

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara D. Zakić

**STRUKTURNO I REDOKS
REPROGRAMIRANJE TUMORSKOG I
PRIDRUŽENOG MASNOG TKIVA MIŠEVA SA
FUNKCIJSKI UTIŠANIM NRF2 U
ORTOTOPSKOM MODELU KANCERA DOJKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tamara D. Zakić

**STRUCTURAL AND REDOX
REPROGRAMMING OF TUMOUR AND
ASSOCIATED ADIPOSE TISSUE IN MICE
WITH FUNCTIONALLY INACTIVE NRF2 IN AN
ORTHOTOPIC BREAST CANCER MODEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

MENTOR:

dr Aleksandra Janković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Bato Korać, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

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

dr Aleksandra Čvoro, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Sanja Mijatović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Vanja Pekovic-Vaughan, senior lecturer, Institute of Life Course and Medical Sciences, Department of Musculoskeletal & Ageing Science, University of Liverpool, Liverpool, UK

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Univerzitetu u Beogradu-Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”-Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu u okviru projekta Fonda za nauku Republike Srbije #7750238: „Exploring New Avenues in Breast Cancer Research: Redox and Metabolic Reprogramming of Cancer and Associated Adipose Tissue - REFRAME”, pod rukovodstvom dr Bata Koraća.

Ovom prilikom želim posebno da se zahvalim:

Dr Aleksandri Janković, mentoru, na dugogodišnjem strpljenju i podršci, kao i na mnogobrojnim razgovorima i konstruktivnim diskusijama o kompleksnim tematikama koje su značajno doprinele izradi ove doktorske disertacije.

Dr Bati Koraću, na beskrajnom poverenju i nesebičnoj podršci, brojnim pruženim savetima i prilikama za usavršavanje.

Prof. Aleksandri Korać, na dragocenim sugestijama, nesebičnom deljenju znanja i pomoći u svim segmentima izrade doktorske disertacije.

Dr Vanji Pekovic-Vaughan, na izdvojenom vremenu, kontinuiranoj i srdačnoj podršci i pomoći.

Dr Sanji Mijatović, na pomoći i korisnim sugestijama prilikom izrade doktorske disertacije.

Dr Anđeliki Kalezić, na svemu što me je naučila.

Marti, na bezbroj lepih trenutaka tokom zajedničkog rada.

Jeleni i Maji, na prijateljskoj atmosferi u laboratoriji i entuzijazmu za rad.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem:

Mami i tati, na bezuslovnoj podršci.

Teodori, Tamari i Milijani, bez kojih bi ovaj ceo put bio nezamisliv.

Strukturno i redoks reprogramiranje tumorskog i pridruženog masnog tkiva miševa sa funkcijski utišanim NRF2 u ortotopskom modelu kancera dojke

Sažetak

Kancer dojke je kompleksno metaboličko oboljenje praćeno izraženim redoks i metaboličkim reprogramiranjem tumora. Kao ključna komponenta tumorske mikrosredine, masno tkivo ostvaruje morfo-funkcionalnu interakciju sa tumorom i definiše tumorogenu nišu. Mehanizmi u osnovi reprogramiranja tumora, interakcije tumora i masnog tkiva u tumorskoj mikrosredini, kao i uloga redoks-senzitivnog nukleusnog faktora-eritroid faktor 2-zavisnog faktora 2 (NRF2) tokom rasta tumora nedovoljno su razjašnjeni. Cilj doktorske disertacije je da se ispituju strukturni, redoks i metabolički profili tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva *in vivo* tokom rasta tumora dojke (tumori od 10, 50 i 200 mg). Poređenjem miševa divljeg soja (*eng.* wild-type, WT) i miševa bez funkcijski aktivnog NRF2, ispitani su NRF2-zavisni mehanizmi redoks-metaboličke interakcije tumora i masnog tkiva na lokalnom i sistemskom nivou. Rezultati su pokazali dinamičko, tkivno-specifično redoks i metaboličko reprogramiranje sa rastom tumora. U WT miševima, tumor uspostavlja glikolitički fenotip i povišen redoks prag, praćen promenama u mitohondrijalnoj dinamici i funkciji. Istovremeno, kancer-asocirano masno tkivo odlikuje sinhronizovana diferencijalna regulacija ključnih metaboličkih i antioksidativnih enzima. Nasuprot tome, odsustvo funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini dovodi do izmenjene regulacije dinamike mitohondrija, antioksidativne odbrane, NADPH-produkujućih i metaboličkih puteva u tumoru, pre svega u inicijalnim fazama rasta (10 mg), koje se postepeno prevazilaze sa daljim rastom tumora. Stoga, rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju NRF2-zavisnu sinhronizaciju redoks i metaboličkog reprogramiranja tumora dojke i njegove mikrosredine, specifično kancer-asociranog masnog tkiva, na taj način formirajući jedinstveni pseudo-organ, u kome tumorska mikrosredina aktivno učestvuje u uspostavljanju fenotipa tumora dojke.

Ključne reči: kancer dojke, tumorska mikrosredina, masno tkivo, NRF2, antioksidativna odbrana, redoks reprogramiranje, metaboličko reprogramiranje, remodeliranje mitohondrija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ćelijska i molekularna onkologija

Structural and redox reprogramming of tumour and associated adipose tissue in mice with functionally inactive NRF2 in an orthotopic breast cancer model

Abstract

Breast cancer is a complex metabolic disease characterised by pronounced redox and metabolic tumour reprogramming. As a key component of the tumour microenvironment (TME), adipose tissue establishes morpho-functional interaction with the tumour and defines a tumour-promoting niche. The mechanisms underlying tumour reprogramming, the interactions between tumour and adipose tissue in TME, and the role of redox-sensitive transcription factor NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) during tumour growth, remain unclear. The major aim of this doctoral dissertation is to examine structural, redox and metabolic profiles of tumour, cancer-associated and contralateral inguinal white adipose tissue *in vivo* during breast tumour growth (10, 50, and 200 mg tumours). By comparing wild-type mice (WT) and mice lacking functionally active NRF2, NRF2-dependent mechanisms of the tumour and adipose tissue redox-metabolic interactions were investigated at both local and systemic levels. These novel results demonstrate dynamic, tissue-specific redox and metabolic reprogramming during tumour growth. In WT mice, tumour establishes a glycolytic phenotype and high redox threshold, with changes in mitochondrial dynamics and function. In parallel, cancer-associated adipose tissue shows synchronised and differential regulation of key metabolic and antioxidant enzymes. In contrast, *Nrf2*^{-/-} TME leads to altered regulation of the tumour mitochondrial dynamics, antioxidant defence, NADPH-generating and metabolic pathways, particularly in the initial phases (10 mg), which become gradually compensated with further tumour growth. In conclusion, this doctoral dissertation reveals for the first time the NRF2-dependent synchronisation of redox and metabolic reprogramming between breast tumour and TME, particularly cancer-associated adipose tissue, thus forming a unique pseudo-organ, in which TME actively contributes to the establishment of breast tumour phenotype.

Key words: breast cancer, tumour microenvironment, adipose tissue, NRF2, antioxidant defence, redox reprogramming, metabolic reprogramming, mitochondrial remodelling.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Cellular and molecular oncology

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Kancer dojke | 1 |
| 1.2. Metaboličko reprogramiranje u kanceru | 1 |
| 1.3. Mitohondrije: dinamično jezgro redoks-metaboličke homeostaze | 5 |
| 1.4. Redoks homeostaza i reprogramiranje u kanceru | 5 |
| 1.5. Regulacija redoks-metaboličkog reprogramiranja | 9 |
| 1.6. NRF2: centralni regulator redoks-metaboličke homeostaze | 10 |
| 1.7. Tkivo dojke i tumorska mikrosredina | 13 |
| 1.8. Redoks-metabolička kooperacija između kancerskih ćelija i kancer-asociranih adipocita u kanceru dojke | 13 |
| 2. CILJEVI | 16 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 17 |
| 3.1. Eksperimentalni dizajn..... | 17 |
| 3.1.1. <i>Ortotopski model kancera dojke kod WT i Nrf2KO miševa</i> | 17 |
| 3.1.2. <i>Ćelijska kokultura MCF-7 ćelija kancera dojke i primarnih adipocita</i> | 18 |
| 3.2. Priprema tkiva za analize | 18 |
| 3.2.1. <i>Svetlosna i elektronska mikroskopija</i> | 18 |
| 3.2.2. <i>Enzimski aktivnost i Western blot</i> | 19 |
| 3.2.3. <i>Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR)</i> | 19 |
| 3.3. Određivanje koncentracije proteina | 19 |
| 3.4. Određivanje koncentracije RNK | 19 |
| 3.5. SDS-PAGE i Western blot..... | 20 |
| 3.5.1. <i>Elektroforeza proteina</i> | 20 |
| 3.5.2. <i>Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot)</i> | 20 |
| 3.5.3. <i>Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom</i> | 23 |
| 3.6. Analiza nivoa 4-HNE ELISA metodom | 23 |
| 3.7. Analiza aktivnosti enzima antioksidativne odbrane..... | 23 |
| 3.7.1. <i>Katalaza</i> | 23 |
| 3.7.2. <i>Glutation peroksidaza</i> | 23 |
| 3.7.3. <i>Glutation S-transferaza</i> | 23 |
| 3.7.4. <i>Glutation reduktaza</i> | 24 |
| 3.7.5. <i>Tioredoxin reduktaza</i> | 24 |
| 3.7.6. <i>Superoksid dismutaza</i> | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8. Analiza nivoa glutationa | 24 |
| 3.9. RT-PCR..... | 24 |
| 3.10. Analiza lokalizacije proteina mikroskopskim metodama | 25 |
| 3.10.1. <i>Imunohistohemijska lokalizacija proteina</i> | 25 |
| 3.10.2. <i>Imunofluorescentna lokalizacija proteina</i> | 26 |
| 3.10.3. <i>Elektronska mikroskopija</i> | 27 |
| 3.11. Statistička obrada rezultata | 27 |
| 4. REZULTATI | 28 |
| 4.1. Promene telesne mase, mase tumora i relativne mase kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva kod WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 28 |
| 4.2. Opšte morfološke karakteristike tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 30 |
| 4.2.1. <i>Morfološka analiza tumorskog tkiva</i> | 30 |
| 4.2.2. <i>Morfološka analiza kancer-asociranog masnog tkiva</i> | 31 |
| 4.2.3. <i>Morfološka analiza kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva</i> | 32 |
| 4.3. Ortotopski model kancera dojke kod WT i <i>Nrf2</i> KO miševa | 33 |
| 4.3.1. <i>Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije proliferativnog ćelijskog nukleusnog antigena (PCNA) u tumorskom tkivu dojke</i> | 33 |
| 4.3.2. <i>Genska ekspresija transkripcionog faktora Nrf2 u kancer-asociranom masnom tkivu</i> ... | 34 |
| 4.3.3. <i>Proteinski nivo NQO1 u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu</i> | 34 |
| 4.4. Redoks profili tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 36 |
| 4.4.1. <i>Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije NRF2 u tumorskom tkivu dojke</i> | 36 |
| 4.4.2. <i>Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije CuZnSOD u tumorskom tkivu dojke</i> | 37 |
| 4.4.3. <i>Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije MnSOD u tumorskom tkivu dojke</i> | 38 |
| 4.4.4. <i>GSH-zavisni antioksidativni sistem u tumorskom tkivu dojke</i> | 39 |
| 4.4.5. <i>TRX-zavisni antioksidativni sistem u tumorskom tkivu dojke</i> | 42 |
| 4.4.6. <i>Proteinski nivo, aktivnost i lokalizacija katalaze u tumorskom tkivu dojke</i> | 43 |
| 4.4.7. <i>Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u kancer-asociranom masnom tkivu</i> | 44 |
| 4.4.8. <i>Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u kancer-asociranom masnom tkivu</i> .. | 45 |
| 4.4.9. <i>Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu</i> | 46 |
| 4.4.10. <i>Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu</i> | 47 |
| 4.4.11. <i>Proteinski nivo NOX2 u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| 4.4.12. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u tumorskom tkivu dojke | 48 |
| 4.4.13. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u kancer-asociranom masnom tkivu | 49 |
| 4.4.14. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu..... | 50 |
| 4.5. Mitohondrije u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 51 |
| 4.5.1. Ultrastruktura mitohondrija u tumorskom tkivu dojke | 51 |
| 4.5.2. Proteinski nivoi markera mitohondrijalne dinamike u tumorskom tkivu dojke | 52 |
| 4.5.3. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>DRP1</i> i <i>VDAC1</i> u tumorskom tkivu dojke..... | 53 |
| 4.5.4. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>MFN1</i> i <i>VDAC1</i> u tumorskom tkivu dojke..... | 54 |
| 4.5.5. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>DRP1</i> i <i>OPA1</i> u tumorskom tkivu dojke..... | 55 |
| 4.5.6. Proteinski nivoi subjedinica kompleksa elektron transportnog lanca u tumorskom tkivu dojke..... | 56 |
| 4.5.7. Proteinska ekspresija i lokalizacija ATP sintaze u tumorskom tkivu dojke..... | 57 |
| 4.5.8. Analiza aktivnosti mitohondrija i nivoa ROS u kancerskim ćelijama dojke i adipocitima u kokulturi | 58 |
| 4.6. Metabolizam glukoze i laktata u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 59 |
| 4.6.1. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>PFKFB3</i> i insulina u tumorskom tkivu dojke | 59 |
| 4.6.2. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>GLUT1</i> i <i>GLUT4</i> u tumorskom tkivu dojke..... | 61 |
| 4.6.3. Proteinski nivoi enzima uključenih u metabolizam laktata u tumorskom tkivu dojke | 62 |
| 4.6.4. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija <i>MCT1/MCT4</i> i <i>CAIX</i> u tumorskom tkivu dojke | 63 |
| 4.6.5. Imunohistohemijska detekcija <i>MCT1</i> , <i>MCT4</i> i <i>CAIX</i> u tumorskom tkivu dojke | 64 |
| 4.6.6. Proteinski nivoi enzima metabolizma glukoze i laktata u kancer-asociranom masnom tkivu..... | 67 |
| 4.6.7. Proteinski nivoi <i>pAMPKa</i> i <i>HIF-1a</i> u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu .. | 68 |
| 4.7. Proteinski nivoi enzima biosinteze masnih kiselina u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke..... | 69 |
| 4.8. Genska ekspresija markera mrkih i bež adipocita u kancer-asociranom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 69 |
| 4.9. Proteinski nivoi <i>rNRF1</i> i <i>NRF1</i> u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke..... | 70 |
| 4.10. Analiza molekularnih markera ekstracelularnih vezikula u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 4.10.1. Proteinski nivoi markera ekstracelularnih vezikula | 72 |
| 4.10.2. Proteinski nivoi kaveolina 1 i koneksina 43..... | 72 |
| 5. DISKUSIJA | 74 |
| 5.1. Uticaj prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u TME na strukturne karakteristike tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva tokom rasta tumora dojke | 74 |
| 5.2. Redoks homeostaza u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke.... | 76 |
| 5.3. Reduktivni kapacitet i NADPH-zavisne komponentne antioksidativne odbrane u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke..... | 77 |
| 5.4. Antioksidativni enzimi uključeni u eliminaciju peroksida u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 79 |
| 5.5. Redoks homeostaza u kancer-asociranom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 80 |
| 5.6. Redoks homeostaza u kontralateralnom ingvinalnom belom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 81 |
| 5.7. Mitohondrijalna homeostaza u tumorskom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke..... | 82 |
| 5.8. Metaboličko reprogramiranje tumorskog i kancer-asociranog masnog tkiva WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 84 |
| 5.9. Transkripciona regulacija redoks-metaboličke homeostaze u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i <i>Nrf2</i> KO miševa tokom rasta tumora dojke | 87 |
| 5.10. Tragom ekstracelularnih vezikula u kanceru dojke | 87 |
| 6. ZAKLJUČCI | 88 |
| 7. LITERATURA | 90 |

1. UVOD

1.1. Kancer dojke

Kancer je kompleksno sistemsko oboljenje koje se odlikuje specifičnim molekularnim obeležjima (Bray *et al.*, 2018; Swanton *et al.*, 2024). U poslednjih nekoliko godina, sve više se ističe da kancer nije samo genetičko, već i metaboličko oboljenje (Coller, 2014; Seyfried *et al.*, 2014). Kancerske ćelije imaju značajno povećane energetske zahteve usled visoke stope proliferacije, zbog čega u velikoj meri menjaju svoj metabolički profil u odnosu na nemaligne ćelije (Faubert *et al.*, 2020). Metaboličko reprogramiranje u ćelijama kancera razlikuje se u zavisnosti od tipa kancera, stope mutacija, inter- i intraćelijske varijabilnosti, faze progresije kancera i tkiva u koje metastaziraju (Nabi & Le, 2021). Stoga se može reći da je jedna od glavnih odlika malignih tumora izražena metabolička plastičnost i adaptabilnost, odnosno sposobnost da u različitim uslovima sredine primenjuje različite metaboličke strategije (Jose *et al.*, 2011; Pavlova & Thompson, 2016).

Metaboličko reprogramiranje neraskidivo je povezano sa promenama u redoks homeostazi, odnosno nivoima reaktivnih vrsta kiseonika (*eng.* Reactive oxygen species, ROS) i regulacijom komponenti antioksidativne odbrane (*eng.* Antioxidative defence, AD) (Galadari *et al.*, 2017). Štaviše, ovako udruženo redoks i metaboličko reprogramiranje kancerskih ćelija nije samo njihova unutrašnja karakteristika, već je značajno oblikovana tumorskom mikrosredinom (*eng.* Tumor microenvironment, TME) (Hanahan & Coussens, 2012). Sa druge strane, različiti tipovi ćelija koji sačinjavaju tumorsku mikrosredinu takođe podležu reprogramiranju u odgovoru na signale iz kancerskih ćelija, na taj način uspostavljajući protumorigenu nišu kroz dvosmernu komunikaciju sa kancerskim ćelijama (Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023; Rybinska *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024; Xing *et al.*, 2015). Zajedno, kancerske ćelije, izmenjene stromalne ćelije i vanćelijski matriks formiraju kompleksan pseudo-organ, koga karakterišu specifične morfološke i funkcijske odlike (Egeblad *et al.*, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

Kancer dojke predstavlja najčešći tip maligniteta kod žena širom sveta, sa visokom stopom incidence i mortaliteta (Bray *et al.*, 2018; Heer *et al.*, 2020), uključujući i Republiku Srbiju (Mihajlović *et al.*, 2013). Postoji nekoliko klasifikacija kancera dojke na osnovu različitih parametara, koji se razlikuju po molekularnim karakteristikama, dijagnostifikovanju, terapijskim pristupima, kao i ishodu bolesti. Na osnovu patohistoloških analiza, kancer dojke se može klasifikovati prema prisustvu, odnosno odsustvu hormonskih receptora kao estrogen-pozitivan/negativan (ER⁺/ER⁻), progesteron-pozitivan/negativan (PR⁺/PR⁻) i odnosu na pozitivan/negativan receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2⁺/HER2⁻). U zavisnosti od kombinacije pomenutih receptora, razlikujemo nekoliko podtipova kancera dojke, koji poseduju specifične molekularne i fenotipske karakteristike - luminalni tip A (ER⁺/PR⁺/HER2⁻), luminalni tip B (ER⁺/PR⁺/HER2⁺), HER2 pozitivan (ER⁻/PR⁻/HER2⁺) i trostruko negativan (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) (Tsang & Tse, 2020). Uprkos uspostavljanju molekularne klasifikacije kancera dojke, jasno je da genetička osnova kancera ne objašnjava u potpunosti njegove karakteristike. Sve veći značaj pridaje se mehanizmima koji su u osnovi redoks i metaboličkog reprogramiranja kancerskih ćelija dojke i uspostavljanja njihove dinamičke interakcije sa ćelijama iz tumorske mikrosredine.

1.2. Metaboličko reprogramiranje u kanceru

Maligna transformacija ćelija je složen proces koji obuhvata niz morfoloških i funkcijskih promena, definisanih kao obeležja kancera (Hanahan & Weinberg, 2000). Tokom poslednjih godina, ovaj koncept je proširen kako bi uključio fenotipsku plastičnost i izmenjen ćelijski metabolizam, što odražava bolje razumevanje adaptabilnosti tumora i njegovih interakcija sa tumorskom mikrosredinom (Hanahan & Weinberg, 2011). Metaboličko reprogramiranje kancerskih ćelija predstavlja njihov adaptivni odgovor na povećane energetske zahteve usled intenzivne proliferacije,

potrebe za povećanjem biomase i izmenjene međućelijske komunikacije (Boroughs & DeBerardinis, 2015; Vander Heiden *et al.*, 2009). Ovaj proces se odigrava kako pod uticajem unutrašnjih tako i pod uticajem različitih spoljašnjih faktora. Intrinzični faktori obuhvataju genetske i epigenetske promene, izmenjenu regulaciju signalnih puteva, kao i transkripcionu i posttranskripcionu regulaciju ekspresije gena koji dovode do promena u metaboličkim putevima ćelije (DeBerardinis & Chandel, 2016; Kaelin & McKnight, 2013).

U fiziološkim uslovima, neproliferišuće, diferencirane ćelije dominantno proizvode ATP putem oksidativne fosforilacije (*eng.* Oxidative phosphorylation, OXPHOS) u mitohondrijama, pri čemu se glukoza potpuno oksiduje do ugljen-dioksida, ostvarujući maksimalnu energetska efikasnost. U takvim ćelijama, katabolizam je usmeren ka optimalnom iskorišćavanju dostupnih nutrijenata i maksimalnoj efikasnosti produkcije ATP (DeBerardinis & Chandel, 2016). Nasuprot tome, Warburg je uočio da proliferišuće kancerske ćelije proizvode gotovo polovinu ukupne hemijske energije u vidu ATP konverzijom glukoze do laktata, čak i u prisustvu kiseonika, pri čemu se udeo mitohondrijalne OXPHOS u produkciji ATP nikad ne smanjuje ispod 50% ukupne proizvodnje energije (Warburg, 1956). Ovakav metabolički profil kancerskih ćelija, označen kao Warburgov efekat, im omogućava brzo generisanje ATP, ali i obezbeđuje metaboličke intermedijere neophodne za sintezu proteina, lipida i nukleinskih kiselina, čime se podržava njihov visoki proliferativni kapacitet. Na osnovu ovih zapažanja, Warburg je pretpostavio da je ovakav metabolički profil posledica mitohondrijalnog „defekta” koji onemogućava potpunu oksidaciju glukoze (Warburg, 1956; Weinhouse, 1956). Međutim, savremena istraživanja jasno pokazuju da disfunkcionalne mitohondrije nisu odlika malignog fenotipa, već naprotiv, da kancerske ćelije aktivno reprogramiraju mitohondrijalni metabolizam (Vyas *et al.*, 2016; Wallace, 2012). Štaviše, održavanje OXPHOS pokazalo se kao jedna od značajnih karakteristika malignog fenotipa, posebno bitna tokom invazije kancera i formiranja metastaza, ali i prilikom odgovora kancerskih ćelija na terapiju (Uslu *et al.*, 2024; Vasan *et al.*, 2020).

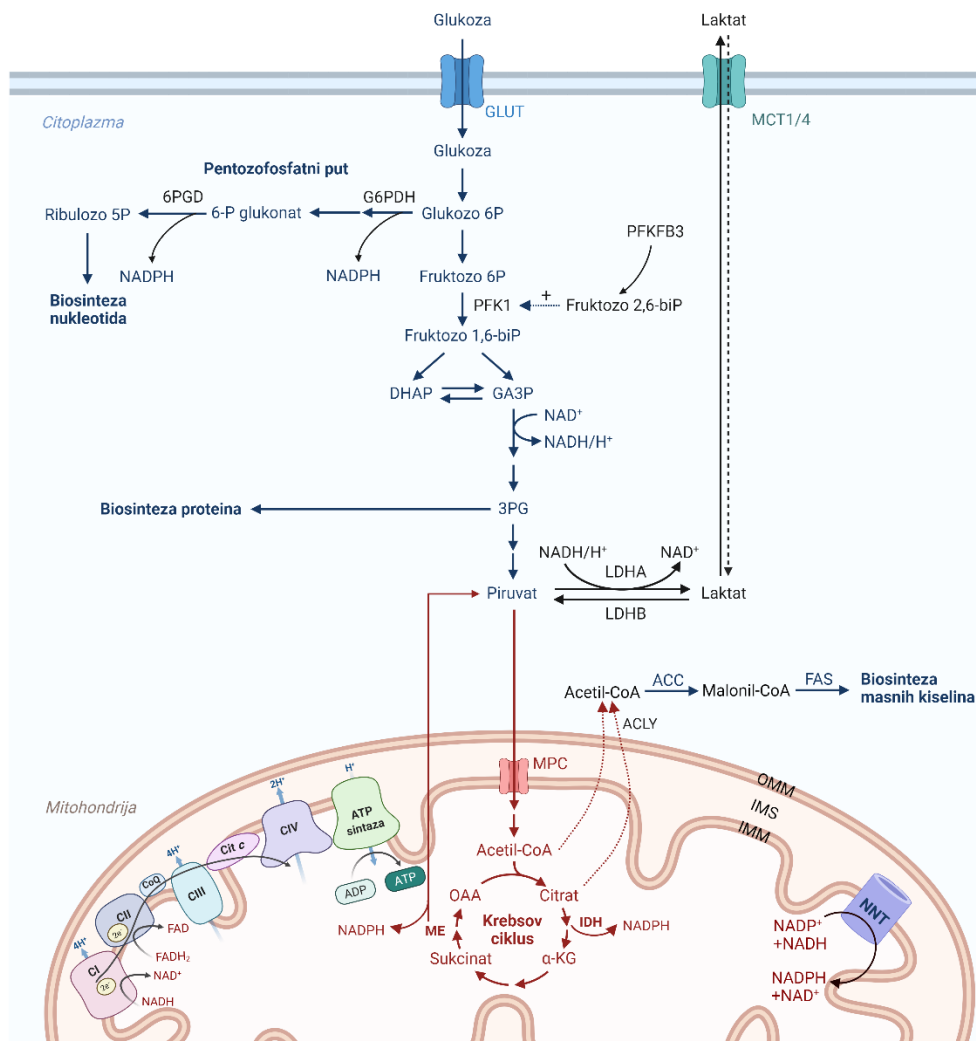
Piruvat nastao u procesu glikolize se u kancerskim ćelijama predominantno konvertuje u laktat posredstvom laktat dehidrogenaze A (*eng.* Lactate dehydrogenase A, LDHA), koja je visoko eksprimirana u mnogim tipovima kancera i povezana je sa njegovom progresijom (Huang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2010). Nasuprot tome, laktat dehidrogenaza B (*eng.* Lactate dehydrogenase B, LDHB) katalizuje reverzibilnu reakciju konverzije laktata u piruvat (Urbańska & Orzechowski, 2019). Laktat se zatim transportuje iz kancerskih ćelija putem monokarboksilatnih transportera (*eng.* Monocarboxylate transporter, MCT). MCT1 i MCT4 predstavljaju ključne izoforme MCT koje učestvuju u dvosmernom transportu monokarboksilata, kao što su laktat i piruvat, kroz ćelijsku membranu u zavisnosti od energetske potrebe ćelija (Curry *et al.*, 2013; Halestrap & Meredith, 2004; Hong *et al.*, 2016). Usled eksporta laktata, dolazi do acidifikacije tumorske mikrosredine, koja je povezana sa lošijim ishodom bolesti usled povećane razgradnje vanćelijskog matriksa, čime se povećava invazivnost kancerskih ćelija i imunosupresija (Estrella *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2007; McCarty & Whitaker, 2010; Parks *et al.*, 2013). Pored toga, laktat predstavlja i signalni molekul posredstvom kojeg kancerske ćelije ostvaruju komunikaciju sa različitim tipovima stromalnih ćelija u tumorskoj mikrosredini (Brooks, 2018; Kalezić *et al.*, 2020).

Pored glikolize, Krebsov ciklus predstavlja jedan od centralnih metaboličkih puteva koji istovremeno podržava energetske i biosintetske zahteve kancerskih ćelija (Vander Heiden *et al.*, 2009). U okviru Krebsovog ciklusa nastaju redukujući ekvivalenti, NADH i FADH₂, koji služe kao prenosioci elektrona na komplekse elektron transportnog lanca (*eng.* Electron transport chain, ETC) i za sintezu ATP u procesu oksidativne fosforilacije (Krebs, 1967). Istovremeno, intermedijeri Krebsovog ciklusa, poput citrata, α -ketoglutarata, sukcinata i oksaloacetata, predstavljaju prekursore za sintezu biomolekula. Citrat je ključni supstrat za sintezu masnih kiselina, α -ketoglutarat učestvuje u sintezi aminokiselina, dok sukcinat i fumarat mogu delovati i kao signalni molekuli (Elliott, 1941). Kancerske ćelije koriste različite izvore ugljenika koji podržavaju Krebsov ciklus. Pored glukoze, glutamin je jedan od glavnih supstrata u kancerskim ćelijama koji u procesu glutaminolize daje glutamat, a potom i α -ketoglutarat, koji ulazi u Krebsov ciklus (Scalise *et al.*, 2017). Takođe, tokom mitohondrijalne β -oksidacije dolazi do sukcesivnog skraćivanja lanaca masnih kiselina uz formiranje

acetil-koenzima A (*eng.* Acetyl-Coenzym A, acetil-CoA), koji ulazi u Krebsov ciklus i oksiduje se (Owen *et al.*, 2002). Istovremeno, u svakom ciklusu β -oksidacije nastaju i redukujući ekvivalenti NADH i FADH₂, koji prenose elektrone na respiratorni lanac mitohondrija (Eaton *et al.*, 1996). Ovakva sposobnost korišćenja različitih izvora ugljenika dodatno doprinosi metaboličkoj fleksibilnosti kancerskih ćelija.

Metabolizam lipida takođe je značajno afektovan u kancerskim ćelijama. *De novo* lipogeneza je proces u kome se atomi ugljenika poreklom od glukoze ili aminokiselina konvertuju do masnih kiselina (Yoo *et al.*, 2004). U uslovima metaboličkog stresa, kancerske ćelije konvertuju citrat putem ATP-citrat liaze (*eng.* ATP-citrate lyase, ACLY) do acetil-CoA, koji se acetil-CoA karboksilazom (*eng.* Acetyl-CoA carboxylase, ACC) konvertuje do malonil-CoA, koji je polazni molekul u biosintezi masnih kiselina katalizovane sintazom masnih kiselina (*eng.* Fatty acid synthase, FAS) (Mashima *et al.*, 2009). U kanceru dojke, FAS je označen kao ključni metabolički onkogen koji pozitivno korelira sa progresijom i rezistencijom kancera dojke na terapiju (Alò *et al.*, 2001; Corominas-Faja *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021). Sintetisane masne kiseline se mogu koristiti kao gradivni blokovi ćelijskih membrana tokom proliferacije kancerskih ćelija, izvor energije, ili mogu biti uključene u transdukciju signala (Schug *et al.*, 2015). Za sintezu masnih kiselina neophodni su acetil-CoA i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (*eng.* Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) kao redukujući ekvivalent, pri čemu je glavni izvor acetil-CoA u kancerskim ćelijama glukoza, dok pentozofosfatni put (*eng.* Pentose phosphate pathway, PPP) predstavlja dominantan izvor redukovanog NADPH (Belew *et al.*, 2019). PPP takođe ima ključnu ulogu u obezbeđivanju prekursora za biosintezu nukleotida, ribozo-5-fosfata, čime predstavlja značajnu poveznicu energetskeg metabolizma (Rashida & Laxman, 2021; Stincone *et al.*, 2015). Pregled ključnih metaboličkih puteva koji su reprogramirani u kancerskim ćelijama prikazan je na Slici 1.

Stoga, iako je Varburgov efekat fundamentalni metabolički koncept u kanceru, on predstavlja samo jedan od aspekata metaboličkog reprogramiranja kancerskih ćelija. Glavna odlika kancerskih ćelija jeste njihova metabolička plastičnost, odnosno sposobnost dinamičnog remodeliranja različitih aspekata metabolizma, između ostalog u zavisnosti od faze progresije tumora i promenljivih uslova tumorske mikrosredine (Ward & Thompson, 2012). Na ovaj način, kancerske ćelije se kontinuirano prilagođavaju različitim nivoima dostupnosti i gradijentima kiseonika, pH, nutrijenata i nusprodukata, što u velikoj meri utiče na razvijanje rezistencije na terapiju (Lyssiotis & Kimmelman, 2017). U uslovima povećane dostupnosti nutrijenata, kancerske ćelije favorizuju biosintetske puteve, dok se u uslovima deprivacije nutrijenata aktiviraju katabolički putevi koji doprinose očuvanju energetske homeostaze. Ovakva metabolička plastičnost kancerskih ćelija im omogućava održavanje ćelijske homeostaze, preživljavanje i adaptaciju na promenljive uslove sredine (Altea-Manzano *et al.*, 2020; Boroughs & DeBerardinis, 2015).



Slika 1. Shematski prikaz ključnih metaboličkih puteva uključениh u metaboličko reprogramiranje kancerskih ćelija. Kancerske ćelije odlikuje metabolički prelaz sa dominantno oksidativnog metabolizma na glikolitički fenotip praćen produkcijom laktata, poznat kao Varburgov efekat. Povećan unos glukoze i intenziviran glikolitički fluks omogućava efikasnu produkciju energije, ali i obezbeđivanje metaboličkih intermedijera za biosintetskih procese i proliferaciju kancerskih ćelija. Intermedijeri glikolize predstavljaju mogu se usmeriti ka sintezi različitih biomolekula, dok pentozofosfatni put predstavlja ključni izvor za biosintezu nukleotida i redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). Pored glukoze, kancerske ćelije koriste i alternativne izvore energije, kao što su masne kiseline, aminokiseline i glutamin, čiji intermedijeri ulaze u Krebsov ciklus i doprinose anaplerotskim reakcijama. Ipak, mitohondrijalna oksidativna fosforilacija ostaje funkcijski aktivna i njen udeo u ukupnoj proizvodnji energije nikada ne pada ispod 50%. MCT1/4, monokarboksilatni transporter 1/4; LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; G6PDH, glukozu 6-fosfat dehidrogenaza; IDH, izocitrat dehidrogenaza; ME, malični enzim; ACC, acetil-CoA karboksilaza; FAS, sintaza masnih kiselina; ATP, adenzin trifosfat; GLUT, glukozni transporter; PFKFB3, 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bisfosfataza 3; PFK1, fosfofruktokinaza 1; DHAP, dihidroksiaceton-fosfat; GA3P, gliceraldehid 3-fosfat; 3PG, 3-fosfoglicerat; MPC, mitohondrijalni nosač piruvata; ACLY, ATP-citrat liaza; α KG, alfa ketoglutarat; OAA, oksaloacetat; 6PGD, 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; NNT, nikotinamid nukleotid transhidrogenaza; OMM, spoljašnja membrana mitohondrija; IMM, unutrašnja membrana mitohondrija; IMS, intermembranski prostor mitohondrija. *Kreirano u BioRenderu.*

1.3. Mitohondrije: dinamično jezgro redoks-metaboličke homeostaze

Mitohondrije su visokodinamične organele koje predstavljaju centar metaboličke aktivnosti u ćeliji, koja je usko povezana sa njihovom (ultra)strukturom, ćelijskom lokalizacijom i biogenezom (Nunnari & Suomalainen, 2012). Tipično, oksidativni metabolizam asociran je sa izduženim mitohondrijama i mitohondrijalnom fuzijom, dok je glikolitički fenotip asociran sa okruglim, sitnim mitohondrijama i mitohondrijalnom fisijom (Rossignol *et al.*, 2004). Iako je glikolitički fenotip jedna od dominantnih karakteristika kancerskih ćelija, mitohondrijalna oksidativna fosforilacija ostaje funkcijski očuvana (Vaupel & Multhoff, 2021). Kancerske ćelije odlikuje izražena metabolička fleksibilnost, koja im omogućava da u zavisnosti od faze progresije tumora i uslova tumorske mikrosredine mogu da koriste i glikolizu i OXPHOS (Jose *et al.*, 2011; Shiratori *et al.*, 2019).

Ravnoteža između mitohondrijalne fuzije i fisije, dva povezana, ali vrlo precizno regulisana procesa, koja odgovaraju na energetske zahteve ćelije, ćelijski ciklus i različita (pato)fiziološka stanja, određuje dinamiku mitohondrija (Adebayo *et al.*, 2021; Tilokani *et al.*, 2018). Mitohondrijalna fuzija je posredovana dinamin-zavisnim GTP-azama mitofuzinom 1 i 2 (*eng.* Mitofusin 1/2, MFN1/2), lokalizovanim na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, i OPA1 (*eng.* Optic atrophy protein 1), lokalizovan na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani (Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Santel & Fuller, 2001). Druga dinamin-zavisna GTP-aza DRP1 (*eng.* Dynamin-related protein 1) reguliše mitohondrijalnu fisiju kroz interakciju sa specifičnim receptorima na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, kao što su Fis1 (*eng.* Mitochondrial fission 1 protein), MiD49 (*eng.* Mitochondrial dynamics protein of 49 kDa), MiD51 (*eng.* Mitochondrial dynamics protein of 51 kDa) i Mff (*eng.* Mitochondrial fission factor) (Losón *et al.*, 2013; Otera *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2011; Smirnova *et al.*, 2001). Izmenjena ravnoteža odnosa mitohondrijalne fuzije i fisije asocirana je sa progresijom tumora, rezistencijom na apoptozu i metastatskim potencijalom (Boland *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2020). Povećanje ekspresije DRP1 dovodi do fragmentacije mitohondrija, podržavajući glikolitički fenotip ćelije i time omogućavajući efikasnije korišćenje kiseonika i održavanje optimalnih nivoa ROS (Kim *et al.*, 2011). Sa druge strane, fuzija mitohondrija i povećanje ekspresije mitofuzina podržavaju oksidativni metabolizam kroz povećanje broja i gustine kompleksa ETC (Cogliati *et al.*, 2013; Lapuente-Brun *et al.*, 2013). Stoga, optimalna funkcija ETC zavisi od ravnoteže između mitohondrijalne fuzije i fisije i specifične aktivacije dinamin-zavisnih proteina. Metabolički *switch* između glikolize i OXPHOS može odražavati promene u dinamici mitohondrija tokom progresije tumora i obrnuto, regulisana dinamika mitohondrija doprinosi održavanju metaboličkih adaptacija tumora tokom različitih faza njegove progresije.

Mitohondrije ne predstavljaju samo izvor ATP i prekursora za biosintetske puteve, već aktivno učestvuju u održavanju metaboličke fleksibilnosti, čime podržavaju proliferaciju, preživljavanje i metastatski potencijal kancerskih ćelija (Ahn & Metallo, 2015; Vaupel & Multhoff, 2021). Pored svoje uloge u energetskom metabolizmu, mitohondrije predstavljaju i glavni izvor ROS u ćelijama (Murphy, 2009). Ovakva dualna uloga mitohondrija ih definiše kao ključni integracioni centar – dinamičko jezgro koji povezuje metaboličko i redoks reprogramiranje kancerskih ćelija (Choudhury, 2021).

1.4. Redoks homeostaza i reprogramiranje u kanceru

Neraskidivo povezano metaboličko i redoks reprogramiranje u kancerskim ćelijama jedno je od ključnih obeležja maligne transformacije (Serrano & Medina, 2025). Metabolički i energetski zahtevi ćelija odražavaju se u produkciji ROS, pre svega superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikala (OH^{\cdot}) i vodonik peroksida (H_2O_2). Redoks homeostaza predstavlja precizno regulisanu dinamičnu ravnotežu između produkcije i uklanjanja ROS, čime se obezbeđuju optimalne, fiziološke koncentracije ROS (Halliwell & Gutteridge, 2015). Glavni endogeni izvori ROS obuhvataju neenzimsku produkciju na mitohondrijalnom ETC usled nepotpune redukcije molekuskog kiseonika (Muller *et al.*, 2004), kao i enzimsku produkciju od strane različitih oksidaza, kao što su NADPH

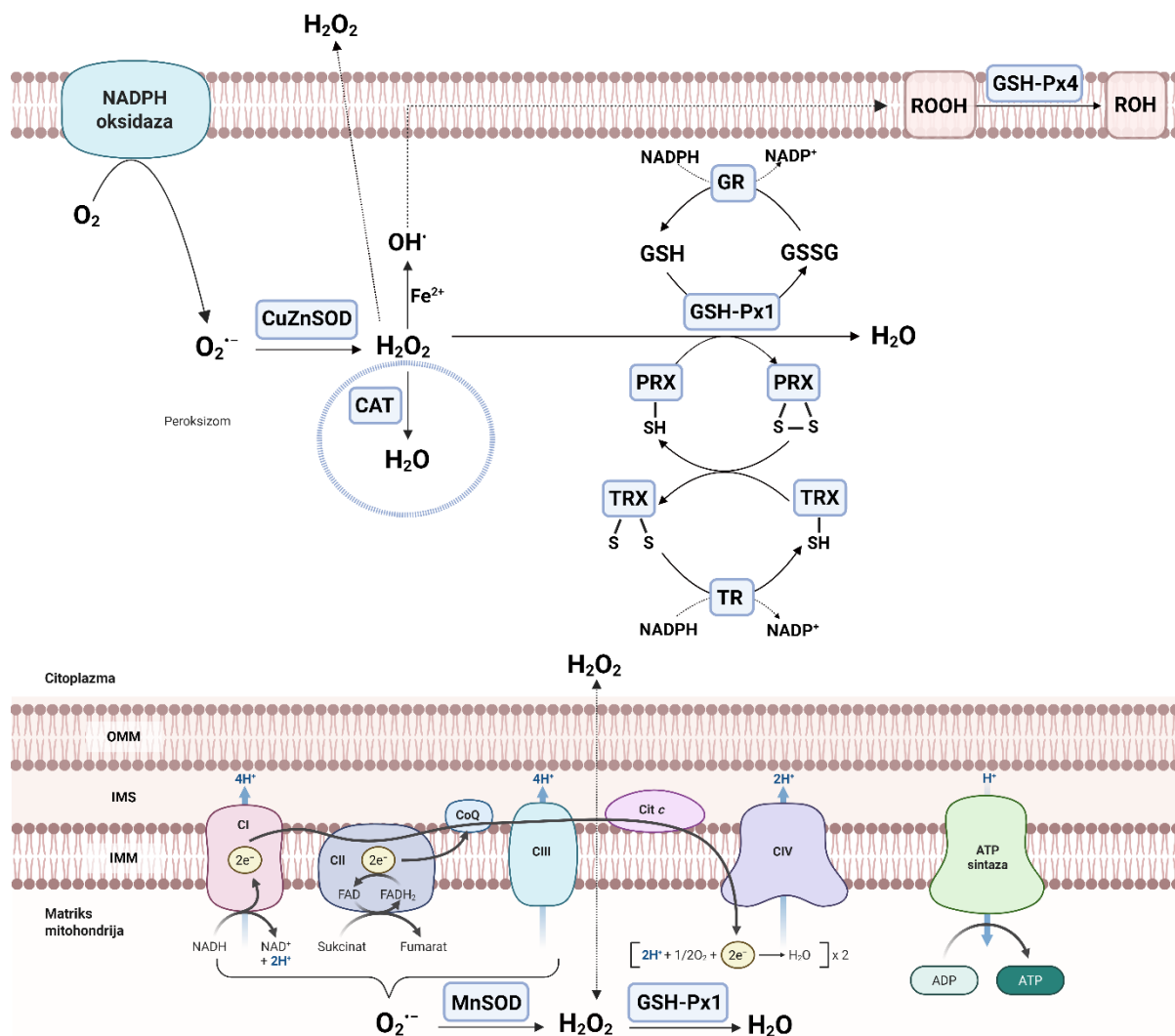
oksidaze (*eng.* NADPH oxidase, NOX), ksantin oksidaze i lipoksigenaze, kao i citohroma P450 (Babior, 2004; de Almeida *et al.*, 2022; Radi, 2018). Sa druge strane, efikasno uklanjanje i održavanje optimalnih nivoa ROS je omogućeno specifičnom subćelijskom lokalizacijom i koordinisanom aktivnošću komponenti antioksidativne odbrane, kako u citoplazmi tako i u organelama. Na ovaj način, precizno regulisana dinamička ravnoteža nastajanja i uklanjanja ROS putem enzima AD omogućava uspostavljanje redoks homeostaze.

Efekti ROS u velikoj meri zavise od njihove koncentracije, ćelijske lokalizacije, poluzivota reaktivnih vrsta i trajanja izloženosti ROS (Moldogazieva *et al.*, 2018; Sies & Jones, 2020). Održavanje fizioloških nivoa ROS neophodno je za njihovu integraciju u signalne puteve i regulatorne mreže, koje imaju značajnu ulogu u regulaciji bazičnih ćelijskih procesa, kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i apoptoza (Jones & Sies, 2015). Prekomerna produkcija ROS i/ili neadekvatan nivo AD dovodi do modulacije signalnih puteva, ali i do oksidativnih modifikacija na nivou biomolekula. Ove promene, između ostalog, obuhvataju posttranslacione modifikacije proteina, koje posledično utiču na protein-protein interakcije, aktivnost enzima i transkripcionih faktora i dovode do narušavanja ćelijskih procesa (Hornsveld & Dansen, 2016). Sa druge strane, niske koncentracije ROS i/ili prekomerna AD narušava njihovu signalnu funkciju (D'Autréaux & Toledano, 2007). Bazalni nivoi ROS određeni su ravnotežom između njihove produkcije i uklanjanja enzimima antioksidativne odbrane. $O_2^{\cdot-}$ je relativno nestabilan molekul koji se brzo dismutuje do vodonik peroksida u reakciji katalizovanoj superoksid dismutazama, pre svega bakar, cink superoksid dismutazom (*eng.* Copper-zinc superoxide dismutase, CuZnSOD), dominantno lokalizovanoj u citoplazmi, ili mangan superoksid dismutazom (*eng.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD), dominantno lokalizovanoj u mitohondrijama (Halliwell & Gutteridge, 2015). H_2O_2 je relativno stabilan molekul koji može slobodno difundovati kroz ćelijske membrane, kao i regulisanom olakšanom difuzijom kroz specifične akvaporine, i na taj način delovati kao bitan unutar- i međućelijski redoks signalni molekul (Sies, 2014, 2017). Međutim, u prisustvu jona gvožđa ili bakra, H_2O_2 može učestvovati u formiranju visoko reaktivnog OH^{\cdot} u Fentonovoj reakciji, koji zatim na mestu nastanka reaguje neselektivno sa različitim biomolekulima (Winterbourn, 1995). Uklanjanje H_2O_2 se prvenstveno odvija delovanjem peroksidaza, uključujući glutation peroksidazu (*eng.* Glutathione peroxidase, GSH-Px) i peroksiredoksine (*eng.* Peroxiredoxin, PRX), koji koriste razlaganje H_2O_2 za oksidaciju drugih supstrata, ili katalaze (*eng.* Catalase, CAT), koja u peroksizomima katalizuje reakciju direktnog razlaganja H_2O_2 do H_2O i molekula kiseonika. Enzim tioredoksin reduktaza (*eng.* Thioredoxin reductase, TR) uz pomoć redukovanog NADPH regeneriše redukovanu formu tioredoksina (*eng.* Thioredoxin, TRX), koji zatim redukuje oksidovani PRX. Sa druge strane, izoforme GSH-Px koriste redukovani glutation (*eng.* Glutathione, GSH) za redukciju H_2O_2 i lipidnih hidroperoksida (ROOH) do H_2O i oksidovanog glutationa (GSSG), odnosno odgovarajućih alkohola (ROH). Redukcija oksidovanog glutationa do njegove redukovanе forme katalizovana je glutation reduktazom (*eng.* Glutathione reductase, GR), koja koristi NADPH kao redukujući kofaktor (Halliwell & Gutteridge, 2015). Glavni putevi produkcije i uklanjanja ROS prikazani su na Slici 2.

NADPH predstavlja ključni kofaktor za funkcionisanje mnogih enzima antioksidativne odbrane i održavanje redoks homeostaze u ćeliji (Murphy, 2012). Glavni izvori NADPH u ćeliji su pentozofosfatni put, pri čemu je enzim glukoza 6-fosfat dehidrogenaza (*eng.* Glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) ključan kao limitirajući enzim PPP, zatim malični enzim 1 (*eng.* Malic enzyme 1, ME1), izocitrat dehidrogenaza 1 i 2 (*eng.* Isocitrate dehydrogenase 1/2, IDH1/2), folat-zavisni jednogljanični metabolizam, i mitohondrijalni enzim nikotinamid nukleotid transhidrogenaza (*eng.* Nicotinamide nucleotide transhydrogenase, NNT) (DeBerardinis & Chandel, 2020; Spaans *et al.*, 2015). NNT je protein unutrašnje membrane mitohondrija koji katalizuje reakciju transfera hidridnih jona sa NADH na $NADP^+$, čime produkuje NADPH (Hoek & Rydström, 1988). NNT-zavisna produkcija NADPH omogućava prenos redukujućeg potencijala (NADH) na NADPH i biosintetske procese u citoplazmi, čime doprinosi metaboličkoj plastičnosti ćelija (Ju *et al.*, 2020).

Izmenjeni balans između produkcije i eliminacije ROS jedna je od ključnih odlika malignog fenotipa (Cerutti, 1985; Wu, 2007). Kancerske ćelije odlikuje visok redoks prag koji se ogleda u sposobnosti ovih ćelija da održavaju relativno visoke nivoe ROS praćene povećanim antioksidativnim kapacitetom, čime se omogućava signalno delovanje ROS, ali i izbegavaju oksidativna oštećenja koja bi dovela do posledične ćelijske smrti (Chandel *et al.*, 2000; Dawane, 2012; Nogueira & Hay, 2013; Sullivan & Chandel, 2014). Ključne faze tumorogeneze, inicijacija, progresija i invazija/formiranje metastaza, predstavljaju redoks-senzitivne procese. Tokom inicijacije tumora, aktivacija onkogenih signalnih puteva podstiče povećan stepen proliferacije i posledično povećanje produkcije ROS. Povišeni nivoi ROS indukuju mutacije ili epigenetske modifikacije genoma i aktiviraju onkogene redoks-senzitivne transkripcione faktore koji dalje stimulišu proliferaciju ćelija ili inhibiraju delovanje tumor supresora (Gupta *et al.*, 2012; Trachootham *et al.*, 2009). Istovremeno, kancerske ćelije povećavaju svoj antioksidativni kapacitet kako bi sprečile akumulaciju ROS i time izbegle ireverzibilna oksidativna oštećenja molekula i ćelijsku smrt (Glasauer & Chandel, 2014; Prasad *et al.*, 2017). Tokom invazije kancera, nivoi ROS dodatno rastu i doprinose aktivaciji matriksnih metaloproteinaza (*eng.* Matrix metalloproteinase, MMP), koje razgrađuju strukturne proteine vanćelijskog matriksa i time olakšavaju invaziju kancerskih ćelija (Nelson & Melendez, 2004). Pored toga, ROS učestvuju u regulaciji signalnih puteva koji su uključeni u reorganizaciju citoskeleta, ćelijsku adheziju i migraciju, čime dodatno podstiču invazivni i metastatski potencijal tumora (Lee & Kang, 2013; Wu, 2007).

Stoga, razumevanje uloge ROS u procesu tumorogeneze zahteva sagledavanje njihove funkcije u zavisnosti od faze progresije tumora, koncentracije i kompartmentalizacije ROS, promenljivih metaboličkih zahteva kancerskih ćelija, kao i uticaja tumorske mikrosredine. Iako povišeni nivoi ROS mogu biti neophodni za malignu transformaciju, održavanje optimalnih nivoa ROS neophodno je za preživljavanje kancerskih ćelija i dalji rast tumora. Ispitivanje redoks homeostaze u kancerskim ćelijama *in vivo*, uzimajući u obzir fazu rasta tumora, od posebnog je značaja za razvoj terapijskih strategija usmerenih na redoks regulaciju, bilo kroz modulaciju nivoa ROS, komponenti AD ili redoks-zavisnih signalnih puteva. Imajući u vidu dualnu ulogu ROS u tumorogenezi, promene u njihovim nivoima, kao i u ekspresiji i aktivnosti AD komponenti, predstavljaju važan aspekt u razumevanju malignog fenotipa kancera dojke.



Slika 2. Shematski prikaz metabolizma reaktivnih vrsta kiseonika u ćeliji. Glavni izvori $O_2^{\cdot-}$ (superoksid anjon radikala) u ćeliji su neenzimska produkcija usled nepotpune redukcije molekuskog kiseonika u elektron transportnom lancu mitohondrija i enzimaska produkcija putem različitih oksidaza, pre svega NADPH oksidaza. $O_2^{\cdot-}$ je nestabilan molekul koji se brzo dismutuje do vodonik peroksida (H_2O_2) u reakciji koju katalizuje bakar,cink superoksid dismutaza (CuZnSOD), prevashodno u citoplazmi, odnosno mangan superoksid dismutaza (MnSOD) u mitohondrijama. H_2O_2 može difundovati kroz ćelijske membrane, slobodno ili olakšanom difuzijom, i na taj način delovati kao signalni molekul. U prisustvu jona gvožđa ili bakra, H_2O_2 u Fentonovoj reakciji dovodi do formiranja visoko reaktivnog hidroksil radikala (OH^{\cdot}). OH^{\cdot} je visoko reaktivan i može reagovati sa lipidima iz membrana, na taj način formirajući lipidne peroksidge (ROOH). Enzim glutation peroksidaza 4 (GSH-Px4) specifično uklanja lipidne peroksidge, pri čemu nastaju lipidni alkoholi (ROH). Sa druge strane, H_2O_2 se prvenstveno uklanja glutation peroksidazom 1 (GSH-Px1) ili peroksiredoksinom (PRX). GSH-Px1 koristi redukovanu glutation (GSH) za ovu reakciju, koji se regeneriše iz svoje oksidovane forme (GSSG) putem glutation reduktaze (GR), koja koristi nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao redukujući ekvivalent. Tiorredoksin (TRX) učestvuje u regeneraciji PRX, a TRX se regeneriše u reakciji katalizovanoj tiorredoksin reduktazom (TR), koja koristi NADPH kao redukujući ekvivalent. H_2O_2 nastao u peroksidomima prvenstveno uklanja katalaza (CAT), koja katalizuje direktnu reakciju razlaganja H_2O_2 do molekula vode (H_2O). OMM, spoljašnja membrana mitohondrija; IMM, unutrašnja membrana mitohondrija; IMS, intermembranski prostor mitohondrija; ATP, adenozin trifosfat. *Kreirano u BioRenderu.*

1.5. Regulacija redoks-metaboličkog reprogramiranja

Funkcijski integrisano redoks i metaboličko reprogramiranje predstavlja jednu od osnova adaptivnog potencijala kancerskih ćelija i stoga je precizno regulisan na više nivoa. Ova regulacija obuhvata promene u ekspresiji i aktivnosti metaboličkih enzima i enzima antioksidativne odbrane, nivou redukujućih ekvivalenata, redoks-senzitivnim signalnim putevima, funkciji i strukturi pre svega mitohondrija, ali i ostalih ćelijskih i vanćelijskih kompartmenata. Na taj način, metabolički status ćelije direktno utiče na njeno redoks stanje, dok redoks signalizacija povratno deluje na metaboličke puteve, uspostavljajući dinamičnu i dvosmernu regulatornu mrežu (Corkey & Deeney, 2020; Trachootham *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2019).

