

# Patofiziološko značenje metaboličkih promjena u solidnim tumorima

---

Penić-Grgaš, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:587982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Helena Penić-Grgaš**

**Patofiziološko značenje metaboličkih promjena  
u solidnim tumorima**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Maje Sirotković-Skerlev, dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## POPIS I POJAŠNJENJE KORIŠTENIH KRATICA

2-HG – 2-hidroksiglutarat

ABCA1 – transporter iz ABC obitelji

ACC – acetil-CoA karboksilaza

ACLY – ATP citrat liaza

ACSL – acetil-CoA sintetaza

AMACR – alfa-metilacil-CoA racemaza

AML – akutna mijeloična leukemija

AMPK – AMP-aktivirana protein kinaza

AR – receptor za androgene

ATGL – engl. *adipose triglyceride lipase*

ATP – adenzin tri fosfat

BMI – indeks tjelesne mase, od engl. *body mass indeks*

BRCA1 – engl. *breast cancer susceptibility gene 1*

CAA – raku pridruženi adipociti, engl. *cancer associated adipocytes*

CAD2 - karbamoil-fosfat sintetaza 2

CAF – raku pridruženi fibroblasti, od engl. *cancer-associated fibroblasts*

CAV1 – kaveolin

CE – kolesterol ester

c-Myc – onkogen

COX-2 – ciklooksigenaza 2

COX4 – citokrom c oksidaza podjedinica 4

CSC – tumorska matična stanica, engl. *cancer stem cell*

DAG – diacilglicerol

DEC1 – transkripcijski represor, od engl. *differentially expressed in chondrocytes-1*

E2 – estrogen

E2F – E2 faktor (transkripcijski faktor)

EGFR – receptor za epidermalni čimbenik rasta, od engl. *epidermal growth factor receptor*

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

ER – estrogenski receptor

ERK – engl. *extracellular regulated kinase*

ERR $\alpha$  – engl. *estrogen-related receptor alpha*

ESI – engl. *electrospray ionization*

F-2,6-BP – fruktoza-2,6-bifosfat

FA – masna kiselina, engl. *fatty acid*

FABP – engl. *fatty acid-binding protein*

FADH<sub>2</sub> – flavin adenin dinukleotid

FASN – sintaza masnih kiselina, engl. *fatty acid synthase*

FFA – slobodna masna kiselina, engl. *free fatty acid*

FGF – fibroblastni čimbenik rasta, od engl. *fibroblast growth factor*

FGFR – receptor za fibroblastni čimbenik rasta, od engl. *fibroblast growth factor receptor*

FH – fumarat hidrataza

G6P – glukoza 6 fosfat

G6PD – glukoza 6 fosfat dehidrogenaza

GC – plinska kromatografija, od engl. *gas chromatography*

GLS – glutaminaza

GLUT – glukozni transporteri

GS – glutamin sintaza

HER2 – engl. *human epidermal growth factor 2*

HIF – hipoksijom inducirani faktor

HK – heksokinaza

HLA – humani leukocitni antigen

HMGCR – 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA receptor

HMGCS – 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA sintaza

HSL – hormon osjetljiva lipaza

hZIP – cink transporter

IDH – izocitrat dehidrogenaza

IGFR – engl. insulin-like growth factor 1 receptor

Il-6 – interleukin 6

INSR – receptor za inzulin

LC – tekućinska kromatografija, od engl. *liquid chromatography*

LDHA – laktatna dehidrogenaza A

LPA – lizofosfatidinska kiselina

LPL – lipoprotein lipaza

MALDI – engl. *matrix-assisted laser desorption/ ionization*

MAPK – engl. *mitogen-activated protein kinase*

MCT – monokarboksilatni transporter, od engl. *monocarboxylate transporter*

MDM2 – engl. *mouse double minute 2 homolog*

MDMX – poznat kao MDM4

MIC - engl. *metastasis initiating cells*

MMP9 – matriks metaloproteinaza 9

MS – masena spektrofotometrija

mTOR – od engl. *mammalian target of rapamycin*

MX11 – engl. *max interactor 1*

NADH – nikotin adenin dinukleotid

NADPH – reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NaN<sub>3</sub> – natrijev azid

NFκB – nuklearni čimbenik, od engl. *Nuclear Factor κB*

NK – prirodno ubilačke stanice, od engl. *Natural Killer*

NMR – nuklearna magnetska rezonanca

NO – dušikov oksid

NSD2 – histon-lizin-N-metiltransferaza

OXPHOS – oksidativna fosforilacija

PDH – piruvat dehidrogenaza

PDH – piruvat dehidrogenaza

PDK1 – piruvat dehidrogenaza kinaza 1

PFK1 – fosfofruktokinaza 1

PGC1 – engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*

PGE2 – prostaglandin E2

PHGDH – 3-fosfoglicerat dehidrogenaza

PI3K - Phosphatidilinozitol 3-kinaze

PKM2 – piruvat kinaza M2

PPAR $\gamma$  – engl. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*

PPP – pentoza fosfatni put

PRPS2 - fosforibozil pirofosfataza

PTEN - fosfataza i tenzin homolog, od engl. *phosphatase and tensin homolog*

Rb- retinoblastoma protein (tumor supresor)

ROS – reaktivni kisikovi radikali, od engl. *reactive oxygen species*

S1P - sfingozin-1-fosfat

SAM – S-adenozilmetionin

SCD – steraoil-CoA desaturaza

SDH – sukcinat dehidrogenaza

SELDI – engl. *surfaced-enhanced laser desorption/ionization*

SREBP – engl. *sterol regulatory element-binding protein 1* (transkripcijski faktor)

TAG – triacilglicerol

TCA – ciklus limunske kiseline, od engl. *tricarboxylic acid cycle*

TGF $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta beta, od engl. *transforming growth factor beta*

TIGAR – engl. *TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator*

TNBC – trostruko negativni rak dojke, od engl. *triple-negative breast cancer*

TOF – engl. *time of flight*

VLDLR – engl. *very-low-density-lipoprotein receptor*

A-KG – alfa ketoglutarat

$\omega$ -3 PUFA - omega-3 polinezasićena masna kiselina



Sadržaj

SAŽETAK

SUMMARY

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>BIOLOGIJA TUMORA – OSAM KLJUČNIH ZNAČAJKI.....</b>	<b>2</b>
2.1	Nekontrolirana proliferacija – samosignalizacija.....	2
2.2	Neosjetljivost na antiproliferativne signale.....	3
2.3	Izbjegavanje programirane stanične smrti – apoptoze. Autofagija – protu- i pro-tumorski mehanizam.....	3
2.4	Neograničeni diobeni potencijal – besmrtnost.....	4
2.5	Aktivacija angiogeneze.....	4
2.6	Invazivnost i metastaziranje.....	4
2.7	Izbjegavanje imuno-posredovanog uništenja.....	4
2.8	Metaboličke promjene.....	5
<b>3.</b>	<b>METABOLOMIKA.....</b>	<b>6</b>
3.1	Tijek istraživanja u metabolomici.....	7
3.2	Analitičke metode.....	9
<b>4.</b>	<b>METABOLIČKE PROMJENE S NAGLASKOM NA TUMORE DOJKE I PROSTATE.....</b>	<b>11</b>
4.1	Metabolizam glukoze.....	12
4.1.1	Normalne stanice.....	12
4.1.2	Maligne stanice – „Warburgov efekt“ i “reverzni Warburgov efekt“.....	12
4.1.3	Što pokreće promjene u metabolizmu glukoze?.....	14
4.1.4	Tumori dojke – posebnosti u metabolizmu glukoze i genetske promjene ovisno o podtipu.....	17
4.1.5	Tumori prostate.....	18
4.2	Metabolizam aminokiselina.....	19
4.2.1	Metabolizam glutamina: uloga i regulacija.....	19
4.2.2	Metabolizam drugih aminokiselina.....	22

4.2.3	Tumori dojke.....	23
4.2.4	Tumori prostate.....	23
4.3	Metabolizam lipida.....	24
4.3.1	Normalne stanice.....	25
4.3.2	Maligne stanice.....	25
4.3.3	Tumori dojke.....	28
4.3.4	Tumori prostate.....	30
<b>5.</b>	<b>METABOLIČKE PROMJENE U POJEDINIM STADIJIMA BOLESTI.....</b>	<b>31</b>
5.1	Intrinzični stadij – Warburgov efekt.....	31
5.2	Deadhezija.....	32
5.3	Interakcija sa stromalnim stanicama.....	32
5.4	Kasni stadij.....	32
<b>6.</b>	<b>TERAPIJSKE IMPLIKACIJE PROMIJENJENOG METABOLIZMA – PRIMJERI.....</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>35</b>
<b>8.</b>	<b>ZAHVALE.....</b>	<b>36</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>53</b>

## Sažetak

### Patofiziološko značenje metaboličkih promjena u solidnim tumorima

Helena Penić-Grgaš

Metaboličke promjene u tumorima prepoznate su kao jedna od ključnih značajki tumora. Rezultat su genskih promjena protoonkogeni i tumor supresori. Produkti i supstrati metaboličkih reakcija, male molekule, metaboliti i predmet su interesa jedne od mlađih među „omikama“ – metabolomikama. Metabolomika je našla svoju primjenu u različitim znanostima i granama medicine, a jedno od posebnog područja interesa su maligne bolesti. Predstavlja koristan „alat“ u razvoju spoznaja o tumorskoj biologiji, razvoju novih tumorskih biljega i terapija. Bavi se identifikacijom i kvantifikacijom metabolita u tjelesnim uzorcima te njihovim ulogama i međusobnim odnosima u metaboličkim putevima. Osnovne platforme u metabolomici su masena spektrofotometrija i nuklearna magnetska rezonancija. Integracijom spoznaja iz metabolomike i drugih „omika“ dobivamo uvid u interakciju genoma i okoliša, a rezultat tih odnosa najbolje se očituje u metabolomu. Složene interakcije rezultiraju promjenama u metabolizmu osnovnih skupina hranjivih tvari – ugljikohidrata, aminokiselina i lipida. Prikazana je patofiziologija metaboličkih promjena po skupinama osnovnih hranjivih tvari, uz istaknute posebnosti u metabolizmu četiriju podtipova tumora dojke te tumora prostate. Osobine tumorskog metabolizma koreliraju s genskim abnormalnostima tumora i određene metaboličke promjene odlika su agresivnijih tipova tumora. Opisane su najvažnije genske promjene koje imaju za posljedicu promijenjenu ekspresiju i aktivnost metaboličkih enzima te način kako njihova aktivnost doprinosi tumorskom rastu. Metabolizam tumora nije stacionaran u vremenu i prostoru, mijenja se tijekom četiri osnovna stadija u razvoju tumora u skladu s promijenjenim potrebama za energijom i građivnim jednicama. Razlike u metabolizmu tumorskih i normalnih stanica koriste se za razvoj novih protu-tumorskih lijekova i vrijedna su nadopuna klasičnim oblicima liječenja.

Ključne riječi: metabolomika, rak dojke, rak prostate, regulacija

## Summary

### Pathophysiological significance of metabolic changes in solid tumors

Helena Penić-Grgaš

Metabolic changes are recognized as one of cancer's hallmarks. They are a result of changes in proto-oncogenes and tumor suppressors. Metabolites are products and substrates of metabolic reactions, and also, a field of interest among one of the youngest of „omics“ – metabolomics. Metabolomics found its use in various sciences and fields of medicine, and one of the main fields of interest are malignant diseases. It is a useful tool in gathering knowledge about tumor biology, development of new tumor biomarkers and therapies. Metabolomics identifies and quantifies metabolites in biospecimens, and determines their functions and interconnectivity in metabolic pathways. The main platforms in metabolomics are mass spectrophotometry and nuclear magnetic resonance. Due to integration of knowledge from metabolomics and other omics, we are getting an insight in the interaction of genome and environment, best reflecting in metabolome. Complex interactions result in changes in main nutrient metabolism – carbohydrates, aminoacids and lipids. Pathophysiology of metabolic changes is shown separately in every nutrient group, with an emphasis on special metabolic features of four breast cancer subtypes and prostatic cancer. Metabolic features of tumors correlate with genetic abnormalities and some of them are hallmarks of aggressive tumors. The most important genetic changes and their contribution to tumor growth are described. They lead to altered expression and activity of metabolic enzymes. Tumor metabolism is not stationary in time and space, it is changing through four main stages in tumor development in accordance with altered energy demands and building units. Differences in the tumor and normal cells metabolism are used in the development of new anti-tumor drugs, which are a valuable addition to classic modes of treatment.

Keywords: metabolomics, breast cancer, prostatic cancer, regulation

## 1. UVOD

Rak je 2. po redu uzrok smrti u razvijenom svijetu pa tako i kod nas. Prema GLOBOCAN-u u 2018. je broj novih slučajeva raka u svijetu približno 18,1 milijun, a broj umrlih od raka približno 9,6 milijuna (1). Učestalost pojedinih tipova malignih novotvorina se razlikuje, a težište ovog rada bit će na dva hormon-ovisna tumora. Rak dojke i rak prostate i čine globalni zdravstveni problem čemu u prilog govore sljedeće brojke: relativni udio novih slučajeva raka prostate je 7,6 %, a dojke 11,6 %. Rak dojke predstavlja najučestaliji rak u žena prema incidenciji, s 2.09 milijuna novih slučajeva, a za rak prostate procjenjuje se da će biti 2. po redu u muškaraca s 1,28 milijuna novih slučajeva u 2018 i 5. po smrtnosti. U relativnom udjelu smrti od raka, rak prostate nosi 3,8 %, a dojke 6,6 % (1). U Hrvatskoj podaci iz 2017. zdravstveno-statističkog ljetopisa svrstavaju rak prostate i rak dojke među 10 vodećih uzroka smrti po spolovima, s brojevima umrlih i relativnim udjelima: 785 (3 %) za rak prostate i 853 (3,1 %) za rak dojke (2). Razlozi za epidemiju ovih tumora nisu u potpunosti poznati no određeni rizični čimbenici mogu se povezati s modernim načinom života (3,4).

S obzirom na globalni značaj bolesti i njezinu izrazitu kompleksnost, razvila su se nova područja u znanosti koja omogućuju individualni pristup bolesti i bolesniku. Tumori su primjer bolesti kod koje je najizraženija potreba za onime što zovemo „precizna“ medicina. U tom pogledu, razvile su se znanosti poznate kao „omike“: genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika i epigenomika (5). Ove znanosti omogućuju shvaćanje biologije tumora i izradu njegova profila ili „osobne karte“ te povezivanje patofizioloških promjena s fenotipom tumora (6). U modernoj onkologiji, integracijom svih „omika“ proučavamo utjecaj genetskih, metaboličkih promjena i okolišnih utjecaja koji su međusobno neodvojivi i premreženi pa je takav pristup u proučavanju tumora najispravniji. Iz takvog pristupa proizlazi neopisivo mnoštvo podataka o događajima na substancičnoj razini i nužnost njihova integriranja. Posljedično bilježimo procvat bioinformatičkih znanosti kao danas neizostavne komponente modernih istraživanja u biomedicinskim područjima (7).

Sofisticirana istraživanja već se desetljećima pokušavaju približiti tumorima, njihovim uzrocima i značajkama. Sve je više evidentno kako je tumor raznolika bolest no određene su se značajke iskristalizirale kao zajedničke svim tumorima ili barem većini. Te stupnjevite promjene u procesu karcinogeneze opisali su znanstvenici Hanahan i Weinberg u svojem poznatom radu „The hallmarks of cancer“ 2000 (8).

