

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti

Ilija Guteša

POVEZANOST AQP3, AQP5, NRF2 I FOXO1 S RAZVOJEM REZISTENCIJE
KOD HER2 POZITIVNIH I TROSTRUKO NEGATIVNIH TUMORA DOJKE

Doktorski rad

Osijek 2026.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: temeljne medicinske znanosti, biologija

POVEZANOST AQP3, AQP5, NRF2 I FOXO1 S RAZVOJEM REZISTENCIJE KOD HER2 POZITIVNIH I TROSTRUKO NEGATIVNIH TUMORA DOJKE

Ilija Guteša

Doktorski rad je izrađen u: KBC Sestre milosrdnice, Klinika za tumore i Institutu Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor 1: Doc. dr.sc. Ana Čipak Gašparović, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković
Mentor 2: Prim. dr. sc. Sanda Bubanović, KBC Sestre milosrdnice, Klinika za tumore

Kratki sažetak doktorskog rada:

Rezistencija na sustavno liječenje glavni je uzrok napredovanja karcinoma i smrtnog ishoda. U ovom istraživanju usporedili smo ekspresiju akvaporina 3 i 5 te transkripcijskih faktora NRF2 i FOXO1 prije i poslije neoadjuvantnog sustavnog liječenja kod agresivnijih tumora dojke, trostruko negativnih i HER2 pozitivnih tumora dojke. Rezultati su pokazali povišenu ekspresiju i akvaporina i NRF2 u ostatnim tumorima nakon sustavne terapije, što ukazuje na značajnu ulogu ovih molekula u proliferaciji i preživljavanju tumorskih stanica. U stromi je dokazan porast izražajnosti AQP5 i NRF2 nakon terapije, što bi moglo ukazivati na njegovu ključnu ulogu u reakciji stromalnih stanica na terapiju. Promjene akvaporina 3 i 5 i NRF2 mogle bi se koristiti kao temelj daljnjih istraživanja ovih biomolekula kao prognostičkih pokazatelja, biomarkera personaliziranog liječenja, ali i kao ciljnih molekula čijom bi se modulacijom postigao bolji terapijski odgovor u liječenju raka dojke.

Broj stranica: 121

Broj slika: 16

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 417

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: karcinom dojke, neoadjuvantna kemoterapija, akvaporini, oksidacijski stres, NRF2, FOXO1

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: basic medical sciences, biology

THE ASSOCIATION OF AQP3 AND AQP5 WITH THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE IN HER2 POSITIVE AND TRIPLE NEGATIVE BREAST TUMORS

Ilija Guteša

Thesis performed at: CHC Sestre milosrdnice, University Hospital for Tumors and Ruđer Bošković Institute

Supervisor 1: Ana Čipak Gašparović, PhD, senior scientist, Ruđer Bošković Institute

Supervisor 2: Sanda Bubanović, PhD, MD, CHC Sestre milosrdnice, University Hospital for Tumors

Short abstract:

(The main cause of cancer progression and mortality is the resistance to systemic therapy. Here, we examined the expression of aquaporins 3 and 5, NRF2 and FOXO1 before and after neoadjuvant systemic therapy in more aggressive breast tumors, specifically triple-negative and HER2-positive breast cancers. We observed increased expression of both aquaporins and NRF2 in residual tumors following systemic therapy, suggesting their role in tumor cell proliferation and survival. In the stroma, an increase in AQP5 and NRF2 expression was also observed after therapy, which may indicate a role in the stromal cell response to treatment. Changes in aquaporins 3 and 5 and NRF2 imply to a need for further research of these molecules as prognostic indicators, biomarkers for personalized treatment and potential therapeutic targets whose modulation may improve therapeutic response in breast cancer treatment.

Number of pages: 121

Number of figures: 16

Number of tables: 2

Number of references: 417

Original in: Croatian

Key words: breast cancer, neoadjuvant, aquaporines, oxidative stress, NRF2, FOXO1

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

Mojoj *mentorici* i *komentorici* na pomoći, podršci i svemu što sam uz njih naučio.

Mojoj *supruzi* na razumijevanju i strpljenju tijekom pisanja ovog doktorata.

I na kraju, *Janu* — kojem sam ovim doktoratom uzeo puno vremena za igru. Nadoknadit ćemo sve.

Sadržaj

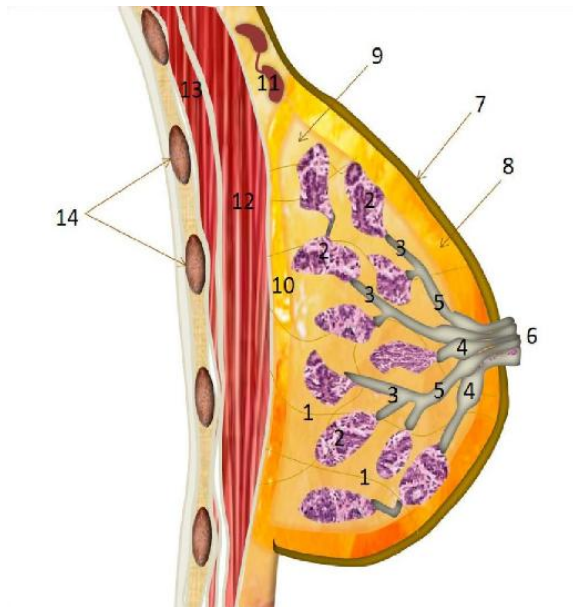
Ilija Guteša	1
Doktorski rad	1
Osijek 2026	1
1. UVOD	1
1.1. Anatomija i fiziologija dojke	1
1.2. Tumori	2
1.2.1. Klasifikacija tumora	2
1.2.2. Geni uključeni u malignu transformaciju	3
1.2.3. Obilježja raka	4
1.2.4. Karcinom dojke	13
1.3. Oksidacijski stres	22
1.3.1. Regulacija antioksidacijske zaštite	24
1.3.2. Oksidacijski stres i antioksidacijska zaštita kod raka	25
1.3.3. Akvaporini	26
1.3.5. FOXO	39
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	43
3. MATERIJALI I METODE	44
3.1. Ustroj istraživanja	44
3.2. Dozvola Etičkog povjerenstva	44
3.3. Ispitanici	45
3.4. Metode	45
3.4.1. Uzimanje i obrada uzoraka	45
3.4.2. Imunohistokemijsko bojenje	46
3.4.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka	48
3.5. Statistička analiza	48
4. REZULTATI	50
4.1. Izražajnost FOXO1 u tumorima dojke	50
4.2. Izražajnost AQP3 i AQP5 u tumoru dojke	51
4.2.1. Izražajnost akvaporina u odnosu na odgovor na terapiju	51
4.2.2. Izražajnost akvaporina u odnosu na imunofenotip	53
4.2.3. Izražajnost akvaporina u odnosu na odgovor na terapiju kod HER2 pozitivnih tumora dojke i kod trostruko negativnih tumora dojke	56
4.3. Izražajnost NRF2 u tumoru dojke	58
4.3.1. Izražajnost NRF2 u odnosu na odgovor na terapiju	58

4.3.2. Izražajnost NRF2 u odnosu na imunofenotip tumora	60
4.4. Analiza korelacija	61
5. RASPRAVA	66
6. ZAKLJUČCI.....	81
7. SAŽETAK	83
8. SUMMARY	84
9. LITERATURA	86
10. ŽIVOTOPIS DOKTORANDA.....	118
11. POPIS PUBLIKACIJA DOKTORANDA	119

1. UVOD

1.1. Anatomija i fiziologija dojke

Dojka je žljezdani organ, građen od žljezdanog, vezivnog i masnog tkiva (Slika 1). Nalazi se na grudnom košu, vezana za pektoralni mišić vezivnim tračcima koji se nazivaju Cooperovi ligamenti. Oko žljezdanog tkiva nalaze se režnjići masnog tkiva, odgovorni za mekanu konzistenciju dojke (1).



Slika 1. Građa dojke. 1. Cooperovi ligamenti; 2. lobuli; 3. ekstralobularni kanalići; 4. ampula; 5. glavni kanalići; 6. bradavica; 7. koža; 8. potkožno masno tkivo; 9. masno tkivo unutar dojke; 10. retromamarno masno tkivo; 11. limfni čvorovi; 12. veliki pektoralni mišić; 13. mali pektoralni mišić; 14. rebra.

Preuzeto s <https://ultrasoundregistryreview.com/BreastTrial4.html>

Areola, bradavica i završni dio mliječnog kanala obloženi su mnogoslojnim pločastim epitelom. Prema periferno epitel prelazi u višeslojni cilindrični, a potom u niski dvoredni kubični epitel. Kanalići i režnjići obloženi su s dva tipa stanica, mioepitelnim stanicama koje se nalaze na bazalnoj membrani i pomažu u sekreciji mlijeka te epitelnim stanicama koje oblažu lumen. Mioepitelne stanice imaju i važnu ulogu u održanju normalne strukture i funkcije

režnjića i bazalne membrane. Mlijeko proizvode luminalne stanice terminalnih kanalića i režnjića, za razliku od obloženih stanica većih kanala.

Dojke kod žena počinju rasti u pubertetu, s početkom proizvodnje estrogena i progesterona. S nastupom puberteta počinju ovulacije, koje su u početku nedovršene, zbog čega se stvara manja količina progesterona. Tada estrogen ima primarnu ulogu u proliferaciji stanica i povećanju tkiva dojke. Razvija se razgranati sustav kanalića, povećava se perikanalikularno vezivno tkivo, prokrvljenost, a odlažu se i masti u stanice. Postupno nastaju potpune ovulacije te dolazi do stvaranja progesterona, koji je odgovoran za povećavanje, dijeljenje i sekrecijska svojstva žljezdanih stanica. Time se dojke dodatno povećavaju. Na rast kanalića utječu još četiri hormona: hormon rasta, prolaktin, glukokortikoidi i inzulin. Obzirom da u muškaraca nema hormonske stimulacije kao u žena, u muškoj se dojci mogu naći samo kanalići, bez režnjića. Mjesečne cikličke hormonske promjene u žena izazivaju promjene na tkivu dojke koje također prolazi kroz faze proliferacije i propadanja (apoptoze). Trudnoća i dojenje također mijenjaju tkivo dojke. Kada nastupi menopauza, prestaje stvaranje estrogena i progesterona iz jajnika te dolazi do involutivnih promjena u dojnama. Smanjuje se udio žljezdanog tkiva na račun masnog tkiva, a ostaje samo nekoliko atrofičnih izvodnih kanala (2). Žene s ranom prvom menstruacijom, kasnom menopauzom ili kasnom prvom trudnoćom dulje su izložene promjenjivim razinama estrogena, zbog čega imaju veći rizik za razvoj karcinoma dojke. Povećan je rizik i u žena koje su produljeno izložene vanjskim estrogenima u obliku oralnih kontraceptiva ili hormonskog nadomjesnog liječenja (3).

1.2. Tumori

1.2.1. Klasifikacija tumora

Pojam tumor dolazi iz latinskog jezika, a u direktnom prijevodu označava svaku oteklinu. Danas se tumorima smatraju patološke tvorbe koje karakterizira neorganizirani, autonomni, nesvrhoviti i parazitni rast.

Klinički se tumori mogu grubo podijeliti u dobroćudne i zloćudne. Dobroćudni (benigni) tumori rastu polako, ekspanzivno, oštro su ograničeni i dobro prokrvljeni. Građeni su od dobro diferenciranih stanica sličnih stanicama normalnog tkiva. Nakon radikalnog kirurškog zahvata

ne recidiviraju i najčešće imaju dobru prognozu (4). Zloćudne (maligne) tumore karakterizira nepravilan oblik, brži i infiltrativan rast, direktno širenje u okolna tkiva, a moguće je i širenje krvlju ili limfom u udaljene organe (metastaziranje). Češće recidiviraju, a građeni su od stanica koje često ne nalikuju na zdrave stanice tkiva iz kojih je tumor nastao. Često se vide brojne mitoze, nekroza i kalcifikacije (4).

1.2.2. Geni uključeni u malignu transformaciju

Nastanak tumora i njegova obilježja vezni su uz promjenu ekspresije gena i/ili njihove mutacije. Kod gena razlikujemo onkogene i tumor supresore. Onkogeni su geni čijom aktivacijom nastaju tumori, dok su tumor supresori geni čijom inaktivacijom nastaju tumori. Među prvim otkrivenim onkogenima su geni karcinogenih virusa, no kasnije je otkriveno da mogu nastati i mutacijama normalnih staničnih gena. Aktivacija onkogenata može nastati zbog točkastih mutacija, translokacija, delecije/insercije više baza ili amplifikacije. Produkti ovih gena imaju normalne fiziološke uloge, poput regulacije rasta stanice i diobe, a njihova nekontrolirana aktivacija uzrokuje autonomni rast tumorskih stanica. Među njih spadaju 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 diobe stanice (ciklini) te transkripcijski faktori (FOS-JUN, MYB) (5).

Tumor supresori su geni koji imaju fiziološku ulogu zaustavljanja rasta i proliferacije. Ukoliko se takvi geni inaktiviraju delecijom ili prestanu funkcionirati zbog mutacije, može nastati maligna transformacija. Gubitak tumorsupresorskog gena se manifestira kao gubitak heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity, LOH) iz razloga što se nasljeđuju recesivno (6). Najpoznatiji tumor supresor je *RB-1*. Ukoliko su oba gena *RB-1* mutirana, kod djece nastaje retinoblastom (7). Kod sporadičnih tumora, *de novo* mutacija nastala je na oba gena.

Posebno je značajan tumor supresor je *TP53*, budući da se njegova mutacija, kao i mutacije gena koji ga reguliraju mogu pronaći u velikom broju ljudskih tumora (8). Jedna od glavnih uloga pTP53 je kontrola prijelaza stanice iz G1 u S fazu. Ukoliko postoji mutacija oba *TP53* gena, izostaje kontrola staničnog ciklusa te stanica prelazi u mitozu bez obzira na oštećenje genoma, što je preduvjet za nastanak tumora (9).

Uz onkogene i tumor supresore, za nastanak tumora bitni su i geni koji kontroliraju apoptozu, programiranu smrt stanice. Apoptoza je važan homeostatski mehanizam kojim se održava ravnoteža između novonastalih i starih stanica (10). Tumori koji nastaju zbog nefunkcionalne apoptoze ne pokazuju ubrzano dijeljenje stanica te rastu sporije zbog nakupljanja stanica koje su izbjegle staničnu smrt (11).

Nezaobilazni geni u nastanku tumora su i geni koji sudjeluju u popravku DNA. Ukoliko se oštećenja DNA ne poprave prije ulaska u mitozu, ona se prenose na sljedeći red stanica te nastaje maligna proliferacija. Predstavnici gena koji kontroliraju popravak DNA su *BRCA1* i *BRCA2* tumorsupresorski geni. Nositelji njihovih mutacija imaju doživotni rizika za rak dojke između 41 i 90 posto, uz povećan rizik kontralateralne bolesti (12–14). Nositelji *mBRCA1/2* varijanti imaju značajno povišen rizik i za nastanak drugih vrsta raka, kao što su rak jajnika, rak prostate, ali i rak gušterače (15,16).

1.2.3. Obilježja raka

Biološki, tumor ima obilježja koja ga izdvajaju od normalnih, netransformiranih stanica. 2001. godine Hanahan i Weinberg predložili su prvih šest obilježja raka, odnosno karakteristika koje stanice dobivaju pri malignoj transformaciji (17). To su:

- Neograničena sposobnost replikacije
- Samodostatnost signala za proliferaciju
- Zaobilazanje antiproliferativnih signala
- Izbjegavanje apoptoze
- Održana angiogeneza
- Invazija tkiva i metastaziranje

Isti autori su 2011. dodali još dva obilježja raka :

- reprogramiranje staničnog metabolizma
- izbjegavanje imunološkog odgovora

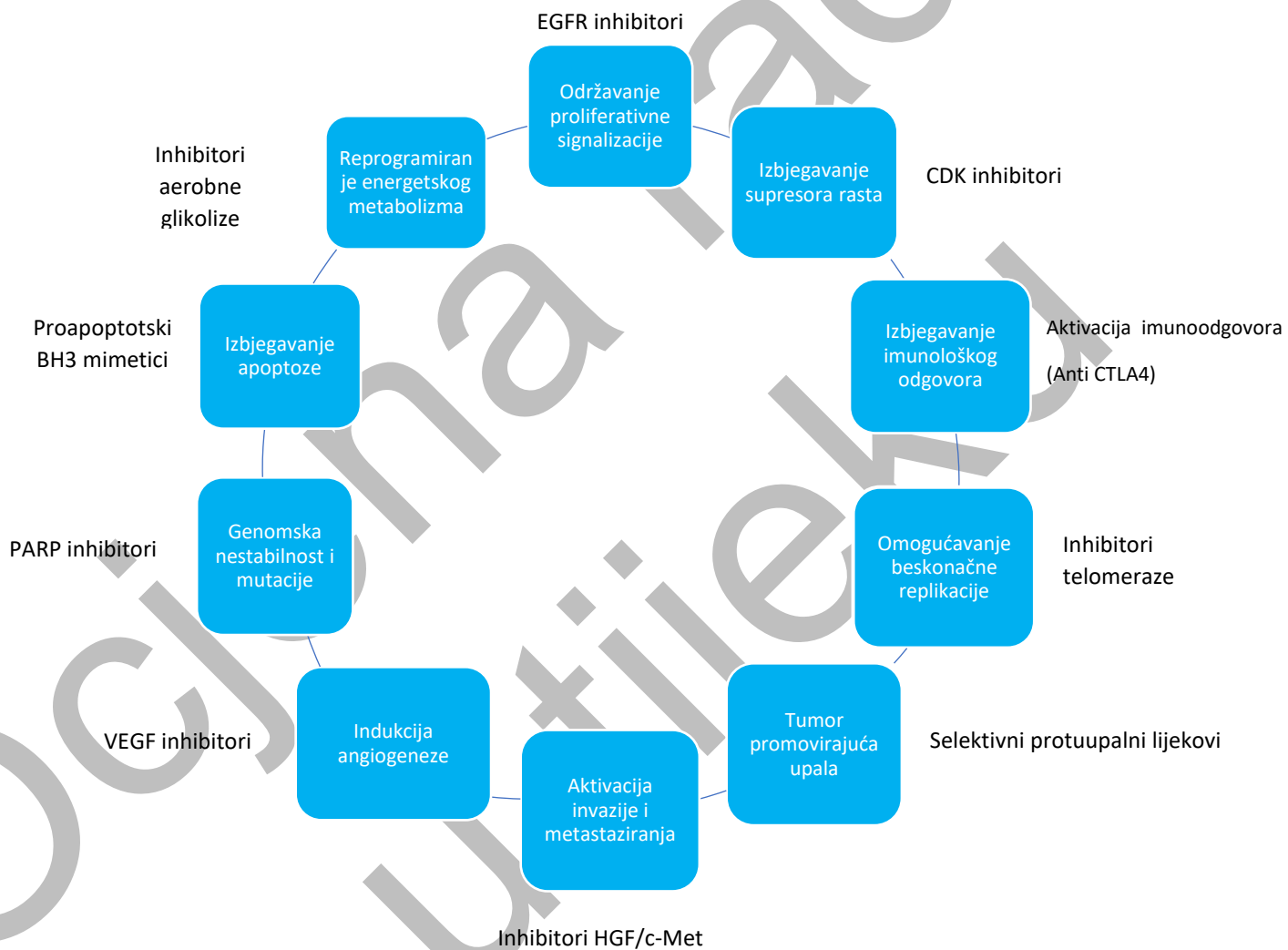
i dvije omogućujuće karakteristike:

- genomska nestabilnost i mutabilnost

- tumor promovirajuća upala (18)

Zahvaljujući novim otkrićima iz područja karcinogeneze i terapije tumora, Hanahan je 2022. godine predložio još četiri obilježja maligne transformacije (Slika 2):

- otključavanje fenotipske plastičnosti
- nemutacijsko epigenetsko reprogramiranje
- polimorfni mikrobiomi
- stare (senescentne) stanice (19)



Slika 2. Obilježja raka i terapijske implikacije, prilagođeno iz Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions (19)

1.2.3.1. Održavanje proliferativne signalizacije

Najvažnija karakteristika malignih tumora je sposobnost održavanja kontinuirane proliferacije. Signalizacija proliferacije u normalnom tkivu odvija se najvećim dijelom putem faktora rasta koji se vežu na receptore na površini stanice, koji intracelularno sadrže domen s tirozin kinazom kojom se dalje signal prenosi do jezgre, gdje se inducira rast stanice i ulazak u mitozu (20,21). Signalizacija se odvija i između obližnjih stanica (parakrina signalizacija). Kod tumorskih stanica mitogena signalizacija odvija se proizvodnjom vlastitih hormona rasta, ekspresijom dodatnih receptora za faktore rasta te slanjem signala okolnim zdravim stanicama koje potom opskrbljuju tumorske stanice raznim faktorima rasta (22,23). Moguće su i strukturne promjene receptora koje omogućuju „automatski“ prijenos signala neovisno o ligandu (24). Neovisnost o faktorima rasta tumorske stanice mogu postići i konstitutivnom aktivacijom signalnih molekula koje se nalaze niže u signalnom putu (npr. Ras).

1.2.3.2. Izbjegavanje supresora rasta

Tumor supresori sprječavaju proliferaciju stanica. Među prvim opisanim tumor supresorima su RB1 (retinoblastom) i TP53 protein. U normalnim uvjetima djeluju kao središnji čvorovi koji, prikupivši signale iz okoline, odlučuju hoće li stanica ići u proliferaciju ili u smjeru senescentnosti/apoptoze. Ova dva sustava su komplementarna, budući da RB protein prima uglavnom ekstracelularne signale, dok TP53 prima signale iz unutrašnjosti stanice. Ukoliko su uvjeti unutar stanice suboptimalni, TP53 može zaustaviti proliferaciju, a ukoliko su oštećenja genoma prevelika, TP53 će stanicu usmjeriti prema apoptozi (25–27).

Sprječavanje proliferacije usko povezanih stanica (kontaktna inhibicija) također je uvjet za homeostazu tkiva. NF2 gen i njegov produkt Merlin upravljaju kontaktnom inhibicijom učvršćivanjem veza adhezijskih molekula poput E cadherina (28).

1.2.3.3. Izbjegavanje apoptoze, autofagija i nekroza

Apoptoza, programirana smrt stanice, prirodna je barijera karcinogeneze. Apoptotske mehanizme čine regulatori i efektorske komponente. Regulatori poput Fas liganda/receptora primaju ekstracelularne proapoptotske signale (ekstrinzični program), dok drugi regulatori, poput TP53 primaju intracelularne signale (intrinzični program). Oba programa aktiviraju proteaze (kaspaze 8 i 9) koje nastavljaju proteolizu koja rezultira efektorskim kaspazama koje

dovode do završne faze apoptoze – rastavljanja stanice i fagocitoze njenih ostataka. Intrinzični apoptotski program smatra se značajnijom barijerom karcinogeneze (18,29).

Najpoznatiji mehanizam izbjegavanja apoptoze je isključivanje TP53. Mogući su i drugi načini - isključivanje proapoptotskih faktora (Bax, Bim, Puma), povišena ekspresija antiapoptotskih faktora (Bcl-2, Bcl XL) ili signala preživljenja (IGF1/2) (18,30).

Autofagija je mehanizam kojim stanica u stanjima stresa (npr. nutritivni deficit) razgrađuje svoje komponente kako bi ih iskoristila za nove biosinteze ili energiju. Autofagosomi obavijaju stanične strukture poput ribosoma i mitohondrija, nakon čega se spajaju s lizosomima gdje se stanične komponente razgrađuju na metabolite niže molekularne mase. Tumorske stanice pod velikom razinom stresa (sustavna terapija) mogu zahvaljujući autofagiji ući u stanje reverzibilnog mirovanja (31,32).

Nekroza je dugo smatrana nekontroliranom smrću stanice, no dokazi upućuju da i kod nje postoji određena razina genetske kontrole. Prilikom nekroze stanica puca, a njezin sadržaj se oslobađa u tkivo (33), što dovodi do mobilizacije upalnih stanica. Upalne stanice imaju sposobnost poticanja angiogeneze, proliferacije i invazivnosti i tako mogu sudjelovati u rastu tumora (34).

1.2.3.4. Omogućavanje beskonačne proliferacije (replikativnosti)

U normalnim stanicama postoje dvije barijere proliferaciji - senescentnost i kriza. Senescentnost je starenje stanice u kojem stanica ostaje živa, ali gubi mogućnost dijeljenja. Kriza završava staničnom smrću. Vrlo rijetko, stanice izlaze iz krize i dobivaju neograničeni replikacijski potencijal, što se naziva imortalizacijom. U tome ključnu ulogu imaju telomere, završeci kromosoma koji se u normalnim uvjetima pri svakoj diobi skraćuju, sve do kritične razine kada više ne mogu zaštititi kromosomsku DNA od fuzije sa susjednim kromosomom. Kritično skraćenje telomere inducira ulazak stanice u krizu/apoptozu. Telomeraza je specijalizirana DNA polimeraza koja produljuje telomere te je gotovo odsutna u normalnim stanicama, no u stanicama koje su imortalizirane pokazuje visoku aktivnost, čineći ih otpornim na indukciju senescentnosti i apoptoze (53). Odsutnost TP53 i njegova nadzora nad integritetom genoma dovodi do loma i fuzija kromosoma, što uzrokuje delecije i amplifikacije segmenta genoma i stjecanja veće količine onkogena te disfunkcije tumor supresora. Smatra se da „uspješne“ tumorske stanice u početku koriste nisku razinu telomeraza za skraćenje telomera te nastanak fuzija kromosoma kojima dobivaju veće količine onkogena i deleciju

tumor supresora, a da potom povećavaju aktivnost telomerase s ciljem održavanja telomera i imortalizacije (18).

1.2.3.5. Indukcija angiogeneze

Angiogeneza se u određenim fiziološkim uvjetima (cijeljenje, menstrualni ciklus) uključuje i potom isključuje, a kod tumora je gotovo kontinuirano aktivna (35). Uključivanje i isključivanje angiogeneze je pod kontrolom regulatora, od kojih su najpoznatiji vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A) i trombospondin-1 (TSP-1) (36–38). Tumorsku angiogenezu karakterizira disbalans navedenih faktora zbog čega nastaju aberantne, tortuotične i razgranate krvne žile s krvarenjima te abnormalnim razinama proliferacije i apoptoze (39). Angiogeni zaokret započinje rano u razvoju raka, već na razinama displazije i karcinoma in situ (35,40).

1.2.3.6. Aktivacija invazije i metastaziranja

Invazija i metastaziranje ključni su za širenje tumora u okolna tkiva i udaljene organe. Kaskada invazije i metastaziranja započinje invazijom kroz bazalnu membranu, nakon čega slijede intravazacija (ulazak u krvne/limfne žile), ekstravazacija (izlazak iz žila u udaljeno tkivo), formiranje mikrometastaza i na kraju kolonizacija (razvoj udaljenih makroskopskih tumora) (41).

Za invaziju i metastaziranje karcinoma ključan je program epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) stanica, što omogućuje invaziju, izbjegavanje apoptoze i diseminaciju (42). EMT je izraženija na rubovima tumora (43), a karakteriziraju je gubitak čvrstih veza, prelazak stanica iz poligonalno/epitelnog oblika u nazubljeno/fibroblastni oblik, izraženost enzima za degradaciju izvanstaničnog matriksa, povećana pokretljivost te povišena otpornost prema apoptozi. U proces su uključeni transkripcijski faktori poput Snail, Slug, Twist i Zeb1/2 (83). Osim procesa EMT, za invaziju i metastaziranje vrlo je važna heterotipna signalizacija, odnosno komunikacija malignih i okolnih stromalnih stanica (44–47).

Tumorske stanice u udaljenim tkivima prolaze obrnuti proces – mezenhimalno epitelnu tranziciju (MET), ponovno poprimajući fenotip stanica primarnog tumora (48). Takav fenotip omogućuje im kolonizaciju, za koju je ključna aktivacija angiogeneze. Upravo se nesposobnost aktivacije angiogeneze smatra razlogom što mnoge mikrometastaze nikad ne uspiju formirati makroskopske tvorbe (49,50). Adaptacija tumorskih stanica na uvjete u novoj okolini očituje se kroz autofagiju kojom tumorske stanice ulaze u stanje mirovanja do pojave boljih okolišnih

uvjeta (51,52). Mirovanje mikrometastaza može biti i posljedica lokalnih supresora (53) i tumor-supresorskog djelovanja imunološkog sustava (50,54).

Dokazano je da se stanice mogu proširiti i iz premalignih lezija (55,56), kao i iz primarnih tumora koji nisu jasno invazivni, ali posjeduju neovaskularizaciju niskog integriteta lumena (57). Postoje naznake da su neka tkiva sklonija prihvaćanju određenih tipova tumora (41,58), pri čemu je nužna potpora lokalnih stromalnih stanica. Stanice iz metastatskih kolonija mogu se također proširiti dalje, kao i vratiti u primarno sijelo (59).

1.2.3.7. Genomska nestabilnost i mutacije

Povećani broj mutacija u genomu tumorskih stanica postiže se povećanjem osjetljivosti na mutagene agense, oštećenjem mehanizama za održavanje genomske stabilnosti, kompromitiranjem nadzornih sustava koji u slučajevima značajnog genetskog oštećenja usmjeravaju stanicu prema senescentnosti ili apoptozi (60,61). Ovdje je ključna uloga TP53, koji je stoga često nazvan čuvarom genoma (62). Mehanizmi održavanja genoma uključuju: otkrivanje oštećenja DNA i aktivacija mehanizama popravka, direktan popravak DNA i inaktivaciju ili presretanje mutagenih molekula prije oštećenja DNA (60,63,64).

Genomska nestabilnost može se postići direktnim mutacijama ili epigenetskom represijom gena odgovornih za navedene mehanizme. Mutacije tih gena kod miševa izazvale su povećanu incidenciju malignih tumora (65). Gubitak telomerne DNA stvara nestabilnost kariotipa, s posljedičnim delecijama i amplifikacijama segmenata kromosoma. Obzirom da se aberacije kod tumora često pojavljuju na sličnim mjestima, smatra se da su upravo mutacije na tim genima ključne za karcinogenezu (66). Iako su mutacije kod tumora vrlo raznolike, nove tehnologije sekvencioniranja DNA omogućuju prepoznavanje sve većeg broja mutacija povezanih s određenim tipovima tumora, te grupiranje takvih mutacija u panele.

1.2.3.8. Tumor promovirajuća upala

Iako je primarni cilj imunološkog odgovora uništenje tumora, postoje dokazi da imunološki odgovor može potpomognuti karcinogenezu i progresiju tumora. Upala podupire karcinogenezu faktorima rasta, preživljenja, proangiogenim faktorima, enzimima za remodeliranje ECM-a koji omogućuju angiogenezu, invaziju i metastaziranje te indukcijskim signalima za EMT (44,67,68). Osim toga, upalne stanice mogu stvarati reaktivne kisikove vrste (ROS) koje su aktivno mutagene i mogu ubrzati malignu alteraciju (68).

1.2.3.9. Reprogramiranje energetskeg metabolizma

Reprogramiranje metabolizma energije tumorskim je stanicama potrebno kako bi zadovoljile energetske potrebe za rast stanice i diobe. Unatoč prisutnosti kisika, tumorske stanice se za dobivanje energije najviše koriste glikolizom, zbog čega se navedeni proces naziva aerobnom glikolizom (69). Na taj način dobiva se 18 puta manja količina ATP-a u odnosu na normalan proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Povišena glikoliza kod tumora povezana je s aktivacijom nekih onkogenata, poput RAS i MYC, i mutiranih tumor supresora (TP53) (70,71). Oslanjanje na glikolizu posebno je vidljivo u stanjima hipoksije, koja je česta kod malignih tumora. Pretpostavlja se da sklonost tumorskih stanica glikolizi ima podlogu u metabolitima glikolize, koje tumorska stanica koristi za biosintezu makromolekula i organela potrebnih za diobu.

1.2.3.10. Izbjegavanje imunološkog odgovora

Smatra se da u normalnim uvjetima imunološki sustav kontinuirano nadzire tkiva te prepoznaje i rano uništava tumorske stanice. Prema toj teoriji, tumor nastaje kada imunološki sustav ne prepozna tumorske stanice. Ovu teoriju podupiru dokazi o povećanoj incidenciji nekih tumora kod imunokompromitiranih osoba (72). Kod miševa kojima je genetskim inženjeringom odstranjena neka komponenta imunološkog sustava, dokazana je veća incidencija i brži rast tumora. Primjeri stanica koje su isključivane su CD8 citotoksični limfociti T (CTL), CD4 pozitivni TH1 (T helperi tipa 1) i natural killer (NK stanice). Kod stanica kod kojih su isključene dvije populacije stanica, npr T stanice i NK stanice incidencija tumora bila je još veća (54,73). Na kliničkoj razini, pacijentici s karcinomom kolona i jajnika kod kojih je pronađena visoka razina infiltracije CTL-ima i NK stanicama imaju bolju prognozu (74,75).

1.2.3.11. Mikrookoliš tumora

Osim samih tumorskih stanica i tumorskih matičnih stanica, postoji niz stanica koje na razne načine pridonose tumorogenezi, a nalaze se u okolini tumora u tkivu koje se kod karcinoma naziva stroma. Stromalne stanice tumora mogu imati izvor u netumorskim stromalnim stanicama, matičnim/progenitornim stanicama strome i stanicama koštane srži (76,77).

Tumorske matične stanice mogu nastati dediferencijacijom progenitornih stanica ili iz normalnih matičnih stanica. Zbog sporog staničnog ciklusa rezistentnije su na standardne

citostatike te su u stanju regenerirati tumor nakon kemoterapije (78). Dediferencijacija omogućuje da tumorska stanica preuzme potpuno drugačiji fenotip. U tumorima se zbog brojnih mutacija mogu pronaći i genetski heterogene stanice (79), što dodatno komplicira ciljanu terapiju tumora.

Endotelne stanice prolaskom kroz angiogeni zaokret ulaze u proliferativnu fazu i stvaraju nove krvne žile. Periciti su specijalizirane mezenhimalne stanice koje daju potporu endotelnim stanicama. Kada kod tumora takva potpora izostane, krvne žile postaju nestabilne, što olakšava hematogenu diseminaciju (80).

Imunološke stanice mogu suzbijati ili poticati rast tumora. U karcinogenezi mogu sudjelovati sekrecijom brojnih signalnih molekula - faktora rasta (EGF, VEGF), kemokina i citokina koji potiču upalno stanje te enzima za razgradnju matriksa - metaloproteinaza, cistein katepsin proteaza i heparanaza (44,81).

Fibroblasti povezani s tumorima su stanice slične fibroblastima i miofibroblasti, a pomažu u karcinogenezi pri proliferaciji, angiogenezi, invaziji i metastaziranju (82–84).

Senescentnost je u normalnim uvjetima ireverzibilno stanje u kojima stanica izgubi mogućnost daljnjeg dijeljenja, mijenja morfologiju i metabolizam te aktivira sekretorni fenotip (SASP od engl. *Senescence Associated Secretory Phenotype*), koji stanici omogućuje sekreciju kemokina, citokina i proteaza (85–87). Senescentnost mogu inducirati mikrookolišni faktori poput manjka nutrijenata, oštećenja DNA, organela ili infrastrukture stanice, te disbalans signalizacije stanice. Sa starenjem se u nekim organima udio senescentnih stanica značajno povećava (88,89).

Kod SASP-a, senescentne stanice mogu poticati rast tumora parakrinom sekrecijom signalnih molekula koje izazivaju rast tumora, invaziju, metastaziranje, kao i supresiju protutumorske imunosti (86,88,90,91). Tumorske stanice mogu pokazati i reverzibilnu senescentnost, odnosno vratiti se u stanje u kojem je moguća daljnja proliferacija. Takva reverzibilna senescentnost jedan je od mehanizama razvoja terapijske rezistencije (92).

Mikrookolišem tumora upravlja heterotipna signalizacija. Početne tumorske stanice započinju signalizaciju aktivacijom stromalnih stanica, koje zauzvrat tumorskim stanicama pružaju potporu faktorima rasta, kemokinima, citokinima i enzimima razgradnje matriksa. Ova je interakcija važna za rast tumora, invaziju i kolonizaciju metastaza. Smatra se da su neka tkiva i organi skloniji prihvatu nekih tipova tumora (41) te da primarni tumor može pripremiti metastatsko sjelo otpuštanjem citokina i kemokina u sustavnu cirkulaciju (58).

1.2.3.12. Otključavanje plastičnosti fenotipa

Proces diferencijacije stanice završava konačnim stanjem diferenciranosti, bez mogućnosti dediferencijacije. Otključavanje fenotipne plastičnosti nužno je za nastanak tumorske stanice (93), a može se dogoditi na tri načina: dediferencijacijom normalne stanice prema progenitornoj stanici, nastankom tumorske stanice blokadom diferencijacije progenitorne stanice ili transdiferencijacijom, odnosno promjenom diferencijacije stanice u novom smjeru. Transdiferencijacija je patohistološki dugo poznata kroz metaplaziju, od čega je najpoznatija metaplazija epitelnih stanica donjeg dijela jednjaka iz pločastih u cilindrične, pod utjecajem želučane kiseline (Barettov jednjak) (93).