Metabolički *switch* između dominantnog glikolitičkog ili oksidativnog fenotipa zasniva se na modulaciji genske ili proteinske ekspresije, kao i aktivnosti ključnih metaboličkih enzima (Jose *et al.*, 2011; Shiratori *et al.*, 2019). U uslovima ograničene dostupnosti nutrijenata, kancerske ćelije održavaju energetske homeostazu regulacijom odnosa ATP/ADP i ATP/AMP. Povećanje nivoa AMP usled nepovoljnih energetskih uslova dovodi do aktivacije AMPK (*eng.* 5' AMP-activated protein kinase), centralnog senzora energetskog statusa ćelije. Aktivacijom AMPK stimulišu se katabolički putevi koji generišu ATP, uključujući glikolizu i oksidaciju masnih kiselina, ali i inhibiraju anabolički procesi (Ren & Shen, 2019). Na taj način, AMPK omogućava ćelijama održavanje energetske homeostaze i preživljavanje u nepovoljnim uslovima (Lin & Hardie, 2018). U kancerskim ćelijama, uloga AMPK je kompleksna i dvosmerna, jer sa jedne strane može ograničiti njihov proliferativni kapacitet inhibicijom anabolizma, dok sa druge strane omogućava preživljavanje kancerskih ćelija u promenljivim uslovima sredine. Dodatno, adaptacija kancerskih ćelija na smanjenu dostupnost kiseonika, odnosno hipoksiju, u velikoj meri posredovana je HIF-1 α (*eng.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha) (Dales *et al.*, 2010; Harris, 2002; Semenza, 2012). HIF-1 α je transkripcioni faktor koji indukuje ekspresiju niza gena uključenih u transport glukoze, glikolitički put i angiogenezu, uključujući heksokinazu 2, 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bisfosfatazu 3 (*eng.* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3), fosfofruktokinazu 1 (*eng.* phosphofructokinase 1, PFK1), LDHA, MCT, glukozne transportere 1 i 3 (*eng.* Glucose transporter, GLUT) (Altemus *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). Stabilizacija HIF-1 α u uslovima smanjene dostupnosti kiseonika između ostalog omogućava preusmeravanje metabolizma ka glikolizi, čime podržava preživljavanje kancerskih ćelija u hipoksičnim regionima tumora (Masson & Ratcliffe, 2014). Na stabilnost HIF-1 α utiče i redoks status ćelije (Patiar & Harris, 2006), pri čemu je pokazano da mitohondrijalne ROS mogu stimulisati stabilizaciju HIF-1 α u ćelijama kancera dojke i u odsustvu hipoksije, na taj način promovirajući glikolitički fenotip (Comito *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2013).

Ključnu ulogu u integraciji redoks i metaboličke homeostaze u mitohondrijama igra nukleusni respiratorni faktor 1 (*eng.* Nuclear respiratory factor 1, rNRF1), koji učestvuje u regulaciji mitohondrijalne biogeneze, ekspresije nukleusnih gena koji kodiraju mitohondrijalne proteine (subjedinice OXPHOS i mitohondrijalne transkripcione faktore) i oksidativnog kapaciteta ćelije (Scarpulla, 2008). Na taj način, rNRF1 direktno reguliše komunikaciju između nukleusa i mitohondrija, koja je neophodna za održavanje ukupne ćelijske homeostaze, a posebno je značajna u kanceru, gde omogućava očuvanje mitohondrijalne funkcije pri izmenjenim energetskim zahtevima ćelija (Radde *et al.*, 2016).

Kod sisara, *cap'n'collar* (CNC) *basic region-leucine zipper* (bZIP) familija transkripcionih faktora obuhvata nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 1, 2 i 3 (*eng.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 1, 2 and 3; NRF1, NRF2, NRF3), koji takođe imaju ulogu u održavanju ćelijske homeostaze (Ibrahim *et al.*, 2020). NRF1 (NFE2L1) pre svega učestvuje u održavanju ćelijske homeostaze kroz regulaciju ekspresije gena uključenih u odgovor ćelije na oksidativni stres, diferencijaciju, inflamatorni odgovor, metabolizam i proteostazu (Kim *et al.*, 2016). S obzirom na njegovu ulogu, NRF1 može doprineti preživljavanju kancerskih ćelija u uslovima oksidativnog i metaboličkog stresa. NRF3 (NFE2L3) je novootkriven transkripcioni faktor čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena, ali studije ukazuju na njegovu ulogu u diferencijaciji, inflamaciji i

tumorogenezi (Chevallard & Blank, 2011; Kobayashi *et al.*, 1999). Međutim, najistaknutiju ulogu među članovima ove familije u regulaciji odgovora ćelija na stres i održavanju redoks-metaboličke homeostaze ima transkripcioni faktor kodiran NFE2L2 genom, NRF2.

1.6. NRF2: centralni regulator redoks-metaboličke homeostaze

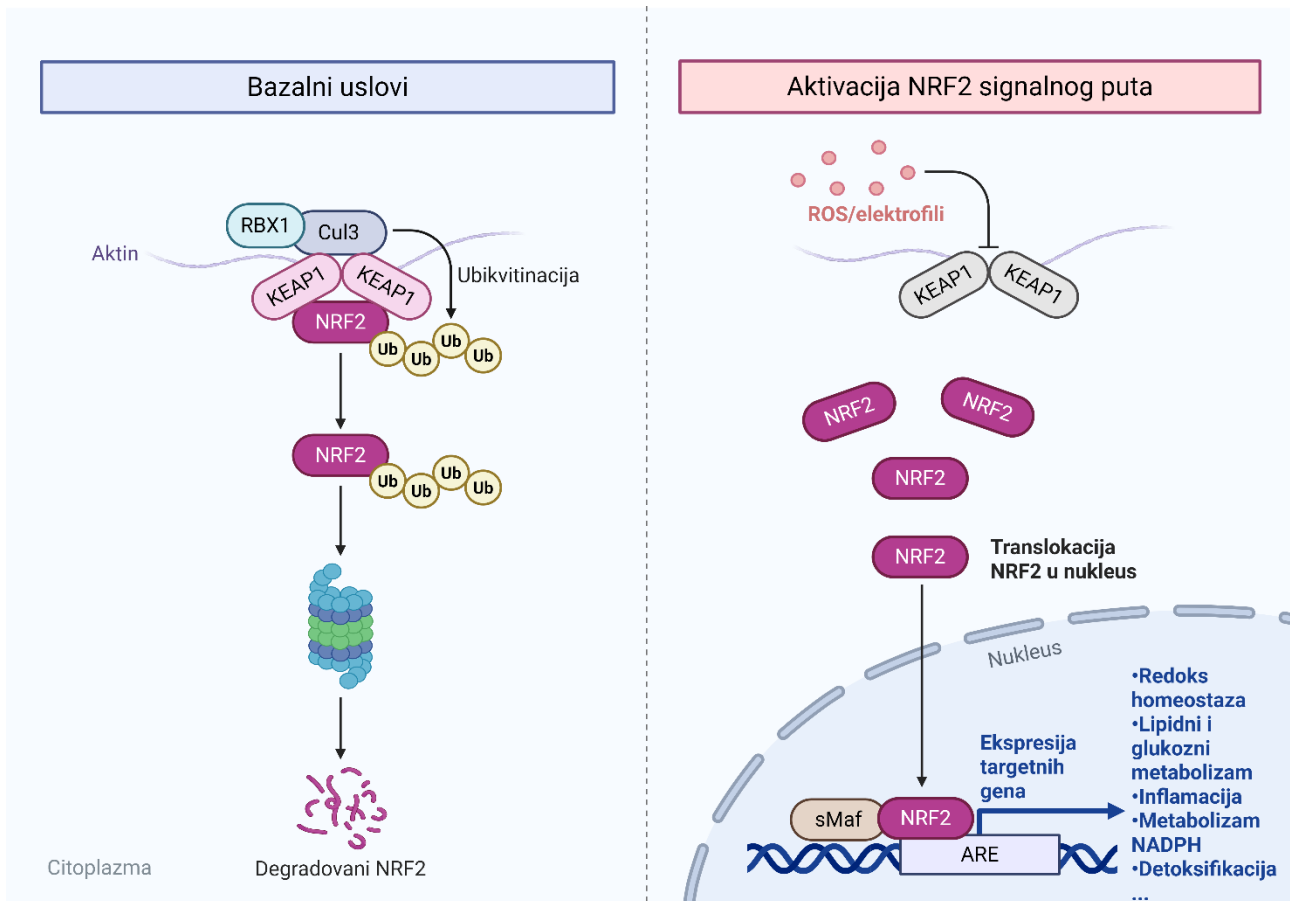
NRF2 (NFE2L2) je transkripcioni faktor prvobitno opisan kao modulator ksenobiotskog metabolizma (Itoh *et al.*, 1997; Köhle & Bock, 2007). Danas je poznato da je NRF2 uključen u regulaciju konstitutivne i inducibilne ekspresije nekoliko stotina gena, uključujući gene odgovorne za antioksidativnu odbranu, generisanje NADPH, metabolizam lipida i glukoze, proteozomalnu degradaciju, autofagiju i mitohondrijalnu homeostazu (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Morgenstern *et al.*, 2024; Taguchi *et al.*, 2011; Tonelli *et al.*, 2018). NRF2 reguliše ekspresiju gena koji sadrže ARE (*eng.* Antioxidative Response Element) sekvence u okviru promotorskih regiona. Njegova transkripciona aktivnost primarno je regulisana vezivanjem za KEAP1 (*eng.* Kelch-like ECH-associated protein 1), koji označava NRF2 za ubikvitinaciju od strane Cullin 3 i RING-box proteina 1 (CUL3/RBX1) i posledičnu proteozomalnu degradaciju (Kobayashi & Yamamoto, 2005). Pri homeostatskim uslovima, nivoi NRF2 su vrlo niski jer je konstantno targetovan za proteozomalnu degradaciju ubikvitinacijom u citoplazmi. Glavni stimulusi za aktivaciju NRF2 jesu oksidativni stres i elektrofilni, koji dovode do modifikacija sulfhidrilnih grupa KEAP1, indukujući konformacione promene koje mu onemogućavaju da označi NRF2 za degradaciju. Na ovaj način, nosivši se u citoplazmi i translocira u nukleus, gde se vezuje za ARE sekvence u promotorskim regionima ciljnih gena zajedno sa proteinima iz Maf familije, čime se regrutuju i ostale komponente transkripcione mašinerije (Kensler *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2004).

Pored KEAP1-zavisne regulacije, aktivnost NRF2 može se modulisati i putem β -TrCP (*eng.* Beta-transducin repeat-containing protein), koji prezentuje NRF2 CUL3/RBX1 kompleksu, kao i putem fosforilacije od strane specifične kinaze glikogen sintaze (*eng.* Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β), koja promovira ubikvitinaciju NRF2 putem β -TrCP/CUL1/RBX1 kompleksa (Hayes *et al.*, 2015; Rada *et al.*, 2011). Aktivacija NRF2 dodatno je regulisana posttranslacionim modifikacijama, kao što su acetilacija i fosforilacija posredovane protein kinazom C i PERK (*eng.* Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase), koje utiču na njegovu stabilnost i translokaciju u nukleus (Cullinan *et al.*, 2003; Numazawa *et al.*, 2003). Takođe, proteini p62/SQSTM1 i p21Cip1/WAF1 mogu interferirati sa ubikvitinacijom NRF2 i doprineti njegovoj aktivaciji (Chen *et al.*, 2009; Katsuragi *et al.*, 2016), dok epigenetski mehanizmi i miRNK mogu uticati na dugoročne promene u njegovoj aktivnosti (Guo *et al.*, 2015; Kabaria *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013). Transkripciona regulacija posredovana NRF2 zavisi od ćelijskog tipa, stimulusa, prisustva ARE sekvenci u promotoru ciljnih gena, dostupnosti Maf proteina, kao i kompeticije i kooperacije sa drugim signalnim putevima (Tonelli *et al.*, 2018).

NRF2 se smatra master regulatorom redoks homeostaze u ćeliji, koju održava kroz modulaciju indukcije, sinteze, regeneracije i transporta ključnih AD komponenti. NRF2 reguliše ekspresiju katalitičke i regulatorne podjedinice glutamat-cistein ligaze (*eng.* Glutamate-cysteine ligase, GCL), ključnog enzima u biosintezi glutationa (Higgins *et al.*, 2009). Takođe, uključen je i u regulaciju ekspresije GSH-Px, kao i GR, čime se obezbeđuje regeneracija unutarćelijskih nivoa redukovano glutationa (Agyeman *et al.*, 2012; Hirotsu *et al.*, 2012). Pored GSH-zavisnog sistema, NRF2 reguliše i ekspresiju TRX i TR, koji između ostalog učestvuju u redukciji oksidovanih tiolnih grupa proteina (Malhotra *et al.*, 2010). Osim uloge u regulaciji redoks homeostaze, NRF2 je uključen u regulaciju intermedijernog metabolizma i mitohondrijalne funkcije – direktno, regulišući ekspresiju ključnih metaboličkih enzima, ili indirektno, kroz interakciju sa drugim transkripcionim faktorima ili putem održavanja redoks homeostaze, čime sprečava oksidativne modifikacije cisteinskih ostataka enzima (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; MacLeod *et al.*, 2009; Malhotra *et al.*, 2010; Paek *et al.*, 2012). Regulacijom ključnih metaboličkih enzima, NRF2 značajno doprinosi metaboličkoj fleksibilnosti

kancerskih ćelija, koja im omogućava da promene metabolizam između oksidacije lipida i ugljenih hidrata u zavisnosti od uslova sredine i dostupnosti nutrijenata. Pored toga, NRF2 reguliše i ekspresiju enzima odgovornih za produkciju NADPH - G6PDH, 6-fosfoglukonat dehidrogenaze (*eng.* 6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD), IDH i ME1. Na taj način, obezbeđuje se koordinisana ekspresija enzima koji obezbeđuju NADPH za reduktivnu biosintezu lipida i nukleotida (MacLeod *et al.*, 2009; Malhotra *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Mehanizam aktivacije NRF2 signalnog puta prikazan je na Slici 3.

Uloga NRF2 tokom tumorogeneze je dualna i zavisna od konteksta. Sa jedne strane, aktivacija NRF2 ima ulogu u prevenciji ROS-indukovane tumorogeneze putem indukcije komponenti AD. Međutim, u već transformisanim kancerskim ćelijama, konstitutivno aktiviran NRF2 predstavlja osnovu visokog redoks praga, štiteći ih od oksidativnih oštećenja i time povećavajući njihovu rezistenciju na hemio/radioterapiju, čime ispoljava protumorogene efekte (Menegon *et al.*, 2016; Sporn & Liby, 2012). Uloga NRF2 u kanceru ne može se posmatrati samo na nivou kancerskih ćelija, budući da postoji redoks-metabolička integracija između kancerskih ćelija, tumorske mikrosredine i sistemskog metabolizma, usled kontinuiranog protoka materije i energije između njih. Pod uticajem metabolizma kancerskih ćelija, u tumorskoj mikrosredini dolazi do remodeliranja tkivne arhitekture, izmenjenih interakcija između različitih tipova ćelija i ćelija sa vanćelijskim matriksom, kao i do metaboličkog reprogramiranja stromalnih komponenti, koje povratno stvaraju uslove koji više ili manje pogoduju daljem rastu tumora (Faubert *et al.*, 2020). Ovakva dinamična i dvosmerna interakcija značajno oblikuje karakteristike kancera i doprinosi njegovoj progresiji. U tom kontekstu, razumevanje uloge NRF2 u kanceru dojke zahteva sagledavanje njegove funkcije ne samo u kancerskim ćelijama, već i u okviru specifične organizacije tkiva dojke i dinamičkih interakcija koje kancer dojke uspostavlja sa svojom tumorskom mikrosredinom.



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma aktivacije NRF2. U bazalnim uslovima, NRF2 je vezan za KEAP1 u citoplazmi, što dovodi do ubikvitinacije i proteazomalne degradacije NRF2. U uslovima povišenog oksidativnog pritiska, dolazi do modifikacije KEAP1, pri čemu NRF2 ostaje slobodan u citoplazmi, akumulira se i stabilizuje, a zatim translocira u nukleus. NRF2 u nukleusu formira heterodimerni kompleks sa Maf proteinima, a zatim se vezuje za ARE sekvence u okviru promotorskih regiona ciljnih gena i indukuje njihovu transkripciju. Targetni geni NRF2 su, između ostalog, uključeni su u održavanje redoks homeostaze, lipidnog i glukoznog metabolizma, inaflamacije, NADPH regeneracije, detoksifikacije i metabolizma hema i gvožđa. Ub, ubikvitin. KEAP1, *eng.* Kelch-like ECH-associated protein 1; RBX, RING-box protein 1; Cul3, *eng.* Cullin 3; sMaf, *eng.* small Maf proteins, ARE, *eng.* Antioxidant response element. ROS, reaktivne vrste kiseonika. *Kreirano u BioRenderu.*

1.7. Tkivo dojke i tumorska mikrosredina

Dojka je veoma plastičan organ koji tokom života prolazi kroz kontinuirane tkivne i funkcijske promene. Diferencirano tkivo dojke sastoji se od dve glavne komponente: epitelne, koju čine žlezde sa razgranatim kanalićima i lobuloalveolarnim jedinicama, i stromalne, koje pretežno sačinjava belo masno tkivo (*eng.* White adipose tissue, WAT) (Hassiotou & Geddes, 2013; Watson & Khaled, 2008). WAT se sastoji dominantno od unilokularnih adipocita i stromalno-vaskularne frakcije, koju čine limfociti, makrofage, endotelne ćelije, fibroblasti, periciti, prekursorske ćelije adipocita i vanćelijski matriks (Kothari *et al.*, 2020). Pored centralne uloge u skladištenju i mobilizaciji lipida u skladu sa energetske potrebama organizma, WAT funkcioniše i kao pravi metabolički i aktivni endokrini organ, utičući na glukoznu i lipidnu homeostazu, između ostalog sintezom i sekrecijom adipokina – hormona, citokina, faktora rasta, kao i komponenti uključenih u remodeliranje vanćelijskog matriksa (Ouchi *et al.*, 2011; Sethi & Vidal-Puig, 2007). Na ovaj način, WAT učestvuje u regulaciji lokalnog i sistemskog energetskeg metabolizma i održavanju metaboličke homeostaze kako u fiziološkim tako i u različitim patološkim stanjima, uključujući gojaznost, dijabetes i kancer (Richard *et al.*, 2000).

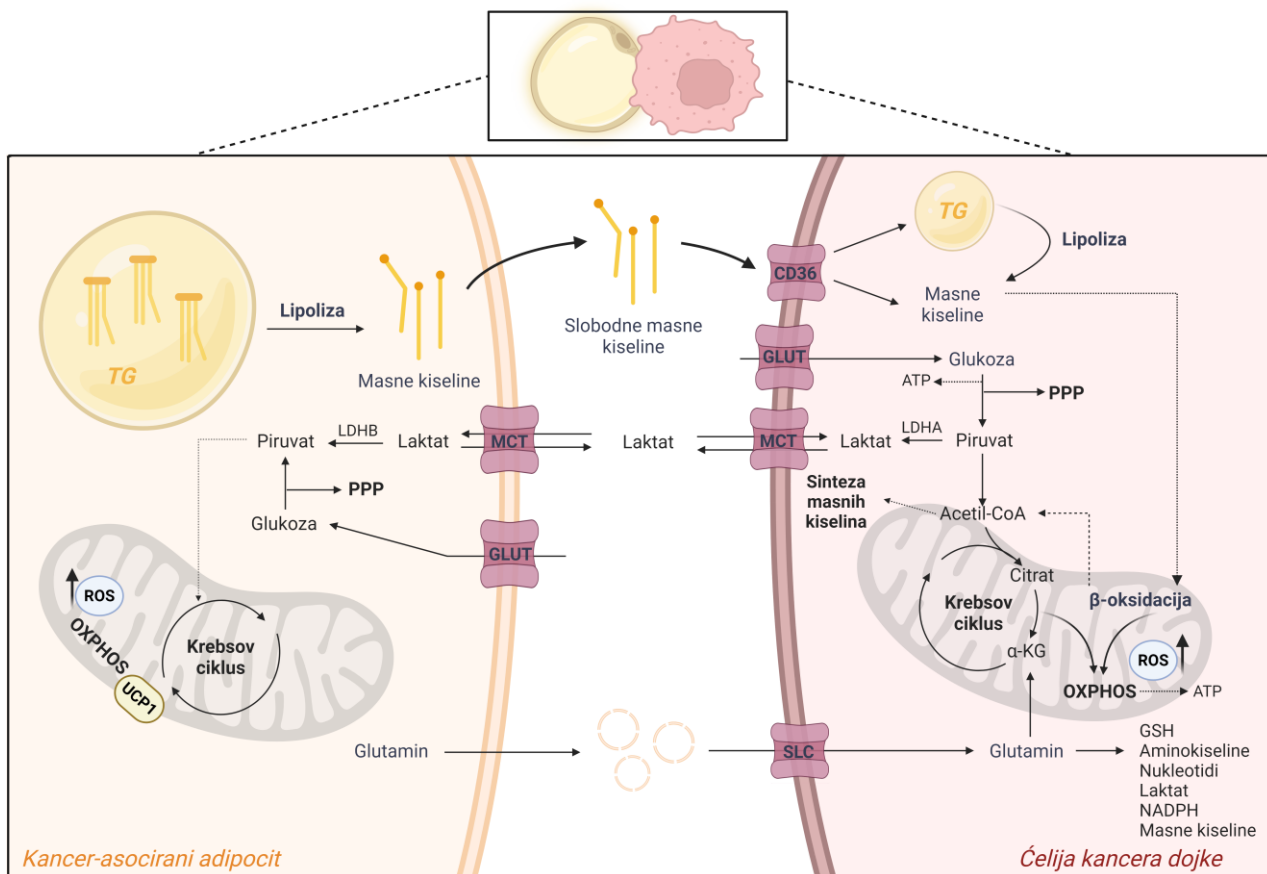
Kancer dojke se najčešće razvija od epitelnih ćelija koje okružuju duktalne i lobularne strukture dojke (Feng *et al.*, 2018). Nakon njihove maligne transformacije, dolazi do uspostavljanja specifične tumorske mikrosredine, koju čini kompleksna i dinamička mreža različitih tipova stromalnih ćelija, vanćelijskog matriksa i solubilnih faktora. Stromalnu komponentu TME u kanceru dojke čine kancer-asocirani adipociti, kancer-asocirani fibroblasti, imunske i endotelne ćelije, dok vanćelijski matriks predstavlja kompleksnu strukturu koja okružuje stromalne ćelije i pruža im mehaničku i funkcijsku podršku (Allinen *et al.*, 2004; Soysal *et al.*, 2015). Usled izmenjenih redoks i metaboličkih karakteristika kancerskih ćelija, menja se protok metabolita i ROS u njihovoj sredini. Takođe, pod uticajem kancerskih ćelija, dolazi do remodeliranja arhitekture tkiva, što direktno utiče na dostupnost kiseonika i nutrijenata i time oblikuje uslove unutar tumorske mikrosredine. Kontinuirana komunikacija između različitih ćelijskih tipova u TME tako uspostavlja kompleksnu regulatornu mrežu koja značajno doprinosi funkcionalnoj i strukturnoj heterogenosti tumora. Sa druge strane, kancerske ćelije odgovaraju na promene u energetskeim zahtevima, ćelijskoj signalizaciji i redoks statusu u TME precizno regulisanim redoks-metaboličkim reprogramiranjem. Ovakva dvosmerna interakcija između ćelija kancera dojke i komponenti TME dovodi do uspostavljanja protumorigenog fenotipa stromalnih ćelija, čime se podržavaju ključni procesi tumorogeneze, odnosno proliferacija, angiogeneza, invazija i metastaziranje kancera (Bernard & Wellberg, 2021; Mao *et al.*, 2013; Yu & Di, 2017; C. Zhao *et al.*, 2020).

1.8. Redoks-metabolička kooperacija između kancerskih ćelija i kancer-asociranih adipocita u kanceru dojke

Masno tkivo mlečne žlezde predstavlja primarnu komponentu tumorske mikrosredine u kanceru dojke, koje pod uticajem kancerskih ćelija prolazi kroz morfološke i funkcijske promene. Ove promene obuhvataju izmenjen metabolizam ugljenih hidrata, masnih kiselina i aminokiselina, ali i regulaciju komponenti antioksidativne odbrane i nivoa ROS (Colleluori *et al.*, 2021; Kalezić *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014). Kao posledica tumor-indukovanih promena, masno tkivo mlečne žlezde u kanceru dojke poprima novi fenotip i naziva se kancer-pridruženo (asocirano) masno tkivo (*eng.* Cancer-associated adipose tissue, CAAT), dok se adipociti prisutni u njemu označavaju kao kancer-asocirani adipociti (*eng.* Cancer-associated adipocytes, CAA) (Dirat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019). CAAT se karakteriše povećanom sekretornom i kataboličkom aktivnošću, čime snabdeva kancerske ćelije različitim metaboličkim supstratima. Neki od faktora koje povišeno oslobađa CAAT su inflamatorni medijatori, duge nekodirajuće RNK, egzozomi i hormoni, koji dodatno podstiču progresiju kancera dojke (Zhao *et al.*, 2020).

Kancerske ćelije zahtevaju kontinuiran protok metabolita kako bi obezbedile ATP, redukujuće ekvivalente i prekursore za sintezu biomolekula. U tom smislu, CAAT predstavlja važan izvor metaboličkih supstrata koji direktno podržavaju metabolizam kancerskih ćelija. Štaviše, kancerske ćelije se značajno oslanjaju na masne kiseline iz CAAT tokom invazije kancera (Currie *et al.*, 2013; Micallef *et al.*, 2021). Iscrpljivanje lipidnih depoa CAAT može se odigrati putem lipolize, oslobađanjem masnih kiselina (Dirat *et al.*, 2011) ili dediferencijacijom adipocita, najčešće kroz Wnt/ β -kateninski put (Blücher & Stadler, 2017; Bochet *et al.*, 2013). Oslobodene masne kiseline iz CAAT koriste se u ćelijama kancera dojke najčešće za produkciju energije putem mitohondrijalne β -oksidacije, čime se favorizuje oksidativni metabolizam, ili za izgradnju ćelijskih membrana (Blücher & Stadler, 2017; Santos & Schulze, 2012). Pored masnih kiselina, laktat se može transportovati iz hipoksičnih, dominantno glikolitičkih ćelija u normoksične kancerske ćelije (Sonveaux *et al.*, 2008) ili stromalne ćelije (Kalezic *et al.*, 2020; Pavlides *et al.*, 2009), gde se koristi kao metabolički supstrat. Na taj način dolazi do metaboličkog kuplovanja između različitih populacija kancerskih ćelija, ali i između kancerskih i stromalnih ćelija. Ovakva dvosmerna komunikacija između ćelija kancera dojke i CAAT formira kompleksnu redoks-metaboličku mrežu, koja podržava rast tumora, invazivnost i rezistenciju na terapiju. Međutim, dvosmerna komunikacija između kancerskih ćelija i CAAT ne odvija se isključivo na nivou razmene metabolita, već i kroz kontinuiranu razmenu signalnih molekula koji utiču na druge stromalne komponente, uključujući fibroblaste, mezenhimalne i imunske ćelije, kao i na vanćelijski matriks (Zhao *et al.*, 2020). Na taj način, CAAT ne predstavlja samo pasivni izvor nutrijenata, već aktivnog učesnika u oblikovanju tumorske mikrosredine. Slika 4 shematski predstavlja dvosmernu metaboličku između kancerskih ćelija dojke i kancer-asociranih adipocita.

Stoga, redoks i metaboličko reprogramiranje predstavljaju usko povezane procese kojima kancerske ćelije dojke i stromalne komponente TME zajednički oblikuju tumor kao kompleksan pseudo-organ. Ipak, mehanizmi koji su u osnovi reprogramiranja CAAT i precizna uloga masnog tkiva u redoks-metaboličkom reprogramiranju kancera dojke još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.



Slika 4. Shematski prikaz metaboličke interakcije između ćelija kancera dojke i kancer-asociranih adipocita. Ćelije kancera dojke ostvaruju metaboličku interakciju sa pridruženim adipocitima, koja podrazumeva reprogramiranje i sinhronizaciju njihovih glavnih metaboličkih puteva. Pre svega, u adipocitima se aktivira lipoliza i oslobađaju masne kiseline, koje zatim preuzimaju kancerske ćelije i koriste ih kao gradivne blokove, energetske izvore ili signalne molekule. Laktat-zavisna komunikacija između kancerskih ćelija dojke i adipocita zasniva se na povećanoj produkciji i oslobađanju laktata od strane kancerskih ćelija, kojeg zatim preuzimaju adipociti i koriste za produkciju piruvata. GLUT, glukočni transporter; GSH, glutation; LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; MCT, monokarboksilatni transporter; OXPHOS, oksidativna fosforilacija; PPP, pentozofosfatni put; ROS, reaktivne vrste kiseonika; SLC, *eng.* Solute carrier transporter; TG, trigliceridi; UCP1, dekuplujući protein 1. Modifikovano prema (Zakic *et al.*, 2023).

2. CILJEVI

Kancer dojke je kompleksno sistemsko oboljenje koje se karakteriše intenzivnim redoks i metaboličkim reprogramiranjem. Iako dosadašnja molekularno-biološka istraživanja ukazuju na postojanje dvosmerne veze između ćelija kancera dojke i tumorske mikrosredine, prevashodno masnog tkiva, molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi ove interakcije nedovoljno su istraženi, pre svega sa aspekta redoks-metaboličke regulacije. Tkivno- i vremenski-specifična uloga centralnog redoks-zavisnog transkripcionog faktora NRF2 u uspostavljanju i dinamici komunikacije između tumora dojke i masnog tkiva ostaje dvosmislena i nerazjašnjena.

Dosadašnje studije na kanceru dojke ukazuju na ključnu ulogu NRF2 u redoks i metaboličkoj plastičnosti kancera, ali je njegova uloga u komunikaciji tumora i sredine u kojoj se razvija nerazjašnjena, kako na lokalnom tako i na sistemskom nivou. U skladu sa tim, cilj doktorske disertacije je da se detaljnije ispituju mehanizmi redoks-metaboličkog reprogramiranja i interakcije tumora sa sredinom u kojoj se razvija, posebno uloga NRF2 u regulaciji ovog procesa. U tu svrhu, ispitivani su redoks i metabolički profili tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva tokom rasta tumora (tumori mase 10, 50 i 200 mg) u *in vivo* studiji ortotopskog modela kancera dojke indukovanoj injekcijom *Nrf2*^{+/+} kancerskih ćelija kod ženki miševa divljeg soja i miševa sa funkcijski utišanim NRF2.

U doktorskoj disertaciji definisani su specifični ciljevi:

- Analiza strukturnih promena tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva tokom rasta ortotopski indukovanoj *Nrf2*^{+/+} tumora dojke u miševima divljeg soja i *Nrf2*KO miševima;
- Karakterizacija redoks profila tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva u odnosu na veličinu tumora dojke i prisustvo funkcijski aktivnog NRF2;
- Ispitivanje metaboličkih profila tumorskog i kancer-asociranog masnog tkiva u odnosu na veličinu tumora dojke i prisustvo funkcijski aktivnog NRF2;
- Karakterizacija AMPK α kao centralnog regulatora metaboličke i redoks homeostaze u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu u odnosu na veličinu tumora dojke i prisustvo funkcijski aktivnog NRF2;
- Analiza strukture i funkcije mitohondrija u tumorskom tkivu u odnosu na veličinu tumora dojke i prisustvo funkcijski aktivnog NRF2;
- Karakterizacija transkripcionih faktora odgovornih za redoks-metaboličko remodeliranje tumorskog i masnog tkiva u odnosu na veličinu tumora dojke i prisustvo funkcijski aktivnog NRF2.

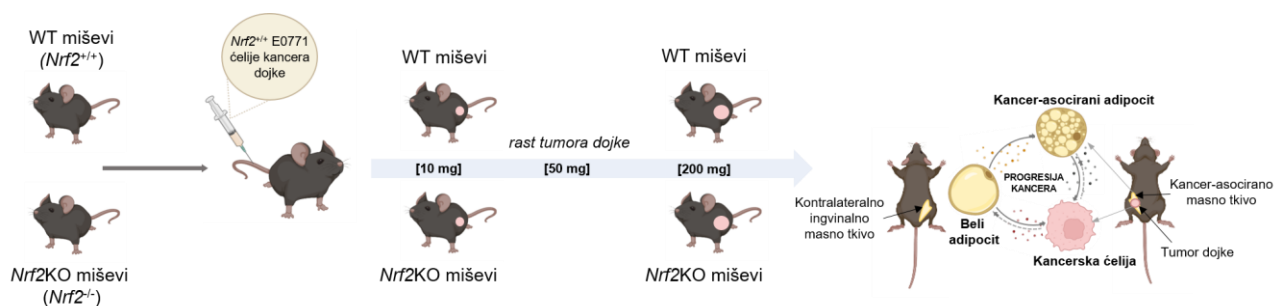
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni dizajn

3.1.1. Ortotopski model kancera dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog odbora za tretman eksperimentalnih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, kao i od strane Veterinarske uprave (br. 323-07-06746/2020-05), u skladu sa Nacionalnim aktom o dobrobiti životinja Republike Srbije, i u saglasnosti sa Direktivom Evropske komisije 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe.

Za ortotopski model kancera dojke korišćene su ženke miševa soja C57BL/6J divljeg tipa (*eng.* wild type, WT) ili miševa sa funkcijski utišanim NRF2 (*eng.* *Nrf2* (*Nfe2l2*) knockout, *Nrf2*KO), starosti od 2.5 do 3 meseca. *Nrf2*KO miševe generisao je profesor Yamamoto (Univerzitet Tohoku, Japan) (Itoh *et al.*, 1997). Miševi su držani u konvencionalnim kavezima pod režimom 12 h svetla i 12 h mraka, sa stalnim pristupom standardnoj hrani i vodi. WT i *Nrf2*KO miševima subkutano je injektovana suspenzija *Nrf2*^{+/+} E0771 ćelija kancera dojke u četvrtu mlečnu žlezdu ingvinalnog belog masnog tkiva, i to 50 000 ćelija u 50 µl DPBS (*eng.* Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). Veličina tumora praćena je svakodnevno i merena pomoću kalipera tri puta nedeljno. Nakon žrtvovanja miševa, tumori dojke su izolovani i izmerena im je masa, na osnovu koje su miševi svrstani u eksperimentalne grupe (n=6-8): kontrolna grupa (miševi bez indukovano tumora), miševi sa tumorima u inicijalnoj (tumori mase ~10 mg), srednjoj (tumori mase ~50 mg) i kasnoj (tumori mase ~200 mg) fazi rasta tumora. S obzirom da je fokus studije bio na lokalnoj interakciji između ćelija kancera dojke i masnog tkiva, iz eksperimenta su isključeni miševi sa intraperitonealnim tumorima ili metastazama (pre svega na plućima), koje se često javljaju kod miševa sa tumorima mase veće od 200 mg. Pored tumora, izolovani su kancer-asocirano masno tkivo dojke (CAAT) i udaljeno, kontralateralno ingvinalno masno tkivo mlečne žlezde (*eng.* Inguinal white adipose tissue, iWAT), koje nije bilo u direktnoj asocijaciji sa tumorom. Nakon izolacije i merenja mase tkiva, deo tkiva je fiksiran za mikroskopske analize, dok je ostatak zamrznut na -80 °C radi kasnije izolacije i analize RNK i proteina. Shematski prikaz ortotopskog modela kancera dojke, kao i izučavana tkiva u ovom modelu, predstavljeni su na Slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz ortotopskog modela kancera dojke na miševima soja C57BL/6J. *Nrf2*^{+/+} ćelije kancera dojke subkutano su injektovane u četvrtu mlečnu žlezdu ingvinalnog masnog tkiva C57BL/6J miševa divljeg soja (*eng.* wild-type, WT) i miševa sa funkcijski utišanim NRF2 (*Nrf2*KO miševi). Progresija kancera dojke praćena je kroz porast mase tumora, označene kao 10, 50 i 200 mg. U ovim tačkama rasta tumora analizirani su tumorsko tkivo dojke, masno tkivo u direktnom kontaktu sa tumorskim tkivom (kancer-asocirano masno tkivo) i kontralateralno ingvinalno masno tkivo, na koje tumor deluje sistemski. *Kreirano u BioRenderu.*

3.1.2. Čelijska kokultura MCF-7 ćelija kancera dojke i primarnih adipocita

Za *in vitro* eksperiment korišćena je kokultura MCF-7 humanih ćelija kancera dojke i izolovani primarni adipociti. I jedne i druge ćelije održavane su u DMEM (*eng.* Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Life Technologies) sa 10% FBS (*eng.* Fetal bovine serum) i 1% rastvora antibiotika/antimikotika (Sigma Aldrich), na 37 °C u inkubatoru sa 5% CO₂. Nakon trećeg pasažiranja, kancerske ćelije su tripsinizovane, centrifugirane, a zatim prebrojane pomoću komorice za brojanje ćelija i vitalne boje Trypan Blue i postavljene u kokulturu. Na membranu inserta naneto je 5x10⁴ izolovanih adipocita, nakon čega je insert invertovan i stavljen na 12-well ploču (ploča sa 12 bunara; Thermo Fisher Scientific). Adipociti su ostavljeni u DMEM tokom 24 h kako bi adherirali za podlogu. Nakon toga, uzgajani su 48 h ili u čistom DMEM ili u DMEM sa dodatim 10 μM ML385, specifičnim inhibitorom NRF2 (Med Chem Express). Na inserte je zatim naneto 5x10⁵ MCF-7 kancerskih ćelija kako bi se uspostavila kokultura tokom 48 h na 37 °C pri 5% CO₂. Na ovaj način formirane su tri eksperimentalne grupe: MCF-7 kancerske ćelije u monokulturi, MCF-7 kancerske ćelije u kokulturi sa adipocitima i MCF-7 kancerske ćelije u kokulturi sa ML385-tretiranim adipocitima (n=3).

Nakon inkubacije u kokulturi, adipociti su isprani sa membrana pomoću DMEM, a kancerske ćelije tripsinizovane kako bi se odvojile od podloge. Prikupljeni adipociti i kancerske ćelije centrifugirani su na 50 g 3 minuta, odnosno 120 g 3 minuta. Po 20 μL ćelijske suspenzije korišćeno je za inkubaciju sa MitoTracker Orange CMTM-ROS (boja za obeležavanje aktivno respirirajućih mitohondrija) ili MitoSOX Red (boja za obeležavanje mesta produkcije superoksid anjon radikala) fluorescentnim bojama, u kombinaciji sa Hoechst 33342 bojom za obeležavanje nukleusa. Inkubacija je sprovedena 10-30 minuta u mraku na 37 °C. Nakon inkubacije, ćelije su suspendovane u DPBS i postavljene u komore za posmatranje (Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich). Mikroskopska analiza vršena je pomoću Leica DM4 B fluorescentnog mikroskopa i LAS X softvera (Leica Microsystems GmbH), koristeći UV filter za Hoechst i N2.1 filter za MitoTracker Orange i MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific). Analizirano je ≥ 3 biološka replikata (tj. bunara iz kokulture). Slike su predstavljene sa preklopljenim signalima MitoTracker Orange/MitoSOX red i Hoechst i ilustruju reprezentativne primere bojenja u okviru grupa.

3.2. Priprema tkiva za analize

3.2.1. Svetlosna i elektronska mikroskopija

Odmah nakon izolacije, jedan deo tumorskog i masnog tkiva fiksiran je za svetlosnu mikroskopiju u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu (pH 7,4). Nakon fiksacije, uzorci su ispirani vodom sa česme preko noći, a zatim sprovedeni kroz seriju etanola rastućih koncentracija radi dehidratacije, prosvetljeni ksilolom i finalno ukalupljeni u parafin. Deo uzorka za elektronsku mikroskopiju je nakon izolacije fiksiran u 2,5% glutaraldehidu u 0,1M fosfatnom puferu i postfiksiran u 1% osmijum tetraoksidu u istom puferu. Nakon rutinske dehidratacije u alkoholima rastuće koncentracije, uzorci su ukalupljeni u epoksidnu smolu (Agar). Tako ukalupljeni uzorci sečeni su na mikrotomu (Reichert) ili ultramikrotomu Leica UC6 (Leica Microsystems). Dobijeni preseci različitih debljina preneti su na mikroskopske pločice i dalje analizirani. Parafinski preseci od 5 μm su bojani hematoksilin-eozinom, a polutanki preseci od 2 μm (*eng.* semi-fine) toluidin plavim.

3.2.2. Enzimski aktivnost i Western blot

Deo izolovanih uzoraka tkiva koja nisu korišćena za mikroskopiju je maceriran, a zatim homogenizovan na ledu u saharoznom puferu (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) u razblaženju 1:10 za tumorsko tkivo i 1:4 za masna tkiva. Homogenizacija je sprovedena tri puta po 10 sekundi u električnom homogenizeru (Heidolph DIAX 600). Nakon toga, uzorci su sonifikovani na ledu tri puta po 15 sekundi pri frekvenciji od 40 kHz. Dobijeni sonifikat je centrifugiran (Hettich) dva puta po 30 minuta, na 12 000 rpm pri 4 °C. U tako dobijenim supernatantima određena je koncentracija proteina, a zatim i enzimski aktivnost, odnosno proteinska ekspresija Western blot metodom i nivo 4-HNE ELISA metodom.

3.2.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR)

Deo izolovanih uzoraka kancer-asociranog masnog tkiva korišćen je za izolaciju RNK pomoću modifikovanog protokola (Chomczynski & Sacchi, 1987) od strane proizvođača TRIzol™ reagensa (Invitrogen). Naime, 50-100 mg tkiva je macerirano na ledu, a zatim homogenizovano u ručnom staklenom homogenizatoru u 1 mL TRIzol™ reagensa. Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, dodato je 0,2 mL hloroforma i inkubirano 3 minuta. Nakon 15 min. centrifugiranja pri 12 000 g na 4 °C, gornja, vodena faza koja sadrži RNK alikvotirana je u nove ependorfice. Zatim je dodato 0,5 mL izopropanola i nakon inkubacije od 10 minuta, centrifugirano pri 12 000 g na 4 °C. Supernatant je odliven, a dobijeni talog sa RNK je resuspendovan u 1 mL 75% etanola. Uzorak je kratko vorteksovao i zatim centrifugiran 5 min. pri 7 500 g na 4 °C. Supernatant je ponovo odbačen, a talog RNK prosušen kratko na vazduhu, a zatim rastvoren u sterilnoj PCR vodi. Ovako dobijeni uzorci RNK su čuvani na -80 °C sve do njihove pripreme za analizu genske ekspresije RT-PCR metodom, koja je podrazumevala DNazni tretman i sintezu cDNK.

3.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina iz uzoraka tumorskog i masnih tkiva pripremljenih u saharoznom puferu određena je spektrofotometrijski po metodi Lowry i saradnika (Lowry *et al.*, 1951). U osnovi ove metode je biuretska reakcija peptidnih veza iz proteina sa bakrom (Cu) u alkalnoj sredini. Nastali jon Cu^+ dalje reaguje sa Folinovim reagensom – Folin-Ciocalteu reakcija, u čijoj osnovi je redukcija fosfomolibdotungstenata do heteropolimolibdenum plavog, usled bakrom katalizovane oksidacije aromatičnih aminokiselina. Kao rezultat, nastaje plavo obojeni kompleks čiji je maksimum apsorpcije na 500 nm. Apsorbanca uzoraka na 500 nm očitana je na UV-VIS spektrofotometru (UV-1900i Shimadzu). Koncentracija proteina u uzorku proporcionalna je intenzitetu boje, odnosno zastupljenosti aromatičnih aminokiselina u proteinima. Za očitavanje koncentracije proteina u uzorcima koristi se linearni deo standardne krive, koja se formira merenjem apsorbanca rastvora albumina rastućih i poznatih koncentracija. Senzitivnost ove metode je 0,01 mg/mL proteina, a koncentracija ukupnih proteina se izražava u mg/mL.

3.4. Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija RNK u uzorcima dobijenim izolacijom TRIzol™ reagensom (Invitrogen, Life Technologies) određena je spektrofotometrijski na NanoDrop Microvolume spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific), na talasnoj dužini od 260 nm u UV delu spektra. Finalna koncentracija izražena je u μg RNK/mL. Odnos apsorbanca na 260 nm i 280 nm je korišćen za određivanje čistoće RNK, a odnos $A_{260}/A_{280} \sim 2$ je smatran za odgovarajuću čistoću RNK.

3.5. SDS-PAGE i Western blot

3.5.1. Elektroforeza proteina

Na osnovu molekulskih masa, proteini su razdvajani natrijum-dodecil sulfat (*eng.* Sodium dodecyl sulfate, SDS) – poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u Mini-Protean III sistemu (BioRad). Gelovi za razdvajanje proteina razlikovali su se po koncentraciji akrilamida (AA), u zavisnosti od molekulske mase ciljnog proteina, dok su gelovi za koncentrovanje uvek bili 5% (5% AA, 0,1% SDS, 0,125 M Tris, pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0,05% amonijum-persulfata i 0,033% N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Pufer za razdvajanje je sadržao 0,192 M glicin, 0,1% SDS i 0,025 M Tris, pH 8,3. Uzorci proteina određene zapremine pre nalivanja na gel pomešani su sa istom zapreminom pufera za uzorke (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -merkaptotanol, 0,025% brom-fenol plavo, 0,125 M Tris, pH 6,8), a zatim denaturisani kuvanjem 5 min. na 95 °C. U zavisnosti od ciljnog proteina, nanošeno je 5-20 μ g proteina iz uzorka. Na gelove je nanošen i proteinski marker (BioRad) radi utvrđivanja molekulskih masa. Elektroforeza je trajala 90-120 min. pri diskontinuiranom intenzitetu struje i konstantnom naponu od 100 V. Nakon prelaska proteina u gel za razdvajanje, napon je povećan na 120 V. Nakon elektroforeze, gelovi su dalje korišćeni za Western blot analizu.

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

Proteini su sa gelova preneseni mokrim elektrotransferom na polivinil difluoridne (PVDF) membrane (Amersham Hybond P 0.45 μ m). Membrane su prethodno aktivirane u metanolu (10 sekundi) i destilovanoj vodi (3 minuta). Transfer proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. u puferu za transfer (0,192 M glicin, 20% metanol, 0,025 M Tris, pH 8,3). Uspešnost transfera je proveravana 5% rastvorom Ponceau S boje u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Membrane su potom obezbojavane ispiranjem u Tris puferu sa dodatkom Tween 20 (0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4) i inkubirane 60 min. na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani - 5% BSA (*eng.* Bovine serum albumine) u Tris puferu sa dodatkom Tween 20. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa primarnim antitelom rastvorenim u 5% BSA preko noći na 4 °C. Podaci o antitelima korišćenim u ovom eksperimentu prikazani su u Tabeli 1. Nakon ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca, odnosno miša (*eng.* Goat-anti rabbit HRP, Abcam i Goat-anti mouse HRP, Abcam), u razblaženju 1:15000, odnosno 1:4000 u 5% BSA tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Membrane su nakon inkubacije ispirane Tris puferom sa dodatkom deterdženta Tween 20, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane 3 minuta u hemiluminiscentnom supstratu – luminolu, uz dodatak H₂O₂. Nakon inkubacije u luminolu, signal sa membrana skeniran je pomoću iBright CL750 Imaging System aparata (Thermo Fisher Scientific). Slike dobijene sa aparata dalje su korišćene za kvantifikaciju proteinskih traka.

Tabela 1. Primarna antitela korišćena za Western blot analizu.

| Antitelo | Proizvođač i kataloški broj | Razblaženje | Mr (kDa) |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------|
| ACC | Abcam ab45174 | 1:1000 | 265 |
| ACLY | Abcam ab40793 | 1:10000 | 120 |
| AMPKα 1/2 | Abcam ab133448 | 1:1000 | 64 |
| CAT | Abcam ab18877 | 1:10000 | 59 |
| CAV1 | Abcam Ab18199 | 1:1000 | 20 |
| CAIX | Elabscience E-AB-64788 | 1:1000 | 58 |
| CD63 | Elabscience E-AB-63817 | 1:1000 | 26 |
| CD81 | Elabscience E-AB-53280 | 1:1000 | 22 |
| CuZnSOD | Santa Cruz sc-101523 | 1:1000 | 23 |
| Cx43 | Abcam ab11370 | 1:2000 | 43 |
| DRP1 | Abcam ab184247 | 1:5000 | 83 |
| FAS | Abcam ab150508 | 1:1000 | 273 |
| G6PDH | Abcam ab76598 | 1:1000 | 59 |
| GAPDH | Abcam ab8245 | 1:1000 | 36 |
| GCL | Abcam ab17926 | 1:1000 | 73 |
| GGT | Abcam ab55138 | 1:1000 | 60-65 |
| GSH-Px1 | Abcam ab108427 | 1:5000 | 22 |
| GSH-Px4 | Santa Cruz sc-166570 | 1:1000 | 21 |
| GST Mu | Abcam ab53942 | 1:1000 | 25 |
| GST Pi | Abcam ab138491 | 1:1000 | 23 |
| HIF-1α | Santa Cruz sc-13515 | 1:1000 | 132 |
| IDH2 | Santa Cruz sc-373816 | 1:1000 | 51 |
| LDHA | Elabscience E-AB-19937 | 1:5000 | 36 |
| LDHB | Abcam ab85319 | 1:10000 | 37 |

| | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------|-------|
| MCT4 | Abcam ab74109 | 1:500 | 49 |
| ME1 | Santa Cruz sc-100569 | 1:1000 | 64 |
| MFN1 | Abcam ab57602 | 1 µg/ml | 84 |
| MFN2 | Abcam ab56889 | 1:1000 | 86 |
| MnSOD | Abcam ab13533 | 1:5000 | 25 |
| NNT | Elabscience E-AB-92601 | 1:1000 | 114 |
| NOX2 | Abcam ab31092 | 1 µg/ml | 65 |
| NRF1 | Santa Cruz sc-28379 | 1:1000 | 65 |
| rNRF1 | Abcam ab86516 | 1:1000 | 54 |
| NQO1 | Abcam ab60588 | 1:10000 | 31 |
| OPA1 | Abcam ab157457 | 1:10000 | 112 |
| OXPPOS cocktail | Abcam ab110413 | 1:1000 | 20-55 |
| pNRF2 | Abcam ab76026 | 1:5000 | 100 |
| PFK1 | Elabscience E-AB-10927 | 1:2000 | 86 |
| PFKFB3 | Abcam ab181861 | 1:1000 | 86 |
| PRX3 | Santa Cruz sc-137222 | 1:1000 | 25 |
| TR | Abcam ab124954 | 1:1000 | 55 |
| TRX | Abcam ab26320 | 1:1000 | 12 |
| TSG101 | Abcam ab30871 | 1 µg/ml | 44 |
| β-aktin | Abcam ab6276 | 1:5000 | 42 |

Skraćenice korišćene u tabeli: ACC, acetyl-CoA karboksilaza; ACLY, ATP-citrat liaza; AMPK α , 5'AMP-aktivirana protein kinaza alfa; CAT, katalaza; CAV1, kaveolin 1; CAIX, karboanhidraza IX; CD63, *eng.* Cluster of differentiation 63; CD81, *eng.* Cluster of differentiation 81; CuZnSOD, bakar,cink superoksid dismutaza; Cx43, koneksin 43; DRP1, *eng.* Dynamin-related protein 1; FAS, sintaza masnih kiselina; G6PDH, glukozo 6-fosfat dehidrogenaza; GAPDH, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza; GCL, glutamat-cistein ligaza; GGT, gama glutamil transferaza; GSH-Px1, glutation peroksidaza 1; GSH-Px4, glutation peroksidaza 4; GST Mu, glutation S-transferaza mu klase; GST Pi, glutation S-transferaza pi klase; HIF-1 α , hipoksija inducibilni faktor-1 alfa; IDH2, izocitrat dehidrogenaza 2; LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; MCT4, monokarboksilatni transporter 4; ME1, malični enzim 1; MFN1, mitofuzin 1; MFN2, mitofuzin 2; MnSOD, mangan superoksid dismutaza; NNT, nikotinamid nukleotid transhidrogenaza; NOX2, NADPH oksidaza 2; NRF1, nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 1; rNRF1, nukleusni respiratorni faktor 1; NQO1, NAD(P)H:hinon oksidoreduktaza 1; OPA1, *eng.* Optic atrophy protein 1; OXPPOS, oksidativna fosforilacija; pNRF2, fosforilisani nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 2; PFK1, fosfofruktokinaza 1; PFKFB3, 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bisfosfataza 3; PRX3, peroksidredoksin 3; TR, tioredoksin reduktaza; TRX, tioredoksin; TSG101, *eng.* Tumor susceptibility gene 101.

3.5.3. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom

Denzitometrijska analiza dobijenih proteinskih traka rađena je pomoću ImageJ softverskog paketa. Intenzitet zatamnjenja (*eng.* volume) zaokružene trake predstavljen je kao suma svih vrednosti piksela pobuđenih signalom (1 piksel = 0,007744 mm²) unutar trake umanjena za fon pozadine (*eng.* background). Dobijene vrednosti za ciljane proteine normalizovane su u odnosu na vrednosti dobijene za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*eng.* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) ili β-aktin kao konstitutivno eksprimiran protein (*eng.* housekeeping protein).

3.6. Analiza nivoa 4-HNE ELISA metodom

Nivo 4-hidroksinonenala (*eng.* 4-hydroxynonenal, 4-HNE) u uzorcima tumorskog tkiva određivan je pomoću ELISA kita #EN-E-EL-0128 (Elabscience), vodeći se protokolom datim od strane proizvođača. Signal je očitao na 450 nm na čitaču mikroploča Synergy H1 MultiMode (Agilent) pomoću Gen5 softvera. Finalno, koncentracija 4-HNE određena je poređenjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom.

3.7. Analiza aktivnosti enzima antioksidativne odbrane

3.7.1. Katalaza

Aktivnost CAT je određivana po Beutler metodi (Beutler, 1982), koja podrazumeva spektrofotometrijsko praćenje promene u absorbanci H₂O₂ koja se menja usled razgradnje standardne koncentracije H₂O₂ (10 mM) katalazom iz uzorka. Promena absorbance prati se na 230 nm talasne dužine jer tu H₂O₂ ima maksimum apsorpcije. Aktivnost CAT je izračunata pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta za H₂O₂ (0.071), a finalne vrednosti izražene su u jedinicama aktivnosti CAT po mg proteina.