## **2. BIOLOGIJA TUMORA – OSAM KLJUČNIH ZNAČAJKI**

Kontrola staničnog ciklusa velikim se dijelom ostvaruje djelovanjem proteinskih produkata dviju velikih skupina gena: protoonkogeni i antionkogeni. Njihova deregulacija rezultira stupnjevitim procesom razvoja tumora kojeg nazivamo tumorigeneza. U svome radu 2000. su Hanahan i Weinberg opisali 6 ključnih promjena, odnosno značajki u tumorskoj stanici koje diktiraju tumorski rast. To su: poremećaji staničnog ciklusa - samodostatnost u signaliziranju rasta, neosjetljivost na antiproliferativne signale, izbjegavanje apoptoze, neograničeni diobeni potencijal, sposobnost pokretanja angiogeneze te invazivnost i mogućnost metastaziranja. 2011. isti su autori objavili novi rad „Hallmarks of cancer: the next generation“ (9) u kojem su opisali još dvije važne značajke tumora, a to su: izbjegavanje imunološkog uništenja i metaboličke promjene te dvije karakteristike koje djeluju permisivno na stjecanje osam nabrojanih značajki – upala i genetska nestabilnost. Upravo su metaboličke promjene u tumoru potakle razvoj metabolomike. Uz pridodane značajke, prepoznata je važnost heterogenosti tumorskog tkiva i međugigre stanica tumora i ostalih stanica, odnosno tumorski „mikrookoliš“ kao aktivni sudionik tumorigeneze i progresije bolesti.

### **2.1 Nekonrolirana proliferacija - samosignalizacija**

Normalne stanice imaju svojstvo kontroliranog umnažanja sa svrhom održavanja normalne funkcije i arhitekture tkiva, osobito u procesu rasta ili ozljede. Osnovu čine interakcija faktora rasta i staničnih receptora za te faktore koji spadaju najčešće u tirozin kinazne receptore. Kaskada unutarstaničnih događaja dalje dovodi do promjena u stanici koje su potrebne za proces stanične diobe.

S druge strane, tumorske stanice imaju izraženu karakteristiku, a to je – samodostatnost u signaliziranju i posljedična nekontrolirana proliferacija. Genetsku podlogu za to svojstvo čini neadekvatno aktiviranje protoonkogeni koji tada postaju onkogeni. Njihovi proteinski produkti pripadaju sljedećim skupinama bjelančevina: čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, Ras-proteini i protein-kinaze (postreceptorska signalizacija), antiapoptotički proteini i proteini jezgre (10). Proces neadekvatne signalizacije tumorska stanica ostvaruje na nekoliko načina i tri osnovne razine poremećaja – čimbenik rasta, receptor i postreceptorski signalni put. Ovisno o odnosu izvora čimbenika rasta i stanice na koju oni djeluju, razlikujemo autokrino (ista stanica je izvor i cilj djelovanja čimbenika rasta), parakrino (čimbenik rasta djeluje na okolne stanice) te jukstakrino signaliziranje (čimbenik rasta djeluje na susjedne stanice). Primjer autokrinog signaliziranja u tumorima je proizvodnja vlastitih signalnih molekula, primjerice koekspresija FGF-a 1,2 i 9 i njihovih receptora u nesitnostaničnom raku

pluća (11). Primjer parakrinog te jusktrakrinog signaliziranja čine netumorske stanice poput tumoru pridruženih fibroblasta (engl. *cancer associated fibroblast* – CAF) i upalnih stanica (protumorski makrofazi) koje djeluju na stanice tumora, a u tome se očituje važnost tumorskog mikrookoliša u patogenezi (12,13). Povećanje broja receptora tj. „senzitivacija“ stanice primjerice FGFR i EGFR receptora u već spomenutom raku pluća (11), konformacijske promjene receptora i posljedično prijenos signala neovisno o prisutnosti čimbenika rasta čine 2. razinu. Postreceptorske promjene u signalnim putevima također su ligand-neovisne i čine 3. razinu. Primjere čine Raf-MEK-MAP kinazni put te PI3/Akt/mTOR putevi (14).

## **2.2 Neosjetljivost na antiproliferativne signale**

Genetsku osnovu za ovo svojstvo čini gubitak aktivnosti tumor-supresora. Oni svoje učinke ostvaruju na kontrolnim točkama u staničnom ciklusu osiguravajući ispravan proces replikacije. Integriraju intracelularne i ekstracelularne signale i određuju daljnju sudbinu stanice. U stanici djeluju kao antiproliferacijski čimbenici, ali i kao proapoptotički proteini te enzimi koji sudjeluju u procesu popravka DNA. Najpoznatiji primjer tumor-supresorskog gena je p53 koji je promijenjen s posljedičnim gubitkom funkcije u oko polovice svih karcinoma (15). Drugi važan mehanizam koji djeluje antiproliferativno u normalnim uvjetima je kontaktna inhibicija. Primjer toga je  $\alpha$ -katenin, protein koji djeluje kao tumor-supresor, važan za ostvarenje mehanizma kontaktne inhibicije a ostvaruje i druge protu-tumorske učinke suprimiranjem Wnt signalne kaskade (16).

## **2.3 Izbjegavanje programirane stanične smrti – apoptoze. Autofagija – protu i protumorski mehanizam.**

Apoptoza je važan protutumorski mehanizam kojim se nastoji spriječiti daljnje dijeljenje stanica čija je DNA značajno oštećena i ne može se popraviti. Jedan od glavnih regulatora je gen p53 koji odlučuje o sudbini stanice – popraviti ili pokrenuti apoptotičke mehanizme (9,17,18). Poznati primjer gena koji koči apoptozu je gen Bcl-2. Pojačani izražaj bjelančevine Bcl-2 rezultira nakupljanjem stanica, a ne pojačanom proliferacijom, s rezultatnim neto povećanjem tumorske mase u folikularnom limfomu (18). Autofagija je također obrambeni mehanizam stanice i načelno jednaki stresovi mogu prouzročiti aktiviranje ovog mehanizma i apoptoze. Razlika je u razini stresogenog čimbenika koji djeluje u manjim razinama za pokretanje autofagije. Ipak, taj je mehanizam ovisan o kontekstu. Nutritivna deprivacija u tumoru i određeni lijekovi poput Rapamycina (m-TOR inhibitor) stavljaju autofagiju u kontekst protektivnog čimbenika (19,20). O povezanosti Rapamycina i autofagije bit će riječi kasnije u tekstu.

## **2.4 Neograničeni diobeni potencijal - besmrtnost**

Diobeni potencijal normalnih stanica ograničen je duljinom telomera na DNA. Enzim zaslužan za njihovo produljenje i posljedično, neograničen diobeni potencijal je telomeraza koja je pojačano aktivna u 85-90 % svih malignih tumora (8) prema (Shay and Bacchetti, 1997). Pojačana aktivnost tog enzima odgovorna je za svojstvo koje nazivamo besmrtnost. Pod tim pojmom podrazumijevamo dvije stvari: izbjegavanje krize tj. stanične smrti - apoptoze i izbjegavanje starenja tj. vijabilnog, ali nereplikativnog stanja. Kao i autofagija, aktivnost telomeraza može imati i pro i protu-tumorski učinak. U pre-maligim lezijama, telomeraze nisu još aktivne pa pojačana replikacija stanica dovodi veće sklonosti razvoju kromosomskih aberacija (9,21).

## **2.5 Aktivacija angiogeneze**

Angiogeneza je proces nužan za prehranu tumorskog tkiva i pokazalo se da se javlja vrlo rano u procesu tumorigeneze, još u stadiju mikroskopskih lezija pa čak i pre-maligim. Ključni aktivator je VEGF-A gen čija je ekspresija regulirana hipoksijom, okogenima (22), ali i metabolitima poput laktata (23).

## **2.6 Invazivnost i metastaziranje**

Gubitak adhezivnih veza među stanicama, pojačana mobilnost, aktivnost matriks-degradirajućih proteaza i povećana otpornost na pro-apoptotičke čimbenike, značajke su invazivnosti. Sumu ovih promjena u svojstvima stanica nazivamo epitelno-mezenhimalnom tranzicijom, a važnu ulogu igra gubitak izražaja E-kadherina, odgovornog za povezivanje stanica (24,25). Napretkom invazivnih svojstava, neke stanice steknu sposobnost metastaziranja što je jedan je od mehanizama tumorskog prevladavanja nedostatnosti nutrijenata na primarnom području (26).

## **2.7 Izbjegavanje imuno-posredovanog uništenja**

Tumorske stanice posjeduju niz prilagodbi koje im omogućuju da postanu „neprepoznatljive“ imunom sustavu i posljedičnom uništenju. Primjerice, izostanak predočavanja epitopa i smanjen izražaj HLA molekula (26). S druge strane, tumorske stanice mogu djelovati imunosupresivno na citotoksične stanice lučenjem TGF- $\beta$  (27) ili velikih količina laktata (23,28,29). Treći način je regrutiranje imunoregulatornih T stanica i posebnog tipa makrofaga M2, također moguće putem laktata (27,30,31). Štoviše, stanice imunomog



sustava, mogu imati pro-tumorsko djelovanje, već opisanim menahizmom parakrinog lučenja čimbenika rasta. Stoga, upala, uz genetsku nestabilnost, čini pogodnu okolinu koja djeluje permisivno na rast tumora (9).

## 2.8 Metaboličke promjene

Prije gotovo stotinu godina Otto Warburg pokazao je kako tumorsko tkivo i u aerobnim uvjetima koristi manje učinkovit način dobivanja energije, a to je glikoliza (32). Njegovo je tumačenje bilo postojanje nefunkcionalnih „krnjih“ mitohondrija u tumorskoj stanici (33,34), što se kasnije pokazalo netočnim. Pravi razlog visoke zastupljenosti aerobne glikolize kao glavnog metaboličkog puta u tumorima jest dobivanje velikog broja metabolita koji služe kao gradbene jedinice za izgradnju makromolekula, i posljedično tome, održavanje visokog stupnja proliferacije (35). Naime glikoliza je glavni ulazni put glukoze u metabolizam, a od njega se granaju druge, lateralne, metaboličke grane: put pentozna fosfata, put heksozamina, monokarbonski put, put sinteze lipida... Osim sinteze gradbenih makromolekula, ti metabolički putevi imaju i u reguliranju redoks statusa, održavanjem reduciranog oblika NADPH, važnog za snižavanje ROS-a (engl. *reactive oxidative species*) u stanici (23,36). Osim promijenjenog metabolizma glukoze, tumori pokazuju i promjene u drugim područjima: kao što je to metabolizam aminokiselina i lipida. Glutamin je najviše korištena aminokiselina s brojnim ulogama (37), a neki tumori poput trostruko negativnog raka dojke (TNBC) (38,39) i glioblastoma (39,40) koriste glutamin uz bok s glukozom i pokazuju „glutaminsku ovisnost“ bez obzira što se radi o neesencijalnoj aminokiselini (41). Hipoteza „krnjih“ mitohondrija napuštena je, jer sinteza makromolekula velikim dijelom započinje u mitohondriju iz intermedijera TCA, a i neke tumorske stanice koriste prvenstveno oksidativni metabolizam (23). Primjerice, stanice karcinoma prostate oksidiraju masne kiseline (42,43). Unutar tumora postoji izražena heterogenost koja se odnosi na tipove stanica i njihov metabolizam. Tako stanice, ovisno o genskoj ekspresiji, udaljenosti od krvnih žila, dostupnosti nutrijenata i parakrinim signalima dobivenim od okolnih stanica prvenstveno koriste glikolizu ili prvenstveno oksidativni metabolizam. Uz to, u nekim se tumorima očituje pojava metaboličke simbioze, kako među tumorskim tako i između tumorskih stanica i stanica strome. Ono što je za jednu stanicu „otpadni produkt“, laktat, za drugu je stanicu gorivo koje će oksidirati u mitohondrijima. Takva se pojava naziva „reverzni Warburgov efekt“ (44–47). U podlozi metaboličkih promjena u tumorima stoji narušena ravnoteža međudjelovanja tumor supresora i onkogeni (23,35). Pokazalo se da glavni tumor supresorski gen p53 suprimira glikolitički put, a potiče oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS). Njegov gubitak rezultira promoviranjem glikolitičkog puta i supresijom OXPHOS-a (48,49). Mutacije gena koji kodiraju metaboličke enzime (IDH, SDH, FH), ustvari

su mnogo rjeđe zastupljene i u manjini tumora pridonose metaboličkim promjenama (50). Rezultat njihove promijenjene aktivnosti su onkometaboliti sa svojim specifičnim doprinosom tumorigenezi (51,52). Specifičnost metabolizma tumora nije samo rezultat genetskih promjena, važan utjecaj imaju: dostupnost kisika i nutrijenata, izloženost kemoterapiji i radioterapiji, histološko podrijetlo, interakcija s okolnim stanicama i gradus tumora (50). Metaboličke promjene pojedinih nutrijenata detaljnije će biti opisane u odlomcima 4.1, 4.2 i 4.3.

### **3. METABOLOMIKA**

Pojam i koncept uveo je Oliver 1998. (53). Usmjerena je na identifikaciju i kvantifikaciju metabolita u tjelesnim tekućinama, stanicama ili staničnim odjeljcima (54). Radi se o malim molekulama, veličine do 1500 Da, a njihov skup naziva se metabolom. On je mnogo dinamičniji i podložniji različitim utjecajima od genoma, transkriptoma i proteoma. Za razliku od nukleinskih kiselina i proteina koji imaju gotovo jedinstveno utvrđenu strukturu i fizikalno-kemijska svojstva, svojstva metabolita uvelike se razlikuju, a mnogi od njih očituju se nestabilnošću zbog čega je nemoguće jednom metodom analizirati sve metabolite (55,56). Druga značajka je „sveprisutnost“, odnosno metaboliti nisu strogo vezani za jedan put ili proces. Posljedično, razine pojedinih metabolita utječu na razine drugih metabolita jer su produkti jednog metaboličkog puta supstrati drugoga i obratno.

To svojstvo nameće potrebu za točnom identifikacijom patološki promijenjenog metaboličkog puta, a veliku ulogu u praćenju i identifikaciji odigrala je primjena molekula obilježenih stabilnim izotopima. Takav pristup omogućuje profiliranje razine aktivnosti pojedinog metaboličkog puta u stanici jer prati korištenje obilježene molekule u pojedinom putu (57). Također, nekoliko gena koji rezultiraju produkcijom nekoliko različitih proteina koji su funkcionalno povezani s razinom proučavanog metabolita (npr.enzimi), mogu za posljedicu imati promjene u razini jednog metabolita. Iz toga proizlazi da ne postoji izravna i jednostavna veza između genoma, transkriptoma i proteoma s jedne strane te metaboloma s druge strane (53). Ova interakcija nije jednosmjerna. Isto tako, metaboliti utječu na gensku ekspresiju. Tako je na primjer u tumorima dojke često pojačana ekspresija MYC onkogen. Jedna od zabilježenih posljedica je povećanje razine onkometabolita 2-hidroksiglutarata koji utječe na pojačanu metilaciju histona i posljedično gensku ekspresiju i diferencijaciju stanice (58,59). Proučavanje odnosa unutar metaboloma vrlo je kompleksno i stoga se postavlja pitanje: zašto ga uopće proučavati? Upravo zbog podložnosti metaboloma utjecajima iz svih smjerova, on odlično korelira s funkcionalnim promjenama u stanici. On je „most“ između genotipa i fenotipa. Upravo je integriranjem s drugim „omikama“ i primjenom informatičke tehnologije moguće

dobiti uvid u to kako je primjerice zbog promjene u genomu došlo do promjene u razini pojedinog metabolita (55). Metabolomika pruža uvid u prirodu bolesti i moguće terapijske intervencije. Zahvaljujući tome pronađeni su novi lijekovi koji predstavljaju nadopunu klasičnoj citotoksičnoj i radioterapiji. Isto tako, „stari“ dobro poznati lijekovi dobivaju nove uloge, primjerice metformin i antilipemici imaju ulogu u liječenju tumora (20,60,61). Metaboliti predstavljaju idealne biomarkere u tjelesnim tekućinama jer su izravno povezani s trenutnim promjenama u tumoru, za razliku od klasičnih tumorskih biljega koji su uglavnom povezani s ekspresijom određenog gena i stoga nisu tako dinamični i ne predstavljaju pravu sliku aktivnosti bolesti. Metaboliti, s druge strane, pružaju mogućnost detektiranja mikrometastatske bolesti (62–64).