1.2.3.13. Epigenetsko reprogramiranje

Epigenetska regulacija je nemutacijska promjena na DNA, a kod normalnih stanica posebno je važna u embrionalnom razvoju, diferencijaciji i organogenezi (94–96). Kod karcinogeneze epigenetsko reprogramiranje nužno je za promjenu epigenoma i prilagodbu stanica negativnim mikrokolišnim uvjetima, poput hipoksije (97) i manjka nutrijenata (98). Na rubu tumora mikrokolišni uvjeti uzrokuju epigenetske promjene koje održavaju EMT u fenotipu invazivnosti (99). Tumorske stanice različitim tvarima i fizikalnim uvjetima uzrokuju epigenetsko reprogramiranje stanica strome koje tada vlastitom sekrecijom potiču daljnji razvoj tumora (100).

1.2.3.14. Polimorfni mikrobiomi

Ekosustav mikroorganizama (mikrobiom) unutar organizma ima važan utjecaj na fenotip tumora (101,102). Najčešće ga čini populacija bakterija, koja može imati različit utjecaj na nastanak i razvoj raka, ali i na terapijski učinak. Uloga mikrobioma najbolje je istražena u probavnom sustavu, gdje mikrobiom sudjeluje u metaboličkoj homeostazi te razgradnji i apsorpciji nutrijenata. Poremećaj mikrobioma može uzrokovati razne bolesti (103) te doprinijeti razvoju karcinoma izazivajući mutacije DNA (104), direktnim utjecajem toksina, proizvodnjom liganada koji izazivaju proliferaciju (101), izazivanjem senescentnosti epitelnih stanica i fibroblasta (105), promjenama metabolizma, poticanjem progresije staničnog ciklusa, modifikacijom histona i protumorskom inflamacijom (106). Imunomodulacijska sposobnost bakterija dokazana je na melanomu gdje je transplantacija mikrobiota s

pacijenata koji su pokazali odgovor na imunoterapiju u crijeva pacijenata koji nisu imali odgovor izazvala terapijski odgovor (107).

1.2.4. Karcinom dojke

Izuzev karcinoma kože, karcinom dojke najčešći je maligni tumor u žena te glavni uzrok smrti u žena u razvijenim zemljama (108). Više od milijun žena oboli, a oko pola milijuna žena umre svake godine od raka dojke širom svijeta. Prema procjeni Američkog društva za rak za 2022 godinu, godišnje je 290 tisuća novih dijagnosticiranih raka dojke, a 43 tisuće umire od ove maligne bolesti (109). Na razini Europske unije, incidencija je i dalje najviša u razvijenim zemljama poput Belgije, Finske i Nizozemske, zbog učinkovitog probira i ranog otkrivanja tumora, dok je mortalitet najviši u Slovačkoj i Poljskoj (108). U Hrvatskoj je u 2020. godini zabilježeno 2869 novih slučajeva raka dojke te 722 smrtnih slučajeva zbog raka dojke (110). Za uspješnost liječenja karcinoma dojke ključno je rano otkrivanje. Najčešće se liječi kirurškim zahvatom nakon čega slijede sustavna terapija (hormonska blokada, kemoterapija, bioterapija) i zračenje (111). Način liječenja ovisi o karakteristikama tumora i pacijentice, a agresivniji tumori se sve češće liječe sustavnom terapijom prije kirurškog zahvata (neoadjuvantna sustavna terapija)(112). Kirurški zahvati mogu biti pošteđni ili radikalni, s ili bez rekonstrukcije dojke, a od sustavnog liječenja može se, ovisno o stadiju i tipu tumora, ponuditi konvencionalna kemoterapija, hormonska blokada te pametni lijekovi u obliku imunoterapije ili bioterapije. Nakon pošteđenih operacijskih zahvata ili kod lokalno uznapredovalih tumora provodi se i lokoregionalno zračenje dojke i regionalnih limfnih čvorova (111).

1.2.4.1. Genski faktori u karcinogenezi raka dojke

U genezu raka dojke uključeni su brojni geni, od kojih su najpoznatije mutirane varijante tumorsupresorskih gena *BRCA1* i *BRCA2* (*mBRCA*), koje su odgovorne za 10-15 posto svih karcinoma dojke (15,113).

Postoje specifični obrasci nasljednih karcinoma dojke i jajnika koji su povezani s mutiranim varijantama gena *BRCA1/2*(15,113). Osim toga, dva vrlo rijetka nasljedna sindroma raka također pokazuju povećan rizik za rak dojke - Li-Fraumenijev sindrom (LFS) i Cowdenov sindrom, koji su povezani s mutiranim varijantama gena *TP53*, odnosno *PTEN* (114,115).

PALB2 i *CDH1* također se smatraju genima s visokom prodornošću i sklonošću razvoja raka dojke (116–119). Ovi nasljedni sindromi, osim povećanog rizika za rak dojke, imaju i nekoliko drugih zajedničkih karakteristika. Nastaju iz mutiranih varijanti gena zametnih stanica koje nisu unutar spolno vezanih gena, zbog čega se te varijante mogu naslijediti od bilo kojeg roditelja. Sindromi se povezuju s pojavom i razvojem raka dojke, ali i drugih vrsta raka u ranoj dobi te pokazuju autosomno dominantni tip nasljeđivanja. Osim toga, pojedinci s ovim nasljednim sindromima imaju povećan rizik za višestruke slučajeve ranog početka bolesti kao i bilateralnu bolest. Iako se mutirane varijante povezane s ovim nasljednim sindromima smatraju vrlo prodornima, izražajnost ovih nasljednih sindroma često je varijabilna između pojedinaca unutar jedne obitelji (npr. dob pojave tumora, mjesto tumora, broj primarnih tumora).

Sindrom raka dojke/jajnika povezan s *BRCA*

BRCA1 i *BRCA2* geni kodiraju tumorsupresorske proteine. Nositelji mutiranih varijanti *BRCA1/2* imaju doživotni rizika za rak dojke između 41 i 90 posto, uz povećan rizik kontralateralne bolesti (12–14). Iako *BRCA1/2* mutirane varijante nose doživotni rizik, vjerojatnost razvoja raka u nositelja varira, čak i unutar obitelji s istom varijantom (120). Rak dojke se češće pojavljuje u ranijoj dobi (121). Kod nositelja *mBRCA1* varijanti veća je učestalost trostruko negativnog podtipa (12) (122), a dokazana je i povezanost *mBRCA2* varijante i ER-pozitivnih tumora (12,123,124) no mehanizam te povezanosti još nije poznat. Muškarci koji nose mutirane varijante *BRCA1/2* također imaju veći rizik za nastanak karcinoma dojke u odnosu na opću mušku populaciju (125).

Nositelji *BRCA1/2* mutiranih varijanti imaju značajno povišen rizik i za nastanak drugih vrsta raka, kao što su rak jajnika, rak prostate, ali i rak gušterače (15,16)

Osim *BRCA1/2*, *TP53* i *PTEN*, dokazani su i drugi geni čije se mutacije povezuju s povišenim rizikom za rak dojke i jajnika: *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*, *EPCAM*, *NF1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, i *STK11*. Intervencija u smislu kemoprevencije ili operacije s ciljem redukcije rizika može se preporučiti kada je doživotni rizik veći od onog opće populacije (12%–13% za rak dojke, 1-2 % za rak jajnika) (126–129).

1.2.4.2. Histološka klasifikacija tumora dojke

Unatoč otkriću brojnih rizičnih faktora za nastanak karcinoma dojke, etiologija karcinoma dojke nije u potpunosti razjašnjena, zbog čega primarna prevencija još uvijek nije moguća. Rak dojke je izrazito heterogen te postoji velik broj histoloških tipova. Karcinomi, zloćudni tumori epitelnog porijekla, su najčešće duktalni (70-80 %) i lobularni (5-15 %), ali mogu se pojaviti i rjeđi podtipovi, poput tubularnog, kribriformnog, mucinoznog, medularnog, sekretornog, adenoid cističnog karcinoma i drugih. Također, u dojci se mogu pronaći i tumori neepitelnog porijekla, poput phyllodes tumora, limfoma i sarkoma (130). Prema istraživanju objavljenom 1992. godine, duktalni karcinom *in situ*, kribriformni i tubularni karcinom imaju odličnu prognozu, s desetogodišnjim preživljenjem od 92%, 91% i 90%. Lošiju prognozu imali su mucinozni karcinom (80%), medularni karcinom (51 %), lobularni karcinom (54 %) i duktalni karcinom (47 %) (131). Osim histološkog tipa, glavni prognostički faktori karcinoma dojke su veličina i gradus tumora, te zahvaćenost limfnih čvorova (132).

U novije se vrijeme prognostičke skupine ipak definiraju prema biologiji tumora, odnosno imunohistokemijskim karakteristikama koje upućuju na pojedine genetske tipove tumora (111).

1.2.4.3. Imunofenotip i sustavna terapija karcinoma dojke

Zahvaljujući napretku genetskih analiza i terapijskih opcija raka dojke, na simpoziju u St. Gallenu 2013. godine definirani su imunofenotipovi, odnosno imunohistokemijski surogati genetskih tipova karcinoma dojke, prema izraženosti estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora, receptora za humani epidermalni faktor rast 2 (HER2) i razini ekspresije proliferacijskog indeksa Ki67. Definirane su 4 podskupine karcinoma dojke, luminal A, Luminal B HER2 negativni, Luminal B HER2 pozitivni, non-luminalni HER-2 pozitivni i trostruko negativni tumori (111).

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 Američkog društva za kliničku onkologiju tumori su ER i PR pozitivni ako je najmanje 1% stanica pozitivno na spomenute receptore (133). Prema preporukama istih društava, na svim karcinomima dojke imunohistokemijskom se analizom očitava izraženost transmembranskog proteina HER2 (134). Ako se reakcija očita kao pozitivna, smatra se da te pacijentice imaju HER2 pozitivne tumore. HER2 receptor je prekomjerno izražen u 15 do 20%

svih invazivnih karcinoma dojke (135), a tradicionalno se povezuje s agresivnošću i lošijom prognozom (136).

LUMINALNI TIP A

Ove tumore karakterizira izraženost hormonskih receptora (ER i PR), negativan HER2 receptor te nizak Ki67. Najčešći su, javljaju se češće u starijoj životnoj dobi, često su niskog gradusa i najčešće manje agresivnog kliničkog tijeka. Zbog toga se najčešće liječe samo hormonskom blokadom, a kemoterapija najčešće nije potrebna (111).

LUMINALNI TIP B

Luminal B tumori su ER pozitivni, ali ih karakterizira jedna ili više od sljedećih, manje povoljnih osobina: PR manji od 20 %, Ki67 veći od 20 % ili HER-2 pozitivnost. Prema HER2 statusu dijele se na HER2 pozitivne i HER2 negativne tumore. Karakterizira ih agresivniji tijek i lošija prognoza u odnosu na luminalne A tumore. Liječe se antihormonskom terapijom, a često je potrebna i sustavna citotoksična i anti-HER2 terapija (obuhvaćena u sljedećem poglavlju) (111).

NON LUMINALNI HER2 POZITIVNI

Ovi tumori nemaju izražene ER i PR receptore, ali pokazuju ekspresiju HER2 receptora. Agresivnog su tijeka, često visokog gradusa i niskog stupnja diferenciranosti. Češći su kod mlađih žena (prije 40. godine života), a liječe se sustavnom citotoksičnom terapijom i anti HER2 terapijom.

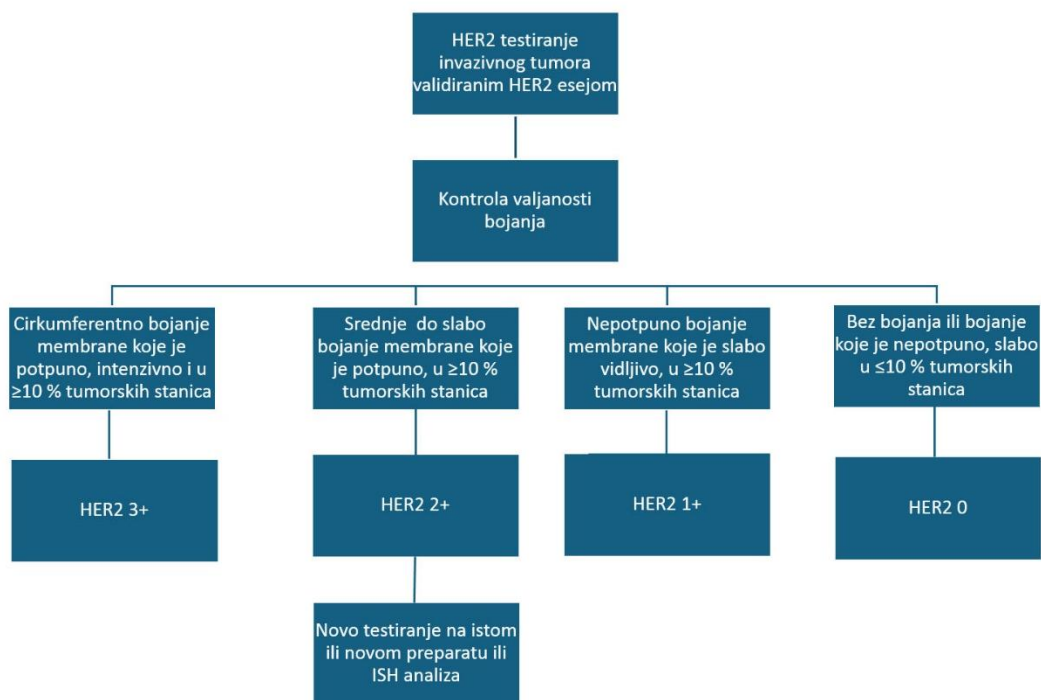
HER2 receptor pripada skupini receptora epidermalnih faktora rasta, zajedno sa HER1, HER3 i HER4 receptorima. HER2 je jedinstven u odnosu na druge članove HER obitelji po sposobnosti konstitutivne dimerizacije bez vezanja liganda. Homodimerizacija ili heterodimerizacija s drugim receptorima epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) dovodi do nizvodne aktivacije više signalnih puteva ključnih za regulaciju funkcije stanice, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i apoptozu. Specifični signalni putevi aktivirani putem fosforilacije uključuju Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT i PLC γ /PKC signalne puteve (137).

Najjači prijenos signala izaziva heterodimer HER2-HER3, osobito putem PI3K/AKT/mTOR puta (138). Dva glavna blokatora HER2 receptora koji se danas koriste u kliničkoj praksi su trastuzumab i pertuzumab.

Prema preporukama Američkog društva za Kliničku onkologiju (eng. American Society of Clinical Oncology - ASCO) i Kolegija američkih patologa (eng. College of American Pathologists - CAP) HER2 status potrebno je utvrditi kod svih pacijentica s invazivnim rakom dojke na temelju jednog ili više rezultata HER2 testa (Slika 3). HER2 je pozitivan kada (promatranjem unutar područja tumora koje iznosi > 10% susjednih i homogenih tumorskih stanica) postoje dokazi o prekomjernoj ekspresiji proteina (IHC) ili amplifikaciji gena (broj kopija HER2 ili omjer HER2/CEP17 pomoću ISH na temelju brojanja najmanje 20 stanica unutar područja).

Imunohistokemija (IHC) 2+ definirana je kao invazivni rak dojke sa slabim do umjerenim potpunim obojenjem membrane uočenim u > 10% tumorskih stanica. U takvim slučajevima potrebno je napraviti refleksno testiranje na istom uzorku ili zatražiti novi uzorak za novo testiranje (IHC ili ISH). IHC 1+ definiran je kao slaba, jedva vidljiva obojenost membrane u preko 10 % tumorskih stanica.

IHC 0 je nalaz bez obojenja ili nekompletna, jedva vidljiva obojanost u manje od 10 % tumorskih stanica (139).



Slika 3. Algoritam HER2 testiranja. Prilagođeno iz Wolf et al (140)

Najčešće korišteni anti-HER2 lijekovi su trastuzumab i pertuzumab. Trastuzumab je bio prvo rekombinantno humanizirano monoklonsko protutijelo koje je dramatično promijenilo liječenje HER2-pozitivnog raka dojke. Trastuzumab se veže na poddomenu IV izvanstanične domene HER2 čime djeluje na HER2 na više razina. Vezanje na monomer HER2 blokira dimerizaciju receptora i aktivaciju nizvodnih signalnih puteva, također, vezanje antitijela blokira proteolitičko cijepanje receptora u aktivniju formu te smanjuje ekspresiju samog receptora (141).

Dodatno, trastuzumab stimulira endocitozu HER2 receptora te izaziva staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima (142). Najozbiljnija nuspojava trastuzumaba je kardiotskičnost koja se povećava kada se trastuzumab kombinira s antraciklinima. Stoga je tijekom i nakon liječenja trastuzumabom nužno praćenje funkcije srca tijekom i nakon liječenja trastuzumabom.

Pertuzumab je također monoklonsko protutijelo usmjereno na HER2 receptor koje pripada klasi inhibitora dimerizacije HER-a. Veže se na različitu domenu HER2 od trastuzumaba (poddomena II), sprječavajući heterodimerizaciju i homodimerizaciju HER2/HER3 (143). Pretkliničke studije (*in vitro* i na modelima ksenografta), pokazale su sinergističke učinke kada se pertuzumab i trastuzumab daju zajedno (144,145). Slično trastuzumabu, učinkovitost pertuzumaba je u početku dokazana u metastatskoj bolesti. Velika randomizirana klinička studija faze III, CLEOPATRA, pokazala je značajno produljenje preživljenja dodatkom pertuzumaba na standardno liječenje docetakselom i trastuzumabom (146,147). Pertuzumab nije kardiotskičan kao trastuzumab, a glavna nuspojava je dijareja (148).

TROSTRUKO NEGATIVAN KARCINOM DOJKE

Trostruko negativni karcinomi dojke (TNBC, od engl. Triple Negative Breast Cancer) su heterogena skupina, a najčešće ih karakterizira agresivan tijek bolesti. Kao što ime sugerira, nemaju izražene ER, PR, niti HER2 receptore. Slabo su diferencirani i često se javljaju kod mlađih žena (prije 40-e godine). Obzirom na nedostatak ciljnih molekula, ne mogu se liječiti ciljanom antihormonskom niti anti-HER2 terapijom. Povezani su s nasljednim (*BRCA1/2*) karcinomom dojke. Zbog visoke proliferacije, često se može očekivati odličan odgovor na kemoterapiju, koja se temelji na cisplatini, antraciklinima i inhibitorima diobe (taksani, PARP inhibitori) (148).

Trostruko negativan rak dojke je u početku doživljavan kao klinički entitet najuže povezan s podtipom sličnom bazalnom koji je definiran početkom 2000-ih godina (149). Ipak, pokazalo se da je TNBC zapravo operativni termin pod kojim se nalazi heterogena skupina tumora koji se razlikuju prema genetskim, patohistološkim i kliničkim karakteristikama (150). U većini slučajeva radi se o agresivnim tumorima, koji su učestaliji u mlađoj dobi (150,151). Najčešći je tip karcinoma dojke kod nositeljica mutacija *BRCA1* (>85 % svih) (152). Unatoč agresivnom tijeku, nekoliko je studija pokazalo da ovi tumori češće ostvaruju potpuni odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju (153,154). Histološki, većina trostruko negativnih tumora su invazivni duktalni karcinomi ne-specijalnog tipa (IDC-NST) (155). Ipak, neki posebni tipovi karcinoma dojke često su trostruko negativnog fenotipa, poput metaplastičnog karcinoma (156), karcinoma s medularnim osobinama (157) i karcinoma s apokrinim osobinama (153,158,159). Svim ovim TNBC-ima zajedničke su karakteristike visok gradus, visoka genetska nestabilnost, kompleksnost genoma i rekurentne *TP53* mutacije (153). Sistematske studije TNBC otkrile su podskupinu tumora niskog gradusa i indolentnog kliničkog ponašanja (160). Iako su vrlo rijetki, njihovi se srodnici mogu pronaći u žlijezdama slinovnicama (161). To su sekretorni karcinom (162), adenoid cistični karcinom (163) i mukoepidermoidni karcinom (164). Iznimka ove grupe je karcinom acinarnih stanica – iako je često niskog gradusa, može progredirati do TNBC visokog gradusa. Acinarni karcinomi dojke imaju mutacije *TP53*, složene genome te su na genetskom nivou vrlo slični mikroglandularnoj adenozi dojke, koja je prekursor TNBC visokog gradusa (161,165). Među vrlo rijetke TNBC spada i karcinom visokih stanica s obrnutim polaritetom (166,167). Sve navedeno dokaz je velike heterogenosti TNBC-a. Stoga su Lehmann i sur. predložili, a kasnije i rafinirali klasifikaciju TNBC-a na genskoj razini (168,169).

Predložena su 4 podtipa: sličan bazalnom tip 1 (engl. basal-like 1, BL1), sličan bazalnom tip 2 (basal-like 2, BL2), mezenhimalni (M) i luminalni androgen receptor (LAR). Ove četiri skupine definirane su specifičnim obrascima ekspresije, a unutar svake skupine varira razina imunomodulatornih infiltrata. BL1 podtip pokazuje povišenu ekspresiju gena koji su uključeni u stanični ciklus i diobu i gena koji sudjeluju u odgovoru na oštećenje DNA. BL2 podtip pokazuje jedinstven genetski profil koji uključuje signaliziranje putem faktora rasta, glikolizu, glukoneogenezu, ekspresiju mioepitelnog markera. M podtip karakterizira povišena ekspresija gena odgovornih za pokretljivost. LAR podtip karakterizira signalizacija androgenskim receptorom, proizvodnja steroida, metabolizam porfirina i metabolizam

androgen-estrogen, unatoč ER negativnosti. U istom razdoblju, 2015. godine, Burstein i sur. definirali su četiri podtipa: LAR, mezenhimalni (MES), imunosuprimirani tumor slični bazalnom (engl. Basal like immunosupressed, BLIS) i imunoaktivirani tumori slični bazalnom (engl. basal-like immunoactivated, BLIA) (170). BLIA tumori su pokazali najbolje preživljenje bez povrata bolesti (engl. Disease Free Survival, DFS), a BLIS najgore. BLIA i BLIS zajednički predstavljaju mnoge tumore slične bazalnom s mutacijom *BRCA1/2* (zametnom ili somatskom)(170–172).

Unatoč brojnim dokazima genetske heterogenosti TNBC-a, standard sustavnog liječenja je i dalje kemoterapija, koja se sve češće aplicira prije operacijskog liječenja. Najčešće se koristi kombinacija antraciklina (adriamicin) i ciklofosfamida u 4-6 ciklusa, nakon čega slijedi 12-tjedna terapija taksanima (paklitaksel). Indikacija za neoadjuvantnu kemoterapiju postavlja se kod većine pacijentica s TNBC koji je veći od 1 cm (T1c i više) ili ima zahvaćen aksilarni limfni čvor (N1-3) (148).

1.2.4.4. Neoadjuvantno i adjuvantno sustavno liječenje

Temeljni cilj kemoterapije, bilo poslijeoperacije (adjuvantne) ili prijeoperacijske (neoadjuvantne) je eradikacija ili kontrola udaljenih metastaza. Iako randomizirana klinička ispitivanja nisu otkrila značajne razlike u dugoročnim ishodima kada se sustavna kemoterapija daje prije ili poslije kirurškog zahvata, postoje neke prednosti i potencijalni nedostaci neoadjuvantne kemoterapije. Prednosti su snižavanje stadija bolesti i omogućavanje operabilnosti ili poštenijeg kirurškog zahvata, dobivanje informacije o djelotvornosti terapije i dobivanje vremena za genetsko testiranje. Identifikacijom pacijentica s ostatnom bolešću nakon neoadjuvantne terapije omogućuje se postoperativna promjena terapije i uvođenje dodatne terapije nakon operacijskog zahvata (173–176). Također, dokazan je prognostički značaj odgovora na neoadjuvantnu terapiju. Naime, kod pacijentica kod kojih je postignut potpuni patohistološki odgovor (pCR, od engl. pathological Complete Response) dokazan je bolji period bez povrata bolesti (eng. Disease Free Survival, DFS) i ukupno preživljenje (engl. Overall Survival, OS), a ta je korelacija upravo najbolja za TNBC (177–179). Ipak, neoadjuvantna sustavna terapija ima i svoje nedostatke, od kojih je najgori progresija bolesti tijekom kemoterapije. Također, moguće je i da se zbog prijeoperacijskog (kliničkog) lažno-višeg stadija aplicira kemoterapija kod pacijentica kod kojih prema poslijeoperacijskom (patohistološkom) stadiju ista ne bi bila potrebna (eng. „overstaging i overtreatment“). Gledano sa znanstvene

strane, posebna prednost neoadjuvantne kemoterapije je dobivanje različitih patohistoloških uzoraka (netretiranih i tretiranih sustavnom terapijom) i testiranje novih biomarkera i njihove dinamike ovisno o terapiji, kao što smo u ovom istraživanju ispitali AQP3, AQP5, NRF2 i FOXO1. U neoadjuvantnom liječenju preferira se nekoliko terapijskih kombinacija, ovisno o imunofenotipu tumora.

Za HER2 pozitivne tumore najčešći je protokol adriamicin+ciklofosfamid (AC) u 4-6 ciklusa nakon čega slijedi 12 tjednih ciklusa paklitaksela u kombinaciji s trastuzumabom koji se aplicira svaka 3 tjedna. Ukoliko ne postoji rezidualna bolest (pCR), nastavlja se s trastuzumabom s ili bez pertuzumaba do ukupno 1 godine terapije. Ukoliko patohistološki nalaz pokaže ostatnu bolest (non-pCR) terapija se nastavlja samo s ado-trastuzumab emtanzinom. Ukoliko se navedeni lijek mora prekinuti zbog toksičnosti, terapija se nastavlja s trastuzumabom ± pertuzumab do ukupno jedne godine terapije. Ukoliko su pri inicijalnoj obradi dokazani zahvaćeni limfni čvorovi (>N0) neoadjuvantno se koristi kombinacija trastuzumaba i pertuzumaba.

Kod HER2 negativnih tumora neoadjuvantno se preferira kombinacija AC u 4-6 ciklusa nakon čega slijedi 12 tjednih paklitaksela. Kod TNBC pacijentica s *BRCA1/2* mutacijom može se neoadjuvantno koristiti olaparib (inhibitor PARP-a), a kod pacijentica s TNBC-om visokog rizika može se neoadjuvantno koristiti pembrolizumab (blokator PD-1) + karboplatina + paklitaksel, nakon čega slijedi preoperativni pembrolizumab + ciklofosfamid + adriamicin/epirubicin, a nakon operacije slijedi terapija pembrolizumabom. Obzirom da su naši uzorci skupljeni prije uvođenja pembrolizumaba i karboplatine u neoadjuvantni protokol, pacijentice su prije operacije dobile kemoterapiju po shemi 4-6 ciklusa AC + paklitaksel 12 tjedana, a pacijenti s HER2 pozitivnim tumorima su uz navedene lijekove dobile bioterapiju trastuzumabom i pertuzumabom. U sljedećem poglavlju obrađeni su najčešće korišteni kemoterapijski agensi kroz njihov utjecaj na oksidacijski stres.

1.2.4.4.1. Adriamicin

Adriamicin je antraciklinski antibiotik koji djeluje interkalacijom u DNA i inhibicijom enzima topoizomeraza II, što uzrokuje prekide DNA i staničnu smrt (180). Dodatno, adriamicin aktivira proizvodnju ROS-a, što pojačava njegov citotoksični učinak. Najčešće nuspojave adriamicina su kardiotoksičnost (kardiomiopatija) i kongestivno zatajenje srca (181), mijelosupresija, te alopecija, mučnina i stomatitis.

Adriamicin inducira oksidacijski stres aktiviranjem mitohondrijskih puteva i NADPH oksidaze, generirajući ROS poput superoksidnog aniona, vodikovog peroksida i hidroksilnih radikala (182). ROS oštećuju lipide, proteine i DNA te potiču apoptozu, osobito u kardiomiocitima i tumorima(183).

1.2.4.4.2. Ciklofosamid

Ciklofosamid je alkilirajući agens koji se u jetri pretvara u aktivne metabolite, uključujući fosforamidni iperit i akrolein, koji tvore DNA-adukte i dovode do stanične smrti(184). Akrolein je izuzetno reaktivan aldehid koji inducira oksidacijski stres interakcijom s lipidima staničnih membrana, smanjenjem razine glutationa (GSH) i inhibicijom antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) (185).

1.2.4.4.3. Paklitaksel

Paklitaksel je taksan koji stabilizira mikrotubule, što uzrokuje mitotski arest i apoptozu (186). Paklitaksel povećava koncentraciju ROS povećanjem aktivnosti NADPH oksidaze vezane za plazmatsku membranu (187)

Istraživanja na jetri štakora pokazala su da je oksidacijski stres izazvan kombinacijom kemoterapijskih agenasa (adriamicin i paklitaksel) značajno veći u odnosu na pojedinačne agense (188). Dokazano je da tijekom liječenja kombinacijom adriamicina, ciklofosfamida i paklitaksela tumori višeg stadija pokazuju značajniji porast markera oksidacijskog stresa. Ova kemoterapijska shema dokazano povišuje razinu malondialdehida, markera lipidne peroksidacije, i snižava antioksidacijsku zaštitu (189).

1.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres, odnosno neravnoteža u staničnoj redoks homeostazi, važan je čimbenik razvoja različitih bolesti (190). Do ove neravnoteže može doći zbog smanjene antioksidacijske obrane ili zbog povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) (191). ROS su reaktivne vrste koje sadrže kisik, a mogu biti ili radikali poput hidroksilnog ili superoksidnog radikala ili molekule poput vodikovog peroksida (H_2O_2) (192). U početku se oksidacijski stres smatrao stresnim i štetnim stanjem(193,194). Danas se oksidacijski stres smatra promijenjenom ravnotežom koja može imati pozitivne ili negativne

posljedice (195). Ove dvije opcije se označavaju kao eustres i distres, gdje je distres štetan stres s mogućim smrtonosnim posljedicama, a eustres je hormeza, odnosno adaptivni biološki odgovor na stresno stanje (196,197).

Blagi oksidacijski stres, izraz koji se odnosi na niske razine ROS-a, vrlo je koristan jer stimulira obrambene mehanizme. Stanice imunološkog sustava proizvode ROS u višim koncentracijama kao obrambene agense protiv patogena (198–200). ROS u niskim koncentracijama sudjeluju u prijenosu signala i u kontroli ekspresije gena vezanih uz staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje (201). Prema tome, blaže oscilacije oksidacijskog stresa su poželjne, izazivajući prilagodbu na okolišni stres izgradnjom staničnog antioksidacijskog obrambenog sustava(202). Povećanje oksidacijskog stresa i ulazak u "umjereni" oksidacijski stres aktivira čitav niz različitih proteina, potičući upalu i mijenjajući ekspresiju citokina i kemokina (203).

Jako visoke koncentracije ROS-a mogu uzrokovati oštećenje proteina, nukleinskih kiselina, lipida, membrana i organela, što može dovesti do aktivacije apoptoze (204). ROS su vrlo reaktivne i uzrokuju oksidaciju svih staničnih makromolekula, DNA, proteina i lipida (205). ROS uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove DNA i oksidiraju baze što rezultira mutacijama. Ukoliko obim oštećenja ne uzrokuje staničnu smrt, ova oštećenja DNK uzrokuju deaktivaciju ili prekomjernu ekspresiju gena koji reguliraju stanični ciklus i dovode do razvoja tumora. Oksidacija proteina remeti njihovu funkciju(206). Lipidi su osjetljivi na peroksidaciju koja uzrokuje smrt stanice zbog poremećaja fizikalnih barijera stanice. Za razliku od mutacija DNA i oksidacije proteina, peroksidacija lipida je autokatalitički proces koji umnožava i proširuje oštećenje (207). Posebno osjetljive na peroksidaciju lipida su višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. PolyUnsaturated Fatty Acids) zbog dvostrukih veza koje su vrlo reaktivne s ROS. Peroksidacija lipida je autokatalitički proces koji također rezultira stvaranjem visoko reaktivnih aldehida, a mogu ga zaustaviti antioksidansi (207). Reaktivni aldehidi dovoljno su stabilni da difundiraju s ishodišta i dalje djeluju na s proteine, modificirajući tako njihovu reaktivnost i funkciju, što u konačnici utječe na stanične procese (207–209).

ROS fiziološki nastaje u mitohondrijima, gdje dolazi do „curenja“ elektrona s transportnog lanca elektrona i formira se superoksidni anion (210). ROS mogu nastati i u peroksisomima oksidacijom masnih kiselina (211), a u endoplazmatskom retikulumu putem oksidacije proteina (212). Izlaganje vanjskima agensima (zračenje, teški metali, atmosferski onečišćivači, kemoterapijski agensi) također dovodi do povećanog stvaranja ROS-a (213).

Iako se antioksidansi često percipiraju kao protutumorski agensi, neka klinička ispitivanja i eksperimentalni modeli pokazuju da dodaci prehrani s antioksidansima, osobito karotenoidima i vitaminom E, mogu povećati učestalost raka i smrti povezane s rakom kod ljudi (214–218).

1.3.1. Regulacija antioksidacijske zaštite

Kako bi se razina ROS-a održala na fiziološkoj razini, ali i kao zaštita od oksidacijskog stresa, stanice su razvile mehanizme za strogu regulaciju razina ROS. Ovi zaštitni mehanizmi temelje se na složenom sustavu eliminacije koji sadrži niz enzima poput superoksid dismutaze (SOD), katalazu, tioredoksine, peroksiredoksine i glutation peroksidaze (219,220), ali i male antioksidacijske molekule kao što su glutation (GSH), tioredoksini, peroksiredoksini, vitamin C (askorbat), vitamin E (tokoferoli) i polifenoli. Neenzimatski antioksidansi, mogu djelovati izravno na ROS i druge prooksidativne agense (221).

Pozitivni učinci blagog stresa uključuju signalni put NRF2/KEAP1. NRF2 je transkripcijski faktor koji se u nestimulirajućim uvjetima nalazi u citoplazmi vezan za KEAP1. U kompleksu s KEAP1, NRF2 biva ubikvitiniran Cul3-ubikvitin E2 ligazom, čime se upućuje na degradaciju u proteasomu. Ako su ROS ili elektrofilni prisutni u povišenim koncentracijama u stanici, oni oksidiraju KEAP1, što mijenja njegovu konformaciju te on djelomično otpušta NRF2. Novonastali NRF2 se tada translocira u jezgru i veže se za mali MAF protein i inducira transkripciju antioksidacijskih gena. Ciljni geni NRF2 uključeni su u sintezu glutationa (glutamat-cistein ligaza, obje, katalitička i modificirajuća podjedinica), u detoksikaciji ROS (tioredoksin reduktaza 1, peroksiredoksin 1), detoksikaciji ksenobiotika (NQO1, NAD(P)H kinon dehidrogenaza 1, glutation- S-transferaza), ali i u transportu lijekova (protein s rezistencijom na multiple lijekove, MRP) (222).

Osim toga, antioksidacijskoj zaštiti doprinose i FOXO proteini (223). Među antioksidacijskim genima koje aktivira obitelj FOXO su katalaza, superoksid dismutaza ovisna o manganu (MnSOD), protein 1 koji veže oštećenje DNA (DDB1), Fas ligand (FasL), ciklin ovisna kinaza B1 (KIP1, p27) i ABC transportni protein, ABCC1 (224).

I NRF2 i obitelj FOXO regulirani su signalnim putem PI3K/AKT (223,225). NRF2 se može aktivirati izravno pomoću PI3K, ali i neizravno, 4-hidroksinonenal (HNE) koji aktivira atipičnu protein kinazu C (PKC) i ERK (225–227). PI3K negativno regulira obitelj FOXO, dok JNK

služi kao pozitivni regulator tako što po primanju stresnog signala fosforilira FOXO i tako ih aktivira (223). Za razliku od NRF2, učinci aktivacije FOXO ovise o težini stresa - ako su razine stresa niske, aktiviraju se antioksidacijski obrambeni mehanizmi, a ako su razine visoke, aktivira se apoptoza (228).

1.3.2. Oksidacijski stres i antioksidacijska zaštita kod raka

ROS zajedno s brojnim adaptacijskim odgovorima stanice imaju značajnu ulogu u inicijaciji i progresiji raka te rezistenciji na lijekove (229–231). ROS su u tumorskim stanicama povišene i zbog aberantnog energetskeg metabolizma. Povećana razina ROS-a povezana je s aktivacijom onkogeni, inaktivacijom tumor-supresorskih gena i oštećenjem mitohondrija (232). Stoga je prilagodba na oksidacijski stres značajan faktor nastanka rezistencije na terapiju. Stanice raka istovremeno s porastom ROS-a povećavaju i svoje antioksidacijske kapacitete. Na taj način stanice raka optimiziraju proliferaciju potaknutu ROS-om i izbjegavaju pragove ROS-a koji bi inače izazvali apoptozu (233,234). Stanice raka koriste ROS kao proliferacijski signal i putem samo-katalizirane lančane reakcije lipidne peroksidacije PUFA. Snažno inducirana peroksidacija PUFA stvara reaktivne aldehide, molekule koje su mnogo stabilnije od samih ROS. Stoga se smatraju "drugim glasnicima" ROS-a (235)

Nedavno se pokazalo da je oštećenje genoma pokretač upalne signalne kaskade koja rezultira otpuštanjem proupalnih čimbenika i povećanjem količine infiltrirajućih imunoloških stanica. Ti događaji dodatno pridonose proizvodnji ROS-a i dovode do pojave začaranog kruga karcinogenog oksidacijskog stresa (236). Oštećenje DNA izaziva aktivaciju imunološkog sustava i upalu, te lučenje proupalnih čimbenika posredovanih aktivacijom cGAS-STING puta, ZBP1 patogenog senzora, AIM2 i NLRP3 inflammasoma. Odgovor na oštećenje DNA također može pokrenuti mehanizme za ograničavanje diobe oštećenih progenitorskih stanica induciranjem trajnog stanja aresta staničnog ciklusa (senescentnost). Trajno oštećenje DNA potiče senescentne stanice na izlučivanje raznih faktora koji mogu djelovati kao jaki imunološki modulatori. Oslobođanje specifičnih citokina može stimulirati plastičnost i regeneraciju tumorskih matičnih stanica i tako potaknuti progresiju tumora (236). Ipak, trajni oksidacijski stres povećava osjetljivost tumorskih stanica i može dovesti do ponovne osjetljivosti na terapiju. Stoga, oksidoreducijske promjene mogu igrati značajnu ulogu u protutumorskoj terapiji (191). Na primjer, kod signalnog puta inzulin/faktor rasta, vezanje

liganda na srodne receptore stimulira proizvodnju superoksidnog aniona pomoću NOX (NADPH oksidaze) koji su u blizini, što rezultira prolaznim povećanjem H_2O_2 koje dalje uzrokuje reverzibilnu inaktivaciju protein tirozin fosfataze (npr. PTP1B, PTPN2 i PTPN11) i lipidne fosfataze PTEN. Inaktivacija ovih enzima omogućuje kratkotrajni prekid represije signalizacije inzulina/faktora rasta i povećanu aktivnost različitih nizvodnih enzima protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), što dovodi do stanične proliferacije (237).