3.7.2. Glutation peroksidaza

Aktivnost enzima GSH-Px je određivana po metodi Paglia i Valentine (Paglia & Valentine, 1967), koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju promene apsorbance NADPH na 340 nm talasne dužine usled njegove oksidacije. NADPH se koristi za redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) pomoću glutation reduktaze, a zatim se GSSG reciklira iz redukovanog glutationa (GSH) pomoću GSH-Px. Aktivnost GSH-Px izražena je u jedinicama po mg proteina, a jedinica aktivnosti GSH-Px je definisana kao 1 nM NADPH oksidovanog u minuti.

3.7.3. Glutation S-transferaza

Aktivnost enzima GST je određena po metodi Habig i saradnika (Habig *et al.*, 1974). GST katalizuje reakciju konjugacije 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa tiolnom (-SH) grupom glutationa, pri čemu nastaje CDNB-glutation konjugat. Aktivnost enzima određena je merenjem promene apsorbance nastalog konjugata na 340 nm. Aktivnost GST je izračunata pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB (9,6), a finalne vrednosti izražene su u nM GSH min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.7.4. Glutation reduktaza

Aktivnost enzima GR određivana je po metodi Glatzle i saradnika (Glatzle *et al.*, 1974), koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju oksidacije NADPH na 340 nm talasne dužine. NADPH se oksiduje prilikom redukcije oksidovanog glutaciona (GSSG) u reakciji koju katalizuje GR. Aktivnost GR izražena je u jedinicama po mg proteina, a jedinica aktivnosti GR je definisana kao 1 nM NADPH oksidovanog u minuti.

3.7.5. Tioeredoksin reduktaza

Aktivnost enzima TR je određena po metodi Luthman i Holmgren (Luthman & Holmgren, 1982). TR katalizuje redukciju disulfidne veze u 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB) do trinitrobenzena (TNB), uz NADPH kao kofaktor. Ova reakcija se prati spektrofotometrijski preko oksidacije NADPH kao povećanje apsorbance na talasnoj dužini od 412 nm tokom prva dva minuta reakcije. Aktivnost TR je izražena u jedinicama po mg proteina, a jedinica aktivnosti TR je definisana kao 1 nM NADPH oksidovanog u minuti.

3.7.6. Superoksid dismutaza

Aktivnost izoformi SOD (MnSOD i CuZnSOD) je određena je po modifikovanoj metodi Misra i Fridovich (Misra & Fridovich, 1972). Ova metoda zasnovana je na sposobnosti SOD da inhibira autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u baznoj sredini, pri čemu se oslobađaju superoksid anjon radikali koji ubrzavaju ovu reakciju. Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 480 nm, a mera aktivnosti enzima je stepen inhibicije reakcije. Jedinica aktivnosti SOD je definisana kao količina proteina koja dovodi do 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearom delu promene apsorbance. Aktivnost SOD izražena je u jedinicama po miligramu proteina.

3.8. Analiza nivoa glutaciona

Količina ukupnog glutaciona (redukovani, GSH i oksidovani, GSSG) određivana je u tkivu po metodi Griffith (Griffith, 1980), nakon precipitacije proteina u uzorku 10% sulfosalicilnom kiselinom. Metoda se zasniva na oksidaciji redukovanog glutaciona (GSH) od strane 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom) (DTNB), pri čemu nastaju 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB) i oksidovani glutacion (GSSG). TNB je jedinjenje žute boje čiji je maksimum apsorpcije na 412 nm i njegova stopa formiranja proporcionalna je koncentraciji GSH u uzorku, koja se može odrediti merenjem promene apsorbance na 412 nm. GR katalizuje redukciju nastalog GSSG do 2 GSH u prisustvu NADPH, a GSH zatim ponovo reaguje sa DTNB i formira TNB. Izmerena količina glutaciona u uzorku predstavlja sumu redukovanog i oksidovanog glutaciona ($[GSH]_{\text{ukupni}} = [GSH] + 2 \times [GSSG]$). Količina glutaciona u uzorcima izračunava se na osnovu linearnog dela prethodno napravljene standardne krive različitih koncentracija GSH, a izražava se u nM GSH g⁻¹ tkiva.

3.9. RT-PCR

Nakon izolacije RNK prema protokolu proizvođača TRIzol™ reagensa (Invitrogen, Life Technologies) i određivanja koncentracije RNK spektrofotometrijskom metodom, 1 µg ukupne RNK je korišćen za sintezu cDNK pomoću kita za reverznu transkripciju i sintezu prvog lanca cDNK (Thermo Fischer Scientific) prema uputstvima proizvođača. Sintetisana cDNK je zatim korišćena kao matrica u RT-PCR. RT-PCR je izvođen pod standardnim uslovima korišćenjem FastStart Essential DNA Green Master kita (Roche) i QuantStudio™ 3 Real-Time PCR aparata (Thermo Fisher Scientific). Sekvence ciljnih gena koje su umnožavane i korišćenih parova prajmera za njihovo

umnožavanje prikazani su u Tabeli 2. Kao standardno eksprimiran gen korišćen je gen za 18S ribozomalnu RNK. Pre reakcije, svaki set prajmera je optimizovan, što je uključivalo određivanje optimalne koncentracije prajmera, MgCl₂ i koncentracije cDNK matrice, verifikacija efikasnosti amplifikacije i nespecifičnog umnožavanja. RT-PCR reakcija je izvedena u duplikatu u ukupnoj zapremini reakcije od 10 µL. Ciljne sekvence su umnožene prema sledećim uslovima reakcije: 15 sekundi denaturacije na 95 °C, 30 sekundi vezivanja prajmera za matricu na 56 °C i 30 sekundi elongacije na 72 °C, u ukupno 40 ciklusa.

Tabela 2. Sekvence parova prajmera koji su korišćeni u RT-PCR.

| Ciljni gen | Sekvence prajmera |
|---------------|---|
| <i>Nrf2</i> | F: 5'-GAG CTA GAT AGT GCC CCT GG-3' R: 5'-CAG GAC TCA CGG GAA CTT CT-3' |
| <i>Cidea</i> | F: 5'-TGC TCT TCT GTA TCG CCC AGT-3' R: GCC GTG TTA AGG AAT CTG CTG-3' |
| <i>PRDM16</i> | F: 5'-CAG CAC GGT GAA GCC ATT C-3' R: 5'-GCG TGC ATC CGC TTG TG-3' |
| <i>18S</i> | F: 5'-GGA AAG CAG ACA TCG ACC TCA-3' R: 5'-AGT TCT CCA GCC CTC TTG GT-3' |

Skraćenice korišćene u tabeli: *Nrf2*, nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 2; *Cidea*, eng. Cell death-inducing DFFA-like effector A; *PRDM16*, eng. PR domain containing 16; *18S*, 18S ribozomalna RNK.

3.10. Analiza lokalizacije proteina mikroskopskim metodama

Parafinski preseći debljine 5 µm korišćeni su za detekciju ekspresije i lokalizacije proteina mikroskopskim metodama. Prethodno, parafinski preseći su sprovedeni kroz rutinski proces deparafinizacije i rehidratacije. Zatim, parafinski preseći su inkubirani 10 min. u 10 mM citratnom puferu (pH 60) na 600 W u mikrotalasnoj i ispirani TBS puferom kako bi se otkrili epitopi, odnosno mesta vezivanja antigena.

3.10.1. Imunohistohemijska lokalizacija proteina

Imunohistohemijska analiza za detekciju ekspresije i lokalizacije proteina rađena je na polutankim presećima debljine 2 µm. Preseći su prethodno sprovedeni kroz rutinski proces skidanja smole u zasićenom rastvoru natrijum etoksida i rehidratacije. Zatim, preseći su inkubirani 10 min. u 10 mM citratnom puferu (pH 60) na 600 W u mikrotalasnoj i ispirani TBS puferom kako bi se otkrili epitopi, odnosno mesta vezivanja antigena. ABC kit (Abcam) je korišćen za imunodetekciju proteina u uzorcima streptavidin-biotin-peroksidaza metodom prema protokolu proizvođača. Nespecifična mesta vezivanja antitela blokirana su inkubacijom preseka u Protein Block rastvoru albumina (Abcam) na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Preseći su inkubirani preko noći na 4 °C sa primarnim antitelima: PCNA (sc-7907, 1:200), NRF2 (ab31163, 1:100), MnSOD (ab13533, 1:100), CuZnSOD (ab13498, 1:250), MCT1 (ab238825, 1:250), MCT4 (ab74109, 1:250) i CAIX (E-AB-64788, 1:250). Preseći su zatim isprani u Tris puferu sa dodatkom Tween 20 deterdženta i inkubirani 10 min. na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim anti-mišjim ili anti-zečjim antitelima (1/20) 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije i ponovnog ispiranja, preseći su inkubirani sa streptavidinom konjugovanim sa peroksidazom na sobnoj temperaturi tokom 10 min.

Mesta vezivanja primarnih antitela za ciljne proteine na tkivnim presecima detektovana su inkubacijom sa 0,05% 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) (DAB kit, Agilent Technologies) u prisustvu 0,012% H₂O₂, u mraku do pojave reakcije. Razvijanje bojene reakcije prekinuto je ispiranjem vodom sa česme, a preseći su zatim kontrastirani hematoksilinom. Nakon rutinske dehidratacije kroz seriju etanola rastuće koncentracije, napravljeni su trajni preparati montiranjem preseka u DPX medijumu (distiren i ksilen; Sigma-Aldrich). Uzorci su dalje analizirani na DMLB svetlosnom mikroskopu opremljenim digitalnom kamerom DFC295 za snimanje mikrografija (Leica Microsystems). Kako bi se utvrdila specifičnost antitela, kontrolni preseći bez inkubacije sa primarnim ili sekundarnim antitelima su takođe analizirani imunohistohemijski. Intenzitet DAB bojenja kvantifikovan je pomoću ImageJ softvera. Regioni od interesa (*eng.* Regions of interest, ROI) su nasumično selektovani uz pomoć *Polygon Tool*. Slike su konvertovane u 8-bitne crno-bele slike i invertovane kako bi se pojačali DAB-pozitivni regioni. Merene su srednje vrednosti sivih površina, oduzimajući signal iz pozadine (*eng.* background) radi korekcije.

3.10.2. Imunofluorescentna lokalizacija proteina

Obrasci ćelijske lokalizacije i kolokalizacije ciljnih proteina u tumorskom tkivu analizirani su konfokalnom mikroskopijom. Nakon otkrivanja antigena i ispiranja u TBS puferu, serijski parafinski preseći debljine 5 µm inkubirani su u 10% normalnom kozjem serumu i 1% BSA u TBS sa dodatkom Tween 20 na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta kako bi se blokirala nespecifična mesta vezivanja antitela. Preseći su zatim inkubirani preko noći sa odgovarajućim primarnim antitelima na 4 °C: CAT (ab1877, 1:100), 4-HNE (ab46545, 1:100), GSH-Px4 (sc-166570, 1:100), DRP1 (FNab02541, 1:100, osim kod kolokalizacije DRP1/OPA1, gde je korišćen sc-271583, 1:100), MFN1 (FNab05150, 1:100), VDAC1 (sc-390996, 1:100), OPA1 (ab157457, 1:100), ATPB (ab14730, 1:100), PFKFB3 (ab181861, 1:100), Insulin (ab6995, 1:100), GLUT1 (ab115730, 1:100), GLUT4 (ab654, 1:100), MCT1 (ab238825, 1:100), MCT4 (ab74109, 1:100) i CAIX (E-AB-64788, 1:100). Nakon ispiranja, preseći su inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa fluorohromima na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta u mraku (A-11029, 1:400, Alexa Fluor® 488 kozje anti-mišje; A-11034, 1:400, Alexa Fluor® 488 kozje anti-zečje; A-21052, 1:400, Alexa Fluor® 633 kozje anti-mišje; A-21071, 1:400, Alexa Fluor® 633 kozje anti-zečje, Life Technologies). Nakon dva ispiranja u TBS puferu sa dodatkom Tween 20 deterdženta, i jednog u TBS, preseći su inkubirani 5 minuta sa fluorescentnom bojom Sytox Orange (S11368, 1/1000, Thermo Fisher Scientific) za kontrastiranje nukleusa. Nakon ponovnog ispiranja u TBS, Mowiol (Polysciences) je korišćen kao medijum za montiranje. U zavisnosti od porekla primarnih antitela, korišćene su dve metode: metod dvostruke simultane imunofluorescencije (ako primarna antitela potiču iz različitih domaćina) i metod dvostruke sekvencijalne imunofluorescencije (ako primarna antitela potiču iz istog domaćina). Leica TCS SP5 II konfokalni laser skenirajući mikroskop (Leica Microsystems) korišćen je u sekvencijalnom modu kako bi se izbeglo preklapanje između različitih kanala. Dvojno obojeni uzorci su ekscitovani Ar laserom na 488 nm i HeNe laserom na 633 nm, a nukleusne boje su ekscitovane HeNe laserom na 543 nm. Kao negativne kontrole korišćeni su preseći koju su podvrgnuti istoj proceduri bez dodavanja primarnih antitela.

Kvantifikacija intenziteta imunofluorescence dobijena je pomoću ImageJ softvera (FIJI). Leica.lif slike su importovane pomoću Bio-Formats dodatka (*eng.* plugin), a individualni fluorescentni kanali su razdvojeni. Intenzitet imunofluorescence je izmeren u pet nasumično izabranih ROI po slici koristeći *ROI Manager tool*. Izračunata je srednja vrednost za svaku ROI i oduzet signal pozadine (*eng.* background), a dobijene vrednosti su dalje statistički analizirane. Za statističku analizu korišćeno je 15 ROI po eksperimentalnoj grupi. Svi parametri slikanja (vreme ekspozicije, jačina lasera, amplifikacija signala) bili su konstanti za sve uzorke. Kolokalizacione analize urađene su pomoću ImageJ (FIJI) softvera sa Coloc 2 dodatkom (*eng.* plugin) kako bi se kvantifikovale prostorne korelacije između 2 fluorescentna signala. Coloc 2 korišćen je za preračunavanje Pirsonovog koeficijenta korelacije (*eng.* *Pearson's correlation coefficient*, R), koji

određuje linearnu korelaciju između signala na 2 kanala u svakom ROI. Costes' test randomizacije primenjen je kako bi se utvrdio značaj kolokalizacije. Finalne R vrednosti su dalje statistički analizirane. Coloc 2 korišćen je i za preračunavanje Mandersovog koeficijenta (*eng. Manders' coefficient*, M1), koji određuje proporciju signala u prvom kanalu koji kolokalizuje sa signalom u drugom kanalu u svakom ROI. Dobljene M1 vrednosti su izražene kao procenti i stepeni kolokalizacije su podeljeni u tri klase u zavisnosti od M1 procenata: niska (0-33%), srednja (34-66%) i visoka (67-100%). Pomoću ovih kategorija opisana je distribucija stepena/nivoa kolokalizacije u različitim eksperimentalnim grupama.

3.10.3. Elektronska mikroskopija

Prethodno ukalupljeni uzorci u epoksidnu smolu su isečeni pomoću ultramikrotoma Leica UC6 (Leica Microsystems) na preseke debljine 80 nm, stavljeni na bakarne mreže i kontrastirani sa UA-Zero (Agar Sci). Transmisioni elektronski mikroskop Philips CM12 (Philips/FEI) sa digitalnom kamerom korišćen je za slikanje. Dijametar mitohondrija meren je u triplikatu, gde je nasumično izabrano 40 mitohondrija po eksperimentalnoj grupi. Sve analize i merenja rađena su putem iTEM softvera (Olympus Soft Imaging Solutions).

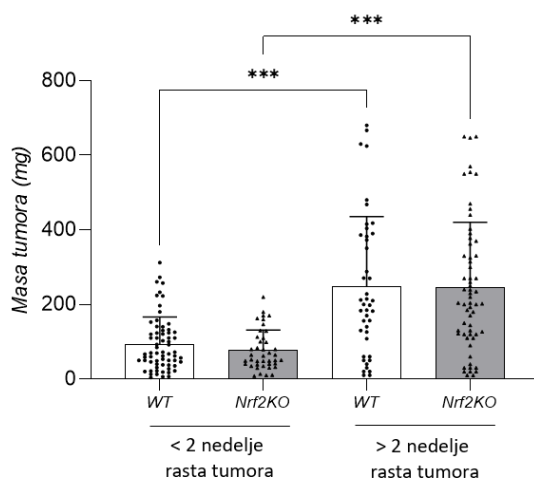
3.11. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza dobijenih rezultata rađena je pomoću GraphPad Prism Software 9. Anderson-Darling, D'Agostino i Pearson, Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov testovi korišćeni su za ispitivanje normalnosti raspodele. Parametarska i neparametarska dvofaktorska analiza varijanse (*eng. Two-way ANOVA*) praćena Tukey testom za višestruka poređenja korišćena je za poređenje varijanse između grupa i utvrđivanje statističke značajnosti u *in vivo* animalnoj studiji. Parametarska jednofaktorska analiza varijanse (*eng. One-way ANOVA*) praćena Tukey testom za višestruka poređenja korišćena je za poređenje varijanse između grupa i utvrđivanje statističke značajnosti u *in vitro* studiji, kao i prilikom poređenja razlika u masama tumora, relativnim masama CAAT i iWAT i telesnim masama miševa. Za statističku značajnost prihvaćene su vrednosti verovatnoće $p < 0.05$. Dobljeni podaci predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (\pm SD).

4. REZULTATI

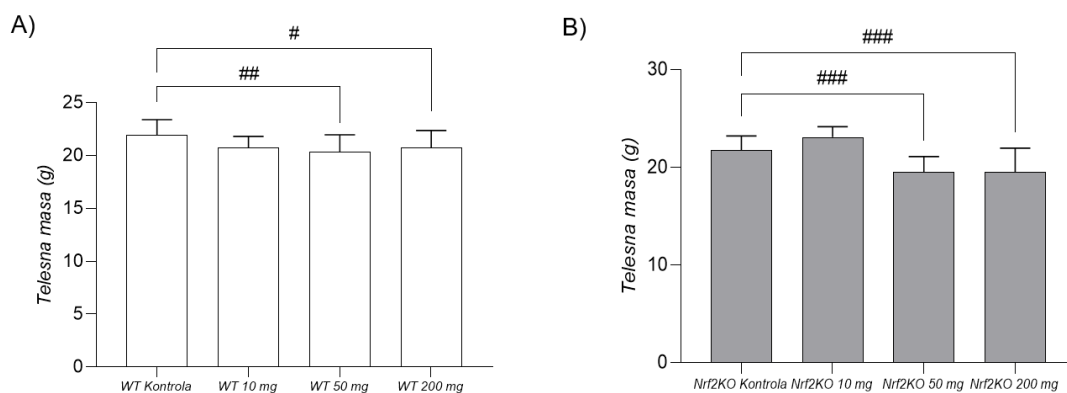
4.1. Promene telesne mase, mase tumora i relativne mase kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva kod WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Rast tumora u ortotopskom modelu kancera dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa praćen je u dve faze rasta, < 2 nedelje i > 2 nedelje nakon inicijacije tumora. Uočen je trend manjih masa tumora u ranim danima rasta tumora (< 2 nedelje) kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa WT miševima, međutim, sa daljim rastom tumora ta razlika nestaje (Slika 6).



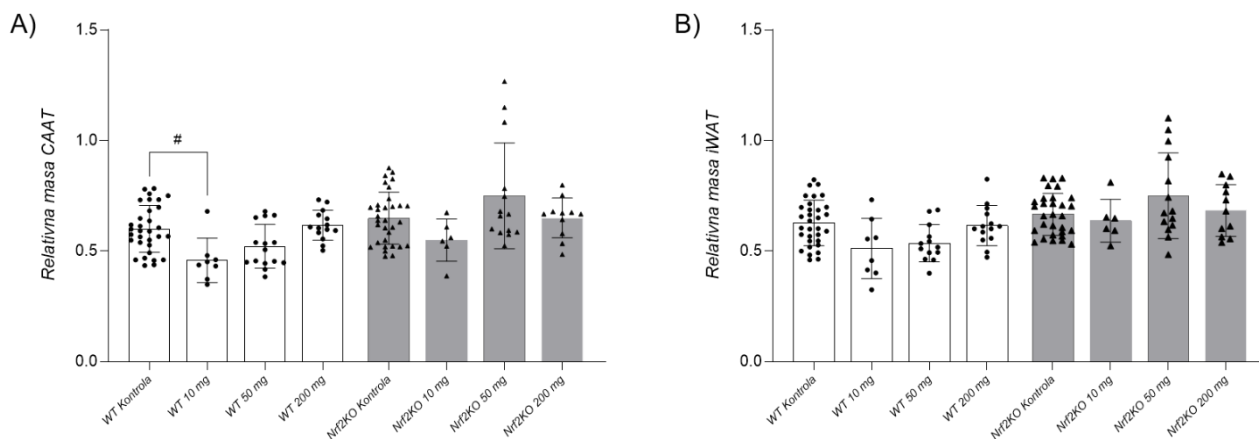
Slika 6. Razlike u masi tumora između WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa u periodu manjem i većem od 2 nedelje rasta tumora. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje veličine tumora kod miševa istog genotipa tokom različitog vremenskog perioda, *** $p < 0.001$.

Na Slici 7 prikazane su promene telesne mase kod WT miševa i *Nrf2*KO miševa tokom eksperimenta. Masa WT miševa sa tumorima od 50 i 200 mg značajno je bila smanjena u odnosu na kontrolne WT miševe bez tumora (Slika 7A). Isti trend primećen je i kod *Nrf2*KO miševa (Slika 7B), s tim da je umanjjenje mase kod ovih miševa bilo većeg stepena ($p < 0.001$) nego kod WT miševa.



Slika 7. Telesna masa (A) WT miševa i (B) *Nrf2*KO miševa tokom eksperimenta (kontrolni miševi bez tumora, miševi sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg). Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. # Poređenje sa respektivnom kontrolnom grupom miševa bez tumora, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$.

Istovremeno, relativna masa kancer-asociranog masnog tkiva bila je značajno niža kod WT miševa sa tumorima od 10 mg u poređenju sa kontrolnim WT miševima bez tumora, dok *Nrf2*KO miševi nisu pokazali značajne razlike u relativnoj masi CAAT tokom eksperimenta (Slika 8A). Sa druge strane, relativna masa iWAT ostala je nepromenjena kod miševa oba genotipa (Slika 8B).

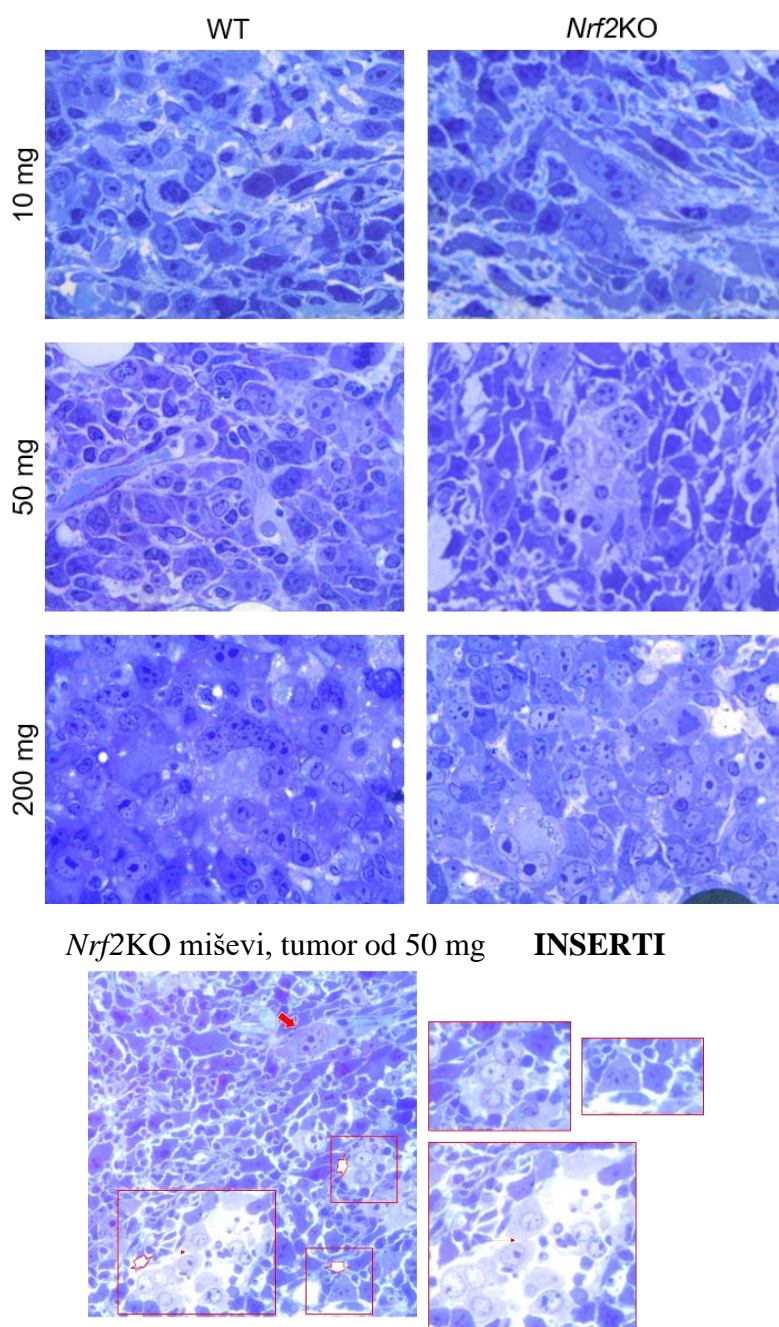


Slika 8. Relativna masa (A) kancer-asociranog masnog tkiva i (B) kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. # Poređenje sa respektivnom kontrolnom grupom miševa bez tumora, # $p < 0.05$.

4.2. Opšte morfološke karakteristike tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

4.2.1. Morfološka analiza tumorskog tkiva

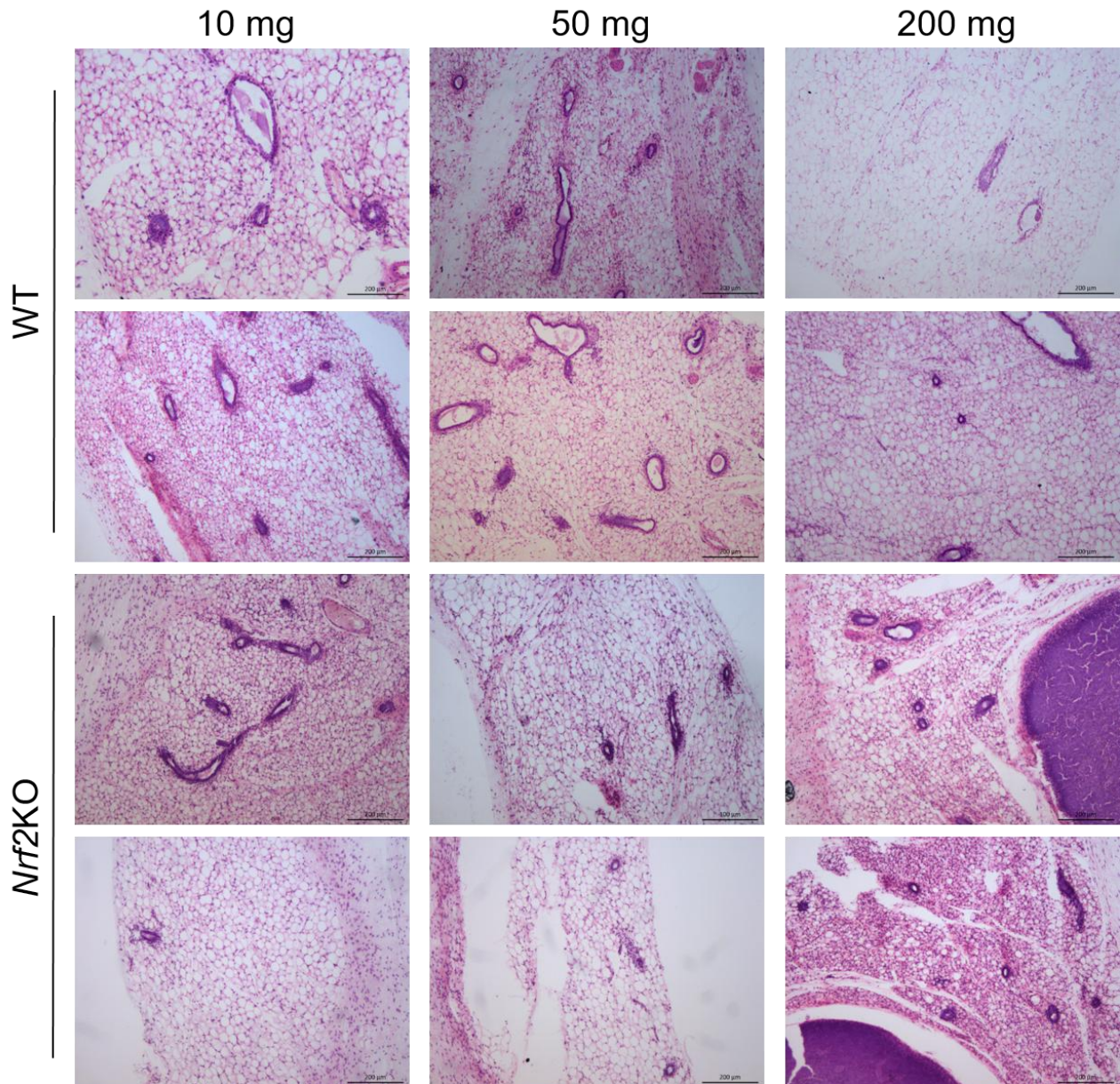
Svetlosnom mikroskopijom analizirana je opšta strukturalna slika tumorskog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg (Slika 9). U obe grupe, morfologija tkiva menjala se sa rastom tumora dojke. Samo u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa (tumori od 50 i 200 mg) uočene su izrazito krupne, odnosno gigantske kancerske ćelije, koje su najverovatnije posledica ćelijske fuzije, jer se uočavaju fuzioni kontakti i višestruki nukleusi (Slika 9, inserti).



Slika 9. Svetlosna mikroskopija na presecima tumorskog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Na insertima su prikazane uveličane sekcije tumorskog tkiva *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 50 mg. Crvena strelica, gigantske kancerske ćelije; bele strelice, ćelijska fuzija; crvena strelica na insertu, fuzioni kontakti. Uvećanje: x40.

4.2.2. Morfološka analiza kancer-asociranog masnog tkiva

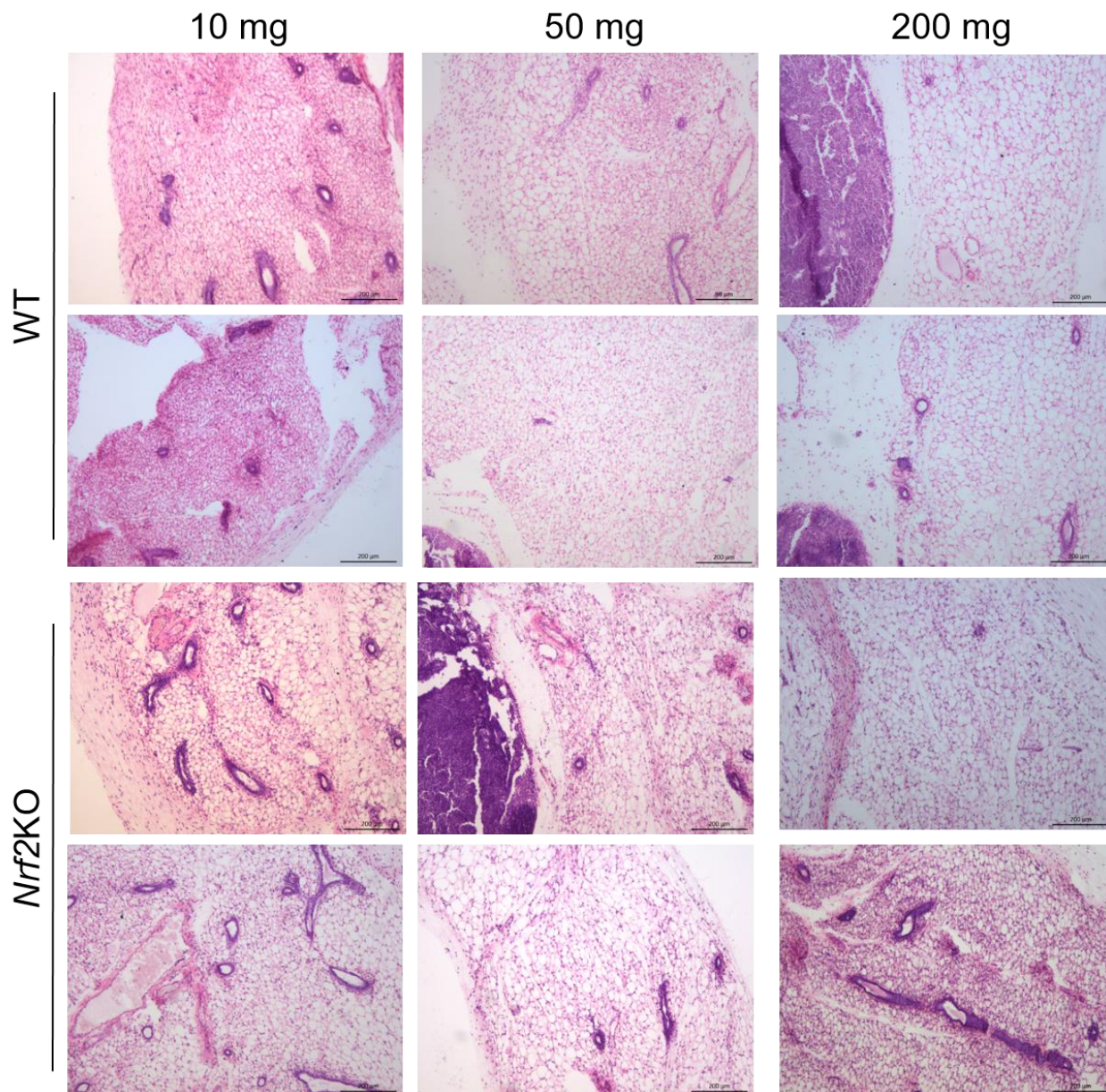
Na Slici 10 prikazana je analiza hematoksilin-eozin bojenjem kancer-asociranog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. U ranim fazama rasta tumora (tumori mase 10 mg) se ne uočava razlika između CAAT WT i *Nrf2*KO miševa, dok se sa daljim porastom mase tumora (tumori mase 50 i 200 mg) uočava infiltracija imunskim ćelijama i multilokularnost adipocita.



Slika 10. Hematoksilin-eozin bojenje kancer-asociranog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Uvećanje: x10, orig. Bar: 200 µm.

4.2.3. Morfološka analiza kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva

Na Slici 11 prikazana je analiza hematoksilin-eozin bojenjem kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (tumori mase 10, 50 i 200 mg). Za razliku od CAAT, uočene su razlike između iWAT WT i *Nrf2*KO miševa. iWAT je kod WT miševa sa tumorima od 10 mg bilo multilokulusno, a zatim je poprimilo većinski unilokulusnu morfologiju pri daljem rastu tumora (tumori mase 50 i 200 mg). U *Nrf2*KO miševima sa tumorima mase 10 mg, iWAT je bilo unilokulusno tkivo, da bi sa daljim rastom tumora (tumori mase 50 i 200 mg) prešlo u većinski multilokulusno tkivo.

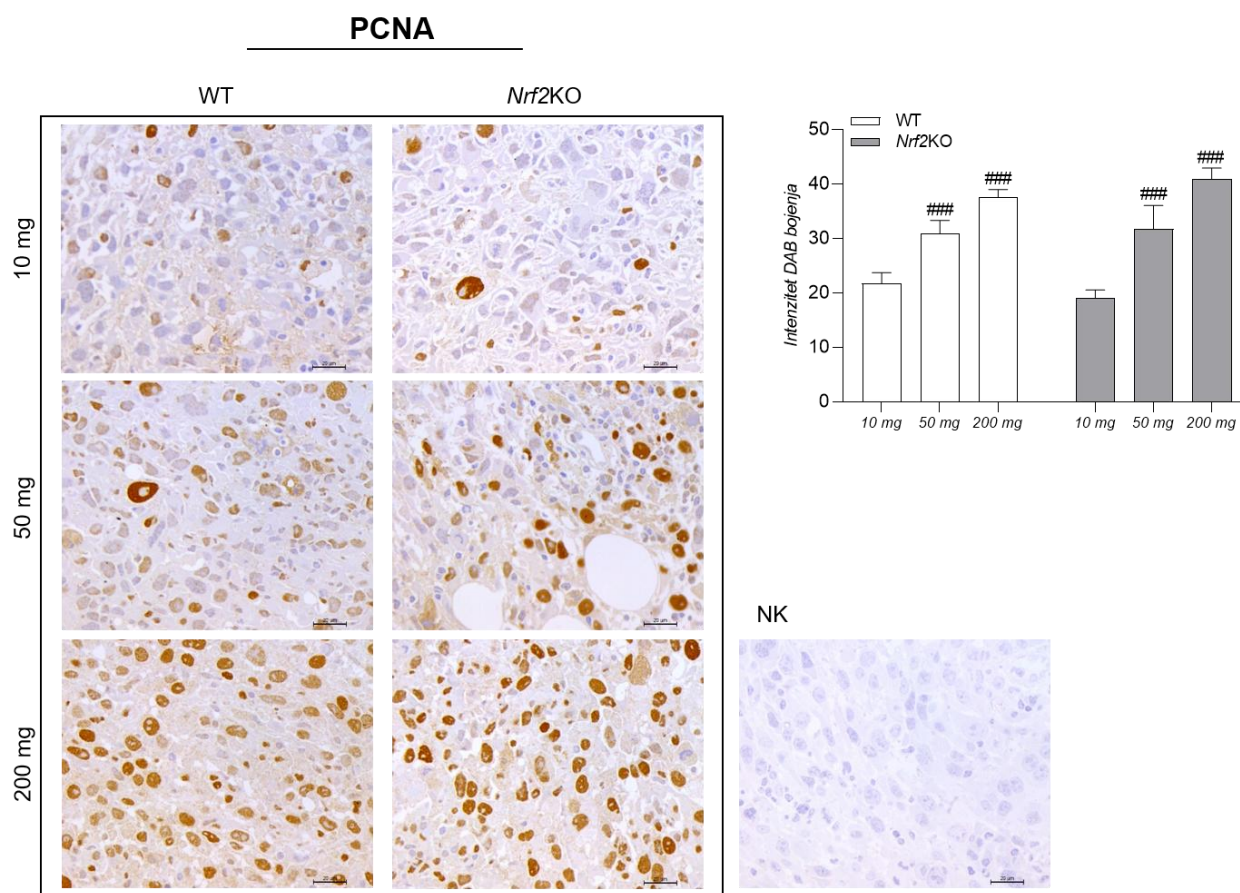


Slika 11. Hematoksilin-eozin bojenje kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Uvećanje: x10, orig. Bar: 200 µm.

4.3. Ortotopski model kancera dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa

4.3.1. Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije proliferativnog ćelijskog nukleusnog antigena (PCNA) u tumorskom tkivu dojke

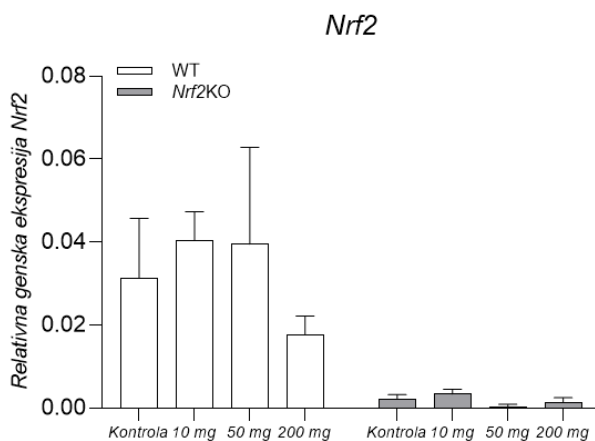
Imunohistohemijska analiza proteinske ekspresije i tkivne lokalizacije proliferativnog markera PCNA (*eng.* Proliferating cell nuclear antigen) u tumorskom tkivu prikazana je na Slici 12. Takođe, na grafiku je prikazan intenzitet diaminobenzidin (DAB) bojenja, odnosno kvantifikacija imunopozitivnosti PCNA u tumorskom tkivu dojke. Uočena je povećana proteinska ekspresija PCNA u nukleusima sa rastom tumora i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa, potvrđujući prisustvo proliferacije kancerskih ćelija i rasta tumora kod oba genotipa miševa. Pored toga, PCNA-pozitivni nukleusi pokazali su plejomorfizam, što ukazuje na proliferaciju različitih tipova ćelija unutar tumorskog tkiva.



Slika 12. Imunohistohemijska detekcija PCNA na presecima tumorskog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Grafik prikazuje kvantifikaciju imunopozitivnosti PCNA u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. NK, negativna kontrola. Uvećanje: x100 orig. Bar: 20 µm. # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora (tumori mase 10 mg), ###p < 0.001.

4.3.2. Genska ekspresija transkripcionog faktora *Nrf2* u kancer-asociranom masnom tkivu

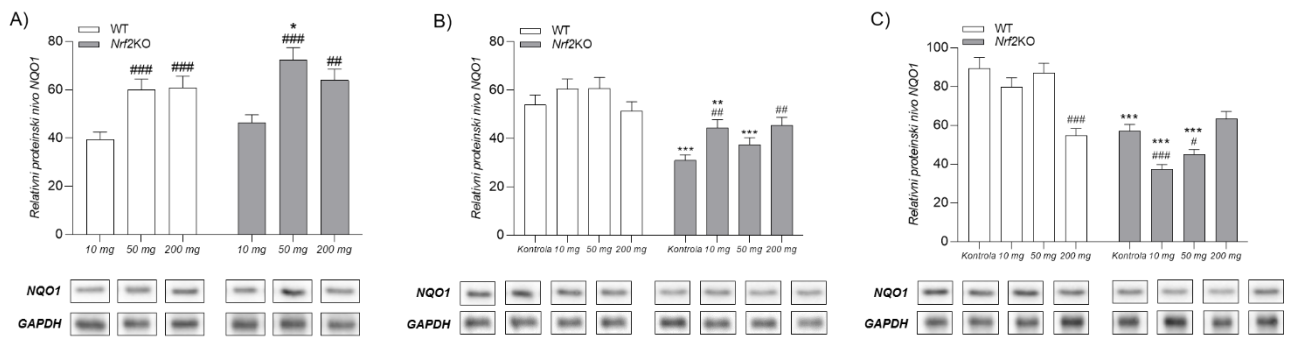
Model *Nrf2*KO miševa potvrđen je i RT-PCR analizom genske ekspresije transkripcionog faktora NRF2 u kancer-asociranom masnom tkivu (Slika 13). Ciljni prajmeri targetovali su sekvencu *Nrf2* koja je izmenjena kod *Nrf2*KO miševa. Kod WT miševa, u CAAT je uočena nepromenljiva genska ekspresija *Nrf2* u kontrolnim miševima bez tumora, kao i sa rastom tumora, dok je u CAAT *Nrf2*KO miševa potpuno izostala genska ekspresija *Nrf2* usled targetovanja izmenjene sekvence kod ovih miševa.



Slika 13. Relativna genska ekspresija *Nrf2* u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg.

4.3.3. Proteinski nivo NQO1 u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu

Da bismo utvrdili razlike u transkripcionoj aktivnosti NRF2 između *Nrf2*^{+/+} tumorskog tkiva dojke i *Nrf2*^{-/-} CAAT i iWAT, analizirali smo proteinski nivo direktnog targeta NRF2, NQO1, u ovim tkivima sa rastom tumora kod WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 14). Proteinski nivo NQO1 u tumorskom tkivu se značajno povećao i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 50 mg i 200 mg (Slika 14A). Nasuprot tome, CAAT WT miševa nije pokazivao promene u proteinskim nivoima NQO1 sa rastom tumora, dok je CAAT *Nrf2*KO miševa pokazao značajno niže proteinske nivoe NQO1 u poređenju sa odgovarajućim grupama WT miševa, sve do miševa sa tumorima od 200 mg, gde ta razlika više nije bila prisutna (Slika 14B). Sličan obrazac proteinskog nivoa NQO1 primećen je i u iWAT (Slika 14C), koje takođe pokazuje niže proteinske nivoe NQO1 kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa respektivnim WT grupama, osim u odnosu na iWAT WT miševa sa tumorima mase 200 mg. Ipak, iWAT WT miševa pokazuje obrazac smanjenja proteinskog nivoa NQO1 sa rastom tumora u odnosu na kontrolne miševe bez tumora. Dodatno, dok je u CAAT *Nrf2*KO miševa pokazano povećanje proteinskog nivoa NQO1 u odnosu na kontrolne miševe bez tumora, kod iWAT *Nrf2*KO miševa uočeno je smanjenje proteinskog nivoa NQO1 u odnosu na kontrolne *Nrf2*KO miševe bez tumora.

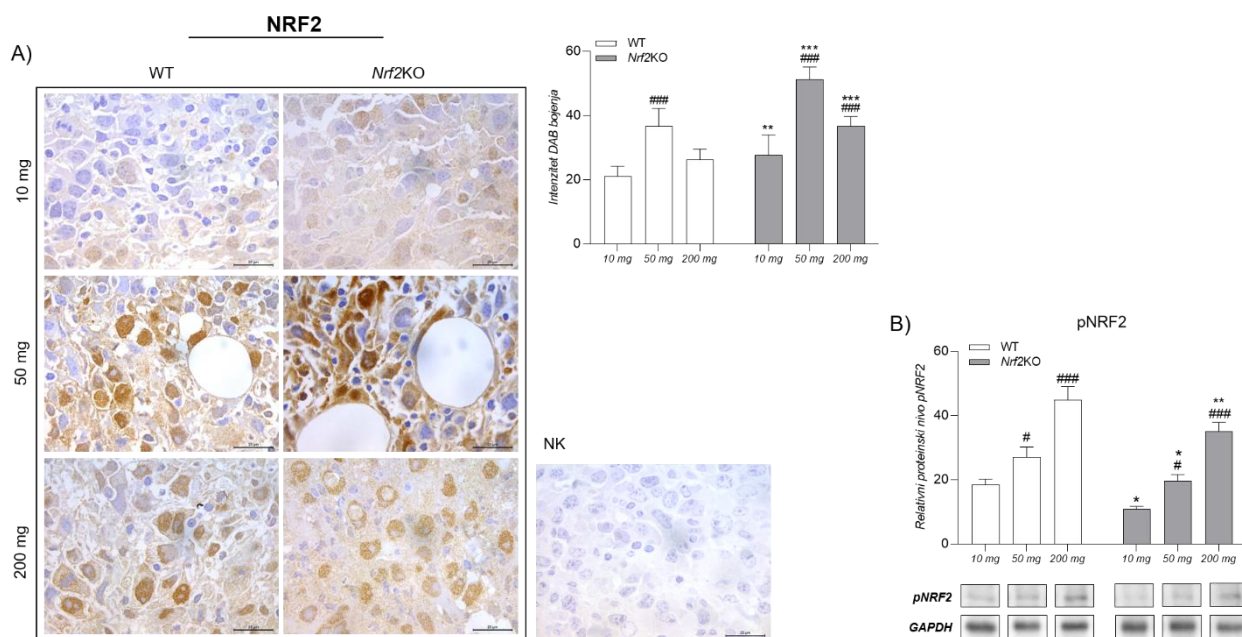


Slika 14. Proteinski nivo NQO1 u (A) tumorskom tkivu, (B) kancer-asociranom masnom tkivu i (C) kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora (B,C) i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg (A,B,C). Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg) (A) ili kontrolom bez tumora (B,C), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4. Redoks profili tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

4.4.1. Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije NRF2 u tumorskom tkivu dojke

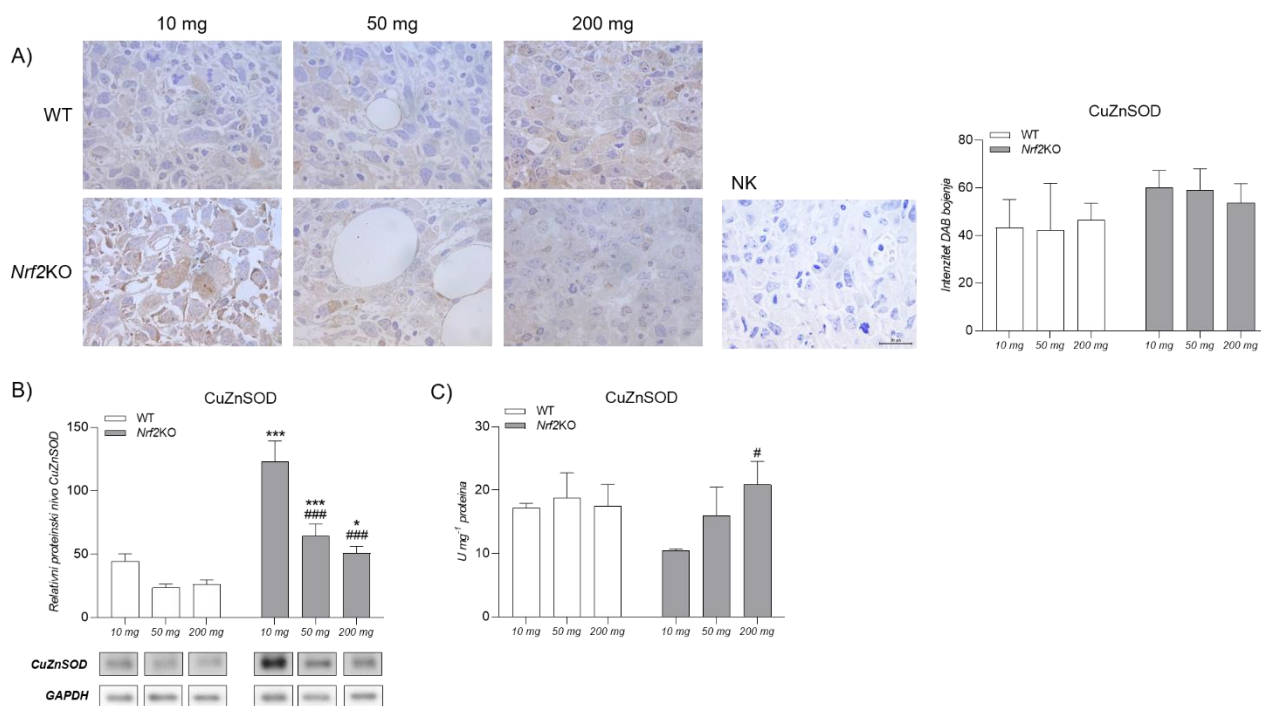
Proteinska ekspresija, tkivna i ćelijska lokalizacija NRF2 u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa ispitivani su imunohistohemijskom i Western blot analizom tokom rasta tumora (Slika 15). Slika 15A pokazuje veću nukleusnu imunoreaktivnost NRF2 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa respektivnim WT grupama tokom eksperimenta. Povećanje nivoa ekspresije NRF2 uočava se sa rastom tumora (tumori od 50 mg) kod oba genotipa miševa u poređenju sa tumorima od 10 mg. Međutim, tumori od 200 mg pokazali su značajno povećane nivoe ekspresije NRF2 u odnosu na tumore od 10 mg samo kod *Nrf2*KO miševa. Pored toga, proteinski nivo aktivnog nukleusnog oblika, fosforilisanog NRF2 (*eng.* phosphorylated NRF2, pNRF2) povećavao se u tumorskom tkivu WT miševa sa rastom tumora, a sličan obrazac je uočen i za pNRF2 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa, ali na značajno nižem nivou u poređenju sa respektivnim WT grupama (Slika 15B).



Slika 15. (A) Imunohistohemijska detekcija NRF2 na presecima tumorskog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Grafik prikazuje kvantifikaciju imunopozitivnosti NRF2 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Uvećanje: x100 orig. Bar: 20 μ m. (B) Proteinski nivo pNRF2 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno ekspimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$.

4.4.2. Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije CuZnSOD u tumorskom tkivu dojke

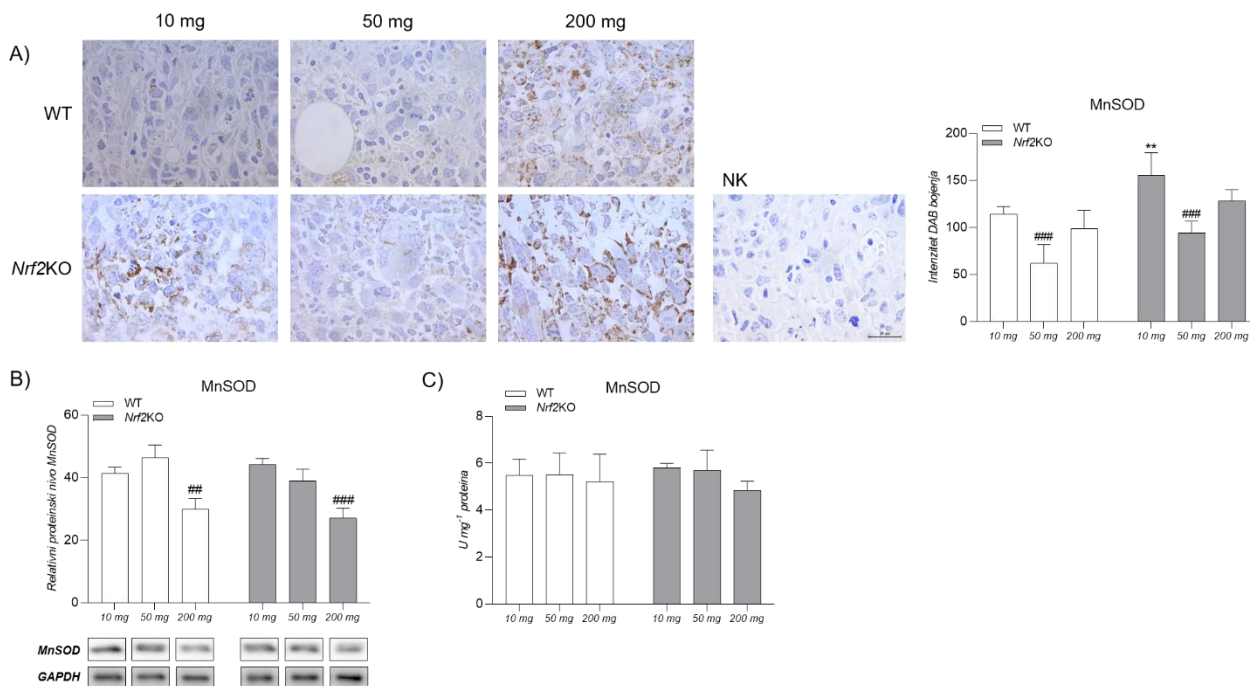
Imunohistohemijska analiza proteinske ekspresije i tkivne lokalizacije CuZnSOD, Western blot analiza i aktivnost CuZnSOD prikazani su na Slici 16. Imunopozitivnost CuZnSOD (Slika 16A) bila je u skladu sa proteinskim nivoima CuZnSOD (Slika 16B), pokazujući povećanje u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa 10 mg tumorima kod WT miševa. Proteinski nivoi CuZnSOD su se zatim smanjivali sa rastom tumora (tumori od 50 mg i 200 mg) kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa inicijalnom fazom rasta tumora (tumori od 10 mg), ali su i dalje ostajali značajno viši nego kod respektivnih grupa WT miševa. Aktivnost CuZnSOD u tumorskim tkivima pokazala je povećanje sa rastom tumora samo kod *Nrf2*KO miševa, i to u grupi sa tumorima mase 200 mg (Slika 16C).