### 3.1 Tijek istraživanja u metabolomici

Tijek istraživanja u metabolomici možemo analizirati kroz devet koraka:

1. Istraživačko pitanje: Određivanje profila tumora? Utjecaj mutiranog gena na metabolizam? Biomarkeri: Probir? Dijagnoza? Praćenje bolesti? Praćenje terapijskog učinka? Istraživanje lijeka? (65,66)
2. Odabir tipa i veličine uzorka:
  - a. Tip uzorka: stanične kulture i uzorci tkiva za istraživanje potencijalnih lijekova i biologije tumora, tjelesne tekućine za biomarkere. Mogu se koristiti sve tjelesne tekućine: krv, urin, likvor, slina, suze, zglobova tekućina... (57,62)
  - b. Veličina uzorka: Potrebna veličina ovisi o subjektu iz kojeg je uzorak dobiven i njegovoj prirodnoj varijabilnosti (za uniformne stanične kulture ili klonske linije laboratorijskih životinja znatno je manji potreban uzorak nego za istraživanja na ljudima). Pokazalo se da razine određenih metabolita u ljudi značajno variraju ovisno o dobi, spolu, rasi, BMI-u, hranjenju i stanju velikih organskih sustava (jetra i bubrezi) (67,68). Ovisi o istraživačkom pitanju: istraživanje ponašanja tumora in vitro u kulturi zahtjeva svega nekoliko uzoraka, istraživanje potencijalnih metabolita za metode probira u ljudi i epidemiološka istraživanja zahtjeva i nekoliko tisuća uzoraka zbog velike varijabilnosti i značaja na razini opće populacije. Ovisi o tome koliko je istraživano svojstvo ili promjena suptilna odnosno izražena (65,66).
3. Sakupljanje i pohrana uzoraka: ovaj korak je iznimno važan i potrebno je koristiti standardizirane procedure i obnašati ih jednako među svim ispitanicima. Primjerice, kod uzimanja uzoraka krvi potrebno je koristiti isti antiokoagulans za sve uzorke (67). Razine pojedinih metabolita nerijetko se mijenjaju ovisno o dobu dana, tjelesnoj aktivnosti i

uzimanju obroka. Kako bi se minimizirali ti utjecaji, savjetuje se npr. uzorke krvi uzimati na tašte. Razine metabolita u urinu mogu pokazivati još veća dnevna odstupanja pa se preporuča sakupljanje 24-satnog urina kako bi se uprosječile vrijednosti dobivene tijekom jednog dana. Uzorci se zamrzavaju na – 80 stupnjeva, a kraće vrijeme tijekom sakupljanja dnevne količine urina, pojedini se uzorak može pohraniti na 4 stupnja u hladnjak. Svaki uzorak poželjno je odijeliti u više malih kako bi se izbjeglo ponovno odmrzavanje i zamrzavanje (65,69).

4. Priprema uzorka: uobičajeni su postupci precipitacija proteina (PP) i ekstrakcija različitim otopinama (polarna otopina za polarne metabolite, a za nepolarne, lipide nepolarna ili kombinacija polarne i nepolarne otopine) (57). PP je nužna u pripremi krvne plazme i seruma s obzirom na veliku količinu proteina koji ulaze u interakciju s metabolitima putem hidrofobnih veza i mogu dovesti do supresije signala u kasnijoj analizi masenom spektrofotometrijom (70). S obzirom na razlike u polaritetu, metaboliti se ne mogu se analizirati istovremeno jednom metodom te je potrebno odvojiti najmanje dvije frakcije. Razvijeni su brojni protokoli i preporuke za ekstrakciju metabolita no ne postoji jedna najbolja metoda. Potrebno je uzeti u obzir razlike u pH, temperaturi i vrsti otapala. Najbolju „pokrivenost“ postićemo kombinacijom različitih kemijskih sredstava za ekstrakciju (71). Urin zahtjeva manje pripreme, a obično se dodaje ureaza kako bi se spriječila pojava „maskiranja“ drugih metabolita izdašnim metabolitom poput ureje (72). Urin nerijetko sadrži bakterije čije bi raspadanje uvjetovalo pojavu novih metabolita u uzorku koji narušavaju vjerodostojnost rezultata. Kako bi se to preveniralo, uzorak se može filtrirati i/ili mu se dodaje bakteriostatski agens poput NaN<sub>3</sub> (73). Uzorci tkiva zahtjevaju određene predkorake, a to su: usitnjavanje uzorka i metaboličko „utišavanje“, odnosno zaustavljanje enzimske aktivnosti. Taj je korak nužan ne bi li se spriječile naknadne promjene razine metabolita a postiže se na različite načine: primjenom topline, hladnoće, organskog otapala, baze ili kiseline (56,71).
5. Analitičke metode: masena spektrofotometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR)
6. Statističke metode: utvrđivanje statističkog značaja detektiranog signala
7. Identifikacija i validacija metabolita pretraživanjem dostupnih metabolomskih baza podataka ili utvrđivanje sasvim novog metabolita
8. Korištenje stabilnih izotopa uz analitičke metode i software analiza s ciljem istraživanja metaboličkih puteva. Pridavanje biološkog značaja identificiranom metabolitu.
9. Primjena stečenih znanja o identitetu, koncentraciji i ulozi metabolita u otkrivanju potencijalnih terapijskih meta i biomarkera.

### 3.2 Analitičke metode

Dvije su osnovne analitičke platforme: masena spektrofotometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonanca (NMR) i dva osnovna pristupa: ciljani („targeted“) i neciljani („untargeted“), odnosno globalni (55,65,74). Analitičke su metode međusobno komplementarne i svaka ima svoje prednosti i mane. Ciljani pristup analizi koristimo kada *a priori* znamo identitet metabolita, ali želimo saznati njihovu koncentraciju. Ovaj pristup koristi se i za validaciju *de novo* otkrivenog metabolita u globalnoj metabolomici (74). Globalni pristup koristi se kada je identitet metabolita u uzorku nepoznat.

#### 1. Masena spektrofotometrija

Analizi obično prethode metode separacije – tekućinska (LC) ili plinska (GC) kromatografija. Metode (LC-MS i GC-MS) su komplementarne i svakom od njim moguće je otkriti otprilike 500 metabolita i identificirati 150-250 njih. S obzirom su metode usmjerene na metabolite različitih fizikalno-kemijskih svojstava, gotovo da i nema preklapanja među otkrivenim metabolitima pa je kombinacijom obiju metoda moguće identificirati najveći broj različitih metabolita u uzorku (71).

LC-MS metoda je pogodna za molekule veće mase, termo-labilne, koje se mogu ionizirati. Prvi korak je separacija analita na kolumni, zatim ionizacija, analiziranje masa i specifičnih fragmenata ta detekcija. Ionizacija se postiže najčešće *electrospray* metodom (ESI), a ako to nije moguće, koristi se ionizacija atmosferskim tlakom, MALDI (engl. *matrix-assisted laser desorption/ ionization*) ili SELDI (engl. *surfaced-enhanced laser desorption/ionization*) metodom. Nakon ionizacije daljnja analiza ovisi o pristupu, ciljanom ili globalnom i prema tome se razlikuje i analizator. Za ciljani pristup koriste se uređaji niske rezolucije tzv. triple-quadrupole. Prva kvadrupolna cijev filtrira „roditeljski“ ion prema njegovoj masi, druga cijev fragmentira ion, a treća selektira dobivene fragmente koji putuju konačno prema detektoru. Specifičnost analize osigurana je tandem MS-om (MS/MS) (56,57). U globalnom pristupu potrebno je koristiti analizatore masa visoke rezolucije poput Orbitrap-a i TOF (engl. *time of flight*), oni se mogu koristiti i u ciljanom pristupu. Specifičnost koju metabolit pokazuje, očituje se kao signalni *peak*, a ovisi o njegovom retencijskom vremenu *t* na kolumni i omjeru mase i naboja (engl. *m/z ratio*) (56). Dobiveni signalni *peakovi* se u konačnici uspoređuju sa standardima (75). Poteškoće u analizi su ionska supresija i stvaranje adukata.

GC-MS metoda pogodna je za molekule male mase (manje od 400 Da), hlapljive, vodotopljive, termo-stabilne, nenabijene, koje se slabo ioniziraju ESI metodom (56,65). Pogodna je za kratkolančane masne kiseline i šećerne alkohole, sterole, šećeri i monofosforilirane šećere i hidroksi-kiseline. Prvi korak je derivatizacija, a zatim ionizacija (hard electron ili kemijska). Glavna poteškoća je raspadanje metabolita uzrokovano toplinom, a pojačana je kontaminacijom samog uređaja ili uzorka (56,76).

Posebnu skupinu čine direktne tzv. *high-throughput* metode, odnosno metode bez kromatografije i desorpcijske metode (77). Njihove su glavne prednosti niža cijena i veća brzina, ali je sama primjena ograničena.

## 2. Nuklearna magnetska rezonancijska (NMR) spektroskopija

Metoda komplementarna MS-u, detektira signal koji je proporcionalan broju jezgara u uzorku i na taj način pruža informaciju o kvantiteti i uvid u prostorne odnose (56,57). Priprema uzorka je znatno jednostavnija nego za MS, a sama je metoda nedestruktivna pa se isti uzorak može kasnije analizirati nekom drugom metodom poput MS-a (65,78). Pruža dinamičan prikaz („real time“) za razliku od MS-a i potpuno je neinvazivna. Reproducibilnost istraživanja i manja varijabilnost ovisna o instrumentima je važna prednost u odnosu na MS (78). Prikladna je za oslikavanje uzoraka obilježenih stabilnim izotopima o čemu će riječi biti kasnije, u sljedećem ulomku. Metoda je pogodna za in vivo i in vitro eksperimente/istraživanja. U tom pogledu NMR se pokazao korisnim za intraoperativni prikaz tumorskog tkiva i njegovo pouzdano razlikovanje od okolnog zdravog tkiva (79). Smatra se najpogodnijom metodom za globanu analizu urina u metabolomici (80). Nedostaci ove metode su: njezina cijena, manja „pokrivenost“ u pogledu broja detektabilnih metabolita, slaba prostorna rezolucija i slaba osjetljivost (57). Granična koncentracija za detekciju je reda veličine  $\mu\text{M}$  dok je za MS  $\text{pM}$  (56,63), a i potrebni su veći uzorci (65). Kod in vivo oslikavanja, problem smanjene osjetljivosti, još je izraženiji zbog različite magnetske permisivnosti tkiva. Tehnikom dinamičke nuklearne polarizacije, odnosno hiperpolarizacije moguće je kratkotrajno pojačati signal dobiven od npr.  $^{13}\text{C}$  više od 10,000 puta i učiniti ga detektabilnim. Najčešće korišten je hiperpolarizirani [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] piruvat. Unatoč potencijalno velike koristi, ova je metoda slabo dostupna i skupa (81,82).

## STABILNI IZOTOPI

Istraživanja bazirana na primjeni stabilnih izotopa pružila su jedinstven uvid u bogatu mrežu metaboličkih puteva u stanici i izvan nje. Za razliku od radoaktivnih, stabilni su izotopi sigurni za primjenu pa se mogu koristiti in vivo i in vitro i našli su primjenu u obje glavne platforme u metabolomici, MS i NMR (83). Proces počinje odabirom odgovarajućeg izotopa

ovisno o istraživačkom pitanju. Izotopom se obilježi metabolit od interesa i promatra njegova daljnja sudbine, ovisno o zastupljenosti aktivnosti pojedine reakcije (74,84). Ako želimo pratiti iskorištenje ugljika određene amino kiseline, koristit ćemo  $^{13}\text{C}$ , dok je  $^{14}\text{N}$  pogodan ako su reakcije transaminacije predmet interesa (85). Glavna prednost u odnosu na klasičnu MS je podatak o tome koliko određeni metabolički put/reakcija pridonosi konačnoj razini određenog metabolita. Dok je MS statička pretraga koja nam daje samo konačni rezultat, identitet i relativnu ili rjeđe apsolutnu koncentraciju, korištenjem stabilnih izotopa dobivamo odgovor na pitanje što je dovelo do te promjene. Stabilni izotopi pridaju određeni biološki značaj detektiranom metabolitu. Jednaka, primjerice povišena koncentracija metabolita u stanici, može biti posljedica pojačane aktivnosti sintetskog puta ili smanjene aktivnosti razgradnog puta. Stoga stabilni izotopi pružaju informaciju o relativnom odnosu tih puteva (engl. *steady state* eksperimenti) i o dinamici protoka metabolita u stvarnom vremenu (dinamički/kinetički eksperimenti) (74,84). Dodatna pogodnost je mogućnost apsolutne kvantifikacije korištenjem obilježenih standarda (56). Za pravilnu interpretaciju složenih podataka dobivenih ovakvim vrstama studija, nužna je pomoć bioinformatike. Postoje brojni dostupni alati i aplikacije slobodno dostupne korisnicima. Koriste se za detekciju, relativnu kvantifikaciju i za analizu metaboličkih puteva, a dostupne su i brojne baze podataka. Primjerice Cytoscape software (86) i Mummichong program <http://mummichog.org/> za analizu puteva te najopsežniji slobodno dostupan alat za cjelokupnu metabolomsku analizu podataka MetaboAnalyst 4.0 (87). Glavni problemi koji se javljaju uz primjenu stabilnih izotopa su manjak dostupnih standarda za sve metabolite i visoka cijena (56,65). Dodatna poteškoća može biti tzv. *exchange flux*. Radi se o pojavi koja je posljedica brzog odigravanja određenih reverzibilnih reakcija. Posljedično tome iako dolazi do neto-sekrecije metabolita izvan stanice, izotop može ostati „zarobljen“ u stanici i dovesti do pogrešne interpretacije rezultata (88).

Iz svega navedenog, možemo zaključiti kako istraživanje u metabolomici može biti vrlo složeno, ali rezultati takvog istraživanja mogu biti veoma informativni i nezamjenjivi. Najpotpunije rezultate možemo dobiti upotrebom nekoliko različitih prikladnih metoda, uz sustavno praćenje nove literature i savjeta stručnjaka na području metabolomike.