Stanice, pa tako i stanice raka, na pretjeranu proizvodnju ROS-a odgovaraju aktivacijom nekoliko transkripcijskih programa. Ti se transkripcijski programi oslanjaju na transkripcijske faktore/njihove partnere za vezanje koji sadrže cisteine koji reagiraju na redoks. Ovi programi uključuju članove obitelji Forkhead Box Protein O3 (FOXO), hipoksija inducibilni faktori (HIFs), KEAP1 s NRF2 i TP53 transkripcijski program (238–241).

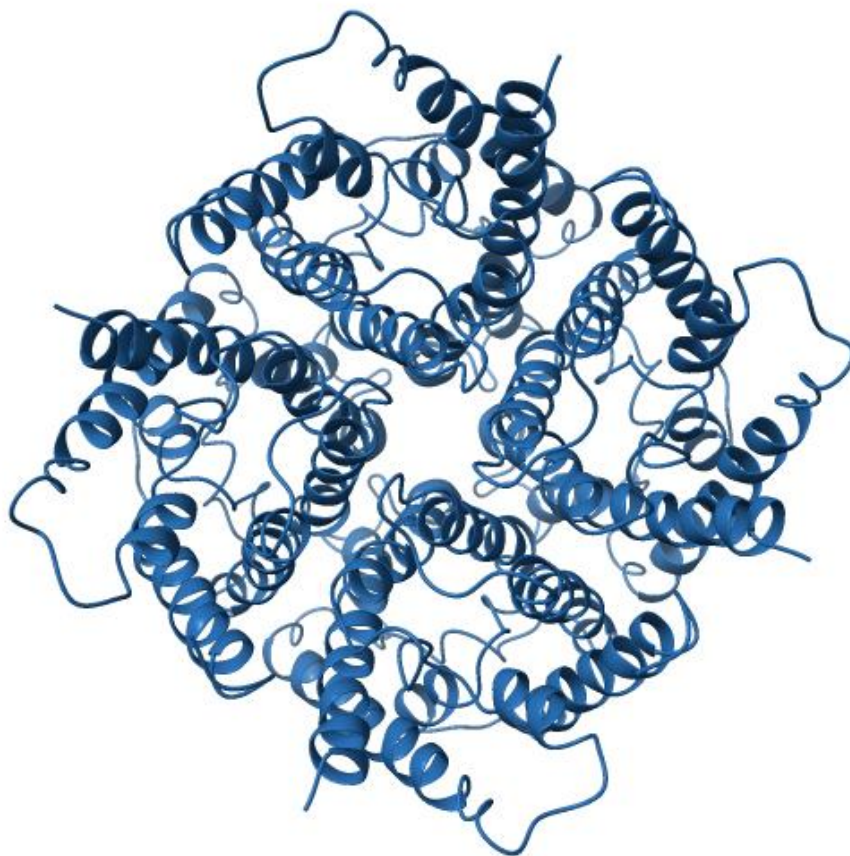
1.3.3. Akvaporini

Homeostaza vode jedan je od najvažnijih faktora u fiziologiji stanice. Iako se prvotno smatralo da voda ulazi u stanice kroz membranu isključivo difuzijom, danas se zna da voda kroz staničnu membranu prolazi u oba smjera kontrolirano, kroz specijalizirane pore nazvane akvaporinima (AQP) (242). Prolaz vode kroz AQP zahtijeva nižu energiju aktivacije u odnosu na prolaz kroz lipidni dvosloj. AQP pripadaju visoko konzerviranoj skupini membranskih proteina te se dijele na: ortodoksne ili klasične (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, i AQP8), koji primarno služe za transport vode; gliceroakvaporine (AQP3, AQP7, AQP9, i AQP10), primarno za glicerol, ali i vodu i druge male polarne spojeve; i S-akvaporine (AQP11 i AQP12), koji se nazivaju i neortodoksnim akvaporinima, koji su locirani isključivo unutar stanice (243). U sisavaca AQP-i također imaju važnu ulogu u metabolizmu energije. Kontrolirajući koncentraciju glicerola u epidermisu, masnom tkivu i drugim tkivima, akvagliceroporini sudjeluju u hidrataciji kože, proliferaciji stanica, karcinogenezi i metabolizmu masti (244). Stoga su AQP postali potencijalne ciljne molekule u liječenju edema mozga, pretilosti, cijeljenja rana, tumora i drugih bolesti (245)(246). Uzevši u obzir funkciju akvaporina i činjenicu da tumorske stanice metabolizam najčešće temelje na glikolizi, a migracijsku sposobnost na lamelopodijima koje kontroliraju AQP (242), ne iznenađuje da su AQP aberantno izraženi u tumorskom tkivu i pozitivno koreliraju s agresivnošću tumora, progresijom raka i metastaziranjem(242,247). Povišena ekspresija AQP otkrivena je u

tumorima različitog porijekla, a povezana je s rastom tumora, angiogenezom, migracijom stanica i proliferacijom, sugerirajući da bi AQP-i mogli imati dijagnostičku i prognostičku vrijednost te da bi se njihova modulacija mogla ispitati u liječenju tumora (248). Posebno se ističu AQP1, AQP3 i AQP5 koji su povišeni u različitim tumorima, a uključeni su u proliferaciju i migraciju (246).

Akvaporini mogu transportirati i vodikov peroksid, što je izuzetno važno zbog njegove uloge u biološkim procesima i signalizaciji (247). Stoga su definirani "peroksiporini" - akvaporini koji olakšavaju protok vodikovog peroksida. Peroksiporini se nalaze u sve tri prethodno navedene skupine: AQP0, AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11 (247).

Akvaporini su evolucijski visoko očuvani transmembranski kanali izgrađeni kao tetrameri, pri čemu se svaki monomer sastoji od oko 320 aminokiselina i molekularne je težine 28 kDa (249). Svaki monomer ima šest transmembranskih domena povezanih s pet petlji (A-E) (250). Regulacijske sekvence akvaporina nalaze se u petlji E, koja sadrži vezna mjesta za inhibitore, Hg⁺ i tetraetilamonij, i petlji D, koja je osjetljiva na protonaciju, čime regulira protok kroz pore (251). Za razliku od ionskih kanala gdje je kanal centralno smješten, svaki monomer akvaporina je zaseban kanal i reguliran neovisno o drugim monomerima. Središte tetramera je također kanal za koji se pretpostavlja da je propustan za plinove, poput CO₂, NO i pojedinih iona, a koja će od ovih vrsta prolaziti ovisi posebno o svakom akvaporinu (Slika 4) (252–254).



Slika 4. Struktura akvaporina. Četiri monomera s četiri kanala te kanalom u sredini. Preuzeto iz NIH 3D. (2014).(255)

Transkripcijska regulacija akvaporina još nije u potpunosti istražena, ali AQP3 ima nekoliko odgovornih elemenata i veznih mjesta transkripcijskih faktora u regiji promotora, kao što je ERE (engl. Estrogen Response Element), RORE (engl. ROR/REV-ERB- Response Element), vezno mjesto za SP1 i za FOXO1 transkripcijske faktore (256). U žlijezdama slinovnicama pokazalo se da je FOXO1 izravni regulator ekspresije AQP5(257). Dodatno, inzulin može pojačati ekspresiju AQP1, AQP5 i AQP8 u submandibularnim žlijezdama dijabetičkih štakora(258). Ovi podaci ukazuju na to da se akvaporini mogu regulirati različitim podražajima koji dodatno ostvaruju zaštitne učinke na ciljanu stanicu. Akvaporini se reguliraju posttranslacijski, gdje se akvaporini smještaju u vezikule i prilikom potrebe za njihovom aktivnošću dolazi do transporta vezikula i spajanja sa staničnom membranom (259). Ovakav promet ovisi o fosforilaciji monomera, npr. AQP2 treba imati fosforilirana najmanje tri monomera za određivanje svog položaja u membrani plazme (260). U stanicama raka prostate, PC-3, AQP3 se translocira iz citoplazme u

staničnu membranu nakon utišavanja RAS like protoonkogena A (261). RAS-u sličan protoonkogen A (eng. Ras-related protein Ral-A).

Regulacija protoka kroz kanal naziva se „gating“ i reguliran je pH, fosforilacijom, temperaturom, napetošću membrane, gradijentom tekućine i tlakom(262–264). Ortodoksni akvaporini najbrže odgovaraju na podražaje promjenom propusnosti. Razlog stvaranja tetramera nije jasan, budući da svaki monomer funkcionira neovisno o drugom te nema dokaza o kooperativnoj ovisnosti u kvarternoj strukturi (265).

Akvaporini kontroliraju kretanje vode kroz membranu, ali također kontroliraju osmotski tlak regulacijom unutarstanične koncentracije glicerola (266). Kontrola kretanja vode i osmotskog tlaka nadalje je povezana s njihovim ulogama u stanici, kao što su migracija, proliferacija i adhezija(248). Tijekom migracije akvaporini selektivno transportiraju vodu zahvaljujući osmotskom gradijentu koji se postiže depolarizacijom aktina. Voda ulazi u stanicu na „vodećem“ mjestu uzrokujući lokalno širenje membrane koje se zatim kompenzira remodeliranjem aktina radi održavanja integriteta membrane (267). Mehanizam kojim akvaporini doprinose staničnoj proliferaciji nije jednostavan niti je isti za svaki akvaporin. Naime, inhibicija AQP1 inhibira proliferaciju i migraciju HT29 stanica, koje imaju visoku bazalnu ekspresiju AQP1, dok ova inhibicija ne utječe na HCT116 stanice s niskom ekspresijom AQP1(268). AQP3 je također povezan sa staničnom proliferacijom - kod stanica raka želuca SGC7901 i MGC803 dokazana je korelacija prekomjerne ekspresije AQP3 i povećane proliferacije, dok je njegova down-regulacija imala suprotan učinak (269). Uzimajući da je kod raka želuca AQP3 značajno viši nego u normalnoj želučanoj sluznici i da je povezan s proteinima EMT u tkivu raka želuca, prekomjerna ekspresija AQP3 povezana je s lošijom prognozom ovih pacijenata. Stoga je kod raka želuca pojačana regulacija ova dva akvaporina povezana s malignijim fenotipom, što se postiže aktivacijom ERK i Ras, kao i PI3K/AKT/Snail signalnog puta(269,270). U matičnim stanicama raka pluća utišavanje AQP3 uzrokovalo je pojačanu aktivnost puta Wnt/GSK-3/ β katenin , što ukazuje na njegovu ulogu u smanjenju aktivnosti ovog signalnog puta i, prema tome, inhibiciji apoptoze i smanjenju diferencijacije stanica raka pluća, zadržavajući matični fenotip ovih stanica (271). Navedene uloge AQP3 omogućuju korištenje AQP3 za određivanje malignog potencijala i rizika povrata bolesti (271). Razna istraživanja pokazala su povišenu ekspresiju AQP-a u raku dojke, uglavnom AQP1, AQP3 i AQP5, za razliku od normalnog okolnog tkiva (272). Kod HER2 pozitivnih tumora, lošija

prognoza vezana je uz povišenu ekspresiju AQP3 (273), dok su AQP1 i AQP5 neovisni prognostički pokazatelji preživljavanja pacijenata s rakom dojke(274).

Budući da liječenje raka dojke vrlo često započinje neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na antraciklinima i taksanima, za koje je poznato da izazivaju oksidacijski stres, za ovo istraživanje je izabrana dinamika akvaporina 3 i 5, obzirom na njihovu sposobnost transporta vodikovog peroksida i dokazanu ulogu u razvoju karcinoma dojke.

1.3.3.1. Akvaporini, oksidacijski stres i rak

Kao što je već opisano, jedan od mogućih mehanizama pomoću kojih akvaporini ostvaruju svoju ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi je regulacija transporta malih molekula kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), dušikov oksid (NO), urea i CO_2 (252,262,275). Budući da H_2O_2 i NO reguliraju i moduliraju redoks signalne putove, čime se regulira proliferacija, diferencijacija i apoptoza, regulacija unosa ovih molekula može izravno ili neizravno doprinijeti modulaciji ovih procesa što rezultira rastom i razvojem tumora. Čimbenici koji reguliraju oksidacijski stres uvelike utječu na razvoj tumora kao i na njegovu sudbinu. Zanimljivo je da su ovi zaštitni faktori u mnogim slučajevima zapravo dvosjekli mač. Ovo se posebno odnosi na NRF2, jedan od ključnih transkripcijskih faktora antioksidacijskog obrambenog sustava. U normalnim stanicama NRF2 induciranom transkripcijom nastaje niz reakcija koji štiti stanicu od maligne transformacije, dok u tumorskim stanicama NRF2 dovodi do zaštite od terapije(222,276). Dodatno, put NRF2 utječe i potiče karcinogenezu ne samo izravno aktivacijom u tumorskim stanicama, već i neizravno, u stromi, preko fibroblasta povezanih s rakom (eng. Cancer Associated Fibroblasts, CAF). Tumorske stanice stupaju u interakciju sa normalnim, netransformiranim stanicama u svom mikrookruženju, mijenjajući normalne fibroblaste u CAF koji su reprogramirani da podržavaju rast tumora. Reprogramiranje CAF-a događa se aktivacijom p62, koji zatim usmjerava KEAP1 na lizosomsku razgradnju (277). Degradacija KEAP1 aktivira NRF2 i pojačava transkripciju ATF6 konačno posredujući ER (endoplazmatski retikulum) odgovor na stres. Dokazi također sugeriraju da FOXO, supresor tumora, može aktivirati mehanizme otpornosti tumora, ali to se može dogoditi samo u kombinaciji s drugim događajima u stanici (223).

U svjetlu antioksidacijske obrane koja djeluje kao dvosjekli mač, akvaporini uvode novi moment reguliranjem protoka H_2O_2 . Delikatna regulacija intracelularne razine H_2O_2 otvara mogućnosti u stimulaciji proliferacije i mehanizma preživljavanja tumorskih stanica, što

dovodi do otpornosti i povećane mobilnosti. Utvrđeno je da su akvaporini pojačano izraženi u brojnim tumorima (278–280) što otvara mogućnosti za njihovo terapijsko ciljanje kod tumora. Točni mehanizmi i signalni putevi na koje utječu akvaporini još se trebaju utvrditi, ali to nije jednostavna i izravna interakcija. Povećana prisutnost određenog akvaporina u staničnoj membrani kontrolira protok H_2O_2 , kao i protok vode i drugih malih molekula. Uvoz i izvoz ovih malih molekula, osim vode i H_2O_2 , također može modificirati signalne puteve uključene u proliferaciju, diferencijaciju i migraciju. Uz to, unos glicerola također bi mogao biti jedan od čimbenika pomoću kojih akvaporini potiču proliferaciju (279). Zbog njihovih svojstava, AQP3 i AQP5 (gliceroakvaporin i ortodoksni akvaporin) su akvaporini istraživani kod raka dojke, a njihova je dinamika i jedan od predmeta ovog istraživanja.

1.3.3.2. AQP3 i rak dojke

AQP3 pripada akvagliceroporinima i kao takav olakšava transport glicerola i vode (281,282). Iako neki autori navode da je AQP3 slab vođeni kanal (271), u bubregu je AQP3 konstitutivno aktivan zajedno s AQP4 (282) čime regulira izlučivanje vode. Nakon fizioloških uloga, njegova uloga prepoznata je i kod raka kože (242), a kasnije i kod drugih vrsta raka, uključujući rak dojke (283–285). Analiza genomskih podataka iz projekta The Cancer Genome Atlas (TCGA) koji je besplatno dostupan na web-portal UALCAN (286) otkrila je uzorak AQP3 u normalnom (medijan 31,64 transkripata na milijun (TPM) u odnosu na različite podklase raka dojke (luminalni podtip–16,183 TPM, HER2-pozitivni podtip -36,481 TPM, TNBC-13,484 TPM). Nakon što je prepoznato da je prekomjerno izražen kod raka, AQP3 je istraživao kao mogući prognostički marker za trostruko negativni tumor dojke, zajedno s AQP5 (287), kao i za HER2 pozitivan rani rak dojke (273). Paralelno, pokazano je da gen AQP3 ima element odgovora na estrogen i reagira na podražaje estrogena povećavajući svoju ekspresiju (288), što ukazuje na vezu između AQP3 i ER+ raka dojke. Mogućnost korištenja AQP3 kao prognostičkog markera u raku dojke može se pripisati njegovoj ulozi u migraciji stanica, koja je olakšana kanaliziranjem vode i glicerola te posljedičnim stvaranjem lamelopodija (288,289). Studije su potvrdile da prekomjerna ekspresija AQP3 povećava migraciju i invaziju ER+ stanica raka dojke (288) i keratinocita (289). Nadalje, u keratinocitima, AQP3 također olakšava transport glicerola u stanicu, što rezultira stvaranjem ATP-a (290). Činjenica da AQP3 olakšava transport vode, glicerola i H_2O_2 stavlja AQP3 visoko na popisu potencijalnih meta u terapiji tumora.

Važno je razjasniti signalne putove i stanične procese na koje utječu promjene u razinama AQP3. Transport vode i glicerola utječe na migraciju i metaboličke procese (osobito metabolizam lipida), a H_2O_2 utječe na signalne putove. H_2O_2 pokreće nekoliko signalnih putova u stanici, a kanal koji može olakšati transport H_2O_2 potencijalni je kandidat koji osigurava određenu razinu kontrole nad tim putovima. U prilog ovoj pretpostavci ide studija Hara-Chikuma i sur. (291) pokazujući u keratinocitima da je stimulans TNF- α olakšan proizvodnjom H_2O_2 pod utjecajem NADPH oksidaze izoforme 2 (NOX2). AQP3 zatim prenosi H_2O_2 što rezultira regulacijom (inhibicijom) proteinske fosfataze 2A i aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NF-kappaB). Štoviše, CXCL12 stimulira transport H_2O_2 kroz membranu putem AQP3 u stanicama raka dojke MDA-MB-231 i DU4475 (292). Oksidacija PTEN/PTP1B događa se zbog H_2O_2 , nakon čega slijedi aktivacija AKT puta i migracija stanica. Isključivanje AQP3 onemogućava ovaj proces i time potvrđuje ulogu AQP3 u migraciji (292).

Potreba za proučavanjem putova na koje utječe prekomjerna ekspresija AQP3 i mehanizama djelovanja ogleda se u nalazu da je Auphen, inhibitor akvaporina koji sadrži zlato, učinkovitije blokirao transport glicerola (oko 90% inhibicije) u odnosu na transport vode (20% inhibicije) (293). Imajući na umu da AQP3 također olakšava transport H_2O_2 kroz plazma membranu (294,295) i strukturne sličnosti između H_2O_2 i vode (296), inhibitore treba pažljivo ispitati u pogledu njihove sposobnosti da blokiraju sve tri molekule kanalizirane preko AQP3. Činjenica da inhibitor može nejednako blokirati transport glicerola i vode upućuje na to da transport H_2O_2 također može biti pod slabijim utjecajem, sugerirajući aktivaciju i modifikaciju staničnih procesa u neželjenom smjeru, odnosno prema progresiji tumora. Postoji nekoliko radova o učinku akvaporina općenito na antioksidacijski obrambeni sustav, posebno transkripcijski faktor NRF2, neovisno o bolesti (297–299). U staničnim linijama raka dojke, MCF7, SUM159 i SkBr3, AQP3 je bio najizraženiji akvaporin, a u HER2 pozitivnim stanicama bio je pojačano reguliran zajedno s NRF2 pomoću H_2O_2 (297), što ukazuje na potrebu proučavanja učinaka prekomjerne ekspresije AQP3 u odnosu na dijelove antioksidativnog sustava.

1.3.3.3. AQP5 i rak dojke

AQP5 je uključen u normalan razvoj dojke i proizvodnju mlijeka, kao i u karcinogenezu dojke (283,300). Jung i sur. pokazali su da utišavanje AQP5 ili indukcija hiperosmotskog stresa stanicama MCF-7 smanjuje ekspresiju AQP5 i negativno utječe na staničnu proliferaciju i

migraciju. Osim toga, ekspresija AQP5 u benignim tumorima i invazivnom duktalnom karcinomu pokazala je različite obrasce- u duktalnim epitelnim stanicama dokazana je ekspresija AQP5 u apikalnim domenama, dok je u tumorskim stanicama ekspresija bila povećana, ali je pronađen gubitak apikalnog polariteta, što ukazuje na ulogu AQP5 u progresiji raka dojke (301). Kod TNBC, primijećena je značajno veća ekspresija AQP5 i AQP3 u tumorskom tkivu nego u okolnom normalnom tkivu. Prekomjerna ekspresija AQP5 uglavnom je primijećena u uzorcima TNBC-a s visokim proliferacijskim indeksom Ki-67 i, zajedno s višom ekspresijom AQP3, povezana je s agresivnijom bolešću s lošijim ukupnim preživljenjem, sugerirajući njihovu zajedničku ekspresiju kao neovisni prognostički marker kod trostruko negativnog tumora dojke (287). Prekomjerna ekspresija AQP5 bila je povezana s lošijim ishodima kod pacijenata s ranim rakom dojke bez obzira na tip i stadij tumora, što ukazuje na to da bi AQP5 mogao biti neovisni prognostički marker preživljenja, osobito kod kurativno operiranih pacijentica s hormonski pozitivnim tumorima (274). Analiza genomskih podataka iz projekta TCGA sa web-portala UALCAN otkrila je značajno različite obrasce ekspresije gena AQP5 u normalnim stanicama u odnosu na različite podtipove raka dojke (286).

U studiji Rodrigues i sur. (297) ispitan je utjecaj oksidativnog stresa na profil lipida, razine medijatora oksidativnog stresa i NRF2, obrasce ekspresije AQP1, AQP3, AQP5 i osjetljivost na H_2O_2 u tri stanične linije raka dojke (koje predstavljaju hormon-pozitivne (MCF-7), HER2-pozitivne (SkBr-3) i TNBC (SUM 159)). Razine PUFA ovisne su o tipu stanice, a najviše su bile u trostruko negativnoj staničnoj liniji SUM 159 u kojoj je pronađena i niža razina NRF2, što može objasniti veću osjetljivost trostruko negativnih stanica na H_2O_2 . Obrazac ekspresije AQP-a također je bio specifičan za tip stanice. Dok je AQP3 bio najizraženija izoforma u svim testiranim staničnim linijama, izloženost H_2O_2 povećala je ekspresiju AQP3 u stanicama MCF-7 i SkBr-3, dok je u SUM 159 stanica razina AQP3 smanjena. Ekspresija AQP5 i AQP1 bila je slična u SUM 159 i SkBr-3, s povećanjem nakon oksidativnog izazova, dok je u MCF-7 stanicama bila snižena (297).

Studija Rodriguesa i sur. pokazala je da AQP5, osim vode, vrlo učinkovito provodi i H_2O_2 . Migracijska sposobnost stanica suprimirana je utišavanjem AQP5, a potom restituirana vanjskim podražajima oksidativnog stresa. Stoga su autori istaknuli ulogu AQP5 u dinamičkom finom podešavanju unutarstaničnih razina H_2O_2 (302), koje su važne za redoks signalizaciju i regulaciju sudbine stanice (303). Stoga bi AQP5 mogao imati značajnu ulogu u terapiji raka.

Otkriće triju miRNA (miR-1226-3p, miR-19a-3p i miR-19b-3p) koje reguliraju AQP5 smanjenjem njegove translacije, što dovodi do smanjene migracije stanica raka dojke, podupire daljnje istraživanje AQP5 kao moguće terapijske mete kod raka dojke (304).

Povezanost ROS-a i AQP5 također je promatrana u studiji Oh et al. Proučavali su utjecaj hiperkolesterolemije i inhibicije ksantin oksidaze (enzim koji stvara ROS) na progresiju raka dojke in vitro i na modelu ksenografta miša. Pokazalo se da hiperlipidemijska stanja pridonose proizvodnji ROS-a, progresiji raka dojke i aktivaciji MAPK-a. Liječenje febeksostatom, inhibitorom ksantin-oksidaze, rezultiralo je smanjenjem razina ROS-a i ekspresije AQP5, ublažilo proliferativnu i migracijsku sposobnost stanica raka dojke, kao i plućne metastaze (305). Za sada još nije sigurno da li je uključenost AQP5 u karcinogenezu dojke uzročna ili samo posljedica metaboličkog reprogramiranja i redoks signalizacije putem H_2O_2 . Zaključno, AQP3 i AQP5 povišeni su u raku dojke i podržavaju procese koji dovode do rasta i metastaza raka dojke. Sadašnja saznanja pokazuju da su ova dva akvaporina potencijalni biomarkeri zloćudnosti raka dojke što ih čini potencijalnim terapijskim ciljevima. Za siguran terapijski pristup potrebno je temeljito proučiti sve moguće putove utjecaja akvaporina, budući da bi neadekvatna inhibicija ili stimulacija svakog AQP-a mogla dovesti stanice raka do zloćudnijeg fenotipa. Jedan od važnih aspekata svakako je umreženost akvaporina s antioksidacijskim sustavom, posebno zbog sposobnosti AQP3 i AQP5 u kanaliziranju H_2O_2 , koji tada igra aktivnu ulogu u signalnim putovima.

1.3.4. *NRF2*

NRF2 je glavni antioksidacijski transkripcijski faktor, koji se veže na ARE (od engl. Antioxidant Response Element) u promotoru gena te tako aktivira njihovu transkripciju. NRF2 aktivira transkripciju gena za citoprotektivne proteine, uključujući komponente antioksidacijskog sustava, protuupalne proteine, enzime za detoksikaciju, kao i proteine koji pomažu u popravku ili uklanjanju oštećenih makromolekula (306–308). Aktivacija signalnog puta NRF2 daje stanicama stratešku prednost u preživljavanju nepovoljnih uvjeta i različitih stresora. NRF2 suprimira i proupalne citokine te tako regulira stanični odgovor na upalu. Uz to, NRF2 sudjeluje u kontroli ključnih staničnih procesa, poput apoptoze, autofagije, angiogeneze, proliferacije i migracije stanica (309).

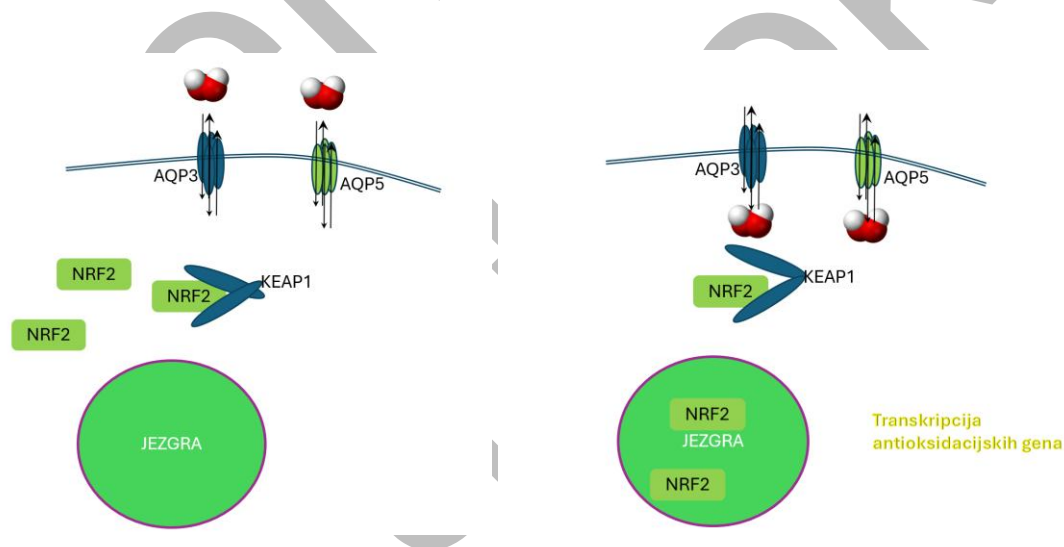
Dokazano je da povećana aktivnost NRF2 povećava otpornost tumorskih stanica na uobičajene kemoterapijske agense i zračenje (310,311). Kod nekoliko tipova raka dokazana je visoka razina aktivnosti NRF2 koja je odgovorna za visoko proliferativni fenotip (312) i početak procesa metastaziranja (313). NRF2 se pokazao kao čimbenik i u stanicama tumorskog mikrookoliša (eng. tumor microenvironment - TME), odnosno strome. Odnos između tumorskih i stromalnih stanica je dvosmjernan: stanice raka izlučuju nekoliko čimbenika koji potiču stanice strome na izlučivanje drugih topljivih molekula, a zauzvrat, one modificiraju metabolizam i redoks potencijal stanica raka (314). NRF2 bi mogao igrati ulogu u ovoj interakciji, budući da je u stromi zloćudnijih tipova raka dojke dokazano povišen, za razliku od strome manje malignih tipova (315). Stoga se inhibicija NRF2 razmatra kao terapijska opcija koja bi mogla biti učinkovita u liječenju raka, ciljajući na preživljavanje i proliferaciju tumorskih stanica, ali i suzbijanje rezistencije (316).

1.3.4.1. *Struktura i regulacija NRF2*

Transkripcijski faktor NRF2 kodiran genom *NFE2L2*, član je obitelji transkripcijskih faktora Cap'n'collar (CNC). NRF2 se sastoji od 605 aminokiselina organiziranih u sedam visoko konzerviranih funkcionalnih domena Neh1-Neh7 (engl. NRF2-ECH Homology 1–7) (309,317). Neh1 domena je DNA-vezujuća domena koja sadrži i signal za nuklearnu lokalizaciju (NLS, od engl. nuclear localization signal). Na N-kraju se nalazi Neh2 domena u kojoj su nalaze dva motiva, DLG (niskog afiniteta) i ETGE (visokog afiniteta) kojima NRF2 ulazi u interakciju s KEAP1. Također, u ovoj domeni se nalazi i slijed sedam lizina koji cilj za ubikvitiniraciju, pri čemu se NRF2 upućuje na proteasomalnu degradaciju. C- terminalna domena Neh3 je

transaktivacijska domena zajedno s Neh4 i Neh5 te su sposobni aktivirati transkripciju. Neh6 domena bogata je serinom, i odgovorna je za negativnu regulaciju neovisnu o Keap1 putem β -TrCP (engl. β -Transducin repeat-Containing Protein) koji potiče ubikvitinaciju NRF2. Neh7 domena odgovorna je za inhibiciju NRF2 signalnog puta vezivanjem NRF2 s retinoidnim X receptorom α (RXR α) i prekidanjem veze CBP-a (engl. CREB-binding protein) s domenama Neh4 i Neh5 (318).

KEAP1, negativni regulator aktivacije NRF2, sastoji se od 624 aminokiseline. U uvjetima bez stresa, ekspresija gena koji reagiraju na elektrofilni podražaj održava se na bazalnoj razini zbog ravnoteže u sintezi i razgradnji NRF2. Naime, novosintetizirani NRF2 veže se na KEAP1 koji je u kompleksu s Culin-3, E3 Ubiquitin-proteinskom ligazom i RBX te se ubikvitinira i time upućuje na proteasomalnu razgradnju (319) (Slika 5). U uvjetima narušene redoks homeostaze, dolazi do promjene konformacije KEAP1 zbog stvaranja disulfidnih veza cisteina u KEAP1 te time dolazi do djelomičnog otpuštanja NRF2(320). Kako se u ovoj konformaciji NRF2 ne može ubikvitinirati, a novonastali NRF2 se ne može vezati na KEAP1, novonastali NRF2 ulazi u jezgru i aktivira ekspresiju antioksidirajućih i detoksicirajućih gena kao što su: GCLC, GCL, NQO1, HMOX1, SRXN1, GST, TXN, GSR, SOD1, MRPs, UGT (321,322).



Slika 5. Aktivacija NRF2 – ulazak vodikovog peroksida kroz akvaporine, djelomično oslobađanje NRF2 iz kompleksa s KEAP, ulazak novosintetiziranog NRF2 u jezgru i transkripcija antioksidacijskih gena

1.3.4.2. Regulacija ekspresije NRF2 kod raka

Istraživanja su pokazala da u tumorima dolazi do promjene u regulaciji i ekspresiji NRF2. Na modelu akutne ozljede pluća izazvanom oksidansima (acute lung injury - ALI), Marzec i sur. (323) pokazali su da polimorfizam označen kao rs6721961 na razini ARE elementa NRF2 promotora utječe na tijek bolesti. Heterozigotni pacijenti (A/C) imali su značajno viši rizik za razvoj ALI nakon velike traume u usporedbi s A/A homozigotima. Mehanizam navedene razlike leži u manje učinkovitom vezivanju NRF2 na polimorfne alele (323). Transkripcija NRF2 regulirana je autoregulacijom i NF-kappa B heterodimerom P50/P65 koji se specifično veže na NRF2 promotor, inducira njegovu transkripcijsku aktivnost i posljedični antioksidacijski odgovor(324). Također, BRCA1 se veže na AHT/ARNT i time povećava aktivnost gena induciranih ksenobiotičkim stresom, uključujući aktivnost NRF2(325).

Uz transkripciju, ekspresija NRF2 je i epigenetički regulirana preko mikro RNA (miRNA). miRNA su male, nekodirajuće, 20-22 nukleotida duge RNA koje sudjeluju u finoj postranskripcijskoj regulaciji brojnih gena, uključujući 60 posto ljudskih gena koji kodiraju proteine. Trenutno su zabilježene 2654 ljudske, zrele miRNA (326,327).

Brojni radovi ukazuju na regulaciju NRF2 i/ili KEAP1 putem brojnih miRNA. Yamamoto i sur. pokazali su na stanicama HeLa da miR-507, miR-634, miR-450a, miR-129-5p mogu smanjiti razinu NRF2, što povećava osjetljivost stanica HeLa na H₂O₂ i cisplatinu. Također, na animalnim modelima pokazali su inhibiciju rasta A549 tumora (koji ima povišenu ekspresiju NRF2 zbog mutacije KEAP1) nakon egzogeno unesenog miR-507 (328). Epigenetska regulacija NRF2 odvija se i putem miRNA koje reguliraju KEAP1. Primjerice miRNA 200-a kod stanica karcinoma dojke te miR-141 kod stanica raka jajnika inhibiraju mRNA za KEAP1, čime se smanjuje razina KEAP1 i povećava razina NRF2(329,330).

Godine 2006. Faraonio i sur. pokazalo je da divlji tip TP53 (WT TP53) izravnom interakcijom s ARE elementom smanjuje njegovu aktivnost (331). Novi podaci ukazuju da kod raka pluća transkripcija NRF2 ovisi o statusu mutacije TP53. U stanicama raka pluća s WT TP53, smanjuje se vezivanje SP1 na NRF2 promotor zbog čega se posljedično smanjuje i transkripcija NRF2. Kod tumora koji sadrže mutirani TP53 ovaj učinak izostaje, SP1 se snažno veže za NRF2 promotor i aktivira njegovu transkripciju te je on aktivan i povećava transkripciju svojih ciljnih gena.

Potrebno je naglasiti da se aktivacija NRF2 događa vrlo brzo nakon izlaganju stresoru te je pod utjecajem i drugih signalnih puteva koji se međusobno preklapaju i/ili aktiviraju. (366)

Uz ulogu u antioksidacijskom odgovoru stanice na stres, NRF2 potiče i transkripciju gena signalnih puteva WNT i NOTCH, koji su važni za samoobnavljanje. Time NRF2 održava matične stanice raka (CSC, od engl. Cancer Stem Cells) u nediferenciranom obliku.

Utišavanje NRF2 značajno smanjuje markere CSC-a i potiče njihovu diferencijaciju, što je prikazano na modelima glioma, tumora dojke te na staničnim modelima raka jajnika s visokim ALDH i hepatocelularnog karcinoma otpornog na sorafenib. Dodatno, NRF2 se veže izravno na uzvodne regije gena OCT4 i NANOG čime potiče njihovu ekspresiju (332–337).

Matične stanice raka dojke (eng. breast cancer stem cells - BCSC) pokazuju plastičnost koja im omogućuje prijelaz između dva fenotipska stanja: proliferativnog epitelnog stanja s visokom ekspresijom aldehid dehidrogenaze (ALDH) te mirnog, invazivnog mezenhimalnog stanja, karakteriziranog ekspresijom CD24-/CD44+, slično epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT). Ova dva fenotipska stanja praćena su promjenama ROS-a – epitelno stanje ima niske razine ROS-a, dok mezenhimalno ima visoke. Štoviše, BCSC u epitelnom stanju pokazuju snažan antioksidacijski odgovor posredovan NRF2 (338). Također, BCSC kod kojih je utišan NRF2 nisu razvile otpornost na citostatike te su pokazale povećanu smrt stanica i odgođeni rast (339). NRF2 se pokazao i kao važan čimbenik otpornosti BCSC na terapiju zračenjem (334,340). Iako je većina podataka koji povezuju NRF2 i CSC dobivena in vitro, inhibicija NRF2 u CSC mogla bi biti obećavajuća opcija za terapije raka koje uključuju senzibilizaciju zračenjem.