Slika 16. (A) Imunohistohemijska detekcija, (B) proteinski nivo i (C) enzimaska aktivnost CuZnSOD u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. NK, negativna kontrola. Uvećanje: x40 orig. Bar: 50 μ m. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$.

4.4.3. Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije MnSOD u tumorskom tkivu dojke

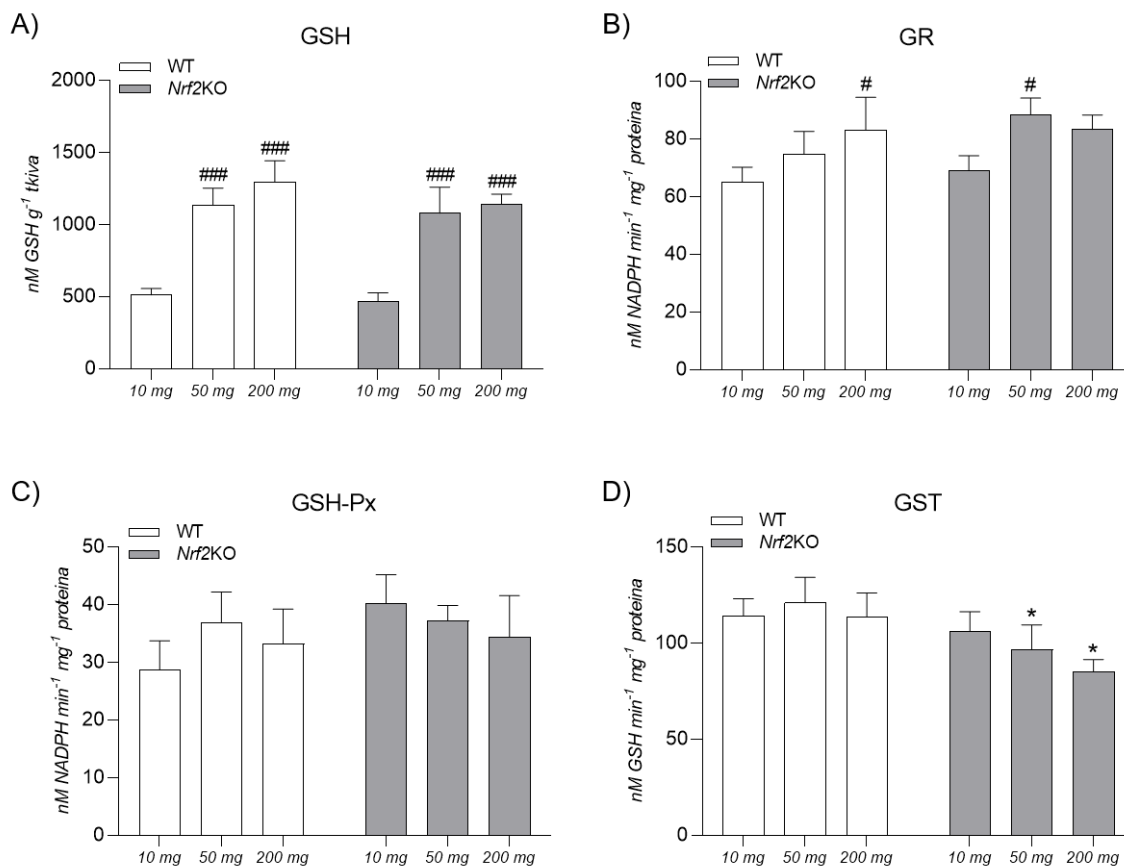
Imunohistohemijska analiza proteinske ekspresije i tkivne lokalizacije MnSOD, Western blot analiza i aktivnost MnSOD prikazani su na Slici 17. Za razliku od CuZnSOD, MnSOD je pokazao smanjenu imunopozitivnost u tumorima od 50 mg kod oba genotipa miševa (Slika 17A), što je bilo u skladu sa smanjenim proteinskim nivoima MnSOD u tumorima od 200 mg kod miševa oba genotipa u odnosu na inicijalnu fazu rasta tumora (tumori od 10 mg) (Slika 17B). Promene u enzimskoj aktivnosti MnSOD nisu uočene ni u jednoj grupi tokom eksperimenta (Slika 17C).



Slika 17. (A) Imunohistohemijska detekcija, (B) proteinski nivo i (C) enzimska aktivnost MnSOD u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. NK, negativna kontrola. Uvećanje: x40 orig. Bar: 50 μ m. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (10 mg), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

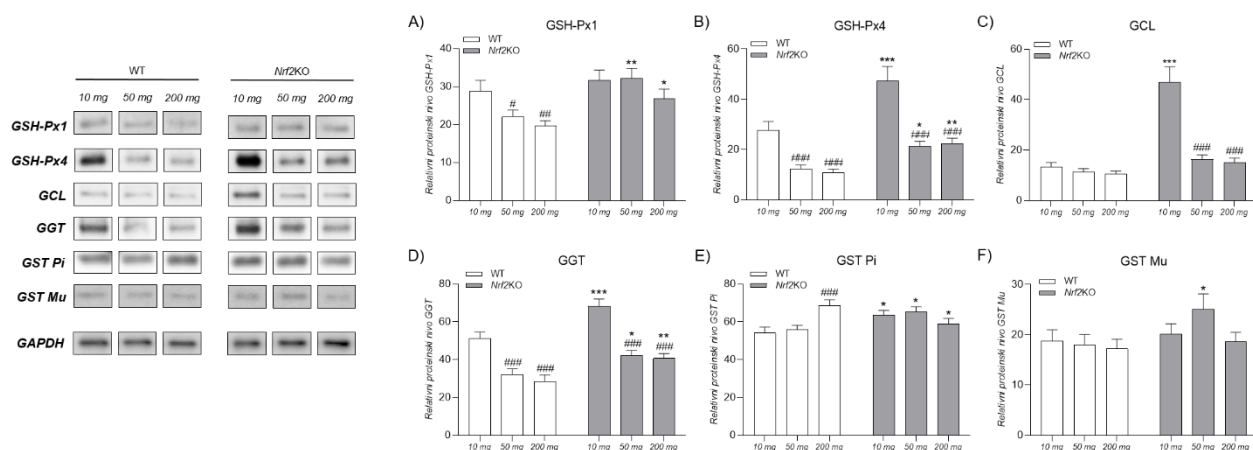
4.4.4. GSH-zavisni antioksidativni sistem u tumorskom tkivu dojke

Slika 18 prikazuje nivoe GSH i aktivnost enzima antioksidativnog sistema baziranog na GSH u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke. Nivoi GSH i aktivnost GR pokazali su promene zavisne od rasta tumora, značajno se povećavajući u tumorima od 50 mg i 200 mg u odnosu na 10 mg tumore miševa istog genotipa (Slika 18A,B). Sa druge strane, aktivnost GST nije se menjala kod WT miševa sa rastom tumora, ali je bila značajno manja u tumorskim tkivima *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 50 i 200 mg u poređenju sa respektivnim grupama WT miševa (Slika 18D). Međutim, nisu uočene razlike u aktivnosti GSH-Px između tumorskih tkiva WT i *Nrf2*KO miševa, kao ni promene sa rastom tumora (Slika 18C).



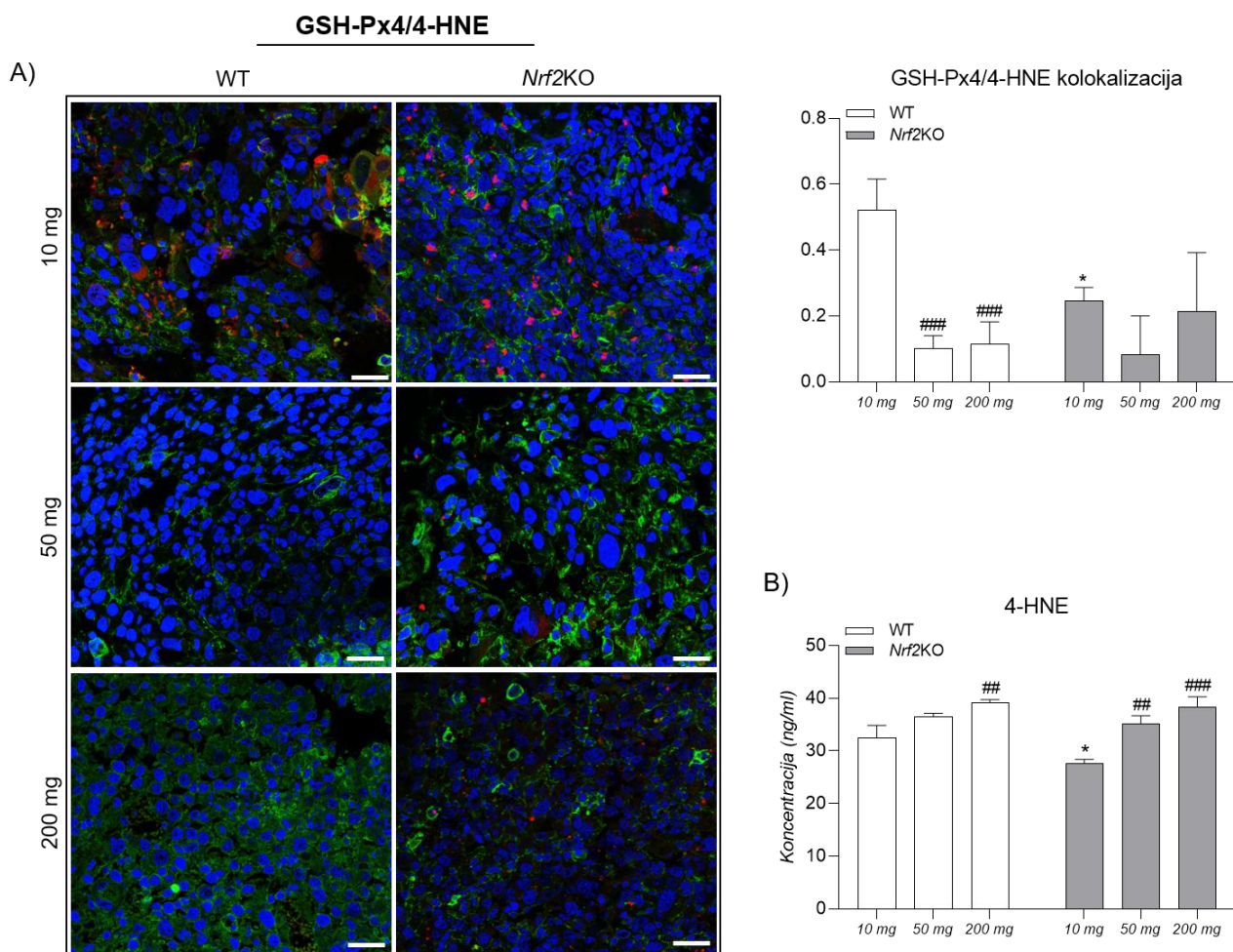
Slika 18. (A) Nivo GSH i enzimska aktivnost (B) GR, (C) GSH-Px i (D) GST u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$.

Izoforme GST pokazale su različite obrasce proteinskih nivoa u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa. Proteinski nivo GST Pi bio je značajno povećan u tumorima od 200 mg kod WT miševa (Slika 19E). Proteinski nivoi GST Pi bili su inicijalno viši u tumorskim tkivima *Nrf2*KO miševa u poređenju sa WT miševima (tumori mase 10 mg), sve do kasnijih faza rasta tumora (200 mg). Sa druge strane, izoforma GST Mu nije pokazala nikakve promene u proteinskom nivou tokom eksperimenta, izuzev povećanja u tumorima od 50 mg u odnosu na tumore od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa (Slika 19F). Nasuprot tome, proteinski nivo GSH-Px1 značajno se smanjio sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg) u tumorskom tkivu WT miševa, dok su kod *Nrf2*KO miševa ostali konstantni, ali i dalje značajno viši nego kod respektivnih grupa WT miševa (Slika 19A). Slično tome, proteinski nivo GSH-Px4 bio je značajno smanjen u tumorima mase 50 i 200 mg u odnosu na tumore mase 10 mg kod WT miševa (Slika 19B). Sličan opadajući profil uočen je i kod *Nrf2*KO miševa, iako su oni pokazali znatno viši proteinski nivo GSH-Px4 u tumorima svih masa u poređenju sa istim grupama WT miševa. Proteinski nivo GGT je takođe bio značajno niži u tumorima od 50 mg i 200 mg WT i *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima od 10 mg kod miševa istog genotipa, iako su proteinski nivoi GGT bili značajno viši u tumorima svih masa kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa respektivnom grupama WT miševa (Slika 19D). Slično, proteinski nivo GCL bio je značajno viši u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa istom grupom WT miševa, dok su se kod *Nrf2*KO miševa značajno smanjili u tumorima od 50 mg i 200 mg u poređenju sa tumorima od 10 mg (Slika 19C).



Slika 19. Proteinski nivoi (A) GSH-Px1, (B) GSH-Px4, (C) GCL, (D) GGT, (E) GST Pi i (F) GST Mu u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojkve (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

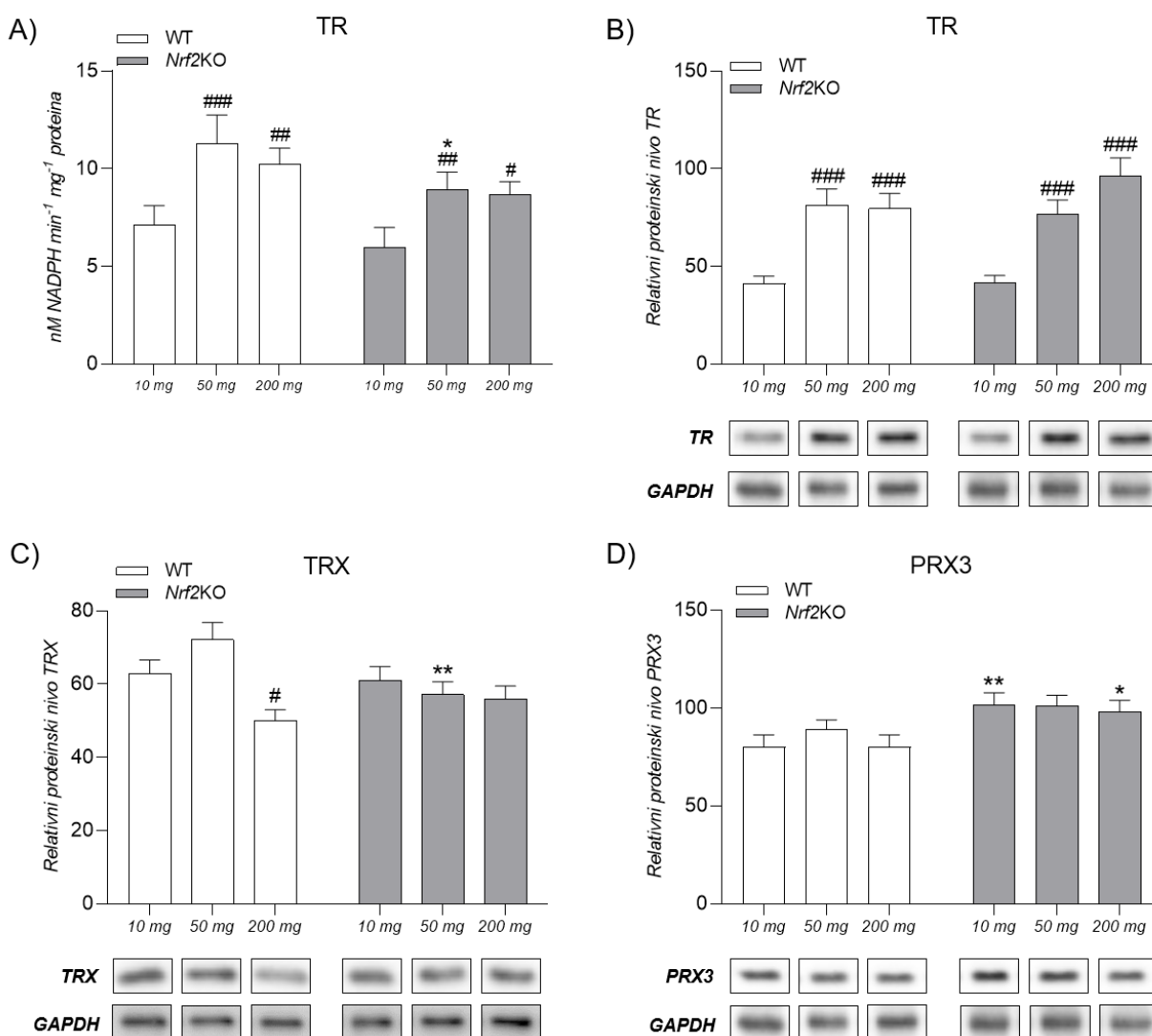
Analiza kolokalizacije GSH-Px4 i markera lipidne peroksidacije 4-HNE (Slika 20A) pokazala je različite profile kod WT i *Nrf2*KO miševa u tumorima od 10 mg, gde je njihova kolokalizacija bila značajno smanjena kod *Nrf2*KO miševa u odnosu na WT miševe. Sa rastom tumora, nivo kolokalizacije GSH-Px4 i 4-HNE se značajno smanjio u tumorskom tkivu WT miševa, dok je kod *Nrf2*KO miševa ostao nepromenjen. Paralelno sa tim, nivoi 4-HNE u tumorskim tkivima pokazivali su suprotan trend u odnosu na ekspresiju GSH-Px4 (Slika 20B). Nivoi 4-HNE značajno su se povećavali sa rastom tumora kod miševa oba genotipa, iako su bili značajno niži u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa.



Slika 20. (A) Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija GSH-Px4 i 4-HNE u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazan je integrisani kanal imunobojenja za GSH-Px4 (zeleno) i 4-HNE (crveno), kolokalizacija je prikazana žutom, dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. (B) Nivoi 4-HNE u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.5. TRX-zavisni antioksidativni sistem u tumorskom tkivu dojke

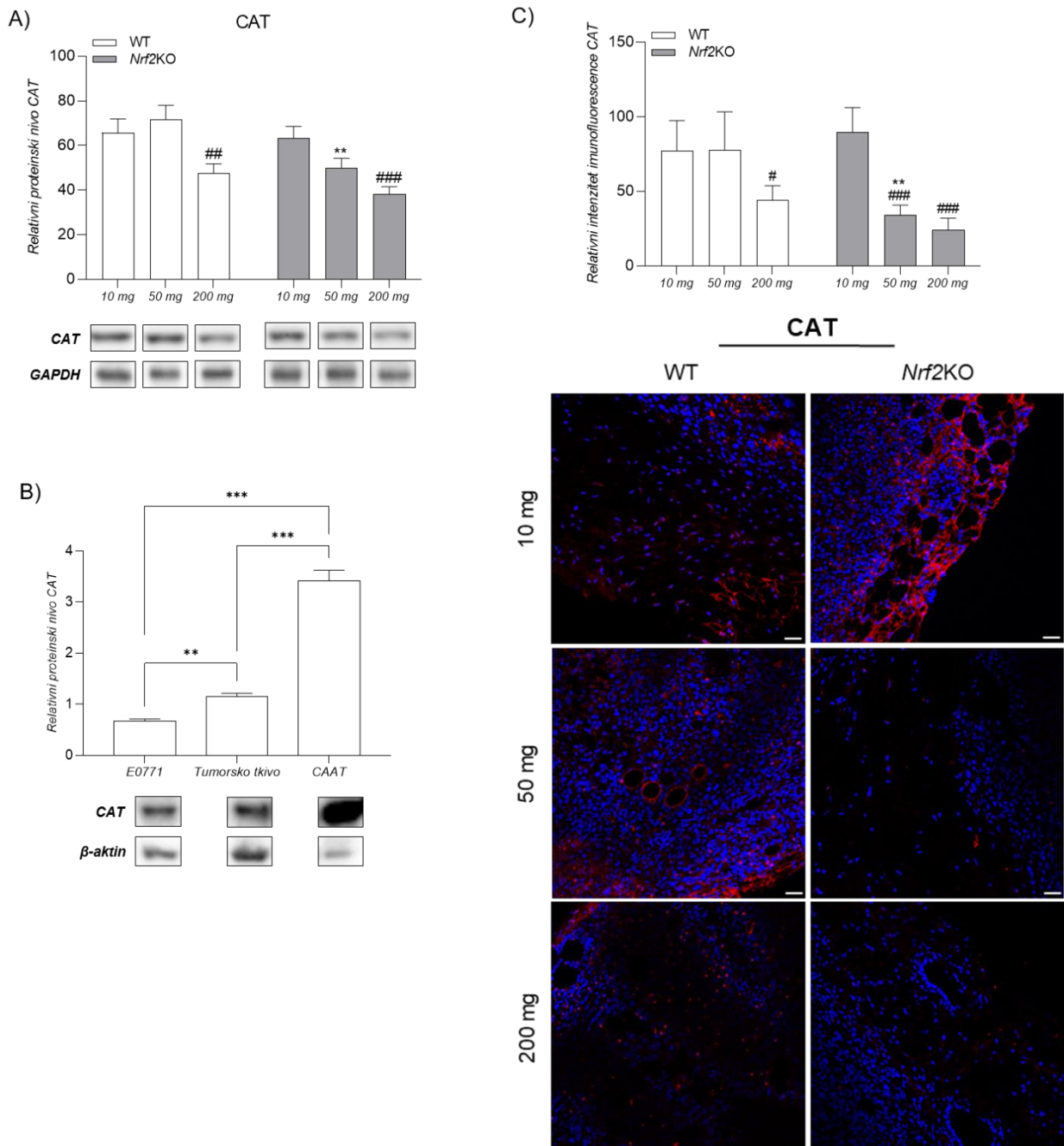
Slika 21 prikazuje promene u aktivnosti TR i proteinskim nivoima enzima TRX-zavisnog sistema antioksidativne odbrane u tumorskim tkivima WT i *Nrf2*KO miševa. Proteinski nivo TR i njegova aktivnost bili su usklađeni, značajno se povećavajući u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa sa rastom tumora (tumori mase 50 i 200 mg), nezavisno od prisustva funkcionalnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini (Slika 21A,B). Suprotno tome, proteinski nivo TRX značajno je smanjen sa rastom tumora (tumori mase 200 mg) samo kod WT miševa, dok u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa nije bilo značajnih promena u proteinskom nivou TRX tokom eksperimenta (Slika 21C). Takođe, proteinski nivo PRX3 (Slika 21D) ostao je stabilan sa rastom tumora kod oba genotipa miševa, ali je bio značajno viši u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa respektivnim grupama WT miševa (tumori mase 10 i 200 mg).



Slika 21. (A) Enzimska aktivnost TR, proteinski nivoi (B) TR, (C) TRX i (D) PRX3 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima dojke mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.6. Proteinski nivo, aktivnost i lokalizacija katalaze u tumorskom tkivu dojke

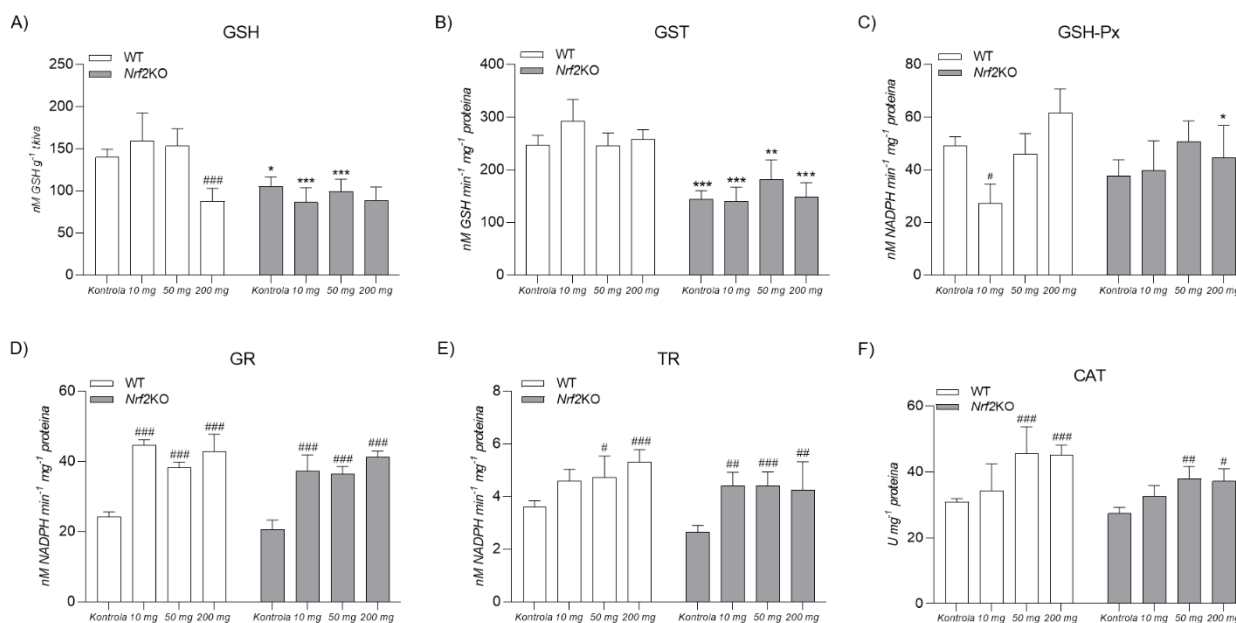
Proteinski nivo CAT u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke imao je isti profil, sa značajnim smanjenjem u tumorima od 200 mg (Slika 22A). Međutim, aktivnost CAT nije se mogla detektovati u tumorskim tkivima ni kod WT ni kod *Nrf2*KO miševa, niti u E0771 ćelijama kancera dojke koje su korišćene za indukciju tumora (nije prikazano). Pored toga, uporedili smo proteinski nivo CAT u E0771 ćelijama kancera dojke, tumorskom tkivu (tumori mase 50 mg) i CAAT WT miševa, pri čemu su značajno viši proteinski nivoi CAT uočeni u CAAT u poređenju sa E0771 kancerskim ćelijama ili tumorskim tkivom (Slika 22B). Profil ekspresije i lokalizacije CAT u tumorskom tkivu dodatno je analiziran konfokalnom mikroskopijom. CAT imunopozitivnost bila je jedva vidljiva u kancerskim ćelijama, dok je bila snažno izražena u okolnim adipocitima, pri čemu se njena imunopozitivnost značajno smanjivala sa rastom tumora kod oba genotipa miševa (Slika 22C), uz niže proteinske nivoe primećene kod WT miševa u odnosu na *Nrf2*KO miševе.



Slika 22. (A) Proteinski nivo CAT u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. (B) Proteinski nivo CAT u E0771 ćelijskoj liniji kancera dojke, tumorskom tkivu dojke i kancer-asociranom masnom tkivu WT miševa. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Imunofluorescentna detekcija CAT u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazano je imunobojenje za CAT (crveno), dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$.

4.4.7. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u kancer-asociranom masnom tkivu

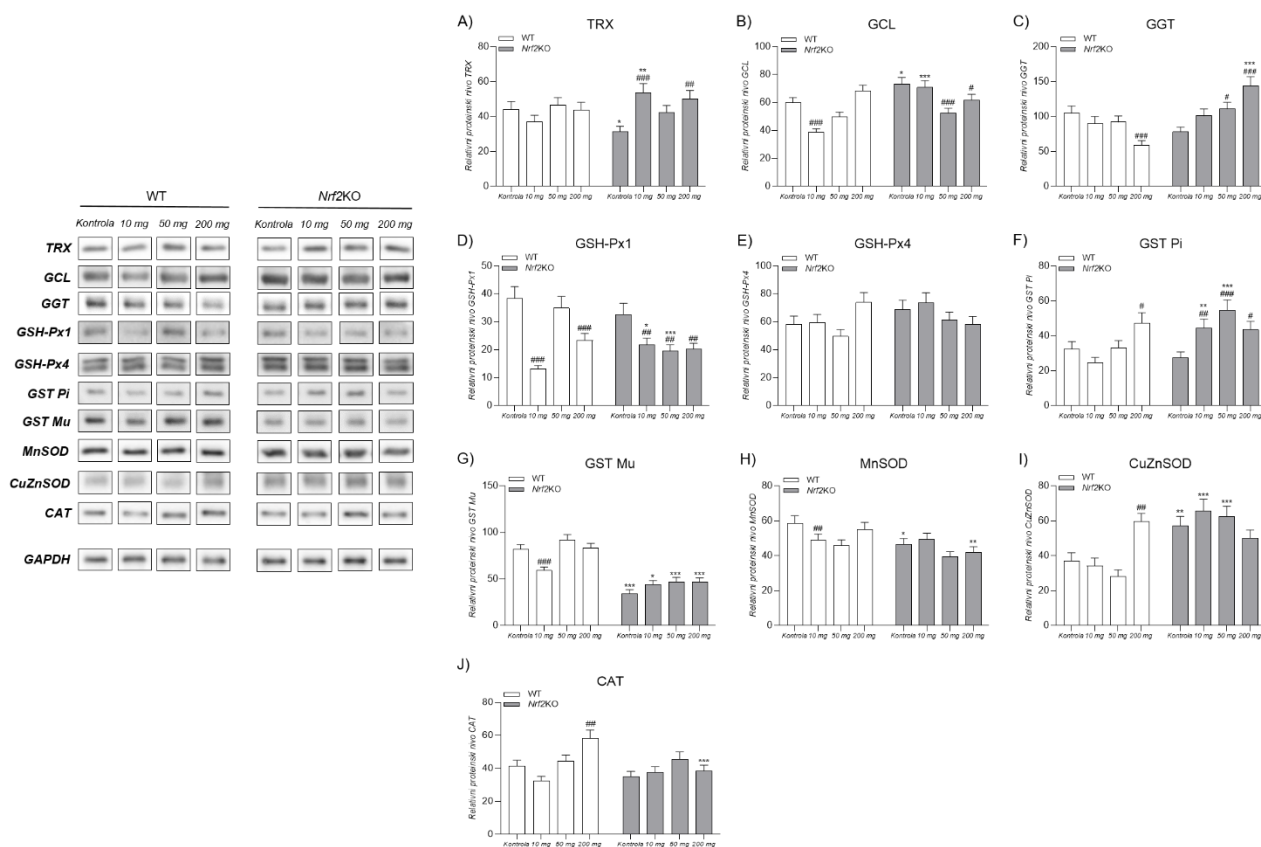
Aktivnost enzima antioksidativne odbrane ispitivana je u CAAT tokom rasta tumora dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 23). Nivoi GSH u CAAT značajno su se smanjili u grupi WT miševa sa tumorima od 200 mg (Slika 23A). Iako se nivoi GSH u CAAT *Nrf2*KO miševa nisu razlikovali sa rastom tumora, bili su značajno niži u poređenju sa respektivnim grupama kontrolnih i WT miševa sa tumorima od 10 mg i 50 mg. Dalje, dok se aktivnost GST nije menjala u CAAT ni kod WT ni kod *Nrf2*KO miševa sa rastom tumora, njena aktivnost bila je značajno niža u CAAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa respektivnim grupama WT miševa (Slika 23B). Aktivnost GSH-Px pokazala je prolazno smanjenje u CAAT WT miševa sa tumorima od 10 mg (Slika 23C). Aktivnosti GR, TR i CAT pokazale su zavisnost samo od prisustva tumora, značajno se povećavajući sa rastom tumora u CAAT i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa (Slika 23D,E,F).



Slika 23. (A) Nivo GSH, enzimska aktivnost (B) GST, (C) GSH-Px, (D) GR, (E) TR i (F) CAT u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.8. Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u kancer-asociranom masnom tkivu

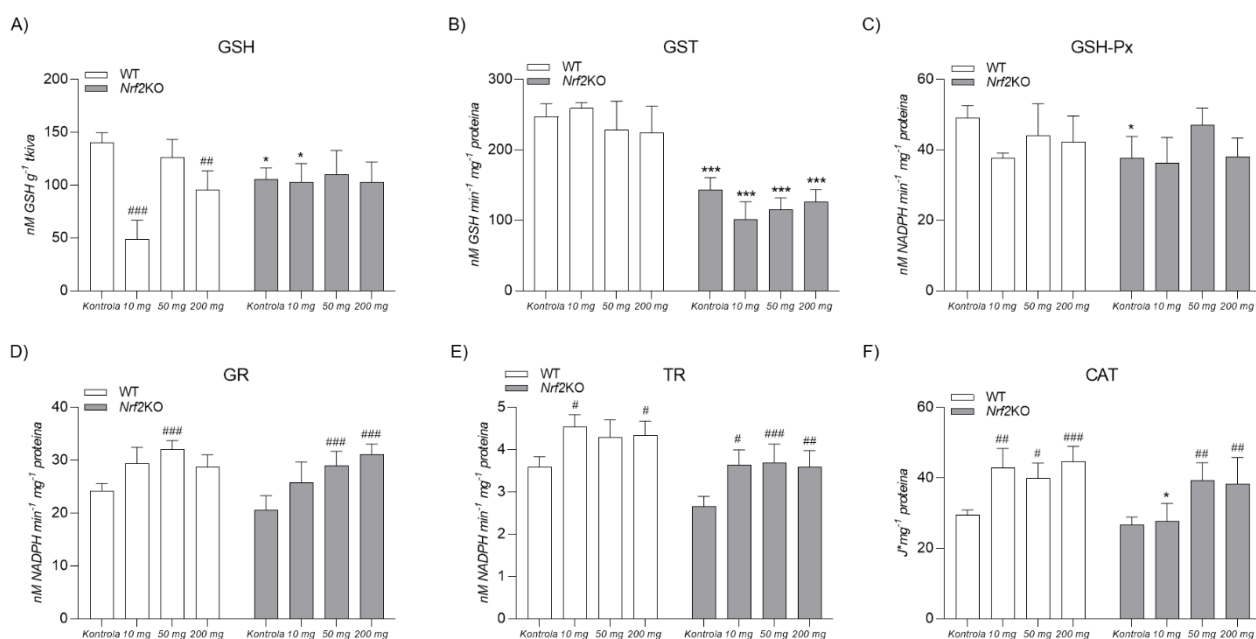
Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u CAAT pokazivali su različite profile i zavisnost od prisustva funkcionalnog NRF2 i/ili prisustva tumora (Slika 24). U CAAT WT miševa, proteinski nivoi GCL, GSH-Px1, GST Mu i MnSOD bili su značajno smanjeni tokom inicijalne faze rasta tumora (10 mg). Ovakve razlike nisu detektovane u CAAT *Nrf2*KO miševa, osim smanjenja proteinskog nivoa GSH-Px1 (Slika 24B,D,G,H). Nasuprot tome, proteinski nivoi GGT i GSH-Px1 u CAAT značajno su opali u grupi WT miševa sa tumorima od 200 mg u poređenju sa kontrolnim WT miševima bez tumora (Slika 24C,D), dok su proteinski nivoi GST Pi, CuZnSOD i CAT bili povećani u istoj grupi (Slika 24F,I,J). Proteinski nivo TRX i GSH-Px4 nije bio značajno promenjen ni u CAAT WT ni *Nrf2*KO miševa sa rastom tumora (Slika 24A,E). Sa druge strane, u CAAT *Nrf2*KO miševa, proteinski nivoi TRX, GGT i GST Pi su se povećali sa rastom tumora (Slika 24A,C,F), dok su proteinski nivoi GCL i GSH-Px1 bili smanjeni u poređenju sa CAAT *Nrf2*KO kontrolnih miševa bez tumora (Slika 24B,D). Pored toga, CAAT *Nrf2*KO miševa pokazao je promene u proteinskim nivoima enzima antioksidativne odbrane zavisno od prisustva funkcionalnog NRF2 u različitim fazama rasta tumora, gde su nivoi GSH-Px1, GST Mu i MnSOD generalno bili smanjeni u odnosu na CAAT *Nrf2*KO kontrolnih miševa bez tumora (Slika 24D,F,H), dok su nivoi GCL, GST Pi i CuZnSOD bio generalno povećani u odnosu na WT grupe sa istim veličinama tumora (Slika 24B,F,I).



Slika 24. Proteinski nivoi (A) TRX, (B) GCL, (C) GGT, (D) GSH-Px1, (E) GSH-Px4, (F) GST Pi, (G) GST Mu, (H) MnSOD, (I) CuZnSOD i (J) CAT u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.9. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu

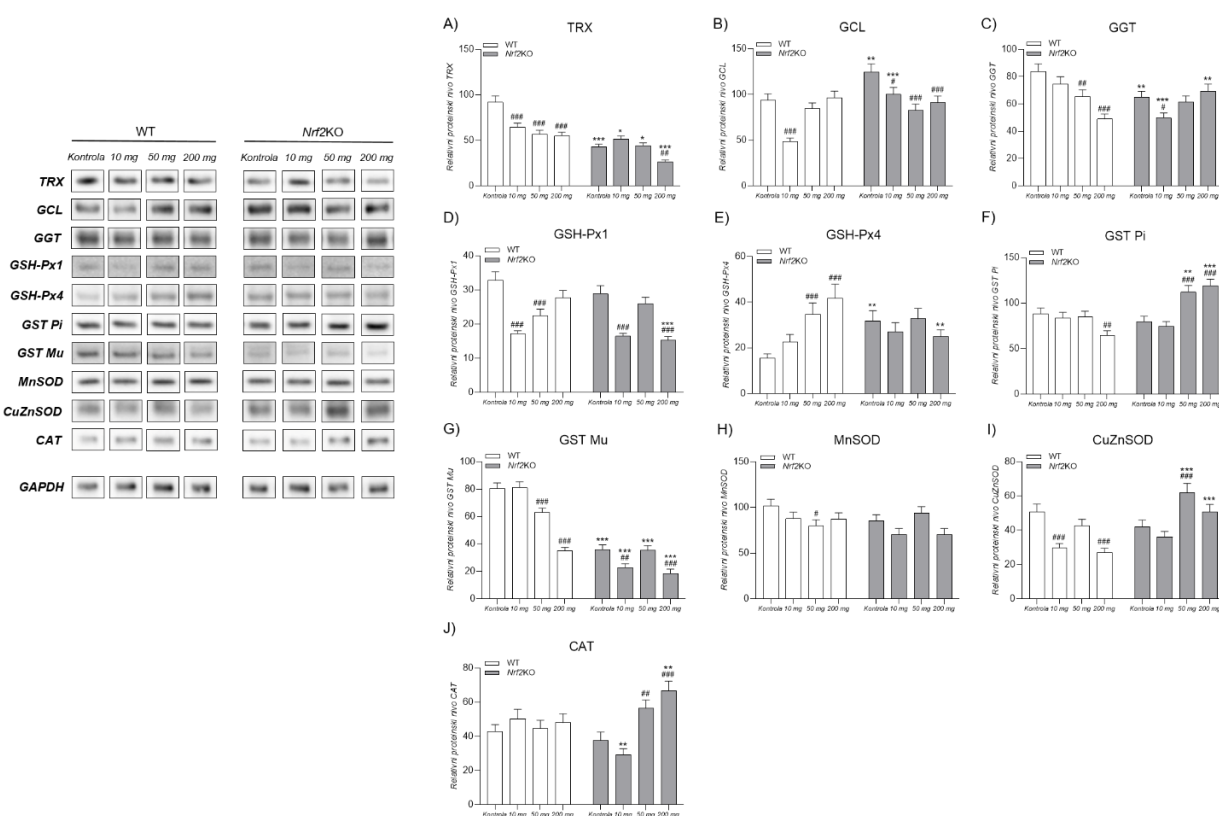
Aktivnost enzima antioksidativne odbrane ispitivana je u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu sa rastom tumora kod WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 25). Značajno niži nivo GSH detektovan je u iWAT WT miševa sa tumorima mase 10 i 200 mg u odnosu na iWAT WT kontrolnih miševa bez tumora, dok se nivo GSH nije menjao sa rastom tumora u iWAT *Nrf2*KO miševa (Slika 25A). Aktivnost GST nije se menjala u iWAT ni kod WT ni kod *Nrf2*KO miševa sa rastom tumora, ali je njena aktivnost bila konstantno niža u iWAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa iWAT WT miševa sa istim masama tumora (Slika 25B). Razlike u aktivnosti GSH-Px detektovane su između iWAT kontrolnih WT i *Nrf2*KO miševa bez tumora, ali ne i u odnosu na rast tumora (Slika 25C). Aktivnosti GR, TR i CAT pokazale su zavisnost samo od prisustva tumora, značajno se povećavajući sa rastom tumora u iWAT i WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 25D,E,F). Dodatno, kod *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 mg, aktivnost CAT bila je značajno niža u odnosu na iWAT WT miševa sa tumorima iste mase (Slika 25F).



Slika 25. (A) Nivo GSH, enzimska aktivnost (B) GST, (C) GSH-Px, (D) GR, (E) TR i (F) CAT u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.10. Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu

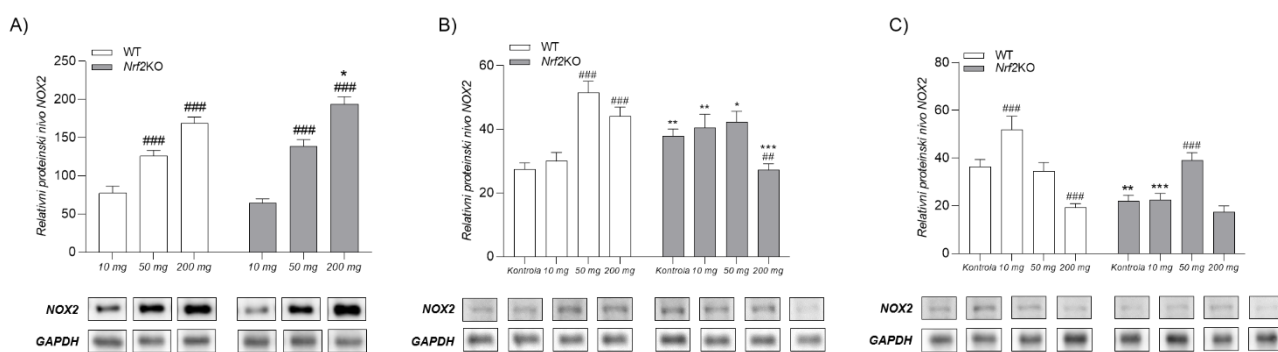
Proteinski nivoi enzima antioksidativne odbrane u iWAT WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazani su na Slici 26. Detektovan je niži proteinski nivo TRX, GCL, GGT, GSH-Px1, GST Pi, GST Mu, MnSOD i CuZnSOD u iWAT WT miševa sa rastom tumora u poređenju sa kontrolnim WT miševima bez tumora. Istovremeno, proteinski nivo CAT nije bio izmenjen u odnosu na prisustvo i veličinu tumora u iWAT WT miševa (Slika 26J), ali je detektovan značajno veći proteinski nivo GSH-Px4 u iWAT istih miševa sa rastom tumora (Slika 26E). U iWAT *Nrf2*KO miševa, proteinski nivoi TRX, GCL, GGT, GSH-Px1, GST Mu i MnSOD smanjivali su se sa rastom tumora, gde je u slučaju GGT i MnSOD prolazno smanjenje primećeno u iWAT *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 mg (Slika 26C,H). Sa druge strane, proteinski nivoi GST Pi, CuZnSOD i CAT povećavali su se sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg) (Slika 26F,I,J), dok je proteinski nivo GSH-Px4 ostao nepromenjen u odnosu na rast tumora u iWAT *Nrf2*KO miševa (Slika 26E). Značajno niži proteinski nivoi TRX i GST Mu detektovani su u iWAT *Nrf2*KO kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima od 10, 50 i 200 mg u odnosu na respektivne WT grupe (Slika 26A,G). Dodatno, niži proteinski nivoi GGT i MnSOD primećeni su u iWAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa bez tumora u poređenju sa istom grupom WT miševa (Slika 26C,H). Smanjeni proteinski nivoi GGT, MnSOD i CAT detektovani su u iWAT *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 mg u poređenju sa istom grupom WT miševa (Slika 26C,H,J), dok su proteinski nivoi GCL, GST Pi, GSH-Px4 i CuZnSOD bili povećani u iWAT *Nrf2*KO kontrolnih miševa bez tumora i miševa tokom specifičnih faza rasta tumora u odnosu na odgovarajuće grupe WT miševa (osim GSH-Px4) (Slika 26B,C,E,I).



Slika 26. Proteinski nivoi (A) TRX, (B) GCL, (C) GGT, (D) GSH-Px1, (E) GSH-Px4, (F) GST Pi, (G) GST Mu, (H) MnSOD, (I) CuZnSOD i (J) CAT u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.11. Proteinski nivo NOX2 u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu

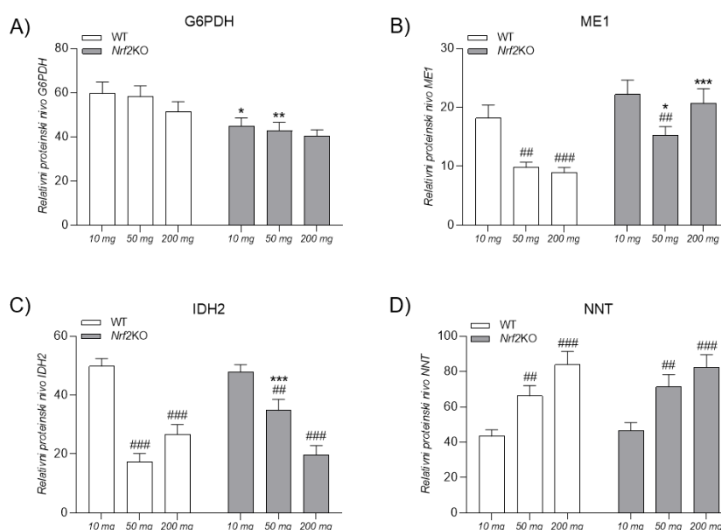
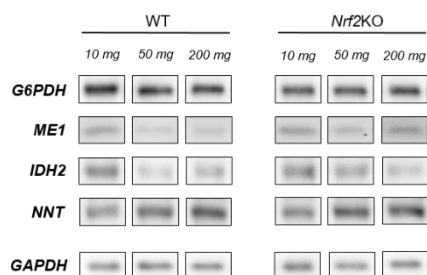
Proteinski nivo NOX2 ispitivana je u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 27). U poređenju sa tumorima od 10 mg, tumori od 50 i 200 mg karakterišu se većim proteinskom nivoom NOX2, nezavisno od genotipa miševa (Slika 27A). Sa druge strane, proteinski nivo NOX2 u CAAT povećavao se sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg) samo kod WT miševa, dok su u CAAT *Nrf2*KO miševa opadali sa rastom tumora (tumori od 200 mg) (Slika 27B). Iako su proteinski nivoi NOX2 bili viši u CAAT *Nrf2*KO kontrolnih miševa i miševa sa tumorima od 10 mg u odnosu na respektivne WT grupe, oni su sa rastom tumora (tumori od 50 mg i 200 mg) postali manji nego u CAAT WT miševa sa tumorima iste mase. U iWAT WT miševa, uočeno je prolazno povećanje, a zatim smanjenje proteinskog nivoa NOX2 sa daljim rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg). Sa druge strane, prolazno povećanje proteinskog nivoa NOX2 detektovano je u iWAT *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 50 mg, dok su *Nrf2*KO kontrolni miševi bez tumora i miševi sa tumorima od 10 mg imali značajno niži proteinski nivo NOX2 u odnosu na iste grupe WT miševa (Slika 27C).



Slika 27. Proteinski nivo NOX2 u (A) tumorskom tkivu, (B) kancer-asociranom i (C) kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa (B,C) i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg (A,B,C). Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg) (A) ili kontrolom bez tumora (B,C), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.12. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u tumorskom tkivu dojke

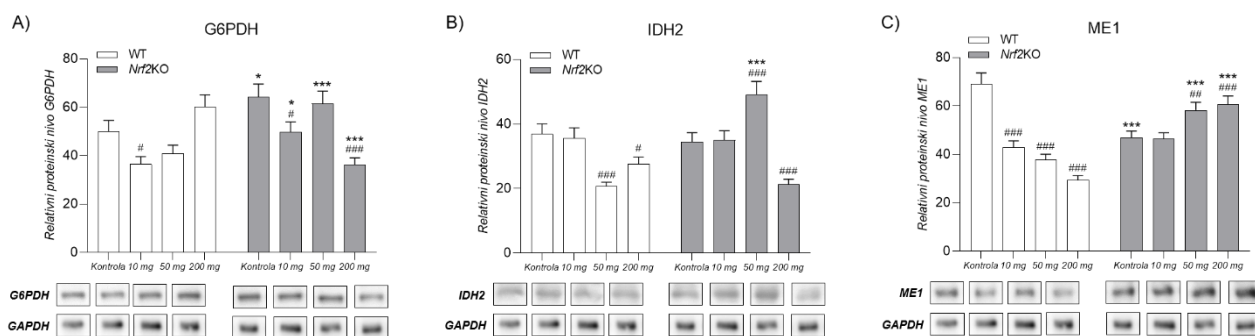
Zatim smo ispitali proteinski nivo metaboličkih enzima uključenih u produkciju NADPH u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 28). Proteinski nivo G6PDH bio je nepromenjen sa rastom tumora, ali je bio značajno niži u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorskim tkivom WT miševa (tumori od 10 i 50 mg tumori) (Slika 28A). Nasuprot tome, ME1 i IDH2 pokazali su sličan profil smanjenja proteinskog nivoa sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg) kod WT miševa (Slika 28B,C). Manje izražen pad primećen je kod *Nrf2*KO miševa sa istim veličinama tumora, pa su njihovi nivoi i dalje bili značajno viši nego kod WT miševa. NNT je pokazao potpuno suprotan ekspresioni profil – značajno povećanje nivoa proteina u tumorima mase 50 i 200 mg, nezavisno od prisustva funkcionalnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini (Slika 28D).



Slika 28. Proteinski nivoi (A) G6PDH, (B) ME1, (C) IDH2 i (D) NNT u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2KO* (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.13. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u kancer-asociranom masnom tkivu

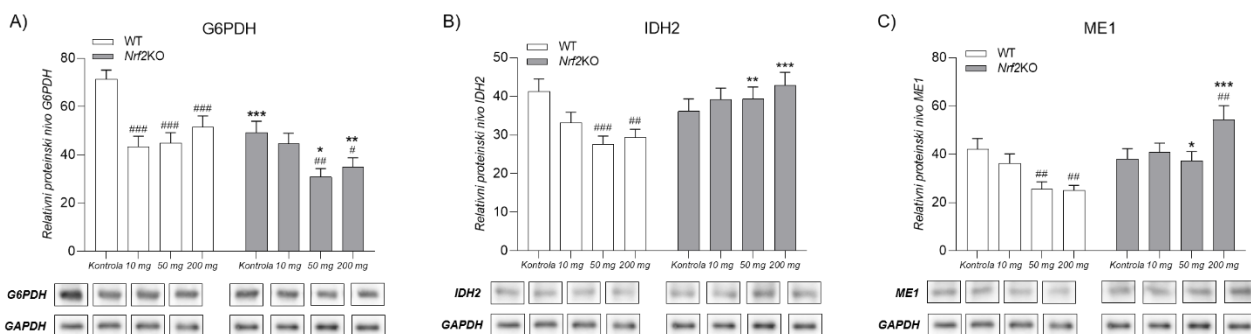
Na Slici 29 prikazan je proteinski nivo NADPH-generišućih enzima u kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2KO* miševa tokom rasta tumora dojke. Proteinski nivoi G6PDH, IDH2 i ME1 pokazali su isti obrazac smanjenja sa rastom tumora u CAAT WT miševa. Sa druge strane, CAAT *Nrf2KO* miševa je takođe pokazao smanjenje proteinskog nivoa G6PDH sa rastom tumora (Slika 29A), dok je uočen trend povećanja proteinskih nivoa IDH2 (Slika 29B) i ME1 (Slika 29C) sa daljim rastom tumora (tumori od 200 mg). Dok su proteinski nivoi G6PDH bili smanjeni u CAAT *Nrf2KO* miševa u odnosu na CAAT WT miševa, IDH2 i ME1 proteinski nivoi su bili viši kod *Nrf2KO* miševa sa tumorima od 50 i 200 mg u odnosu na komplementarne WT grupe.



Slika 29. Proteinski nivoi (A) G6PDH, (B) IDH2 i (C) ME1 u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2KO* (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.4.14. Proteinski nivoi NADPH-generišućih enzima u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu

Na Slici 30 prikazan je proteinski nivo NADPH-generišućih enzima u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke. Proteinska nivoi G6PDH, IDH2 i ME1 pokazali su isti obrazac smanjenja sa rastom tumora u iWAT WT miševa, s tim da je to smanjenje bilo samo prolazno (tumori od 10 mg) u slučaju G6PDH. Sa druge strane, niži proteinski nivo G6PDH sa rastom tumora detektovan je u iWAT *Nrf2*KO miševa (Slika 30A). Smanjenje proteinskog nivoa IDH2 uočeno je u iWAT WT miševa sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg), dok je u iWAT *Nrf2*KO miševa primećeno povećanje (tumori od 50 mg), a zatim smanjenje proteinskog nivoa IDH2 (tumori od 200 mg) sa rastom tumora (Slika 30B). Proteinski nivoi ME1 su bili niži u iWAT WT miševa sa svim veličinama tumora u odnosu na iWAT kontrolnih WT miševa bez tumora, dok je ME1 u iWAT *Nrf2*KO miševa pokazao suprotan, rastući ekspresioni profil sa rastom tumora (tumori mase 50 i 200 mg) (Slika 30C). Proteinski nivoi G6PDH, IDH2 i ME1 bili su povećani u iWAT *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 50 mg u odnosu na iWAT WT miševa sa istom veličinom tumora. Ovakvo povećanje primećeno je i u iWAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 mg (G6PDH), kao i *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 200 mg (ME1), dok je u iWAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa detektovano smanjenje proteinskog nivoa ME1 u odnosu na iWAT kontrolnih WT miševa bez tumora.