#### **4. METABOLIČKE PROMJENE S NAGLASKOM NA TUMORE DOJKE I PROSTATE**

U odlomku o osam ključnih značajki tumora ukratko je navedena suština metaboličkih promjena u tumorima i kako se metabolizam tumora mijenja ovisno o okolnostima u tumorskoj

stanici i okolišu. Prikazat ću patofiziologiju metaboličkih promjena na razini pojedinih osnovnih nutrijenata: glukoze, lipida i aminokiselina, uz osvrt na posebnosti tumora dojke i prostate. U zadnjem ću odlomku prikazati redosljed promjena ovisno o progresiji tumora i okolnostima u kojima se nalazi.

## 4.1 Metabolizam glukoze

### 4.1.1. Normalne stanice

Glukoza je osnovno gorivo za većinu stanica. Dobivanje energije, odnosno ATP-a odvija se u 3 kontinuirana procesa: glikoliza, ciklus limunske kiseline (TCA) i oksidativna fosforilacija (OXPHOS). Prolazak kroz staničnu membranu odvija se pomoću transportera GLUT koji su različito zastupljeni u tkivima. Kako bi glukoza ostala „zarobljena“ u stanici, enzim heksokinaza (HK) kovertira glukozu u anion glukoza-6-fosfat (G6P). To je prvi korak u procesu glikolize koja se sastoji od deset reakcija, a završni produkti su: dvije molekule piruvata i dvije molekule ATP-a po jednoj metaboliziranoj molekuli glukoze. U anaerobnim stanicama glikoliza je osnovni način dobivanja energije, dok će u aerobnim stanicama molekula piruvata ući u TCA. Prvi korak je pretvorba u acetil-CoA, katalizirana piruvat-dehidrogenazom (PDH). U nizu reakcija kojim se acetil-CoA oksidira do CO<sub>2</sub>, stvaraju se visoko energizirani elektroni nošeni putem NADH ili FADH<sub>2</sub> koji služe kao koenzimi za OXPHOS. Elektroni prolaze kroz komplekse u unutrašnjoj membrani mitohondrija sa NADH i FADH<sub>2</sub> na kisik. Oksidacijom u NAD i FAD dobivena je energija koja omogućava prijenos protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija pa je dobiveni protonski gradijent služi kao energetska pohrana. Kretanje protona natrag kroz membranu prema unutrašnjosti mitohondrija, čvrsto je povezano s konverzijom ADP-a u ATP. OXPHOS rezultira proizvodnjom 36 molekula ATP-a po molekuli glukoze što ga čini 18 puta učinkovitijim procesom od glikolize.

### 4.1.2. Maligne stanice – „Warburgov efekt“ i „reverzni Warburgov efekt“

Osnovna metabolička promjena u većini malignih stanica je „Warburgov efekt“ definiran kao povećano uzimanje glukoze, pojačana glikoliza i smanjena mitohondrijska funkcija. U osnovi se radi o procesu aerobne glikolize, odnosno preferiranja tog manje učinkovitog metaboličkog puta i u stanju dovoljne koncentracije kisika u okolini tumora. Taj je način dobivanja energije mnogo brži (89). Drugu prednost za tumorsku stanicu čini povećana proizvodnja intermedijera glikolitičkog procesa koji čine polazne točke za anaboličke puteve koji se „granaju“ od osnovnog procesa - glikolize. Na taj način stanica može održavati visok stupanj rasta i visok proliferacijski indeks. Primjerice G6P može ući u put pentozna fosfata konverzijom u ribozu-5-



fosfat pomoću enzima G6PD. Taj put omogućava sintezu nukleotida potrebnih za sintezu DNA te dobivanje NADPH koji je važan za sintezu masnih kiselina, prolina i zaštitu stanica od ROS-a (51). Drugi intermedijer koji čini polaznu točku za sintezu lipida je gliceraldehid-3-fosfat, odnosno dihidroksiaceton fosfat. Treći primjer je 3-fosfoglicerat koji je pomoću PHGDH konvertiran u serin, što čini ulazni put za sintezu glicina i folatni ciklus. Taj je ciklus ključan za sintezu purina, timidina i reakcije metilacije (23). Enzim PHGDH je često amplificiran u melanomu i tumorima dojke (90), ali i ostali enzimi biosintetskog puta serina, osobito u TNBC-u (91). Osim povećane sinteze prekursora, povećana glikoliza, a smanjena mitohondrijska oksidacija rezultira manjim razinama ROS-a i pridonosi besmrtnosti stanica što je pokazano u stanicama s pojačanom ekspresijom glikolitičkih enzima glukoza fosfat izomeraze i fosfoglicerat mutaze (92). Povećana aktivnost glikolitičkih enzima može imati i druge funkcije koje pridonose tumorskom rastu, neovisno o povećanom glikolitičkom obrtaju. Primjerice, glukoza fosfat izomeraza povećava motilitet stanice, a HK2 djeluje antiapoptotički (93). Rezultat pojačane glikolize je proizvodnja velikih količina laktata i acidoza tumorskog mikrokoliša. Laktat ima brojne uloge koje pridonose tumorskoj progresiji. Djeluje imunosupresivno, mijenja zastupljenost pojedinih tipova imunskih stanica u okolišu, povećavajući razinu T-regulatornih stanica i imunosupresivnih makrofaga (23,45,94,95). Također potiče angiogenezu, proizvodnju hijaluronske kiseline i TGF- $\beta$  (96). Na taj način potiče motilitet stanica i diferencijaciju u stanice s metastatskim potencijalom, proces poznat kao epitelno-mezehimalna diferencijacija (96). Zbog svojeg antioksidativnog djelovanja, laktat smanjuje terapijske učinke koji se zasnivaju barem djelomično na produkciji ROS-a, kao što je radioterapija (97). Štoviše, laktat može služiti kao gorivo za dobivanje energije u TCA u subpopulaciji stanica s dominantno oksidativnim metabolizmom (47,58,98). Zbog višestrukih uloga koje laktat ima u progresiji tumora i permisivnog djelovanja na tumorsku invaziju, u nekim ga tumorima smatramo markerom agresivnosti, metastatskog potencijala i lošeg ishoda, a tumori prostate (99), cerviksa (100) te tumori glave i vrata (101) neki su od primjera. Acidoza, koja je uglavnom posljedica povećane proizvodnje laktata, pridonosi tumorskoj invaziji povećavajući aktivnost proteolitičkih enzima, matriks metaloproteinaza (23), a djeluje i imunosupresivno svojim djelovanjem na NK i CD8+ stanice (95).

„Warburgov efekt“ nije zabilježen u svim stanicama tumora, već unutar tumora postoji izrazita heterogenost u metabolizmu između različitih subpopulacija stanica. Naime tumorske stanice mogu inducirati metaboličke promjene u okolnim fibroblastima koji poprimaju specifične značajke i nazivaju se CAFs (engl. *cancer associated fibroblasts*). Važnu ulogu u induciranju tih promjena ima ROS, točnije vodikov peroksid koji u fibroblastima uzrokuje smanjenje razine kaveolina-1. Također dolazi po povećanja razine HIF-1 i TGF $\beta$  koji su važni za brojne

fenotipske promjene u fibroblastima. Jedna od posljedica je povećana glikoliza u fibroblastima zbog stanja kojeg nazivamo „pseudohipoksija“ uzrokovana ROS. Stvoreni laktat fibroblasti izlučuju preko transportera MCT4, a tumorske stanice preuzimaju laktat putem MCT1 transportera i oksidiraju ga u TCA. Ovakva se pojava naziva „reverzni Warburgov“ efekt, a suradnja među stanicama metabolička simbioza s laktatnim šantom kao nositeljem te simbioze (13,45,58). Osim ROS, ulogu u pojavi metaboličkog reprogramiranja fibroblasta ima i IL-6 što je zabilježeno u tumorima prostate (102). Metabolička simbioza i laktatni šant zabilježeni su u više tipova tumora, primjerice tumorima glave i vrata (46), tumorima prostate (103), tumorskim matičnim stanicama u raku dojke (58) i u ER+ pozitivnim tumorima dojke (98).

#### 4.1.3. Što pokreće promjene u metabolizmu glukoze?

Pokretači metaboličkih promjena u stanicama raka su promijenjene aktivnosti onkogeni (AKT, MYC, RAS), tumor supresori (FH i SDH koji su ujedno i metabolički enzimi, p53), faktora kao što je HIF i mikroRNA (104,105). Treba naglasiti da su izvanstanični signali osnovni pokretači ulaska glukoze u stanice, a ne trenutno stanje energije u normalnim stanicama. S druge strane maligne stanice akumuliraju genske promjene što rezultira neovisnošću o izvanstaničnim podražajima (23). Glavni put regulacije metabolizma glukoze je PI3K/Akt/mTOR koji čini sjecište signala dobivenih iz izvanstaničnog matriksa i receptorskih tirozin kinaza. Akt kinaza, nazvana još „Warburgovom kinazom“ povećava ekspresiju transportera glukoze GLUT1 i glikolitičkih enzima uslijed stimulacije receptorskim kinazama. Važno je naglasiti da aerobna glikoliza potaknuta Akt-om ne rezultira smanjenom aktivnošću OXPHOS-a. Distalno u putu je mTOR kinaza koja također povećava aktivnost glikolitičkih enzima i ima centralnu ulogu. Osim toga, mTOR aktivira c-Myc i HIF-1 (89). Cijeli signalni put PI3K/Akt/mTOR može biti pojačano aktivan, bilo zbog konstitutivne aktivnosti Akt, bilo zbog gubitka njegovih negativnog regulatora, tumor supresorskog gena PTEN ili p53 koji djeluju na razini supresije PI3K (89). P53 upravo aktivacijom PTEN djeluje kao negativni regulator tog puta. Gubitak PTEN u tumorima prostate povezan je s razvijenim metastatskim potencijalom (106), a često nedostaje i u tumorima dojke (107). PI3K/Akt/mTOR put pojačano je aktivan u HER2+ tumorima dojke i luminalnim ER+ podtipovima raka dojke (98,107,108). Drugi važni onkogen u regulaciji metabolizma glukoze je MYC iako je njegovo dominantno djelovanje usmjereno na metabolizam glutamina, o čemu će riječ biti u drugom odlomku. C-Myc potencira transkripciju GLUT1/2/4, glikolitičkih enzima i MCT (89,109). Njegova pojačana aktivnost ili amplifikacija ima ulogu ponajviše u TNBC tumorima dojke, a nešto manje u HER2+ tumorima (98,110). MYC može aktivirati glikolitičke enzime, ali i mitohondrijsku oksidaciju, povećavajući na taj način proizvodnju ROS (104). U TNBC-u MYC inhibira protein koji inhibira glikolizu (111)

povećavajući i na taj način njezinu aktivnost. Najpoznatiji tumor supresor p53 uz svoje brojne uloge u održavanju integriteta genoma, preživljenju stanice, angiogenezi, autofagiji, epitelno-mezenhimalnoj tranziciji i osobito, staničnom ciklusu, starenju stanice i programiranoj staničnoj smrti ima ulogu i u regulaciji metabolizma stanice (48,105,112). P53 inaktivan je u oko 80% svih tumora, bilo mutacijom, bilo interakcijom s endogenim inhibitorima poput MDM2 i MDMX. Učinci se ponešto razlikuju ovisno o tome radi li se o mutaciji divljeg alela ili o inaktivaciji. P53 koji je proudukt aktivirajućih mutacija, tzv. GOF p53 (engl. *gain of function*) sudjeluje u transkripciji određenih gena koji nisu mete divljeg tipa. Primjerice, gena za enzim MMP9, odgovornog za sposobnost migracije tumorskih stanica. Stoga, aktivirajuće mutacije p53 povezujemo s agresivnijim tipovima tumora, u usporedbi s onima kod kojih je došlo do inaktivacije divljeg tipa (109,113). Neke od mutiranih formi povećavaju i glikolizu i OXPHOS, dok druge povećavaju glikolizu, a smanjuju OXPHOS (114). P53 može djelovati kao negativni regulator glikolize na više načina. Neizravno – inhibicijom PI3K/Akt/mTOR puta preko negativnih regulatora tog puta, kao što su AMPK i PTEN koji djeluju kao senzori metaboličkog stresa (89,115). Nadalje, divlji tip p53 inhibira aktivnost/ekspresiju HIF1 i MYC-a. Gubitkom njegove funkcije, dolazi do njihove pojačane aktivnosti i ekspresije. Izravno djelovanje ostvaruje represijom transkripcije transportera GLUT1 i GLUT4, indukcijom transkripcije TIGAR koji suprimira glikolitički enzim PFK1 snižavanjem razine F-2,6-BP (alosterički aktivator PFK1) i smanjuje stvaranje ROS (105,116). S obzirom da dolazi do prekida glikolize na razini PFK1, stvorena G6P je dostupna kao supstrat za G6PDH, ključni enzim PPP-a (također jedna od meta izravnog djelovanja p53). Posljedično pojačanoj aktivnosti PPP, povećava se sinteza nukleotida i NADPH za održavanje reduciranog oblika glutationa, kao zaštitnog mehanizma od ROS (109). P53 povećava aktivnost TCA i OXPHOS-a, a dio tog učinka ostvaruje povećanjem transkripcije citokrom c oksidaze 2 i potiče ulazak u respiratorni lanac (48,105). Snižuje razine MCT1 pa je stvoreni laktat u stanici, neophodno usmjeren u oksidativni metabolički put. U slučaju laktata unesenog u stanicu izvana, taj učinak ostvaruje povećanjem aktivnosti PDH (109). Sve u svemu, gubitak funkcije p53 rezultira obratnim slijedom događaja, povećanom glikolizom i smanjenim TCA i OXPHOS-a. TP53 mutacija javlja se u više od 80% tumora TNBC i HER2+ podtipu raka dojke (107). HIF-1 igra važnu ulogu u prilagodbi stanica na hipoksiju djelujući na transkripciju gena koji sudjeluju u diferencijaciji, apoptozi, preživljenju, angiogenezi i metabolizmu (105). Točnije, hipoksijom izazvano povećanje razine ROS-a, uzrokuje HIF-1 stabilizaciju (89). Sumarno djelovanje uključuje pojačanu glikolizu, a smanjen OXPHOS (117). Glavne mete djelovanja su transporteri GLUT1 i GLUT3 čime povećava ulazak glukoze u stanice. Pojačava aktivnost cijelog niza glikolitičkih enzima te pretvorbu piruvata u laktat djelovanjem na LDHA i njegovo izbacivanje iz stanice putem MCT4. Osim transporta laktata,