1.3.4.3. Uloga NRF2 u rezistenciji tumora na terapiju

Nažalost, u malignoj transformaciji stanice, aktivirani NRF2 pokazuje svoju “tamnu stranu” (222) - aktivacija NRF2 u tumorskim stanicama potiče obrambene zaštitne mehanizme koji pomažu u preživljavanju, progresiji raka i metastaziranju te povećavaju otpornosti na radioterapiju i kemoterapiju. Ovi učinci NRF2 vezani su uz njegovu ulogu glavnog antioksidacijskog transkripcijskog faktora, ali i uz njegovu regulaciju gena uključenih u različite stanične procese povezane s metabolizmom lijekova: izlučivanje, metabolizam energije, metabolizam željeza i aminokiselina, metabolizam mitohondrija, autofagiju i proliferaciju. Sve to dovodi do zaštite tumorskih stanica od primijenjene terapije i stavlja NRF2 u skupinu regulatora obilježja raka (341).

U prilog navedenom je uloga NRF2 u razvoju rezistencije na zračenje i kemoterapiju u stanicama raka debelog crijeva (342,343), utjecaj NRF2 na rezistenciju na sorafenib kod

hepatocelularnog karcinoma (336) i rezistenciju na gemcitabin kod raka gušterače (344). Mutacija pojačane funkcije NRF2 (engl. „Gain of function“) kod NSCLC indikator je radiorezistencije (345), a status mutacije NRF2 može se koristiti i za procjenu potencijalne koristi kemoterapije temeljene na platini (346).

Do aktivacije NRF2 također može doći zbog mutacija u njegovom represoru, KEAP1, što je vidljivo kod adenokarcinoma pluća s KRAS mutacijama, gdje inaktivirajuće mutacije KEAP1 dovode do prekomjerne ekspresije NRF2. Ova prekomjerna ekspresija NRF2 dovodi do progresije tumora uzrokujući i podržavajući metabolički pomak i reprogramiranje, što rezultira metastazama i otpornošću na cisplatinu (347–349). Preživljavanje i proliferacija ovih stanica uvelike ovise o povećanoj aktivnosti NRF2, a nazivaju se i "NRF2 ovisnice" (312).

Signalni put NRF2 isprepliće se s drugim signalnim putovima. Stoga promjene u aktivnosti drugih putova moduliraju aktivnost NRF2 te povećavaju otpornost tumora. Takav primjer je E3 ligaza NEDD-4, koja regulira PTEN (tumor supresor fosfataza i TENSin homolog) koji dalje regulira put PI3K/AKT/mTOR i utječe na AKT/NRF2/HMOX-1 osovinu (350).

Obzirom na navedeno, signalni put NRF2 i njegove interakcije s drugim signalnim putovima vrlo su važni za otpornost tumora na kemoterapiju, radioterapiju i terapije temeljene na antitijelima. Stoga je NRF2 atraktivna meta za napredne, visoko selektivne terapije raka.

1.3.5. FOXO

Obitelj transkripcijskih faktora Forkhead box (FOX) dobila je ime po *Drosophila* forkhead genu. FOX obitelj sadrži devetnaest podobitelji gena FOXO, FOXA i FOXS, a definirana je visoko konzerviranom krilato spiralnom DNA-vezujućom domenom i motivom vilice. Druga (O) podobitelj FOX, FOXO, sačuvana je od *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) do sisavaca; samo jedan FOXO gen postoji kod beskralješnjaka, dok sisavci imaju 4 FOXO gena, FOXO1, FOXO3, FOXO4 i FOXO6. FOXO1, FOXO4 i FOXO6 pojačano su izraženi u masnom, koštanom i živčanom tkivu, dok se FOXO3 u većoj količini nalazi u slezeni, želucu, crijevima, bubrezima i srčanom tkivu. Ova četiri gena uključena su u stanične putove koji reguliraju proliferaciju (FOXO1, FOXO3 i FOXO4), otpornost na oksidacijski stres (FOXO1 i FOXO3), metabolizam (FOXO1 i FOXO3), staničnu diferencijaciju (FOXO3), upalu (FOXO1, FOXO3 i FOXO4), starenje (FOXO1, FOXO3 i FOXO4) i apoptozu (FOXO1, FOXO3 i FOXO4) u sisavaca (351).

1.3.5.1. Regulacija FoxO

Ekspresija specifičnih FoxO članova kod sisavaca tkivno je specifična i regulirana prostorno i vremenski u različitim razvojnim fazama (352,353). FoxO transkripcijski faktori detektiraju promjene u izvanstaničnom ili unutarstaničnom okruženju. Njihova aktivnost je pod utjecajem različitih signala, poput faktora rasta koji aktiviraju PI3K/AKT signalni put i različitih signala stresa, uključujući oksidacijski stres (354). FoxO ima ulogu u raznim bolestima, uključujući rak. Općenito, imaju funkciju tumor supresora poticanjem aresta staničnog ciklusa, apoptoze, otpornosti na stres i popravka DNA, a inaktivirani su u različitim vrstama raka kod ljudi (355,356). Osim toga, FoxO su središnji regulatori, nalazeći se na raskrižju staničnog metabolizma, diferencijacije i transformacije (357,358). Novija istraživanja pokazuju da bi FOXO3 mogao biti i onkogen (359). Regulacija FOXO odvija se regulacijom transkripcijske aktivnosti, stanične lokalizacije, stabilnosti proteina te regulacijom na razini mRNA. FOXO se nalaze pod negativnom regulacijom puta faktora rasta- PI3K/AKT, koji je često hiperaktivan kod malignih tumora (360)

U stanjima oksidacijskog stresa FOXO se aktiviraju putem c-Jun N-terminalne kinaze (JNK). (361). FOXO ima ulogu i u energetsom metabolizmu stanice. Pri energetsom deficitu, tj. porastu AMP/ATP, dolazi do aktivacije AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK), koja fosforilira FOXO3, što izaziva porast ekspresije gena uključenih u antioksidacijski odgovor i energetske metabolizam. Faktori rasta i različiti oblici stresa aktiviraju kinaze koje fosforilacijom reguliraju aktivnost FoxO. Općenito, kinaze aktivirane čimbenicima rasta koji potiču razvoj tumora (kao što je AKT) inhibiraju funkciju FoxO, dok kinaze aktivirane stresom, kao što su JNK, AMPK i PERK, potiču funkciju FoxO. Fosforilacija FoxO kontrolira funkciju FoxO kroz tri glavna mehanizma: nuklearna lokalizacija, transkripcijska aktivnost i stabilnost proteina. Stabilnost FoxO proteina regulirana je ubikvitinacijom i posljedičnom proteasomalnom degradacijom (362). Određeni okolišni podražaji aktiviraju uzvodne kinaze koje fosforiliraju FoxO, koji tada postaje podložan za ubikvitinaciju i degradaciju (363,364).

Uz fosforilaciju i ubikvitinaciju, regulatori FoxO mogu modificirati aktivnost FoxO drugim posttranslacijskim modifikacijama, uključujući acetilaciju, metilaciju, glikozilaciju i hidroksilaciju. Acetilacija staničnih proteina je važna posttranslacijska modifikacija koja pokriva 80-90% ukupnog staničnog proteoma (365). Acetilacija FoxO utječe na funkciju FoxO dvojako, mijenjanjem vezanja FoxO na DNA ili isključivanjem FoxO iz jezgre (366,367). Acetilacija FoxO može izazvati različite rezultate. Primjer je acetilacija putem CBP, koja kod

FoxO1 izaziva pojačanu transkripcijsku aktivnost, a kod FoxO4 izaziva inhibiciju transkripcije (368,369). Također, FoxO3 se acetilira u oksidacijskom stresu, te se povezuje sa SIRT1, koji onda deacetilira FoxO3 zbog čega dolazi do aresta staničnog ciklusa i prevencije apoptoze (370).

Transkripciju FoxO mogu regulirati različiti transkripcijski faktori, uključujući E2F-1, TP53, HIF-1 α i sam FoxO. E2F-1 povećava ekspresiju FoxO1 i FoxO3 (371). TP53 se aktivira oštećenjem DNA i može se vezati na promotorsku regiju FoxO3 te započeti transkripciju FoxO3 (372,373). FoxO promotor sadrži vezna mjesta i za HIF-1 α , čime dolazi do negativne povratne sprege. Naime, hipoksija povećava razinu HIF-1 α , koji izaziva transkripciju FoxO, a potom FoxO inhibira HIF-1 α induciranu apoptozu (374). FoxO3 može povećati ekspresiju FoxO1 i FoxO4(375). Nakon tretmana faktorima rasta, sva tri FoxO smanjuju ekspresiju, vjerojatno inhibicijom fosforilacije FoxO3. S druge strane, moguć je i suprotan učinak FoxO3, kao što je inhibicija transkripcije FoxO1 koja je vidljiva kod stanica raka prostate (376).

Na postranskripcijskoj razini regulacija FoxO odvija se putem stabilizacije njegove mRNA pomoću RNA vezajućeg proteina HuR (377), te putem nekodirajućih RNA, uključujući miRNA (378) i duge nekodirajuće RNA (lncRNA) (93). Kod karcinoma dojke, duga nekodirajuća RNA lncFoxO1 povećava ekspresiju FoxO1 i djeluje kao supresor razvoja raka dojke (378).

1.3.5.2. FoxO kod raka

Ekspresija FoxO kod raka prvo je otkrivena kao fuzijski produkt kromosomske translokacije (FoxO1 kod alveolarnog rhabdomiosarkoma, FoxO3 i FoxO4 kod AML)(379–381). FoxO općenito funkcioniraju kao tumor-supresori što se očituje u deleciji ili inaktivaciji kod raka (npr FoxO1 i FoxO3 kod raka prostate)(382). Snažan tumor-supresorski učinak vidljiv je i po tome što za tumorima sklon fenotip treba učiniti deleciju svih 6 alela za FoxO1, 3 i 4 (383,384). Na staničnim linijama dokazano je da FoxO obitelj mogu limitirati brojna obilježja raka – smanjiti proliferaciju (385–388), poticati apoptozu i senescentnost (389–392), a limitirati angiogenezu (392), invazivnost i metastatski potencijal (393)(394).

Uloga FOXO kao tumor supresora ipak nije jednoznačna te ima dokaza kako FOXO djeluju i kao onkogeni. Kod kronične i akutne mijeloične leukemije FoxO3 ima značajnu ulogu u održavanju leukemija-inicirajućih stanica, matičnih stanica leukemije odgovornih za ponovno javljanje rezistencije na lijekove (395,396). Uz to, FoxO3 može potaknuti i invaziju tumora,

povećanjem ekspresije metaloproteinaza matriksa, specifično MMP-9 i MMP-13 (397). Uz deacetilaciju, FoxO3a putem regulacije ekspresije Bim modulira osjetljivost tumorskih stanica na paklitaksel (398).

FoxO1 može posredovati rezistenciju na adriamicin indukcijom ekspresije multimedikamentne rezistencije 1 proteina (MDR1)(399). Prilagodba tumorskih stanica na kemoterapiju može biti posredovana FoxO induciranom reaktivacijom puta PI3K-AKT (400–402) Također, FoxO mogu inducirati i povećanu proizvodnju metabolita značajnih za razvoj tumora, poput 2-hidroksiglutarata (403).

FoxO regulacija transkripcijske koordinirana je s drugim transkripcijskim faktorima, poput YAP, s kojim regulira ekspresiju MnSOD i katalaze tijekom odgovora na oksidacijski stres (404). Zaključno, FoxO općenito djeluju kao tumorsupresori, no u određenim uvjetima FoxO također mogu pospješiti razvoj tumora. Stoga Hornsvelt i sur. sugeriraju da FoxO nisu tipični tumorsupresori nego da su u stanju pojačati otpornost svih stanica, kako zdravih, tako i tumorskih(405).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati povezanost razvoja rezistencije na kemoterapiju kod HER2+ i trostruko negativnih tumora dojke s ekspresijom akvaporina AQP3 i AQP5 te transkripcijskih faktora NRF2 i FOXO1, s ciljem identificiranja potencijalnih molekularnih pokazatelja koji bi mogli doprinijeti razvoju prediktivnog modela odgovora na kemoterapiju.

U svrhu ostvarenja glavnog cilja postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. odrediti promjene u ekspresiji akvaporina AQP3 i AQP5 uzrokovane kemoterapijom induciranim oksidacijskim stresom u stanicama tumora i strome;
2. odrediti promjene u ekspresiji transkripcijskih faktora NRF2 i FOXO1 uzrokovane kemoterapijom induciranim oksidacijskim stresom u stanicama tumora i strome;
3. analizirati povezanost ekspresije AQP3 i AQP5 s ekspresijom NRF2 i FOXO1 prije i nakon provedene kemoterapije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je provedeno kroz retrospektivnu studiju na kohorti opće populacije pacijentica liječenih u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice u razdoblju od 2016 do 2021. godine. Istraživanje je vođeno bolničkim protokolima za liječenje tumora dojke, a u istraživanje su uključene pacijentice s HER2 pozitivnim i trostruko negativnim karcinomom dojke (stadija II i III). Pacijentice sa sumnjom na tumor dojke prolazile su inicijalnu širokoiglenu biopsiju prilikom koje je patolog odredio točnu dijagnozu. Nakon postavljene dijagnoze pacijentica je prolazila liječenje sukladno standardnim protokolima te su liječene neoadjuvantnom kemoterapijom sa ili bez bioterapije (anti-HER2 terapija) u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice. Nakon terapije proveden je onkološki operacijski zahvat ostatnog tumora (operacijske biopsije). Za istraživanje su uzeti uzorci inicijalne iglene biopsije te uzorci ležišta tumora. Za odabir pacijentica uzeti su u obzir sljedeći kriteriji: cjelovito provođenje sustavne terapije i operacijsko liječenje u Klinici za tumore, te dostupnost adekvatnih poslijeoperacijskih uzoraka za imunohistokemijsko bojanje četiri istraživana proteina.

3.2. Dozvola Etičkog povjerenstva

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice pod brojem 251-29-11-21-01-10. Prilikom dizajna istraživanja vodilo se računa o etičkim standardima Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine te njenim modifikacijama iz 1983. godine te je istraživanje u potpunosti usklađeno s navedenim. Podaci o karakteristikama pacijentica, primljenoj terapiji te kliničkim i radiološkim karakteristikama tumora preuzeti su iz povijesti bolesti i radioloških nalaza bolničkih informacijskih sustava te su kodirani. U svrhu zaštite osobnih podataka pacijentica, pristup istima imao je samo glavni istraživač.

3.3. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 131 pacijentica s karcinomom dojke od 2016. do 2021. godine, čiji su uzorci arhivirani u Odjelu za onkološku patologiju Klinike za tumore. Istraživanje je provedeno u Klinici za tumore, KBC „Sestre milosrdnice“ te na Institutu Ruđer Bošković. Retrospektivno istraživanje obuhvaća kohortu opće populacije pacijentica s HER2 pozitivnim (N075) i trostruko negativnim karcinomom dojke (stadija II i III) (N=56) koje su liječene neoadjuvantnom kemoterapijom s ili bez bioterapije (anti-HER2 terapija) u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice. Podaci o pacijenticama vođeni su pod šiframa, a identiteti su poznati isključivo voditelju projekta. Uz podjelu po imunofenotipu, pacijentice su podjeljene i po ishodu neoadjuvantnog liječenja. Ishod neoadjuvantnog liječenja određuje se matematičkim modelom prema patohistološkim karakteristikama ostatnog tumora u dojci i limfnim čvorovima, a izražava se kao ostatno tumorsko opterećenje (eng. *Residual Cancer Burden* – RCB). RCB određuje patohistološki odgovor - potpuni patohistološki odgovor (engl. *pathohistological complete response*, pCR) ili RCB=0 označava odsutnost ostatnog invazivnog karcinoma u dojci i limfnim čvorovima, pri čemu mogu biti prisutne ostatne neinvazivne (in situ) tumorske stanice, dok RCB>0 označava veće ostatno tumorsko opterećenje (407).

3.4. Metode

3.4.1. Uzimanje i obrada uzoraka

Inicijalni uzorci dobiveni su širokoiglenim biopsijama prilikom inicijalne dijagnostike tumora. Nakon završene onkološke terapije i izvedenog onkološkog operacijskog zahvata ostatnog tumora (operacijske biopsije) dobiveni su operacijske biopsije. Obje biopsije podvrgnute su standardnom imunohistokemijskom bojanju tumora kako bi se odredio fenotip. Prema imunofenotipu inicijalne biopsije odabrani su HER2 pozitivni i trostruko negativni tumori. Tkivo uzeto za obje biopsije obrađeno je standardnim histološkim postupkom. Uzorci tkiva fiksirani su u 10% puferiranom formalinu 48 sati. Nakon fiksacije tkiva su dehidrirana kroz niz otopina alkohola s uzlaznim koncentracijama alkohola (70%, 96% i apsolutni etanol). Nakon apsolutnog etanola tkiva su dehidrirana u ksilenu te prožeta parafinom da bi konačno bila uklopljena u parafin.

Parafinske kocke dobivene na ovako opisan način mikrotomom su narezane na rezove debljine 5 µm koji su korišteni za daljnju analizu i imunohistokemijsko bojenje.

3.4.2. 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 je zatim rehidriran do destilirane vode kroz silazni niz koncentracija etanola (apsolutni, 96%, 70%). Nakon što su uzorci u potpunosti rehidrirani, uzorci su inkubirani u metanolu 2 minute te potom isprani tri puta po 5 minuta PBS-om te se pristupilo bojanjima specifičnih antigena.

Za detekciju NRF2 potrebno je „odmaskirati“ antigene (engl. *antigen retrieval*) kako bi moglo doći do prepoznavanja od strane antitijela. Za tu svrhu tkivo je potrebno termički obraditi. Za termičku obradu korišten je citratni pufer pH 6,0, pri čemu su uzorci inkubirani na temperaturi od 85 °C 30 minuta za detekciju NRF2. Nakon termičke obrade, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u PBS-u te su zatim inkubirani s primarnim mišjim monoklonskim antitijelom anti-NRF2 (1:100, ab31163, Abcam, Velika Britanija) preko noći na 4°C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su blokirane endogene peroksidaze inkubacijom u 3% H₂O₂ 20 minuta u mraku. Uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su inkubirani sekundarnim antitijelom En Vision, (DAKO, Danska). Ponovno, uzorci su isprani od ostataka antitijela tri puta po 5 minuta u TBS-u, te se pristupilo vizualizaciji kompleksa antigen-antitijelo dodatkom kromogena DAB (DAKO). DAB je substrat peroksidaze, koja je vezana za sekundarno antitijelo i reakcijom daje netopivi spoj koji je smeđe obojan. Nakon 2 do 5 minuta, višak DAB-a se uklonio ispiranjem u destiliranoj vodi te su uzorci inkubirani 10 sekundi s hemalaunom kako bi se vizualizirale jezgre (one su obojane plavo). Nakon ispiranja u vodovodnoj vodi pristupilo se dehidraciji tkiva kroz uzlazni niz koncentracija etanola (70%, 96%, apsolutni) te konačna dehidracija u ksilenu nakon čega su uzorci uklopljeni u medij za uklapanje uzoraka čime je dobiven trajni preparat.

Za detekciju AQP3 rehidrirani uzorci su inkubirani u metanolu 2 minute i isprani tri puta po 5 minuta u PBS-u. Nakon ispiranja uzorci su inkubirani s primarnim mišjim monoklonskim antitijelom anti-AQP3 (F-1) (1:50, sc-518001, Santa Cruz Technology, SAD) preko noći na 4°C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su blokirane endogene peroksidaze inkubacijom u 3% H₂O₂ 20 minuta u mraku. Uzorci su isprani

tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su inkubirani sekundarnim antitijelom En Vision, (DAKO, Danska). Ponovno, uzorci su isprani od ostataka antitijela tri puta po 5 minuta u TBS-a, te se pristupilo vizualizaciji kompleksa antigen-antitijelo dodatkom kromogena DAB (DAKO). DAB je substrat peroksidaze, koja je vezana za sekundarno antitijelo i reakcijom daje netopivi spoj koji je smeđe obojan. Nakon 2 do 5 minuta, višak DAB-a se uklonio ispiranjem u destiliranoj vodi te su uzorci inkubirani 10 sekundi s hemalaunom kako bi se vizualizirale jezgre (one je bojaju plavo). Nakon ispiranja u vodovodnoj vodi pristupilo se dehidraciji tkiva kroz uzlazni niz koncentracija etanola (70%, 96%, apsolutni) te konačna dehidracija u ksilenu nakon čega su uzorci uklopljeni u medij za uklapanje uzoraka čime je dobiven trajni preparat.

Za detekciju AQP5 rehidrirani uzorci su inkubirani u metanolu 2 minute i isprani tri puta po 5 minuta u PBS-u. Nakon ispiranja uzorci su inkubirani s primarnim mišjim monoklonskim antitijelom anti-AQP5 (D-7) (1:50, sc-514022, Santa Cruz Technology) preko noći na 4°C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su blokirane endogene peroksidaze inkubacijom u 3% H₂O₂ 20 minuta u mraku. Uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su inkubirani sekundarnim antitijelom En Vision, (DAKO, Danska). Ponovno, uzorci su isprani od ostataka antitijela tri puta po 5 minuta u TBS-a, te se pristupilo vizualizaciji kompleksa antigen-antitijelo dodatkom kromogena DAB (DAKO). DAB je substrat peroksidaze, koja je vezana za sekundarno antitijelo i reakcijom daje netopivi spoj koji je smeđe obojan. Nakon 2 do 5 minuta, višak DAB-a se uklonio ispiranjem u destiliranoj vodi te su uzorci inkubirani 10 sekundi s hemalaunom kako bi se vizualizirale jezgre (one je bojaju plavo). Nakon ispiranja u vodovodnoj vodi pristupilo se dehidraciji tkiva kroz uzlazni niz koncentracija etanola (70%, 96%, apsolutni) te konačna dehidracija u ksilenu nakon čega su uzorci uklopljeni u medij za uklapanje uzoraka čime je dobiven trajni preparat.

Za detekciju FOXO1 potrebno je „odmaskirati“ antigene (engl. *antigen retrieval*) kako bi moglo doći do prepoznavanja od strane antitijela. Za tu svrhu tkivo je potrebno termički obraditi. Za termičku obradu korišten je citratni pufer pH 6,0, pri čemu su uzorci inkubirani na temperaturi od 85 °C 30 minuta za detekciju NRF2. Nakon termičke obrade, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBST-u te su zatim inkubirani s primarnim zečjim antitijelom anti-FOXO1 (C29H4) (1:100, 2880S, Cell Signaling Technology, SAD) preko noći na 4°C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su blokirane endogene peroksidaze inkubacijom u 3% H₂O₂ 20 minuta u mraku. Uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBS-u, te su inkubirani sekundarnim antitijelom En Vision, (DAKO, Danska). Ponovno, uzorci

su isprani od ostataka antitijela tri puta po 5 minuta u TBS-a, te se pristupilo vizualizaciji kompleksa antigen-antitijelo dodatkom kromogena DAB (DAKO). DAB je substrat peroksidaze, koja je vezana za sekundarno antitijelo i reakcijom daje netopivi spoj koji je smeđe obojan. Nakon 2 do 5 minuta, višak DAB-a se uklonio ispiranjem u destiliranoj vodi te su uzorci inkubirani 10 sekundi s hemalaunom kako bi se vizualizirale jezgre (one je bojaju plavo). Nakon ispiranja u vodovodnoj vodi pristupilo se dehidraciji tkiva kroz uzlazni niz koncentracija etanola (70%, 96%, apsolutni) te konačna dehidracija u ksilenu nakon čega su uzorci uklopljeni u medij za uklapanje uzoraka čime je dobiven trajni preparat.

3.4.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka

Za sva antitijela pratila se lokalizacija pozitiviteta unutar stanice, za NRF2 i FOXO1 jezgra i citoplazma, za akvaporine membrana i citoplazma (pozitivitet u jezgri nije uočen).

Obzirom da ne postoji standardizirani sustav bodovanja niti granična vrijednost pozitivnog/negativnog rezultata za sve istraživane receptore, dobiveno obojenje očitavali smo kao postotak obojenih tumorskih stanica na 1000 tumorskih stanica te 1000 stromalnih stanica.

3.5. Statistička analiza

Podaci su statistički obrađeni te su prikazani rezultati standardnih deskriptivnih statističkih metoda: srednja vrijednost i standardna devijacija. Rezultati su prikazani srednjom vrijednošću, standardnom greškom i postotcima tablično i grafički. Shapiro-Wilkovim testom ispitana je normalnost raspodjele podataka. Rezultati su obrađeni sljedećim statističkim testovima: Studentov t-test, Fisherov egzaktni test, χ^2 test, i jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA). Za statističke testove koji su obuhvaćali uzorke prije i nakon terapije korišteni su upareni testovi. Za sve testove uzeta je razina značajnosti $p < 0.05$.

Sakupljeni podaci za sve skupine analizirani su statističkim programima Microsoft Excel 2010, MedCalc 15.8.0 (Belgija) te GraphPad 8.0 (SAD) te jamovi 2.5 (The jamovi project (2024), <https://www.jamovi.org>).

Za statističku obradu dobivenih podataka primijenjene su standardne metode deskriptivne statistike za prikaz numeričkih (vrijednosnih) varijabli: aritmetička sredina, standardna pogreška aritmetičke sredine te prosjek za prikaz zbirnih vrijednosti atributivnih varijabli.

Konačno, za analizu povezanosti promatranih varijabli vezanih uz dijagnozu, ishod bolesti, primljene terapije s varijablama imunohistokemijskih bojanja, korištena je Spearmanova korelacija, koja se koristi kada među varijablama ne postoji linearna povezanost niti normalna distribucija. Za određivanje jačine korelacije korištena je klasifikacija prema Schoberu i suradnicima(406) pri čemu je raspon koeficijenta 0,3-0,69 umjerena korelacija, 0,7-0,89 jaka, a 0,9-1 vrlo jaka korelacija.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 131 pacijentica, od kojih je 56 pacijentica s dijagnozom trostruko negativnih tumora dojke i 75 HER2 pozitivnih pacijentica. Od 56 pacijentica s dijagnozom trostruko negativnog tumora, 13 pacijentica je imalo potpuni odgovor na terapiju, dok 43 nije. Kod HER2 pozitivnih tumora, 35 pacijentica je imalo potpuni odgovor na terapiju, dok 40 nije. Grupe se nisu razlikovale po starosti pacijentica. Prosječna starost pacijentica s trostruko negativnim tumorom dojke je 56,6 godine (minimum 30, maksimum 81), a pacijentica s HER2 pozitivnim tumorom prosječna starost je 58,7 (minimum 37, maksimum 83). Grupe se nisu razlikovale po promjeru tumora, gdje je prosječan tumor imao promjer 37,0 mm kod trostruko negativnih tumora dojke (minimum 10 mm, maksimum 100 mm) i 36,7 mm kod HER2 pozitivnih tumora (minimum 14 mm, maksimum 100 mm). Grupe su se značajno razlikovale u RCB, koji je kod trostruko negativnih tumora dojke iznosio 2,11 (medijan 2,12, a kod HER2 pozitivnih tumora 1,11 (medijan 0,482).

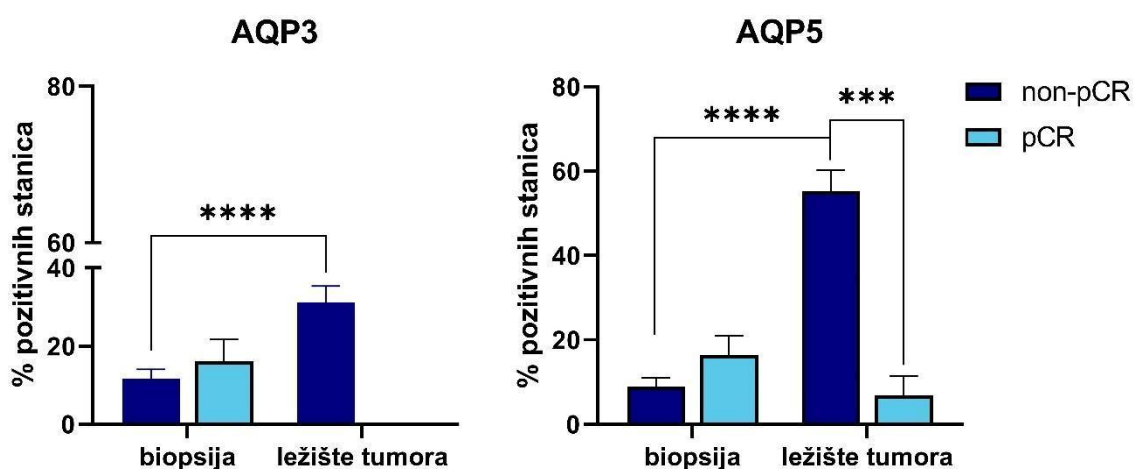
4.1. Izražajnost FOXO1 u tumorima dojke

Kako bi se ispitala izražajnost transkripcijskog faktora FOXO1 u HER2 pozitivnim i trostruko negativnim tumorima dojke, provedeno je imunohistokemijsko bojanje specifičnim anti-FOXO1 antitijelom. Bojanje specifičnim antitijelom pokazalo je kako u navedenim tumorima dojke FOXO1 nije izražen, niti u tumorskom tkivu niti u stromi.

4.2. Izražajnost AQP3 i AQP5 u tumoru dojke

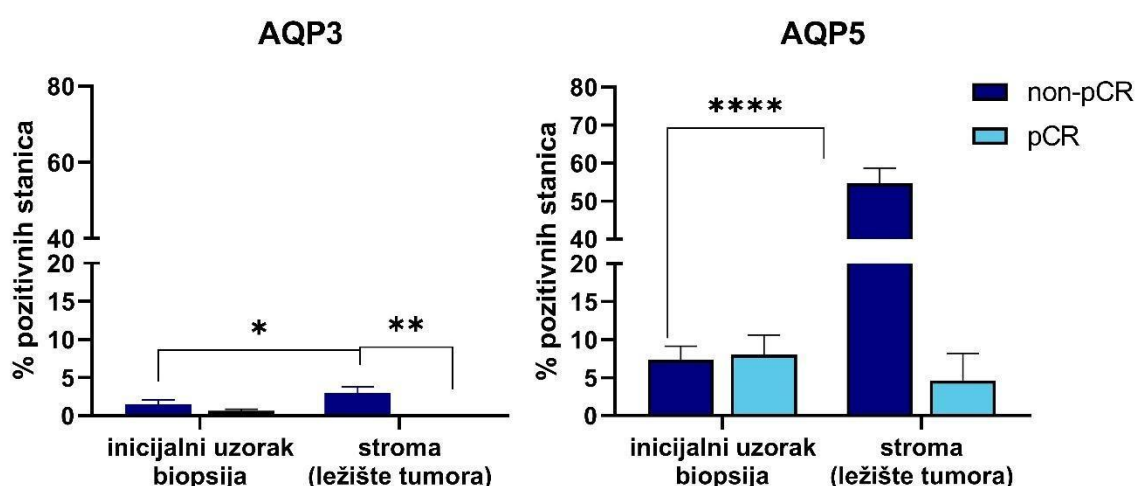
4.2.1. Izražajnost akvaporina u odnosu na odgovor na terapiju

Kako bi se istražila povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 i odgovora na terapiju, usporedio se postotak pozitivnih tumorskih stanica na AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. U inicijalnoj biopsiji je manje od 20% stanica pozitivno na AQP3 i nema razlike u odnosu na odgovor na terapiju. Nakon provedene terapije uočava se statistički značajan porast AQP3 u ostatnom tkivu tumora u odnosu na inicijalnu biopsiju ($p < 0,0001$) kod nepotpunog odgovora na terapiju (non-pCR), dok se kod potpunog odgovora ne nalazi pozitivnih stanica. Imunohistokemijsko bojenje AQP5 pokazalo je da je došlo do izrazitog statistički značajnog povećanja kod nepotpunog odgovora na terapiju (9% u inicijalnoj biopsiji nasuprot 56% u ostatnom tumoru, $p < 0,0001$) (Slika 6).



Slika 6. Izražajnost AQP3 i AQP5 u tumorskom tkivu tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ostatnom tkivu nakon provedene terapije. pCR – potpuni odgovor na terapiju; non-pCR nepotpuni odgovor na terapiju. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

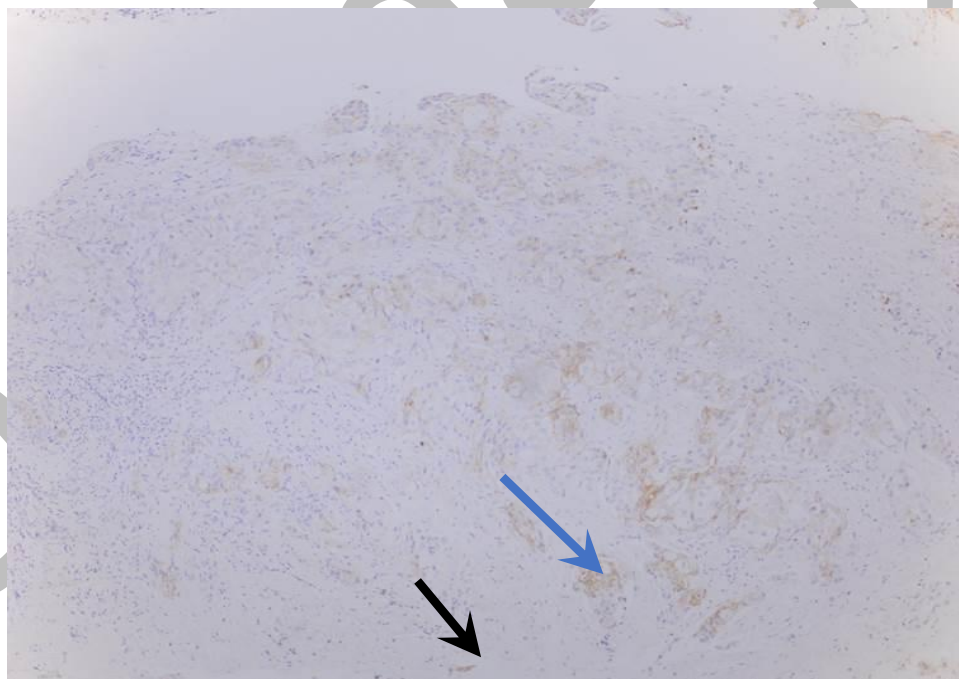
Kako bi se istražila povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 i odgovora na terapiju u stromi tumora, usporedio se postotak pozitivnih stanica strome na AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. U stromi inicijalnih i poslije operativnih uzoraka AQP3 bio je slabije izražen u odnosu na AQP5. U uzorcima u kojima je postojalo ostatno tumorsko tkivo nakon sustavne terapije (non-pCR) zabilježen je značajan porast ekspresije AQP5 ($p < 0,0001$) i AQP3 ($p = 0,0228$) u stromi. Također, kod potpunog odgovora na terapiju stanice strome ne pokazuju pozitivnost na AQP3 te se statistički značajno razlikuju od AQP3 pozitivnosti u stanicama strome kod nepotpunog odgovora na terapiju ($p = 0,006$) (Slika 7).