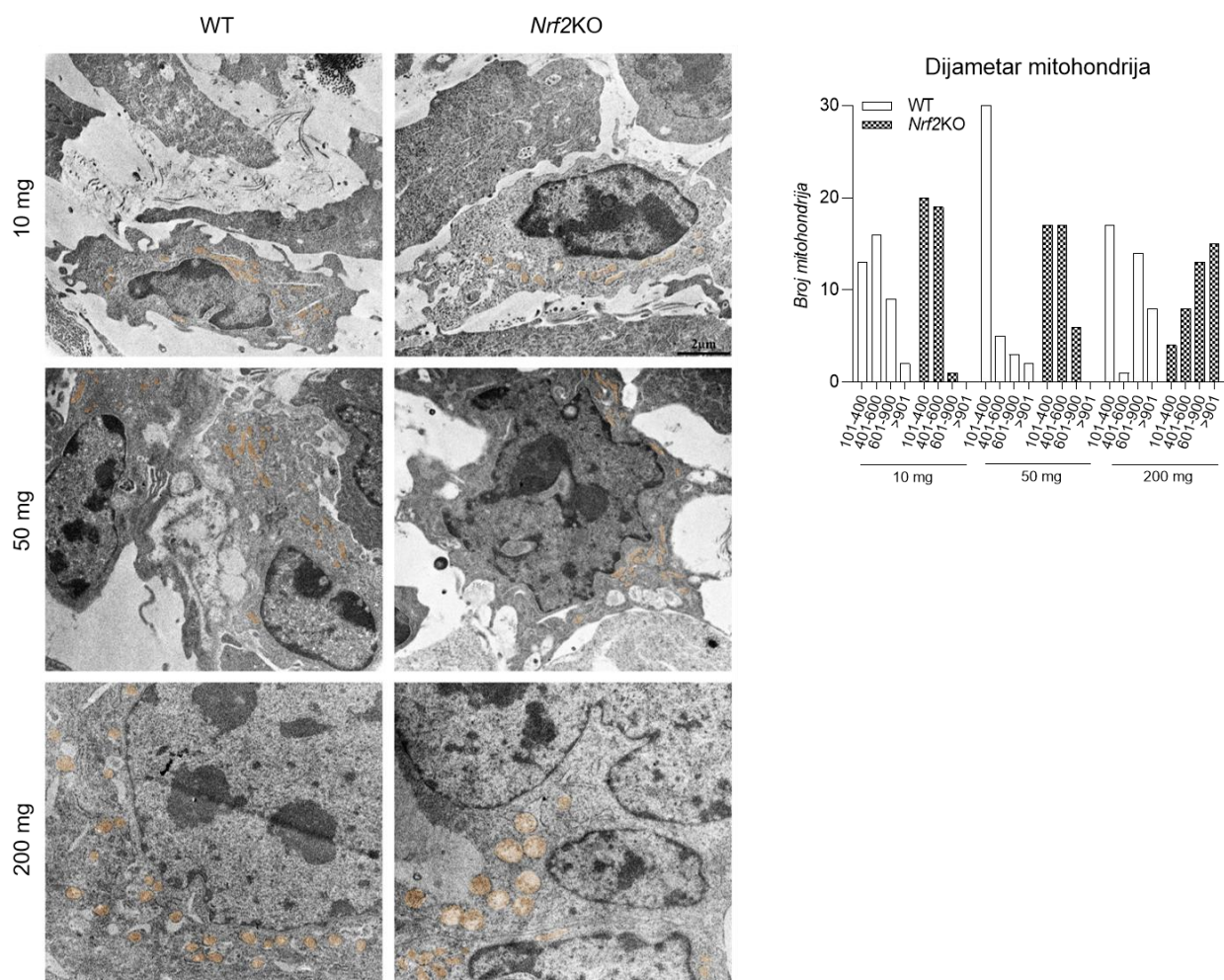


Slika 30. Proteinski nivoi (A) G6PDH, (B) IDH2 i (C) ME1 u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno ekspimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.5. Mitochondrije u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

4.5.1. Ultrastruktura mitohondrija u tumorskom tkivu dojke

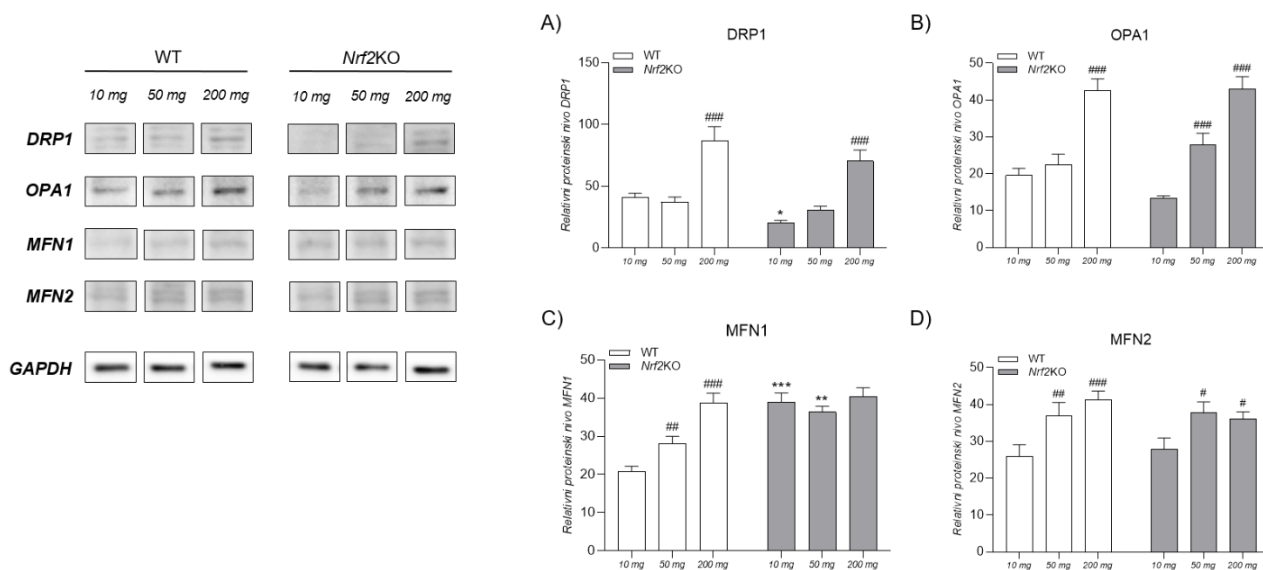
Mitohondrijalna ultrastruktura, kao i prečnik mitohondrija u tumorima od 10, 50 i 200 mg kod WT i *Nrf2*KO miševa analizirani su elektronskom mikroskopijom (Slika 31). Primećene su fibrilarne i izdužene mitohondrije, kao i okrugle i sitne mitohondrije u tumorskim tkivima miševa oba genotipa. Stoga smo analizirali raspodelu prečnika mitohondrija (101-400, 401-600, 601-900, >901 nm) u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa. Kod WT miševa, broj mitohondrija manjeg prečnika (101-400 nm) dramatično se povećao (~2,5 puta) tokom rasta tumora sa 10 mg na 50 mg, dok je broj mitohondrija većeg prečnika (401-600 i 601-900 nm) opao (~3-5 puta). Sa daljim rastom tumora kod WT miševa (200 mg), primećen je suprotan obrazac: broj mitohondrija manjeg prečnika (101-400 i 401-600 nm) se smanjio (~2 puta), dok je broj mitohondrija većeg prečnika (401-600 i 601-900 nm) porastao (~3-5 puta) u poređenju sa tumorima od 50 mg. Nasuprot tome, kod *Nrf2*KO miševa prečnik mitohondrija nije se značajno menjao tokom rasta tumora sa 10 mg na 50 mg, ali je došlo do promene u tumorima od 200 mg: broj mitohondrija manjeg prečnika (101-400 i 401-600 nm) značajno se smanjio (~2-4 puta), dok se broj mitohondrija većeg prečnika (601-900 i >901 nm) povećao. Iako se prečnik mitohondrija povećavao u tumorima od 200 mg kod oba genotipa miševa, dominantni prečnik mitohondrija u tumorima WT miševa ostajao je ~101-400 nm u svim fazama rasta tumora. Nasuprot tome, kod *Nrf2*KO miševa detektovano je izrazito smanjenje (~4 puta) mitohondrija manjeg prečnika (101-400 nm), dok je dominantni prečnik mitohondrija >901 nm bio ~2 puta veći u poređenju sa tumorima iste veličine kod WT miševa.



Slika 31. Reprezentativne elektronske mikrofografije ultrastrukture mitohondrija u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Mitohondrije su predstavljene kao pseudoobojene strukture. Na grafiku je prikazana distribucija dijametra mitohondrija (101-400, 401-600, 601-900, >901 nm) u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Uvećanje: x6.300, orig. Bar: 2 μ m.

4.5.2. Proteinski nivoi markera mitohondrijalne dinamike u tumorskom tkivu dojke

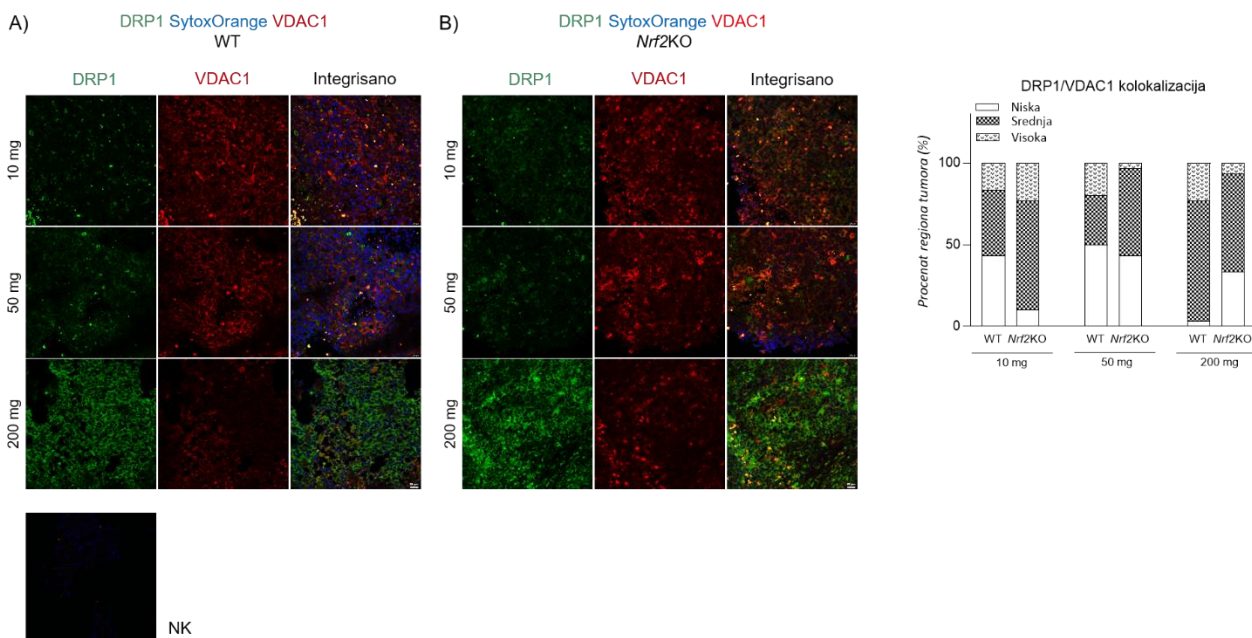
Proteinski nivoi markera mitohondrijalne fisije i fuzije analizirani su u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 32). Kod WT miševa, uočeno je značajno povećanje proteinskih nivoa DRP1 i OPA1 u tumorima od 200 mg u poređenju sa tumorima od 10 mg (Slika 32A,B). Pored toga, povećani proteinski nivo markera mitohondrijalne fuzije MFN1 i MFN2 detektovan je u tumorima od 50 mg i 200 mg u poređenju sa tumorima od 10 mg kod WT miševa (Slika 32C,D). Kod *Nrf2*KO miševa, uočeni su slični obrasci proteinskih nivoa za DRP1, OPA1 i MFN2, sa značajnim povećanjem u tumorima od 50 mg i 200 mg u poređenju sa tumorima od 10 mg, iako su proteinski nivoi DRP1 bili smanjeni u tumorima od 10 mg u poređenju sa tumorima iste mase kod WT miševa. Nasuprot tome, proteinski nivo MFN1 bio je povećan u tumorima od 10 i 50 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa i ostali su na sličnom nivou u tumorima od 200 mg, što je u skladu sa povećanim prečnikom mitohondrija kod *Nrf2*KO miševa usled pojačane mitohondrijske fuzije.



Slika 32. Proteinski nivoi (A) DRP1, (B) OPA1, (C) MFN1 i (D) MFN2 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno ekspimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.5.3. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija DRP1 i VDAC1 u tumorskom tkivu dojke

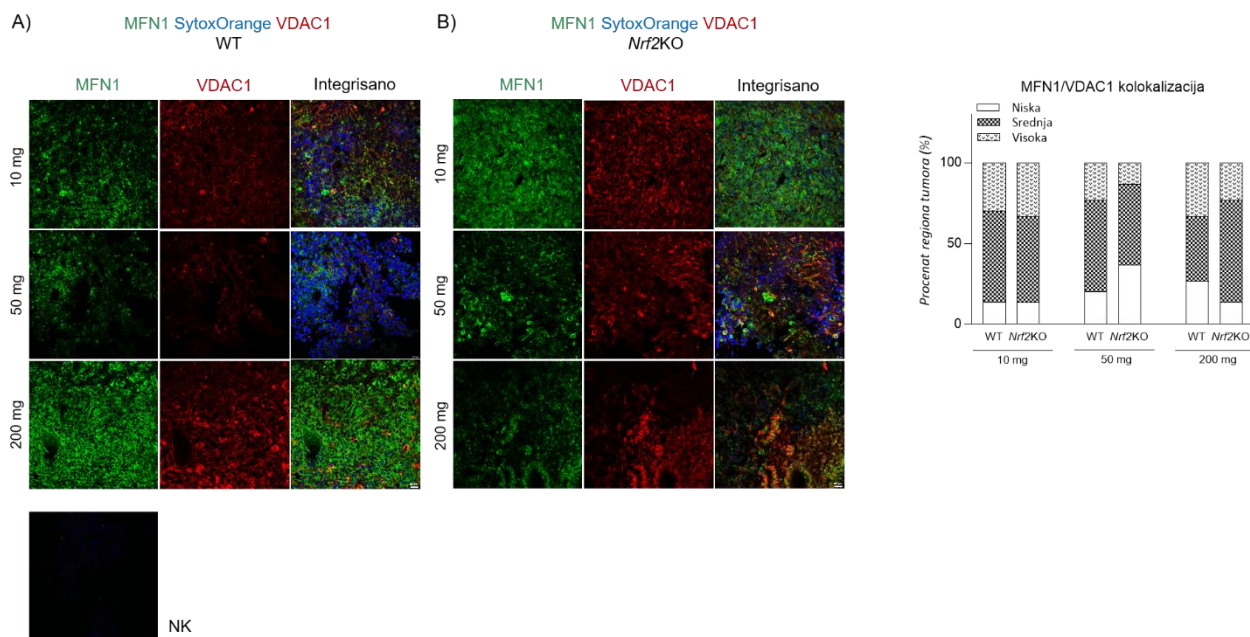
Da bismo ispitali uticaj *Nrf2*^{-/-} tumorske mikrosredine na mitohondrijalnu dinamiku u tumorskom tkivu, analizirana je prostorna ekspresija, kao i kolokalizacija markera fisije mitohondrija DRP1 sa mitohondrijalnim markerom VDAC1 u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 33) tokom rasta tumora dojke. U tumorskom tkivu WT miševa, kolokalizacija DRP1/VDAC1 značajno se menjala sa rastom tumora (Slika 33A). U tumorima od 10 mg i 50 mg postojala je relativno ravnomerna raspodela ćelija sa srednjim do visokim nivoom kolokalizacije i sa niskim nivoom kolokalizacije (~55–60%). U tumorima od 200 mg kod WT miševa, srednja do visoka kolokalizacija DRP1/VDAC1 dramatično se povećala (~96%) u poređenju sa tumorima od 50 mg, što ukazuje na to da asociranost DRP1 i mitohondrija zavisi od veličine tumora. Obrazac kolokalizacije DRP1/VDAC1 bio je drugačiji kod *Nrf2*KO miševa (Slika 33B). U tumorima od 10 mg uočena je vrlo izražena srednja do visoka kolokalizacija (~90%), što je u skladu sa većim brojem mitohondrija manjeg prečnika i sugerise povećanu mitohondrijsku fisiju. Međutim, sa rastom tumora kod *Nrf2*KO miševa, kolokalizacija se smanjivala (~60% u tumorima od 50 mg i 200 mg), što ukazuje na smanjenu aktivnost mitohondrijske fisije sa rastom tumora.



Slika 33. Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija DRP1 i VDAC1 u tumorskom tkivu (A) WT i (B) *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazana su imunobojenja za DRP1 (zeleno) i VDAC1 (crveno) na zasebnim kanalima, kao i integrirani kanal koji pokazuje kolokalizaciju DRP1/VDAC1, dok su nukleusi obeleženi sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. (C) Na grafiku je prikazan % DRP1/VDAC1 kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije.

4.5.4. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija MFN1 i VDAC1 u tumorskom tkivu dojke

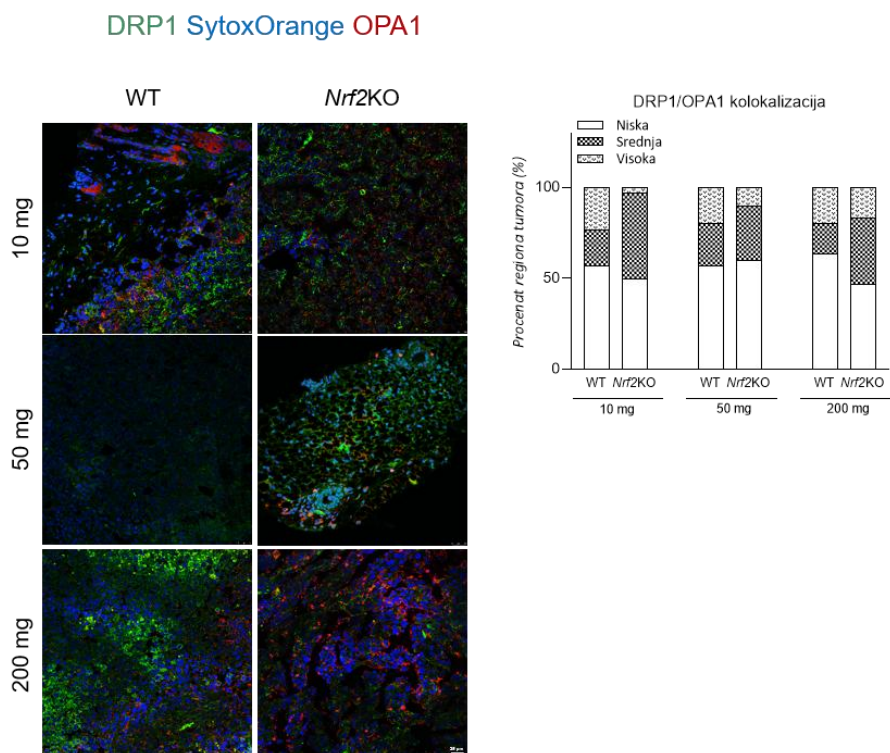
Prostorna ekspresija u tumorskom tkivu, kao i kolokalizacija markera fuzije mitohondrija MFN1 sa mitohondrijalnim markerom VDAC1 u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazana je na Slici 34. Kolokalizacija MFN1/VDAC1 u tumorskom tkivu pokazala je stabilniji obrazac kod oba genotipa miševa tokom rasta tumora dojke. Kod WT miševa, dominirala je srednja kolokalizacija (40–56%), dok je visoka kolokalizacija dostigla maksimum u tumorima od 200 mg (Slika 34A). Kod *Nrf2*KO miševa, srednja kolokalizacija (~60%) bila je dominantna u svim veličinama tumora, dok je visoka kolokalizacija pokazivala prolazni pad u tumorima od 50 mg (Slika 34B).



Slika 34. Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija MFN1 i VDAC1 u tumorskom tkivu (A) WT i (B) *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazana su imunobojenja za MFN1 (zeleno) i VDAC1 (crveno) na zasebnim kanalima, kao i integrisani kanal koji pokazuje kolokalizaciju MFN1/VDAC1, dok su nukleusi obeleženi sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. (C) Na grafiku je prikazan % MFN1/VDAC1 kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije.

4.5.5. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija DRP1 i OPA1 u tumorskom tkivu dojke

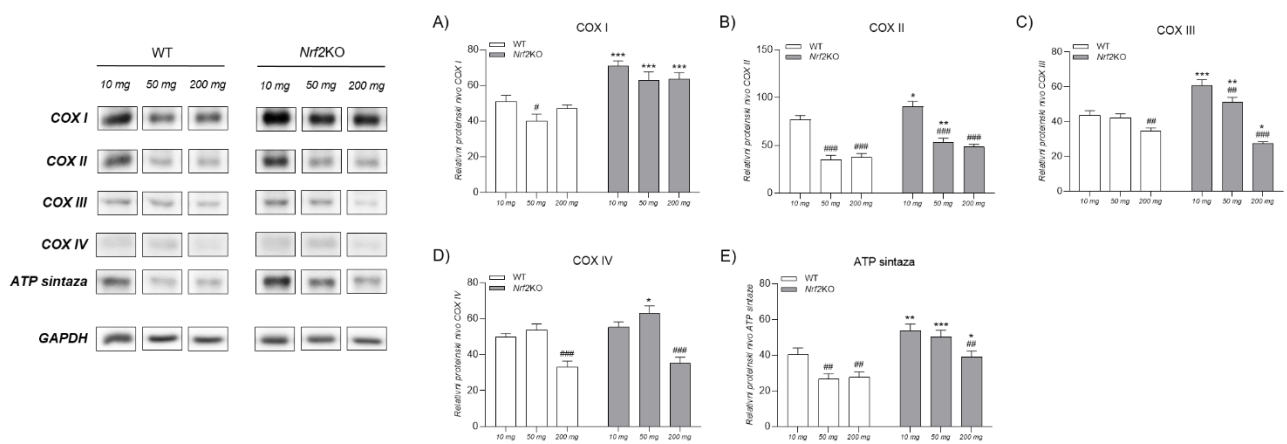
Takođe smo analizirali kolokalizaciju DRP1 i OPA1 kao marker istovremene fisije i fuzije mitohondrija u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 35). Kod WT miševa, odnos kancerskih ćelija sa srednjom do visokom kolokalizacijom (30-40%) i kancerskih ćelija sa niskom kolokalizacijom (60-70%) bio je relativno stabilan tokom rasta tumora. Kod *Nrf2*KO miševa, kancerske ćelije sa srednjom do visokom kolokalizacijom DRP1/OPA1 bile su nešto brojnije u tumorima od 200 mg (50-60%), što je u skladu sa povećanom mitohondrijalnom fuzijom u ovoj fazi rasta tumora.



Slika 35. Imunofluorescentna detekcija DRP1 i OPA1 u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazan je integrisani kanal imunobojenja DRP1 (zeleno) i OPA1 (crveno), kolokalizacija je prikazana žutom, dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. Na grafiku je prikazan % DRP1/OPA1 kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije.

4.5.6. Proteinski nivoi subjedinica kompleksa elektron transportnog lanca u tumorskom tkivu dojke

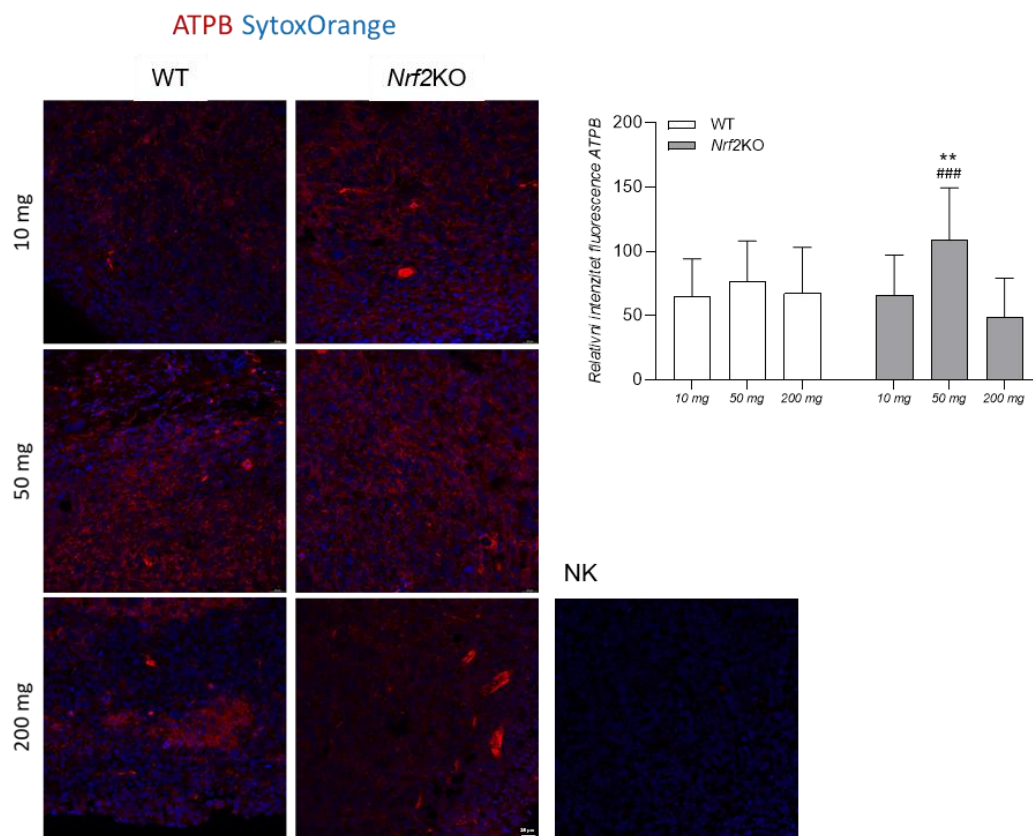
Proteinski nivo subjedinica kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazan je na Slici 36. Kod WT miševa, proteinski nivoi kompleksa (*eng.* complex, COX) ETC u tumorskom tkivu bili su smanjeni sa rastom tumora, i to kompleksa I u tumorima od 50 mg (Slika 36), kompleksa III i IV u tumorima od 200 mg (Slika 36C,D), kompleksa II i ATP sintaze u tumorima od 50 i 200 mg (Slika 36B,E) u odnosu na tumore od 10 mg. Nasuprot tome, kod *Nrf2*KO miševa uočeni su značajno viši proteinski nivoi svih kompleksa ETC i ATP sintaze u tumorima od 10 mg i 50 mg u poređenju sa tumorima iste mase kod WT miševa. Iako su se nivoi ovih proteina kasnije smanjivali sa rastom tumora, proteinski nivoi kompleksa I i ATP sintaze u tumorima *Nrf2*KO miševa ostali su značajno viši tokom svih faza rasta tumora u poređenju sa tumorima istih masa WT miševa, dok su proteinski nivoi kompleksa II, III i IV bili viši u tumorima od 50 mg u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa.



Slika 36. Proteinski nivoi (A) Kompleksa I, (B) Kompleksa II, (C) Kompleksa III, (D) Kompleksa IV i (E) ATP sintaze u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.5.7. Proteinska ekspresija i lokalizacija ATP sintaze u tumorskom tkivu dojke

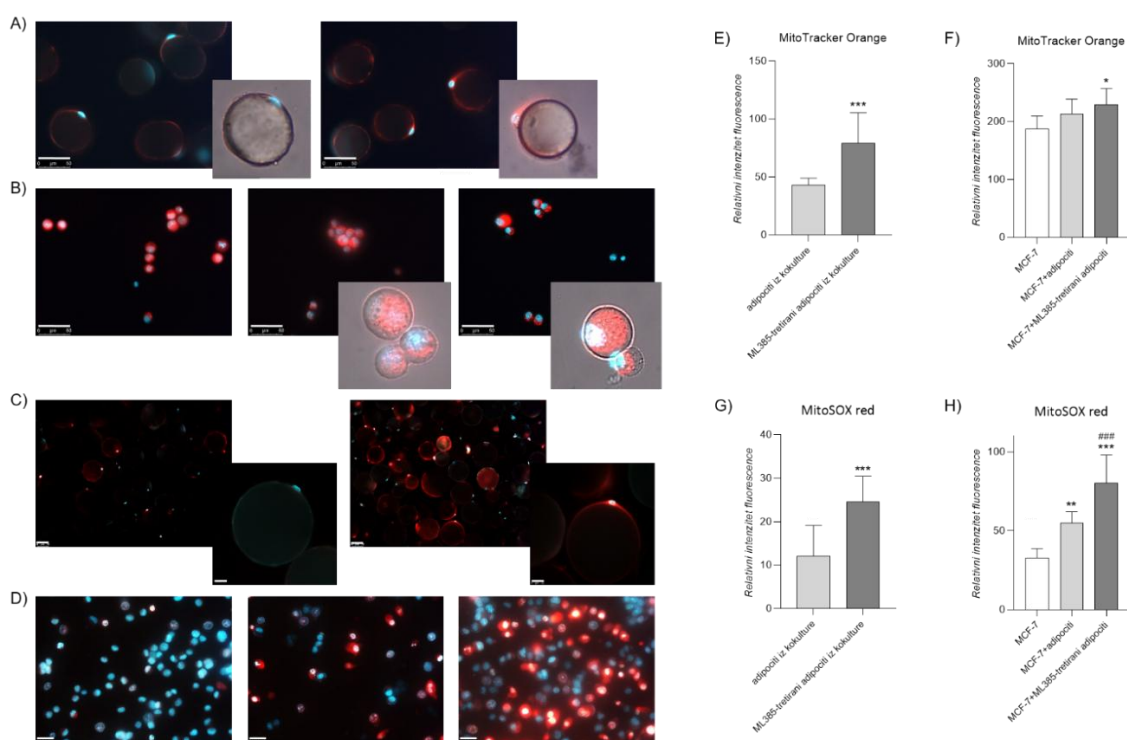
Imunofluorescentna detekcija subjedinice ATP sintaze, ATPB, kao i kvantifikacija njene ekspresije u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazana je na Slici 37. Intenzitet signala fluorescence ATPB bio je relativno konstantan u svim grupama tokom eksperimenta, osim značajnog povećanja u tumorima od 50 mg kod *Nrf2*KO miševa u odnosu na tumore iste mase WT miševa, kao i tumore od 10 mg *Nrf2*KO miševa.



Slika 37. Imunofluorescentna detekcija ATPB u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazano je imunobojenje za ATPB (crveno) i nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 µm. Na grafiku je prikazan relativni intenzitet fluorescence ATPB zasnovan na 15 regiona od interesa u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), ### $p < 0.001$.

4.5.8. Analiza aktivnosti mitohondrija i nivoa ROS u kancerskim ćelijama dojke i adipocitima u kokulturi

Koristeći model kokulture adipocita i MCF-7 ćelijske linije kancera dojke, ispitali smo efekat inhibicije NRF2 u adipocitima na mitohondrijalnu aktivnost i produkciju mitohondrijalnih ROS u samim adipocitima i u kancerskim ćelijama (Slika 38). Inhibicija NRF2 u adipocitima korišćenjem inhibitora ML-385 dovela je do značajnog povećanja mitohondrijske aktivnosti detektovane MitoTracker Orange bojom (Slika 38A,E) i produkcije mitohondrijalnog superoksid anjon radikala detektovane MitoSOX Red (Slika 38C,G) bojom u adipocitima. MCF-7 kancerske ćelije u kokulturi sa adipocitima tretiranim ML-385 pokazale su značajno povećanu mitohondrijalnu aktivnost u poređenju sa kancerskim ćelijama u monokulturi (Slika 38B,F). U skladu sa tim, produkcija mitohondrijalnog superoksid anjon radikala takođe je bila značajno povećana u MCF-7 kancerskim ćelijama u kokulturi sa adipocitima u poređenju sa monokulturom (Slika 38D,H).



Slika 38. Mikrografije prikazuju fluorescentni signal od MitoTracker Orange (A,C) ili MitoSox Red (B,D) u (A,C) netretiranim ili ML-385-tretiranim adipocitima iz kokulture sa MCF-7 ćelijskom linijom kancera dojke, ili u (B,D) MCF-7 ćelijama kancera dojke u monokulturi, kokulturi sa netretiranim adipocitima ili kokulturi sa ML-385-tretiranim adipocitima. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. Prikazan je integrisani kanal imunobojenja za MitoTracker Orange/MitoSOX (crveno) i nukleusi obojeni sa Hoechst 33342 (plavo). Bar: 50 μ m. Na graficima je prikazan relativni fluorescentni intenzitet (E,F) MitoTracker Orange i (G,H) MitoSox Red. * Poređenje sa netretiranim adipocitima iz kokulture (E,G) ili MCF-7 ćelijama kancera dojke iz monokulture (F,H), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa MCF-7 ćelijama kancera dojke iz kokulture sa netretiranim adipocitima (F,H), ### $p < 0.001$.

4.6. Metabolizam glukoze i laktata u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

4.6.1. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija PFKFB3 i insulina u tumorskom tkivu dojke

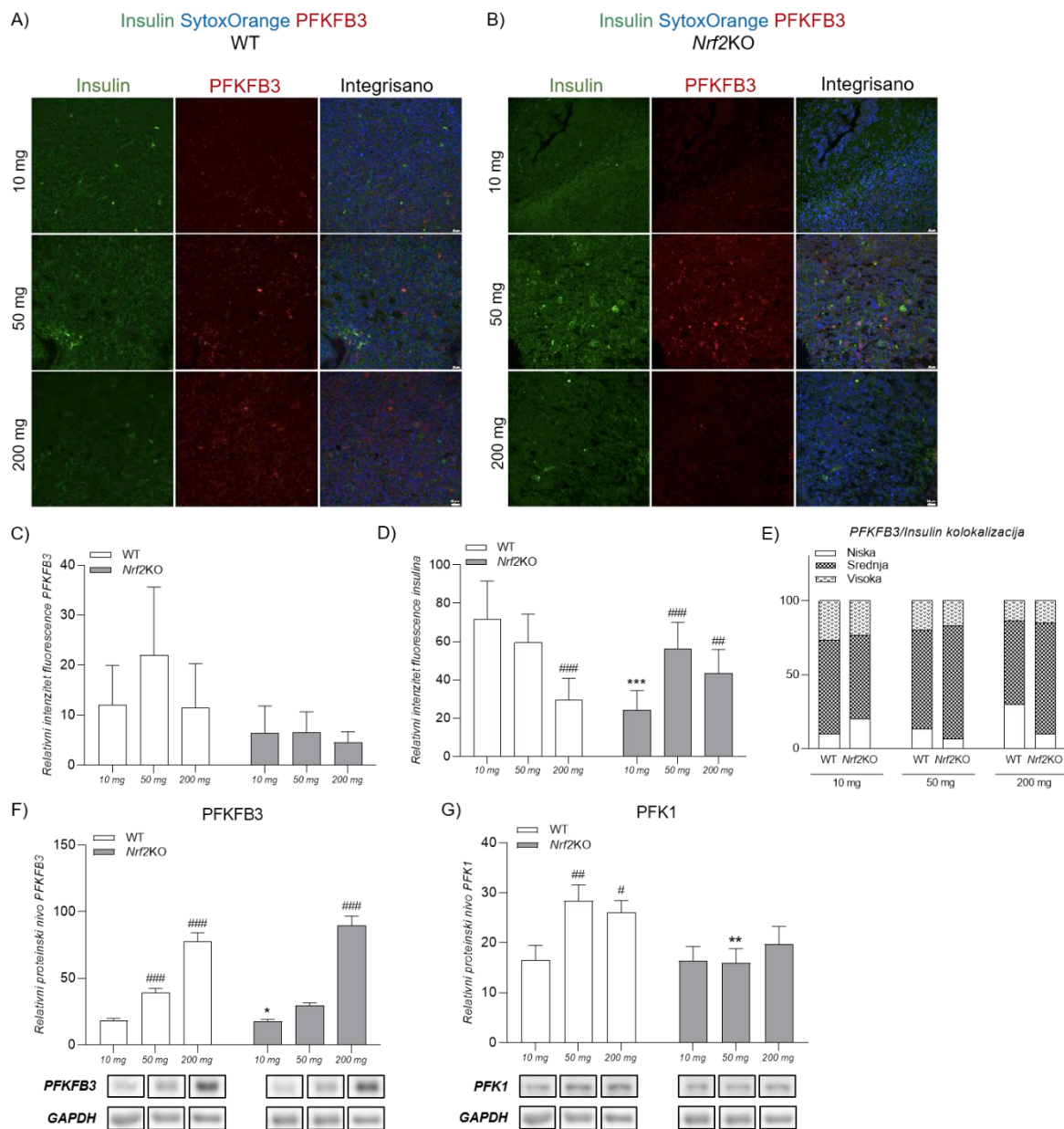
Obrazac proteinske ekspresije i lokalizacije PFKFB3 kao jednog od ključnih regulatora glikolize i hormonskog regulatora glukoznog metabolizma - insulina, kao i njihova kolokalizacija u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke, prikazani su na Slici 39.

Kod WT miševa (Slika 39A), analiza konfokalne mikroskopije tumora mase 10 mg je pokazala generalno nisku i ravnomerno raspoređenu imunofluorescencu insulina u tumorskom tkivu. Sporadične kancerske ćelije pokazivale su viši nivo imunofluorescence insulina, međutim, ove ćelije su bile difuzno raspoređene. Imunofluorescencija PFKFB3 je bila pretežno difuzna sa niskim signalom, iako su bili vidljivi lokalizovani klasteri kancerskih ćelija sa povećanom imunofluorescencijom PFKFB3. U tumorima mase 50 mg, obrazac imunofluorescence insulina bio je sličan, ali je bilo prisutno manje izolovanih kancerskih ćelija sa jakim signalom insulina. Umesto toga, insulin-pozitivne kancerske ćelije češće su se pojavljivale u lokalizovanim klasterima unutar specifičnih regiona tumora. Imunofluorescencija PFKFB3 pokazivala je sličan prostorni obrazac, sa regionalnim povećanjem signala i izraženijim klasterima u poređenju sa tumorima od 10 mg. U tumorima mase 200 mg, imunofluorescencija insulina je bila smanjena u poređenju sa tumorima od 10 i 50 mg. Ograničen broj kancerskih ćelija pokazivao je povišen signal insulina, a ukupna imunofluorescencija delovala je slabo i difuzno. Imunofluorescencija PFKFB3 bila je takođe smanjena u poređenju sa tumorima od 10 i 50 mg, pokazujući pretežno nizak i homogen raspored. Kolokalizacija PFKFB3 i insulina pokazala je pretežno srednji stepen kolokalizacije PFKFB3 i insulina u tumorskim tkivima WT miševa svih grupa. Međutim, u tumorima od 10 i 50 mg, visok stepen kolokalizacije bio je dominantniji u odnosu na nizak, dok su tumori od 200 mg češće pokazivali njihovu nisku kolokalizaciju (Slika 39E).

Kod *Nrf2*KO miševa (Slika 39B), konfokalna mikroskopija tumora mase 10 mg je pokazala nisku i homogenu imunofluorescencu insulina u tumorskom tkivu. Uočena je zoniranost, sa diskretnim regionima koji su pokazivali nešto višu imunofluorescencu insulina. Imunofluorescencija PFKFB3 bila je generalno slaba, sa malim brojem kancerskih ćelija koje su pokazivale povećan signal. U tumorima mase 50 mg kod *Nrf2*KO miševa, imunofluorescencija insulina pokazivala je veću heterogenost u poređenju sa tumorima od 10 mg. Klasteri kancerskih ćelija pokazivali su povišenu imunofluorescencu insulina, uz pojedinačne ćelije sa višim signalom u odnosu na ostatak tkiva. Imunofluorescencija PFKFB3 pokazivala je sličan heterogeni obrazac, sa nekoliko kancerskih ćelija i manjih klastera koji su pokazivali pojačan signal PFKFB3. U tumorima mase 200 mg, imunofluorescencija insulina bila je smanjena u odnosu na grupu od 50 mg i nalikovala je niskoj i homogenoj distribuciji uočenoj u tumorima od 10 mg, dok je samo nekoliko kancerskih ćelija pokazivalo povećanu imunofluorescencu insulina. Imunofluorescencija PFKFB3 je bila takođe ujednačenija i generalno slabija nego u tumorima od 50 mg, nalikujući obrascu iz tumora mase 10 mg. Kolokalizacija PFKFB3 i insulina pokazala je dominantan srednji stepen kolokalizacije u svim grupama *Nrf2*KO miševa. Visoka kolokalizacija uočena je u manjem broju kancerskih ćelija, naročito u grupi od 10 mg, dok je niska kolokalizacija bila retka, uočena u malo većem procentu u istim tumorima (Slika 39E).

Kvantifikacija imunofluorescence pokazala je da su nivoi insulina u tumorskom tkivu bili značajno niži u tumorima od 10 mg *Nrf2*KO miševa u poređenju sa istom veličinom tumora kod WT miševa. Imunofluorescentni signal insulina se povećavao u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa sa rastom tumora, dok su WT miševi pokazali opadanje nivoa insulina u tumorskom tkivu sa rastom tumora, s obzirom da je nivo imunofluorescence u tumorima mase 200 mg bio značajno niži u poređenju sa tumorima mase 10 mg (Slika 39D). Iako je imunofluorescentni signal PFKFB3 bio generalno nepromenjen (Slika 39C), analiza proteinske ekspresije pokazala je da je proteinski nivo

PFKFB3 bio značajno povećan sa rastom tumora i kod WT i *Nrf2*KO miševa (Slika 39F), pri čemu su njegovi nivoi bili niži u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa. Pored toga, proteinski nivo PFK1 bio je značajno povećan sa rastom tumora samo kod WT miševa (Slika 39G).



Slika 39. Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija PFKFB3 i insulina u tumorskom tkivu (A) WT i (B) *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazana su imunobojenja za PFKFB3 (crveno) i insulin (zeleno) na zasebnim kanalima, kao i integrisani kanal koji pokazuje kolokalizaciju PFKFB3/insulin, dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. Na graficima je prikazan relativni intenzitet fluorescence (C) PFKFB3 i (D) insulina, kao i (E) % PFKFB3/insulin kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije. Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. Proteinski nivoi (F) PFKFB3 i (G) PFK1 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

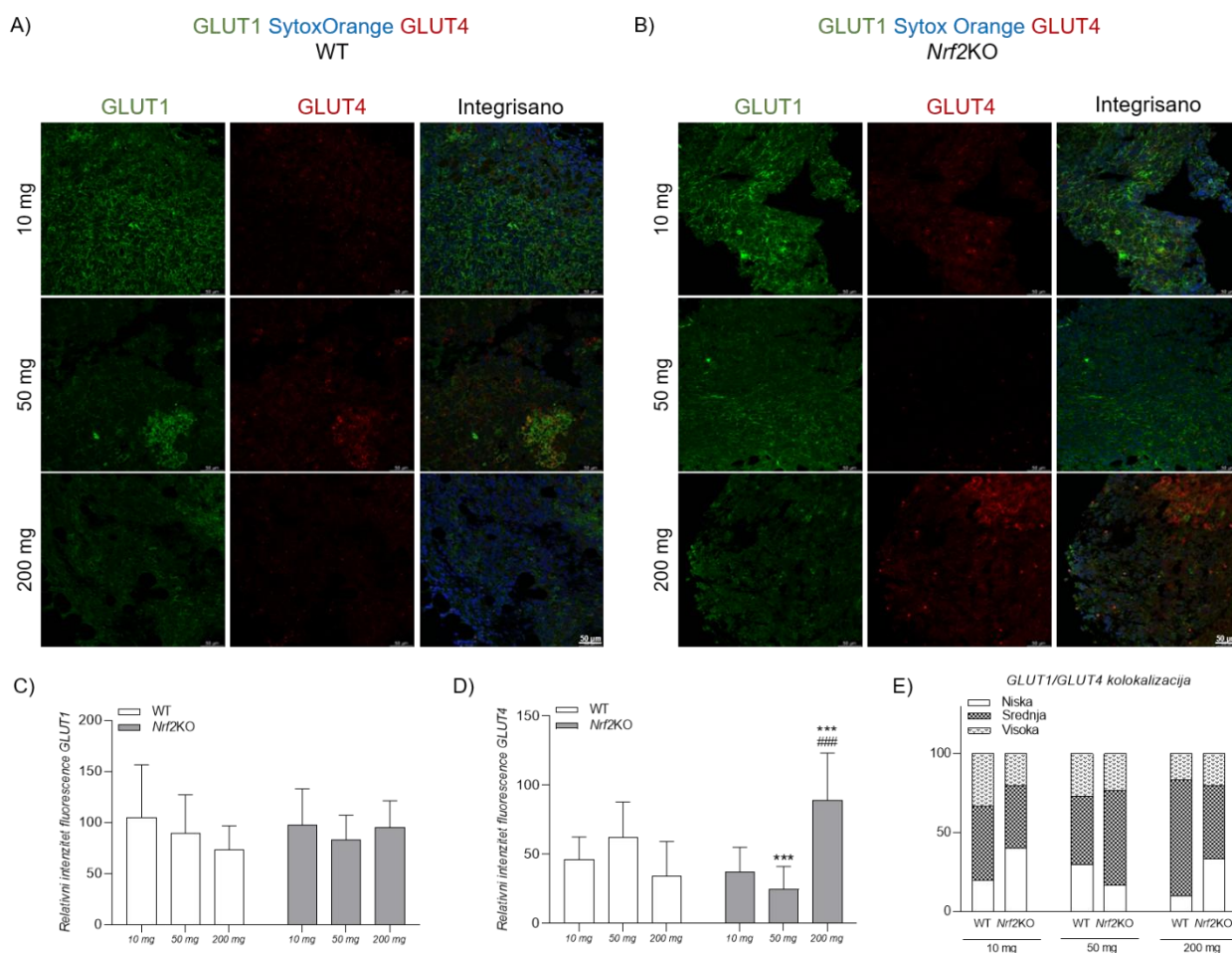
4.6.2. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija GLUT1 i GLUT4 u tumorskom tkivu dojke

Zatim smo ispitali proteinsku ekspresiju, tkivnu lokalizaciju i kolokalizaciju dve izoforme glukoznih transportera, GLUT1 (bazalni unos glukoze) i GLUT4 (hormon-stimulisan unos glukoze), u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 40).

Kod WT miševa (Slika 40A), konfokalna mikroskopija tumora mase 10 mg pokazala je pretežno homogeno raspoređenu imunofluorescencu GLUT1 u tumorskom tkivu, uz pojedinačne rasute kancerske ćelije sa većim intenzitetom signala. Imunofluorescencija GLUT4 bila je generalno slabija i difuzno raspoređena, iako su neke pojedinačne kancerske ćelije pokazivale pojačan signal GLUT4. U tumorima mase 50 mg, imunofluorescencija GLUT1 bila je manje uniformno raspoređena u poređenju sa grupom od 10 mg. Iako je ukupni intenzitet signala bio sličan, uočene su regije sa klasterima kancerskih ćelija sa povećanom imunofluorescencijom GLUT1 u odnosu na ostatak tumorskog tkiva. Imunofluorescencija GLUT4 pokazala je sličan prostorni obrazac, sa lokalizovanim klasterima kancerskih ćelija koje su pokazale jači signal. U tumorima mase 200 mg, imunofluorescencija GLUT1 bila je smanjena u odnosu na grupe od 10 i 50 mg. Samo mali broj kancerskih ćelija pokazivao je pojačan signal GLUT1, a ukupni signal je bio slabiji. Imunofluorescencija GLUT4 je takođe bila smanjena i uglavnom difuzna, uz nekoliko kancerskih ćelija sa pojačanim signalom, ali ređe nego u grupi od 50 mg. Kolokalizacija GLUT1 i GLUT4 u tumorskim tkivima WT miševa pokazala je da su GLUT1 i GLUT4 uglavnom umereno kolokalizovani u svim grupama. Visoka kolokalizacija bila je izraženija u grupama od 10 i 50 mg, dok je grupa od 200 mg pokazivala dominantno umerenu kolokalizaciju sa manjim brojem regiona visokog preklapanja (Slika 40E).

Kod *Nrf2*KO miševa (Slika 40B), imunofluorescencija GLUT1 bila je homogeno raspoređena kroz tumor mase 10 mg, uz nekoliko klastera kancerskih ćelija sa pojačanim signalom. Imunofluorescencija GLUT4 pokazala je sličan obrazac, sa rasutim kancerskim ćelijama koje su imale veći intenzitet signala. U tumorima mase 50 mg, imunofluorescencija GLUT1 ostala je uglavnom homogena, ali smanjena u poređenju sa grupom od 10 mg, uz poneke klustere sa pojačanim signalom. Imunofluorescencija GLUT4 bila je generalno slaba, a samo sporadične kancerske ćelije pokazivale su blago pojačan signal u odnosu na okolno tkivo. U tumorima mase 200 mg, imunofluorescencija GLUT1 podsećala je na obrazac iz grupe od 50 mg, sa ukupnim slabim signalom i ograničenim regionalnim pojačanjem signala. Imunofluorescencija GLUT4 pokazala je homogen obrazac sličan onom u grupi od 10 mg, dok su neki tumorski regioni pokazivali veći intenzitet signala koji nije bio prisutan u grupama od 10 i 50 mg. Kolokalizacija GLUT1 i GLUT4 u tumorskim tkivima *Nrf2*KO miševa pokazala je dominantno nizak stepen kolokalizacije GLUT1 i GLUT4 u tumorima od 10 mg, tumori od 50 mg su dominantno pokazivali regione sa umerenom kolokalizacijom, kao i u tumorima od 200 mg, uz veći stepen i niske kolokalizacije (Slika 40E).

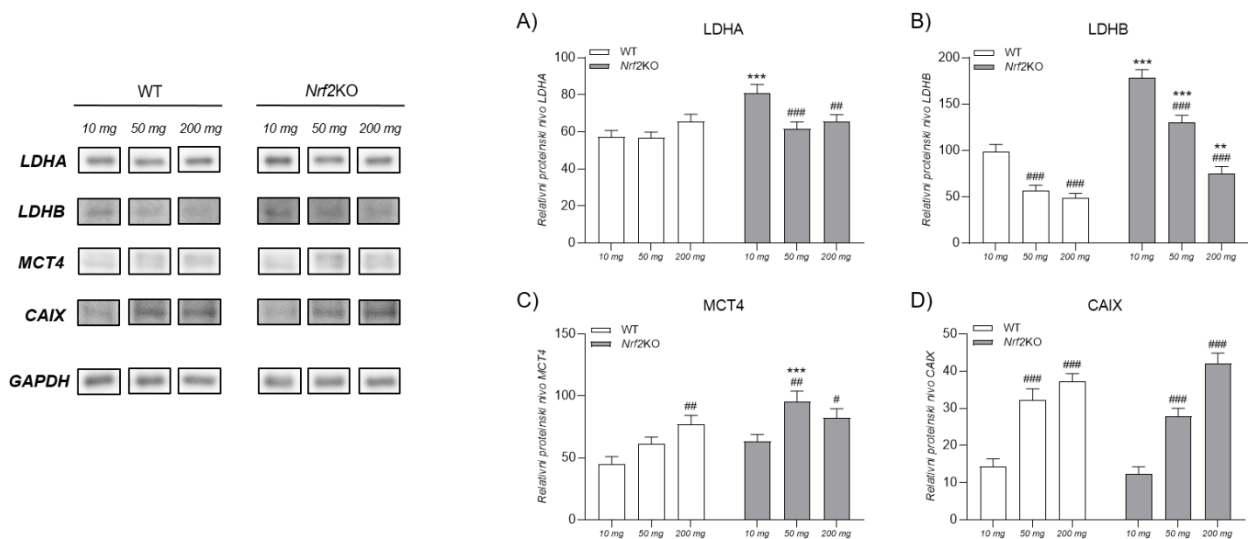
Kvantitativna analiza imunofluorescence pokazala je nepromenjene nivoe GLUT1 u tumorskom tkivu oba genotipa miševa (Slika 40C), dok su nivoi GLUT4 značajno porasli sa rastom tumora (tumori od 200 mg) samo kod *Nrf2*KO miševa (Slika 40D). Obrasci imunofluorescence GLUT4 i insulina u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa bili su relativno konstantni, uz povećanje nivoa GLUT4 u kasnoj fazi rasta tumora (tumori od 200 mg).



Slika 40. Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija GLUT1 i GLUT4 u tumorskom tkivu (A) WT i (B) *Nrf2KO* miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazana su imunobojenja za GLUT1 (zeleno) i GLUT4 (crveno) na zasebnim kanalima, kao i integrisani kanal koji pokazuje kolokalizaciju GLUT1/GLUT4, dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 25 μ m. Na graficima je prikazan relativni intenzitet fluorescence (C) GLUT1 i (D) GLUT4, kao i (E) % GLUT1/GLUT4 kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije. Uvećanje: x40 orig. Bar: 50 μ m. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), ### $p < 0.001$.

4.6.3. Proteinski nivoi enzima uključenih u metabolizam laktata u tumorskom tkivu dojke

Proteinski nivo ključnih enzima uključenih u metabolizam laktata u tumorskom tkivu WT i *Nrf2KO* miševa tokom rasta tumora dojke prikazan je na Slici 41. Tumorsko tkivo WT miševa pokazalo je stabilne proteinske nivoe LDHA (Slika 41A), smanjene nivoe LDHB (Slika 41B) i povećane nivoe MCT4 (Slika 41C) sa rastom tumora. Nasuprot tome, tumorsko tkivo *Nrf2KO* miševa pokazalo je značajno više nivoe proteina LDHA (Slika 41A) i LDHB (Slika 41B) u inicijalnoj fazi rasta tumora (tumori od 10 mg) u poređenju sa istom grupom WT miševa, koji su opadali sa daljim rastom tumora. Ipak, proteinski nivo LDHB je ostao značajno viši tokom svih faza rasta tumora kod *Nrf2KO* miševa u poređenju sa WT miševima. Takođe, kao što je prikazano na Slici 41C, proteinski nivo MCT4 bio je veći u tumorima od 50 mg i 200 mg kod *Nrf2KO* miševa, odnosno veći u tumorima od 200 mg kod WT miševa, u poređenju sa inicijalnom fazom rasta tumora (10 mg) kod miševa istog genotipa. U poređenju sa tumorima od 10 mg, proteinski nivo CAIX se progresivno povećavao sa rastom tumora kod oba genotipa miševa (Slika 41D).



Slika 41. Proteinski nivoi (A) LDHA, (B) LDHB, (C) MCT4 i (D) CAIX u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2KO* (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.6.4. Proteinska ekspresija, lokalizacija i kolokalizacija MCT1/MCT4 i CAIX u tumorskom tkivu dojke

Analiza proteinske ekspresije, lokalizacije i kolokalizacije MCT1/4 i CAIX u tumorskom tkivu WT i *Nrf2KO* miševa tokom rasta tumora dojke primenom konfokalne mikroskopije prikazana je na Slici 42.