za održavanje primjerenog pH u stanicama, povećava NHE1 ekspresiju (Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> izmjenjivač). Supresiju mitohondrijske aktivnosti ostvaruje pozitivnim djelovanjem na PDK1 koji negativno regulira PDH, enzim ključan za ulazak piruvata u TCA te djelovanjem na MXI1 i COX4. Promovira mitofagiju, a s druge strane inhibira mitogenezu što pridonosi rezistenciji na apoptozu i terapiju. Pojačana glikoliza dodatno stabilizira HIF-1 i time se ostvaruje mehanizam povratne sprege (89,109). Međutim, hipoksija nije jedini stabilizator HIF-1. Upravo su genetičke promjene u tumorima ključne za njegovu aktivnost. Već je spomenut gubitak p53 i njegovog inhibitornog učinka. MDM2 (negativni regulator p53) također neovisno pridonosi HIF-1 aktivnosti (109). Nadalje, onkogeno signaliziranje pridonosi njegovoj stabilizaciji pa je to još jedan od načina kako onkogeni promiču glikolizu (89). U tumorima dojke, koji imaju povećanu ekspresiju MYC-a, povećane su razine onkometabolita 2-HG što je povezano s izraženim katabolizmom glutamina u tim tumorima. 2-HG djeluje inhibitorno na enzime koji sudjeluju u degradaciji HIF-1 što za posljedicu ima njegovu akumulaciju (58). MYC međutim ima dvojako djelovanje jer uz stabilizaciju HIF-1 i poticanje glikolize (i drugih puteva, primjerice glutaminolize), potiče i biogenezu mitohondrija stimulirajući na taj način OXPHOS i fenotip karakterističan za tumorske matične stanice (58,118). ROS, primjerice vodikov peroksid kojeg proizvode tumorske stanice raka dojke djeluje na okolne fibroblaste i u njima stabilizira HIF-1 i stimulira glikolizu (119). U novije vrijeme, prepoznata je i uloga nekodirajuće RNA kao regulatora raznih procesa u stanici, pa tako i metabolizma. Mikro RNA (mi-RNA) u određenim tumorima djeluju na glikolitičke enzime i transport glukoze. Primjerice, mi-R22 u karcinomu dojke, direktno se veže na GLUT1 i inhibira njegovo djelovanje i posljedično, glikolizu (120). Mi-R143 direktno smanjuje ekspresiju ključnog enzima glikolize, HK2, a smanjene razine te mi-RNA zabilježene su u nekim tumorima, između ostalog i tumorima dojke (121). S druge strane, signaliziranje putem mTOR smanjuje razine mi-R143 pa je to jedan od načina kako pojačana aktivnost tog puta djeluje u korist glikolize (122). Inhibicija glikolize putem mi-RNA u nekim je tumorima ostvarena indirektnim načinom, supresijom HIF-1 (89). Dugačkoj, nekodirajućoj RNA pridano je manje pažnje nego mi-RNA, no čini se kako i ona ima ulogu u regulaciji Warburgovog efekta. LINK-A (engl. *long intergenic non-coding RNA for kinase activation*) stabilizira HIF-1 u uvjetima normalne koncentracije kisika u TNBC-u, promičući na taj način aerobnu glikolizu (123). Ovo su samo neki od primjera važnih regulatora metabolizma glukoze s dominantnim djelovanjem na pojačanje glikolize. Iz svega navedenog očito je kako je cijela regulacija veoma složena i kako se svakim danom otkrivaju novi regulatori. Oni čine potencijalne terapijske mete no zbog njihove isprepletenosti i pleiotropnih učinaka, stvarna terapijska korist treba biti temeljito istražena.

#### 4.1.4. Tumori dojke – posebnosti u metabolizmu glukoze i genetske promjene ovisno o podtipu

Tumori dojke čine izrazito heterogenu skupinu tumora, različitog biološkog ponašanja i različitih terapijskih mogućnosti. Postoje različite podjele ovih tumora no u praksi je najčešće korištena receptorska podjela jer o izražaju receptora najviše ovisi terapijski pristup. Tri su glavne grupe prema toj podjeli: luminalni ER+, HER2+ i TNBC (124). ER+ tumori dojke čine najveći udio (70%), a možemo ih podijeliti na lumA koji je ER+ i HER2-, i lumB koji je ER+ i HER2+/- (125). Dominantno imaju oksidativni metabolizam, a kao gorivo koriste laktat dobiven iz okolnih fibroblasta (CAFs). Pokazuju reverzni Warburgov efekt koji je osnova metaboličke simbioze u tim stanicama (98). Imaju izraženu ekspresiju LDH koji konvertira preuzeti laktat u piruvat. Utjecaj estrogena na metabolizam glukoze u ER+ tumorima ovisan je o kontekstu. U stanju visoke koncentracije glukoze potiče glikolizu i suprimira TCA, u hipoksiji povećava ekspresiju GLUT1, 2 i 5 te razine HIF-1, u stanju normalne koncentracije regulira ravnotežu između glikolize i OXPHOS-a povećanjem razine PDH (126). U stanju niske koncentracije glukoze aktivira UTR/stresni put u endoplazmatskom retikulumu i izbjegava apoptozu, a potiče i autofagiju kao mehanizam preživljenja stanice u stanju deplecije nutrijenata (98). HER2+ tumori čine 15%, a TNBC 12% tumora dojke (125). U tim je tumorima izražen Warburgov efekt, najviše u TNBC koji je ujedno i najagresivniji. Ekspresija GLUT1 korelira sa stupnjem glikolize i agresivnošću tumora ER+<HER2+<TNBC (98,108). Navedeno potvrđuje ulogu Warburgovog efekta u održavanju visokog stupnja proliferacije tumora i karakteristika koje odražavaju tumorsku agresivnost i invazivnost, kao što su otpornost na hipoksiju, apoptozu, te imunsko izbjegavanje i terapijska rezistencija (36). Pokretači Warburgovog efekta u HER2+ tumorima su promjene na p53, MYC, PI3K, PTEN (58,98,108) te visoke razine HIF-1 čak i u normoksiji, što nije karakteristika drugih podtipova (127). TNBC rijetko pokazuje promjene na PI3K-u, ali ima visoku ekspresiju MYC-a, mutiran p53 i visoku ekspresiju EGFR-a (58,108). Pokazalo se da intermedijer glikolize, fruktoza-1,6-bisfosfat ima zanimljivu ulogu. Djelujući kao alosterički modifikator, veže se izravno na EGFR i povećava njegovu fosforilaciju. Posljedično, pojačava se dodatno glikoliza i sekrecija laktata (128). BRCA1 povezani tumori dojke često su TNBC i imaju lošu prognozu (129). Normalni, divlji tip BRCA1 inhibira glikolizu i potiče TCA te oksidativni metabolizam, smanjuje sintezu FA i aminokiselina, smanjuje aktivnost aromataze i posljedično razine estrogena te ekspresiju ER $\alpha$  (130,131). Mutirani tip rezultirat će pojačanom glikolizom, povećanim razinama E2 i ER $\alpha$  i IGFR te lakšom aktivacijom PI3K/Akt/mTOR signalnog puta drugim tvarima, poput cirkulirajućeg estrogena (58). Također su povišene razine ROS (132) i sposobnost autofagije (133). Zanimljiva je povezanost glikolize i rezistencije na tamoksifen. Rezistentne stanice imaju više razine HIF-1 i NSD2-a, a oni povećavaju metilaciju

promotora gena koji kodiraju glikolitičke enzime. Inhibicija tih enzima povećava osjetljivost na terapijske učinke tamoksifena (126).

#### 4.1.5. Tumori prostate

Tkivo prostate specifično je po tome što normalno pokazuje „Warburgov efekt“. Svrha toga je proizvodnja velikih količina citrata koje prostata luči u sjemenu tekućinu. Koncentracija citrata je 12 puta veća u prostati nego u plazmi. Kako se citrat ne bi oksidirao, nego izlučivao, prostata akumulira velike količine cinka (200 puta više koncentracije nego u plazmi) koji potom blokira mitohondrijski enzim m-akotinu i time oksidaciju citrata. S druge strane, tumorske stanice prestaju pokazivati „Warburgov efekt“. Počinju oksidirati citrat uslijed povećanih energetske potrebe. Smanjena akumulacija cinka ključan je događaj koji dovodi do oksidacije citrata (134). Jedan od razloga smanjene akumulacije cinka je epigenetski snižena razina transkripcijskog faktora AP2a odgovornog za transkripciju gena za transportere cinka hZIP1 i hZIP3 (135). Osim inhibicije m-akotinaze, cink ima i proapoptotički učinak, oslobađajući citokrom c iz mitohondrija i inhibirajući antiapoptotičko djelovanje NF- $\kappa$ B (136). Sve navedeno upućuje na protutumorsko djelovanje cinka u tumorima prostate (134). Citrat zadovoljava povećane energetske potrebe, no za proliferaciju i anaboličke procese potreban je dodatni izvor energije. Mogući izvor energije je laktat proizveden iz okolnih CAFs koji ujedno stimuliraju oksidativni metabolizam karcinomskih stanica te epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). Osnovni mehanizam djelovanja je inaktivacija enzima PKM2 pa takav neaktivan enzim odlazi u jezgru i dolazi u interakciju sa HIF1 $\alpha$  i DEC1, a posljedično dolazi do aktivacije EMT i OXPHOS-a (137). U stromalnim stanicama također može doći do gubitka tumor supresora p62 ili njegove smanjene ekspresije, potaknuto okolnim tumorskim stanicama. Gubitak tog gena dovodi do promjena na razini mTOR/c-Myc signalnog puta što u konačnici vodi ka povećanom lučenju proinflammatornog citokina IL-6 te TGF- $\beta$  koji promiču CAF fenotip te glikolizu tj. „Warburgov efekt“ u stromalnim stanicama (138). U metastatskom karcinomu prostate dolazi do potpunog obrtaja te se pojavljuje „Warburgov efekt“ slično kao u zdravim stanicama epitela prostate. Pretpostavljeni mehanizam u koštanim metastazama leži u interakciji s adipocitima CAA (engl. *cancer associated adipocytes*) koji možda potiču transkripciju HIF-1 i time glikolizu (139). Podloga manjeg dijela tumora prostate (20%) je kronična upala (140). Naime, analiza njihovog metabolizma pokazala je da oni već inicijalno pokazuju „Warburgov efekt“ što ih razlikuje od klasičnih tumora prostate. Moguće objašnjenje leži u sposobnosti proupalnog citokina TNF- $\alpha$  da inducira HIF-1 ovisno reprogramiranje metabolizma prema aerobnoj glikolizi (141).

## 4.2 Metabolizam aminokiselina

Maligne proliferirajuće stanice pokazuju promijenjen metabolizam aminokiselina, u odnosu na mirne, neproliferirajuće. Nekoliko je zajedničkih karakteristika (142):

- a) Povećano iskorištavanje aminokiselina i povećana ekspresija specifičnih transportera
- b) Povećana potreba za dušikom uslijed povećane biosinteze u proliferirajućim stanicama
- c) Povećana potrošnja specifičnih neesencijalnih aminokiselina dovodi do ovisnosti o egzogenim izvorima
- d) Promijenjena aktivnost enzima koji sudjeluju u metabolizmu aminokiselina

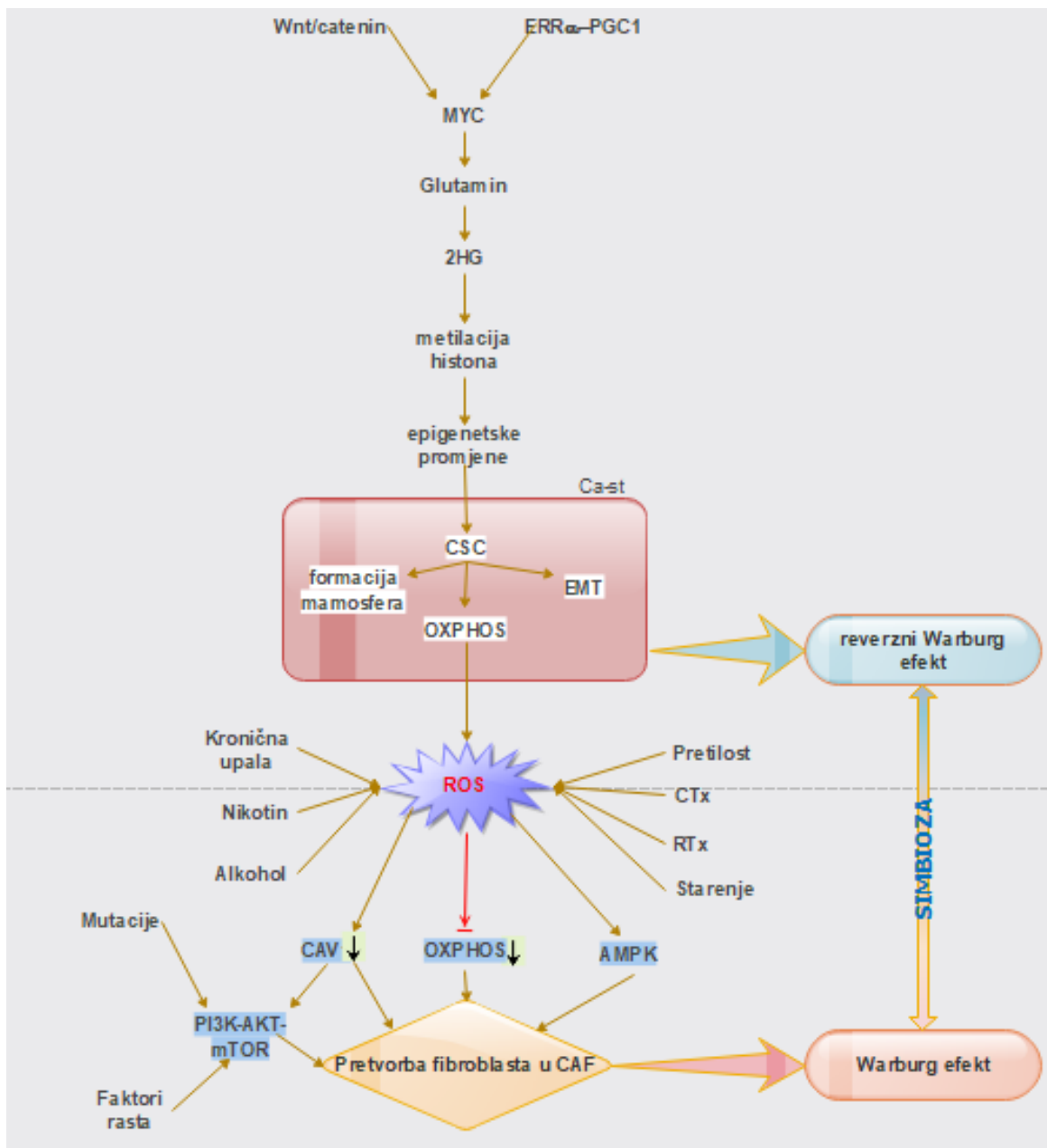
### 4.2.1. Metabolizam glutamina: uloga i regulacija

Najznačajnije promjene vidljive su u metabolizmu glutamina. Glutamin je najzastupljenija slobodna amino kiselina u ljudskoj krvi (52,143) i drugi je po redu najkorišteniji metabolit poslije glukoze, za većinu tumorskih stanica (40,52,143). Unatoč visokoj potrebi proliferirajućih stanica za ta dva nutrijenta, većina ugljika u staničnoj masi, porijeklom je od drugih aminokiselina, a ova dva nutrijenta imaju druge specifične uloge. Ugljik porijeklom iz glutamina i glukoze doprinosi svaki svega 5-10% suhe stanične mase (144). Glutamin ima važnu ulogu u intermedijernom metabolizmu, služeći u sintezi nukleotida, heksozamina i reakcijama glikozilacije, sintezi neesencijalnih aminokiselina, glutationa, a u dobrom dijelu malignih i nemalignih proliferirajućih stanica, glavni je supstrat TCA i izvor energije. Jedan je od izvora NADPH važnog za reakcije biosinteze i reduciranog oblika glutationa u čemu se očituje uloga u održavanju redoks-homeostaze (143). Unos esencijalnih aminokiselina odvija se preko antiportera u zamjenu za glutamin, a takav unos povezan je aktivacijom mTOR signalnog puta (41,110). Donor je dušika za sintezu nukleotida, NAD, asparagina i glukozamina (52). Glutamin je najviše iskorištavana aminokiselina u tumorima (143). Iako se radi o neesencijalnoj aminokiselini, visoka konzumacija glutamina čini ju uvjetno esencijalnom, a tumori pokazuju tzv. „glutaminsku ovisnost“, odnosno, ovise o vanjskim izvorima glutamina (39,41). Sudbina većine glutamina u stanici je konverzija u glutamat katalizirana glutaminazom. Glutamat se potom konvertira u  $\alpha$ -KG, što je katalizirano glutamat dehidrogenazom ili transaminazom, i tako ulazi u TCA i postaje izvor ATP-a (143). Pokazalo se da je metabolizam glukoze i glutamina ko-reguliran jer je u brzo-proliferirajućim stanicama, uz glikolizu, izraženo iskorištavanje glutamina kako bi se stvorio  $\alpha$ -KG, ušao u TCA i na taj način pogodovao daljnjoj sintezi intermedijera i proliferaciji (110,143). Rjeđe, u uvjetima hipoksije,  $\alpha$ -KG ulazi u proces reduktivne karboksilacije, što rezultira stvaranjem izocitrata i citrata za sintezu FA (52,110).