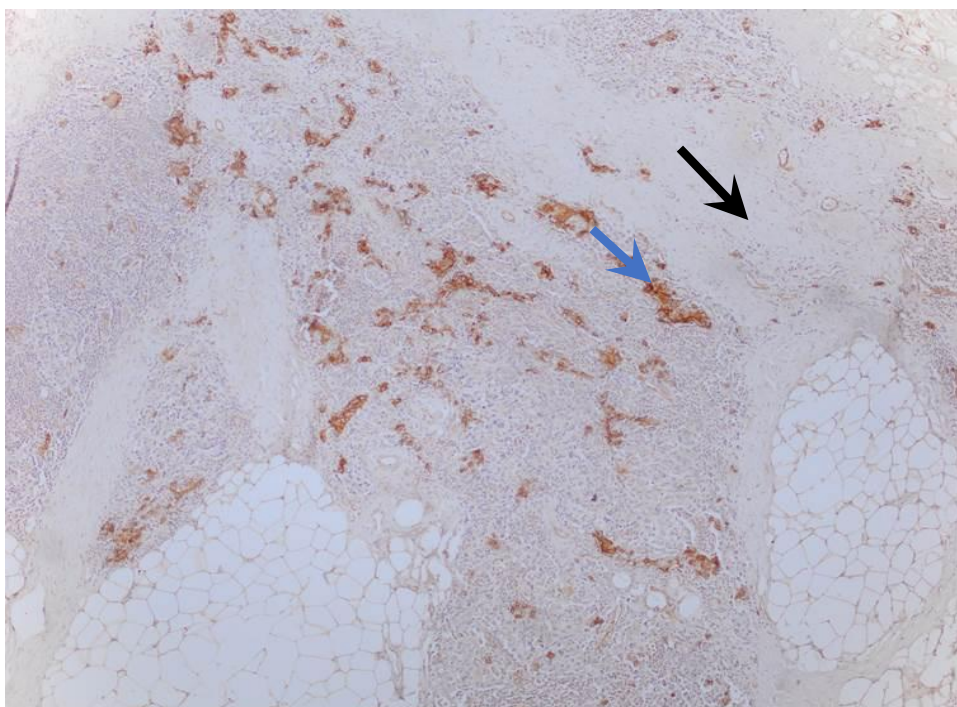
Slika 7. Izražajnost AQP3 i AQP5 u stromi tumora/ležišta tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom tkivu nakon provedene terapije: pCR – potpuni odgovor na terapiju; non-pCR nepotpuni odgovor na terapiju. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

4.2.2. Izražajnost akvaporina u odnosu na imunofenotip

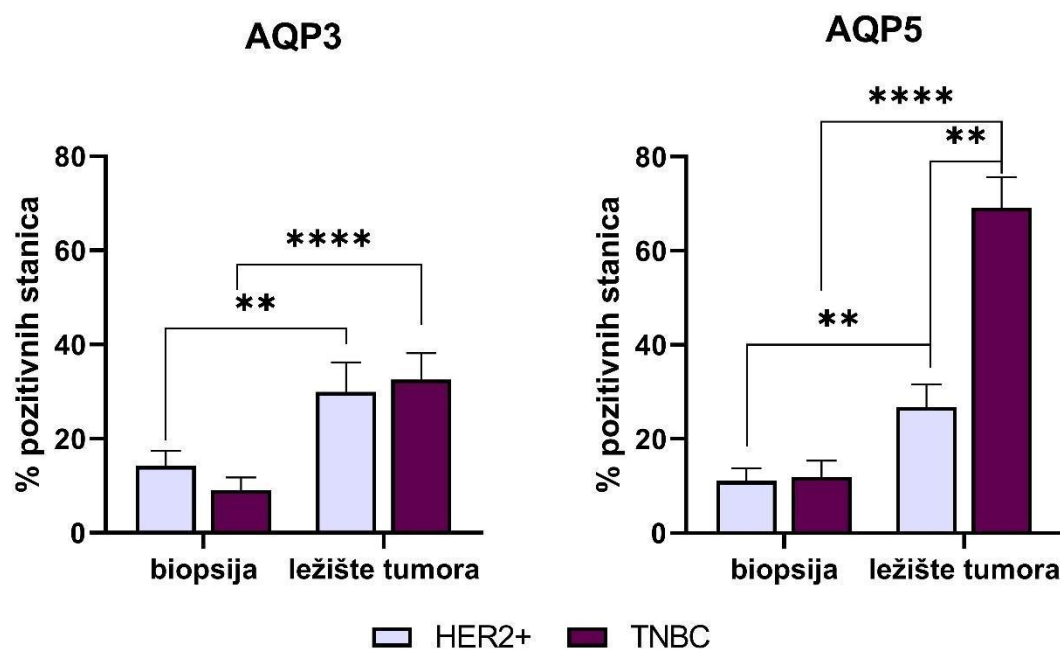
Sljedeće se istražila povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 s imunofenotipom tumora, na način da se usporedio postotak pozitivnih tumorskih stanica na AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora u HER2 pozitivnim i trostruko negativnim tumorima dojke (reprezentativne slike imunohistokemijskog bojenja prikazane na Slikama 8. i 9.). Kod oba istraživana imunofenotipa tumora nakon provedene neoadjuvantne sustavne terapije, pokazan je statistički značajan porast ekspresije AQP3 (HER2 pozitivni tumor $p=0,0058$, trostruko negativni tumor dojke $p<0,0001$). Također, i za AQP5 je pokazan statistički značajan porast ekspresije i kod HER2 pozitivnih tumora ($p=0,0099$) i kod trostruko negativni tumor dojke ($p<0,0001$) nakon provedene neoadjuvantne sustavne terapije. Nakon provedene neoadjuvantne sustavne terapije pokazan je statistički značajno veći udio stanica s povišenom ekspresijom AQP5 kod trostruko negativnih tumora dojke (69%) u odnosu na HER2 pozitivne tumore (28%, $p=0,002$). Istovremeno, nema značajne razlike u ekspresiji AQP3 kod HER2 pozitivnih i trostruko negativnih tumora (slika 10).



Slika 8. Izražajnost AQP3 u tumoru i stromi trostruko-negativnog tumora dojke, povećanje 100x, plava strelica - tumor; crna strelica – stroma



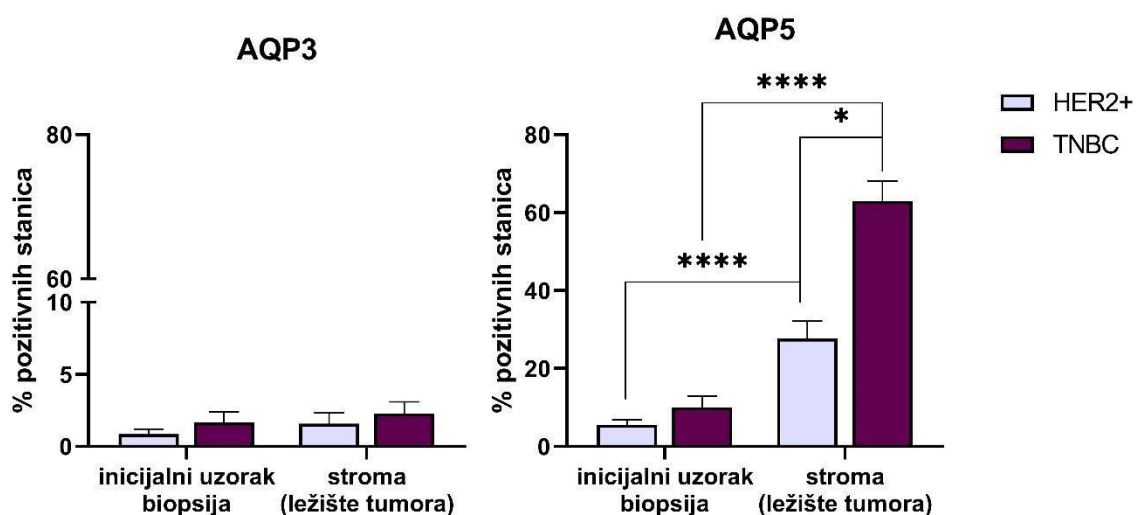
Slika 9. Ekspresija AQP5 u tumoru i stromi trostruko-negativnog tumora dojke, povećanje 100x, plava strelica – tumor; crna strelica - stroma



Slika 10. Izražajnost AQP3 i AQP5 u tumorskom tkivu HER2 pozitivnih (HER2+) i trostruko negativnih tumora dojke (TNBC). Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i

operativno odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

Nakon što se ispitala povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 s imunofenotipom tumora u stanicama tumora, ispitala se povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 u stanicama strome u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora u HER2 pozitivnim i trostruko negativnim tumorima dojke. Zanimljivo, u stromi, kod oba imunofenotipa raka dojke pokazana je viša ekspresija AQP5 u odnosu na AQP3, koji je izrazito nizak. Slijedom izrazito niske ekspresije AQP3 u stromi oba imunofenotipa, nije bilo statističke razlike u ekspresiji AQP3 u odnosu na imunofenotip ili terapiju. Međutim, kod AQP5 zabilježen je statistički značajan porast ekspresije u stromi nakon sustavne terapije i kod HER2 pozitivnih tumora ($p < 0,0001$) i kod trostruko negativnih tumora dojke ($p < 0,0001$). Također, rezultati prate pojavu AQP5 u tumorskim stanicama pa je tako udio stanica s povišenom ekspresijom AQP5 nakon sustavne terapije bio značajno veći u stromi trostruko negativnog tumora u odnosu na HER2 pozitivni tumor ($p = 0,019$) (Slika 11).



Slika 11. Izražajnost AQP3 i AQP5 u stromi HER2 pozitivnih (HER2+) i trostruko negativnih tumora dojke /TNBC). Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno

odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$

4.2.3. Izražajnost akvaporina u odnosu na odgovor na terapiju kod HER2 pozitivnih tumora dojke i kod trostruko negativnih tumora dojke

Obzirom da je uočeno povećanje u izraženosti AQP3 i AQP5 u tumoru nakon provedene neoadjuvantne sustavne terapije posebice kod nepotpunog odgovora na terapiju te kod oba promatrana imunofenotipa tumora, pacijenti su podijeljeni po imunofenotipu i odgovoru na terapiju.

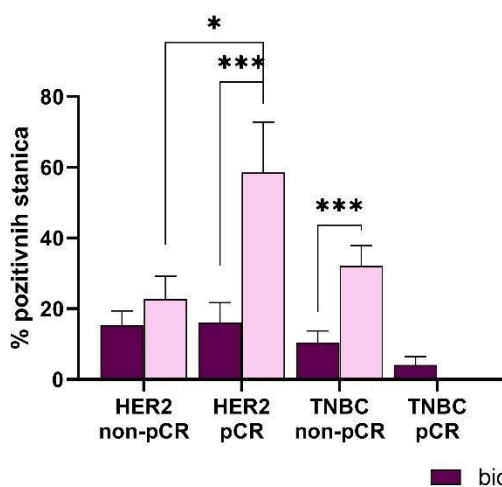
Analizom izraženosti AQP3 u HER2 pozitivnim tumorima pokazan je statistički značajan porast ekspresije AQP3 u ležištu tumora kod potpunog patohistološkog odgovora u odnosu na nepotpuni ($p=0,0349$). Također, porast izraženosti AQP3 uočeno je kod HER2 pozitivnih tumora kod kojih je postignut potpuni patohistološki odgovor (ostatne stanice u ležištu tumora, zadovoljen kriterij pCR) u odnosu na inicijalne uzorke ($p<0,001$). Kod trostruko negativnih tumora pokazan je statistički značajan porast ekspresije AQP3 u stanicama tumora kod kojih nije postignut potpuni patohistološki odgovor ($p<0,001$).

Analiza je pokazala značajan porast izraženosti AQP5 nakon sustavne terapije i kod ostalih HER2 pozitivnih (8 % vs 42 % , $p=0,0016$) i trostruko negativnih (s 10 % na 69 % , $p<0,001$) tumora. Porast izraženosti AQP5 nakon sustavne terapije bio je najveći kod ostatnog trostruko negativnog tumora ($p<0,001$) u odnosu na inicijalnu biopsiju, a zanimljivo je da je izraženost AQP5 statistički značajna u odnosu na HER2 pozitivne tumore (42% vs 69 % , $p=0,004$).

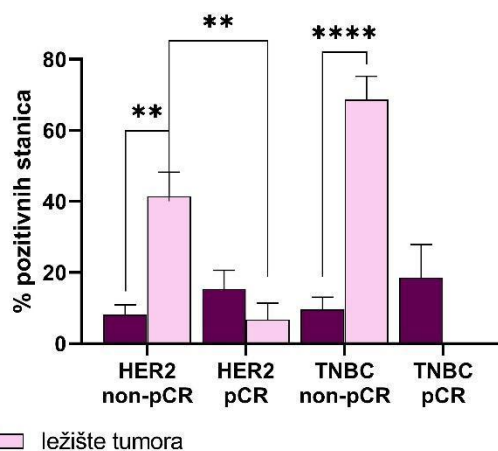
U slučajevima potpunog patohistološkog odgovora, u ležištu tumora nakon sustavnog liječenja trostruko negativnih tumora nije pronađena ekspresija ni AQP3 niti AQP5.

Ostatni HER2 pozitivni tumori (non-PCR) imali su značajno višu ekspresiju AQP5 u odnosu na ostatne tumorske stanice HER2 pozitivnih tumora koji su zadovoljili kriterije potpunog patohistološkog odgovora (pCR) (42 % vs 7 % , $p=0,002$) (Slika 12).

AQP3 u tumoru: pCR po imunofenotipu



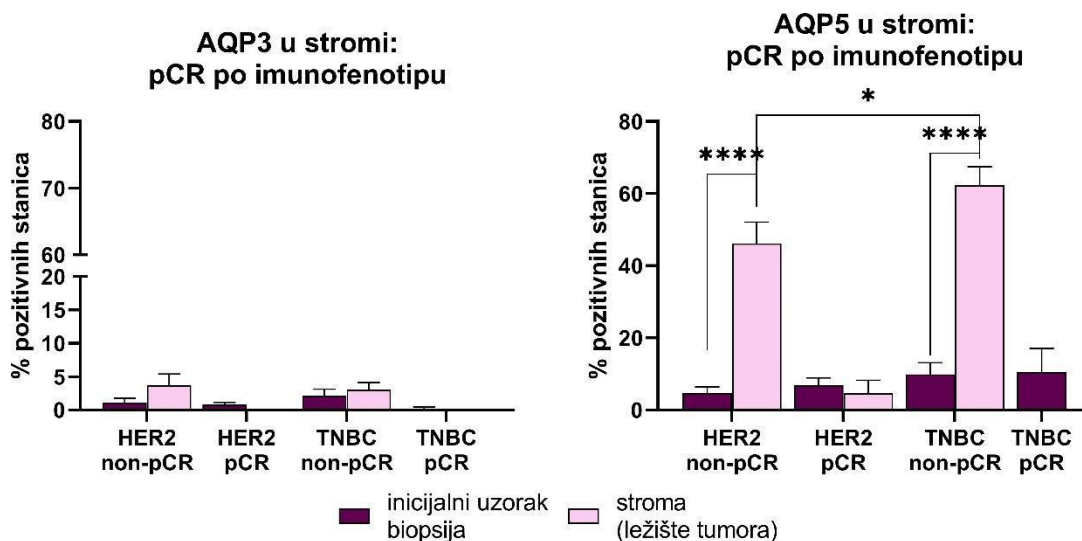
AQP5 u tumoru: pCR po imunofenotipu



Slika 12. Izražajnost AQP3 i AQP5 u tumorskom tkivu HER2 pozitivnih (HER2+) i trostruko negativnih tumora dojke (TNBC) u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ispitana je i ekspresija AQP3 i AQP5 u **stromi** ovisno o oba promatrana parametra, o patohistološkom odgovoru i imunofenotipu. Ekspresija AQP3 u stanicama strome kod oba imunofenotipa bila je niska, i prije i poslije sustavnog liječenja.

AQP5 je pokazao značajnu dinamiku kod oba fenotipa. Zabilježen je statistički značajan porast ekspresije AQP5 nakon sustavne terapije za oba imunofenotipa ($p < 0,0001$), s tim da je porast bio izraženiji kod TNBC u odnosu na HER2 pozitivne tumore (62 % vs 46 %, $p = 0,020$). Kod potpunog odgovora, ekspresija AQP5 u stromi ostala je niska i kod trostruko negativnih i HER2 pozitivnih tumora (Slika 13).



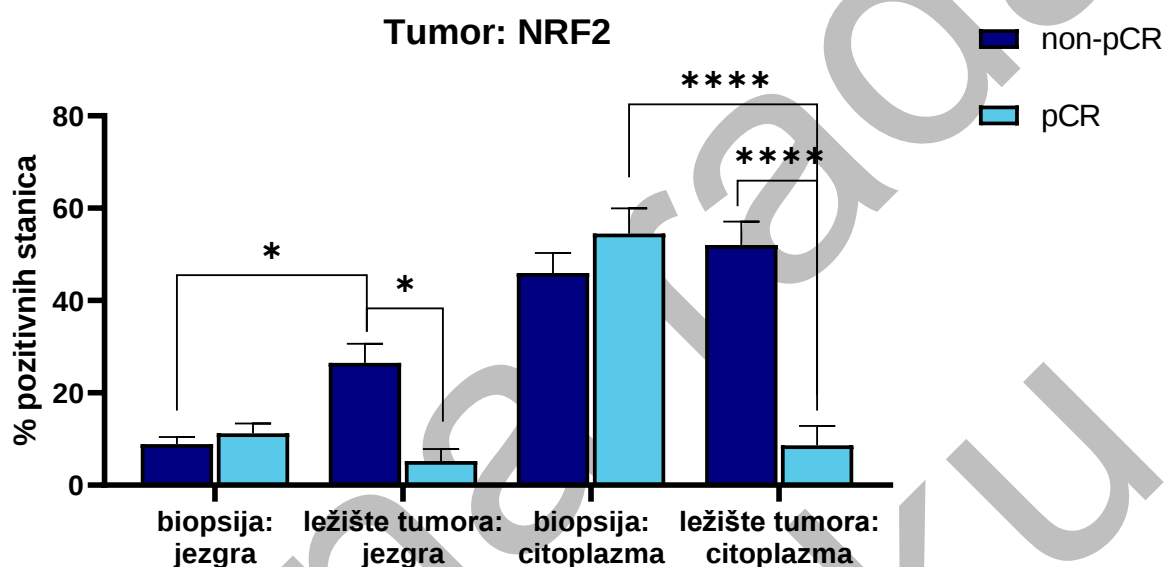
Slika 13. Izražajnost AQP3 i AQP5 u stromi HER2 pozitivnih (HER2+) i trostruko negativnih tumora dojke (TNBC) u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Usporedba izražajnosti AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ostatnom tkivu nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

4.3. Izražajnost NRF2 u tumoru dojke

4.3.1. Izražajnost NRF2 u odnosu na odgovor na terapiju

Kako bi se pratio utjecaj terapije na antioksidacijski odgovor stanica tumora i strome na primijenjenu terapiju, ispitana je izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Lokalizacija NRF2 transkripcijskog faktora u jezgri upućuje na njegovu potencijalnu aktivaciju uslijed prisutnosti oksidacijskog stresa. Zabilježen je značajan porast ekspresije NRF2 u jezgrama **tumorskih stanica** kod ostatnih tumora (no- pCR) ($p = 0,0237$), što ukazuje na porast transkripcijske aktivnosti NRF2 uslijed kemoterapije. Kod tumora kod kojih je postignut pCR, ostatne tumorske stanice pokazale su značajno nižu ekspresiju NRF2 u jezgri u odnosu na stanice ostatnih tumora (non pCR) (5,4% vs 26,5%, $p = 0,0189$). Obzirom da je kod ostatnih tumora izražajnost NRF2 u jezgri bila značajno veća, može se zaključiti da NRF2 značajno sudjeluje u obrani tumorskih stanica i razvoju rezistencije na sustavnu terapiju. U citoplazmi tumorskih

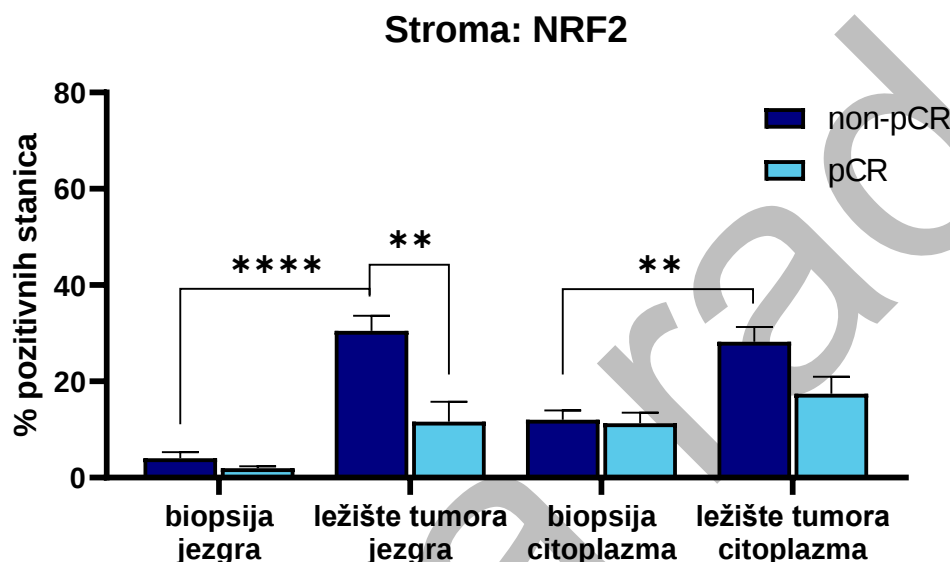
stanica izražajnost NRF2 ostala je podjednaka prije i poslije sustavne terapije. Najveći pad citoplazmatske razine NRF2 zabilježen je u ostatnim stanicama kod tumora koji su nakon kemoterapije ostvarili pCR, s 54,5% na 8,7 %, $p < 0,0001$). Tumori koji nisu zabilježili pCR, imali su nakon sustavne terapije također značajno višu razinu citoplazmatskog NRF2 u odnosu na ostatne tumorske stanice iz pCR grupe (52,0% vs 8,7 %, $p < 0,0001$) (Slika 14).



Slika 14. Izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju, pCR – potpuni odgovor na terapiju; non-pCR nepotpuni odgovor na terapiju. Usporedba izražajnosti NRF2 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ostatnom tkivu nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

Također, ispitana je izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 u **stanicama strome** tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. U stanicama strome, izražajnost NRF2 u jezgrama prije sustavne terapije bila je općenito niska. Nakon kemoterapije, zabilježen je statistički značajan porast izražajnosti NRF2 u jezgrama kod ostatnih tumora (non PCR) (4,1% vs 30,5 %, $p < 0,0001$), što upućuje na potrebu za aktivacijom antioksidacijske zaštite putem NRF2 i u stanicama strome nakon kemoterapije. Izražajnost NRF2 je značajno veća kod stanica strome u non-pCR grupi odnosu na stanice strome pCR skupine (30,5 % vs 11,6 %, $p = 0,0033$).

U citoplazmi stanica strome ostatnih tumora izražajnost NRF2 značajno je porasla nakon kemoterapije (s 12,0 % na cca 28,3 %, $p=0,0038$) (Slika 15).



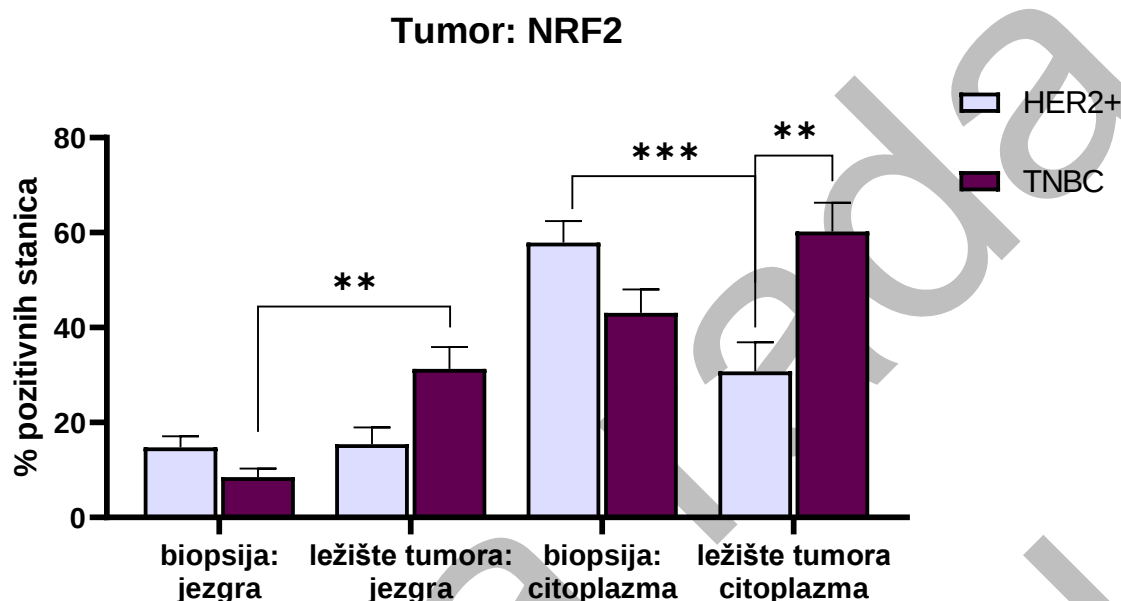
Slika 15. Izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama strome tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju, pCR – potpuni odgovor na terapiju; non-pCR nepotpuni odgovor na terapiju. Usporedba izražajnosti i lokalizacije NRF2 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ostatnom tkivu nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$

4.3.2. Izražajnost NRF2 u odnosu na imunofenotip tumora

Sljedeće, ispitana je izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 ovisno o imunofenotipu tumora dojke, (HER2 pozitivni i trostruko negativni tumori dojke) (Slika 10). Kod HER2 pozitivnih tumora izražajnost NRF2 u jezgrama tumorskih stanica nije se značajno promijenila nakon kemoterapije dok je u citoplazmama zabilježen statistički značajan pad izražajnosti NRF2 ($p<0,001$).

Za razliku od HER2 pozitivnih tumora, kod trostruko negativnih tumora dojke zabilježen je porast izražajnosti NRF2 u jezgrama tumorskih stanica nakon kemoterapije ($p=0,068$). Porast izražajnosti u citoplazmi kod TNBC nije statistički značajan, ali je izražajnost u citoplazmi nakon

kemoterapije bila značajno veća kod TNBC u odnosu na HER2 pozitivne tumore ($p=0,0012$) (Slika 16).



Slika 16. Izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama HER2 pozitivnih i trostruko negativnih tumora dojke. Usporedba izražajnosti i lokalizacije NRF2 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ostatnom tkivu nakon provedene terapije. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška. Statistički značajno: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

4.4. Analiza korelacija

Analizom Spearmanove korelacije utvrđene su brojne značajne povezanosti između ekspresije AQP3, AQP5 i NRF2 te patohistoloških parametara, uključujući pCR i RCB.

Kod HER2 pozitivnih tumora (Tablica 1.) je vrlo jaka korelacija između RCB i potpunog odgovora ($p=0,901$), što potvrđuje valjanost modela i analize (veći RCB znači da je ostalo tumora i to je nepotpuni odgovor na terapiju). Uz pCR, RCB pokazuje umjerenu pozitivnu korelaciju s izražajnošću AQP5 u stanicama tumora nakon terapije ($p=0,642$). Odgovor na terapiju kod HER2 pozitivnih tumora umjereno negativno korelira s izražajnošću AQP5 u tumoru i u stromi nakon terapije (ležište tumora) ($p=-0.500$ i $p=-0.303$). U biopsijama HER2 pozitivnih tumora, AQP5 u stanicama tumora slabo korelira s AQP3 u stanicama tumora i NRF2

u citoplazmama stanica strome ($p=0,264$ i $p=0,269$), umjereno korelira s NRF2 u jezgrama stanica tumora i AQP5 u stromi ($p=0,412$ i $p=0,811$). Nadalje, u biopsijama, AQP5 u tumorima umjereno korelira s NRF2 u jezgrama stanica strome ($p=0.313$). U biopsijama se vidi umjerena korelacija NRF2 i njegovih lokalizacija (jezgra-citoplazma i tumor-stroma). NRF2 u stromi pokazuje umjerenu korelaciju s Ki67 (NRF2 u citoplazmi), dok su ostale, statistički značajne korelacije slabe.

Tablica 1. Korelacija parametara kod HER2 pozitivnih tumora dojke (Spearmanova korelacija)

		Spearman's rho	df	p-value
RCB	pCR	-0.901	70	<.001
	AQP5 u tumoru – ležište tumora	0.642	68	<.001
pCR	AQP5 u tumoru – ležište tumora	-0.500	70	<.001
	AQP5 u stromi – ležište tumora	-0.303	70	0.010
AQP5 u tumoru – biopsija	AQP3 u tumoru – biopsija	0.264	65	0.031
	NRF2 u jezgri tumora – biopsija	0.412	60	<.001
	NRF2 u jezgri strome – biopsija	0.313	62	0.012
	NRF2 u citoplazmi strome – biopsija	0.269	62	0.032
	AQP5 u stromi – biopsija	0.811	71	<.001
AQP5 u tumoru – ležište tumora	NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	0,353	47	0,013
AQP3 u stromi – biopsija	AQP3 u tumoru – biopsija	0.454	64	<.001
	NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	-0.315	44	0.033
NRF2 u jezgrama tumora – biopsija	NRF2 u citoplazmi tumora – biopsija	0.516	60	<.001
	NRF2 u jezgri strome – biopsija	0.398	60	0.001
	NRF2 u citoplazmi strome – biopsija	0.382	60	0.002
	AQP5 u stromi – biopsija	0.318	60	0.012
NRF2 u citoplazmama tumora – biopsija	NRF2 u jezgri strome – biopsija	0.347	60	0.006
	NRF2 u citoplazmi strome – biopsija	0.371	60	0.003

NRF2 u jezgrama strome – biopsija	NRF2 u citoplazmi strome – biopsija	0.589	62	<.001
	NRF2 u citoplazmi tumora – ležište tumora	0.591	14	0.016
NRF2 u citoplazmama strome – biopsija	Ki67	0.386	54	0.003
	AQP5 u stromi – biopsija	0.297	62	0.017
NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	NRF2 u citoplazmi strome – ležište tumora	0.604	47	<.001
	AQP5 u stromi – biopsija	-0.294	47	0.040

Kod trostruko negativnog tumora dojke također se nalazi umjerena negativna korelacija RCB i odgovora na terapiju ($p=-0.632$). RCB također umjereno pozitivno korelira s AQP3 u stanicama tumora i AQP3 u stromi tumora nakon operacije ($p=0,413$ i $p=0,454$) te s NRF2 u jezgrama i citoplazmama stanica strome nakon operacije ($p=0,510$ i $p=0,319$). Za razliku od nakon operacije, u biopsiji RCB pokazuje umjerenu negativnu korelaciju s NRF2 u citoplazmama stanica tumora ($p=-0.387$). Nadalje, odgovor na terapiju umjereno negativno korelira s AQP5 u tumoru, AQP3 u stromi, NRF2 u jezgrama i citoplazmama strome nakon operacije ($p=0,636$, $p=0,352$, $p=0,397$ i $p=0,589$). Zanimljiva je jaka pozitivna korelacija u ekspresiji AQP5 u tumoru i stromi u biopsiji ($p=0,877$). AQP5 nakon operacije također umjereno korelira s NRF2 u jezgrama i citoplazmama strome ($p=0,367$ i $p=0,383$). U biopsiji, AQP3 u stanicama tumora umjereno korelira s AQP3 u stromi i AQP3 u stanicama tumora nakon operacije ($p=0,503$ i $p=0,448$). AQP3 u stanicama strome u biopsiji negativno umjereno korelira s Ki67 ($p=-0,351$), dok AQP3 u stanicama tumora nakon operacije negativno umjereno korelira s NRF2 u jezgrama tumora u biopsiji ($p=-0,368$). Slično kao i kod HER2 pozitivnih tumora, NRF2 pokazuje umjerenu do jaku pozitivnu korelaciju u biopsijama i nakon operacije ovisno o lokalizaciji (jezgra-citoplazma i tumor-stroma).

Tablica 2. Korelacija praćenih parametara kod trostruko negativnih tumora dojke (Spearmanova korelacija)

		Spearman's rho	df	p-value
RCB	AQP5 u tumoru – ležište tumora	0.413	49	0.003
	AQP3 u stromi – ležište tumora	0.454	45	0.001
	NRF2 u citoplazmama tumora – biopsija	- 0.387	43	0.009
	NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	0.510	42	<.001
	NRF2 u citoplazmama strome – ležište tumora	0.319	42	0.035
	pCR	- 0.632	49	<.001
pCR	AQP5 u tumoru – ležište tumora	-0.636	54	<.001
	AQP3 u stromi – ležište tumora	0.352	49	0.011
	NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	0.397	45	0.006
	NRF2 u citoplazmama strome – ležište tumora	0.589	45	<.001
AQP5 u tumoru – biopsija	AQP5 u stromi – biopsija	0.877	50	<.001
AQP5 u tumoru – ležište tumora	NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	0.367	45	0.011
	NRF2 u citoplazmama strome – ležište tumora	0.383	45	0.008
AQP3 u tumoru – biopsija	AQP3 u stromi – biopsija	0.503	49	<.001
	AQP3 u tumoru – ležište tumora	0.448	35	0.005
AQP3 u stromi – biopsija	Ki67	-0.351	51	0.010
AQP3 u tumoru – ležište tumora	NRF2 u jezgrama tumora – biopsija	-0.368	34	0.027
NRF2 u jezgrama tumora – biopsija	NRF2 u citoplazmama tumora – biopsija	0.764	46	<.001
	NRF2 u jezgrama strome – biopsija	0.544	47	<.001
	NRF2 u citoplazmama strome – biopsija	0.594	47	<.001

NRF2 u citoplazmama tumora - biopsija	NRF2 u jezgrama strome – biopsija	0.440	46	0.002
	NRF2 u citoplazmama strome – biopsija	0.485	46	<.001
NRF2 u jezgrama strome – biopsija	NRF2 u citoplazmama strome – biopsija	0.663	47	<.001
NRF2 u jezgrama tumora – ležište tumora	NRF2 citoplazmama tumora – ležište tumora	0.489	32	0.003
NRF2 citoplazmama tumora – ležište tumora	NRF2 u citoplazmama strome – ležište tumora	0.359	33	0.034
NRF2 u jezgrama strome – ležište tumora	NRF2 u citoplazmama strome – ležište tumora	0.624	45	<.001

5. RASPRAVA

Karcinom dojke jedan je od vodećih uzroka smrtnosti među ženama diljem svijeta. U Hrvatskoj čini četvrtinu svih novih slučajeva raka u žena (110). Iako je kemoterapija jedna od ključnih strategija liječenja, njezina učinkovitost često je ograničena razvojem otpornosti tumorskih stanica i nuspojavama koje uključuju oksidacijski stres. Većina karcinoma dojke je histološki duktalnog i lobularnog tipa, a preostali tumori spadaju u skupinu rijetkih tumora dojki. U terapijskom smislu danas su važnije biološke, odnosno imunohistokemijske karakteristike tumora i kondiciju pacijentica te se liječenju nastoji pristupiti personalizirano. Na međunarodnom stručnom sastanku u St. Gallenu 2013. godine definirani su kliničko patološki surogati karcinoma dojke prema izraženosti hormonskih i HER2 receptora i proliferacijskog indeksa Ki67, na čemu se temelji sustavna terapija raka dojke (111). Karcinom dojke se najčešće liječi kirurškim zahvatom, sustavnom terapijom (antihormonska terapija, kemoterapija, bioterapija) i zračenjem. Agresivniji tumori, u koje spadaju trostruko negativan rak dojke i HER2 pozitivan rak dojke, sve se češće liječe sustavnom terapijom prije kirurškog zahvata (neoadjuvantna sustavna terapija) (112).

Kod trostruko negativnog raka dojke (TNBC), neoadjuvantno se preferira kombinacija adriamicina i ciklofosfamida (AC) u 4-6 ciklusa, potom 12 ciklusa tjednih paklitaksela. Kod TNBC pacijentica s BRCA1/2 mutacijom može se neoadjuvantno koristiti i olaparib, a kod pacijentica s TNBC-om visokog rizika može se uz navedene citostatike koristiti i kombinacija pembrolizumaba, karboplatine i paklitaksela (148). Obzirom da su naši uzorci dobiveni prije uvođenja olapariba, pembrolizumaba i karboplatine u neoadjuvantni protokol, pacijentice čije smo uzorke koristili za ovo istraživanje prije operacije dobile su kemoterapiju po shemi 4-6 ciklusa AC + paklitaksel 12 tjedana. Za HER2 pozitivne tumore također se najčešće koristi shema 4-6 puta AC + 12 tjedana paklitaksela, a tijekom terapije paklitakselom koriste se biološki lijekovi trastuzumab i pertuzumab, koji blokiraju proliferacijsku signalizaciju putem HER2 receptora. No, obzirom da je za patohistološki kriterij HER2 pozitivnosti potrebno samo 10 % HER2 pozitivnih tumorskih stanica, dio tumorskih stanica ostaje bez direktnog učinka HER2 ciljane terapije. Naime, na uzorcima metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke dokazano je da unutar HER2 pozitivnih tumora postoji regionalna heterogenost ekspresije u 8,7 %

slučajeva, što smanjuje učinkovitost HER2 ciljane terapije. Navedeno je potvrđeno u analizama preživljenja - regionalna heterogenost ekspresije HER2 receptora bila je povezana s lošijim rezultatima liječenja (vrijeme do progresije bolesti, ukupno preživljenje) (408).

Dominantni citostatik u liječenju raka dojke je adriamicin (dokorubicin), koji spada u skupinu antraciklina. Adriamicin ima višestruke mehanizme citotoksičnog djelovanja, a jedan od njih je povećanjem koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (eng. Reactive Oxygen Species, ROS), uključujući vodikov peroksid (H_2O_2) što dovodi do oksidacijskog stresa (188,409). Oksidacijski stres nastaje kada je ravnoteža između ROS i antioksidacijskog sustava stanice narušena, što može potaknuti razvoj i progresiju karcinoma. ROS imaju dvojak učinak: u fiziološkim koncentracijama posreduju u staničnoj signalizaciji i mogu voditi u apoptozu, dok u višim razinama uzrokuju oštećenje DNA, proteina i lipida te konačno mogu rezultirati staničnom smrću. U kontekstu kemoterapije, ROS djeluju kao efektori koji induciraju smrt tumorskih stanica. H_2O_2 u stanicu ulazi kontrolirano kroz akvaporine (252), transmembranske pore čija se aktivnost u vidu „otvorenosti“ pore strogo regulira. Nažalost, kontrolirani ulazak H_2O_2 u stanicu posredovan akvaporinima vjerojatno je dio mehanizma kojim akvaporini ostvaruju svoju ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi i posljedično razvoju tumora (267,276,288). Uloga akvaporina kod raka dojke vidljiva je u povišenoj ekspresiji akvaporina u stanicama raka dojke, uglavnom AQP1, AQP3 i AQP5 (272). Kod HER2 pozitivnih tumora, lošija prognoza vezana je uz povišenu ekspresiju AQP3 (273), dok je AQP5 neovisni prognostički pokazatelj preživljavanja pacijenata s rakom dojke (274). Kod TNBC, dokazana je povezanost povišene ekspresije AQP5 s višim proliferacijskim indeksom Ki67, kao i lošije preživljenje u slučajevima zajedničke povišene ekspresije AQP3 i AQP5. AQP3 je akvagliceroporin što znači da, uz vodu i H_2O_2 , omogućava prolazak glicerola kroz staničnu membranu u oba smjera (281,282).