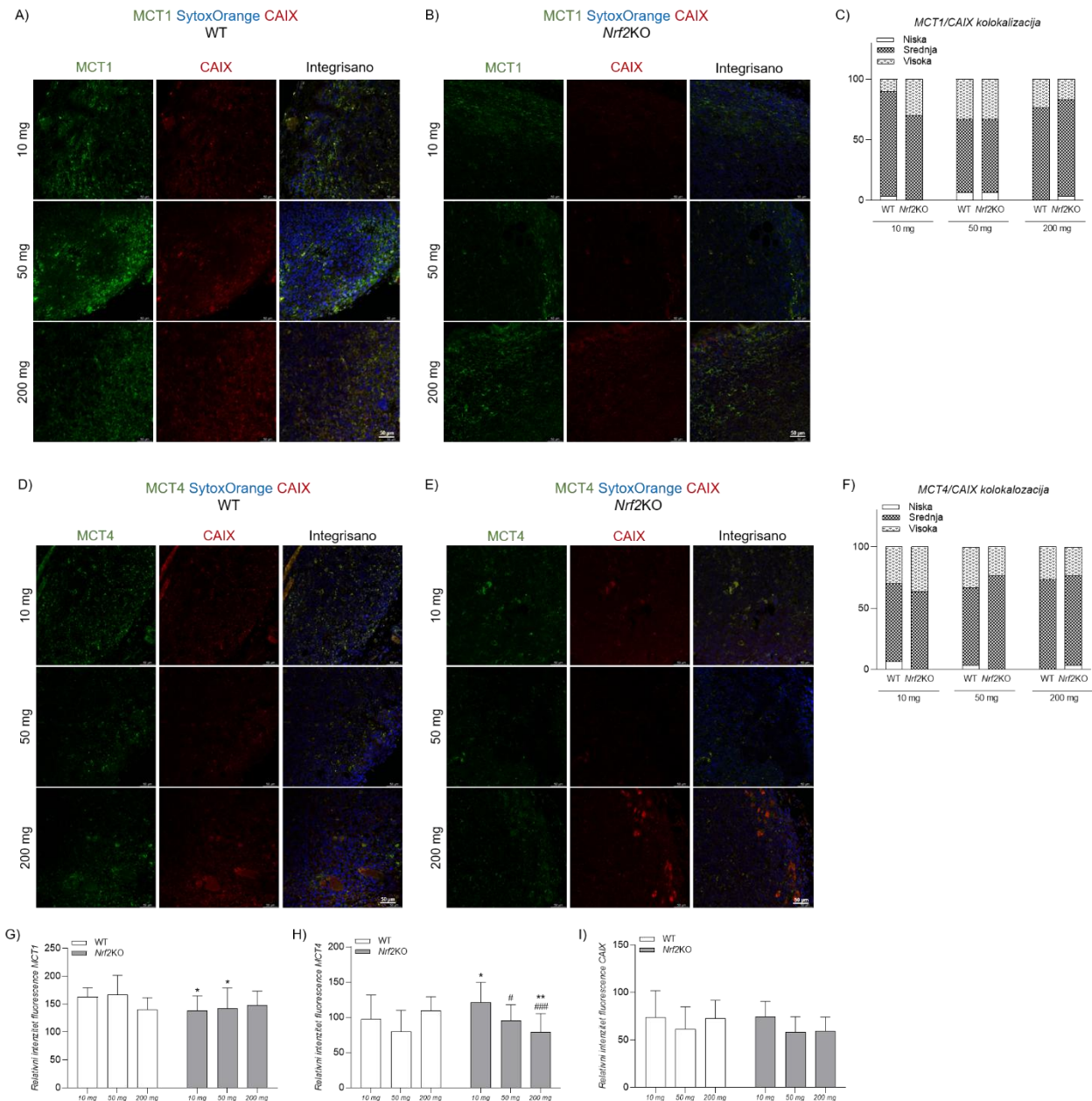
Kod WT miševa (Slika 42A,D), imunofluorescenca MCT1 pokazala je izraženu heterogenost u tumorima od 10 mg, sa tumorskim regionima koji su pokazivali izrazito povećan signal. Imunofluorescenca CAIX takođe je bila heterogena, sa rasutim kancerskim ćelijama koje su pokazivale jači signal. Nasuprot tome, imunofluorescenca MCT4 bila je uglavnom homogena kroz tumorsko tkivo, uz pojedinačne kancerske ćelije sa pojačanim signalom. U tumorima mase 50 mg, imunofluorescenca MCT1 bila je izraženija nego u tumorima od 10 mg i pokazivala je jasnu zoniranost, sa većim brojem pojedinačnih kancerskih ćelija sa povećanim signalom. Imunofluorescenca CAIX pokazivala je povećanu heterogenost, sa regionima pojačanog signala, kao i pojedinačnim kancerskim ćelijama sa većim intenzitetom fluorescence sa rastom tumora u poređenju sa tumorima od 10 mg. Sa druge strane, u tumorima mase 200 mg, imunofluorescenca MCT1 bila je homogenija i smanjena u poređenju sa tumorima od 10 i 50 mg. Imunofluorescenca CAIX takođe je bila homogenija, iako je deo kancerskih ćelija i dalje pokazivao pojačan signal. Nasuprot tome, imunofluorescenca MCT4 pokazivala je izraženiju zoniranost nego u tumorima od 10 i 50 mg, sa većim brojem kancerskih ćelija sa pojačanim signalom. Kolokalizacija MCT1 i CAIX pokazala je dominantno srednji stepen kolokalizacije u tumorskim tkivima svih grupa WT miševa, uz povećanje visokog stepena kolokalizacije sa rastom tumora, pre sve u tumorima od 50 mg (Slika 42C). Kolokalizacija MCT4 i CAIX takođe je bila predominantno srednjeg stepena u svim grupama WT miševa, uz znatno manju prisutnost i visokog stepena kolokalizacije (Slika 42F).

Kod *Nrf2KO* miševa (Slika 42B,E), imunofluorescenca MCT1 pokazivala je zoniranost u tumorima mase 10 mg, sa većim tumorskim regionima koji su pokazivali relativno uniforman i pojačan signal. Imunofluorescenca CAIX bila je generalno niska, sa samo nekoliko kancerskih ćelija koje su pokazivale blago pojačan signal. Nasuprot tome, imunofluorescenca MCT4 bila je homogeno

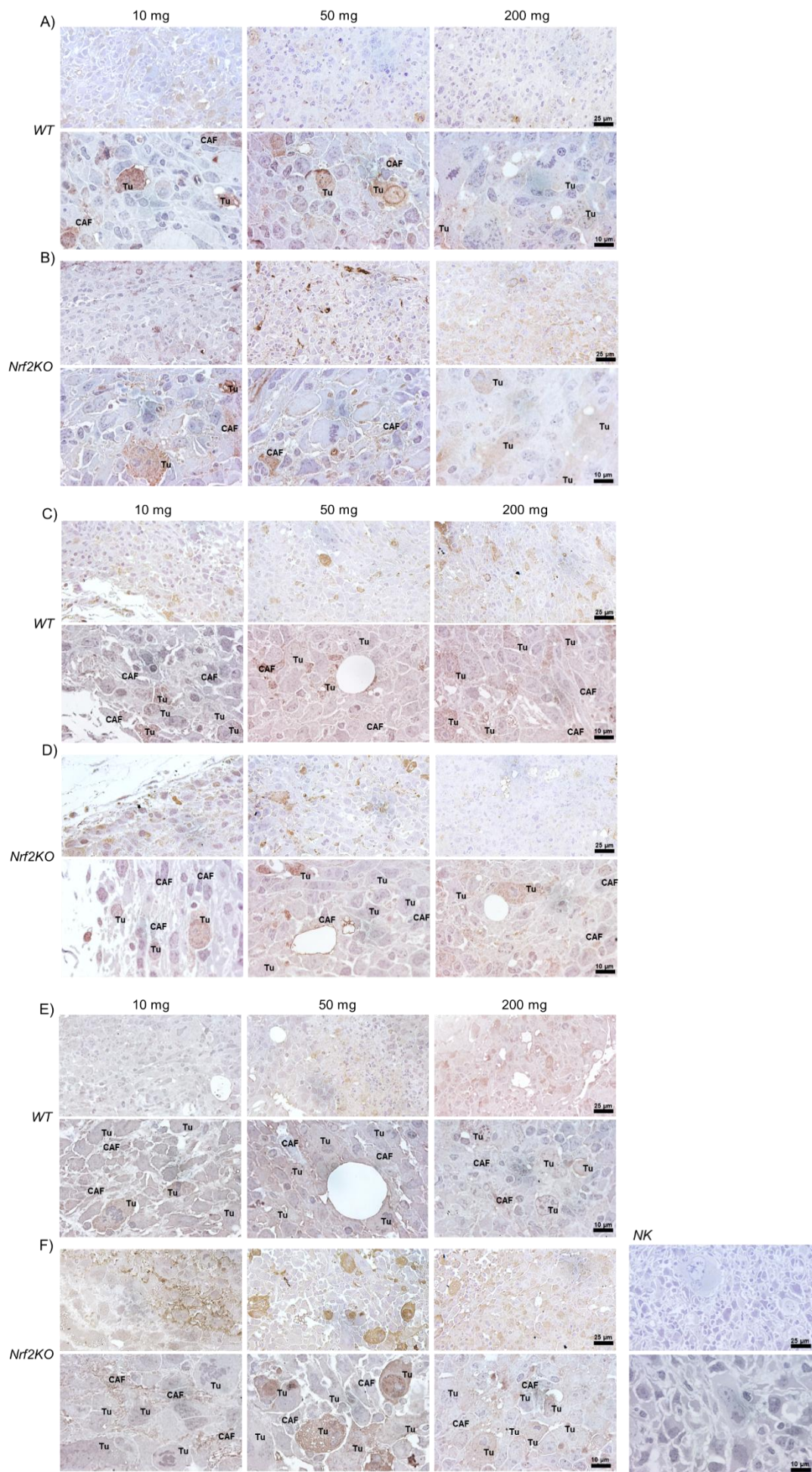
raspoređena kroz tumor, uz pojedinačne kancerske ćelije sa pojačanim signalom. U tumorima mase 50 mg, imunofluorescencija MCT1 pratila je obrazac sličan onom u tumorima od 10 mg, uz dodatne klustere kancerskih ćelija sa pojačanim signalom. Imunofluorescencija CAIX ostala je generalno niska, iako su kancerske ćelije sa pojačanim signalom primećene u klasterima koji su pokazivali povećanu imunofluorescenciju MCT1. Imunofluorescencija MCT4 pokazivala je obrazac sličan onom u tumorima od 10 mg, iako je manji broj kancerskih ćelija pokazivao povećan signal. U tumorima mase 200 mg, imunofluorescencija MCT1 bila je homogenija i pokrivala je veći deo tumorskog tkiva nego u tumorima od 10 i 50 mg. Imunofluorescencija CAIX pokazivala je sličan obrazac, sa diskretnim tumorskim regionima sa povećanim signalom. Imunofluorescencija MCT4 i dalje je bila homogena i pokrivala je veći deo tumorskog tkiva nego u ranijim fazama rasta tumora kod *Nrf2*KO miševa. Kolokalizacija u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa pokazala je da je srednji stepen kolokalizacije MCT1/CAIX (Slika 42C) i MCT4/CAIX (Slika 42F) dominirao u svim grupama. Visok stepen kolokalizacije primećen je u delu kancerskih ćelija, naročito u tumorima od 10 i 50 mg, dok je nizak stepen kolokalizacije bio redak.

4.6.5. Imunohistohemijska detekcija MCT1, MCT4 i CAIX u tumorskom tkivu dojke

Imunohistohemijska analiza monokarboksilatnih transportera MCT1/4 i CAIX u tumorskim tkivima WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke, specifično u kancerskim ćelijama i u kancer-asociranim fibroblastima, prikazana je na Slici 43. U tumorima od 10 mg, detektovana je slična imunopozitivnost MCT1 u kancerskim ćelijama WT i *Nrf2*KO miševa, ali je MCT1 imunopozitivnost bila niža u kancer-asociranim fibroblastima (*eng.* Cancer-associated fibroblast, CAF) kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima istih masa WT miševa. Nasuprot tome, tumore od 50 mg karakterisalo je veće prisustvo MCT1-pozitivnih CAF kod *Nrf2*KO miševa nego kod WT miševa, ali manja zastupljenost MCT1-pozitivnih kancerskih ćelija. U tumorima od 200 mg, imunopozitivnost MCT1 bila je slična između kancerskih ćelija, nezavisno od genotipa miševa, iako je njen intenzitet bio niži nego u tumorima od 10 i 50 mg (Slika 43A,B). U tumorima od 10 mg, imunopozitivnost MCT4 bila je slična, takođe nezavisno od genotipa miševa, sa MCT4-negativnim CAF i MCT4-pozitivnim kancerskim ćelijama. U tumorima od 50 mg, MCT4-pozitivni CAF bili su prisutni samo kod WT miševa, dok su kancerske ćelije pokazivale veću MCT4 imunopozitivnost kod *Nrf2*KO miševa. U tumorima od 200 mg, i WT i *Nrf2*KO miševi pokazivali su mali broj MCT4-pozitivnih CAF i MCT4-pozitivnih kancerskih ćelija (Slika 43C,D). Imunopozitivnost CAIX bila je značajno veća sa rastom tumora u kancerskim ćelijama kod obe grupe miševa (WT i *Nrf2*KO), dok su CAF pokazivali smanjenu imunopozitivnost u kasnijim fazama rasta tumora. U tumorima od 10 mg, *Nrf2*KO miševi pokazivali su veći broj CAIX-pozitivnih CAF i manji broj CAIX-pozitivnih kancerskih ćelija u poređenju sa tumorima iste mase kod WT miševa. U tumorima od 50 mg, obe grupe miševa (WT i *Nrf2*KO) pokazivale su slično sporadično prisustvo CAIX-pozitivnih CAF, ali i povećanu CAIX imunopozitivnost u kancerskim ćelijama. U tumorima od 200 mg, detektovano je povećano prisustvo CAIX-pozitivnih kancerskih ćelija kod miševa oba genotipa, sa jačim intenzitetom signala u poređenju sa tumorima od 50 mg, dok su CAF iz obe grupe pokazivale smanjenu CAIX imunopozitivnost u poređenju sa tumorima od 10 mg (Slika 43E,F).



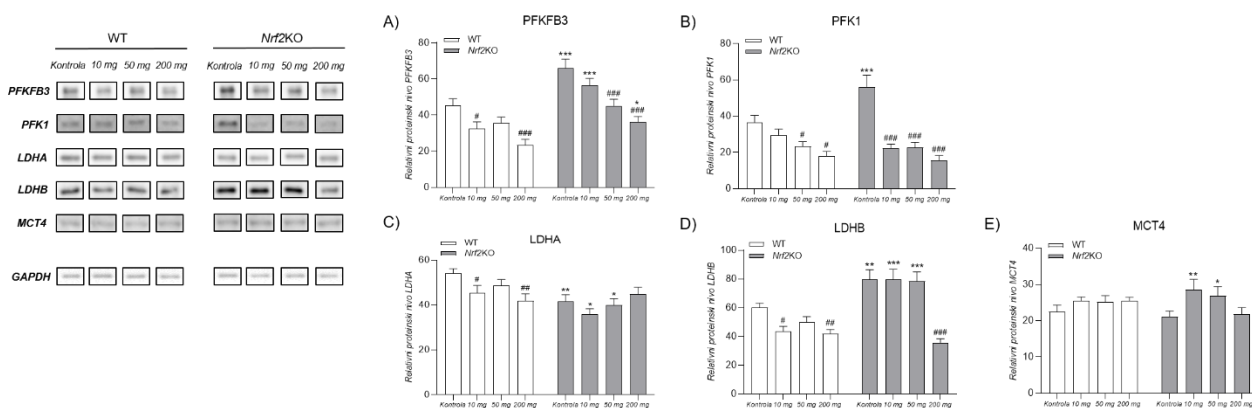
Slika 42. Imunofluorescentna detekcija i kolokalizacija monokarboksilatnih transportera MCT1/MCT4 i CAIX u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Prikazana su imunobojenja za (A,B) MCT1 (zeleno) i CAIX (crveno), odnosno (D,E) MCT4 (zeleno) i CAIX (crveno) na zasebnim kanalima, kao i integrisani kanali koji pokazuju kolokalizaciju MCT1/MCT4 i CAIX, dok su nukleusi obojeni sa Sytox Orange (plavo). Uvećanje: x40 orig. Bar: 50 μ m. Na graficima je prikazan relativni intenzitet fluorescencije (G) MCT1, (H) MCT4, (I) CAIX, kao i (C) % MCT1/CAIX i (F) % MCT4/CAIX kolokalizacije zasnovan na 15 regiona od interesa, klasifikovani kao nizak, srednji ili visok stepen kolokalizacije. Uvećanje: x40, orig. Bar: 50 μ m. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$.



Slika 43. Imunohistohemijska detekcija (A,B) MCT1, (C,D) MCT4 i (E,F) CAIX u kancerskim ćelijama i kancer-asociranim fibroblastima kod WT i *Nrf2*KO miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Tu, kancerska ćelija; CAF, kancer-asocirani fibroblast; NK, negativna kontrola. Uvećanje: x40/x100, orig. Bar: 25/10 μ m.

4.6.6. Proteinski nivoi enzima metabolizma glukoze i laktata u kancer-asociranom masnom tkivu

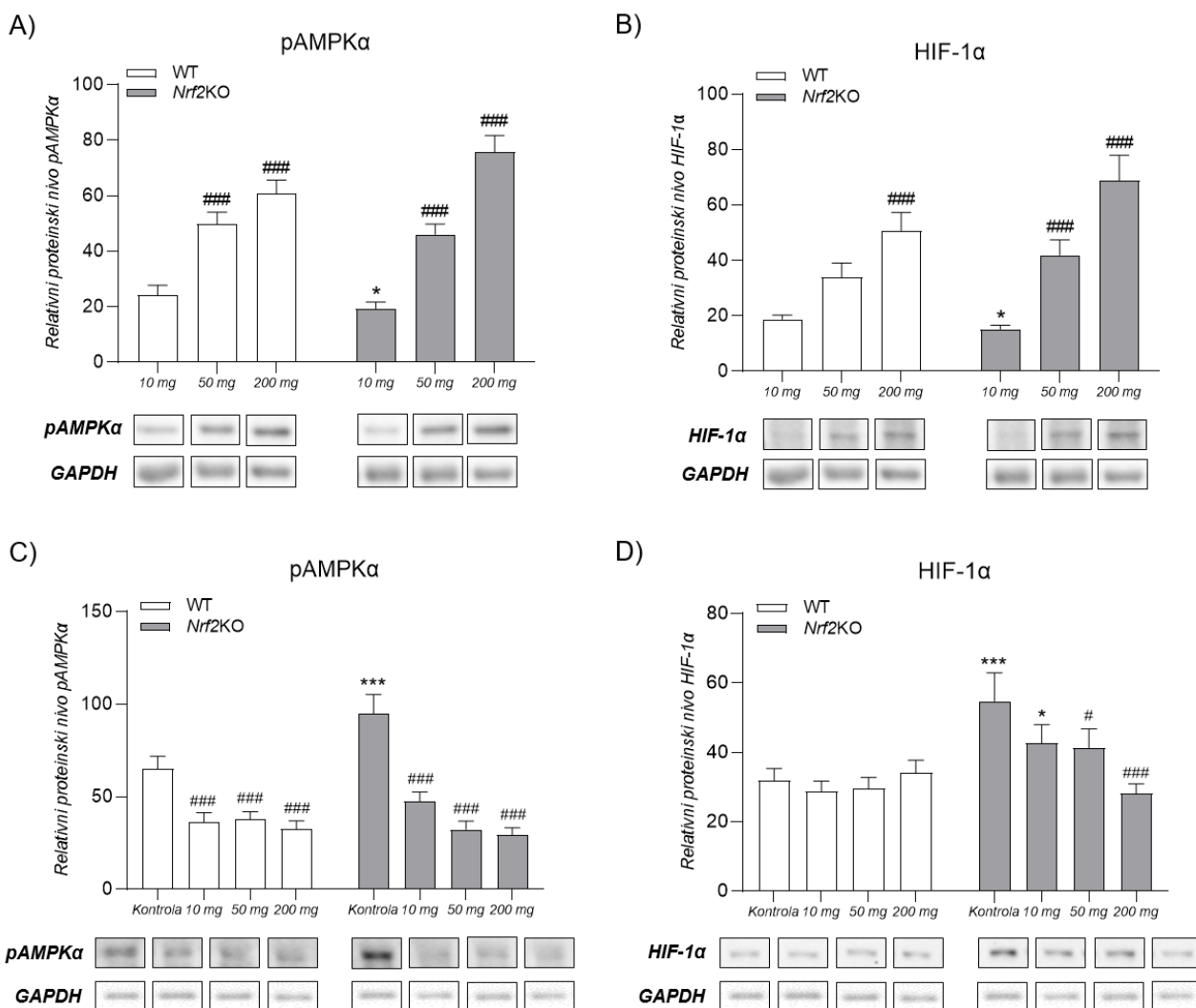
Proteinski nivo ključnih enzima glikolize i metabolizma laktata u CAAT WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazan je na Slici 44. CAAT WT miševa pokazao je opadajući profil proteinskog nivoa PFKFB3 (Slika 44A) i PFK1 (Slika 44B), opadajuće proteinske nivoe LDHA (Slika 44C) i LDHB (Slika 44D) i nepromenjene proteinske nivoe MCT4 (Slika 44E) sa rastom tumora. Iako su i dalje pokazivali opadajući ekspresioni profil sa rastom tumora, proteinski nivoi PFKFB3 bili su značajno veći u CAAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa CAAT WT miševa sa tumorima od 10 i 200 mg. Pored toga, nivoi proteina uključenih u metabolizam laktata, LDHB i MCT4, bili su značajno veći u CAAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa odgovarajućim WT grupama, dok je značajno niži proteinski nivo LDHA detektovan u CAAT kod *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 i 50 mg u odnosu na odgovarajuće WT grupe. Dodatno, proteinski nivoi PFKFB3, PFK1 i LDHB su bili značajno veći, dok je LDHA bio značajno niži u CAAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa bez tumora u poređenju sa CAAT kontrolnih WT miševa bez tumora.



Slika 44. Proteinski nivoi (A) PFKFB3, (B) PFK1, (C) LDHA, (D) LDHB i (E) MCT4 u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.6.7. Proteinski nivoi pAMPK α i HIF-1 α u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu

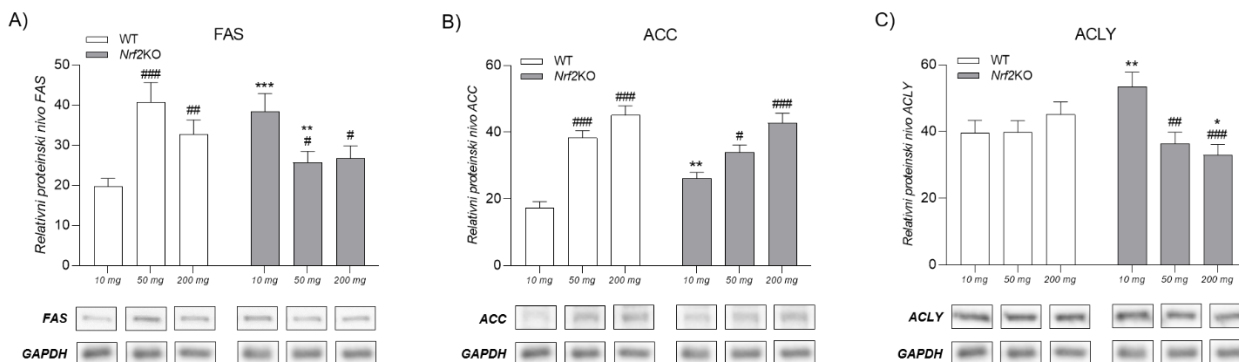
Zatim smo ispitali promene u proteinskim nivoima ključnih regulatora glikolize, pAMPK α (*eng.* phosphorylated AMPK α) i HIF-1 α , u tumorskom i kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 45). Njihovi proteinski nivoi bili su značajno povećani sa rastom tumora u tumorskim tkivima i WT i *Nrf2*KO miševa. Međutim, kod *Nrf2*KO miševa, tumori od 10 mg pokazali su značajno niže proteinske nivoe pAMPK α i HIF-1 α u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa (Slika 45A,B). pAMPK α je pokazao isti opadajući ekspresioni profil sa rastom tumora u CAAT WT i *Nrf2*KO miševa u odnosu na CAAT kontrolnih miševa istog genotipa bez tumora (Slika 45C). Proteinski nivo HIF-1 α nije se menjao sa rastom tumora u CAAT WT miševa, dok su se u CAAT *Nrf2*KO miševa njegovi proteinski nivoi smanjili sa rastom tumora (Slika 45D). U CAAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa bez tumora, detektovani su značajno veći proteinski nivoi pAMPK α (Slika 45C) i HIF-1 α (Slika 45D) u poređenju sa CAAT kontrolnih WT miševa bez tumora.



Slika 45. Proteinski nivoi pAMPK α i HIF-1 α u (A,B) tumorskom tkivu i (C,D) kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora (C,D) i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg (A,B,C,D). Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno ekspimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg) (A,B) ili kontrolom bez tumora (C,D), # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$.

4.7. Proteinski nivoi enzima biosinteze masnih kiselina u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

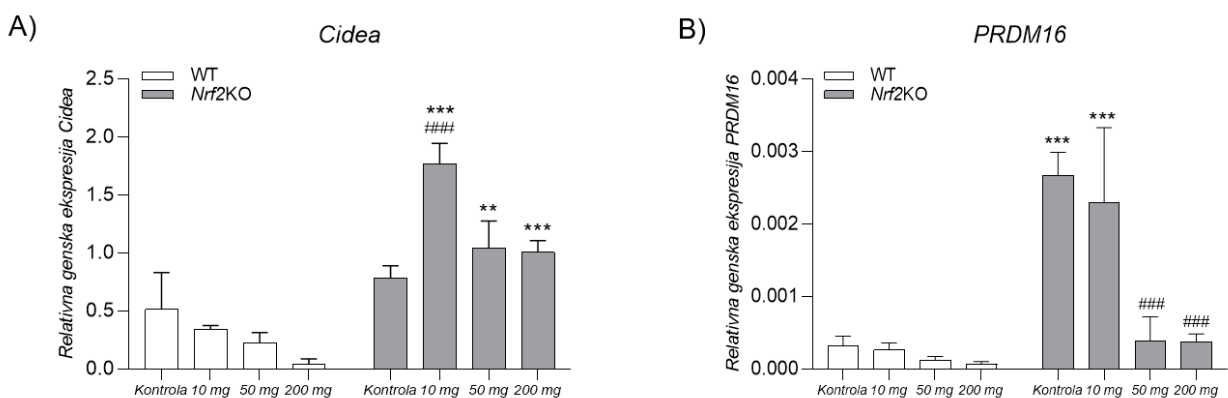
Na Slici 46 prikazan je proteinski nivo FAS, ACC i ACLY u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke. Sva tri enzima biosinteze lipida imala su povišene proteinske nivoe u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima iste mase WT miševa. Dok su ti nivoi FAS (Slika 46A) i ACLY (Slika 46C) opadali sa rastom tumora, nivoi ACC su se povećavali u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa (Slika 46B). Kod WT miševa, proteinski nivoi FAS (Slika 46A) i ACC (Slika 46B) takođe su bili veći sa rastom tumora, dok su ACLY proteinski nivoi ostali nepromenjeni bez obzira na rast tumora (Slika 46C).



Slika 46. Proteinski nivoi (A) FAS, (B) ACC i (C) ACLY u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.8. Genska ekspresija markera mrkih i bež adipocita u kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

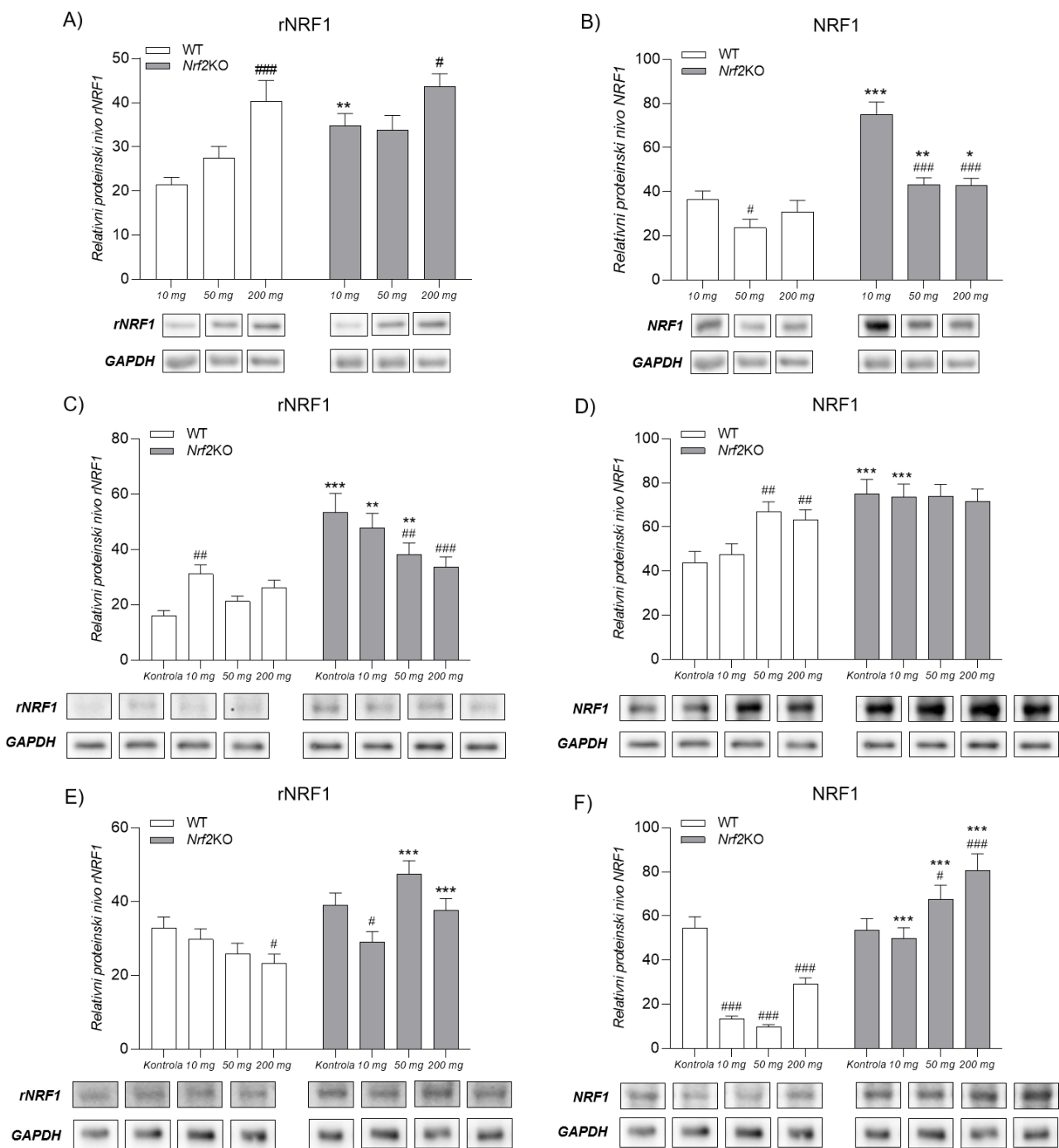
Dalje smo ispitali gensku ekspresiju *Cidea* (eng. Cell death-inducing DFFA-like effector A), markera bež adipocita (*browning* marker), i *PRDM16* (eng. PR domain containing 16), markera mrkih adipocita, u kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke (Slika 47). Genska ekspresija *Cidea* bila je nepromenjena u CAAT WT miševa tokom eksperimenta, dok je u CAAT *Nrf2*KO miševa bila snažno povećana sa pojavom tumora (tumori od 10 mg), ali se sa daljim rastom tumora vratila na kontrolni nivo (Slika 47A). Dodatno, genska ekspresija *Cidea* bila je značajno viša u CAAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa CAAT WT miševa sa tumorima istih masa. Genska ekspresija *PRDM16* takođe je bila nepromenjena i jedva detektabilna u CAAT WT miševa bez obzira na prisustvo i rast tumora. Sa druge strane, CAAT *Nrf2*KO miševa karakterisao se značajno višim nivoima genske ekspresije *PRDM16* u kontrolnim i miševima sa tumorima od 10 mg u odnosu na iste WT grupe. Genska ekspresija *PRDM16* značajno se smanjila u CAAT *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 50 i 200 mg u odnosu na CAAT kontrolnih miševa bez tumora (Slika 47B).



Slika 47. Genska ekspresija (A) *Cidea* i (B) *PRDM16* u kancer-asociranom masnom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2KO* (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom kontrolom bez tumora, ### $p < 0.001$.

4.9. Proteinski nivoi rNRF1 i NRF1 u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i *Nrf2KO* miševa tokom rasta tumora dojke

Profili proteinskih nivoa transkripcionih faktora NRF1, jednog od ključnih regulatora redoks homeostaze, i rNRF1, ključnog regulatora mitohondrijalne biogeneze i energetskog metabolizma, u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i *Nrf2KO* miševa tokom rasta tumora dojke prikazani su na Slici 48. Proteinski nivoi rNRF1 povećali su se u tumorskim tkivima u kasnoj fazi rasta tumora (200 mg) kod oba genotipa miševa (Slika 48A). Sa druge strane, proteinski nivo NRF1 bio je prolazno smanjen u tumorima mase 50 mg kod WT miševa, dok je u tumorskom tkivu *Nrf2KO* miševa bio značajno smanjen sa rastom tumora (tumori mase 50 i 200 mg) u odnosu tumore od 10 mg (Slika 48B). Dodatno, u tumorima od 10 mg kod *Nrf2KO* miševa detektovani su značajno viši proteinski nivoi NRF1 i rNRF1, u poređenju sa tumorima iste mase kod WT miševa. U CAAT WT miševa, proteinski nivoi rNRF1 pokazali su trend povećanja sa rastom tumora, dok su u CAAT *Nrf2KO* miševa bili značajno niži sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg tumori). Istovremeno, CAAT je pokazao znatno viši proteinski nivo rNRF1 u kontrolnim *Nrf2KO* miševima bez tumora i gotovo svim tačkama rasta tumora (osim tumora od 200 mg) u odnosu na CAAT WT miševa sa tumorima istih masa (Slika 48C). Proteinski nivo NRF1 bio je povećan u CAAT WT miševa sa rastom tumora (tumori od 50 i 200 mg), dok su u CAAT *Nrf2KO* miševa ti nivoi ostali nepromenjeni. Slično kao i kod rNRF1, u CAAT *Nrf2KO* miševa proteinski nivoi NRF1 bili su znatno viši kod kontrolnih i miševa sa tumorima od 10 mg u odnosu na odgovarajuće grupe WT miševa (Slika 48D). Za razliku od CAAT, iWAT je pokazao opadajuće proteinske nivoe rNRF1 (Slika 48E) i NRF1 (Slika 48F) sa rastom tumora i kod WT i kod *Nrf2KO* miševa. Sa druge strane, zabeleženo je samo prolazno smanjenje proteinskog nivoa rNRF1 u iWAT *Nrf2KO* miševa sa 10 mg tumorima (Slika 48E), dok su proteinski nivoi NRF1 rasli sa daljim rastom tumora (Slika 48F). Slično kao i u CAAT, proteinski nivoi rNRF1 i NRF1 bili su veći u iWAT *Nrf2KO* miševa u odnosu na iWAT WT miševa sa tumorima mase 50 i 200 mg, dok su proteinski nivoi NRF1 bili povećani i u iWAT *Nrf2KO* miševa sa tumorima od 10 mg.

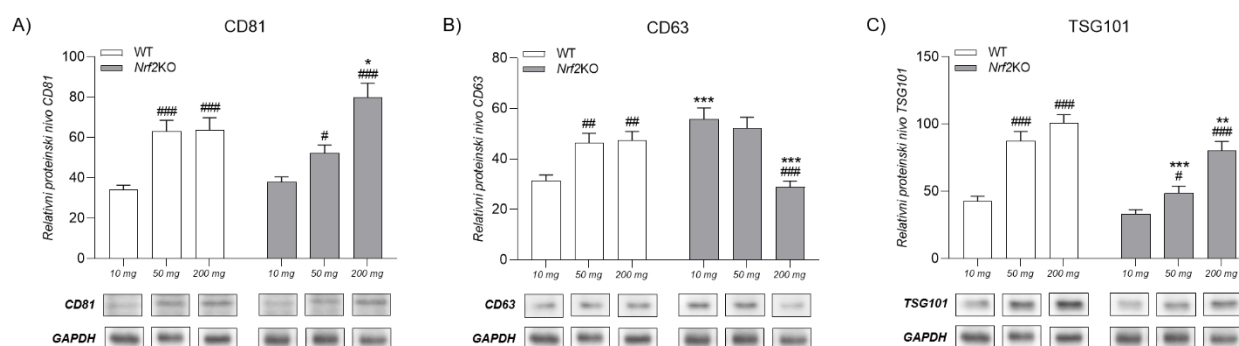


Slika 48. Proteinski nivoi rNRF1 i NRF1 u (A,B) tumorskom tkivu, (C,D) kancer-asociranom i (E,F) kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu kod WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) kontrolnih miševa bez tumora (C-F) i miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg) (A,B) ili kontrolom bez tumora (C-F), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.10. Analiza molekularnih markera ekstracelularnih vezikula u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

4.10.1. Proteinski nivoi markera ekstracelularnih vezikula

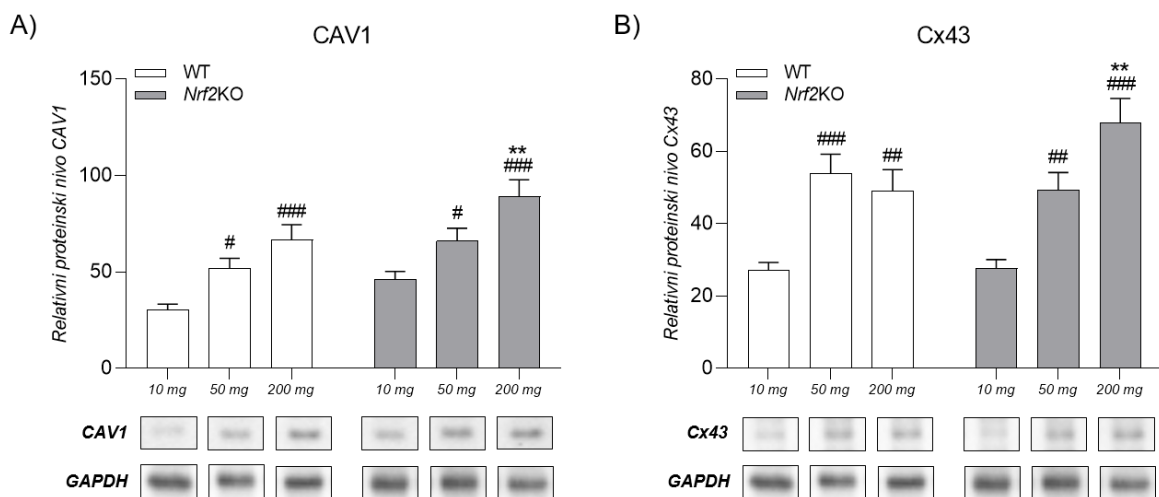
Proteinski nivoi markera ekstracelularnih vezikula CD81 (eng. Cluster of differentiation 81), CD63 (eng. Cluster of differentiation 63) i TSG101 (eng. Tumor susceptibility gene 101) u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazana je na Slici 49. U tumorskim tkivima WT miševa uočeno je povećanje proteinskih nivoa sva tri markera sa rastom tumora (tumori mase 50 i 200 mg). Sličan obrazac zabeležen je i u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa za CD81 (Slika 49A) i TSG101 (Slika 49C). Međutim, proteinski nivo CD63 bio je smanjen u tumorima od 200 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa tumorima od 10 mg, dok su tumori od 10 mg pokazali značajno veći proteinski nivo CD63 u poređenju sa tumorima iste mase kod WT miševa (Slika 49B). Sa druge strane, proteinski nivo TSG101 bio je značajno niži u tumorima od 50 i 200 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa istim masama tumora WT miševa (Slika 49C).



Slika 49. Proteinski nivo (A) CD81, (B) CD63 i (C) TSG101 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.10.2. Proteinski nivoi kaveolina 1 i koneksina 43

Proteinski nivo kaveolina 1 (eng. Caveolin 1, CAV1) i koneksina 43 (eng. Connexin 43, Cx43), strukturnih proteina uključenih u međučelijsku komunikaciju posredovanu ekstracelularnim vezikulama, u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke prikazan je na Slici 50. Nezavisno od genotipa miševa, primećeno je povećanje proteinskih nivoa CAV1 (Slika 50A) i Cx43 (Slika 50B) u tumorima mase 50 i 200 mg u odnosu na tumore od 10 mg miševa istog genotipa. Međutim, tumori mase 200 mg pokazali su značajno više proteinske nivoe ovih proteina kod *Nrf2*KO miševa u odnosu na tumore iste mase kod WT miševa.



Slika 50. Proteinski nivoi (A) CAV1 i (B) Cx43 u tumorskom tkivu WT (beli barovi) i *Nrf2*KO (sivi barovi) miševa sa tumorima mase 10, 50 i 200 mg. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na GAPDH kao konstitutivno eksprimirani protein. Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. * Poređenje sa respektivnom WT grupom, ** $p < 0.01$; # Poređenje sa respektivnom inicijalnom fazom rasta tumora dojke (tumori mase 10 mg), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

5. DISKUSIJA

Redoks i metaboličko reprogramiranje predstavlja jedno od ključnih obeležja tumorogeneze. Ovaj proces ne obuhvata samo intrinzične adaptacije kancerskih ćelija, već i koordinisano remodeliranje tumorske mikrosredine, koju u kanceru dojke dominantno sačinjava kancer-asocirano masno tkivo. Tumorska mikrosredina je označena kao funkcionalna komponenta tumora kao pseudo-organa, gde utiče na različite parametre progresije kancera – rast, invazivnost, adaptivni kapacitet i odgovor na terapiju. U skladu sa konceptom kancera kao pseudo-organa, razumevanje komunikacije između tumorskog tkiva dojke i CAAT, kao i molekulskih mehanizama uključenih u uspostavljanje ove dvosmerne veze, posebno je značajno sa aspekta sinhronizovanog redoks i metaboličkog reprogramiranja kojim podležu oba tkiva, omogućavajući progresiju tumora. U cilju detaljnijeg sagledavanja ovih promena, u ortotopskoj studiji na C57 miševima divljeg soja ispitivan je redoks-metabolički profil u tumorskom tkivu, CAAT kao primarnoj komponenti tumorske mikrosredine u kanceru dojke, kao i u udaljenom, kontralateralnom iWAT, koje je služilo kao pokazatelj sistemskih efekata kancera dojke. Ove promene su ispitivane u zavisnosti od faze rasta tumora, definisane kao inicijalna (tumori mase 10 mg), srednja (tumori mase 50 mg) i kasna faza (tumori mase 200 mg). Dodatno, indukcijom kancera dojke sa *Nrf2*^{+/+} kancerskim ćelijama na miševima istog soja sa funkcijski utišanim NRF2 (*Nrf2*KO miševi), po prvi put je ispitana uloga NRF2 signalizacije u tumorskoj mikrosredini u regulaciji redoks-metaboličkog reprogramiranja tumorskog tkiva dojke, kao i direktan efekat izostanka NRF2 signalizacije na reprogramiranje CAAT i iWAT tokom rasta tumora dojke.

Naime, rezultati su pokazali da NRF2 signalizacija u TME predstavlja važan regulator dvosmerne komunikacije između tumorskog tkiva dojke i CAAT, utičući na redoks homeostazu, metabolizam glukoze, laktata i masnih kiselina, mitohondrijalnu dinamiku i funkciju tokom rasta tumora. Pri tome, inicijalna faza rasta tumora, odnosno tumori mase 10 mg, izdvaja se kao period sa najvećom osetljivošću tumora na NRF2-zavisne promene u CAAT, dok se sa daljim rastom razlike između tumorskih tkiva WT i *Nrf2*KO miševa postepeno ublažavaju, najverovatnije usled aktivacije kompenzatornih mehanizama u kancerskim ćelijama. Rezultati disertacije ukazuju na najveći uticaj NRF2-zavisnog redoks statusa tumorske mikrosredine u najranijim fazama rasta tumora, kada reprogramiranje kancerskih ćelija još uvek u velikoj meri zavisi od redoks-metaboličke interakcije sa stromalnim ćelijama u TME, pre svega kancer-asociranim adipocitima.

5.1. Uticaj prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u TME na strukturne karakteristike tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva tokom rasta tumora dojke

Masa tumora predstavlja jedan od indikatora progresije tumora, s obzirom na to da fizički parametri tumora, uključujući veličinu, masu i zapreminu, odražavaju dinamiku rasta solidnih tumora (Stylianopoulos, 2017). U skladu sa tim, WT miševi su u vremenskom periodu kraćem od 2 nedelje nakon inicijacije tumora pokazivali trend većih masa tumora u odnosu na *Nrf2*KO miševe. Nakon 2 nedelje, mase tumora su se značajno povećale i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa, bez značajnih razlika između genotipova. Paralelno sa tim, samo je kod WT miševa u inicijalnoj fazi rasta tumora (tumori od 10 mg) uočeno smanjenje relativne mase CAAT, što ukazuje na izraženiju lokalnu interakciju između tumorskog tkiva i *Nrf2*^{+/+} CAAT. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da ćelije kancera dojke indukuju lipolizu u CAAT, čime se obezbeđuju masne kiseline neophodne za uvećanje biomase i rast tumora (Balaban *et al.*, 2017; Paré *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2018). Izostanak ovakvih promena kod *Nrf2*KO miševa sugerira da aktivacija NRF2 signalizacije u CAAT ima značajnu ulogu u uspostavljanju lokalne metaboličke interakcije između kancerskih ćelija dojke i CAAT. Dodatno, smanjenje telesne mase životinja sa rastom tumora bila je u skladu sa smanjenjem relativne mase CAAT, kao i različitim trendom rasta tumora kod ova dva genotipa miševa, gde se kod WT miševa uočava trend smanjenja mase životinja već u inicijalnoj fazi rasta tumora (tumori od

10 mg). Međutim, smanjenje telesne mase bilo je izraženije kod *Nrf2*KO miševa u srednjoj i kasnoj fazi rasta tumora (tumori od 50 i 200 mg) u odnosu na WT miševе, što ukazuje na izmenjene sistemske efekte tumora dojke kada se oni razvijaju u odsustvu funkcionalnog NRF2 u CAAT.

Analiza tkivne arhitekture svetlosnom mikroskopijom potvrdila je prisustvo morfoloških promena tkiva koje podleže malignoj transformaciji, ali i u drugim nemalignim tkivima, na koje tumor deluje kako na lokalnom tako i na sistemskom nivou. U tumorskom tkivu uočeno je prisustvo brojnih tipičnih kancerskih ćelija sa višestrukim nukleusima i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa, pri čemu se sa rastom tumora povećavao broj i udeo većih kancerskih ćelija. Međutim, samo su u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa primećene izrazito krupne kancerske ćelije, koje mogu odgovarati multinukleusnim gigantskim kancerskim ćelijama i verovatno predstavljaju posledicu ćelijske fuzije, s obzirom na to da su kod njih uočeni fuzioni kontakti između kancerskih ćelija (Liu *et al.*, 2024). Poznato je da ovakve ćelije doprinose heterogenosti solidnih tumora, rastu tumora i rezistenciji na terapiju, kao i da se najčešće pojavljuju u uslovima narušene ćelijske homeostaze (Zhang *et al.*, 2014), pa njihova pojava u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa dodatno ukazuje na efekte *Nrf2*KO domaćina ne samo na redoks-metabolički profil tumora, već i na njegove strukturne osobine.

Analiza morfologije CAAT i iWAT ukazuje na značajnu ulogu NRF2 signalizacije u tumorom-indukovanom remodeliranju masnog tkiva tokom progresije kancera dojke. Na lokalnom nivou, tumor remodelira svoju mikrosredinu kroz promene u morfologiji i funkciji stromalnih ćelija, vanćelijskog matriksa i celokupne organizacije tkiva. Sa porastom mase tumora dojke, CAAT je pokazivao sve izraženiju multilokularnost adipocita i pojačanu infiltraciju imunskim ćelijama kod oba genotipa miševa. Budući da se multilokularnost adipocita povezuje sa njihovom višom metaboličkom aktivnošću i *browning*-om WAT (Jankovic *et al.*, 2015), uočene promene ukazuju na metaboličku aktivaciju kancer-asociranih adipocita i gubitak tipičnog fenotipa unilokularnih belih adipocita u CAAT, nezavisno od prisustva funkciji aktivnog NRF2 u CAAT. Prema literaturnim podacima, ovakve morfološke promene kancer-asociranih adipocita su posledica povećane lipolize i smanjenja veličine lipidnih tela usled uspostavljanja redoks-metaboličkih interakcija sa kancerskim ćelijama (Currie *et al.*, 2013; Micallef *et al.*, 2021). Istovremeno, koncept kancera kao sistemske metaboličke bolesti sve je više prihvaćen, budući da je pokazano da tumor može uticati i na udaljena tkiva koja su uključena u sistemsku metaboličku regulaciju (Altea-Manzano *et al.*, 2025; Swanton *et al.*, 2024). To potvrđuju i rezultati morfološke analize iWAT. U iWAT WT miševa, u inicijalnim fazama rasta tumora (tumori od 10 mg) dominiraju multilokulusni adipociti, dok je u kasnoj fazi rasta tumora ovo tkivo postalo većinski unilokulusno. Sa druge strane, u iWAT *Nrf2*KO miševa uočen je potpuno suprotan obrazac promene morfologije adipocita. Rezultati disertacije sugerišu da tumor dojke indukuje sistemsko remodeliranje iWAT, pri čemu smer ovih promena zavisi od prisustva funkcionalnog NRF2 u samim adipocitima. Stoga, tumori tokom rasta menjaju sistemsku metaboličku homeostazu, utičući na udaljena metabolički aktivna tkiva poput masnog, iako su neophodne dalje ultrastrukturne i molekularno-biološke analize kako bi se utvrdila osnova ovih promena.

PCNA je jedan od pokazatelja proliferativne aktivnosti ćelija s obzirom da ima ključnu ulogu u replikaciji DNK i regulaciji ćelijskog ciklusa (Essers *et al.*, 2005; Moldovan *et al.*, 2007). Pokazana povišena proteinska ekspresija PCNA u tumorskom tkivu kod miševa oba genotipa sa rastom tumora ukazuje na pojačanu proliferativnu aktivnost kancerskih ćelija i posledično sa povećanjem tumorske mase. Istovremeno, PCNA-pozitivni nukleusi pokazali su izražen pleomorfizam, ukazujući na to da je progresija tumora praćena povećanom proliferacijom heterogene populacije ćelija u tumorskom tkivu. S tim u vezi, tumorsko tkivo ne karakteriše samo porast broja proliferišućih kancerskih ćelija i stope njihove proliferacije sa daljom progresijom tumora, već i održavanje izrazite ćelijske heterogenosti, koja ima značajnu ulogu u adaptibilnosti tumora na promenljive uslove sredine (Marusyk *et al.*, 2020).

5.2. Redoks homeostaza u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Redoks-metabolički profil tumora predstavlja skup blisko povezanih funkcijskih karakteristika ćelijskog metabolizma i redoks homeostaze koje kancerskim ćelijama omogućavaju uspostavljanje i održavanje visoko proliferativnog fenotipa, preživljavanje u promenljivim uslovima sredine i invazivnost tumora (Fiaschi & Chiarugi, 2012; Hashimoto *et al.*, 2016; Jones & Sies, 2015). Redoks homeostaza određena je dinamičkim i prostorno-vremenskim promenama u odnosu produkcije i eliminacije ROS, regulaciji komponenti antioksidativne odbrane, dostupnosti redukujućih ekvivalenata (NADPH) i funkcijom statusu mitohondrija kao centralnog mesta produkcije energije i ROS (Li *et al.*, 2026; Ray *et al.*, 2012; Zorov *et al.*, 2014). Do sada je redoks homeostaza intenzivno ispitivana kako u humanim studijama tako i u različitim eksperimentalnim animalnim i ćelijskim modelima kancera dojke, često pokazujući kontradiktorne rezultate (Galadari *et al.*, 2017; Sabharwal & Schumacker, 2014; Sies & Jones, 2020), što je najverovatnije posledica dualne uloge ROS u kanceru. Pri visokim nivoima, ROS promovišu inicijaciju i progresiju kancera kroz stimulisanje proliferacije kancerskih ćelija, inflamacije i metaboličko reprogramiranje, dok daljim povišenjem, ROS dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, ćelijske smrti i posledične supresije rasta tumora (Sarmiento-Salinas *et al.*, 2019; Trachootham *et al.*, 2009; Vander Heiden *et al.*, 2009).

Intenzivirani metabolički procesi u kancerskim ćelijama dovode do povećane produkcije ROS, koja je praćena povećanjem antioksidativnog kapaciteta kako bi se održala redoks homeostaza i izbegla oksidativna oštećenja biomakromolekula (Castaldo *et al.*, 2016; Helfinger & Schröder, 2018; Weinberg & Chandel, 2009). Još od ranih radova, Oberley i sar. (Li *et al.*, 1995), koji su pokazali da MnSOD deluje kao tumor supresor u humanim ćelijama kancera dojke, brojne studije bile su usmerene ka ispitivanju promena na nivou komponenti antioksidativne odbrane u različitim tipovima kancerskih ćelija (Ambrosone, 2000; Gupta *et al.*, 2014; Oberley, 2002). Međutim, paradoks prema kome kancerske ćelije preživljavaju i podležu ćelijskoj smrti posredstvom ROS-zavisnih mehanizama predstavlja izazov u razumevanju uloge ROS u progresiji kancera, kao i razvoju terapija baziranih na modulaciji redoks homeostaze. Povišeni nivoi ROS su neophodni za malignu transformaciju ćelija i održavanje malignog fenotipa, ali je precizna regulacija njihovih nivoa ključna za preživljavanje kancerskih ćelija i dalji rast tumora (Sabharwal & Schumacker, 2014; Trachootham *et al.*, 2009). U tom smislu, redoks profil tumora se posmatra kao dinamična karakteristika koja se razlikuje u zavisnosti od tipa tumora, stadijuma tumora, osobina tumorske mikrosredine, kao i adaptivnog kapaciteta samih kancerskih ćelija (Kalezic *et al.*, 2021; Swanton, 2012).

U disertaciji je okarakterisan redoks profil tumorskog tkiva dojke u zavisnosti od faze rasta tumora (10-200 mg) kod WT miševa. S obzirom na značaj TME za redoks-metaboličko reprogramiranje i progresiju kancera dojke, iste promene analizirane su i kod *Nrf2*KO miševa, kod kojih je onemogućeno vezivanje NRF2 za ARE sekvence. Rezultati su pokazali da se uspostavljanje nove redoks homeostaze u tumorskom tkivu dojke razlikuje u zavisnosti od faze rasta tumora, ali i od genotipa miševa. Pre svega, imunohistohemijska detekcija NRF2 pokazala je njegovu veću nukleusnu imunopozitivnost u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa WT miševima tokom svih faza rasta tumora, ukazujući na direktnu povezanost NRF2 signalizacije u tumorskom tkivu i CAAT. Međutim, proteinski nivoi pNRF2 (fosforilisani NRF2, aktivna forma) u tumorskom tkivu značajno su se povećavali sa rastom tumora kod oba genotipa miševa, ali su bili značajno niži u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa. Ovakav obrazac ekspresije NRF2 ukazuje na kompenzatorno povećanje ukupnog nivoa NRF2 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa, ali uz izostanak potpune aktivacije NRF2 putem fosforilacije. Fosforilacija NRF2 predstavlja jedan od regulatornih mehanizama njegove aktivacije, koji dovodi do povećanja njegove stabilnosti i posledične translokacije u nukleus (Suzuki & Yamamoto, 2015; Taguchi & Yamamoto, 2017, 2020). U vezi sa tim, analiza proteinskog nivoa NQO1, kao jednog od primarnih targeta NRF2 koji ima ulogu u detoksifikaciji kinona (Ross & Siegel, 2017), korišćena je kao pokazatelj aktivacije NRF2 signalizacije. U *Nrf2*^{+/+} tumorskom tkivu dojke, nivoi NQO1 značajno su rasli sa rastom tumora kod obe grupe miševa, dok je nivo NQO1 u CAAT i iWAT *Nrf2*KO miševa, bio značajno niži nego u odgovarajućim grupama WT miševa tokom eksperimenta.