Stvoreni glutamat također je prekursor za sintezu glutationa. Neki tumori, poput glioma (145) i AML-a (146), pokazuju mutaciju enzima IDH2 što rezultira konverzijom  $\alpha$ -KG u 2-HG. Akumulacija 2-HG moguća je i bez navedene mutacije, a to je zabilježeno u tumorima koji pokazuju pretjeranu ekspresiju c-Myc, primjerice, TNBC i u nešto manjoj mjeri HER2+ tumori dojke (58,98,110). 2-HG jedan je od „onkometabolita“, a njegova akumulacija dovodi do kompetitivne inhibicije  $\alpha$ -KG-ovisnih dioksigenaza što posljedično dovodi do stabilizacije HIF-1 i do epigenetskih promjena. Jednu grupu tih enzima čine histonske demetilaze pa njihova inhibicija dovodi do hipermetilacije DNA i „utišavanja“ gena diferencijacije. Posljedično, dolazi do pojave fenotipa matičnih (engl. *stem-like phenotype*) i progenitornih stanica, koje karakterizira jačanje OXPHOS-a i EMT-a. Zaključno, c-Myc inducirane promjene u metabolizmu glutamina dovode do akumulacije onkometabolita 2-HG, što rezultira stabilizacijom HIF-1 i dediferencijacijom u CSC (engl. *cancer stem cell*) (58). Vidi sliku 1.

O regulaciji metabolizma glutamina mnogo se manje zna nego o regulaciji metabolizma glukoze. Ključnu ulogu u regulaciji glukoze igra PI3K/Akt/mTOR put, a nije se pokazao važnim u metabolizmu glutamina. S druge strane, c-Myc regulira metabolizam obiju molekula i ključan je za glutamin. Povećava ekspresiju transportera SLC1A5 i SLC7A5/SLC3A2. Povećava ekspresiju ključnih enzima biosinteze nukleotida što dovodi posljedično do pojačanog uzimanja glutamina, fosforibozil pirofosfataze (PRPS2) i karbamoil-fosfat sintetaze 2 (CAD2) (23). Nadalje, povećava ekspresiju glutamin sintaze (GS) i glutaminaze (GLS) (52). Pokazalo se da je ekspresija GLS povećana uslijed Myc-ovisne supresije mi-R23a i mi-R23b (147). Osim c-Myc, drugi važan regulator je Rb. Njegov gubitak dovodi do povećanog iskorištavanja glutamina zbog oslobađanja faktora E2F (148).





Slika 1. Metabolička simbioza CSC (engl. *cancer stem-cells*) i fibroblasta u tumoru dojke. Pod utjecajem Wnt/katenin i ERR $\alpha$ -PGC1 signaliziranja potaknute su MYC-inducirane promjene u metabolizmu glutamina i posljedične epigenetske promjene. MYC signaliziranje ključno je za razvoj CSC fenotipa kojeg karakteriziraju biogeneza mitohondrija (dodatno potaknuta ERR $\alpha$ -PGC1 signaliziranjem), oksidativni metabolizam, EMT i formiranje mamosfera. Adaptacija na OXPHOS postignuta je povećanom sintezom detoksifikacijskih enzima. CSC produciraju velike količine ROS-a u tumorskom okolišu. Same tumorske stanice su zaštićene od ROS, ali okolnim fibroblastima izaziva metaboličke promjene u smjeru pojačane glikolize i pretvorbu fibroblasta u miofibroblaste (mezenhimalno-mezenhimalna

tranzicija). U tom obrtaju ključnu ulogu ima smanjen izražaj CAV1 (kaveolin) pod utjecajem ROS, uz istovremenu pojačanu aktivnost PI3K/Akt/mTOR signalnog puta. Rezultat toga je pretvorba u fenotip CAFs uz visoku glikolitičku aktivnost, odnosno Warburgov efekt. Izlučeni laktat koriste CSC (reverzni Warburgov efekt). Povećane razine ROS rezultat su i brojnih okolišnih čimbenika, ne samo nus-proizvod tumorskih stanica.

Prema referenci (58);

© 2019 Helena Penić-Grgaš

#### 4.2.2. Metabolizam drugih aminokiselina

Iako su promjene u metabolizmu glutamina daleko najizraženije i dobro prepoznate kao značajka brojnih tumora, promjene se očituju i na metabolizmu drugih aminokiselina, a kao primjere navest ću arginin i serin.

Arginin je neesencijalna aminokiselina no u određenim tumorima dolazi do pojave auksotrofije, odnosno potrebe za vanjskom suplementacijom te aminokiseline. Primjeri tumora su TNBC (98), hepatocelularni karcinom i melanom (149). Objašnjenje u toj pojavi je epigenetsko stišavanje ekspresije ključnih sintetskih enzima. A koja je sama korist za tumorsku stanicu? Jedno objašnjenje leži u akumulaciji ornitina koji služi kao prekursor za sintezu poliamina koji su pokazali antiapoptotičko i pro-invazivno djelovanje u tumorima (150). Drugo je moguće objašnjenje nakupljanje aspartata koji je prekursor za sintezu nuleotida, potrebnih brzoproliferirajućim stanicama (23). Treća je mogućnost povećana produkcija dušičnog oksida (NO-a) iz arginina što je značajka TNBC-a. Pokazalo se da NO ima uloge u angiogenezi i imunskom izbjegavanju. U bolesnika s TNBC-om više razine NO-a povezane su lošim ishodom (151).

Serin je neesencijalna aminokiselina i važna točka u biosintezi drugih važnih molekula. Prekursor je sinteze glicina i cisteina. Ova aminokiselina potrebna je za sintezu sfingolipida i donor je ugljika za folatni ciklus. Taj je ciklus pak važan za sintezu purina, timidina, regeneraciju metionina iz homocisteina i produkciju SAM koji je potreban za reakcije metilacije (152). Nadalje, serin djeluje kao alosterički aktivator izoforme enzima PKM2 (23). Egzogena opskrba serinom u većini je tumora dovoljna za proliferaciju. Ipak, određeni tumori pokazuju povećanu aktivnost biosintetskog puta serina (152). Glavni, ograničavajući enzim (engl. *rate-limiting*) PHGDH često je amplificiran u TNBC-u i melanomu (90). Njegova aktivnost može biti pojačana i djelovanjem onkogenog c-Myc (153). To svojstvo amplifikacije enzima može biti iskorišteno u terapijske svrhe jer se pokazalo da inhibicija tog enzima povećava osjetljivost

tumorskih stanica na kemoterapiju, uslijed smanjenih mogućnosti održavanja redoks-homeostaze, a također i smanjuje metastatski potencijal stanica (154).

#### 4.2.3. Tumori dojke

Tumori dojke su izrazito heterogena skupina, a to se odnosi i na njihove karakteristike u pogledu metabolizma aminokiselina. TNBC s najvećom ekspresijom c-Myc pokazuje najveći stupanj glikolize i glutaminolize (98). Ekspresija glutaminaze i povećan omjer glutamat/glutamin koji je posljedica pojačane aktivnosti tog enzima, pokazali su se kao potencijalni dijagnostički markeri i prediktori dobrog odgovora na inhibitore glutaminaze (155). Dio tih tumora su glutaminski auksotrofi, vjerojatno zbog manjka GS (156). Upravo to svojstvo predstavlja metaboličku vulnerabilnost koja čini potencijalnu terapijsku metu. Agresivni tumori dojke pokazuju izraženu ekspresiju glutaminskih transportera, najviše SLC1A5 i SLC7A5, a potonji je zaslužan za istovremeni utok leucina i posljedičnu aktivaciju mTOR signalnog puta. Ti transporteri čine potencijalnu terapijsku metu najagresivnijih tumora dojke (110). U pogledu metabolizma serina, ovi tumori se očituju pojačanom aktivnošću njegovog biosintetskog puta. PHGDH često je amplificiran ili pojačano ekspimiran u ovim tumorima (91) (vidi prethodni ulomak), ali i drugi biosintetski enzimi, osobito u koštanim metastazama (157). Neke studije su pokazale osjetljivost TNBC na deprivaciju cistina (158), za razliku od luminalnih tumora, a dio tumora su argininski auksotrofi (vidi prethodni odlomak) (159). HER2+ tumori također imaju izraženu glutaminolizu, no u znatno manjem opsegu nego li TNBC. ER+ tumori imaju više razine glutamina, zbog prevage aktivnosti GS nad glutaminazom i slabog iskorištavanja glutamina (98,126). Tumorske stanice koje su razvile rezistenciju na inhibitore aromataze, povećavaju razine transportera glutamina, što je regulirano putem ER i HER2 .

#### 4.2.4. Tumori prostate

U androgen-ovisnim tumorima prostate, AR regulira metabolizam glutamina djelujući na transportere i ekspresiju glutaminaze. Svoje djelovanje AR ostvaruje putem MYC i mTOR ovisnih i neovisnih mehanizama, a također i potonji mogu biti regulirani neovisno o AR-u. Za razliku od drugih tumora, u tumorima prostate MYC nije dominantni regulator metabolizma glutamina. Štoviše, u tumorskim linijama s divljim tipom tumor supresora PTEN, MYC nema utjecaja na ekspresiju niti transportera niti glutaminaze (VCaP linija). U nekim tumorskim linijama ima utjecaj samo na transportere (LNCaP linija), a u nekima i na transportere i na ekspresiju glutaminaze (PC3 linija). Zaključno, možemo reći da je MYC djelovanje na metabolizam glutamina ovisno o kontekstu, odnosno o tumorskoj staničnoj liniji i različitom izražaju onkogeno, tumor supresora i signalnih puteva (160). Osim razlika u razmjeru

metabolizma glutamina i njegovoj regulaciji između različitih staničnih linija, pokazalo se da razlike postoje i unutar gotovo iste linije, ovisno o tome radi li se o primarnom tumoru ili metastazi. PC3 i PC3M (metastaza) su agresivne tumorske linije, rezistentne na kastraciju, dakle androgen neovisne. PC3M pokazuje 3 puta veće iskorištavanje glutamina i ono je ovisno o aktivnosti mTOR puta, dok je u PC3-u, čini se, neovisno. Međutim, niti jedna od tih linija ne pokazuje glutaminsku ovisnost i mogu proliferirati u potpunoj odsutnosti glutamina što upućuje na veliku metaboličku fleksibilnost (161). Stanice raka prostate nerijetko imaju manje količine ornitin karbamoil transferaze koja sudjeluje u sintezi arginina pa su osjetljive na tretman arginazom i arginin deiminazom (106). Sarkozin, odnosno N-metilglicin je neproteinska aminokiselina nastala kao intermedijerni produkt metabolizma glicina. U osoba s tumorom prostate sarkozin se pokazao kao dobar urinarni tumorski marker (162,163). Međutim, sarkozin doista ima i ulogu u tumorskoj progresiji. Povećava brzinu proliferacije, migraciju (164), angiogenezu, invaziju i intravazaciju te povećava ekspresiju gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, proliferaciju i apoptozu. Prometastatski učinci sarkozina očituju se i u androgen-ovisnim i u androgen-neovisnim tumorima. Sve navedeno upućuje na to da je sarkozin onkometabolit sa značajnim biološkim ulogama, a ne samo tumorski biljeg (165,166).

#### **4.3 Metabolizam lipida**

Metabolizam lipida postaje intenzivnim područjem istraživanja. Ova skupina molekula izuzetno je heterogena, kako u pogledu kemijske građe, tako i u pogledu funkcija koje obnašaju u stanicama. Neke od prepoznatih uloga u stanicama su: izvor i pohrana energije, izgradnja membrana, signalizacija, posttranslacijske modifikacije proteina, regulacija autofagije, migracije, proliferacija i preživljenja tumorskih stanica, uloga u angiogenezi te komunikacija s imunskim i drugim stromalnim stanicama (167). Neke od ovih uloga važne su i za zdrave stanice i za maligne, no značaj se bitno razlikuje. Nadalje, uočena povezanost između pretilosti (3,4,168,169), dijeta bogate zasićenim masnim kiselinama, nekim nezasićenim i pojedinih tipova malignih tumora poput raka dojke (170,171), prostate (42), pankreasa (172) i ovarija (173). Navedeno upućuje na zaključak da te molekule imaju ulogu i u inicijaciji i progresiji tumora, a njihov promijenjeni metabolizam nije pasivna posljedica već nastalog tumora, nego i aktivni dionik istog.

#### 4.3.1. Normalne stanice

Većina normalnih stanica tkiva svoje potrebe za lipidima zadovoljavaju kroz unos egzogenih slobodnih masnih kiselina (FFAs) i lipoproteina. Biosinteza lipida stoga je ograničena samo na pojedina tkiva poput jetre, masnog tkiva i dojke u vrijeme razdoblja laktacije. Polazna molekula u sintezi lipida je acetyl-CoA, nastao cijepanjem citrata dobivenog iz TCA. Ključni enzimi u biosintezi FFA su ACYL, ACC i FASN, a kao produkt nastaju zasićene masne kiseline – palmitinska, stearinska i oleinska. Sisavci mogu djelovanjem enzima SCD „umetnuti“ dvostruku vezu na položaju delta-9 čime nastaju neesencijalne jednostruko nezasićene kiseline. Derivati FFA su primjerice TAG-ovi koji služe kao oblik pohrane FFAs u vezikulama i oslobađaju se iz njih djelovanjem lipaza po potrebi. Glicerolipidi su sljedeća skupina derivata, a načelno ih možemo podijeliti na fosfoinozitide koji djeluju kao drugi glasnici, i fosfogliceride koji grade membrane (167). Sfingolipidi su velika klasa lipida odgovorna za održavanje fluidnosti membrane i za signalizaciju. Neki od spomenutih derivata su ceramid i sfingomijelin. Treća skupina signalnih lipida su eikozanoidi, derivati višestruko-nezasićene arahidonske kiseline (174). Drugu veliku biosintetsku „granu“ čini mevalonatski put biosinteze kolesterola. Polazna molekula je ista, acetyl-CoA, a ključni enzimi su HMGCS i HMGCR. Kolesterol je važna strukturalna komponenta membrana, odgovorna za modulaciju njene fluidnosti. Osim toga, kolesterol čini okosnicu za sintezu steroidnih hormona. Regulacija ekspresije gena za pojedine ključne enzime ostvaruje se kroz transkripcijske čimbenike obitelji SREBP. Osnovni „aktivatori“ povezani su s promjenama u sastavu stanične membrane (175), a drugi čimbenici koji utječu na aktivaciju su nutritivni status i signaliziranje čimbenicima rasta. Druga razina kontrole enzima je njihova izravna fosforilacija kinazama PI3K/Akt/mTOR puta u odgovoru na čimbenike rasta (176,177) ili AMPK kinazom u ovisnosti o energetsom statusu (178).