Arif i sur pokazali su da nokaut AQP3 u MDA-MB-231 stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke inhibira njihovu proliferaciju, migraciju i invaziju, što upućuje na važnu ulogu tog akvaporina u progresiji raka dojke (410). Uloga AQP3 u migraciji tumorskih stanica objašnjena je njegovom ulogom stvaranju lamelopodija, koji lakše nastaju ukoliko je prisutno više AQP3 na membrani te njegovom ulogom u lokaliziranom provođenju vode i glicerola u smjeru kretanja stanice (288,289). Istraživanje Huang i sur. potvrdila je da prekomjerna ekspresija AQP3 povećava migraciju i invaziju ER+ stanica raka dojke (288). Olakšani transport

glicerola u stanicu preko AQP3 rezultira stvaranjem ATP-a, što objašnjava ulogu AQP3 u energetsom metabolizmu (290). Navedene metaboličke i proliferacijske uloge AQP3 upućuju na važnu ulogu tog akvaporina u životu stanice i čine ga vrlo interesantnom terapijskom metom u liječenju tumora.

Transport vode i glicerola utječe na migraciju i metaboličke procese (osobito metabolizam lipida), dok H_2O_2 utječe na signalne putove. H_2O_2 pokreće nekoliko signalnih putova u stanici, a kanal koji može olakšati transport H_2O_2 svakako je potencijalni kandidat koji osigurava određenu razinu kontrole nad tim putovima. U prilog ovoj pretpostavci ide istraživanje Hara-Chikuma i sur. (291) koje je na keratinocitima pokazalo kako je prijenos signala stimulacijom stanice s $TNF-\alpha$ olakšan proizvodnjom H_2O_2 putem NADPH oksidaze izoforme 2 (NOX2). AQP3 se lokalizira u membrani pokraj NOX2 i po stvaranju H_2O_2 prenosi ga u stanicu. Ulaskom ovog H_2O_2 rezultira regulacijom (inhibicijom) proteinske fosfataze 2A i aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NF-kappaB). Štoviše, CXCL12 stimulira transport H_2O_2 kroz membranu putem AQP3 u stanicama raka dojke MDA-MB-231 i DU4475 (292). Oksidacija PTEN/PTP1B događa se zbog H_2O_2 , nakon čega slijedi aktivacija AKT signalnog puta i migracija stanica. Utišavanje AQP3 onemogućava ovaj proces i time potvrđuje ulogu AQP3 u migraciji (292).

Potreba za proučavanjem signalnih puteva na koje utječe prekomjerna ekspresija AQP3 i mehanizama djelovanja ogleda se u nalazu da je Auphen, inhibitor akvaporina koji sadrži zlato, učinkovitije blokirao transport glicerola (oko 90% inhibicije) u odnosu na transport vode (20% inhibicije) (293). Imajući na umu da AQP3 također olakšava transport H_2O_2 kroz plazma membranu (294,295) i strukturne sličnosti između H_2O_2 i vode (296), inhibitore treba pažljivo ispitati u pogledu njihove sposobnosti da blokiraju sve tri molekule koje su supstrati AQP3. Činjenica da inhibitor može nejednako blokirati transport glicerola i vode upućuje na to da transport H_2O_2 također može biti pod slabijim utjecajem, sugerirajući aktivaciju i modifikaciju staničnih procesa u neželjenom smjeru, odnosno prema progresiji tumora. Postoji nekoliko radova o učinku akvaporina općenito na antioksidacijski obrambeni sustav, posebno transkripcijski faktor NRF2, neovisno o bolesti (297–299). U staničnim linijama raka dojke, MCF7, SUM159 i SkBr3, AQP3 je bio najizraženiji akvaporin, a u HER2 pozitivnim stanicama bio je pojačano reguliran zajedno s NRF2 pomoću H_2O_2 (297), što ukazuje na potrebu proučavanja učinaka prekomjerne ekspresije AQP3 u odnosu na dijelove antioksidativnog sustava.

AQP5 je dokazano uključen u fiziološke procese razvoja dojke, proizvodnju mlijeka, ali i u razvoj raka dojke (283,300). Jung i sur. pokazali su da utišavanje AQP5 stanicama MCF-7 negativno utječe na staničnu proliferaciju i migraciju. Osim toga, ekspresija AQP5 u benignim tumorima i invazivnom duktalnom karcinomu pokazala je različite obrasce - u duktalnim epitelnim stanicama dokazana je ekspresija AQP5 u apikalnim domenama, dok je u tumorskim stanicama ekspresija bila povećana uz gubitak apikalnog polariteta, što ukazuje na ulogu AQP5 u progresiji raka dojke (301). Kod trostruko negativnog raka dojke, primijećena je značajno veća ekspresija AQP5 i AQP3 u tumorskom tkivu nego u okolnom normalnom tkivu. Prekomjerna ekspresija AQP5 uglavnom je primijećena u uzorcima trostruko negativnog raka dojke s visokim proliferacijskim indeksom Ki-67 i, zajedno s višom ekspresijom AQP3, povezana je s agresivnijom bolešću s lošijim ukupnim preživljenjem, ukazujući na njihovu zajedničku ekspresiju kao neovisni prognostički marker kod trostruko negativnog raka dojke (287). Prekomjerna ekspresija AQP5 bila je povezana s lošijim ishodima kod pacijenata s ranim rakom dojke bez obzira na tip i stadij tumora, što ukazuje na to da je AQP5 neovisni prognostički marker preživljenja, osobito kod kurativno operiranih pacijentica s hormonski pozitivnim tumorima (274).

Za dinamiku oksidacijskog stresa, akvaporina i antioksidacijskog sustava kod karcinoma dojke vrlo je značajno istraživanje Rodrigues i sur., u kojoj je ispitan utjecaj oksidacijskog stresa na profil lipida, razine medijatora oksidacijskog stresa i NRF2, obrasce ekspresije AQP1, AQP3, AQP5 i osjetljivost na H_2O_2 u tri stanične linije raka dojke koje predstavljaju hormon-pozitivne (MCF-7), HER2-pozitivne (SkBr-3) i trostruko negativne karcinome dojke (SUM 159). Razine višestruko nezasićenih masnih kiselina najviše su bile u trostruko negativnoj staničnoj liniji SUM 159, u kojoj je pronađena i niža razina NRF2, što može objasniti veću osjetljivost trostruko negativnih stanica na H_2O_2 . Obrazac ekspresije AQP-a također je bio specifičan za tip stanice. Dok je AQP3 bio najizraženija izoforma u svim testiranim staničnim linijama, izloženost vodikovom peroksidu povećala je ekspresiju AQP3 u stanicama MCF-7 i SkBr-3, dok je u SUM 159 stanica razina AQP3 smanjena. Ekspresija AQP5 i AQP1 bila je slična u SUM 159 i SkBr-3, s povećanjem nakon oksidativnog izazova, dok je u MCF-7 stanicama bila snižena (297).

Istraživanje Rodriguesa i sur. o utjecaju oksidacijskog stresa na AQP5 pokazala je da AQP5, osim vode, vrlo učinkovito provodi i H_2O_2 . Utišavanje AQP5 smanjilo je migracijsku sposobnost stanica, međutim vanjskim podražajem vodikovim peroksidom uspostavila se početna

sposobnost migracije, vjerojatno putem AQP3, koji je bio prisutan na staničnoj membrani. Stoga su autori istaknuli značajnu ulogu AQP5 u dinamičkom finom podešavanju unutarstaničnih razina H_2O_2 (302), koje su važne za redoks signalizaciju i regulaciju sudbine stanice (303). Ovi rezultati upućuju da bi AQP5 mogao imati značajnu ulogu u terapiji raka. Otkriće triju miRNA (miR-1226-3p, miR-19a-3p i miR-19b-3p) koje reguliraju AQP5 smanjenjem njegove translacije, što dovodi do smanjene migracije stanica raka dojke, podupire daljnje istraživanje AQP5 kao moguće terapijske mete kod raka dojke (304).

Povezanost ROS-a i AQP5 također je promatrana u istraživanju Oh et al. Proučavali su utjecaj hiperkolesterolemije i inhibicije ksantin oksidaze (enzim koji stvara ROS) na progresiju raka dojke in vitro i na modelu ksenografta miša. Pokazalo se da hiperlipidemijska stanja pridonose proizvodnji ROS-a, progresiji raka dojke i aktivaciji MAPK-a. Liječenje febeksostatom, inhibitorom ksantin-oksidaze, rezultiralo je smanjenjem razina ROS-a i ekspresije AQP5, ublažilo proliferativnu i migracijsku sposobnost stanica raka dojke, kao i plućne metastaze (305). Za sada još nije sigurno je li uključenost AQP5 u karcinogenezu dojke uzrok ili posljedica metaboličkog reprogramiranja i redoks signalizacije putem H_2O_2 .

Regulacija unosa H_2O_2 putem akvaporina važna je i zbog njegove sposobnosti aktivacije antioksidacijskog sustava. Jedan od glavnih antioksidacijskih transkripcijskih faktora je transkripcijski faktor NRF2 (321). Uz NRF2, u antioksidacijskoj zaštiti sudjeluje i obitelj Forkhead box O transkripcijskih faktora (FOXO), koji osim antioksidacijskih reguliraju i brojne druge stanične procese (388,404,411).

NRF2 je glavni transkripcijski faktor za antioksidacijsku obranu stanice, budući da regulira ekspresiju antioksidacijskih enzima poput glutation peroksidaze i superoksid dismutaze. Uz antioksidacijsku zaštitu, učinci NRF2 vezani su i uz njegovu regulaciju gena uključenih u različite stanične procese povezane s metabolizmom lijekova: izlučivanje, metabolizam energije, metabolizam željeza i aminokiselina, metabolizam mitohondrija, autofagiju i proliferaciju. Sve to dovodi do zaštite tumorskih stanica od primijenjene terapije i stavlja NRF2 u skupinu regulatora obilježja raka (341).

Dokazana je uloga NRF2 u razvoju rezistencije na zračenje i kemoterapiju u stanicama raka debelog crijeva (342,343), pri rezistenciji na sorafenib kod hepatocelularnog karcinoma (336) i rezistenciji na gemcitabin kod raka gušterače (344). Mutacija pojačane funkcije NRF2 (engl. „gain of function“), odnosno konstantne aktivacije, kod NSCLC indikator je radiorezistencije

(345), a status mutacije NRF2 može se koristiti i za procjenu potencijalne koristi kemoterapije temeljene na platini (346). Kod matičnih stanica raka dojke (engl. Breast Cancer Stem Cells, BCSC) dokazano je da utišavanje NRF2 onemogućava stvaranje otpornosti na citostatike, te su takve stanice pokazale povećanu smrt stanica i odgođeni rast (339).

Signalni put NRF2 isprepliće se s drugim signalnim putovima. Stoga promjene u aktivnosti drugih putova mogu modulirati aktivnost NRF2 te povećati otpornost tumora. Takav primjer je E3 ligaza NEDD-4, koja regulira PTEN (tumor supresor fosfataza i TENSin homolog) koji dalje regulira put PI3K/AKT/mTOR i utječe na AKT/NRF2/HMOX-1 osovinu (350). Indirektan utjecaj NRF2 na karcinogenezu putem stromalnih stanica vidljiv je kod fibroblasta povezanih s rakom (engl. Cancer Associated Fibroblasts, CAF) (277).

Obzirom na navedeno, signalni put NRF2 i njegove interakcije s drugim signalnim putovima vrlo su važni za otpornost tumora na kemoterapiju, radioterapiju i terapije temeljene na protutijelima.

Za istraživanje je izabran i transkripcijski faktor FOXO1, obzirom da regulira ključne procese poput apoptoze, autofagije i odgovora na oksidacijski stres. FoxO su dokazani kao tumor-supresori, što se očituje u deleciji ili inaktivaciji kod raka (npr FoxO1 i FoxO3 kod raka prostate) (396). Na staničnim linijama dokazano je da FoxO mogu utjecati na brojna obilježja raka – smanjuju proliferaciju, potiču apoptozu i senescentnost, limitiraju angiogenezu i stjecanje invazivnog fenotipa. Veza akvaporina i FOXO1 dokazana je u žlijezdama slinovnicama, gdje se pokazalo da je FOXO1 izravni regulator ekspresije AQP5 (257). Kod karcinoma dojke, duga nekodirajuća RNA lncFoxO1 povećava ekspresiju FoxO1 i djeluje kao supresor razvoja raka dojke (378).

S druge strane, postoje dokazi kako FOXO djeluju i kao onkogeni, primjerice održavanjem leukemija inicirajućih stanica (395,396) i poticanjem invazije tumora, povećanjem ekspresije metaloproteinaza matriksa (MMP-9 i MMP-13) (397). FoxO mogu posredovati i u rezistenciji na kemoterapiju, što je dokazano kod dva glavna kemoterapijska agensa za rak dojke - dokazan je utjecaj FoxO3a putem regulacije ekspresije Bim na osjetljivost tumorskih stanica na paklitaksel (398), a FoxO1 može posredovati rezistenciju na adriamicin indukcijom ekspresije MDR1 (399). Prilagodba tumorskih stanica na kemoterapiju može biti posredovana FoxO induciranom reaktivacijom puta PI3K-AKT (400–402).

Obzirom da su ranija istraživanja uputila na povišene razine akvaporina u tumorima (247,272,285), pretpostavili smo da tumorske stanice regulacijom ekspresije akvaporina i posljedično regulacijom antioksidacijske zaštite mogu razviti ili pojačati rezistenciju na citostatike i oksidacijski stres. Regulacija rezistencije na terapiju i oksidacijski stres potencijalno bi se ostvarivala finom regulacijom koncentracije H_2O_2 putem peroksiporina, akvaporina koji mogu prenositi H_2O_2 preko membrane. Regulacija koncentracije H_2O_2 može potaknuti signalne puteve koji potiču proliferaciju, a nisu previsoka da bi uzrokovala nepovratna oštećenja stanice. Na temelju navedenih pretpostavki definirana je hipoteza rada, odnosno da će kemoterapijom i bioterapijom izazvani oksidacijski stres uzrokovati porast ekspresije AQP3 i AQP5 u ostatnim tumorima i stromi nakon provedene neoadjuvantne citostatske terapije u odnosu na inicijalne uzorke tumorskog tkiva, što bi trebalo korelirati s odgovorom na terapiju. Također, u uzorcima ostalih tumora nakon sustavne terapije očekivala se viša razina transkripcijskih faktora koji reguliraju komponente antioksidacijske zaštite, NRF2 i FOXO1, u okviru odgovora na oksidacijski stres.

Hipoteza je istražena kroz određivanje ekspresije AQP3, AQP5, NRF2 i FOXO1 u uzorcima tumorskog tkiva prije i poslije kemoterapije. Obzirom na dokazanu interakciju tumorskih stanica i stanica strome, određivana je ekspresija AQP3, AQP5, NRF2 i FOXO1 i u stromi.

Kako bi se istražila povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 i odgovora na terapiju, usporedio se postotak pozitivnih tumorskih stanica na AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora nakon provedene terapije. U inicijalnim uzorcima je manje od 20% stanica bilo pozitivno na AQP3 i nije bilo razlike u izraženosti kod inicijalnih uzorka iz pCR i non-pCR skupine. Ovaj rezultatu upućuje da je inicijalna razina AQP3 u tkivu i tumoru dojke relativno niska. Također, možemo zaključiti da početna razina AQP3 ne utječe na terapijski odgovor te da se njegova ekspresija može pojačati tijekom sustavne terapije. Rezultati upućuju da bi transkripcija antioksidacijskog transkripcijskog faktora i promatranih akvaporina tijekom kemoterapije mogla biti odgovorna za rezistenciju, odnosno slabiji terapijski odgovor. Nadalje, u uzorcima nakon provedene terapije uočava se značajan porast AQP3 u ostatnom tkivu tumora u odnosu na inicijalnu biopsiju u skupini nepotpunog odgovora na terapiju (non-pCR), dok se kod potpunog odgovora ne nalazi pozitivnih stanica. Međutim, kod potpunog odgovora na terapiju nije bilo ostatnog tkiva tumora. Ovi rezultati upućuju na

procesu kojima se povećava ekspresija AQP3 kao rezultat primijenjene terapije. Također, rezultati ukazuju i na moguću ulogu AQP3 u razvoju otpornosti na kemoterapiju.

Imunohistokemijsko bojenje AQP5 pokazuje sličan obrazac kao i AQP3 u odnosu na ishod provedene terapije, s time da su inicijalne razine AQP5 niže nego AQP3. Razine AQP5 izrazito su se povećale kod nepotpunog odgovora na terapiju (9% u inicijalnoj biopsiji, 56% u ostatnom tumoru). Kao i kod AQP3, terapija pokreće stanične odgovore koji dovode do povećanja AQP5 nakon provedene terapije u skupini nepotpunog odgovora na terapiju (non-pCR) što također ukazuje na moguću ulogu AQP5 u razvoju otpornosti na kemoterapiju. Iako se u literaturi ne nalaze podaci kako terapija utječe na razine ovih akvaporina, ni na *in vitro*, na *in vivo* modelima, ni na kliničkim uzorcima, povećane razine AQP3 i AQP5 koreliraju s lošijim preživljenjem kod pacijentica s trostruko negativnim rakom dojke(412).

Uz ekspresiju AQP3 i AQP5 u stanicama tumora, htjeli smo ispitati i ekspresiju u stromi kako bi istražili povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 i odgovora na terapiju. Stoga se usporedio postotak pozitivnih stanica strome na AQP3 i AQP5 u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom tkivu nakon provedene terapije. Zanimljivo, stanice strome imale su izrazito nisku ekspresiju AQP3, manje od 5% stanica je pozitivno na ovaj akvaporin. Također, AQP5 je bio jače izražen u stromi u odnosu na AQP3, kako u inicijalnim, tako i u postoperativnim uzorcima. Zanimljivo, iako nije bilo razlike u postotku pozitivnih stanica prije primijenjene terapije kod potpunog i nepotpunog odgovora na terapiju, u uzorcima u kojima je postojalo ostatno tumorsko tkivo nakon sustavne terapije (non-pCR) zabilježen je značajan porast ekspresije oba ispitivana akvaporina u stromi. Ovi rezultati se slažu s rezultatima na tumorima što upućuje na regulaciju akvaporina terapijom uz moguću ulogu AQP3 i AQP5 u razvoju rezistencije na kemoterapiju. U stromi su puno izraženije promjene AQP5 (sa 7 % na 55 % pozitivnih stanica), što sugerira vrlo značajnu ulogu stromalnog AQP5 u stvaranju rezistencije na terapiju. Također, u skupini potpunog odgovora na terapiju, stanice strome bile su negativne na AQP3, dok su kod nepotpunog odgovora stanice strome bile su AQP3 pozitivne uz porast broja pozitivnih stanica nakon terapije, upućujući i na ulogu stromalnog AQP3 u razvoju rezistencije.

Nakon što je analizirana povezanost ekspresije AQP3 i AQP5 s ishodom terapije, ispitano je postoji li razlika u ekspresiji između imunofenotipa tumora dojke, kako bi se odgovorilo na pitanje postoji li potencijal za akvaporine kao mogućeg razlikovnog faktora. Istraživanjem

povezanosti AQP3 i AQP5 s imunofenotipom tumora, dokazan je značajan porast ekspresije AQP3 i AQP5 u tumorskim stanicama oba imunofenotipa nakon provedene neoadjuvantne terapije. Također, nakon provedene neoadjuvantne terapije dokazana je značajno veća ekspresija AQP5 kod trostruko negativnih tumora dojke (69%) u odnosu na HER2 pozitivne tumore (28%). S druge strane, ekspresija AQP3 kod HER2 pozitivnih i trostruko negativnih tumora bila je podjednaka. Ovi rezultati pokazuju kako terapija, vjerojatnije kemoterapija koju primaju obje grupe pacijentica, povećava postotak stanica pozitivnih na AQP3 i AQP5. Također, je zanimljivo da je kod pacijentica s trostruko negativnim tumorom dojke postotak AQP5 pozitivnih značajno viši od HER2 pozitivnih pacijentica.

Sljedeće je ispitana povezanost izraženosti AQP3 i AQP5 u stanicama strome u inicijalnoj biopsiji i operativno odstranjenom ležištu tumora ovisno o imunofenotipu. Zanimljivo, kod oba imunofenotipa je ekspresija AQP5 u stromi znatno viša u odnosu na AQP3, kod kojeg je postotak pozitivnih stanica manji od 5%. Slijedom izrazito niske ekspresije AQP3 u stromi oba imunofenotipa, nije bilo statističke razlike u ekspresiji AQP3 u odnosu na imunofenotip ili terapiju. Međutim, kod AQP5 zabilježen je značajan porast ekspresije u stromi nakon sustavne terapije kod oba imunofenotipa. Također, ovi rezultati prate pojavu AQP5 u tumorskim stanicama pa je tako udio stanica s povišenom ekspresijom AQP5 nakon sustavne terapije bio značajno veći u stromi trostruko negativnih tumora u odnosu na HER2 pozitivne tumore. Navedeni rezultati sugeriraju vrlo značajnu ulogu AQP5 kao dominantnog peroksidporina koji porastom ekspresije i izbacivanjem vodikovog peroksida pridonosi kontroli razine oksidacijskog stresa tijekom kemoterapije, a samim time rezistenciji tumora i posljedičnoj progresiji bolesti. Porast AQP3 je prisutan, ali manjeg razmjera u odnosu na AQP5, te je vjerojatnije rezultat većih energetske zahtjeva tumorskih stanica tijekom kemoterapije - AQP3 je akvaglikeroporin te, uz vodu i vodikov peroksid, omogućava prolazak glicerola kroz staničnu membranu u oba smjera (281,282). Ulazak glicerola u stanicu preko AQP3 rezultira stvaranjem ATP-a (290) čime potpomaže rast tumora omogućujući izvor energije.

Obzirom da je uočeno povećanje izraženosti AQP3 i AQP5 u tumoru nakon provedene neoadjuvantne sustavne terapije posebice kod nepotpunog odgovora na terapiju te kod oba promatrana imunofenotipa tumora, pacijenti su raščlanjeni po imunofenotipu i odgovoru na terapiju. Analizom izraženosti AQP3 u HER2 pozitivnim tumorima dokazan je porast ekspresije

AQP3 u ležištu tumora kod potpunog patohistološkog odgovora u odnosu na nepotpuni. Također, porast izraženosti AQP3 uočen je kod HER2 pozitivnih tumora kod kojih je postignut pCR. Iako se na prvi pogled može činiti neočekivanim da se kod potpunog odgovora na terapiju bilježi pozitivnost u preostalim stanicama, ta se pozitivnost odnosi isključivo na in situ komponentu (DCIS), čime su kriteriji potpunog patohistološkog odgovora (pCR) i dalje u potpunosti zadovoljeni. Kod trostruko negativnih tumora pokazan je porast ekspresije AQP3 u stanicama tumora kod kojih nije postignut potpuni patohistološki odgovor. Zanimljivo, Zhu i suradnici pokazali su da kod pacijentica s trostruko negativnim tumorima dojke veća ekspresija AQP3 korelira sa lošijom prognozom (287). U našem istraživanju liječenje pacijentica se odvijalo po drugačijem kliničkom protokolu, skupljani su uzorci prije i poslije provedene terapije, dok u njihovom istraživanju nije naveden točan klinički protokol koji su pacijentice podvrgnute, samo je navedeno da su pacijentice operirane. Slična je situacija i kod ranog HER2 pozitivnog tumora dojke, gdje se AQP3 pokazao kao neovisni biljeg za preživljenje (DFS, engl. Disease Free Survival i OS, engl. Overall Survival) (273).

U našem istraživanju AQP5 je pokazao veće razlike prije i poslije terapije u odnosu na AQP3. Analiza je pokazala značajan porast izraženosti AQP5 nakon sustavne terapije i kod ostalih HER2 pozitivnih (s 8 % na 42 %) i trostruko negativnih (s 10 % na 69 %) tumora. Porast izraženosti AQP5 nakon sustavne terapije bio je najveći kod ostatnog trostruko negativnog tumora u odnosu na inicijalnu biopsiju, a zanimljivo je da je izraženost AQP5 statistički značajna u odnosu na HER2 pozitivne tumore (69 % vs 42 %). Očekivano, budući da nema stanica tumora, u slučajevima potpunog patohistološkog odgovora, u ležištu tumora nakon sustavnog liječenja trostruko negativnih tumora nije pronađena ekspresija ni AQP3 niti AQP5.

Ostatni HER2 pozitivni tumori imali su značajno višu ekspresiju AQP5 u odnosu na ostatne tumorske stanice HER2 tumora (ostatni DCIS) koji su zadovoljili kriterije potpunog patohistološkog odgovora (42 % vs 7 %). Također, analizirana je ekspresija AQP3 i AQP5 u stromi ovisno o patohistološkom odgovoru i imunofenotipu.

Ekspresija AQP3 u stanicama strome kod oba imunofenotipa bila je niska, i prije i poslije sustavnog liječenja. Nasuprot AQP3, AQP5 je pokazao značajnu dinamiku kod oba fenotipa. Zabilježen je značajan porast ekspresije AQP5 nakon sustavne terapije za oba imunofenotipa, s tim da je porast bio izraženiji kod trostruko negativnog tumora dojke u odnosu na HER2

pozitivne tumore (62 % vs 46 %). Pregled literature o pojavnosti akvaporina (niti 3 niti 5) u stromi tumora dojke nije dao rezultate.

Budući da je izraženost dva promatrana perokisporina, AQP3 i AQP5, povišeni nakon provedene terapije, sljedeći korak je bio ispitati izražajnost i lokalizaciju transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. Do sada su studije pokazale kako je NRF2 povišen u jezgrama tumora dojke bez obzira na imunofenotip, dok su razlike među imunofenotipovima vidljive na stanicama strome(315). Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali tako visoki postotak jezgri tumorskih stanica pozitivnih na NRF2 u inicijalnoj biopsiji, no nakon primijenjene terapije postotak NRF2-pozitivnih jezgri tumorskih stanica se značajno povećao, što ukazuje na porast transkripcijske aktivnosti NRF2 kao posljedicu provedene kemoterapije.

Nadalje, kod tumora kod kojih je postignut pCR, ostatne stanice DCIS-a pokazale su značajno nižu ekspresiju NRF2 u jezgrama tumorskih stanica u odnosu na stanice ostatnih tumora. Obzirom da je kod ostatnih tumora izražajnost NRF2 u jezgri bila značajno veća nego u biopsijama istih, ovi rezultati ukazuju da NRF2 značajno sudjeluje u obrani tumorskih stanica i posljedično može imati značajnu ulogu u razvoju rezistencije na sustavnu terapiju. Potvrda ove hipoteze je u radu Xia i suradnika, koji su pokazali da aktivacija NRF2 u hipoksičnim uvjetima potiče ekspresiju ABCB1 pumpe te time posljedično sudjeluje u razvoju rezistencije na adriamicin (413). U citoplazmi tumorskih stanica izražajnost NRF2 se nije promijenila nakon sustavne terapije kod nepotpunog odgovora na terapiju. Međutim, kod potpunog odgovora na terapiju, pCR, zabilježen je najveći pad citoplazmatske razine NRF2 u ostatnim stanicama DCIS-a. Ovaj pad broja pozitivnih citoplazmi u ostatnim stanicama DCIS-a je izrazito zanimljiv nalaz te bi bio zanimljiv pravac istraživanja jer su to uzorci tumora koji je u potpunosti reagirao na terapiju. Poznavanje točnih mehanizama snižavanja zalihe NRF2 u citoplazmama tumorskih stanica je zanimljivo u smislu razumijevanja signalnih putova koji bi mogli biti ciljani terapijom kako bi se smanjio obrambeni mehanizam tumora. Usporedbom broja citoplazmi ostatnih tumora pozitivnih na NRF2 kod potpunog i nepotpunog odgovora na terapiju, kod nepotpunog odgovora nalazimo značajno više citoplazmi pozitivnih na NRF2, što upućuje na veće zalihe NRF2, zahvaljujući kojima se ove stanice uspješno brane od oksidacijskog stresa uzrokovanog kemoterapijom, a posljedično i povećanjem ABC pumpe koje dodatno izbacuju adriamicin iz stanica tumora.

Sukladno analizi akvaporina, i kod NRF2 smo ispitali izražajnost i lokalizaciju transkripcijskog faktora NRF2 u stanicama strome tumora dojke u odnosu na odgovor tumora na terapiju. U stanicama strome, izražajnost NRF2 u jezgrama prije sustavne terapije bila je, bez obzira na ishod terapije, izrazito niska, ispod 10%, što upućuje na nisku potrebu za aktivacijom NRF2 u stanicama strome prije sustavne terapije. Nakon kemoterapije, zabilježen je statistički značajan porast izražajnosti NRF2 u jezgrama stanica strome ostalih tumora, što upućuje da kemoterapija djeluje i na stanice strome kao i na stanice tumora, na način da aktivira NRF2. Zanimljivo, pozitivnost jezgara stanica strome značajno je veća kod pacijentica s nepotpunim odgovorom u odnosu na pacijentice s potpunim odgovorom na terapiju. Također, u citoplazmama stanica strome ostalih tumora kod nepotpunog odgovora na terapiju izražajnost NRF2 značajno je viša u odnosu na potpuni odgovor. Ovaj porast ekspresije NRF2 u stanicama strome nakon kemoterapije upućuje na potencijalnu ulogu stanica strome u obrani od kemoterapije i moguće u razvoju rezistencije. Može se pretpostaviti da stanice strome transkripcijom ciljnih molekula NRF2 pomažu tumorskim stanicama u obrani od oksidacijskog stresa.

Nadalje, ispitana je izražajnost i lokalizacija transkripcijskog faktora NRF2 ovisno o imunofenotipu tumora. Kod HER2 pozitivnih tumora vidljiv je porast izražajnosti NRF2 u jezgrama tumorskih stanica, ali nije statistički značajan. U citoplazmama HER2 pozitivnih tumora istovremeno je zabilježen statistički značajan pad izražajnosti nakon kemoterapije, što djelomično može biti rezultat translokacije NRF2 u jezgru, ali i smanjene transkripcije gena. Kod trostruko negativnih tumora dojke, zabilježen je porast izražajnosti NRF2 u jezgrama tumorskih stanica nakon kemoterapije, što upućuje na porast transkripcijske aktivnosti NRF2, odnosno antioksidacijske zaštite. Izražajnost NRF2 u citoplazmi nakon kemoterapije bila je značajno veća kod TNBC-a u odnosu na HER2 pozitivne tumore.

Naše istraživanje nije pokazalo izražajnost FOXO1 ni u tumorskim stanicama niti u stromi, sugerirajući ulogu FOXO1 kao tumor supresora kod TNBC i HER2 pozitivnog raka dojke.

Naši rezultati pokazali su zanimljive promjene AQP3, AQP5 i NRF2 u stanicama tumora, a koje su vezane uz terapiju. Pretpostavka na početku istraživanja bila je da će se pokazati razlike u ekspresiji promatranih akvaporina i NRF2 između dva imunofenotipa, kao i između grupe s potpunim i nepotpunim odgovorom na terapiju. U inicijalnim biopsijama se pokazalo kako nema razlike među grupama, no druge analize pokazale su zanimljive trendove. Akvaporini se

povećavaju nakon terapije u stanicama tumora u svim grupama. Razlike u grupi s potpunim i nepotpunim odgovorom nakon terapije nisu usporedive kod tumorskih stanica, jer se kod potpunog odgovora ne nalaze tumorske stanice, ili su DCIS, što zadovoljava pCR kriterij. Međutim, razlike kod kriterija odgovora na terapiju mogu se vidjeti kod strome. Stroma, odnosno mikrookoliš tumora, sve više postaje važan čimbenik kod razvoja tumora kao i kod odgovora na terapiju (414). Danas se sve više govori o mikrookolišu tumora kao faktoru koji igra ključnu ulogu u razvoju i progresiji tumora. Znamo da stanice tumora mogu transformirati fibroblaste, imune stanice, adipocite i druge stanice u blizini tumora na način da potiču i podržavaju rast tumora(415). Važnost strome očituje se i u porastu istraživanja odnosa tumora i strome (engl. Tumor-Stroma Ratio, TSR i Tumor-Stroma Proportion, TSP) (415,416). Ova istraživanja ukazuju na potencijal mjerenja količine strome kao prognostičkog faktora, no ovi rezultati nisu jednoznačni i ovise o tipu tumora (417). I rezultati ovog istraživanja potvrđuju važnost strome posebice gledano na ekspresiju AQP3 i AQP5 kod grupe s potpunim odgovorom. Nakon terapije, u ostatnom tkivu nakon operacije stanice strome kod potpunog odgovora ne povećavaju ekspresiju ova dva akvaporina, dok su oni povišeni u stromi kod nepotpunog odgovora. Također, razlike u izraženosti AQP5 prate se i u odnosu na imunofenotip, gdje je kod trostruko negativnog tumora dojke on značajno povišen u odnosu na stromu HER2 pozitivnih tumora dojke. Zanimljivo, NRF2 u stromi ima vrlo slični trend u odnosu na odgovor na terapiju i na imunofenotip.

Analiza korelacije pokazala je korelaciju između RCB i odgovora na terapiju kod oba imunofenotipa tumora potvrđujući time rezultate ove analize. Također, kod oba imunofenotipa nalazimo pozitivnu korelaciju RCB i AQP5 u stanicama tumora nakon operacije što ukazuje na lošiji terapijski odgovor i posljedično lošiju prognozu kod pacijentica s izraženim AQP5 nakon provedene terapije te AQP3 ukazuje da viša razina ovih proteina može predvidjeti manju vjerojatnost potpune remisije, što je u skladu s literaturom koja sugerira ulogu akvaporina u tumorskoj rezistenciji i progresiji (274,287,412).

Kod trostruko negativnog tumora dojke nalazimo više korelacija s RCB i odgovorom na terapiju u odnosu na HER2 pozitivne tumore, a posebice zajedničkih korelacija (pozitivnih s RCB i negativnih za pCR) što ukazuje na potencijal ovih molekula kao biomarkera, ali upućuje i na biološku značajnost kod rezistencije na terapiju. Posebice se tu ističu korelacije s RCB i odgovorom na terapiju kod strome nakon terapije. Konačno, korelacije RCB i odgovora na

terapiju s parametrima strome ističu biološki značaj strome u odgovoru na terapiju i potencijalnu ulogu u razvoju rezistencije.

Sumarno, rezultati ovog rada ukazuju da su promjene u ekspresiji akvaporina AQP3 i AQP5, kao i transkripcijskog faktora NRF2 povezane s mehanizmima prilagodbe tumorskih stanica kemoterapiju te su povezane s odgovorom na terapiju. Promjene ekspresije ovih molekula ukazuje na složenu mrežu međusobnih odnosa između redoks homeostaze, regulacije staničnog metabolizma i signalnih putova kojima tumorska stanica preživljava unatoč citotoksičnom djelovanju terapije. Rezultati upućuju na to da su akvaporini, osim ulogom u transportu vode i malih molekula, mogu biti važni sudionici u prijenosu redoks signala i regulaciji oksidacijskog stanja stanice. Također, njihova regulacija putem NRF2 mogla bi imati funkcionalnu važnost u održavanju stabilnosti tumora tijekom sustavne terapije. Nadalje, ekspresija u akvaporinima povezana je i s molekularnim podtipom tumora. Iako je kod oba istraživana podtipa tumora uočen porast ekspresije oba akvaporina, kod trostruko negativnih tumora je porast ekspresije AQP5 izraženiji, što ukazuje na različite mehanizme u uvjetima sustavne terapije. Uz promjenu akvaporina, aktivacija NRF2 povećava ekspresiju antioksidacijskih enzima i drugih komponenti obrambenog sustava, čime se potiče oporavak tumorskih stanica nakon terapije i stvaraju preduvjeti za razvoj rezistentnih klonova. Ova povezanost NRF2 i terapijskog odgovora ukazuje da upravo NRF2 može biti jedan od (glavnih) regulatora prilagodbe tumorskih stanica na kemoterapiju.

Dobiveni rezultati ukazuju da akvaporini i NRF2 sudjeluju u razvoju kemorezistencije, koja je izuzetno složen niz procesa i međudjelovanja molekularnih sustava koji zajednički omogućuju tumorskoj stanici prilagodbu na stresne uvjete. Kemorezistencija je izrazito dinamičan proces koji uključuje promjene metabolizma, staničnih signalnih puteva, promjene u transkripcijske regulacije te promijenjenu redoks homeostazu, u koju spadaju promjene NRF2 i akvaporina. Ova kompleksnost je razlog ograničenog terapijskog učinka standardnih kemoterapijskih protokola kod određenih podtipova karcinoma dojke, pri čemu akvaporini čine dodatan faktor kojim se rezistencija ostvaruje.

Identifikacija povezanosti ekspresije AQP3, AQP5 i NRF2 s terapijskim odgovorom predstavlja važan korak prema boljem razumijevanju bioloških mehanizama otpornosti na liječenje. Ovi rezultati naglašavaju potencijalnu primjenu akvaporina i transkripcijskog faktora NRF2 kao biomarkera za procjenu terapijske učinkovitosti, ali i kao mogućih terapijskih meta u budućim

pristupima liječenju karcinoma dojke. Posebno je zanimljiva mogućnost ciljane modulacije NRF2 čime bi se moglo utjecati na redoks ravnotežu tumorske stanice i povećati njezina osjetljivost na citotoksične lijekove.