5.3. Reduktivni kapacitet i NADPH-zavisne komponentne antioksidativne odbrane u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Kako bi se prilagodile visokoj stopi proliferacije, kancerske ćelije usmeravaju svoj metabolizam pretežno ka glikolitičkom fenotipu, u literaturi poznato kao Warburgov efekat (Liberti & Locasale, 2016; Warburg, 1956). U takvim uslovima, povećan unos glukoze u kancerskim ćelijama ne koristi se samo za produkciju energije u vidu ATP, već se deo glukoze metaboliše kroz PPP, koji obezbeđuje ribozo-5-fosfat za sintezu nukleotida, ali je i glavni izvor NADPH, koji je neophodan za biosintetske procese i funkcionisanje enzima AD (Vander Heiden *et al.*, 2009, 2010). Na ovaj način, PPP ima centralnu ulogu u integraciji anaboličkih zahteva kancerskih ćelija i redoks homeostaze, gde povećan protok metabolita kroz PPP omogućava održavanje odgovarajućeg odnosa NADPH/NADP⁺, čime se obezbeđuje neophodni reduktivni potencijal kako za biosintetske procese tako i za funkcionisanje antioksidativne odbrane.

Kao ključni regulatorni enzim koji usmerava tok metabolita kroz PPP, ekspresija G6PDH odražava sposobnost tumorskog tkiva da obezbedi odgovarajuće nivoe redukovano NADPH (Patra & Hay, 2014). U skladu sa tim, nepromenjeni proteinski nivoi G6PDH u tumorskom tkivu WT miševa ukazuju na značaj PPP za produkciju metaboličkih intermedijera i NADPH tokom rasta tumora dojke. Značajno niži proteinski nivoi G6PDH u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa odgovarajućim WT grupama ukazuju na smanjen reduktivni kapacitet ovih tumora, što je u vezi sa uočenim trendom manjih tumorskih masa tokom rasta tumora kod *Nrf2*KO miševa. Istovremeno, smanjeni ili nepromenjeni proteinski nivoi ME1 i IDH2 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa ukazuju na to da kompenzacija NADPH usled smanjenog doprinosa PPP nije ostvarena preko klasičnih citoplazmatičnih NADPH-generišućih enzima. Umesto toga, povećani proteinski nivo mitohondrijalne NNT sa rastom tumora sugerise da se reduktivni kapacitet u kancerskim ćelijama *Nrf2*KO miševa održava aktivacijom alternativnog mehanizma zavisnog od mitohondrija. Ovaj enzim povezuje mitohondrijalni energetski metabolizam i redoks homeostazu jer koristi protonski gradijent nastao tokom mitohondrijalne OXPHOS da katalizuje prenos elektrona sa NADH na NADP⁺ (Kampjut & Sazanov, 2019). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, koji ističu targetovanje NADPH-generišućih puteva kao potencijalne terapijske strategije u specifičnim fazama rasta tumora (DeNicola & Cantley, 2015; Fan *et al.*, 2014; Lewis *et al.*, 2014). Dodatno, promene u proteinskim nivoima NADPH-produkujućih enzima u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa ukazuju na značaj NRF2-zavisne redoks homeostaze u tumorskoj mikrosredini za održavanje reduktivnog kapaciteta u kancerskim ćelijama.

NADPH takođe predstavlja ključan kofaktor za održavanje redoks homeostaze, delujući kao donor elektrona i u antioksidativnim i prooksidativnim putevima (Chandel, 2021). Sa tim u vezi, izoforma NADPH oksidaze NOX2 jedan je od najistaknutijih prooksidativnih enzima koji prenosi elektrone sa citoplazmatskog NADPH na kiseonik, pri čemu generiše O₂⁻ i posledično H₂O₂ (Bedard & Krause, 2007). Pokazano je da povećana ekspresija NOX2 doprinosi održavanju prooksidativnog okruženja pogodnog za proliferaciju, inflamaciju i progresiju tumora (Laurent *et al.*, 2019; Mukawera *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015). Naši rezultati pokazali su povišene proteinske nivoe izoforme NOX2 u tumorskom tkivu i WT i *Nrf2*KO miševa u srednjoj i kasnoj fazi rasta tumora (tumori mase 50 i 200 mg), što ukazuje da je aktivacija NOX2-zavisnog prooksidativnog puta bitna za uspostavljanje protumorigenog redoks okruženja u tumorskom tkivu dojke. Ovakvo povećanje NOX2 bilo je nezavisno od prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u TME, verovatno zbog značaja povećane produkcije ROS za dalju progresiju tumora.

Značaj NOX2-generisanog O₂⁻ za tumorogenezu dodatno je podržan smanjenjem ekspresije obe SOD izoforme, a naročito CuZnSOD, u tumorskom tkivu oba genotipa miševa sa rastom tumora. Rezultati disertacije su u saglasnosti sa studijama u kojima su ispitivane promene ekspresije MnSOD (Hempel *et al.*, 2011) i CuZnSOD (Vilchis-Landeros *et al.*, 2024; Weydert *et al.*, 2006) u različitim tipovima tumora. Međutim, najviša ekspresija SOD izoformi detektovana je u inicijalnim fazama rasta tumora (tumori mase 10 mg), nakon čega je dalje opadala sa rastom tumora. Ovakav obrazac

njihove ekspresije ukazuje na relativno očuvan kapacitet tumora za uklanjanje $O_2^{\cdot-}$ u najranijim fazama tumorogeneze, dok se sa daljim rastom tumora redoks homeostaza pomera ka izraženom prooksidativnom stanju. Posebno su od značaja povišeni proteinski nivoi CuZnSOD u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u poređenju sa odgovarajućim WT grupama, što sugeriše da je specifično ekspresija izoforme CuZnSOD osetljiva na promene u NRF2-zavisnom redoks statusu u TME. NADPH takođe funkcioniše kao redukujući ekvivalent za AD enzime GR i TR, koji održavaju redukovane forme GSH i TRX (Arnér & Holmgren, 2000; Couto *et al.*, 2016). GSH i TRX-zavisni sistemi predstavljaju jedne od glavnih redoks pufera u ćeliji (Hayes & McLellan, 1999; Holmgren *et al.*, 2005; Lu & Holmgren, 2014). Njihovo održavanje neophodno je za vijabilnost kancerskih ćelija, jer obezbeđuju redukujuće ekvivalente za eliminaciju ROS, održavaju tiolske grupe proteina u redukovanom stanju i omogućavaju očuvanje vijabilnosti ćelija u uslovima povećanog oksidativnog opterećenja (Fath *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2015). U skladu s tim, aktivnosti obe reduktaze, GR i TR, progresivno su se povećavale sa rastom tumora, nezavisno od prisustva funkcionalnog NRF2 u TME. Uočeni obrazac aktivnosti GR i TR jasno ukazuje na dominantan uticaj rasta tumora na indukciju njihove aktivnosti, naglašavajući njihovu ključnu ulogu u održanju redoks homeostaze kancerskih ćelija tokom progresije tumora dojke.

Rezultati disertacije takođe su pokazali porast nivoa GSH sa rastom tumora u obe grupe miševa, što je u skladu sa podacima da kancerske ćelije akumuliraju GSH kao adaptivni odgovor na povećana oksidativna opterećenja (Bansal & Simon, 2018). Nivoi GSH su u ćeliji određeni ravnotežom između njegove sinteze i iskorišćavanja, koja je u kancerskim ćelijama usmerena ka povećanju njegovih nivoa sa progresijom tumora. Budući da su proteinski nivoi GCL i GGT kao ključnih enzima za sintezu GSH bili nepromenjeni ili sniženi sa rastom tumora, porast nivoa GSH verovatno je posledica njegove efikasnije regeneracije iz postojećeg pula GSH putem aktivnosti GR. Na taj način favorizuje se manje energetski zahtevan put, jer redukcija oksidovanog GSSG do njegove redukovane forme pomoću GR zahteva znatno manje energije i biosintetskih prekursora u poređenju sa *de novo* sintezom glutationa. Istovremeno, nivoi GCL i GGT su pokazivali zavisnost od aktivnosti NRF2 u TME, naročito u tumorima od 10 mg, što ukazuje da je sam glutationski pul u kancerskim ćelijama zavisan od NRF2 aktivacije u TME u najranijim fazama rasta tumora. Nasuprot tome, aktivnost GST, koji koristi GSH pre svega za detoksifikaciju elektrofilnih jedinjenja (Sheehan *et al.*, 2001), bila je konstantna u tumorskom tkivu kod oba genotipa miševa, ali je njegova aktivnost bila niža u tumorima koji su se razvijali u *Nrf2*KO miševima u poređenju sa WT miševima. Izoforma GST Pi posebno se izdvojila kao dominantna GST izoforma, jer je njena povećana proteinska ekspresija u tumorima od 200 mg najverovatnije doprinela održanju GST aktivnosti kod WT miševa, dok je izostanak porasta njenog nivoa u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa moguće bio uzrok smanjene ukupne GST aktivnosti kod ovih miševa u odnosu na tumore istih masa WT miševa. Zaista, prethodne studije ukazale su da viši proteinski nivoi GST Pi izoforme u tumorskom tkivu predstavljaju loš prognostički marker kod pacijentkinja sa kancerom dojke (Huang *et al.*, 2003, 2004; Su *et al.*, 2003).

TRX-zavisni sistem takođe je važan deo antioksidativne odbrane u ćeliji koji se modulira tokom tumorogeneze (Arnér & Holmgren, 2006). Dok je aktivnost TR bila povećana sa rastom tumora nezavisno od redoks statusa TME, proteinski nivoi TRX opadali su sa rastom tumora kod WT miševa. To je u skladu sa ranije zabeleženim promenama u tumorskom tkivu pacijentkinja sa kancerom dojke (Cadenas *et al.*, 2010). Ipak, njegova nepromenjena proteinska ekspresija u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa odražava uticaj NRF2 signalizacije u TME na ekspresiju TRX u kancerskim ćelijama dojke. Rezultati pokazuju da je pozitivna regulacija TR, GR, GSH neophodna za održavanje visokog redoks praga u kancerskim ćelijama dojke, budući da je regulacija aktivnosti TR i GR, odnosno nivoa GSH, bila dominantno vođena rastom tumora. Sa druge strane, regulacija GST i TRX pre svega je bila zavisna od NRF2-zavisne redoks signalizacije u TME, što ukazuje na značaj njihove ekspresije u adaptaciji kancerskih ćelija na izmenjen NRF2-posredovan redoks status u tumorskoj mikrosredini.

5.4. Antioksidativni enzimi uključeni u eliminaciju peroksida u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Održavanje redukovanih formi GSH i TRX neophodno je za aktivnost enzima AD koji uklanjaju perokside, uključujući H₂O₂ i lipidne perokside (Espinosa-Diez *et al.*, 2015; Georgiou-Siafis & Tsiftoglou, 2023). Za razliku od GSH-Px1, koja uklanja H₂O₂ (Lubos *et al.*, 2011), izoforma GSH-Px4 specifično uklanja lipidne perokside i učestvuje u procesu regulisane ćelijske smrti posredovane gvožđem (Song *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Povećana proteinska ekspresija GSH-Px4 i PRX3 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u odnosu na odgovarajuće WT grupe sugerise da odsustvo funkcionalnog NRF2 u TME utiče na regulaciju metabolizma peroksida u samom tumoru dojke, verovatno kao kompenzatorni odgovor na izmenjenu redoks homeostazu u TME. Šta više, imunofluorescentna analiza tumorskog tkiva pokazala je visok stepen kolokalizacije GSH-Px4 i markera lipidne peroksidacije 4-HNE u tumorima mase 10 mg kod WT miševa, ukazujući na njihovu funkcijsku interakciju u metabolizmu lipidnih peroksida tokom inicijalne faze rasta tumora dojke. Iako je u tumorima iste mase kod *Nrf2*KO miševa proteinska ekspresija GSH-Px4 bila značajno viša, sniženi nivoi 4-HNE i stepen kolokalizacije GSH-Px4 sa 4-HNE u odnosu na tumore od 10 mg kod WT miševa ukazuju da NRF2 aktivacija u TME moduliše regulaciju lipidne peroksidacije u tumorskom tkivu tokom inicijalnih faza rasta tumora. Istovremeni porast nivoa 4-HNE i snižavanje proteinskog nivoa GSH-Px4 sa rastom tumora kod oba genotipa miševa mogli bi ukazati na povišen stepen ROS-posredovane lipidne peroksidacije u tumorskom tkivu, što može doprineti uspostavljanju prooksidativnog okruženja u tumoru.

Još jedan enzim koji specifično eliminiše vodonik peroksid u peroksizomima, CAT, pokazao je veoma specifičan profil ekspresije u tumorskom tkivu dojke. Naime, rezultati disertacije su pokazali da se proteinski nivo CAT snižavao sa rastom tumora, dok je njena aktivnost bila nedetektabilna u tumorskom tkivu oba genotipa miševa, što ukazuje na značaj specifičnih mehanizama translacione i posttranslacione regulacije CAT za uspostavljanje i progresiju malignog fenotipa. Pokazani rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o smanjenoj aktivnosti CAT u kancerskim ćelijama (Brahm, 1916), što je kasnije primećeno i u različitim kancerskim ćelijskim linijama (Beck *et al.*, 2011; Glorieux *et al.*, 2011; Verrax *et al.*, 2009). Dodatno, naši rezultati imunofluorescentne analize pokazali su dominantnu lokalizaciju CAT u stromi vezivnog tkiva i okolnim adipocitima, što bi zajedno sa nedetektabilnom aktivnošću CAT u tumorskom tkivu dojke moglo biti povezano sa oslobađanjem CAT iz kancerskih ćelija, kao što je pokazano u prethodnim studijama (Böhm *et al.*, 2015; Sandstrom & Buttke, 1993) i to potencijalno putem ekstracelularnih vezikula (Green *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2021). Negativna regulacija CAT u kancerskim ćelijama može se dovesti u vezu sa sniženom oksidacijom masnih kiselina u peroksizomima usled smanjene ekspresije acil-CoA oksidaze 1 (*eng.* Acyl-CoA oxidase 1, ACOX1) (Kim, 2020). Međutim, translokacija CAT iz kancerskih ćelija mogla bi dodatno služiti kao mehanizam održavanja H₂O₂-zavisne signalizacije u ćelijama kancera dojke koja pogoduje njihovoj proliferaciji (Bauer, 2015), dok bi vanćelijska CAT imala zaštitnu ulogu u TME (Böhm *et al.*, 2015).

Opadajući profili ekspresije sve tri komponente AD uključene u eliminaciju peroksida, CAT, GSH-Px i PRX, ukazuju na značaj prooksidativne signalizacije za adaptaciju i preživljavanje kancerskih ćelija dojke. Ipak, tumori dojke koji se razvijaju u *Nrf2*^{-/-} domaćinu pokazuju povećanu aktivnost i/ili proteinske nivoe ovih enzima, što dodatno naglašava značaj NRF2 signalizacije u TME za regulaciju ROS homeostaze u tumorskom tkivu dojke. Ovakva integracija redoks signalizacije i metabolizma kancerskih ćelija i njihove mikrosredine doprinosi održanju protumorigenog okruženja. Rezultati disertacije pokazuju da se promene u NRF2 signalizaciji u CAAT, kao dominantne komponente TME, istovremeno odražavaju i kroz promene NRF2 signalizacije u tumorskom tkivu, čime se naglašava njihova dvosmerna redoks komunikacija, naročito tokom inicijalne faze rasta tumora (tumori mase 10 mg). Dok promene u proteinskoj ekspresiji PRX, GSH-Px1 i GSH-Px4 u tumorskom tkivu ukazuju na postojanje NRF2-zavisne redoks interakcije između tumora dojke i CAAT, promene u ekspresiji i lokalizaciji CAT bile su pre svega unutrašnje za tumor, obzirom da nisu bile pod uticajem NRF2 signalizacije u CAAT.

5.5. Redoks homeostaza u kancer-asociranom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Visoka stopa metaboličke aktivnosti u tumorskom tkivu dojke praćena je pojačanom regulacijom komponenti antioksidativne odbrane u CAAT (Kalezic *et al.*, 2021). U disertaciji, po prvi put su ispitivane promene komponenti antioksidativne odbrane u CAAT tokom rasta tumora dojke, kao i efekat odsustva funkcionalnog NRF2 na tumor-indukovano reprogramiranje CAAT. Rezultati ukazuju na izraženu zavisnost CAAT od funkcionalnog NRF2 u uspostavljanju redoks homeostaze kako pri bazalnim uslovima tako i tokom tumorogeneze, dodatno potvrđujući da CAAT nije samo pasivna komponenta tumorske mikrosredine, već aktivno tkivo čija redoks-zavisna adaptacija na prisustvo tumora dojke značajno doprinosi uspostavljanju protumorogene sredine i progresiji tumora. Ovo je u skladu sa činjenicom da je masno tkivo metabolički i endokrino aktivno tkivo (Cinti, 2005; Kershaw & Flier, 2004; Spiegelman & Flier, 2001), koje može uticati na lokalnu i sistemsku homeostazu oslobađanjem metabolita i različitih adipokina (Clemente-Suárez *et al.*, 2023).

Niži nivoi GSH i konstantno niža aktivnost GST u CAAT *Nrf2*KO miševa uočeni su već u kontrolnim *Nrf2*KO miševima bez tumora u poređenju sa istim WT miševima i održavali su se tokom rasta tumora. To potvrđuje očekivani uticaj odsustva NRF2 signalizacije na bazalni antioksidativni kapacitet ovog tkiva, koje predstavlja specifično izmenjeno redoks okruženje, a koje se dalje dinamično menja sa rastom tumora. Nasuprot tome, porast aktivnosti GR, TR i CAT sa rastom tumora u CAAT nezavisno od NRF2 genotipa miševa ukazuje na to da su ove komponente antioksidativne odbrane pre svega tumor-zavisne i verovatno predstavljaju odgovor CAAT na pojačano oksidativno opterećenje usled rasta tumora. Dakle, iako su postojale razlike u bazalnom redoks kapacitetu, CAAT aktivira specifične mehanizme antioksidativne odbrane kao odgovor na prisustvo tumora dojke, nezavisno od NRF2 signalnog puta. Istovremeno, različiti obrasci promena AD enzima na proteinskom nivou ukazuju da odsustvo funkcionalnog NRF2 ne utiče samo na aktivaciju, već i na regulaciju njihove sinteze u CAAT tokom tumorogeneze. GCL, GSH-Px1, GST Mu i MnSOD bili su značajno smanjeni u CAAT WT miševa tokom inicijalne faze rasta tumora (10 mg), dok su sa daljim rastom tumora opadali proteinski nivoi GGT i GSH-Px1, uz istovremeni porast GST Pi i CuZnSOD. Ovakve promene ukazuju na selektivan i vremenski-specifičan odgovor CAAT, pri čemu različite komponente antioksidativne odbrane preuzimaju glavnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze tokom različitih faza rasta tumora. Nasuprot tome, u CAAT *Nrf2*KO miševa, nivoi TRX, GGT i GST Pi su se povećavali sa rastom tumora, dok su GCL i GSH-Px1 bili sniženi u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. Pored toga, CAAT *Nrf2*KO miševa se odlikovao i promenama u enzimima antioksidativne odbrane nezavisno od rasta tumora, pre svega sniženim nivoima TRX, GST Mu i MnSOD i povišenim CuZnSOD nivoima u odnosu na WT miševima sa tumorima iste veličine. Može se reći da odsustvo funkcionalnog NRF2 utiče na kvalitativni i kvantitativni aspekt redoks reprogramiranja tokom tumorogeneze, s obzirom da se aktiviraju različiti adaptivni mehanizmi u odgovoru na rast tumora u odnosu na WT miševima.

Posebno je značajno da je ekspresija NOX2 u CAAT u potpunosti zavisila od prisustva funkcionalnog NRF2, pri čemu su WT i *Nrf2*KO miševi pokazali potpuno suprotan profil ekspresije tokom rasta tumora dojke – rastući kod WT, a opadajući kod *Nrf2*KO miševa. Slično, NRF2-zavisni, ali i suprotni obrazac ekspresije pokazali su NADPH-generišući enzimi IDH2 i ME1 u CAAT, s tim da je on bio opadajući kod WT, a rastući kod *Nrf2*KO miševa. Sa druge strane, proteinska ekspresija G6PDH opadala je sa rastom tumora nezavisno od NRF2 genotipa miševa, iako je bazalna vrednost bila značajno niža u CAAT *Nrf2*KO miševa u poređenju sa CAAT kontrolnih WT miševa bez tumora. Dakle, odsustvo funkcionalnog NRF2 ne utiče samo na ekspresione nivoe enzima AD u CAAT, već i na regulaciju produkcije NADPH, čime afektuje celokupno redoks-metaboličko reprogramiranje ovog tkiva tokom rasta tumora dojke. S obzirom da je NADPH glavni redukujući ekvivalent neophodan za regeneraciju TRX i GSH i aktivnost prooksidativnih enzima kao što je NOX, njegov izmenjeni metabolizam utiče na redoks profil CAAT i posledično njegovu signalnu ulogu u TME.

5.6. Redoks homeostaza u kontralateralnom ingvinalnom belom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Rezultati dobijeni u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu ukazuju na to da i ovo tkivo podleže tkivno-specifičnom redoks remodeliranju tokom rasta tumora dojke, što dodatno podržava koncept kancera kao sistemske bolesti, u kojoj putem različitih signalnih molekula deluje na udaljena tkiva domaćina (Swanton *et al.*, 2024). Promene u aktivnosti i ekspresiji enzima antioksidativne odbrane, kao i NADPH-produkujućih enzima, ističu značaj iWAT kao redoks-senzitivnog tkiva koje se adaptira tumor-indukovanim sistemskim promenama. Pri tome, obrasci promena u redoks profilima iWAT između WT i *Nrf2*KO miševa ukazuju na ulogu NRF2 u regulaciji bazalne i tumor-indukovane redoks homeostaze.

U iWAT WT miševa, smanjenje nivoa GSH sa rastom tumora, uz porast aktivnosti GR, TR i CAT, ukazuje na povećanje oksidativnog opterećenja pod uticajem tumora i kompenzatornu aktivaciju AD enzima kojima iWAT povećava svoj antioksidativni kapacitet. Smanjenje nivoa GSH, zajedno sa povećanjem aktivnosti GR sa rastom tumora, odražava povećano iskorišćavanje redukovano GSH u cilju održavanja novouspostavljene redoks homeostaze pod uticajem rastućeg tumora. Istovremeno, povećanje aktivnosti TR i CAT oslikava pojačani antioksidativni odgovor u ovom tkivu, u cilju ponovnog uspostavljanja redoks homeostaze tokom progresije tumora. Sa druge strane, iWAT *Nrf2*KO miševa pokazao je znatno nižu aktivnost GST u svim fazama rasta tumora u odnosu na iWAT WT miševa, pokazujući direktnu zavisnost tumor-indukovane aktivnosti GST od NRF2. Dodatno, niže aktivnosti GST i GSH-Px, kao i smanjeni nivoi GSH, uočeni su u iWAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa u poređenju sa iWAT kontrolnih WT miševa, što očekivano reflektuje ključnu ulogu NRF2 u održavanju bazalne redoks homeostaze iWAT. Rezultati sugerišu da NRF2 određuje bazalni antioksidativni kapacitet iWAT, koji verovatno određuje njegov redoks adaptivni odgovor na prisustvo tumora. Može se reći da odsustvo NRF2 određuje bazalni redoks kapacitet iWAT, čime verovatno kasnije definiše odgovor antioksidativne odbrane u iWAT na prisustvo tumora. Na proteinskom nivou, u iWAT WT miševa uočen je generalni trend smanjenja proteinske ekspresije svih enzima antioksidativne odbrane sa rastom tumora, osim povećanja GSH-Px4. Ovakav obrazac ekspresije enzima AD sa rastom tumora dojke ukazuje na njihovu dominantnu regulaciju na nivou aktivnosti, ali ne i na nivou povećanja njihovih proteinskih nivoa tokom tumor-indukovanog redoks reprogramiranja. S obzirom da masno tkivo predstavlja tkivo bogato lipidima, povećanje ekspresije GSH-Px4 može imati ulogu u zaštiti membranskih fosfolipida od oksidativnih oštećenja u uslovima povećanog oksidativnog pritiska. Nasuprot tome, iWAT *Nrf2*KO miševa pokazalo je znatno složeniji obrazac ekspresije enzima AD, sa istaknutim smanjenjem proteinskih nivoa TRX i GST Mu tokom svih faza rasta tumora, kao i fazno-zavisne promene u ekspresiji GGT, MnSOD, CAT, GST Pi i CuZnSOD, ističući kako uticaj prisustva tumora tako i izostanka NRF2 signalizacije u iWAT. Trajno sniženi nivoi TRX i GST Mu u iWAT *Nrf2*KO miševa sugerišu direktnu zavisnost njihove ekspresije od NRF2, dok povećanje proteinskih nivoa GST Pi i CuZnSOD u specifičnim fazama rasta tumora (50 i 200 mg) predstavlja kompenzatorni mehanizam kojim se iWAT prilagođava na inicijalno izmenjeni antioksidativni kapacitet usled nedostatka funkcionalnog NRF2.

Sličan obrazac promena uočen je i kod NADPH-produkujućih enzime, pri čemu iWAT WT miševa pokazuje generalni trend smanjenja proteinske ekspresije G6PDH, IDH2 i ME1 sa rastom tumora, što ukazuje na smanjeni reduktivni kapacitet iWAT tokom tumorogeneze. Sa druge strane, iWAT *Nrf2*KO miševa pokazuje porast proteinske ekspresije IDH2 i ME1 sa rastom tumora u odnosu na iWAT WT miševa, što sugeriše aktivaciju alternativnih mehanizama za održanje reduktivnog kapaciteta u odsustvu NRF2 signalizacije. Istovremeno, promene u proteinskoj ekspresiji enzima NOX2 ukazuju na zavisnost produkcije $O_2^{\cdot-}$ i posledično H_2O_2 u iWAT kako od prisustva tumora tako i od prisustva funkcionalnog NRF2.

5.7. Mitohondrijalna homeostaza u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Kao centralni element integracije metabolizma i redoks homeostaze u ćeliji, strukturno i funkcijsko remodeliranje mitohondrija izdvojilo se kao jedan od ključnih aspekata malignog fenotipa (Awad & Abdul Karim, 2025; Wallace, 2012). Dinamika mitohondrija, odnosno procesi fuzije i fisije, ne oslikava samo njihove morfološke promene, već predstavlja i mehanizam putem kojeg ćelije usklađuju potrebe energetskog metabolizma i redoks statusa (Nasrallah & Horvath, 2014; Willems *et al.*, 2015). U nemalignim ćelijama, ravnoteža između fuzije i fisije strogo je regulisana, dok je njihova izmenjena ravnoteža povezana sa tumorogenezom (Anderson *et al.*, 2018; Awad & Abdul Karim, 2025; J. Xing *et al.*, 2022). Imajući u vidu značaj TME za progresiju kancera dojke, kao i opisane promene u mitohondrijalnom metabolizmu u kanceru dojke, u disertaciji je ispitivana zavisnost mitohondrijalne dinamike, morfologije i funkcije tokom različitih faza rasta tumora dojke od NRF2 signalizacije u TME.

Rezultati novijih studija ističu značaj održavanja funkcionalnih mitohondrija u tumorskom tkivu (Potter *et al.*, 2016), jer predstavljaju važan centar regulacije metabolizma, produkcije ROS i eliminacije i adaptacije na promenljive nivoe hranljivih materija i kiseonika u svojoj okolini (Kuznetsov *et al.*, 2022). Naši rezultati pokazali su da su i kod WT i kod *Nrf2*KO miševa mitohondrije u tumorskom tkivu dojke prelazile iz fibrilarnih i duguljastih u okrugle i sitne sa rastom tumora, što ukazuje na metabolički prelaz sa dominantno oksidativnog na glikolitički metabolizam. Međutim, analiza dijametra mitohondrija i njihove dinamike ukazala je na jasne razlike remodeliranja mitohondrija između tumorskog tkiva koje se razvijalo u WT i *Nrf2*KO miševima. Kod WT miševa, mitohondrije prečnika 101-400 nm bile su dominantna subpopulacija u tumorskom tkivu tokom svih faza rasta tumora (10-200 mg). Manji prečnik mitohondrija, kao rezultat pojačane mitohondrijske fisije, povezan je sa većom stopom proliferacije, povećanom rezistencijom na apoptozu i metastatskim potencijalom u nekim tipovima kancera (Kashatus *et al.*, 2015; Moindjie *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2013). Stoga, u tumorskom tkivu WT miševa favorizovana je deoba mitohondrija, koja je u skladu sa pojačanom proliferativnom aktivnošću kancerskih ćelija i metaboličkom adaptacijom u smeru glikolitičkog fenotipa. Nasuprot tome, dominantne mitohondrijske subpopulacije kod *Nrf2*KO miševa pomerale su se sa 101-400 nm u tumorima od 10 i 50 mg na >901 nm u tumorima od 200 mg. Veći prečnik mitohondrija povezan je sa pojačanom mitohondrijskom fuzijom i održanim oksidativnim metabolizmom, što se najčešće sreće u manje agresivnim tumorima (Tilokani *et al.*, 2018). Ovi rezultati ukazuju na korišćenje različitih metaboličkih strategija u tumorima dojke u zavisnosti od očuvane NRF2 signalizacije unutar TME, pri čemu odsustvo funkcionalnog NRF2 u TME pogoduje mitohondrijskoj fuziji i održavanju oksidativnog metabolizma.

Promene u morfologiji mitohondrija tokom progresije tumora dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa bile su u skladu sa promenama u nivou ekspresije i regrutovanju ključnih faktora regulacije mitohondrijalne dinamike. Sniženi nivoi proteina DRP1 ukazuju na niži stepen fisije mitohondrija, dok je povišenje proteinskih nivoa MFN1 ukazalo na povećanu fuziju ovih organela u tumorima tokom inicijalne faze rasta tumora (10 mg) kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa istom grupom WT miševa. Ipak, povišeni markeri mitohondrijalne fisije sa rastom tumora - MFN2 i OPA1, karakterisali su tumore od 10 mg nezavisno od NRF2 statusa u TME, što ukazuje na istovremenu aktivaciju fuzije i fisije mitohondrija u tumorskom tkivu. Pored promena u nivou proteina, analiza kolokalizacije DRP1 sa mitohondrijalnim markerom VDAC1 ukazala je na izražene razlike u mitohondrijalnom regrutovanju ključnog regulatora fisije DRP1 između tumora WT i *Nrf2*KO miševa. U tumorskom tkivu WT miševa, kolokalizacija DRP1/VDAC1 povećavala se sa rastom tumora, što je u skladu sa progresivnom translokacijom DRP1 u mitohondrije i povećanom stopom mitohondrijalne fisije u kanceru (Liang *et al.*, 2020; Padder *et al.*, 2021; Zhan *et al.*, 2016). Tumore od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa karakterisale su grupe ćelija sa visokim stepenom kolokalizacije DRP1/VDAC1, koja je opadala sa daljim rastom tumora. Nasuprot tome, obrasci kolokalizacije MFN1 sa VDAC1 u tumorskom tkivu bili su slični u obe grupe miševa tokom rasta tumora, što sugeriše da mitohondrijalno regrutovanje MFN1 nije afektovano odsustvom funkcionalnog NRF2 u TME.

Rezultati ukazuju na izmenjenu mitohondrijalnu dinamiku u tumorskim tkivima dojke kao odgovor na *Nrf2*^{-/-} TME, odnosno senzitivnost regulacije mitohondrijalne fisije pre svega u inicijalnim fazama rasta tumora, naglašavajući važnu ulogu NRF2 signalizacije u TME domaćina u modulaciji ravnoteže između mitohondrijalne fisije i fuzije, kao i u mitohondrijalnoj regrutaciji regulatora fisije, odnosno translokaciji DRP1 u mitohondrije, koja je neophodna za njegovu aktivaciju.

Promene u mitohondrijalnoj dinamici bile su praćene promenama u oksidativnom metabolizmu mitohondrija. Ravnoteža između mitohondrijalne fuzije i fisije ključna je za očuvanje funkcije mitohondrija, budući da je oksidativni metabolizam tipično povezan sa izduženim mitohondrijama i mitohondrijalnom fuzijom, dok je mitohondrijalna fisija povezana sa smanjenim stopama oksidativnog metabolizma (Rossignol *et al.*, 2004). U skladu sa povišenim nivoima proteina i mitohondrijalnim regrutovanjem DRP1 sa rastom tumora kod WT miševa, uočen je suprotan obrazac u proteinskoj ekspresiji subjedinica ETC kompleksa i ATP sintaze, koji su značajno opadali sa rastom tumora kod ovih miševa. Ovi rezultati podržavaju prelazak kancerskih ćelija sa dominantno oksidativnog prema dominantno glikolitičkom fenotipu tokom tumorogeneze. Sa druge strane, proteinski nivoi subjedinica ETC kompleksa i ATP sintaze bili su generalno viši u tumorima dojke od 10 i 50 mg kod *Nrf2*KO miševa u poređenju sa istim veličinama tumora WT miševa i u saglasnosti su sa povećanim MFN1 i/ili sniženim nivoima DRP1 proteina. Iako su sa daljim rastom tumora *Nrf2*KO miševi pokazivali sličan trend smanjenja ETC kompleksa u tumorima od 200 mg kao i WT miševi, ekspresija kompleksa I i ATP sintaze ostala je viša u poređenju sa istim grupama WT miševa. Rezultati ukazuju na veći stepen održavanja oksidativnog metabolizma u tumorima dojke *Nrf2*KO miševa tokom ranih faza rasta tumora i u skladu su sa opisanim redoks reprogramiranjem u tumorskom tkivu ovih životinja, dodatno ističući inicijalnu fazu rasta tumora (10 mg) kao najosetljiviji period na izostanak NRF2-zavisne signalizacije u TME domaćina.

Aktivnost mitohondrija i oksidativni metabolizam povezani su sa povećanom produkcijom ROS (Zorov *et al.*, 2014), koji imaju važnu ulogu u regulaciji redoks-senzitivnih procesa, uključujući proliferaciju ćelija i ćelijsku smrt (Diebold & Chandel, 2016; Ott *et al.*, 2007). Kako bi se procenio funkcijski značaj uočenih razlika u remodeliranju mitohondrija između tumora dojke WT i *Nrf2*KO miševa, korišćen je model kokulture MCF-7 ćelija kancera dojke sa primarnim adipocitima prethodno tretiranim specifičnim NRF2 inhibitorom ML385. Uočena je viša respiratorna aktivnost mitohondrija, merena intenzitetom signala fluorescentne boje MitoTracker Orange, koja obeležava aktivno respirirajuće mitohondrije. Povećana respiracija mitohondrija bila je povezana sa povišenom mitohondrijalnom produkcijom O₂⁻ u MCF-7 ćelijama kancera dojke kokultivisanim sa *Nrf2*^{-/-} adipocitima, što potvrđuje *in vivo* nalaze da NRF2 signalizacija u kancer-asociranim adipocitima direktno utiče na funkciju mitohondrija u kancerskim ćelijama dojke.

Koristeći ortotopski model kancera dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa, rezultati disertacije su po prvi put pokazali da mitohondrijalna ultrastruktura, dinamika i funkcija u ćelijama kancera dojke predstavlja integralni deo dvosmerne interakcije tumorskog tkiva i TME, pre svega CAAT, i zavisna je od TME-posredovane NRF2 signalizacije.

5.8. Metaboličko reprogramiranje tumorskog i kancer-asociranog masnog tkiva WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Metaboličko reprogramiranje ćelija kancera dojke privlači sve veću pažnju usled njegove uloge u uspostavljanju malignog fenotipa, kao i visokog potencijala za razvoj ciljanih metaboličkih terapija (Galluzzi *et al.*, 2013). Warburgov efekat, kao glavni aspekt metaboličkog reprogramiranja kancerskih ćelija, smatra se primarno unutrašnjom karakteristikom kancera, ključnom za uspostavljanje malignog fenotipa (Vander Heiden *et al.*, 2009). Međutim, da li i kako redoks-metabolička interakcija između tumora dojke i CAAT utiče na metaboličko reprogramiranje kancerskih ćelija još uvek nije poznato. Shodno tome, jedan od ciljeva disertacije bio je da se ispita uticaj NRF2-zavisne regulacije njihove interakcije na molekulske mehanizme koji su u osnovi metaboličkog reprogramiranja kancera ćelija tokom rasta tumora dojke.

Hormonalna regulacija metabolizma glukoze pre svega uključuje hormone insulin i glukagon, koji promovisu glikolizu i glukoneogenezu, respektivno (Pilkis & Granner, 1992). Pored hormonalne regulacije, unutarćelijska regulacija glikolize podrazumeva nekoliko ključnih tačaka regulacije. PFK1 katalizuje jednu od ključnih ireverzibilnih reakcija glikolize i aktivira se alosteričnim modulatorom fruktozo-2,6-bisfosfatom, čiji nivoi su regulisani bifunkcionalnim enzimom PFKFB (Van Schaftingen *et al.*, 1981). Izoforma PFKFB3 pokazuje dominantnu kinaznu aktivnost, čime podstiče glikolitički fluks i proliferaciju kancerskih ćelija (Yalcin *et al.*, 2009). Ekspresija PFKFB3 dodatno je regulisana insulinom i povezana je sa aktivacijom HIF-1 α i AMPK α signalnih puteva, što doprinosi uspostavljanju glikolitičkog fenotipa, povećanoj proliferaciji i migraciji ćelija kancera dojke (Clem *et al.*, 2008). Centralnu ulogu glikolitičkog fenotipa tokom rane tumorogeneze potvrdili su rezultati disertacije. Naime, u tumorskom tkivu dojke kod WT i *Nrf2*KO miševa detektovano je povišenje proteinske ekspresije ključnih faktora regulacije glikolize, PFKFB3, pAMPK α i HIF-1 α sa rastom tumora. Međutim, ova indukcija nije bila podjednako prisutna u tumorima od 10 mg kod *Nrf2*KO miševa, kod kojih su zabeleženi sniženi proteinski nivoi PFKFB3, PFK1, HIF-1 α , pAMPK α i insulina u odnosu na tumore iste veličine kod WT miševa. Ove promene ukazuju da NRF2 signalizacija u CAAT podržava rano uspostavljanje metaboličke komunikacije između tumora dojke i CAAT, koja doprinosi ostvarivanju ključnih aspekata Warburgovog efekta u kancerskim ćelijama dojke putem aktivacije AMPK α (fosforilacijom), transkripcione kontrole (HIF-1 α), alosterične regulacije (PFKFB3/PFK1) i/ili hormonske regulacije glikolize putem insulina. Iako nedostatak funkcionalnog NRF2 u CAAT nije sprečio aktivaciju glikolitičkog fenotipa u kancerskim ćelijama, uticao je na njegovu dinamiku i mehanizme uspostavljanja u inicijalnoj fazi rasta tumora (10 mg), dodatno ističući osetljivost najranijih faza rasta tumora i u slučaju ključne metaboličke strategije tumora, Warburgovog efekta, na NRF2-zavisne promene u CAAT.

Porast nivoa insulina sa rastom tumora samo u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa, uporedo sa povećanom stopom kolokalizacije insulina i PFKFB3, ukazuje na aktivaciju kompenzatornog mehanizma usmerenog ka insulin-zavisnom preuzimanju glukoze radi povećanja stope glikolitičkog fluksa kao odgovora na slabiju aktivaciju glikolitičkog puta u tumorima ovih miševa. Ovu hipotezu podržava i istovremeni porast proteinskog nivoa GLUT4 transportera koji se translocira u membranu pretežno kao odgovor na insulinsku signalizaciju (Leto & Saltiel, 2012), što je zabeleženo samo u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa. Zajedno sa konstantnom ekspresijom GLUT1 i kolokalizacijom GLUT1/GLUT4, izgleda da je ovaj kompenzatorni mehanizam omogućio *Nrf2*KO miševima da održe glikolitički fenotip koji pogoduje tumoru, uprkos inicijalnom izostanku aktivacije ključnih faktora regulacije glikolize. Nasuprot tome, nepromenjeni GLUT1 i GLUT4 nivoi u tumorskom tkivu WT miševa, kao i opadajući nivoi insulina sa rastom tumora, ukazuju da je kapacitet za unos glukoze kod tumora ovih miševa verovatno dovoljan tokom rane tumorogeneze, gde je povećana stopa glikolize vođena povećanjem ekspresije PFKFB3 i PFK1.

Različiti metabolički profili tumora WT i *Nrf2*KO miševa takođe su se ogledali i u metabolizmu laktata. Laktat predstavlja važan metabolički intermedijer i signalni molekul koji ima višestruke funkcije u biologiji tumora, uključujući regulaciju pH, redoks homeostaze i metaboličke kooperacije

tumora i stromalnih ćelija (Li *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2026). Tumorsko tkivo WT miševa pokazivalo je očekivan obrazac metabolizma laktata, sa konstantnim nivoima LDHA, sniženim nivoima LDHB i povećanim nivoima MCT4 i CAIX sa rastom tumora, čime je podržan eksport laktata iz kancerskih ćelija i posledična acidifikacija tumorske mikrosredine. Povećana ekspresija CAIX povezana je sa kancerom dojke i predstavlja klinički pokazatelj agresivnosti tumora i niske stope preživljavanja pacijenata (Neri & Supuran, 2011; Numprasit *et al.*, 2023; Ong *et al.*, 2022). U skladu s tim, uočena povećana ekspresija vanćelijske izoforme CAIX sa rastom tumora u tumorskom tkivu i WT i *Nrf2*KO miševa, zajedno sa povišenim proteinskim nivoima MCT4, ukazuje na značaj ekstracelularne acidifikacije za progresiju tumora. Nasuprot tome, tumorsko tkivo *Nrf2*KO miševa pokazivalo je povišene proteinske nivoe LDHA, LDHB i MCT4, kao i snižene nivoe MCT1 u tumorima od 10 i 50 mg u poređenju sa odgovarajućim WT grupama. To ukazuje na rano povećanje stope metabolizma laktata kod ovih miševa. Iako su proteinski nivoi LDHA i LDHB opadali sa rastom tumora kod *Nrf2*KO miševa, trajno viši nivoi LDHB u tumorskom tkivu ovih miševa u odnosu na odgovarajuće WT grupe ukazuju na povećan kapacitet za reoksidaciju laktata i izmenjenu komunikaciju zasnovanu na laktatu između tumorskog tkiva i *Nrf2*^{-/-} CAAT. Ovakve promene bi mogle biti posledica povećanog unosa laktata iz CAAT u kancerske ćelije ili izmenjene regeneracije NAD⁺ i redoks homeostaze CAAT u odsustvu funkcionalnog NRF2. Niži proteinski nivoi MCT1 u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa u skladu su sa ovim nalazima, favorizujući sintezu i eksport laktata kao odgovor na izmenjenu NRF2-zavisnu redoks signalizaciju u CAAT.

Iako su inicijalna faza rasta tumora (tumori mase 10 mg) pokazale značajne razlike u metaboličkoj regulaciji tumora dojke kod *Nrf2*KO miševa, i WT i *Nrf2*KO miševi razvili su slične metaboličke profile u kasnijim fazama rasta tumora (200 mg). Ove izražene metaboličke razlike između ranih i kasnijih faza rasta tumora verovatno odražavaju početnu zavisnost tumorskog metabolizma od NRF2 signalizacije u CAAT, dok dalji rast tumora prati aktivacija kompenzatornih mehanizama i intrinzičnih metaboličkih adaptacija tumora koje umanjuju razlike uočene između WT i *Nrf2*KO miševa u ranim stadijumima. Čini se da je metabolizam laktata posebno osetljiv na nedostatak NRF2 signalizacije u CAAT tokom rasta tumora, verovatno zbog izmenjenog redoks okruženja, s obzirom na to da je laktat uključen i u održavanje ćelijske redoks homeostaze (Lin *et al.*, 2022).

Dok su tumori dojke pokazivali povišene stope glikolize tokom rasta tumora, CAAT je imala potpuno suprotan metabolički profil. Kod WT miševa, CAAT je pokazivalo osobine ovakvog kataboličkog fenotipa, sa sniženim proteinskim nivoima ključnih faktora regulacije glikolize i enzima LDH sa rastom tumora, što je u skladu sa njegovom tumor-promovišućom ulogom. Sa druge strane, u CAAT kod *Nrf2*KO miševa, ovakav metabolički obrazac je bio odložen u odnosu na WT miševima, s obzirom na više proteinske nivoe PFKFB3 i HIF-1 α . Štaviše, nivoi enzima uključenih u metabolizam laktata, uključujući LDHB i MCT4, takođe su bili viši u *Nrf2*KO CAAT, dok su nivoi LDHA bili sniženi u tumorima WT miševa iste veličine (10 mg), što ukazuje na povećan kapacitet CAAT kod *Nrf2*KO miševa za oksidaciju i eksport laktata. Stoga, NRF2 signalizacija značajno utiče na metaboličku regulaciju u CAAT tokom inicijalnih faza rasta tumora (tumori od 10 mg), dok je CAAT oba genotipa miševa sa tumorima od 200 mg pokazivala gotovo identične metaboličke profile. Dodatno, CAAT kontrolnih *Nrf2*KO miševa bez tumora takođe je pokazivao izmenjen metabolički profil, sa povišenim proteinskim nivoima PFKFB3, PFK1, HIF-1 α i pAMPK α u odnosu na kontrolne WT miševima bez tumora, što ukazuje na direktne efekte odsustva funkcionalnog NRF2 na metabolizam CAAT u bazalnim uslovima.

Ekspresioni profili metaboličkih enzima u tumorskom tkivu dojke i CAAT podržavaju postojanje NRF2-zavisne metaboličke kooperacije između tumora i CAAT prilikom uspostavljanja njihovih redoks-metaboličkih profila tokom rasta tumora dojke. Štaviše, NRF2 signalizacija u CAAT se izdvaja kao jedan od ključnih posrednika njihove redoks-metaboličke komunikacije tokom inicijalne faze rasta tumora (tumori od 10 mg). Dok su WT miševi pokazivali tipičan glikolitički fenotip u tumorskom tkivu uz uspostavljanje kataboličkog fenotipa CAAT, *Nrf2*KO miševi su pokazivali nižu stopu rane aktivacije glikolize i posledično, kompenzatorno insulin-zavisno preuzimanje glukoze i

pojačan promet laktata, sa tim da je metabolizam CAAT usled nedostatka funkcionalnog NRF2 već bio usmeren ka kataboličkom fenotipu u kontrolnim miševima bez tumora. Stoga, tumorsko tkivo dojke i CAAT uspostavljaju dinamičnu, dvosmernu metaboličku komunikaciju u kojoj kancerske ćelije i pridruženi adipociti usklađuju metabolizam glukoze i laktata kako bi podržali progresiju tumora. Rezultati dodatno ističu značaj aktivacije NRF2 u TME za metaboličko reprogramiranje tumora dojke. Targetovanje ovih metaboličkih puteva moglo bi dovesti do narušavanja metaboličke simbioze između tumora i CAAT i potencijalno do novih terapijskih pristupa u lečenju kancera dojke.

Analiza proteinskih nivoa enzima lipidnog metabolizma – ACLY, ACC i FAS, ukazuje na to da je i *de novo* lipogeneza takođe sastavni deo metaboličkog reprogramiranja u tumorskom tkivu dojke, pri čemu je obrazac njihovih promena zavisio od prisustva funkcionalnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini. Povećan stepen sinteze masnih kiselina jedno je od obeležja kancerskih ćelija, s obzirom na njihovu ulogu u formiranju ćelijskih membrana, energetskih rezervi i značaja kao signalnih molekula (Calder, 2015). Povećani proteinski nivoi sva tri ključna enzima lipogeneze u tumorima mase 10 mg kod *Nrf2*KO miševa ukazuju na raniju aktivaciju lipogeneze kod tumora koji se razvijaju u *Nrf2*^{-/-} TME. Međutim, sa daljim rastom tumora, nivoi FAS i ACLY opadaju kod *Nrf2*KO miševa, dok je ekspresija ACC rasla. To ukazuje na specifičnu regulaciju lipogeneze u zavisnosti od faze rasta tumora. Nasuprot tome, što je u sklafasdu sa nalazima drugih autora (Chajès *et al.*, 2006; Hilvo *et al.*, 2011), FAS i ACC u tumorskom tkivu WT miševa pokazali su porast proteinske ekspresije sa rastom tumora. Rezultati sugerišu da odsustvo funkcionalnog NRF2 u TME menja vremensku dinamiku aktivacije *de novo* lipogeneze u tumorskom tkivu dojke i na taj način dovodi do uspostavljanja različitih obrazaca metaboličkih promena tokom progresije tumora kod ovih miševa.

Browning je fenomen koji podrazumeva pojavu bež (*eng.* beige) adipocita u belom masnom tkivu, pri čemu ovakvi adipociti stiču morfološke i funkcijske karakteristike slične mrkim adipocitima (Petrovic *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). Ovaj fenotip karakteriše se povećanom metaboličkom aktivnošću i izmenjenim energetskim metabolizmom (Bartelt & Heeren, 2014). Bež adipociti su multilokularni, dekuplirajući protein 1 (*eng.* Uncoupling protein 1, UCP1)-pozitivni i odlikuju se povećanim brojem i aktivnošću mitohondrija. Bež adipociti se javljaju u belom masnom tkivu u uslovima povećane energetske potrošnje, kao što je niska temperatura ili različite metaboličke bolesti, uključujući kancer (Kir *et al.*, 2014). Sve više studija zapravo ukazuje na to da je aktivacija *browning*-a adaptivni odgovor lokalnog (Dirat *et al.*, 2011) i udaljenog masnog tkiva (Kir *et al.*, 2014) tokom progresije tumora, što ukazuje da je kancer sistemsko metaboličko oboljenje. Regulacija *browning*-a je kompleksna i podrazumeva aktivaciju nekoliko specifičnih transkripcionih faktora, među kojima su PRDM16 (Seale *et al.*, 2008), FGF21 (*eng.* Fibroblast growth factor 21) (Fisher *et al.*, 2012), PPAR γ (*eng.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Rosen *et al.*, 1999), PGC-1 α (*eng.* PPAR- γ coactivator-1 α) (Puigserver *et al.*, 1998), kao i različite mikro RNK (Mori *et al.*, 2012; Trajkovski *et al.*, 2012). CIDEA je protein asociranim sa lipidnim telima, koji je visoko ekspimiran u mrkim i bež adipocitima kod miševa i smatra se jednim od markera termogeno aktivnih adipocita (Abreu-Vieira *et al.*, 2015) i učestvuje u regulaciji lipidnog metabolizma, čime doprinosi metaboličkom remodeliranju adipocita. U disertaciji, rezultati analize genske ekspresije *Cidea* i *PRDM16* ukazali su na promene lipidnog metabolizma u CAAT tokom rasta tumora dojke. U CAAT *Nrf2*KO miševa, uočena je izraženija sklonost ka *browning* fenotipu, budući da su u CAAT WT miševa *Cidea* i *PRDM16* ostali slabo ekspimirani i nepromenjeni, dok je u CAAT *Nrf2*KO miševa zabeleženo rano i prolazno povećanje njihove genske ekspresije, posebno kod *Nrf2*KO miševa sa tumorima od 10 mg. Odsustvo funkcionalnog NRF2 u CAAT izgleda da utiče ne samo na morfološke promene već i na njegovu metaboličku plastičnost i indukuje pojavu metabolički aktivnih mrkih i/ili bež adipocita, pre svega u početnim fazama tumorogeneze.

5.9. Transkripciona regulacija redoks-metaboličke homeostaze u tumorskom, kancer-asociranom i kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa tokom rasta tumora dojke

Profili ekspresije transkripcionih faktora NRF1 i rNRF1 dodatno su ukazali na tkivno-specifičan, koordinisani redoks i metabolički odgovor tokom rasta tumora dojke, koji je zavisio od prisustva funkcionalnog NRF2 u tkivima organizma domaćina. U tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa uočen je rani porast proteinske ekspresije oba transkripciona faktora, što ukazuje na kompenzatornu aktivaciju redoks-zavisnih signalnih puteva kao odgovor na izmenjeno redoks okruženje diktirano nedostatkom funkcionalnog NRF2. Pri tome, nivoi NRF1 u tumorima *Nrf2*KO miševa ostali su povišeni u odnosu na tumore iste mase kod WT miševa tokom čitavog eksperimenta. Ove promene bile su još izraženije u CAAT. CAAT WT miševa karakterisalo se fazno-specifičnim povećanjima proteinske ekspresije NRF1 i rNRF1 sa pojavom tumora, što ukazuje na aktivaciju tumor-indukovanog redoks i mitohondrijalnog reprogramiranja. Nasuprot tome, u CAAT *Nrf2*KO miševa pokazano je rano kompenzatorno povećanje proteinske ekspresije i NRF1 i rNRF1, pri čemu je sa daljim rastom tumora obrazac njihove ekspresije bio isti kao i u CAAT *Nrf2*KO miševa. Sa druge strane, iWAT pokazao je potpuno suprotan profil njihove proteinske ekspresije, gde je u iWAT WT miševa primećeno sniženje ekspresije ovih transkripcionih faktora, dok je iWAT *Nrf2*KO miševa pokazivao trend njihovog povećanja sa rastom tumora, uz značajno više proteinske nivoe u poređenju sa iWAT kod WT miševa sa istim masama tumora. Ovakav obrazac proteinske ekspresije NRF1 i rNRF1 ukazuje na tkivno-specifičnu kompenzatornu aktivaciju signalnih puteva koji su uključeni u redoks regulaciju i remodelovanje mitohondrija tokom početnih faza rasta tumora, dok se sa daljim rastom tumora ovaj odgovor modifikuje na tkivno-specifičan način. Takođe, rezultati ukazuju da se lokalni i sistemski efekti tumora na redoks reprogramiranje tkiva domaćina razlikuju, pri čemu CAAT i iWAT ispoljavaju specifične adaptivne odgovore u zavisnosti od njihove lokalizacije i funkcijske povezanosti sa tumorom.