#### 4.3.2. Maligne stanice

Reaktivacija biosinteze lipida, česta je pojava u malignim tkivima, a nerijetko već u ranim stadijima, primjerice raka dojke (37,167,179). Štoviše, de novo adipogeneza smatra se novom ključnom karakteristikom (engl. *hallmarks*) agresivnih tumora (180). Tako je ekspresija ključnog biosintetskog enzima FASN u stadiju 1 tumora pluća povezana s lošom prognozom i agresivnošću (181). Akumulacija lipida u obliku TAG-bogatih vezikula također je marker agresivnosti (182). Dominantni izvor ugljika za sintezu lipida čini glukoza. U malignim su stanicama mogući alternativni izvori ugljika za sintezu lipida, a uključuju acetat i glutamin koji ulazi u ovaj proces reduktivnom karboksilacijom. Takav je obrazac ponašanja uočen u hipoksičnim tkivima (23,183–185). Za povišenu ekspresiju biosintetskih enzima zaslužno je djelovanje mTORc1 na SREBP. S obzirom na centralnu ulogu mTORc1 u visoko

proliferativnim tkivima, ne začuđuje njegov učinak na ekspresiju upravo biosintetskih enzima, ne samo za sintezu lipida, nego i proteina te nukleotida. Na taj način zadovoljavaju se velike potrebe proliferirajućih tkiva za građevnim jedinicama (186). SREBP aberantno je aktiviran u pojedinim tumorima poput raka dojke, prostate, GBM i ovarija, kao posljedica aktivnosti ključnih signalnih kaskada u tumorskim stanicama (187). Osim na razini ekspresije, moguće je izravno djelovanje na enzime, primjerice HER2+ izravno fosforilira FASN u HER2+ tumorima dojke, a također djeluje i putem SREBP-a na ekspresiju (188). Zanimljivo je da SREBP1 ima i druge „mete“ djelovanja osim enzima, pa tako regulira ekspresiju AR-a (189). Kao i u pogledu metabolizma ugljikohidrata i aminokiselina, promjena u aktivnosti onkogeni i tumor supresora igra ključnu ulogu u metaboličkom zaokretu. Primjerice gubitak funkcije p53 gena rezultira aktivacijom mevalonatskog sintetskog puta (190). Posebnosti genske regulacije metabolizma lipida bit će opisane na primjerima karcinoma dojke i prostate u sljedećim odlomcima, a ovdje ću se osvrnuti na specifične uloge lipida.

Strukturna uloga. De novo lipogeneza u tumorskim stanicama rezultira povećanim sadržajem zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina u strukturi fosfolipida, a moguća dobrobit za stanicu je u tome što je takav sastav membrane manje osjetljiv na potencijalno oksidativno oštećenje, odnosno peroksidaciju (191). Takav sastav rezultira i smanjenom fluidnošću membrane, tipično za agresivne tumore dojke (192). Abnormalan sastav membrane rezultira gubitkom polariziranosti epitelnih stanica što je zabilježeno u mnogim tumorima. Aktivnost enzima mevalonatskog puta ima ulogu u 3D rastu tumora, sidrište-neovisnom rastu i invazivnosti jer se pokazalo da blokiranjem tih enzima tumor gubi te sposobnosti u p53 mutanti (190).

Signalizacija. Sfingozin i ceramid su lipidi važni u signaliziranju i pokazuju pro-apoptotičko djelovanje, a jedan od „signala“ za njihovu sintezu je i kemoterapija pa su oni jedni od posrednika njezinog terapijskog učinka. S obzirom na njihove protu-tumorske učinke, razine sintetskih enzima ceramida su snižene u brojnim tumorima što pridonosi rezistenciji na terapiju (193). Međutim, sfingozin-1-fosfat (S1P) ima pro-tumorske učinke te promiče proliferaciju, migraciju i angiogenezu (194). Eikozanoidi prvenstveno djeluju proupalno i na taj način „razbuktavaju“ tumorigenezu. PGE2 može uz to aktivirati i intracelularne signalne puteve poput RAS-ERK. Lizofosfatidinska kiselina (LPA), signalna je lipidna molekula koja potiče migraciju i preživljenje, a povećana ekspresija receptora za tu molekulu svojstvena je nekim tumorima poput glioblastoma, tumora dojke i prostate (186). PGE2 djeluje i kao specifičan signal u diferencijaciji okolnih stromalnih stanica, pa tako potiče polarizaciju makrofaga u M2 tip, poznat

po svojim pro-tumorskim učincima. I drugi signalni lipidi poput LPA i S1P mogu modulirati učinke imunskih stanica (174,183).

Sljedeća važna uloga lipida je posttranslacijska modifikacija proteina koja je važan putokaz za substanični razmještaj proteina i specifično signaliziranje. Primjer kakav utjecaj imaju te modifikacije u tumorigenezi jest gubitak Rb (tumorsupresorski protein) koji kao jednu od posljedica ima izraženu prenilaciju N-ras u retinoblastomu i tzv. starenje stanice (195).

Lipidi imaju ulogu i u regulaciji angiogeneze. Primjerice prostaglandini izlučeni iz tumorskih stanica, ali isto tako i prostaglandini izlučeni iz endotelnih stanica koji povratno djeluju na tumorske stanice i potiču ih na lučenje pro-angiogenih čimbenika. S1P djeluje slično VEGF-u i  $\beta$ -FGF-u u stimulaciji angiogeneze i vaskularnoj maturaciji (183,186).

Metabolizam lipida u hipoksiji razlikuje se između normalnih i tumorskih stanica. Naime, za razliku od normalnih, u tumorskih stanicama zadržan je određen stupanj  $\beta$ -oksidacije, vjerojatno aktivacijom CPT1 putem AMPK koji djeluje kao stres-senzor (196). Druga razlika je zadržana lipogeneza u tumorskih stanicama. Pokazalo se da je FASN aktiviran putem Akt i SREBP1 u hipoksiji. Osim toga, u hipoksičnim stanicama karcinoma prostate povećana je ekspresija enzima ACLY i ACSL1 što govori u prilog tome da je glukoza glavni izvor sinteze lipida za te stanice (197), što nije uvijek slučaj. Već spomenuto korištenje glutamina u procesu reduktivne karboksilacije početni je korak u lipogenezi u hipoksičnim uvjetima u stanicama glioblastoma (184). Stanice karcinoma prostate često luče izvanstanične vezikule, a njihovo su lučenje i lipidni sastav promijenjeni u hipoksiji. Naime, raste udio zasićenih masnih kiselina u TAG i fosfolipidima u sastavu vezikula što je obrambeni mehanizam od potencijalne peroksidacije pri reoksigenaciji. Nadalje, povećan je udio arahidonske i linolenske (omega 6) masne kiseline što govori u prilog tome da su vezikule bioaktivni nosači odgovorni za protumorska zbivanja u susjednim stanicama (197). U hipoksiji stanice gomilaju lipide u obliku vezikula, ponašajući se poput adipocita. Time osiguravaju adekvatan izvor energije pri reoksigenaciji. Štoviše, rast je čak i brži nakon reoksigenacije nego što je bio prije hipoksije. Jedan od načina regulacije formiranja tih vezikula je vezanje HIF1 za promotor gena za Lipin1, protein odgovoran za formiranje DAG-a, posljedično TAG-a (198).

Metabolička simbioza, svojstvo je koje omogućuje tumorskom tkivu veliku prilagodljivost na uvjere u mikrookolišu. Već smo ju upoznali kroz primjer laktatnog šanta i CAFs, a drugi primjer je odnos između tumorskih stanica i CAAs, a komunikacija se odvija putem specifičnih hormona, adipokina. Metabolička simbioza CAAs i tumorskih stanica opisana je za nekoliko tipova tumora, a među njima je i karcinom ovarija te omentalni adipociti, karcinom dojke

(171,199) i prostate (200,201). U adipocitima tumorske stanice induciraju lipolizu i na taj način osiguravaju izvor FFAs. Osim toga, adipociti potiču iskorištavanje tih FFAs u stanicama, tj. potiču FAO (202). Adipociti nisu samo inertna „skladišta“ TAG-ova, oni su također izvor aktivnih molekula koje nazivamo adipokinima (hormoni, faktori rasta, proupalne molekule) koji moduliraju procese poput proliferacije, migracije i metastaziranja, a ravnoteža tih adipokina poremećena je u pretilosti što čini samo jedan u nizu čimbenika koji pretilost vezuju uz povećanu incidenciju, bržu progresiju, lošiju prognozu i smanjeno preživljenje raka (199,201). Komunikacijski kanal između stanica čine izvanstanične vezikule, bogate lipidima i enzimima FAO procesa koji se pokazao ključnim načinom kako adipociti utječu na agresivnost tumora. Adipociti koje nazivamo CAA razlikuju se od „uobičajenih“. Naime, oni imaju smanjen sadržaj lipida i ekspresiju diferencijacijskih markera, a s druge strane povećan sadržaj proteaza i povećano lučenje proupalnih citokina. Podliježu procesu „delipidacije“, djelomice je to uzrokovano dediferencijacijom, a djelomice indukcijom lipolize od strane tumorskih stanica (201).

#### 4.3.3. Tumori dojke

U metaboličkim bolestima poput dijabetesa melitusa te u tumorima često su disregulirani isti signalni putevi. Konkretno, u tumorima dojke javlja se aktivirajuća mutacija PI3K, gubitak funkcije PTEN i amplifikacija/hiperaktivacija HER2/neu koji dijeli neke nizvodne efekte s INSR (inzulinski receptor) (188). Lipogenetski profil najizraženiji je u HER2+ tumorima dojke (203). Glavni regulator metabolizma masti, PPAR $\gamma$ , često je ko-amplificiran sa HER2 (188). Ključni biosintetski enzim FASN povišeno je ekspimiran zahvaljujući djelovanju HER2 na SREBP i čini transkripcijsku razinu regulacije, a mTOR translacijsku razinu. Uz to, HER2 izravno regulira aktivnost enzima fosforilacijom. Pokazalo se da je odnos HER2 i FASN-a bidirekcionalan, odnosno da postoji određen stupanj međuregulacije što je potvrđeno činjenicom da je moguće postići resenzitizaciju na Transtuzumab (Herceptin) inhibicijom FASN-a (204). Akt ima permisivan učinak na lipogenezu, a djeluje inhibirajući negativnog regulatora PPAR $\gamma$ - FOXO (188). Akt dovodi i do povišene ekspresije FASN u stanju hipoksije (205). EGF signaliziranje dovodi do povećane aktivnosti FASN putem MAPK, PI3K i SREBP1 (198). Još jedan važan regulator je BRCA1. Divlji tip normalno stabilizira inaktivnu formu ACC-a, dok mutirani BRCA1 rezultira njegovom hiperaktivacijom (206). Osim pro-lipogenog, mTOR ima i antilipolitički učinak negativno regulirajući transkripciju HSL i ATGL (207).

Estrogen djeluje putem svojih receptora ERa i ERb. Suprimira lipogenezu i akumulaciju TAG kompetitivnim vezanjem za PPAR $\gamma$ , a smanjuje i ekspresiju CD36, transportera slobodnih masnih kiselina. Učinak nije jednosmjernan. Naime, inhibicija FASN-a rezultira supresijom



preživljenja i rasta tumorske stanice stimulirane estrogenom, zbog aktivacije apoptoze i supresije onkogenog signaliziranja putem PI3K/Akt. Nadalje, zbog kemijski slične strukture kao estrogenski hormoni, 27-hidroksikolesterol može aktivirati ER i stoga promovirati rast (126).

Heterogenost tumora dojke očituje se i u metabolizmu lipida. TNBC ima veoma slabu ekspresiju sintetskih enzima poput FASN, ACLY, ACC i SCD1 što upućuje na to da pretežito ovisi o egzogenim FA, a sinteza lipida najmanja je u odnosu na ostale podtipove. Za njihovu aktivaciju u ovome podtipu odgovoran je enzim ACSL4. Pokazuje tropizam za arahidonsku kiselinu, povećava razine COX-2 i proizvodnju PGE2. Ta je izoforma enzima potencijalni biomarker TNBC kao i hormonske rezistencije u ER+. Razine lipaza MGLL i PNPLA2 koje mobiliziraju FA iz TAG u lipidnim skladištima su snižene što znači da TNBC preferira slobodne FA. S druge strane, povećan je izražaj LPL-a, VLDLR-a i FABP5/7. PLIN2 je protein iz skupine perilipina koji je povezan s povećanim skladištenjem lipida u vezikulama i povišen je u TNBC-u (198). Povećano je uzimanje i skladištenje kolesterola, a smanjena njegova sinteza (208). FAO nije dominantni način dobivanja energije, on je važniji za manje agresivne tipove tumora poput ER+ (198). Međutim, u metastatskom TBC-u FAO postaje važan izvor energije uslijed aktivacije onkogenog Src (209). FAO postaje važan izvor energije i u stanju kronične acidoze, a iskorištavanje glukoze tu je smanjeno. HER2+ tumori imaju najaktivniju biosintezu lipida i sukladno tome najveću ekspresiju biosintetskih enzima sukladno već opisanoj ulozi HER2. Za aktivaciju koriste izoformu enzima ACSL3. Visoke razine kolesterola u mitohondrijima dovode do rezistencije stanica na pro-apoptotičke signale. U HER2+ tumorima povišene su razine STARD3 proteina koji je uključen u ulazak kolesterola u mitohondrij. Visoke razine tog proteina također smanjuju adhezivnost stanica, što povećava metastatski potencijal i pogoršava prognozu. S druge strane, protein ABCA1 odgovoran je za izlazak kolesterola iz mitohondrija i kao takav je često snižen u tumorima (210). ER+ tumori imaju uravnotežen odnos biosinteze i oksidacije masnih kiselina, a smatra se da su takvi „uzaludni“ ciklusi važni za održavanje integriteta mitohondrija (198). U ER+ tumorima onkoprotein MUC-1 dovodi do povećane ekspresije enzima uključenih u metabolizam kolesterola i masnih kiselina što dovodi do rezistencije na terapiju Tamoxifenom (211). Prognozičko značenje ima smanjena ekspresija perilipina 1, proteina izraženog na površini lipidnih vezikula. Naime, u ER+ tumorima koji imaju smanjenu ekspresiju perilipina 1, prognoza je lošija, a preživljenje kraće (212).