Zaključno, oksidacijski stres i s njim povezani signalni putevi i proteini, uključujući AQP3, AQP5 i NRF2, čine važnu molekularnu osnovu prilagodbe tumorskih stanica na terapijski pritisak. Njihova međusobna povezanost potvrđuje da je rezistencija na kemoterapiju evolucijski proces koji omogućuje tumorskoj populaciji održavanje vitalnosti i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Ova saznanja mogu poslužiti kao temelj za razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa usmjerenih na prevladavanje kemorezistencije i poboljšanje ishoda liječenja bolesnica s karcinomom dojke.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu istražili smo povezanost NRF2, kao glavnog antioksidacijskog transkripcijskog faktora, i transkripcijskog faktora FOXO1 s dva akvaporina, AQP3 i AQP5. Iz rezultata možemo izvući sljedeće zaključke:

1. U trostruko negativnim i HER2+ tumorima dojke nema ekspresije transkripcijskog faktora FOXO 1.
2. AQP3 i AQP5 povećavaju ekspresiju u stanicama tumora kod nepotpunog odgovora na terapiju, s time da AQP5 bilježi značajno veći porast ekspresije.
3. Stroma pomoću AQP3 i AQP5 pomaže u obrani tumora od kemoterapije - oba akvaporina u stromi bili su povišeni kod nepotpunog terapijskog odgovora. U stanicama strome, AQP3 je bio slabije izražen u odnosu na AQP5, kako u inicijalnim, tako i poslijeoperacijskim uzorcima. Kod nepotpunog odgovora na terapiju ekspresija oba akvaporina se povećala, dok kod potpunog odgovora na terapiju nije došlo do promjene ova dva akvaporina u stanicama strome.
4. Oba akvaporina imala su povećanu ekspresiju u tumorskim stanicama nakon kemoterapije kod oba imunofenotipa tumora (HER2+ i TNBC). Trostruko negativni tumori reagirali su značajno većim porastom AQP5. Porast AQP3 nakon sustavne terapije bio je kod oba imunofenotipa tumora podjednak.
5. Stromalne stanice pokazuju vrlo sličnu dinamiku ekspresije akvaporina kao i tumorske stanice - U stanicama strome dokazana je značajno viša ekspresija AQP5 kod oba imunofenotipa raka dojke. Ekspresija AQP3 bila je niska kod oba imunofenotipa, kako prije, tako i poslije sustavnog liječenja. Nakon terapije, u stanicama strome zabilježen je značajan porast AQP5 za oba imunofenotipa, a taj je porast još izraženiji kod stanica strome kod trostruko negativnog raka dojke.
6. AQP3 je značajno porastao u ostatnim in situ tumorskim stanicama HER2 pozitivnih tumora s patohistološki potpunim odgovorom (ostatni DCIS, zadovoljen kriterij potpunog patohistološkog odgovora- pCR) i kod trostruko negativnih tumora s nepotpunim odgovorom na terapiju (non-pCR).

7. Ekspresija AQP5 u stromi povezana je s terapijskim odgovorom. AQP3 u stromi je nizak. Ekspresija AQP5 u stromi povećala se nakon sustavne terapije u ostatnim tumorima kod oba imunofenotipa, s tim da je porast bio nešto izraženiji kod TNBC u odnosu na HER2+ tumore. Kod potpunog odgovora, ekspresija AQP5 u stromi ostala je niska i kod trostruko negativnih i HER2+ tumora. AQP3 u stromi ima nisku ekspresiju neovisno o imunofenotipu i terapijskom odgovoru.

8. Ekspresija NRF2 bila je povećana u jezgrama tumorskih stanica kod ostalih tumora nakon kemoterapije kod nepotpunog odgovora. Kod tumora kod kojih je postignut pCR, ostatne in situ tumorske stanice pokazale su značajno nižu ekspresiju NRF2 u jezgri u odnosu na stanice ostalih tumora.

9. U stanicama strome nakon kemoterapije evidentiran je porast ekspresije NRF2 u jezgrama kod nepotpunog odgovora na terapiju. Izražajnost NRF2 je značajno veća kod stanica strome u non-pCR grupi odnosu na stanice strome pCR skupine.

10. Ostalni HER2+ tumori nisu imali povišenu ekspresiju NRF2 u jezgri.

11. Ostatne tumorske stanice kod trostruko negativnih tumora imale su povećanu ekspresiju NRF2 u jezgrama nakon kemoterapije.

12. AQP5 u tumoru je povezan s lošijim odgovorom na terapiju. AQP5 u tumoru pozitivno korelira s RCB što ukazuje da bi povećana ekspresija AQP5 mogla biti povezana s lošijim odgovorom na terapiju. AQP5 u tumoru i stromi u biopsiji snažno su povezani, što može sugerirati stabilnu i usklađenu regulaciju ovog akvaporina unutar tumorskog mikrookoliša.

14. Povezanost NRF2 i Ki67 sugerira funkcionalnu vezu između oksidacijskog odgovora i proliferativne aktivnosti tumorskih stanica – dokazana je pozitivna korelacija ekspresije NRF2 i Ki67.

15. AQP3 u tumoru i stromi pokazuju usklađenu ekspresiju, što može odražavati zajedničku regulaciju akvaporina u tumorskom tkivu

7. SAŽETAK

Karcinom dojke najčešći je karcinom u žena i čini četvrtinu svih novih slučajeva raka u žena u Hrvatskoj. Unatoč velikom napretku u dijagnostici i terapiji, posebno uvođenjem bioterapije i imunoterapije, smrtnost i dalje ostaje visoka kod agresivnih podtipova bolesti. Najveći problem liječenja je razvoj rezistencije na sustavnu terapiju, koja je povezana s antioksidacijskom obranom tumora i sposobnošću tumorskih stanica da se prilagode terapijskom stresu. Stoga je razumijevanje molekularnih mehanizama koji tome doprinose ključno za poboljšanje ishoda liječenja i identifikaciju novih terapijskih meta. U ovom istraživanju usporedili smo ekspresiju AQP3 i AQP5, te transkripcijskih faktora NRF2 i FOXO1 prije i poslije neoadjuvantnog sustavnog liječenja kod agresivnijih tumora, trostruko negativnih i HER2+ karcinoma. Akvaporini, osim uloge u transportu vode, sudjeluju i u prijenosu glicerola i vodikovog peroksida, što ih čini važnima u procesima preživljavanja stanica pod terapijskim stresom. Transkripcijski faktori NRF2 i FOXO1 ključni su regulatori staničnog odgovora na oksidativni stres te balansiraju između poticanja apoptoze i aktivacije mehanizama zaštite tumorskih stanica. Naši rezultati pokazali su povišenu ekspresiju akvaporina u ostatnim tumorima nakon sustavne terapije, što ukazuje na značajnu ulogu ovih molekula u preživljavanju i proliferaciji tumorskih stanica, ali i u mogućem razvoju terapijske rezistencije. U stromi je dokazan porast izražajnosti AQP5 nakon terapije, što bi moglo ukazivati na njegovu ključnu ulogu u reakciji stromalnih stanica na terapiju. Porast ekspresije AQP5 bio je značajniji kod TNBC, što može upućivati na različite mehanizme odgovora na sustavnu terapiju u različitim podtipovima tumora dojke. NRF2, transkripcijski faktor uključen u odgovoru na oksidativni stres, bio je značajno povišen u jezgrama tumorskih stanica kod ostatnih tumora, sugerirajući njegovu ulogu u aktivaciji obrambenih mehanizama i razvoju otpornosti na terapiju. Povećana citoplazmatska ekspresija NRF2 u stromi ostatnih tumora dodatno potvrđuje ulogu strome u rezistenciji tumora na sustavnu terapiju. Istraživanje nije pokazalo izraženost FOXO1, što sugerira ulogu FOXO1 kao tumor supresora kod TNBC i HER2 pozitivnog raka dojke. Otkrivene dinamike AQP3 i AQP5 te NRF2 ukazale su na njihovu značajnu ulogu u kemorezistenciji agresivnih tumora dojke te bi se mogle koristiti kao temelj daljnjih istraživanja ovih biomolekula kao prognostičkih pokazatelja, ali i kao ciljnih molekula čijom bi se modulacijom postigao bolji terapijski odgovor i preživljenje agresivnijih karcinoma dojke.

8. SUMMARY

Breast cancer is the most common malignancy in women and accounts for one quarter of all newly diagnosed cancers in women in Croatia. Despite considerable advances in diagnostics and therapy, particularly with the introduction of biotherapy and immunotherapy, mortality remains high in aggressive subtypes of this disease. The major challenge is the development of therapy resistance, which is associated with the tumor's antioxidative defense mechanisms and the ability of cancer cells to adapt to therapy-induced stress. Therefore, understanding the molecular mechanisms that contribute to this process is crucial for improving treatment outcomes and identifying new therapeutic targets. Here, we compared the expression of AQP3 and AQP5, as well as the transcription factors NRF2 and FOXO1, before and after neoadjuvant systemic therapy in triple-negative and HER2+ breast cancers. In addition to their role in water transport, aquaporins are also involved in the transport of glycerol and hydrogen peroxide, making them important contributors to cell survival under therapeutic stress. The transcription factors NRF2 and FOXO1 are key regulators of the cellular oxidative stress response, balancing between the induction of apoptosis and the activation of protective mechanisms in tumor cells. Our results demonstrated increased aquaporin expression in residual tumor cells following systemic therapy, indicating a significant role of these molecules in tumor cell survival and proliferation, as well as in the potential development of therapy resistance. In the stroma, an increase in AQP5 expression was observed after therapy, suggesting important role in stroma therapy response. The increase in AQP5 expression was more pronounced in TNBC, which may point to different mechanisms of response to systemic therapy among various breast cancer subtypes. NRF2, a transcription factor involved in oxidative stress response, was significantly upregulated in the nuclei of tumor cells in residual tumors, suggesting its role in activating defense mechanisms and promoting therapy resistance. Enhanced cytoplasmic expression of NRF2 in the stroma of residual tumors further supports the importance of the tumor microenvironment in systemic therapy resistance. The study did not show noticeable FOXO1 expression, which suggests its tumor suppressive role in TNBC and HER2-positive breast cancer. The identified dynamics of AQP3 and AQP5 and NRF2 highlight their important role in chemoresistance of aggressive breast tumors. Further, it could serve as a basis for further

research of these biomolecules as prognostic indicators as well as potential therapeutic targets, whose modulation may lead to improved treatment response and survival in aggressive breast cancer.

Ocjena rada
u tisku

9. LITERATURA

1. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 16e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical [Internet]. [cited 2022 Oct 25]. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=3047>
2. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology - 9780323597128 | Elsevier Health [Internet]. [cited 2022 Oct 25]. Available from: https://www.eu.elsevierhealth.com/guyton-and-hall-textbook-of-medical-physiology-9780323597128.html?gclid=Cj0KCQjwkt6aBhDKARIsAAyeLJ3IZ_4HlMQxvLWQGYuL9wkMKBqN0-eRpXfMAY4gA-VuAWsgA0-RPIaAvZZEALw_wcB&gclsrc=aw.ds
3. Key TJA, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* [Internet]. 1988 [cited 2022 Oct 25];24(1):29–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3276531/>
4. Jakić-Razumović Jasminka, Tomić Snježana. *Patologija 4/ Bolesti dojke*. 2014. 639–657 p.
5. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. 2000.
6. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* [Internet]. 1991 [cited 2023 Jun 19];254(5035):1138–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1659741/>
7. Ortiz M V., Dunkel IJ. Retinoblastoma. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073815587943> [Internet]. 2015 May 28 [cited 2023 Jun 19];31(2):227–36. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0883073815587943?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
8. Blagih J, Buck MD, Vousden KH. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Jun 19];133(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32144194/>
9. Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract* [Internet]. 1996 [cited 2023 Jun 19];192(7):669–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8880867/>
10. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 Jun 19];43(6):582–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>
11. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, editors. *Patologija*. 5th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
12. Hu C, Polley EC, Yadav S, Lilyquist J, Shimelis H, Na J, et al. The Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Clinical Subtypes of Invasive Breast Cancer From a Clinical Genetic Testing Cohort. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Mar 8];112(12):1231–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32091585/>
13. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Apr 10 [cited 2023 Mar 8];25(11):1329–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17416853/>
14. Van Den Broek AJ, Van't Veer LJ, Hoening MJ, Cornelissen S, Broeks A, Rutgers EJ, et al. Impact of Age at Primary Breast Cancer on Contralateral Breast Cancer Risk in BRCA1/2

- Mutation Carriers. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Feb 10 [cited 2023 Mar 8];34(5):409–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26700119/>
15. Blackwood MA, Weber BL. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol* [Internet]. 1998 [cited 2023 Mar 9];16(5):1969–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9586917/>
 16. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* [Internet]. 2012 May 8 [cited 2023 Mar 9];106(10):1697–701. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22516946/>
 17. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell*. 2000.
 18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
 19. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
 20. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Vol. 141, *Cell*. Elsevier B.V.; 2010. p. 1117–34.
 21. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clinical and Translational Oncology*. 2006 Feb;8(2):77–82.
 22. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*. 2008 Oct 1;6(10):1521–33.
 23. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Vol. 432, *Nature*. 2004. p. 332–7.
 24. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-independent EGFR signaling. Vol. 75, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.; 2015. p. 3436–41.
 25. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:671–82.
 26. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005;24:2909–15.
 27. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jul 11];2(2):103–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12204530/>
 28. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* [Internet]. 2007 Jun 4 [cited 2023 Jul 11];177(5):893–903. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17548515/>
 29. Junttila MR, Evan GI. p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2009 Nov [cited 2023 Jul 11];9(11):821–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19776747/>

30. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* [Internet]. 2007 Feb 26 [cited 2023 Jul 11];26(9):1324–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17322918/>
31. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2023 Jul 11];15(17):5308–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19706824/>
32. Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2023 Jul 11];125(5):991–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19452527/>
33. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* [Internet]. 2008 Dec 26 [cited 2023 Jul 11];135(7):1161–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19109884/>
34. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* [Internet]. 2010 Mar [cited 2023 Jul 11];140(6):883–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303878/>
35. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353–64.
36. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins: From structure to therapeutics - Thrombospondins in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008 Mar;65(5):700–12.
37. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69:4–10.
38. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2023 Jul 11];29(6):789–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19164810/>
39. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(3):321–31.
40. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* [Internet]. 2009 Jul [cited 2023 Jul 11];45(11):1924–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19406633/>
41. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2023 Jul 11];70(14):5649–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610625/>
42. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: A cancer researcher's conceptual friend and foe. *American Journal of Pathology*. 2009;174(5):1588–93.
43. Hlubek F, Brabletz T, Budczies J, Pfeiffer S, Jung A, Kirchner T. Heterogeneous expression of Wnt/ β -catenin target genes within colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007 Nov 1;121(9):1941–8.
44. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jul 11];141(1):39–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371344/>

45. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239–52.
46. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392–401.
47. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18:884–901.
48. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial - Mesenchymal and mesenchymal - Epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):374–83.
49. Naumov GN, Folkman J, Straume O, Akslen LA. Tumor-vascular interactions and tumor dormancy. *APMIS*. 2008 Jul;116(7–8):569–85.
50. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:834–46.
51. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2023 Jul 11];22(2):241–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945838/>
52. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2023 Jul 11];118(12):3917–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19033662/>
53. Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer*. 2010;46:1181–8.
54. Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2023 Jul 11];84(4):988–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18515327/>
55. Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol*. 2010;222:1–15.
56. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):302–12.
57. Gerhardt H, Semb H. Pericytes: Gatekeepers in tumour cell metastasis? *J Mol Med*. 2008 Feb;86(2):135–44.
58. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*. 2011 Apr;21(2):139–46.
59. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XHF, Norton L, et al. Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. *Cell* [Internet]. 2009 Dec 24 [cited 2025 Mar 5];139(7):1315–26. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0092867409014378>
60. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Mar;11(3):220–8.

61. Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2023 Jul 14];5:51–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19743960/>
62. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* [Internet]. 1992 [cited 2023 Jul 14];358(6381):15–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1614522/>
63. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40:179–204.
64. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071–8.
65. Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*. 2004;38:445–76.
66. Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes--form and function. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2010 Feb [cited 2023 Jul 14];20(1):4–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20060285/>
67. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:309–16.
68. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883–99.
69. Weinhouse S, Warburg O, Burk D, Schade AL. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (1979). 1956;124(3215):267–72.
70. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008;7:11–20.
71. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009 Mar 1;23(5):537–48.
72. Vajdic CM, Van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* [Internet]. 2009 Oct 15 [cited 2023 Jul 14];125(8):1747–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19444916/>
73. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* [Internet]. 2007 May [cited 2023 Jul 11];121(1):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17386080/>
74. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010 Feb;29(8):1093–102.
75. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* [Internet]. 2008 Apr [cited 2023 Jul 14];222(1):101–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18363996/>
76. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:249–61.
77. Fang S, Salven P. Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:290–5.

78. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* [Internet]. 2010 Aug 26 [cited 2023 Jul 14];29(34):4741–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20531305/>
79. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 28 [cited 2023 Jul 14];467(7319):1114–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20981102/>
80. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Jul 11];85(8):593–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20540157/>
81. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):618–31.
82. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jul 14];316(8):1324–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211171/>
83. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jul 14];21(1):19–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19857592/>
84. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jul 14];316(17):2713–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20451516/>
85. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 17];34(23–24):1565–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262144/>
86. Faget D V., Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Jul 17];19(8):439–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31235879/>
87. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* [Internet]. 2019 Oct 31 [cited 2023 Jul 17];179(4):813–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675495/>
88. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Jul 17];169(6):1000–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575665/>
89. Kowald A, Passos JF, Kirkwood TBL. On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 17];19(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33166065/>
90. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Jul 17];21(1):94–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602768/>
91. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jul 17];6(10):838–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32482536/>

92. De Blander H, Morel AP, Senaratne AP, Ouzounova M, Puisieux A. Cellular plasticity: A route to senescence exit and tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 1;13(18).
93. Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jul 17];9(7):837–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30992279/>
94. Bitman-Lotan E, Orian A. Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021 Apr 1;78(7):3141–58.
95. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):635–8.
96. Zeng Y, Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes (Basel)*. 2019 Apr 1;10(4).
97. Thienpont B, Van Dyck L, Lambrechts D. Tumors smother their epigenome. *Mol Cell Oncol*. 2016 Nov 1;3(6).
98. Gameiro PA, Struhl K. Nutrient Deprivation Elicits a Transcriptional and Translational Inflammatory Response Coupled to Decreased Protein Synthesis. *Cell Rep*. 2018 Aug 7;24(6):1415–24.
99. Lindner P, Paul S, Eckstein M, Hampel C, Muenzner JK, Erlenbach-Wuenssch K, et al. EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*. 2020 Feb 1;11(2).
100. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309–22.
101. Dzutsev A, Badger JH, Perez-Chanona E, Roy S, Salcedo R, Smith CK, et al. Microbes and Cancer. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2017 Apr 26 [cited 2023 Jul 17];35:199–228. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28142322/>
102. Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med*. 2019 Mar 1;25(3):377–88.
103. Thomas S, Izard J, Walsh E, Batich K, Chongsathidkiet P, Clarke G, et al. The host microbiome regulates and maintains human health: A primer and perspective for non-microbiologists. *Cancer Res*. 2017 Apr 15;77(8):1783–812.
104. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, van Hoeck A, Wood HM, Nomburg J, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + *E. coli*. *Nature*. 2020 Apr 9;580(7802):269–73.
105. Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, Sugiura Y, Yoshimoto S, Arai Y, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
106. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the intestinal epithelium: Modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. *Cells*. 2021 Jul 1;10(7).

107. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* (1979). 2021 Feb 5;371(6529):602–9.
108. ECIS - European Cancer Information System, 2023 [Internet]. [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>
109. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Feb 28];72(1):7–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21708>
110. Šekerija M, Bubanović L, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J, Mikolaj L, et al. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, Zagreb, 2022. [Internet]. Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-maligne-bolesti/>
111. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013 Sep 1;24(9):2206–23.
112. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. Vol. 50, *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Oxford University Press; 2020. p. 225–9.
113. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* [Internet]. 2002 Jan 25 [cited 2023 Mar 9];108(2):171–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11832208/>
114. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* [Internet]. 2009 Feb [cited 2023 Mar 9];18(1):13–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972196/>
115. Schneider K, Zelle K, Nichols KE, Garber J. Li-Fraumeni Syndrome. Adam M, Ardinger H, Pagon R, Wallace S, Bean L, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. 2019 Nov 21 [cited 2023 Mar 9]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>
116. Yang X, Leslie G, Doroszuk A, Schneider S, Allen J, Decker B, et al. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Mar 9];38(7):674–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31841383/>
117. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Aug 7 [cited 2023 Mar 9];371(6):497–506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25099575/>
118. Hu C, Polley EC, Yadav S, Lilyquist J, Shimelis H, Na J, et al. The Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Clinical Subtypes of Invasive Breast Cancer From a Clinical Genetic Testing Cohort. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Mar 9];112(12):1231–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32091585/>
119. Xicola RM, Li S, Rodriguez N, Reinecke P, Karam R, Speare V, et al. Clinical features and cancer risk in families with pathogenic CDH1 variants irrespective of clinical criteria. *J Med Genet*

- [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Mar 9];56(12):838–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31296550/>
120. Levy-Lahad E, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lishinsky E, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 [cited 2023 Mar 8];60(5):1059. Available from: [/pmc/articles/PMC1712434/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1712434/?report=abstract)
 121. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, Hahnen E, Hauke J, Bluemcke B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Mar 8];53(7):465–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26928436/>
 122. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Sep 10 [cited 2023 Mar 8];26(26):4282–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779615/>
 123. Dorling L, Carvalho S, Allen J, González-Neira A, Luccarini C, Wahlström C, et al. Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 4 [cited 2023 Mar 9];384(5):428–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33471991/>
 124. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 4 [cited 2023 Mar 9];384(5):440–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33471974/>
 125. Key Statistics for Breast Cancer in Men [Internet]. [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/key-statistics.html>
 126. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Jul [cited 2023 Mar 9];68(4):284–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29809280/>
 127. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Nov [cited 2023 Mar 9];69(6):438–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31577379/>
 128. Tung N, Domchek SM, Stadler Z, Nathanson KL, Couch F, Garber JE, et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Mar 9];13(9):581–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27296296/>
 129. Domchek SM, Robson ME. Update on Genetic Testing in Gynecologic Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019 Sep 20 [cited 2023 Mar 9];37(27):2501–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31403865/>
 130. Acevedo C, Amaya C, López-Guerra JL. Rare breast tumors: Review of the literature. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 3];19(4):267. Available from: [/pmc/articles/PMC4104018/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24104018/)

131. ELLIS IO, GALEA M, BROUGHTON N, LOCKER A, BLAMEY RW, ELSTON CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 3];20(6):479–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1607149/>
132. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. A PROGNOSTIC INDEX IN PRIMARY BREAST CANCER. *Br J Cancer*. 1982;45:361.
133. Allison KH, Elizabeth ; M, Hammond H, Dowsett ; Mitchell, Mckernin SE, Carey LA, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. 2019; Available from: www.asco.org/guideline-methodology
134. Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:1364–82.
135. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2014 May 14 [cited 2023 Mar 8];106(5). Available from: [/pmc/articles/PMC4580552/](http://pmc/articles/PMC4580552/)
136. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* [Internet]. 1987 [cited 2023 Mar 8];235(4785):182–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3798106/>
137. Moasser MM. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* [Internet]. 2007 Oct 10 [cited 2024 May 13];26(45):6469. Available from: [/pmc/articles/PMC3021475/](http://pmc/articles/PMC3021475/)
138. Capelan M, Pugliano L, De Azambuja E, Bozovic I, Saini KS, Sotiriou C, et al. Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2023 Mar 8];24(2):273–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22910839/>
139. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond MEH, Hayes DF, Mcshane LM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Jun 2];41(22):3867–72. Available from: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.22.02864>
140. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond MEH, Hayes DF, McShane LM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Dec 1];147(9):993–1000. Available from: <https://dx.doi.org/10.5858/arpa.2023-0950-SA>
141. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2011 Feb [cited 2024 May 13];11(2):263–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21342044/>

142. Hudis CA. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. <https://doi.org/101056/NEJMra043186> [Internet]. 2007 Jul 5 [cited 2023 Mar 8];357(1):39–51. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra043186>
143. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, De Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 [cited 2023 Mar 8];5(4):317–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15093539/>
144. Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2023 Mar 8];64(7):2343–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15059883/>
145. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2023 Mar 8];69(24):9330–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19934333/>
146. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jan 12 [cited 2023 Mar 8];366(2):109–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22149875/>
147. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Feb 19 [cited 2023 Mar 8];372(8):724–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25693012/>
148. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines[®]) Breast Cancer NCCN.org NCCN Guidelines for Patients[®] available at www.nccn.org/patients [Internet]. 2023. Available from: <https://www.nccn.org>
149. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jul 17];378(9805):1812–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098854/>
150. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Nov 11 [cited 2023 Jul 17];363(20):1938–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21067385/>
151. O’Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2023 Jul 17];16(24):6100–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21169259/>
152. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2023 Jul 17];73(7):2025–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23536562/>
153. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2023 Jul 17];19(23):6380–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24298068/>

154. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Jun 15 [cited 2023 Jul 17];26(12):2838–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32046998/>
155. Geyer FC, Pareja F, Weigelt B, Rakha E, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. *Am J Pathol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Jul 17];187(10):2139–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28736315/>
156. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* [Internet]. 2006 Jul [cited 2023 Jul 17];49(1):10–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16842242/>
157. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 6 [cited 2023 Jul 17];9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17417968/>
158. Mills AM, Gottlieb CE, Wendroth SM, Brenin CM, Atkins KA. Pure Apocrine Carcinomas Represent a Clinicopathologically Distinct Androgen Receptor-Positive Subset of Triple-Negative Breast Cancers. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Jul 17];40(8):1109–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27259012/>
159. Weisman PS, Ng CKY, Brogi E, Eisenberg RE, Won HH, Piscuoglio S, et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod Pathol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2023 Jul 17];29(5):476–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26939876/>
160. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer* [Internet]. 2016 Dec 14 [cited 2023 Jul 17];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721389/>
161. Pareja F, Weigelt B, Reis-Filho JS. Problematic breast tumors reassessed in light of novel molecular data. *Mod Pathol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jul 17];34(Suppl 1):38–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024304/>
162. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jul 17];2(5):367–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12450792/>
163. Wetterskog D, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, A'Hern R, Geyer FC, Milanezi F, et al. Adenoid cystic carcinomas constitute a genomically distinct subgroup of triple-negative and basal-like breast cancers. *J Pathol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 Jul 17];226(1):84–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22015727/>
164. Pareja F, Da Cruz Paula A, Gularte-Mérida R, Vahdatinia M, Li A, Geyer FC, et al. Pleomorphic adenomas and mucoepidermoid carcinomas of the breast are underpinned by fusion genes. *NPJ Breast Cancer* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 17];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32550265/>

165. Geyer FC, Berman SH, Marchiò C, Burke KA, Guerini-Rocco E, Piscuoglio S, et al. Genetic analysis of microglandular adenosis and acinic cell carcinomas of the breast provides evidence for the existence of a low-grade triple-negative breast neoplasia family. *Mod Pathol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Jul 17];30(1):69–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27713419/>
166. Chiang S, Weigelt B, Wen HC, Pareja F, Raghavendra A, Martelotto LG, et al. IDH2 Mutations Define a Unique Subtype of Breast Cancer with Altered Nuclear Polarity. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2023 Jul 17];76(24):7118–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913435/>
167. Pareja F, da Silva EM, Frosina D, Geyer FC, Lozada JR, Basili T, et al. Immunohistochemical analysis of IDH2 R172 hotspot mutations in breast papillary neoplasms: applications in the diagnosis of tall cell carcinoma with reverse polarity. *Mod Pathol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Jul 17];33(6):1056–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31896809/>
168. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Jul [cited 2023 Jul 17];121(7):2750–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633166/>
169. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Jul 17];11(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27310713/>
170. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Jul 20];21(7):1688–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25208879/>
171. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jul 20];9(2):176–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30679171/>
172. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu K Da, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2023 Jul 20];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26975198/>
173. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, Von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Feb 2 [cited 2023 Jul 20];26(5):814–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18258991/>
174. Killelea BK, Yang VQ, Mougalian S, Horowitz NR, Pusztai L, Chagpar AB, et al. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer increases the rate of breast conservation: results from the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Jul 20];220(6):1063–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25868410/>
175. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-

- 18 and B-27. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Feb 2 [cited 2023 Jul 20];26(5):778–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18258986/>
176. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2005 Feb 2 [cited 2023 Jul 20];97(3):188–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15687361/>
177. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 May 20 [cited 2023 Jul 20];30(15):1796–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22508812/>
178. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 20];384(9938):164–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24529560/>
179. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Mar 10 [cited 2023 Jul 20];26(8):1275–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18250347/>
180. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2025 Jun 2];56(2):185–229. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031699724016132?via%3Dihub>
181. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* [Internet]. 2015 Jun 2 [cited 2025 Jun 2];131(22):1981–8. Available from: [/doi/pdf/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777?download=true](https://doi/pdf/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777?download=true)
182. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2025 Jun 2];57(7):727–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10075079/>
183. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2025 Jun 2];1863(12):2977–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27646922/>
184. Sladek NE. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol Ther* [Internet]. 1988 Jan 1 [cited 2025 Jun 2];37(3):301–55. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0163725888900046?via%3Dihub>
185. Kurauchi K, Nishikawa T, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. *BMC Res Notes* [Internet]. 2017 Aug 14 [cited 2025 Jun 2];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28807058/>
186. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2014 Sep 15 [cited 2025 Jun 2];25(18):2677. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4161504/>

187. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel Action of Paclitaxel against Cancer Cells: Bystander Effect Mediated by Reactive Oxygen Species. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2025 Jun 2];67(8):3512–7. Available from: [/cancerres/article/67/8/3512/535000/Novel-Action-of-Paclitaxel-against-Cancer-Cells](https://cancerres/article/67/8/3512/535000/Novel-Action-of-Paclitaxel-against-Cancer-Cells)
188. Pieniżek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyła A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci* [Internet]. 2013 [cited 2025 Jun 2];58(1):104–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23612702/>
189. Phani TPS, Mannangatti M, Nekkala R, Bellala VM, Bellala RS, Payala V. Oxidative stress in breast cancer after chemotherapy. *Bioinformation* [Internet]. 2022 Dec 31 [cited 2025 Jun 2];18(12):1141. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10492917/>
190. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* [Internet]. 2010 Oct [cited 2024 Jun 25];44(10):1098–124. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20836659/>
191. Trošelj KG, Tomljanović M, Jaganjac M, Matijević Glavan T, Čipak Gašparović A, Milković L, et al. Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response. *Molecules* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Nov 2];27(5). Available from: [/pmc/articles/PMC8912061/](https://pmc/articles/PMC8912061/)
192. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul.* 1985;23(C):217–37.
193. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul.* 1985 Jan 1;23(C):217–37.
194. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1985 [cited 2024 Jun 25];311(1152):617–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2869521/>
195. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2024 Jun 25];595:19–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095209/>
196. Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. <http://dx.doi.org/10.1191/0960327102ht217oa> [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2024 Jun 25];21(2):91–7. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327102ht217oa>
197. Davies KJA. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2016 Jun 1;49:1–7.
198. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* [Internet]. 2004 Mar 5 [cited 2023 Jul 20];303(5663):1532–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001782/>
199. Rybicka JM, Balce DR, Khan MF, Krohn RM, Yates RM. NADPH oxidase activity controls phagosomal proteolysis in macrophages through modulation of the luminal redox environment of phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Jun 8 [cited 2023 Jul 20];107(23):10496–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20498052/>

200. Yang HC, Cheng ML, Ho HY, Tsun-Yee Chiu D. The microbicidal and cytheregulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes Infect* [Internet]. 2011 Feb [cited 2023 Jul 20];13(2):109–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20971207/>
201. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* [Internet]. 2011 Apr 6 [cited 2023 Jul 20];13(4):361–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21459321/>
202. Alleman RJ, Katunga LA, Nelson MAM, Brown DA, Anderson EJ. The “Goldilocks Zone” from a redox perspective-Adaptive vs. deleterious responses to oxidative stress in striated muscle. *Front Physiol* [Internet]. 2014 Sep 18 [cited 2024 Jun 25];5:105707. Available from: www.frontiersin.org
203. Peluso I, Yarla NS, Ambra R, Pastore G, Perry G. MAPK signalling pathway in cancers: Olive products as cancer preventive and therapeutic agents. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2024 Jun 25];56:185–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912082/>
204. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Jul 20];1863(12):2977–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27646922/>
205. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991 Jan 1;11(1):81–128.
206. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* [Internet]. 2012 [cited 2025 Oct 7];5(1):9. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3488923/>
207. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* [Internet]. 2010 Oct [cited 2024 Jun 25];44(10):1098–124. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20836659/>
208. Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics* [Internet]. 2013 Oct 30 [cited 2024 Jun 25];92:239–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23438936/>
209. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1993 [cited 2024 Jun 25];57(5 Suppl). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8475896/>
210. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009 Jan 1;417(1):1–13.
211. Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río Luis A. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *Subcell Biochem*. 2013 May 29;69:231–55.
212. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 20;21(3):396–413.
213. Naidoo K, Birch-Machin MA. Oxidative stress and ageing: The influence of environmental pollution, sunlight and diet on skin. *Cosmetics*. 2017 Mar 1;4(1).

214. Russo GL, Moccia S, Russo M, Spagnuolo C. Redox regulation by carotenoids: Evidence and conflicts for their application in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2021 Dec 1;194.
215. Klein EA, Thompson IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia S, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA*. 2011 Oct 12;306(14):1549–56.
216. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: Design, methods, participant characteristics, and compliance. *Ann Epidemiol*. 1994;4(1):1–10.
217. Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meykens FL, Omenn GS, et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping β -carotene and retinol supplements. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Dec 1;96(23):1743–50.
218. Ebbing M, Børnå KH, Nygård O, Arnesen E, Ueland PM, Nordrehaug JE, et al. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA*. 2009;302(19):2119–26.
219. Cipak A, Jaganjac M, Tehlivets O, Kohlwein SD, Zarkovic N. Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2008 Jun;1781(6–7):283–7.
220. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2010 Feb;1804(2):263–74.
221. Ahmadinejad F, Møller SG, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhor G, Jami MS. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*. 2017 Sep 1;6(3).
222. Milkovic L, Zarkovic N, Saso L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Nov 2];12:727–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28411557/>
223. Beretta GL, Corno C, Zaffaroni N, Perego P. Role of FoxO proteins in cellular response to antitumor agents. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 1;11(1).
224. Laissue P. The forkhead-box family of transcription factors: Key molecular players in colorectal cancer pathogenesis. *Mol Cancer*. 2019 Jan 8;18(1).
225. Chen J, Wang L, Chen Y, Sternberg P, Cai J. Phosphatidylinositol 3 kinase pathway and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative injury in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Feb;50(2):936–42.
226. 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 Aug 1;285(2 54-2).
227. Łuczaj W, Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017 Oct 1;111:87–101.
228. Carter ME, Brunet A. FOXO transcription factors. *Current Biology*. 2007 Feb 20;17(4).
229. Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, et al. Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*. 2021;10(5).

230. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10823–30.
231. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 2006;10(3):175–6.
232. Ogrunc M, Di Micco R, Lontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M, et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):998–1012.
233. Dodson M, De La Vega MR, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD. Modulating NRF2 in disease: Timing is everything. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019 Jan 6;59:555–75.
234. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis C De, Marinari UM, et al. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
235. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81–128.
236. Cinat D, Coppes RP, Barazzuol L. DNA Damage-Induced Inflammatory Microenvironment and Adult Stem Cell Response. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Oct 8;9.
237. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer.
238. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiol Rev.* 2018 Jul 1;98(3):1169–203.
239. Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 2015 Dec 1;6:51–72.
240. Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, et al. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep.* 2014 Jan 23;4.
241. Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol.* 2008 Feb;10(2):138–48.
242. Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins - New players in cancer biology. Vol. 86, *Journal of Molecular Medicine*. 2008. p. 523–9.
243. Ishibashi K, Tanaka Y, Morishita Y. The role of mammalian superaquaporins inside the cell: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2021 Jul 1;1863(7):183617.
244. Brown D. E-Mail The Discovery of Water Channels (Aquaporins) Why Are We Interested in Water Channels? *Proceedings Ann Nutr Metab* [Internet]. 2017;70(1):37–42. Available from: <http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>
245. Soveral G, Macey RI, Moura TF. Membrane stress causes inhibition of water channels in brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule. *Biol Cell* [Internet]. 1997 Aug 1 [cited 2023 May 2];89(5–6):275–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1768-322X.1997.tb01023.x>

246. Kasa P, Farran B, Prasad GLV, Nagaraju GP. Aquaporins in female specific cancers. *Gene* [Internet]. 2019 Jun 5 [cited 2023 May 2];700:60–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898710/>
247. Prata C, Hrelia S, Fiorentini D. Peroxiporins in cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 2;20(6).
248. Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochim Biophys Acta Biomembr* [Internet]. 2015;1848(10):2576–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.001>
249. Vieira da Silva I, Soveral G. Aquaporins in Obesity. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Nov 12];969:227–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28258577/>
250. King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Nov 12];5(9):687–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15340377/>
251. Yool A. Functional Domains of Aquaporin-1: Keys to Physiology, and Targets for Drug Discovery. *Curr Pharm Des*. 2007 Oct 28;13(31):3212–21.
252. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2014;1840(5):1596–604.
253. Rodrigues C, Mósca AF, Martins AP, Nobre T, Prista C, Antunes F, et al. Rat aquaporin-5 is pH-gated induced by phosphorylation and is implicated in oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 13;17(12).
254. Kourghi M, Pei J V., De Ieso ML, Nourmohammadi S, Chow PH, Yool AJ. Fundamental structural and functional properties of Aquaporin ion channels found across the kingdoms of life. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Apr 1;45(4):401–9.
255. NIH 3D. (2014). Structure of aquaporin-1 at 3.8 Å resolution by electron crystallography (Version 2.x). NIH 3D. <https://doi.org/10.60705/3DPX/150.2>.
256. Yde J, Keely SJ, Moeller HB. Expression, regulation and function of Aquaporin-3 in colonic epithelial cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2021 Jul 1;1863(7).
257. Lee SM, Lee SW, Kang M, Choi JK, Park K, Byun JS, et al. FoxO1 as a Regulator of Aquaporin 5 Expression in the Salivary Gland. *J Dent Res*. 2021 Oct 1;100(11):1281–8.
258. Cui F, Hu M, Li R, Li B, Huang D, Ma W, et al. Insulin on changes in expressions of aquaporin-1, aquaporin-5, and aquaporin-8 in submandibular salivary glands of rats with Streptozotocin-induced diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Nov 12];14(2):221. Available from: </pmc/articles/PMC7868788/>
259. Milković L, Gašparović AČ. AQP3 and AQP5—Potential Regulators of Redox Status in Breast Cancer. *Molecules* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Nov 12];26(9). Available from: </pmc/articles/PMC8124745/>
260. Kamsteeg EJ, Heijnen I, Van Os CH, Deen PMT. The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *Journal of Cell Biology*. 2000 Nov 13;151(4):919–29.