5.10. Tragom ekstracelularnih vezikula u kanceru dojke

Ekstracelularne vezikule predstavljaju važne medijatore međucelijske komunikacije jer omogućavaju transport različitih biomolekula, uključujući proteine, lipide i RNK (Tkach & Théry, 2016). Zbog ovakve uloge, mogu biti od velikog značaja u komunikaciji tumora i TME, kao i tumora i udaljenih tkiva domaćina, time utičući na različite aspekte progresije tumora (Kalluri & McAndrews, 2023; Ten *et al.*, 2024). U ovoj disertaciji, promene u proteinskoj ekspresiji markera ekstracelularnih vezikula, kao i kaveolina 1 i koneksina 43, u tumorskom tkivu WT i *Nrf2*KO miševa, ukazuju na sve veću zastupljenost ovakvog vida komunikacije sa rastom tumora. Porast proteinske ekspresije sva tri markera ekstracelularnih vezikula, CD81, CD63 i TSG101, u tumorskom tkivu WT miševa ukazuje na intenziviranje biogeneze i/ili oslobađanja ekstracelularnih vezikula sa rastom tumora. Iako je sličan obrazac primećen u tumorskom tkivu *Nrf2*KO miševa, opadajući ekspresioni profil CD63 (i pored inicijalno većih nivoa u tumorima od 10 mg u odnosu na WT miševe) i niži nivoi TSG101 u kasnijim fazama rasta tumora (200 mg) u odnosu na komplementarne WT grupe, ukazuju na efekte nedostatka funkcionalnog NRF2 u TME na regulaciju vezikularnog odgovora tumora. Dodatno, proteinski nivoi CAV1 i Cx43 bili su viši u tumorima od 200 mg kod *Nrf2*KO miševa nego kod tumora iste veličine WT miševa, sugerišući da odsustvo funkcionalnog NRF2 u TME može čak dodatno doprineti indukciji vezikularnog transporta sa daljim rastom tumora. Dakle, komunikacija posredovana ekstracelularnim vezikulama sastavni je deo progresije kancera dojke i povezana je sa NRF2-zavisnom signalizacijom u TME, koja izgleda da utiče na dinamiku i obrazac biogeneze ekstracelularnih vezikula.

6. ZAKLJUČCI

U disertaciji su ispitivani strukturni, redoks i metabolički profili tumorskog, kancer-asociranog i kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva tokom rasta tumora dojke (tumori mase 10, 50 i 200 mg), sa posebnim osvrtom na ulogu NRF2 signalnog puta u integraciji reprogramiranja tumorskog i masnog tkiva mlečne žlezde na lokalnom i sistemskom nivou.

Okarakterisane su morfološke osobine, ekspresioni profili ključnih redoks i metaboličkih enzima, kao i faktori regulacije uključenih u reprogramiranje kancerskih ćelija i tumor-indukovano reprogramiranje kancer-asociranih adipocita u okviru tumorske mikrosredine, ali i kontralateralnih adipocita kao pokazatelja sistemskih efekata tumora. Po prvi put je utvrđen značaj NRF2-zavisnog redoks statusa organizma domaćina za uspostavljanje malignog fenotipa i protumorogene mikrosredine tokom rasta tumora dojke. Na osnovu rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Dinamika lokalne redoks-metaboličke interakcije tumora dojke i kancer-asociranog masnog tkiva na morfološkom nivou zavisi od prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini. Beleži se trend većih masa tumora u najranijim fazama tumorogeneze kod WT miševa u poređenju sa *Nrf2*KO miševima. Paralelno, uočeno je smanjenje relativne mase kancer-asociranog masnog tkiva u poređenju sa kontrolama bez tumora samo kod WT miševa u inicijalnoj fazi rasta tumora (10 mg).

- Detaljna analiza morfoloških promena pokazuje da tokom rasta tumora dojke dolazi do progresivnog remodeliranja tumorskog tkiva, koje se ogleda u povećanju broja i veličine kancerskih ćelija, kao i povećanoj ekspresiji proliferacionog markera PCNA kod miševa oba genotipa. Međutim, odsustvo funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini dovodi do pojave gigantskih kancerskih ćelija, što ukazuje na izmenjenu regulaciju ćelijskog ciklusa. Paralelno, morfološka analiza kancer-asociranog masnog tkiva kod oba genotipa miševa pokazuje izraženu multilokularnost adipocita kao adaptivni odgovor na prisustvo tumora. Povećana genska ekspresija *Cidea* i *PRDM16* ukazuje da je aktivna regulacija *browning* fenotipa prisutna samo u kancer-asociranom masnom tkivu *Nrf2*KO miševa.

- Tokom rasta tumora dojke dolazi do dinamičkog metaboličkog reprogramiranja tumorskog tkiva, koje se karakteriše postepenim uspostavljanjem glikolitičkog fenotipa uz produkciju laktata, odnosno Warburgovim efektom. U odsustvu funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini, indukcija ovakvog fenotipa u tumoru je odložena, uz aktivaciju alternativnih, insulin- i GLUT4-zavisnih mehanizama preuzimanja glukoze i viši stepen očuvanja oksidativnog metabolizma. Po prvi put pokazano je da ključne metaboličke karakteristike kancerskih ćelija nisu isključivo intrinzične, već su u značajnoj meri određene NRF2-zavisnim redoks statusom tumorske mikrosredine, posebno u najranijoj fazi rasta tumora (10 mg).

- Paralelno sa metaboličkim promenama, tumor dojke uspostavlja dinamičku redoks homeostazu tokom rasta. Promene u aktivnosti i nivoima ključnih komponenti antioksidativne odbrane ukazuju na povećane nivoe ROS i lipidnih peroksida tokom rasta tumora, uz istovremeno održavanje visokih nivoa redukovanih GSH i TRX. Dodatno, tumori istih veličina karakterišu se distinktnim redoks profilima u zavisnosti od funkcijskog statusa NRF2 u njegovoj mikrosredini, što potvrđuje NRF2-zavisnu integraciju redoks statusa tumorske mikrosredine i tumora dojke tokom njegovog rasta.

- Ekspresioni profili regulatornih faktora redoks-metaboličkog reprogramiranja, specifično AMPK α , HIF-1 α , NRF1 i rNRF1, ukazuju na njihovu ulogu u regulaciji ekspresije ključnih antioksidativnih i metaboličkih enzima. Najizraženiji uticaj NRF2-zavisne regulacije redoks i metaboličkog reprogramiranja tumora uočen je u inicijalnim fazama rasta tumora (10 mg), ukazujući da inicijalno uspostavljanje malignog fenotipa u velikoj meri zavisi od redoks statusa tumorske mikrosredine. Sa daljim rastom tumora, ove razlike se postepeno smanjuju, odražavajući visoku adaptibilnost i metaboličku plastičnost kancerskih ćelija.

- Remodeliranje mitohondrija predstavlja centralni integrator redoks i metaboličkog reprogramiranja tumora dojke. Promene u mitohondrijalnoj strukturi, dinamici i metabolizmu u tumorskom tkivu zavise od prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini i faze rasta tumora. Tokom rasta tumora dolazi do smanjenja proteinskog nivoa subjediničnog elektronskog transportnog lanca. Međutim, tumori koji su se razvijali bez prisustva funkcijski aktivnog NRF2 u tumorskoj mikrosredini pokazali su njihove veće proteinske nivoe, kao i suprotan profil proteinske ekspresije DRP1 i MFN1 u inicijalnoj fazi rasta tumora (10 mg) u odnosu na tumore WT miševa, dok sa rastom tumora pokazuju veći dijametar mitohondrija. Ove promene praćene su povećanom respiratornom aktivnošću mitohondrija i produkcijom ROS u kancerskim ćelijama dojke kokultivisanim zajedno sa *Nrf2*^{-/-} adipocitima, što dodatno potvrđuje značaj NRF2 u kancer-asociranom masnom tkivu za funkciju mitohondrija i redoks homeostazu u kancerskim ćelijama prilikom uspostavljanja redoks-metaboličke interakcije tumora dojke sa asociranim masnim tkivom.

- Kancer-asocirano masno tkivo pokazuje tkivno-specifično i funkcijski usklađeno redoks i metaboličko reprogramiranje sa tumorskim tkivom dojke. Za razliku od tumorskog tkiva, kancer-asocirano masno tkivo karakteriše smanjeni metabolizam glukoze i laktata, uz selektivne promene u aktivnosti i ekspresiji ključnih komponentni antioksidativne odbrane tokom rasta tumora. Odsustvo funkcijski aktivnog NRF2 u kancer-asociranom masnom tkivu dovodi do povećanih proteinskih nivoa ključnih enzima glukoznog i laktatnog metabolizma u specifičnim fazama rasta tumora, praćeno izmenjenim redoks profilom. Dodatno, redoks i metabolički profil kancer-asociranog masnog tkiva bez funkcijski aktivnog NRF2 izmenjen je i u bazalnim uslovima bez prisustva tumora, ukazujući na ključnu regulatornu ulogu NRF2 u reprogramiranju masnog tkiva kako u fiziološkim tako i u patofiziološkim uslovima.

- Sistemski efekti tumora dojke potvrđeni su kroz redoks i metaboličko reprogramiranje kontralateralnog ingvinalnog masnog tkiva, koje nije u direktnom kontaktu sa tumorom. Takođe, promene u strukturi i redoks-metaboličkoj homeostazi u kontralateralnom ingvinalnom masnom tkivu zavise su od prisustva funkcijski aktivnog NRF2, kao i od faze rasta tumora dojke.

Tumorsko tkivo dojke uspostavlja dvosmernu redoks-metaboličku interakciju sa kancer-asociranim masnim tkivom već u najranijim fazama rasta tumora (10 mg). Transkripcioni faktor NRF2 u tumorskoj mikrosredini koordiniše uspostavljanje ove interakcije, koja dovodi do formiranja pseudo-organa kancera dojke, u kome međusobna zavisnost tumora i masnog tkiva određuje uspostavljanje malignog fenotipa i protumorogene sredine.

Usklađene promene u redoks profilima tumorskog i kancer-asociranog masnog tkiva, zajedno sa povezanom NRF2 signalizacijom u ova dva tkiva, ukazuju na postojanje njihove redoks-zavisne kooperacije. Značaj uspostavljanja NRF2-dirigovane protumorogene mikrosredine po prvi put je potvrđen u ortotopskom modelu kancera dojke. Generalno, tkivno-specifično strukturno, redoks i metaboličko reprogramiranje tumorskog tkiva određeno je fazom rasta tumora i funkcijskim statusom NRF2 u kancer-asociranom masnom tkivu kao dominantnoj komponenti tumorske mikrosredine.

7. LITERATURA

- Abreu-Vieira, G., Fischer, A. W., Mattsson, C., de Jong, J. M. A., Shabalina, I. G., Rydén, M., Laurencikiene, J., Arner, P., Cannon, B., Nedergaard, J., & Petrovic, N. (2015). Cidea improves the metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Nature Communications*, 6(1), 7433. <https://doi.org/10.1038/ncomms8433>
- Adebayo, M., Singh, S., Singh, A. P., & Dasgupta, S. (2021). Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *The FASEB Journal*, 35(6), e21620. <https://doi.org/10.1096/fj.202100067R>
- Agyeman, A. S., Chaerkady, R., Shaw, P. G., Davidson, N. E., Visvanathan, K., Pandey, A., & Kensler, T. W. (2012). Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(1), 175–187. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1536-9>
- Ahn, C. S., & Metallo, C. M. (2015). Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer & Metabolism*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0128-2>
- Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W. R., & Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 6(1), 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.010>
- Alò, P. L., Visca, P., Botti, C., Galati, G. M., Sebastiani, V., Andreano, T., Di Tondo, U., & Pizer, E. S. (2001). Immunohistochemical Expression of Human Erythrocyte Glucose Transporter and Fatty Acid Synthase in Infiltrating Breast Carcinomas and Adjacent Typical/Atypical Hyperplastic or Normal Breast Tissue. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(1), 129–134. <https://doi.org/10.1309/5Y2L-CDCK-YB55-KDK6>
- Altea-Manzano, P., Cuadros, A. M., Broadfield, L. A., & Fendt, S. (2020). Nutrient metabolism and cancer in the *in vivo* context: a metabolic game of give and take. *EMBO Reports*, 21(10), e50635. <https://doi.org/10.15252/embr.202050635>
- Altea-Manzano, P., Decker-Farrell, A., Janowitz, T., & Erez, A. (2025). Metabolic interplays between the tumour and the host shape the tumour macroenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, 25(4), 274–292. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00786-4>
- Altemus, M. A., Goo, L. E., Little, A. C., Yates, J. A., Cheriyan, H. G., Wu, Z. F., & Merajver, S. D. (2019). Breast cancers utilize hypoxic glycogen stores via PYGB, the brain isoform of glycogen phosphorylase, to promote metastatic phenotypes. *PLOS ONE*, 14(9), e0220973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220973>
- Ambrosone, C. B. (2000). Oxidants and Antioxidants in Breast Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2(4), 903–917. <https://doi.org/10.1089/ars.2000.2.4-903>
- Anderson, G. R., Wardell, S. E., Cakir, M., Yip, C., Ahn, Y. R., Ali, M., Yllanes, A. P., Chao, C. A., McDonnell, D. P., & Wood, K. C. (2018). Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. *Nature Communications*, 9(1), 1677. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04033-x>
- Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102–6109. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>
- Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 16(6), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.009>

- Awad, A. M. A. M., & Abdul Karim, N. (2025). Dysregulation of Mitochondrial Function in Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(14), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms26146750>
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>
- Balaban, S., Shearer, R. F., Lee, L. S., van Geldermalsen, M., Schreuder, M., Shtein, H. C., Cairns, R., Thomas, K. C., Fazakerley, D. J., Grewal, T., Holst, J., Saunders, D. N., & Hoy, A. J. (2017). Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer & Metabolism*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0163-7>
- Bansal, A., & Simon, M. C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2291–2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- Bartelt, A., & Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 24–36). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204>
- Bauer, G. (2015). Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. *Redox Biology*, 6, 353–371. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.017>
- Beck, R., Pedrosa, R. C., Dejeans, N., Glorieux, C., Levêque, P., Gallez, B., Taper, H., Eeckhoudt, S., Knoops, L., Calderon, P. B., & Verrax, J. (2011). Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. *Investigational New Drugs*, 29(5), 891–900. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9441-3>
- Bedard, K., & Krause, K-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Belew, G. D., Silva, J., Rito, J., Tavares, L., Viegas, I., Teixeira, J., Oliveira, P. J., Macedo, M. P., & Jones, J. G. (2019). Transfer of glucose hydrogens via acetyl-CoA, malonyl-CoA, and NADPH to fatty acids during de novo lipogenesis. *Journal of Lipid Research*, 60(12), 2050–2056. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000354>
- Bernard, J. J., & Wellberg, E. A. (2021). The Tumor Promotional Role of Adipocytes in the Breast Cancer Microenvironment and Macroenvironment. *The American Journal of Pathology*, 191(8), 1342–1352. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.02.006>
- Beutler, E. (1982). Catalase. In *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods* (pp. 105–106). Grune and Stratton Inc.
- Blücher, C., & Stadler, S. C. (2017). Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00293>
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guet, R., Maridonneau-Parini, I., Gonidec, S. Le, Couderc, B., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Research*, 73(18), 5657–5668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>
- Böhm, B., Heinzemann, S., Motz, M., & Bauer, G. (2015). Extracellular localization of catalase is associated with the transformed state of malignant cells. *Biological Chemistry*, 396(12), 1339–

1356. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0234>

- Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 292. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00292>
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology*, 17(4), 351–359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Brahn, B. (1916). *Sitzber. Kgl. Preuss. Akad. Wiss*, 478-481.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brooks, G. A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism*, 27(4), 757–785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>
- Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrman, M., Hermes, M., Geppert, B., Schormann, W., Maccoux, L. J., Schug, M., Schumann, A., Wilhelm, C., Freis, E., Ickstadt, K., Rahnenführer, J., Baumbach, J. I., Sickmann, A., & Hengstler, J. G. (2010). Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(3), R44. <https://doi.org/10.1186/bcr2599>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1S), 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Castaldo, S. A., Freitas, J. R., Conchinha, N. V., & Madureira, P. A. (2016). The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 8413032. <https://doi.org/10.1155/2016/8413032>
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant States and Tumor Promotion. *Science*, 227(4685), 375–381. <https://doi.org/10.1126/science.2981433>
- Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., & Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA Carboxylase α Is Essential to Breast Cancer Cell Survival. *Cancer Research*, 66(10), 5287–5294. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1489>
- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>
- Chandel, N. S. (2021). NADPH—The Forgotten Reducing Equivalent. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(6), a040550. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040550>
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Journal of Cell Biology*, 160(2), 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., & Zhang, D. D. (2009). Direct Interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Molecular Cell*, 34(6), 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.029>
- Chevillard, G., & Blank, V. (2011). NFE2L3 (NRF3): the Cinderella of the Cap'n'Collar transcription factors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(20), 3337–3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0747-x>

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Choudhury, F. K. (2021). Mitochondrial Redox Metabolism: The Epicenter of Metabolism during Cancer Progression. *Antioxidants*, *10*(11), 1838. <https://doi.org/10.3390/antiox10111838>
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *73*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.010>
- Cipolat, S., De Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(45), 15927–15932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>
- Clem, B., Telang, S., Clem, A., Yalcin, A., Meier, J., Simmons, A., Rasku, M. A., Arumugam, S., Dean, W. L., Eaton, J., Lane, A., Trent, J. O., & Chesney, J. (2008). Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0482>
- Clemente-Suárez, V. J., Redondo-Flórez, L., Beltrán-Velasco, A. I., Martín-Rodríguez, A., Martínez-Guardado, I., Navarro-Jiménez, E., Laborde-Cárdenas, C. C., & Tornero-Aguilera, J. F. (2023). The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicines*, *11*(5), 1290. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051290>
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salvati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, *155*(1), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.032>
- Colleluori, G., Perugini, J., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2021). Mammary gland adipocytes in lactation cycle, obesity and breast cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *22*(2), 241–255. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09633-5>
- Coller, H. A. (2014). Is Cancer a Metabolic Disease? *The American Journal of Pathology*, *184*(1), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.035>
- Comito, G., Calvani, M., Giannoni, E., Bianchini, F., Calorini, L., Torre, E., Migliore, C., Giordano, S., & Chiarugi, P. (2011). HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(4), 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.042>
- Corkey, B. E., & Deeney, J. T. (2020). The Redox Communication Network as a Regulator of Metabolism. *Frontiers in Physiology*, *11*, 567796. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.567796>
- Corominas-Faja, B., Vellon, L., Cuyàs, E., Buxó, M., Martín-Castillo, B., Serra, D., García, J., Menendez, J. A., & Lupu, R. (2017). Clinical and therapeutic relevance of the metabolic oncogene fatty acid synthase in HER2+ breast cancer. *Histology and Histopathology*, *32*(7), 687–698. <https://doi.org/10.14670/HH-11-830>
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, *95*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(20), 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003>

- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*, 18(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- Curry, J. M., Tuluc, M., Whitaker-Menezes, D., Ames, J. A., Anantharaman, A., Butera, A., Leiby, B., Cognetti, D., Sotgia, F., Lisanti, M. P., & Martinez-Outschoorn, U. E. (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence. *Cell Cycle*, 12(9), 1371–1384. <https://doi.org/10.4161/cc.24092>
- D’Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Dales, J.-P., Beaufils, N., Silvy, M., Picard, C., Pauly, V., Pradel, V., Formisano-Tréziny, C., Bonnier, P., Giusiano, S., Charpin, C., & Gabert, J. (2010). Hypoxia inducible factor 1 α gene (HIF-1 α) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Medicine*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-44>
- Dawane, J. S. (2012). Understanding Redox Homeostasis and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6(10), 1796-1802. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4947.2654>
- de Almeida, A. J. P. O., de Oliveira, J. C. P. L., da Silva Pontes, L. V., de Souza Júnior, J. F., Gonçalves, T. A. F., Dantas, S. H., de Almeida Feitosa, M. S., Silva, A. O., & de Medeiros, I. A. (2022). ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 1225578. <https://doi.org/10.1155/2022/1225578>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nature Metabolism*, 2(2), 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- DeNicola, G. M., & Cantley, L. C. (2015). Cancer’s Fuel Choice: New Flavors for a Picky Eater. *Molecular Cell*, 60(4), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.018>
- Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>
- Eaton, S., Bartlett, K. B., & Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochemical Journal*, 320(2), 345–357. <https://doi.org/10.1042/bj3200345>
- Egeblad, M., Nakasone, E. S., & Werb, Z. (2010). Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell*, 18(6), 884–901. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>
- Elliott, K. A. C. (1941). Intermediary metabolites and respiratory catalysis. *Physiological Reviews*, 21(2), 267–306. <https://doi.org/10.1152/physrev.1941.21.2.267>
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox*

- Essers, J., van Cappellen, W. A., Theil, A. F., van Drunen, E., Jaspers, N. G. J., Hoeijmakers, J. H. J., Wyman, C., Vermeulen, W., & Kanaar, R. (2005). Dynamics of Relative Chromosome Position during the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 769–775. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0876>
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornell, H. H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J. M., Sloane, B. F., Johnson, J., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2013). Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. *Cancer Research*, 73(5), 1524–1535. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2796>
- Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J. J., Shlomi, T., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, 510(7504), 298–302. <https://doi.org/10.1038/nature13236>
- Fath, M. A., Ahmad, I. M., Smith, C. J., Spence, J., & Spitz, D. R. (2011). Enhancement of Carboplatin-Mediated Lung Cancer Cell Killing by Simultaneous Disruption of Glutathione and Thioredoxin Metabolism. *Clinical Cancer Research*, 17(19), 6206–6217. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0736>
- Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487), e1600200. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Fiaschi, T., & Chiarugi, P. (2012). Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/762825>
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W., & Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812–3819. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035972>
- Fisher, M., Ffolliott, M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J. S., Maratos-Flier, E., & Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development*, 26(3), 271–281. <https://doi.org/10.1101/gad.177857.111>
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Heiden, M. G. Vander, & Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(11), 829–846. <https://doi.org/10.1038/nrd4145>
- Georgiou-Siafis, S. K., & Tsiftoglou, A. S. (2023). The Key Role of GSH in Keeping the Redox Balance in Mammalian Cells: Mechanisms and Significance of GSH in Detoxification via Formation of Conjugates. *Antioxidants*, 12(11), 1953. <https://doi.org/10.3390/antiox12111953>
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017>

- Glatzle, D., Vuilleumier, J. P., Weber, F., & Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30(6), 665–667. <https://doi.org/10.1007/BF01921531>
- Glorieux, C., Dejeans, N., Sid, B., Beck, R., Calderon, P. B., & Verrax, J. (2011). Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), 1384–1390. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.007>
- Green, T. M., Alpaugh, M. L., Barsky, S. H., Rappa, G., & Lorico, A. (2015). Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Contribution to the Metastatic Phenotype. *BioMed Research International*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/634865>
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Guo, Y., Yu, S., Zhang, C., & Kong, A.-N. T. (2015). Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.013>
- Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for Cancer: The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16(11), 1295–1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K., & Pakuwal, U. (2014). Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(11), 4405–4409. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.
- Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family?from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 619–628. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1067-2>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrc704>
- Harris, I. S., Treloar, A. E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K. C., Yung, K. Y., Brenner, D., Knobbe-Thomsen, C. B., Cox, M. A., Elia, A., Berger, T., Cescon, D. W., Adeoye, A., Brüstle, A., Molyneux, S. D., Mason, J. M., Li, W. Y., Yamamoto, K., *et al.* (2015). Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression.

Cancer Cell, 27(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019>

- Hashimoto, K., Simmons, A. N., Kajino-Sakamoto, R., Tsuji, Y., & Ninomiya-Tsuji, J. (2016). TAK1 Regulates the Nrf2 Antioxidant System Through Modulating p62/SQSTM1. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(17), 953–964. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6663>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., & Sutherland, C. (2015). Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of β -TrCP and GSK-3. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 611–620. <https://doi.org/10.1042/BST20150011>
- Heer, E., Harper, A., Escandor, N., Sung, H., McCormack, V., & Fidler-Benaoudia, M. M. (2020). Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet Global Health*, 8(8), e1027–e1037. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30215-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30215-1)
- Helfinger, V., & Schröder, K. (2018). Redox control in cancer development and progression. *Molecular Aspects of Medicine*, 63, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.02.003>
- Hempel, N., Carrico, P., & Melendez, J. A. (2011). Manganese Superoxide Dismutase (Sod2) and Redox-Control of Signaling Events That Drive Metastasis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(2), 191–201. <https://doi.org/10.2174/187152011795255911>
- Higgins, L. G., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. (2009). Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts in vitro against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(3), 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.005>
- Hilvo, M., Denkert, C., Lehtinen, L., Müller, B., Brockmöller, S., Seppänen-Laakso, T., Budczies, J., Bucher, E., Yetukuri, L., Castillo, S., Berg, E., Nygren, H., Sysi-Aho, M., Griffin, J. L., Fiehn, O., Loibl, S., Richter-Ehrenstein, C., Radke, C., Hyötyläinen, T., *et al.* (2011). Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research*, 71(9), 3236–3245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3894>
- Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Douglas Engel, J., & Yamamoto, M. (2012). Nrf2–MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10228–10239. <https://doi.org/10.1093/nar/gks827>
- Hoek, J. B., & Rydström, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochemical Journal*, 254(1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/bj2540001>
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., & Lillig, C. H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*, 33(6), 1375–1377. <https://doi.org/10.1042/BST0331375>

- Hong, C. S., Graham, N. A., Gu, W., Espindola Camacho, C., Mah, V., Maresh, E. L., Alavi, M., Bagryanova, L., Krotee, P. A. L., Gardner, B. K., Behbahan, I. S., Horvath, S., Chia, D., Mellinghoff, I. K., Hurvitz, S. A., Dubinett, S. M., Critchlow, S. E., Kurdistani, S. K., Goodglick, L., *et al.* (2016). MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell Reports*, *14*(7), 1590–1601. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.057>
- Hornsveld, M., & Dansen, T. B. (2016). The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxidants & Redox Signaling*, *25*(6), 300–325. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6580>
- Huang, J., Tan, P.-H., Thiyagarajan, J., & Bay, B.-H. (2003). Prognostic Significance of Glutathione S-Transferase-Pi in Invasive Breast Cancer. *Modern Pathology*, *16*(6), 558–565. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000071842.83169.5A>
- Huang, J., Tan, P. H., Tan, B. K. H., & Bay, B. H. (2004). GST-pi expression correlates with oxidative stress and apoptosis in breast cancer. *Oncology Reports*, *12*(4), 921–925.
- Huang, X., Li, X., Xie, X., Ye, F., Chen, B., Song, C., Tang, H., & Xie, X. (2016). High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. *Breast*, *30*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.08.014>
- Ibrahim, L., Mesgarzadeh, J., Xu, I., Powers, E. T., Wiseman, R. L., & Bollong, M. J. (2020). Defining the Functional Targets of Cap'n'collar Transcription Factors NRF1, NRF2, and NRF3. *Antioxidants*, *9*(10), 1025. <https://doi.org/10.3390/antiox9101025>
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *236*(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
- Jankovic, A., Golic, I., Markelic, M., Stancic, A., Otasevic, V., Buzadzic, B., Korac, A., & Korac, B. (2015). Two key temporally distinguishable molecular and cellular components of white adipose tissue browning during cold acclimation. *Journal of Physiology*, *593*(15), 3267–3280. <https://doi.org/10.1113/JP270805>
- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxidants and Redox Signaling*, *23*(9), 734–746. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>
- Jose, C., Bellance, N., & Rossignol, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1807*(6), 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.012>
- Ju, H.-Q., Lin, J.-F., Tian, T., Xie, D., & Xu, R.-H. (2020). NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
- Kabaria, S., Choi, D. C., Chaudhuri, A. D., Jain, M. R., Li, H., & Junn, E. (2015). MicroRNA-7 activates Nrf2 pathway by targeting Keap1 expression. *Free Radical Biology and Medicine*, *89*, 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.010>
- Kaelin, W. G., & McKnight, S. L. (2013). Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell*, *153*(1), 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.004>
- Kalezic, A., Udicki, M., Srdic Galic, B., Aleksic, M., Korac, A., Jankovic, A., & Korac, B. (2020). Lactate Metabolism in Breast Cancer Microenvironment: Contribution Focused on Associated Adipose Tissue and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9676. <https://doi.org/10.3390/ijms21249676>

- Kalezic, A., Udicki, M., Srdic Galic, B., Aleksic, M., Korac, A., Jankovic, A., & Korac, B. (2021). Redox profile of breast tumor and associated adipose tissue in premenopausal women - Interplay between obesity and malignancy. *Redox Biology*, *41*, 101939. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101939>
- Kalluri, R., & McAndrews, K. M. (2023). The role of extracellular vesicles in cancer. *Cell*, *186*(8), 1610–1626. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.010>
- Kampjut, D., & Sazanov, L. A. (2019). Structure and mechanism of mitochondrial proton-translocating transhydrogenase. *Nature*, *573*(7773), 291–295. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1519-2>
- Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., Counter, C. M., & Kashatus, D. F. (2015). Erk2 Phosphorylation of Drp1 Promotes Mitochondrial Fission and MAPK-Driven Tumor Growth. *Molecular Cell*, *57*(3), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.002>
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2016). Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Current Opinion in Toxicology*, *1*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.09.005>
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*(1), 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kim, E.-Y., Chung, T.-W., Han, C. W., Park, S. Y., Park, K. H., Jang, S. B., & Ha, K.-T. (2019). A Novel Lactate Dehydrogenase Inhibitor, 1-(Phenylseleno)-4-(Trifluoromethyl) Benzene, Suppresses Tumor Growth through Apoptotic Cell Death. *Scientific Reports*, *9*(1), 3969. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40617-3>
- Kim, H., Scimia, M. C., Wilkinson, D., Trelles, R. D., Wood, M. R., Bowtell, D., Dillin, A., Mercola, M., & Ronai, Z. A. (2011). Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Molecular Cell*, *44*(4), 532–544. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.045>
- Kim, H. M., Han, J. W., & Chan, J. Y. (2016). Nuclear Factor Erythroid-2 Like 1 (NFE2L1): Structure, function and regulation. *Gene*, *584*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.002>
- Kim, J.-A. (2020). Peroxisome Metabolism in Cancer. *Cells*, *9*(7), 1692. <https://doi.org/10.3390/cells9071692>
- Kir, S., White, J. P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V. E., & Spiegelman, B. M. (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature*, *513*(7516), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature13528>
- Kobayashi, A., Ito, E., Toki, T., Kogame, K., Takahashi, S., Igarashi, K., Hayashi, N., & Yamamoto, M. (1999). Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Cap'n' Collar Family Transcription Factor Nrf3. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(10), 6443–6452. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6443>
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., & Yamamoto, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(16), 7130–7139. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004>

- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(3–4), 385–394. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.385>
- Köhle, C., & Bock, K. W. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochemical Pharmacology*, 73(12), 1853–1862. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.009>
- Kothari, C., Diorio, C., & Durocher, F. (2020). The importance of breast adipose tissue in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>
- Krebs, H. A. (1967). The redox state of nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Advances in Enzyme Regulation*, 5, 409–434. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(67\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0065-2571(67)90029-5)
- Kuznetsov, A. V., Margreiter, R., Ausserlechner, M. J., & Hagenbuchner, J. (2022). The Complex Interplay between Mitochondria, ROS and Entire Cellular Metabolism. *Antioxidants*, 11(10), 1995. <https://doi.org/10.3390/antiox11101995>
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., & Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, 340(6140), 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Laurent, V., Toulet, A., Attané, C., Milhas, D., Dauvillier, S., Zaidi, F., Clement, E., Cinato, M., Le Gonidec, S., Guérard, A., Lehuédé, C., Garandeau, D., Nieto, L., Renaud-Gabardos, E., Prats, A.-C., Valet, P., Malavaud, B., & Muller, C. (2019). Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. *Molecular Cancer Research*, 17(3), 821–835. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0748>
- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., Royer, R. E., Vander Jagt, D. L., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2037–2042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914433107>
- Lee, D. J., & Kang, S. W. (2013). Reactive Oxygen Species and Tumor Metastasis. *Molecules and Cells*, 35(2), 93–98. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0034-9>
- Lee, S., Hallis, S. P., Jung, K.-A., Ryu, D., & Kwak, M.-K. (2019). Impairment of HIF-1 α -mediated metabolic adaption by NRF2-silencing in breast cancer cells. *Redox Biology*, 24, 101210. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101210>
- Leto, D., & Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: Traffic control of GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 383–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Lewis, C. A., Parker, S. J., Fiske, B. P., McCloskey, D., Gui, D. Y., Green, C. R., Vokes, N. I., Feist, A. M., Vander Heiden, M. G., & Metallo, C. M. (2014). Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 55(2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.008>
- Li, J.-J., Oberley, L. W., St Clair, D. K., Ridnour, L. A., & Oberley, T. D. (1995). Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene*, 10(10), 1989–2000.

- Li, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, X., Fu, X., An, Y., Zou, Y., Wang, J. X., Wang, Z., & Yu, T. (2022). Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 305. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01151-3>
- Li, Y., Zhao, Q., Hu, H., & Pei, J.-F. (2026). Spatiotemporal dynamics of reactive oxygen species: implications for cellular homeostasis and redox therapies. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 31(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s11658-025-00849-w>
- Li, Z., Sun, C., & Qin, Z. (2021). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts and its effect on cancer cell reprogramming. *Theranostics*, 11(17), 8322–8336. <https://doi.org/10.7150/thno.62378>
- Liang, J., Yang, Y., Bai, L., Li, F., & Li, E. (2020). DRP1 upregulation promotes pancreatic cancer growth and metastasis through increased aerobic glycolysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 35(5), 885–895. <https://doi.org/10.1111/jgh.14912>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, 27(2), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>
- Lin, Y., Wang, Y., & Li, P. (2022). Mutual regulation of lactate dehydrogenase and redox robustness. *Frontiers in Physiology*, 13, 1038421. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1038421>
- Liu, P., Wang, L., & Yu, H. (2024). Polyploid giant cancer cells: origin, possible pathways of formation, characteristics, and mechanisms of regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1410637. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1410637>
- Liu, W., Wang, B., Zhou, M., Liu, D., Chen, F., Zhao, X., & Lu, Y. (2023). Redox Dysregulation in the Tumor Microenvironment Contributes to Cancer Metastasis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 39(7–9), 472–490. <https://doi.org/10.1089/ars.2023.0272>
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-10-0721>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Luthman, M., & Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21(26), 6628–6633. <https://doi.org/10.1021/bi00269a003>
- Lyssiotis, C. A., & Kimmelman, A. C. (2017). Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cell Biology*, 27(11), 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>
- Ma, H., Gu, Z., & Wang, Z. (2026). Lactate and lactylation: metabolic architects of tumor progression and metastasis. *Cellular Oncology (Dordrecht, Netherlands)*, 49(2), 66. <https://doi.org/10.1007/s13402-026-01182-w>

- Ma, J., Zhang, Q., Chen, S., Fang, B., Yang, Q., Chen, C., Miele, L., Sarkar, F. H., Xia, J., & Wang, Z. (2013). Mitochondrial Dysfunction Promotes Breast Cancer Cell Migration and Invasion through HIF1 α Accumulation via Increased Production of Reactive Oxygen Species. *PLoS ONE*, 8(7), e69485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069485>
- Ma, Y., Wang, L., & Jia, R. (2020). The role of mitochondrial dynamics in human cancers. *American Journal of Cancer Research*, 10(5), 1278–1293.
- MacLeod, A. K., McMahon, M., Plummer, S. M., Higgins, L. G., Penning, T. M., Igarashi, K., & Hayes, J. D. (2009). Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1–NRF2 pathway, and not the BACH1–NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis*, 30(9), 1571–1580. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp176>
- Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W., & Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(1–2), 303–315. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3>
- Marusyk, A., Janiszewska, M., & Polyak, K. (2020). Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell*, 37(4), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007>
- Mashima, T., Seimiya, H., & Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100(9), 1369–1372. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605007>
- Masson, N., & Ratcliffe, P. J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & Metabolism*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3>
- McCarty, M. F., & Whitaker, J. (2010). Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 15(3), 264–272.
- Menegon, S., Columbano, A., & Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 22(7), 578–593. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.002>
- Micallef, P., Wu, Y., Bauzá-Thorbrügge, M., Chancelón, B., Vujičić, M., Peris, E., Ek, C. J., & Asterholm, I. W. (2021). Adipose tissue—breast cancer crosstalk leads to increased tumor lipogenesis associated with enhanced tumor growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11881. <https://doi.org/10.3390/ijms222111881>
- Mihajlović, J., Pechlivanoglou, P., Miladinov-Mikov, M., Živković, S., & Postma, M. J. (2013). Cancer incidence and mortality in Serbia 1999–2009. *BMC Cancer*, 13(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-18>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Moindjie, H., Rodrigues-Ferreira, S., & Nahmias, C. (2021). Mitochondrial metabolism in carcinogenesis and cancer therapy. *Cancers*, 13(13), 3311. <https://doi.org/10.3390/cancers13133311>

- Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Feldman, N. B., & Lutsenko, S. V. (2018). ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research*, *52*(5), 507–543. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, *129*(4), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Moraes, J. A., Encarnação, C., Franco, V. A., Xavier Botelho, L. G., Rodrigues, G. P., Ramos-Andrade, I., Barja-Fidalgo, C., & Renovato-Martins, M. (2021). Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles and the Tumor Microenvironment: Revisiting the Hallmarks of Cancer. *Cancers*, *13*(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/cancers13133328>
- Morgenstern, C., Lastres-Becker, I., Demirdöğen, B. C., Costa, V. M., Daiber, A., Foresti, R., Motterlini, R., Kalyoncu, S., Arioiz, B. I., Genc, S., Jakubowska, M., Trougakos, I. P., Piechota-Polanczyk, A., Mickael, M., Santos, M., Kensler, T. W., Cuadrado, A., & Copple, I. M. (2024). Biomarkers of NRF2 signalling: Current status and future challenges. *Redox Biology*, *72*, 103134. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103134>
- Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., & Kaneda, Y. (2012). Essential Role for miR-196a in Brown Adipogenesis of White Fat Progenitor Cells. *PLoS Biology*, *10*(4), e1001314. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001314>
- Mukawera, E., Chartier, S., Williams, V., Pagano, P. J., Lapointe, R., & Grandvaux, N. (2015). Redox-modulating agents target NOX2-dependent IKK ϵ oncogenic kinase expression and proliferation in human breast cancer cell lines. *Redox Biology*, *6*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.010>
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49064–49073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407715200>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial Thiols in Antioxidant Protection and Redox Signaling: Distinct Roles for Glutathionylation and Other Thiol Modifications. *Antioxidants & Redox Signaling*, *16*(6), 476–495. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4289>
- Nabi, K., & Le, A. (2021). *The Intratumoral Heterogeneity of Cancer Metabolism*, *1311*, 149–160. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_11
- Nasrallah, C. M., & Horvath, T. L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *10*(11), 650–658. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.160>
- Nelson, K. K., & Melendez, J. A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(6), 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.008>
- Neri, D., & Supuran, C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, *10*(10), 767–777. <https://doi.org/10.1038/nrd3554>
- Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, *19*(16), 4309–4314. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1424>
- Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S., & Yoshida, T. (2003). Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *American*

- Numprasit, W., Yangngam, S., Prasopsiri, J., Quinn, J. A., Edwards, J., & Thuwajit, C. (2023). Carbonic anhydrase IX-related tumoral hypoxia predicts worse prognosis in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, 10, 1087270. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1087270>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Oberley, T. D. (2002). Oxidative damage and cancer. *American Journal of Pathology*, 160(2), 403–408. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64857-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64857-2)
- Ong, C. H. C., Lee, D. Y., Lee, B., Li, H., Lim, J. C. T., Lim, J. X., Yeong, J. P. S., Lau, H. Y., Thike, A. A., Tan, P. H., & Iqbal, J. (2022). Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX (CAIX) protein is an independent prognostic indicator in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 24(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01532-0>
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M. M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J., & Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 191(6), 1141–1158. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007152>
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409–30412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
- Padder, R. A., Bhat, Z. I., Ahmad, Z., Singh, N., & Husain, M. (2021). DRP1 Promotes BRAFV600E-Driven Tumor Progression and Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.592130>
- Paek, J., Lo, J. Y., Narasimhan, S. D., Nguyen, T. N., Glover-Cutter, K., Robida-Stubbs, S., Suzuki, T., Yamamoto, M., Blackwell, T. K., & Curran, S. P. (2012). Mitochondrial SKN-1/Nrf Mediates a Conserved Starvation Response. *Cell Metabolism*, 16(4), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.007>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169.
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., & Ryan, M. T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Reports*, 12(6), 565–573. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.54>
- Paré, M., Darini, C. Y., Yao, X., Chignon-Sicard, B., Rekima, S., Lachambre, S., Virolle, V., Aguilar-Mahecha, A., Basik, M., Dani, C., & Ladoux, A. (2020). Breast cancer mammospheres secrete Adrenomedullin to induce lipolysis and browning of adjacent adipocytes. *BMC Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07273-7>
- Parks, S. K., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9), 611–623. <https://doi.org/10.1038/nrc3579>

- Patiar, S., & Harris, A. L. (2006). Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocrine-Related Cancer*, 13(Supplement 1), S61–S75. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01290>
- Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23), 3984–4001. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7153–7164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942>
- Pilkis, S. J., & Granner, D. K. (1992). Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 885–909. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.004321>
- Potter, M., Newport, E., & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1499–1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5)
- Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., & Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, 31(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1128/MCB.01204-10>
- Radde, B. N., Ivanova, M. M., Mai, H. X., Alizadeh-Rad, N., Piell, K., Van Hoose, P., Cole, M. P., Muluangwi, P., Kalbfleisch, T. S., Rouchka, E. C., Hill, B. G., & Klinge, C. M. (2016). Nuclear respiratory factor-1 and bioenergetics in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 347(1), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.006>
- Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
- Rashida, Z., & Laxman, S. (2021). The pentose phosphate pathway and organization of metabolic networks enabling growth programs. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100390. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100390>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

- Ren, Y., & Shen, H.-M. (2019). Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox Biology*, 25, 101154. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101154>
- Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., Stephens, J. M., *et al.* (2000). *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction*. PMID: 32255578
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell*, 4(4), 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80211-7)
- Ross, D., & Siegel, D. (2017). Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00595>
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., & Capaldi, R. A. (2004). Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Research*, 64(3), 985–993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1101>
- Roy, K., Wu, Y., Meitzler, J. L., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Antony, S., & Doroshov, J. H. (2015). NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science*, 128(12), 863–875. <https://doi.org/10.1042/CS20140542>
- Rybinska, I., Mangano, N., Tagliabue, E., & Triulzi, T. (2021). Cancer-Associated Adipocytes in Breast Cancer: Causes and Consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3775. <https://doi.org/10.3390/ijms22073775>
- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrc3803>
- Sandstrom, P. A., & Buttke, T. M. (1993). Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4708–4712. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4708>
- Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(5), 867–874. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.867>
- Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal*, 279(15), 2610–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>
- Sarmiento-Salinas, F. L., Delgado-Magallón, A., Montes-Alvarado, J. B., Ramírez-Ramírez, D., Flores-Alonso, J. C., Cortés-Hernández, P., Reyes-Leyva, J., Herrera-Camacho, I., Anaya-Ruiz, M., Pelayo, R., Millán-Pérez-Peña, L., & Maycotte, P. (2019). Breast cancer subtypes present a differential production of reactive oxygen species (ROS) and susceptibility to antioxidant treatment. *Frontiers in Oncology*, 9, 480. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00480>
- Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., Console, L., & Indiveri, C. (2017). Glutamine Transport and Mitochondrial Metabolism in Cancer Cell Growth. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00306>
- Scarpulla, R. C. (2008). Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 321–334. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.006>
- Schug, Z. T., Peck, B., Jones, D. T., Zhang, Q., Grosskurth, S., Alam, I. S., Goodwin, L. M., Smethurst, E., Mason, S., Blyth, K., McGarry, L., James, D., Shanks, E., Kalna, G., Saunders, R. E., Jiang, M., Howell, M., Lassailly, F., Thin, M. Z., ... Gottlieb, E. (2015). Acetyl-CoA Synthetase 2 Promotes Acetate Utilization and Maintains Cancer Cell Growth under Metabolic Stress. *Cancer Cell*, 27(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.002>

- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, *454*(7207), 961–967. <https://doi.org/10.1038/nature07182>
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* *148*(3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Serrano, J. J., & Medina, M. Á. (2025). Metabolic Reprogramming at the Edge of Redox: Connections Between Metabolic Reprogramming and Cancer Redox State. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(2), 498. <https://doi.org/10.3390/ijms26020498>
- Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of Lipid Research*, *48*(6), 1253–1262. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700005-JLR200>
- Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M., & D'Agostino, D. P. (2014). Cancer as a metabolic disease: Implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, *35*(3), 515–527. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt480>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, *360*(1), 1. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., Ito, K., & Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55296-3>
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(13), 8735–8741. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, *11*, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh, B., Ronghe, A. M., Chatterjee, A., Bhat, N. K., & Bhat, H. K. (2013). MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *34*(5), 1165–1172. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt026>
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., & van der Blik, A. M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(8), 2245–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Song, X., Wang, X., Liu, Z., & Yu, Z. (2020). Role of GPX4-Mediated Ferroptosis in the Sensitivity of Triple Negative Breast Cancer Cells to Gefitinib. *Frontiers in Oncology*, *10*, 597434. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.597434>
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., & Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(12), 3930–42. <https://doi.org/10.1172/JCI36843>

- Soysal, S. D., Tzankov, A., & Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3–4), 142–152. <https://doi.org/10.1159/000430499>
- Spaans, S. K., Weusthuis, R. A., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M. (2015). NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*, 6, 742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00742>
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell*, 104(4), 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00240-9)
- Sporn, M. B., & Liby, K. T. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 564–571. <https://doi.org/10.1038/nrc3278>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Stylianopoulos, T. (2017). The Solid Mechanics of Cancer and Strategies for Improved Therapy. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139(2), 10.1115/1.4034991. <https://doi.org/10.1115/1.4034991>
- Su, F., Hu, X., Jia, W., Gong, C., Song, E., & Hamar, P. (2003). Glutathion s transferase π indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *Journal of Surgical Research*, 113(1), 102–108. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00200-2)
- Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- Suzuki, T., & Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>
- Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and Time. *Cancer Research*, 72(19), 4875–4882. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2217>
- Swanton, C., Bernard, E., Abbosh, C., André, F., Auwerx, J., Balmain, A., Bar-Sagi, D., Bernards, R., Bullman, S., DeGregori, J., Elliott, C., Erez, A., Evan, G., Febbraio, M. A., Hidalgo, A., Jamal-Hanjani, M., Joyce, J. A., Kaiser, M., Lamia, K., ... Hanahan, D. (2024). Embracing cancer complexity: Hallmarks of systemic disease. *Cell*, 187(7), 1589–1616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.009>
- Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
- Taguchi, K., & Yamamoto, M. (2017). The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 85. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00085>
- Taguchi, K., & Yamamoto, M. (2020). The KEAP1–NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. *Cancers*, 13(1), 46. <https://doi.org/10.3390/cancers13010046>
- Ten, A., Kumeiko, V., Farniev, V., Gao, H., & Shevtsov, M. (2024). Tumor Microenvironment Modulation by Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *Cells*, 13(8), 682. <https://doi.org/10.3390/cells13080682>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>

- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, *164*(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, *29*(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(7), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>
- Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, C. C., & Stoffel, M. (2012). MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nature Cell Biology*, *14*(12), 1330–1335. <https://doi.org/10.1038/ncb2612>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, *27*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Urbańska, K., & Orzechowski, A. (2019). Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms20092085>
- Uslu, C., Kapan, E., & Lyakhovich, A. (2024). Cancer resistance and metastasis are maintained through oxidative phosphorylation. *Cancer Letters*, *587*, 216705. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216705>
- Van Schaftingen, E., Jett, M. F., Hue, L., & Hers, H. G. (1981). Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(6), 3483–3486. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3483>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, *324*(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vander Heiden, M. G., Locasale, J. W., Swanson, K. D., Sharfi, H., Heffron, G. J., Amador-Noguez, D., Christofk, H. R., Wagner, G., Rabinowitz, J. D., Asara, J. M., & Cantley, L. C. (2010). Evidence for an Alternative Glycolytic Pathway in Rapidly Proliferating Cells. *Science*, *329*(5998), 1492–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1188015>
- Vasan, K., Werner, M., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metabolism*, *32*(3), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.019>
- Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, *599*(6), 1745–1757. <https://doi.org/10.1113/JP278810>
- Verrax, J., Pedrosa, R., Beck, R., Dejeans, N., Taper, H., & Calderon, P. (2009). In Situ Modulation of Oxidative Stress: A Novel and Efficient Strategy to Kill Cancer Cells. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(15), 1821–1830. <https://doi.org/10.2174/092986709788186057>
- Vilchis-Landeros, M. M., Vázquez-Meza, H., Vázquez-Carrada, M., Uribe-Ramírez, D., & Matuz-Mares, D. (2024). Antioxidant Enzymes and Their Potential Use in Breast Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(11), 5675. <https://doi.org/10.3390/ijms25115675>
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, *166*(3), 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*(10), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>

- Wang, F., Gao, S., Chen, F., Fu, Z., Yin, H., Lu, X., Yu, J., & Lu, C. (2014). Mammary fat of breast cancer: Gene expression profiling and functional characterization. *PLoS ONE*, *9*(10), e109742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109742>
- Wang, J., He, Y., Hu, F., Hu, C., Sun, Y., Yang, K., & Yang, S. (2024). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22), 12223. <https://doi.org/10.3390/ijms252212223>
- Wang, K., Jiang, J., Lei, Y., Zhou, S., Wei, Y., & Huang, C. (2019). Targeting Metabolic–Redox Circuits for Cancer Therapy. *Trends in Biochemical Sciences*, *44*(5), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.001>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, *123*(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*, *21*(3), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
- Watson, C. J., & Khaled, W. T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, *135*(6), 995–1003. <https://doi.org/10.1242/dev.005439>
- Weinberg, F., & Chandel, N. S. (2009). Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(23), 3663–3673. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0099-y>
- Weinhouse, S. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science*, *124*(3215), 267–269. <https://doi.org/10.1126/science.124.3215.267>
- Weydert, C. J., Waugh, T. A., Ritchie, J. M., Iyer, K. S., Smith, J. L., Li, L., Spitz, D. R., & Oberley, L. W. (2006). Overexpression of manganese or copper–zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radical Biology and Medicine*, *41*(2), 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.015>
- Willems, P. H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, C. E. J., Murphy, M. P., & Koopman, W. J. H. (2015). Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metabolism*, *22*(2), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.006>
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, *82–83*, 969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., Van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Wu, K. C., Cui, J. Y., & Klaassen, C. D. (2011). Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicological Sciences*, *123*(2), 590–600. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr183>
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0778-6>
- Wu, W.-S. (2007). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, *25*(4), 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9037-8>

- Xing, J., Qi, L., Liu, X., Shi, G., Sun, X., & Yang, Y. (2022). Roles of mitochondrial fusion and fission in breast cancer progression: a systematic review. *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02799-5>
- Xing, Y., Zhao, S., Zhou, B. P., & Mi, J. (2015). Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment. *The FEBS Journal*, 282(20), 3892–3898. <https://doi.org/10.1111/febs.13402>
- Xu, S., Chen, T., Dong, L., Li, T., Xue, H., Gao, B., Ding, X., Wang, H., & Li, H. (2021). Fatty acid synthase promotes breast cancer metastasis by mediating changes in fatty acid metabolism. *Oncology Letters*, 21(1), 27. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12288>
- Yalcin, A., Clem, B. F., Simmons, A., Lane, A., Nelson, K., Clem, A. L., Brock, E., Siow, D., Wattenberg, B., Telang, S., & Chesney, J. (2009). Nuclear Targeting of 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) Increases Proliferation via Cyclin-dependent Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24223–24232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016816>
- Yang, D., Li, Y., Xing, L., Tan, Y., Sun, J., Zeng, B., Xiang, T., Tan, J., Ren, G., & Wang, Y. (2018). Utilization of adipocyte-derived lipids and enhanced intracellular trafficking of fatty acids contribute to breast cancer progression. *Cell Communication and Signaling*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0221-6>
- Yoo, H., Stephanopoulos, G., & Kelleher, J. K. (2004). Quantifying carbon sources for de novo lipogenesis in wild-type and IRS-1 knockout brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 45(7), 1324–1332. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400031-JLR200>
- Yu, T., & Di, G. (2017). Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research*, 29(3), 237–252. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2017.03.10>
- Zakic, T., Pekovic-Vaughan, V., Cvoro, A., Korac, A., Jankovic, A., & Korac, B. (2023). Redox and metabolic reprogramming in breast cancer and cancer-associated adipose tissue. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14794>
- Zhan, L., Cao, H., Wang, G., Lyu, Y., Sun, X., An, J., Wu, Z., Huang, Q., Liu, B., & Xing, J. (2016). Drp1-mediated mitochondrial fission promotes cell proliferation through crosstalk of p53 and NF- κ B pathways in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(40), 65001–65011. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11339>
- Zhang, S., Mercado-Uribe, I., Xing, Z., Sun, B., Kuang, J., & Liu, J. (2014). Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*, 33(1), 116–128. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.96>
- Zhang, X., Sui, S., Wang, L., Li, H., Zhang, L., Xu, S., & Zheng, X. (2020). Inhibition of tumor propellant glutathione peroxidase 4 induces ferroptosis in cancer cells and enhances anticancer effect of cisplatin. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4), 3425–3437. <https://doi.org/10.1002/jcp.29232>
- Zhao, C., Wu, M., Zeng, N., Xiong, M., Hu, W., Lv, W., Yi, Y., Zhang, Q., & Wu, Y. (2020). Cancer-associated adipocytes: Emerging supporters in breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01666-z>
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W., & Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814–4824. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.494>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.201>

BIOGRAFIJA AUTORA

Tamara D. Zakić rođena je 24.02.1996. godine u Pančevu. Osnovne akademske studije je upisala 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, koje je završila 2019. godine sa prosečnom ocenom 9,77. Master akademske studije je upisala 2019. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Biologija ćelija i tkiva, koje je završila 2020. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Ćelijska i molekularna onkologija.

Od 2020. godine je zaposlena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, a potom kao istraživač saradnik od 2022. godine. Od 2022-2025. godine bila je učesnik na projektu IDEJE, #7750238, REFRAME Fonda za nauku Republike Srbije.

Član je Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju. Član je Evropskog društva Society for Free Radical Research – Europe, evropskog društva European Society for Mitochondrial Research and Medicine (E-mit), Srpskog društva za ekstracelularne vezikule i Društva za neuronauke Srbije. Dobitnik je nagrade za najbolje mlade istraživače na međunarodnom skupu Society for Free Radical Research – Europe. Samostalno ili kao koautor objavila je devet radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M21), časopisima od međunarodnog značaja (M22) i međunarodnim časopisima (M23), jedan rad u istaknutom nacionalnom časopisu (M52), kao i dvadeset četiri saopštenja sa međunarodnih skupova. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, jedan u M21a kategoriji, jedan u M23 kategoriji.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара Закић

Број индекса Б3006/2020

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Структурно и редокс репрограмирање туморског и придруженог масног ткива мишева са
функцијски утишаним NRF2 у ортотопском моделу канцера дојке

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Закић

Број индекса Б3006/2020

Студијски програм Биологија

Наслов рада Структурно и редокс репрограмирање туморског и придруженог масног ткива мишева са функцијски утишаним NRF2 у ортотопском моделу канцера дојке

Ментор др Александра Јанковић, научни саветник,

Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања

„Синиша Станковић”-Институт од националног значаја за

Републику Србију

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структурно и редокс репрограмирање туморског и придруженог масног ткива мишева са функцијски утишаним NRF2 у ортотопском моделу канцера дојке

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.