261. Chen Q, Zhu L, Zong H, Song X, Wang L, Wang X, et al. Subcellular localization of aquaporin 3 in prostate cancer is regulated by RalA. *Oncol Rep.* 2018 May 1;39(5):2171–7.
262. Rodrigues C, Mósca AF, Martins AP, Nobre T, Prista C, Antunes F, et al. Rat aquaporin-5 is pH-gated induced by phosphorylation and is implicated in oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 13;17(12).
263. Soveral G, Madeira A, Loureiro-Dias MC, Moura TF. Membrane tension regulates water transport in yeast. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2008 Nov;1778(11):2573–9.
264. Soveral G, Macey RI, Moura TF. Membrane stress causes inhibition of water channels in brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule. *Biol Cell.* 1997 Aug;89(5–6):275–82.
265. Ozu M, Galizia L, Acuña C, Amodeo G. Aquaporins: More than functional monomers in a tetrameric arrangement. *Cells.* 2018 Nov 11;7(11).
266. Ahmadpour D, Geijer C, Tamás MJ, Lindkvist-Petersson K, Hohmann S. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2014;1840(5):1482–91.
267. Tomita Y, Dorward H, Yool AJ, Smith E, Townsend AR, Price TJ, et al. Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 1;18(2).
268. Dorward HS, Du A, Bruhn MA, Wrin J, Pei J V., Evdokiou A, et al. Pharmacological blockade of aquaporin-1 water channel by AqB013 restricts migration and invasiveness of colon cancer cells and prevents endothelial tube formation in vitro. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2016 Feb 24;35(1).
269. Chen J, Wang T, Zhou YC, Gao F, Zhang ZH, Xu H, et al. Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2014 May 3;33(1).
270. Wang Z, Wang Y, He Y, Zhang N, Chang W, Niu Y. Aquaporin-1 facilitates proliferation and invasion of gastric cancer cells via GRB7-mediated ERK and Ras activation. *Anim Cells Syst (Seoul).* 2020 Sep 2;24(5):253–9.
271. Jing H, Liu C, Liu L, Zhang Y. Molecular mechanism of AQP3 in regulating differentiation and apoptosis of lung cancer stem cells through Wnt/GSK-3 β / β -Catenin pathway. *JBUON.* 2020;25(4):1714–20.
272. Shi Z, Zhang T, Luo L, Zhao H, Cheng J, Xiang J, et al. Aquaporins in human breast cancer: identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. *J Surg Oncol [Internet].* 2012 Sep 1 [cited 2023 May 2];106(3):267–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22105864/>
273. Kang S, Chae YS, Lee SJ, Kang BW, Kim JG, Kim WW, et al. Aquaporin 3 Expression Predicts Survival in Patients with HER2-positive Early Breast Cancer. *Anticancer Res [Internet].* 2015 May 1 [cited 2023 May 2];35(5):2775–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25964557/>
274. Lee SJ, Chae YS, Kim JG, Kim WW, Jung JH, Park HY, et al. AQP5 expression predicts survival in patients with early breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Feb;21(2):375–83.

275. Rodrigues C, Tartaro Bujak I, Mihaljević B, Soveral G, Cipak Gasparovic A. Yeast aquaporin regulation by 4-hydroxynonenal is implicated in oxidative stress response. *IUBMB Life*. 2017 May 1;69(5):355–62.
276. Bhakta-Guha D, Efferth T. Hormesis: Decoding two sides of the same coin. *Pharmaceuticals*. 2015 Dec 16;8(4):865–83.
277. Kang JI, Kim DH, Sung KW, Shim SM, Cha-molstad H, Soung NK, et al. P62-induced cancer-associated fibroblast activation via the Nrf2-ATF6 pathway promotes lung tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 1;13(4):1–25.
278. De Ieso ML, Yool AJ. Mechanisms of aquaporin-facilitated cancer invasion and metastasis. *Front Chem*. 2018;6.
279. Aikman B, De Almeida A, Meier-Menches SM, Casini A. Aquaporins in cancer development: Opportunities for bioinorganic chemistry to contribute novel chemical probes and therapeutic agents. *Metallomics*. 2018 May 1;10(5):696–712.
280. Khan S, Ricciardelli C, Yool AJ. Targeting aquaporins in novel therapies for male and female breast and reproductive cancers. *Cells*. 2021 Feb 1;10(2):1–18.
281. van Lieburg AF, Knoers NVAM, Deen PMT. Discovery of aquaporins: a breakthrough in research on renal water transport. *Pediatric Nephrology*. 1995 Apr;9(2):228–34.
282. Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: Important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(4):259–77.
283. Mobasheri A, Barrett-Jolley R. Aquaporin water channels in the mammary gland: From physiology to pathophysiology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014;19(1):91–102.
284. Moosavi MS, Elham Y. Aquaporins 1, 3 and 5 in Different Tumors, their Expression, Prognosis Value and Role as New Therapeutic Targets. *Pathology and Oncology Research*. 2020 Apr 1;26(2):615–25.
285. Marlar S, Jensen HH, Login FH, Nejsum LN. Aquaporin-3 in cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 1;18(10).
286. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia (United States)*. 2017 Aug 1;19(8):649–58.
287. Zhu Z, Jiao L, Li T, Wang H, Wei W, Qian H. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2018 Aug 1;16(2):2661–7.
288. Huang YT, Zhou J, Shi S, Xu HY, Qu F, Zhang D, et al. Identification of Estrogen Response Element in Aquaporin-3 Gene that Mediates Estrogen-induced Cell Migration and Invasion in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Sci Rep*. 2015 Jul 29;5.
289. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med*. 2008 Feb;86(2):221–31.

290. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Prevention of Skin Tumorigenesis and Impairment of Epidermal Cell Proliferation by Targeted Aquaporin-3 Gene Disruption. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan 1;28(1):326–32.
291. Hara-Chikuma M, Satooka H, Watanabe S, Honda T, Miyachi Y, Watanabe T, et al. Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF- κ B signalling in keratinocytes and development of psoriasis. *Nat Commun.* 2015 Jun 23;6.
292. Satooka H, Hara-Chikuma M. Aquaporin-3 Controls Breast Cancer Cell Migration by Regulating Hydrogen Peroxide Transport and Its Downstream Cell Signaling. *Mol Cell Biol.* 2016 Apr 1;36(7):1206–18.
293. Martins AP, Marrone A, Ciancetta A, Cobo AG, Echevarría M, Moura TF, et al. Targeting aquaporin function: Potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound. *PLoS One.* 2012 May 18;7(5).
294. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 7;107(36):15681–6.
295. Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry.* 2007 Jan 12;282(2):1183–92.
296. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2006 Aug;1758(8):994–1003.
297. Rodrigues C, Milkovic L, Bujak IT, Tomljanovic M, Soveral G, Cipak Gasparovic A. Lipid Profile and Aquaporin Expression under Oxidative Stress in Breast Cancer Cells of Different Malignancies. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
298. Ampawong S, Luplertlop N. Experimental Scedosporiosis Induces Cerebral Oedema Associated with Abscess regarding Aquaporin-4 and Nrf-2 Depletions. *Biomed Res Int.* 2019;2019.
299. Song D, Liu X, Diao Y, Sun Y, Gao G, Zhang T, et al. Hydrogen-rich solution against myocardial injury and aquaporin expression via the PI3K/Akt signaling pathway during cardiopulmonary bypass in rats. *Mol Med Rep.* 2018 Aug 1;18(2):1925–38.
300. Lu C, Ma Z, Cheng X, Wu H, Tuo B, Liu X, et al. Pathological role of ion channels and transporters in the development and progression of triple-negative breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2020 Aug 6;20(1).
301. Jung HJ, Park JY, Jeon HS, Kwon TH. Aquaporin-5: A marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells. *PLoS One.* 2011 Dec 1;6(12).
302. Rodrigues C, Pimpão C, Mósca AF, Coxixo AS, Lopes D, Da Silva IV, et al. Human aquaporin-5 facilitates hydrogen peroxide permeation affecting adaption to oxidative stress and cancer cell migration. *Cancers (Basel).* 2019 Jul 1;11(7).
303. Milkovic L, Gasparovic AC, Cindric M, Mouthuy PA, Zarkovic N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells.* 2019 Aug 1;8(8).

304. Park EJ, Jung HJ, Choi HJ, Jang HJ, Park HJ, Nejsum LN, et al. Exosomes co-expressing AQP5-targeting miRNAs and IL-4 receptor-binding peptide inhibit the migration of human breast cancer cells. *FASEB Journal*. 2020 Feb 1;34(2):3379–98.
305. Oh SH, Choi SY, Choi HJ, Ryu HM, Kim YJ, Jung HY, et al. The emerging role of xanthine oxidase inhibition for suppression of breast cancer cell migration and metastasis associated with hypercholesterolemia. *FASEB J [Internet]*. 2019 Jun 1 [cited 2024 Jun 25];33(6):7301–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30860872/>
306. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2015 [cited 2023 Nov 2];88(Pt B):179–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25975984/>
307. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013 Jan;53:401–26.
308. Chen B, Lu Y, Chen Y, Cheng J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*. 2015;225(3):R83–99.
309. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*. 2020 Nov 23;25(22).
310. Wang Z, Zhang J, Li M, Kong L, Yu J. The expression of p-p62 and nuclear Nrf2 in esophageal squamous cell carcinoma and association with radioresistance. *Thorac Cancer*. 2020 Jan 1;11(1):130–9.
311. Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1235–43.
312. Okazaki K, Papagiannakopoulos T, Motohashi H. Metabolic features of cancer cells in NRF2 addiction status. *Biophys Rev*. 2020 Apr 1;12(2):435–41.
313. Lignitto L, LeBoeuf SE, Homer H, Jiang S, Askenazi M, Karakousi TR, et al. Nrf2 Activation Promotes Lung Cancer Metastasis by Inhibiting the Degradation of Bach1. *Cell*. 2019 Jul 11;178(2):316–329.e18.
314. Parri M, Ippolito L, Cirri P, Ramazzotti M, Chiarugi P. Metabolic cell communication within tumour microenvironment: models, methods and perspectives. *Curr Opin Biotechnol*. 2020 Jun 1;63:210–9.
315. Orešić T, Bubanović S, Ramić S, Šarčević B, Čipak Gašparović A. Nuclear localization of NRF2 in stroma of HER2 positive and triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract [Internet]*. 2023 Aug 1 [cited 2024 May 7];248. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37421843/>
316. Panieri E, Saso L. Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev [Internet]*. 2019 [cited 2023 Nov 2];2019. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31097977/>
317. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal [Internet]*. 2018 Dec 10 [cited 2024 May 7];29(17):1727–45. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7342>

318. Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F, et al. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Apr 4 [cited 2023 Nov 2];283(14):8984–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18238777/>
319. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 1;21(13):1–23.
320. Xi J, Zhang Z, Wang Z, Wu Q, He Y, Xu Y, et al. Hinokitiol functions as a ferroptosis inhibitor to confer neuroprotection. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 May 7];190:202–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35985562/>
321. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1304–9.
322. Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J Cell Physiol*. 2020 Apr 1;235(4):3119–30.
323. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury . *The FASEB Journal*. 2007 Jul;21(9):2237–46.
324. Rushworth SA, Zaitseva L, Murray MY, Shah NM, Bowles KM, MacEwan DJ. The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- κ B and underlies its chemo-resistance. *Blood* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2023 Nov 2];120(26):5188–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23077289/>
325. Kang HJ, Kim HJ, Kim SK, Barouki R, Cho CH, Khanna KK, et al. BRCA1 modulates xenobiotic stress-inducible gene expression by interacting with ARNT in human breast cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 May 26 [cited 2023 Nov 2];281(21):14654–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567799/>
326. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2023 Nov 2];47(D1):D155–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30423142/>
327. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* [Internet]. 2009 Jan [cited 2023 Nov 2];19(1):92–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18955434/>
328. Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki KI, Omura K, Inazawa J. The Impact of miRNA-Based Molecular Diagnostics and Treatment of NRF2-Stabilized Tumors. *Cell Death and Survival* [Internet]. [cited 2023 May 22]; Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/>
329. Van Jaarsveld MTM, Helleman J, Boersma AWM, Van Kuijk PF, Van Ijcken WF, Despierre E, et al. miR-141 regulates KEAP1 and modulates cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Nov 2];32(36):4284–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045278/>
330. Eades G, Yang M, Yao Y, Zhang Y, Zhou Q. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Nov 25 [cited 2023 Nov 2];286(47):40725–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21926171/>

331. Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Dec 29 [cited 2023 Nov 2];281(52):39776–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17077087/>
332. Kahroba H, Shirmohamadi M, Hejazi MS, Samadi N. The Role of Nrf2 signaling in cancer stem cells: From stemness and self-renewal to tumorigenesis and chemoresistance. *Life Sci* [Internet]. 2019 Dec 15 [cited 2023 Nov 2];239. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31678283/>
333. Zhu J, Wang H, Fan Y, Hu Y, Ji X, Sun Q, et al. Knockdown of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 by lentivirus induces differentiation of glioma stem-like cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 2];32(3):1170–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25017049/>
334. Kamble D, Mahajan M, Dhat R, Sitasawad S. Keap1-Nrf2 Pathway Regulates ALDH and Contributes to Radioresistance in Breast Cancer Stem Cells. *Cells* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Nov 2];10(1):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33419140/>
335. Kim D, Choi B hyun, Ryoo I geun, Kwak MK. High NRF2 level mediates cancer stem cell-like properties of aldehyde dehydrogenase (ALDH)-high ovarian cancer cells: inhibitory role of all-trans retinoic acid in ALDH/NRF2 signaling. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Nov 2];9(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30166520/>
336. Gao L, Morine Y, Yamada S, Saito Y, Ikemoto T, Tokuda K, et al. Nrf2 signaling promotes cancer stemness, migration, and expression of ABC transporter genes in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Nov 2];16(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34473785/>
337. Jang J, Wang Y, Lalli MA, Guzman E, Godshalk SE, Zhou H, et al. Primary Cilium-Autophagy-Nrf2 (PAN) Axis Activation Commits Human Embryonic Stem Cells to a Neuroectoderm Fate. *Cell* [Internet]. 2016 Apr 7 [cited 2023 Nov 2];165(2):410–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27020754/>
338. Luo M, Shang L, Brooks MD, Jiagge E, Zhu Y, Buschhaus JM, et al. Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metab* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2023 Nov 2];28(1):69–86.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29972798/>
339. Ryoo IG, Choi BH, Kwak MK. Activation of NRF2 by p62 and proteasome reduction in sphere-forming breast carcinoma cells. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 2];6(10):8167–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25717032/>
340. Qin S, He X, Lin H, Schulte BA, Zhao M, Tew KD, et al. Nrf2 inhibition sensitizes breast cancer stem cells to ionizing radiation via suppressing DNA repair. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Nov 2];169:238–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892113/>
341. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Jul 9 [cited 2023 Nov 2];34(1):21–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29731393/>

342. O'cathail SM, Wu CH, Thomas R, Hawkins MA, Maughan TS, Lewis A. NRF2 Mediates Therapeutic Resistance to Chemoradiation in Colorectal Cancer through a Metabolic Switch. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Nov 2];10(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34573012/>
343. Payandeh Z, Tazehkand AP, Mansoori B, Khaze V, Asadi M, Baradaran B, et al. The Impact of Nrf2 Silencing on Nrf2-PD-L1 Axis to Overcome Oxaliplatin Resistance and Migration in Colon Cancer Cells. *Avicenna J Med Biotechnol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Nov 2];13(3):116–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34484640/>
344. Duong HQ, Yi YW, Kang HJ, Hong Y Bin, Tang W, Wang A, et al. Inhibition of NRF2 by PIK-75 augments sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Oncol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2023 Nov 2];44(3):959–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366069/>
345. Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, Bunz F, Biswal S. Gain of Nrf2 function in non-small-cell lung cancer cells confers radioresistance. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2023 Nov 2];13(11):1627–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20446773/>
346. Cescon DW, She D, Sakashita S, Zhu CQ, Pintilie M, Shepherd FA, et al. NRF2 Pathway Activation and Adjuvant Chemotherapy Benefit in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Nov 2];21(11):2499–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25739673/>
347. Galan-Cobo A, Sitthideatphaiboon P, Qu X, Poteete A, Pisegna MA, Tong P, et al. LKB1 and KEAP1/NRF2 Pathways Cooperatively Promote Metabolic Reprogramming with Enhanced Glutamine Dependence in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2023 Nov 2];79(13):3251–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31040157/>
348. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, Leboeuf SE, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Nov 2];23(11):1362–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28967920/>
349. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, Papadimitrakopoulou VA, Tong P, Izzo J, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Nov 2];5(8):861–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26069186/>
350. Chuang HY, Hsu LY, Pan CM, Pikatan NW, Yadav VK, Fong IH, et al. The E3 Ubiquitin Ligase NEDD4-1 Mediates Temozolomide-Resistant Glioblastoma through PTEN Attenuation and Redox Imbalance in Nrf2-HO-1 Axis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Nov 2];22(19). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34638586/>
351. Murtaza G, Khan AK, Rashid R, Muneer S, Hasan SMF, Chen J. FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2017.
352. Furuyama T, Yamashita H, Kitayama K, Higami Y, Shimokawa I, Mori N. Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the

- rat skeletal muscles. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2002 Nov 15 [cited 2023 Nov 7];59(4):331–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12424797/>
353. Hoekman MFM, Jacobs FMJ, Smidt MP, Burbach JPH. Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expr Patterns* [Internet]. 2006 Jan [cited 2023 Nov 7];6(2):134–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16326148/>
354. Eijkelenboom A, Burgering BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2023 Nov 7];14(2):83–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23325358/>
355. Zhang Y, Gan B, Liu D, Paik JH. FoxO family members in cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2011 Aug 15 [cited 2023 Nov 7];12(4):253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21613825/>
356. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* [Internet]. 2005 Nov 14 [cited 2023 Nov 7];24(50):7410–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16288288/>
357. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* [Internet]. 2004 May 14 [cited 2023 Nov 7];117(4):421–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15137936/>
358. Van Der Horst A, Burgering BMT. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2023 Nov 7];8(6):440–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17522590/>
359. Santos BF, Grenho I, Martel PJ, Ferreira BI, Link W. FOXO family isoforms. *Cell Death Dis* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2024 May 7];14(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37891184/>
360. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* [Internet]. 2017 Aug 10 [cited 2023 Nov 7];170(4):605–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802037/>
361. Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* [Internet]. 2005 Apr 8 [cited 2023 Nov 7];121(1):115–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15820683/>
362. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2023 Nov 7];9(9):679–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18698327/>
363. Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Apr 4 [cited 2023 Nov 7];278(14):12361–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12517744/>
364. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Sep 30 [cited 2023 Nov 7];100(20):11285–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13679577/>

365. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Nov 7];1864(10):1372–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27296530/>
366. Qiang L, Banks AS, Accili D. Uncoupling of acetylation from phosphorylation regulates FoxO1 function independent of its subcellular localization. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Aug 27 [cited 2023 Nov 7];285(35):27396–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519497/>
367. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Aug 9 [cited 2023 Nov 7];102(32):11278–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16076959/>
368. Van Der Horst A, Tertoolen LGJ, De Vries-Smits LMM, Frye RA, Medema RH, Burgering BMT. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jul 9 [cited 2023 Nov 7];279(28):28873–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15126506/>
369. Perrot V, Rechler MM. The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Nov 7];19(9):2283–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890677/>
370. Qiang L, Banks AS, Accili D. Uncoupling of acetylation from phosphorylation regulates FoxO1 function independent of its subcellular localization. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Aug 27 [cited 2023 Nov 7];285(35):27396–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519497/>
371. Nowak K, Killmer K, Gessner C, Lutz W. E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007 Apr [cited 2023 Nov 7];1769(4):244–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17482685/>
372. Kurinna S, Stratton SA, Tsai WW, Akdemir KC, Gu W, Singh P, et al. Direct activation of forkhead box O3 by tumor suppressors p53 and p73 is disrupted during liver regeneration in mice. *Hepatology* [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 Nov 7];52(3):1023–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20564353/>
373. Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, et al. The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2023 Nov 7];30(29):3207–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21423206/>
374. Bakker WJ, Harris IS, Mak TW. FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Dec 28 [cited 2023 Nov 7];28(6):941–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18158893/>
375. Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffey PJ, Demoulin JB. The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Apr 17 [cited 2023 Nov 7];284(16):10334–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19244250/>

376. Zhu WL, Tong H, Teh JT, Wang M. Forkhead box protein O3 transcription factor negatively regulates autophagy in human cancer cells by inhibiting forkhead box protein O1 expression and cytosolic accumulation. *PLoS One* [Internet]. 2014 Dec 29 [cited 2023 Nov 7];9(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25546383/>
377. Li Y, Yu J, Du D, Fu S, Chen Y, Yu F, et al. Involvement of post-transcriptional regulation of FOXO1 by HuR in 5-FU-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncol Lett* [Internet]. 2013 Jul [cited 2023 Nov 8];6(1):156–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23946796/>
378. Xi J, Jing F, Li Q, Li X, Saitian Z. The long non-coding RNA lncFOXO1 suppresses growth of human breast cancer cells through association with BAP1. *Int J Oncol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Nov 8];50(5):1663–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28339037/>
379. Fredericks WJ, Galili N, Mukhopadhyay S, Rovera G, Bennicelli J, Barr FG, et al. The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2023 Nov 8];15(3):1522–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7862145/>
380. Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, et al. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* [Internet]. 1997 [cited 2023 Nov 8];14(2):195–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9010221/>
381. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a Novel Partner of the MLL Gene in t(6; 11)(q21; q23), Defines a Forkhead Transcriptional Factor Subfamily. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3714–9.
382. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2023 Nov 8];163(4):1011–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26544944/>
383. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, et al. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* [Internet]. 2007 Jan 26 [cited 2023 Nov 8];128(2):309–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17254969/>
384. Gan B, Lim C, Chu G, Hua S, Ding Z, Collins M, et al. FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis. *Cancer Cell* [Internet]. 2010 Nov 16 [cited 2023 Nov 8];18(5):472–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075312/>
385. Van Der Vos KE, Coffey PJ. The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2011 Feb 15 [cited 2023 Nov 8];14(4):579–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20673124/>
386. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 [cited 2023 Nov 8];2(1):81–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150827/>
387. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJPL, Lam EWF, et al. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of

- cyclin D. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2023 Nov 8];22(22):7842–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12391153/>
388. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N. FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jul 26 [cited 2023 Nov 8];277(30):26729–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12048180/>
389. De Keizer PLJ, Packer LM, Szybowska AA, Riedl-Polderman PE, Van Den Broek NJF, De Bruin A, et al. Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2023 Nov 8];70(21):8526–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20959475/>
390. Zhuo DX, Niu XH, Chen YC, Xin DQ, Guo YL, Mao Z Bin. Vitamin D3 up-regulated protein 1(VDUP1) is regulated by FOXO3A and miR-17-5p at the transcriptional and post-transcriptional levels, respectively, in senescent fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Oct 8 [cited 2023 Nov 8];285(41):31491–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20656682/>
391. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* [Internet]. 2004 Jan 14 [cited 2023 Nov 8];23(1):212–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14713953/>
392. Qi XF, Chen ZY, Xia JB, Zheng L, Zhao H, Pi LQ, et al. FoxO3a suppresses the senescence of cardiac microvascular endothelial cells by regulating the ROS-mediated cell cycle. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Nov 8];81:114–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25655933/>
393. Ni D, Ma X, Li HZ, Gao Y, Li XT, Zhang Y, et al. Downregulation of FOXO3a promotes tumor metastasis and is associated with metastasis-free survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2023 Nov 8];20(7):1779–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486593/>
394. Zhang L, Cai M, Gong Z, Zhang B, Li Y, Guan L, et al. Geminin facilitates FoxO3 deacetylation to promote breast cancer cell metastasis. *J Clin Invest* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Nov 8];127(6):2159–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28436938/>
395. Zhang X, Rielland M, Yalcin S, Ghaffari S. Regulation and function of FoxO transcription factors in normal and cancer stem cells: what have we learned? *Curr Drug Targets* [Internet]. 2011 Jun 20 [cited 2023 Nov 8];12(9):1267–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21443463/>
396. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, et al. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* [Internet]. 2010 Feb 4 [cited 2023 Nov 8];463(7281):676–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20130650/>
397. Storz P, Döppler H, Copland JA, Simpson KJ, Toker A. FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2023 Nov 8];29(18):4906–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19564415/>

398. Sunters A, Fernández De Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, et al. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Dec 12 [cited 2023 Nov 8];278(50):49795–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527951/>
399. Han CY, Cho K Bin, Choi HS, Han HK, Kang KW. Role of FoxO1 activation in MDR1 expression in adriamycin-resistant breast cancer cells. *Carcinogenesis* [Internet]. 2008 [cited 2024 May 1];29(9):1837–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18390843/>
400. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 Jan 18 [cited 2023 Nov 8];19(1):58–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215704/>
401. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, Iwanicki MP, Song L, Morales FC, et al. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Feb 14 [cited 2023 Nov 8];21(2):227–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22340595/>
402. Lin A, Piao HL, Zhuang L, Sarbassov DD, Ma L, Gan B. FoxO transcription factors promote AKT Ser473 phosphorylation and renal tumor growth in response to pharmacologic inhibition of the PI3K-AKT pathway. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Mar 15 [cited 2023 Nov 8];74(6):1682–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24448243/>
403. Charitou P, Rodriguez-Colman M, Gerrits J, van Triest M, Groot Koerkamp M, Hornsveld M, et al. FOXOs support the metabolic requirements of normal and tumor cells by promoting IDH1 expression. *EMBO Rep* [Internet]. 2015 Apr [cited 2023 Nov 8];16(4):456–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25648147/>
404. Shao D, Zhai P, Del Re DP, Sciarretta S, Yabuta N, Nojima H, et al. A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat Commun* [Internet]. 2014 Feb 14 [cited 2023 Nov 8];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24525530/>
405. Hornsveld M, Dansen TB, Derksen PW, Burgering BMT. Re-evaluating the role of FOXOs in cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Jun 6];50:90–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29175105/>
406. Schober P, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2025 Sep 29];126(5):1763–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29481436/>
407. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2026 Jan 2];25(28):4414–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17785706/>
408. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, et al. HER2 Heterogeneity Affects Trastuzumab Responses and Survival in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2025 Jun 3];142(6):755–66. Available from: <https://dx.doi.org/10.1309/AJCP1RL4GUVGK3YX>

409. Nicoletto RE, Ofner CM. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2022 Mar 1;89(3):285–311.
410. Arif M, Kitchen P, Conner MT, Hill EJ, Nagel D, Bill RM, et al. Downregulation of aquaporin 3 inhibits cellular proliferation, migration and invasion in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2025 Jun 3];16(1):713. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6019904/>
411. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EBE, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* [Internet]. 2006 Jun 2 [cited 2023 Nov 7];125(5):987–1001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16751106/>
412. Zhu Z, Jiao L, Li T, Wang H, Wei W, Qian H. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2025 Sep 29];16(2):2661–7. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8955/abstract>
413. Xia X, Wang Q, Ye T, Liu Y, Liu D, Song S, et al. NRF2/ABCB1-mediated efflux and PARP1-mediated dampening of DNA damage contribute to doxorubicin resistance in chronic hypoxic HepG2 cells. *Fundam Clin Pharmacol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2025 Sep 29];34(1):41–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31420991/>
414. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Sep 29];82(3–4):142–52. Available from: <https://dx.doi.org/10.1159/000430499>
415. Roscigno G, Jacobs S, Toledo B, Borea R, Russo G, Pepe F, et al. The potential application of stroma modulation in targeting tumor cells: Focus on pancreatic cancer and breast cancer models. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2025 Aug 1 [cited 2025 Oct 1];113:151–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X25000604?via%3DiHub>
416. Micke P, Strell C, Mattsson J, Martín-Bernabé A, Brunnström H, Huvila J, et al. The prognostic impact of the tumour stroma fraction: A machine learning-based analysis in 16 human solid tumour types. *EBioMedicine* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Oct 1];65. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S2352396421000621>
417. Micke P, Strell C, Mattsson J, Martín-Bernabé A, Brunnström H, Huvila J, et al. The prognostic impact of the tumour stroma fraction: A machine learning-based analysis in 16 human solid tumour types. *EBioMedicine* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Oct 3];65:103269. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S2352396421000621>

10. ŽIVOTOPIS DOKTORANDA

Rođen sam 1983. godine u Koprivnici i nakon završetka IV. jezične gimnazije u Zagrebu upisao sam Medicinski fakultet u Rijeci 2000. godine. Nakon završetka medicinskog fakulteta 2006. godine započeo sam pripravnički staž na Odjelu kirurgije Klinike za tumore gdje sam ubrzo stekao veliki afinitet prema kirurgiji, a postupno i prema onkologiji, posebno genetskoj osnovi nastanka tumora. 2008. godine započeo sam specijalizaciju iz opće kirurgije. Tijekom specijalizacije pohađao sam brojna područja kirurgije s posebnim fokusom na kirurško onkološku problematiku, dominantno kirurgiju dojke, kolorektalnog karcinoma, melanoma i sarkoma mekih tkiva.

U srpnju 2013. godine završio sam specijalizaciju iz Opće kirurgije te od tada radim na Zavodu za onkoplastiku i rekonstruktivnu kirurgiju Klinike za tumore. Od 2010. do 2017. radio sam i na Centralnom hitnom prijemu KBC-a Sestre milosrdnice, baveći se najviše hitnim abdominalnim i vaskularnim pacijentima. U rujnu 2016. položio sam Europski ispit iz kirurške onkologije u Bruxellesu. U siječnju 2018. položio sam subspecijalistički ispit iz plastične, rekonstruktivne i estetske kirurgije. U ožujku 2018. završio sam obuku iz mikrokirurgije u Pius-Branzeu centru u Temišvaru u Rumunjskoj. Iste godine pohađao sam dvomjesečnu edukaciju iz mikrokirurgije na Kliničkom odsjeku za plastičnu, rekonstruktivnu, estetsku kirurgiju i opeklone u Sveučilišnom kliničkom centru u Ljubljani. 2021. godine položio sam tečaj iz ultrazvuka dojke. 2023. godine pohađao sam napredni mikrokirurški tečaj u Groningenu. Na Klinici za tumore stalni sam član multidisciplinarnog tima za bolesti dojke, gdje zajednički s onkolozima, radiolozima i patolozima odlučujemo o optimalnom liječenju pacijentica s rakom dojke. Osim uobičajene kirurško-onkološke problematike, svakodnevno izvodimo rekonstrukcije dojki implantatima i mišićno kožnim režnjevima. Rado prenosim stečeno znanje i iskustvo kirurškim specijalizantima i studentima. Vrlo sam zainteresiran za daljnje usavršavanje u mikrokirurškoj rekonstruktivnoj kirurgiji.

11. POPIS PUBLIKACIJA DOKTORANDA

Udžbenici:

1. Kirurška onkologija. Turić M, Stanec M, Vrdoljak D.V. (ur.) Zagreb: Medicinska naklada, 2011
2. Breast cancer: multidisciplinary treatment. Beketić-Orešković, Lidija ; Šantek, Fedor (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2019. str. 57-79 (poglavlje Surgical management of breast carcinoma)
3. Karcinom dojke: multidisciplinarno liječenje. Beketić-Orešković, Lidija ; Šantek, Fedor (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2018. str. 56-78 (poglavlje Kirurško liječenje karcinoma dojke)
4. Kirurgija. Vrdoljak D.V., Rotim K., Biočina B. (ur.). Zdravstveno veleučilište, Zagreb, 2016. (poglavlja: Bolesti dojke, Hernije)

Radovi:

1. Vrdoljak, D.V.; Šitić, S.; Stanec, M.; Orešić, T.; Perić Balja, M.; Ramljak, V.; Guteša, I.; Ramić, S.; Knežević, F. Primary Ewing's Sarcoma of the Kidney: A Case Report, Collegium antropologicum, 2012, Vol. 36, No. 2.
2. Milković Periša, M.; Šitić, S.; Veliki Dalić, I.; Luetić Cavor, Lj; Guteša, I; Seiwert, S. Tumoral calcinosis presenting as a soft tissue mass in a 16 year old patient. Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology, 2017.
3. Guteša, I.; Potesak, I.; Pavičić, I.; Tometić G.; Kirac, I.; Penavić, I.; Milas, I.; Stanec, M. Sentinel lymph node biopsy in breast conservative surgery – preliminary results Libri Oncologici: Croatian Journal of Oncology, 2016., Vol. 44, No. 2-3.
4. Milas, I.; Zore, Z.; Roth, A.; Orešić, T.; Eljuga, D.; Gulani, M.; Guteša, I.; Stanec, M. Breast reconstruction Libri Oncologici: Croatian Journal of Oncology, 2014. Vol. 42, No. 1-3.
5. Glavan, E.; Guteša, I.; Kirac, I.; Vrdoljak, B.; Doko, M. Surgical treatment of colorectal carcinoma Libri Oncologici: Croatian Journal of Oncology, 2013. Vol. 41,

No. 1-3.

6. Guteša, I; Orešić, T; Eljuga, D; Milas, I; Stanec, M; Vrdoljak, DV. Minimally invasive treatment of breast cancer. Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology, 2014. Vol 42, 1-3; 23-28

Aktivna sudjelovanja na kongresima:

1. Guteša I, Grladinović F, Milas I, Tometić G, Stanec M

Zbrinjavanje DCIS. 6. kongres kirurške onkologije, Vodice, 28.-30. travnja 2023

2. Guteša I

Optimal choice of breast reconstruction in adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer. 8. HRVATSKI KIRURŠKI KONGRES s međunarodnim sudjelovanjem. 10.-12.11.2023

3. Milas, I; Guteša, I; Grgat K, Alfier, G; Stanec, M

Optimalno vrijeme rekonstrukcije nakon radikalnog kirurškog zahvata kada planiramo provesti radioterapiju XXX. znanstveni sastanak Bolesti dojke, HAZU, 2021.

4. Radić, P.; Murgić, J.; Tomljenović, H.; Jazvić, M.; Marić-Brozić, J.; Kirac, I.; Guteša, I.; Soldić, Ž.; Fröbe, A.; Impact of type of primary surgery on quality of life, anxiety, depression and body image in breast cancer patients receiving adjuvant treatment: a cross-sectional study. Hrvatski onkološki kongres, Poreč, 2021.

5. Stanec, M.; Zore, Z.; Orešić, T.; Guteša, I.; Gulan, M. What to expect from new technologies in breast cancer surgery? 11. Hrvatski kongres plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije, Zadar, 2018.

6. Milas, I.; Guteša, I.; Gulan, M.; Eljuga, D.; Orešić, T.; Roth, A.; Zore, Z.; Stanec, M. Kirurški zahvati na dojci i aksili u neoadjuvantnom pristupu liječenju raka dojke. XXVII. znanstveni sastanak Bolesti dojke. HAZU, 2017.

7. Milas, I.; Stanec, M.; Orešić, T.; Guteša, I.; Roth, A.; Zore, Z.; Gulan, M.; Eljuga, D. Limfadenektomija limfnog čvora čuvara kod raka dojke - pogled kirurga. XXVI. znanstveni sastanak Bolesti dojke. HAZU, 2016.

8. Stanec, M.; Vrdoljak, D.V.; Lesar, M.; Milas, I.; Orešić, T.; Guteša, I.; Roth, A.; Zore, Z.; Gulan, M.; Banović, M.; Eljuga, D. Kirurško liječenje raka dojke - od Halsteda do sentinel-limfadenektomije XXV. Znanstveni sastanak Bolesti dojke. HAZU, 2015.

9. Stanec. M.; Vrdoljak, D.V.; Lesar, M.; Guteša. I.; Zore, Z.; Eljuga, D.; Što očekujemo od novih tehnologija u kirurgiji raka dojke? XXIV. znanstveni sastanak Bolesti dojke, HAZU, 2014.

10. Stanec, M., Vrdoljak, D.V.; Mužina, D.; Lesar, M.; Milas, I.; Orešić, T.; Knežević, F.; Guteša, I.; Penavić, I.; Roth, A.; Zore, Z.; Krleža-Supić, D.; Banović, M. Pogreške i komplikacije kirurškog liječenja raka dojke. XXI. znanstveni sastanak Bolesti dojke, HAZU, 2011.