#### 4.3.4. Tumori prostate

Za razliku od mnogih drugih tumora, tumori prostate većinom ovise o unosu lipida i njihovom metabolizmu, u usporedbi s unosom glukoze i glikolizom (213). Promijenjena i povećana sinteza lipida smatra se ključnom odrednicom progresije raka prostate, jer sinteza postaje

neovisna o androgenoj regulaciji (106). Razine glavnih transkripcijskih faktora iz obitelji SREBP pri androgenoj deprivaciji, odnosno kastraciji, opadaju. Nakon nekoliko tjedana njihova razina raste, a razine su jednake ili veće od prekastracijskih. To ukazuje na dvije stvari. Prvo, androgeni utječu na razinu SREBP-a, i drugo, razvijaju se neovisni putevi regulacije tih faktora nakon kastracije. Smatra se da SREBP i nizvodni efektori imaju važnu ulogu u androgen-neovisnom fenotipu tumora (214). Što se efektoru tiče, promjene obuhvaćaju enzime odgovorne za sintezu i oksidaciju masnih kiselina te za sintezu kolesterola i fosfolipida (43). Povećana ekspresija glavnog sintetskog enzima FAS povećava rizik za smrtnost od raka prostate, a smrtnost dodatno raste gubitkom PTEN-a (215). Na ekspresiju utječu androgeni i EGF, koji je pojačano eksprimiran u raku prostate, djelujući na transkripcijski faktor SREBP1 (106). Nadalje, već spomenuti gubitak PTEN u agresivnim tumorima prostate dodatno povećava njegovu ekspresiju jer dolazi do gubitka negativnog regulatornog djelovanja na PI3K/Akt put, dok hipoksija djeluje putem HIF1 indukcije i posljedične Akt fosforilacije (205). Osim spomenute povećane ekspresije biosintetskih enzima poput FASN, poremećena je i njihova regulacija, pa tako aktivnost FASN više ne odgovara nutritivnom statusu. FASN također sam regulira određene signalne puteve i smatra se onkogenom (216). Supstrat za *de novo* sintezu masnih kiselina je citrat, a on je ujedno i intermedijer TCA pa su njegove razine smanjene u malignom tkivu prostate u usporedbi s nemalignim (42). Sintetizirane FA ili pak unesene slobodne FA mogu se koristiti kao izvor energije putem  $\beta$ -oksidacije ili za sintezu lipidnih spojeva poput fosfolipida i triglicerida. U oba slučaja prethodi aktivacija FA djelovanjem enzima ACSL, a u samom tkivu prostate dominantna izoforma (od njih 5) je ACSL3, čije je djelovanje potaknuto androgenima (217). Razine ACSL3 najveće su u androgen-osjetljivim tumorskim stanicama (218). Gubitkom te osjetljivosti, razine te izoforme opadaju, a rastu razine ACSL4 (218). S druge strane, ACSL4 jedina je izoforma koja je snižena u malignom tkivu prostate, u odnosu na normalno, a njegova povišena razina smatra se markerom agresivnosti i androgene rezistencije. Slična povezanost s hormon-receptor negativnošću i ekspresijom enzima, pokazano je i za rak dojke (219). Što se tiče korištenja lipide u svrhu dobivanja energije, Liu i suradnici pokazali su povećanu ekspresiju ključnih enzima, a odsutnost GLUT1, čime su potvrdili oksidaju masnih kiselina kao dominantan energetski izvor (42). U tumorima prostate od osobitog je značaja oksidacija razgranatih masnih kiselina u peroksisomima. Ključni enzim je AMACR, a pokazao se korisnim dijagnostičkim markerom (220) i terapijskom metom (221). Što se metabolizma kolesterola tiče, pokazalo se da su povećane razine kolesteril-estera u lipidnim vezikulama povezane s agresivnošću (222), a visoke cirkulirajuće razine kolesterola s razvojem raka prostate (223), što ukazuje na moguću povezanost prehrane bogate životinjskim masnoćama kakvu susrećemo na Zapadu sa sve

većom incidencijom ovog raka (4). Akumulacija CE inducirana je gubitkom PTEN-a i posljedičnom povećanom aktivnošću inače suprimiranog PI3K/Akt/mTOR puta te SREBP-a i LDL-R-a. Ovaj je mehanizam neovisan o androgenima. Egzogeni CE dominira, a *de novo* sinteza slabije je zastupljena (223).

Osim identificiranja promijenjene ekspresije gena detekcijom povišenih razina RNA za te gene, promjene se još preciznije i detaljnije mogu pratiti metabolomskom analizom. Tako su u pacijenata s rakom prostate u plazmi pronađene povišene razine ceramida, sfingomijelina, fosfoinozitola i fosfoetanolamina, a u samom tkivu prostate povišene razine CE u odnosu na normalno tkivo (224).

## **5. METABOLIČKE PROMJENE U POJEDINIM STADIJIMA BOLESTI**

Metabolizam tumorskih stanica nije statičan tijekom bolesti i mijenja se ovisno o okolnostima u okolišu i ovisno o potrebama koje se mijenjaju ovisno o tome u kojem je razvojnom stadiju tumor. Četiri su osnovne različite faze koje se mogu primijetiti u većini tumora tijekom progresije bolesti (225).

### **5.1. Intrinzični stadij – Warburgov efekt**

Brojne, već spomenute promjene u razini aktivnosti onkogeni i tumor supresora favoriziraju aerobnu glikolizu. Tumorske stanice često ekspimiraju embrionalnu formu piruvat kinaze PKM2 koja dodatno favorizira glikolizu i u uvjetima niske koncentracije glukoze (226). Već spomenutu korist od aerobne glikolize imaju u stvaranju intermedijera koji se usmjeravaju dalje u stvaranje osnovnih građevnih jedinica i na taj način omogućava kontinuiranu proliferaciju (35). Sljedeća potencijalna korist je hiperpolarizacija mitohondrija, zatvaranje Kv kanala i posljedična prevencija influksa kalcija koja bi inače pokrenula kaskadu apoptotičkih događaja u stanici (227). U influksu kalcija važnu ulogu ima ROS-ovi stvoreni tijekom mitohondrijske respiracije. Iz toga valja zaključiti kako brzo proliferirajuće stanice ne smiju ovisiti o mitohondrijskoj respiraciji kao izvoru energije (225). Povećana glutaminoliza u ovome stadiju služi ponajprije održavanju reduciranog oblika NADPH potrebnog za intenzivne anaboličke reakcije sinteze makromolekula (41).

### **5.2. Deadhezija**

Jedno od osnovnih svojstava tumora jest gubitak međustaničnih veza i kontakta s podlogom u fazi progresije. Deadherirane stanice mijenjaju svoj fenotip, postaju mobilnije i mijenjaju svoj

metabolizam. U ovoj fazi bolesti, cilj nisu rast i proliferacija, nego progresija izvan granica primarnog tumora. Za takav pothvat, stanice trebaju znatno veće količine energije. U normalnim stanicama, uslijed gubitka kontakta s podlogom dolazi do stanične smrti koju nazivamo anoikis, uslijed manjkavog transporta glukoze u stanicu i manjka ATP-a (228). Tumorske stanice povećavaju u ovoj fazi mitohondrijski metabolizam, ali i alternativni put dobivanja ATP-a serin-glicin-kreatinski putem. Važnu ulogu u ovim prilagodabama imaju metastatski proteinski produkti, osteopontini i signaliziranje vodikovim peroksidom koji stabilizira kaveolin-1 što za posljedicu ima favoriziranje oksidativnog metabolizma. Glutaminoliza je povećana u ovim stanicama, s ciljem proizvodnje glicina kao alternativnog puta dobivanja ATP-a, ali i za dobivanje glutationa i zaštitu od oksidativnog stresa (225,229). Novija istraživanja govore u prilog tome da u metastatskim stanicama - MIC (engl. *metastasis initiating cells*), ključnu ulogu ima oksidacija FA (FAO) i da je to generalno svojstvo metastatskih tumora (230). Ta je tvrdnja poduprta činjenicom da dijeta bogata lipidima može povećati metastatski potencijal MIC stanica koje iskazuju takva metabolička svojstva (231). Važnost FAO očituje se i u metastatskom TNBC-u (232), a pokazalo se i da reduciran unos masti u bolesnika smanjuje smrtnost od tog raka (233).

### **5.3. Interakcija sa stromalnim stanicama**

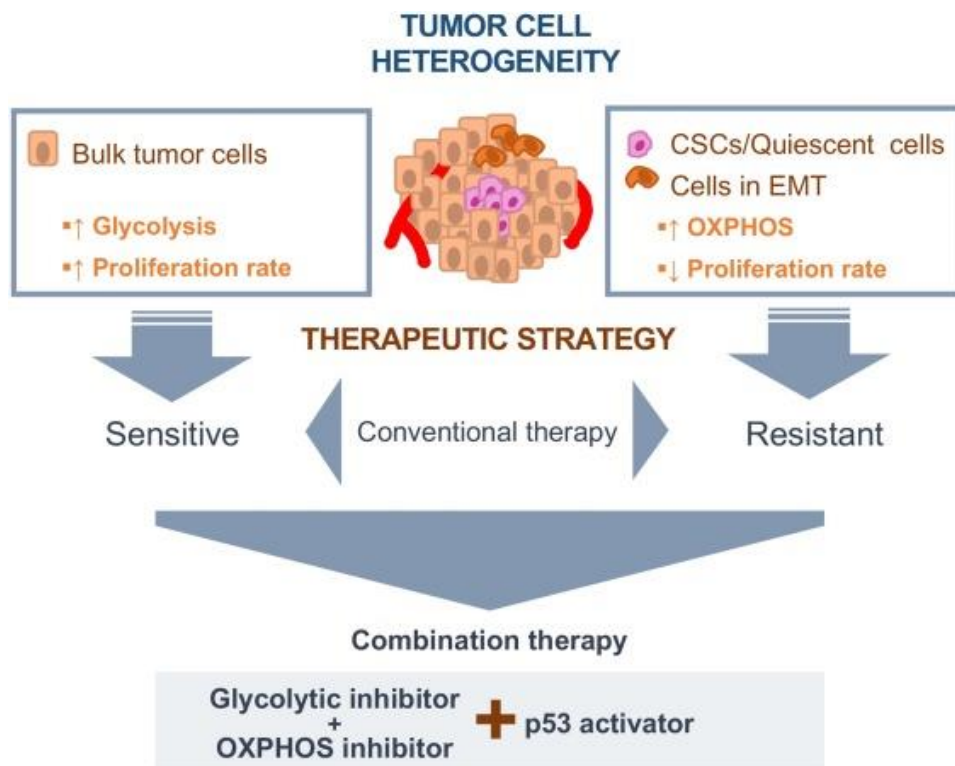
U interakciji sa stromalnim stanicama, tumorske stanice nastoje „izvući“ što veću korist i stoga induciraju promjene u njihovom metabolizmu osiguravajući na taj način sebi povoljne uvjete. Ponovno važnu ulogu ima vodikov peroksid (ROS) kojeg produciraju tumorske stanice, a inducira nešto drugačije promjene nego u deadheriranim stanicama. U okolnim fibroblastima uzrokuje smanjenje razine kaveolina-1, stabilizira HIF-1 i potiče Warburgov efekt. Stvoreni laktat putuje od stromalnih stanica do tumorskih, a ključnu ulogu tu imaju MCT4 i MCT1 (13,46,47,234). Osim fibroblasta (CAF) i okolni adipociti mogu promovirati tumorski rast i širenje, služeći kao izvor adipokina te FA koje služe kao izvor energije. To je demonstrirano za ovarijske tumore (202) i tumore dojke (171).

### **5.4. Kasni stadij**

U kasnom stadiju dominira stanje laktacidoze, niske koncentracije kisika i glukoze. Dolazi do stabilizacije HIF1 $\alpha$  pa se glikoliza dalje nastavlja. Stvorene velike količine laktata mijenjaju pH unutar stanice pa se aktivira enzim karboanhidraza kako bi se održala homeostaza u stanici (235). Glavno gorivo Krebsova ciklusa je glutamin, a ne glukoza (225).

## 6. TERAPIJSKE IMPLIKACIJE PROMIJENJENOG METABOLIZMA - PRIMJERI

Metabolički modulatori čine novu generaciju anti-tumorske terapije. Mogu djelovati samostalno ili u kombinaciji s klasičnim kemoterapeutcima i radioterapijom. U tumorima postoje barem dvije subpopulacije stanica, diferencirane tumorske i CSC stanice, a njihov se metabolizam razlikuje. Stoga je logično istovremeno terapijski djelovati i na Warburg-predominantne diferencirane i OXPHOS-predominantne CSC kako bi se izbjegla rezistencija uočena kod monoterapije metaboličkim modulatorima. Metformin se naširoko istražuje za primjenu u različitim tipovima tumora. On ima dvojako djelovanje jer inhibira i glikolizu (inhibirajući HK2) i OXPHOS (inhibirajući kompleks 1 ETC-a) i stoga ga je moguće primjenjivati kao monoterapiju ili u kombinaciji. Primjerice, kombinacija 2-DG-a (HK2 inhibitor) i metformina u tumorima prostate (236) i metformina sa DCA (PDK inhibitor) u tumorima dojke (237) pokazale su se učinkovitima. Još jedan obećavajući terapijski pristup je reaktivacija p53, najčešće korištenjem malih molekula – inhibitora MDM2/X. Dodatak takvih lijekova, primjerice RITA (238), omogućava veću učinkovitost i sigurnost antitumorskih lijekova, jer je moguće primijeniti manje doze metaboličkih modulatora, a i sama terapija je selektivna za stanice s gubitkom funkcije p53 (109). Princip djelovanja dvojne ili trojne terapije na različite subpopulacije stanica u tumoru prikazan je na slici 2. Još jedan zanimljiv primjer primjene spoznaja iz područja metabolizma je primjena omega-3 polinezasićenih masnih kiselina ( $\omega$ -3 PUFA) u bolesnika s rakom dojke, liječenih rapamicinom. Naime, rapamicin dovodi do metaboličkih poremećaja koje je moguće reducirati primjenom  $\omega$ -3 PUFA. Druga važna korist od istodobne primjene je prevladavanje terapijske rezistencije na rapamicin. Naime, rapamicin je inhibitor mTOR signalnog puta, a mTOR je negativni regulator mehanizma autofagije. Poznato je da je autofagija čest mehanizam terapijske rezistencije. Inhibicijom mTOR-a dolazi do dezinhibicije autofagije. Istodobnom primjenom  $\omega$ -3 PUFA dolazi do lipotoksičnih učinaka u stanici i povećane proizvodnje ROS-a, te prevencije autofagije (20). Odabrani primjeri pokazuju kako je metabolizam tumora moguće područje za terapijske intervencije i istraživanja novih lijekova kao i novog načina primjene starih lijekova. Nove molekule usmjerene na metaboličke enzime djeluju sinergistički sa „starim“ lijekovima te kemo i radioterapijom no još uvijek postoje problemi nedostatne selektivnosti ili slabe učinkovitosti (37,60).



*Slika 2.* Sinergizam inhibitora glikolize, oksidativne fosforilacije te p53 aktivatora u djelovanju na heterogeno tumorsko tkivo, sastavljeno od stanica različitog metaboličkog profila i stupnja proliferacije.

Preuzeto iz: p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. Pharmacol Res. 2018 May 1;131:75–86. Gomes AS, Ramos H, Soares J, Saraiva L. © 2019, uz dopuštenje Elseviera

## 7. ZAKLJUČAK

Metabolizam tumora prepoznat je kao jedan od ključnih karakteristika, „hallmarks“. Od prvih zapažanja na tom području, Warburgovog učinka, pa do danas učinjeni su veliki pomaci u razumijevanju složenih zbivanja u metabolizmu. Pokazalo se da promjene ključnih gena u tumorigenezi, tumor supresora i onogena, imaju posljedice na tumorski metabolizam. Pretpostavlja se također da te promjene na neki način potpomažu u svim fazama tumorigeneze, tumorskog rasta i progresije. Tumori su heterogena tkiva, izrazito prilagodljiva na različite uvjete, a to svojstvo najbolje se očituje u pogledu metabolizma. Možemo reći da je tumorski metabolizam heterogen u vremenu i prostoru. Osim toga, važno ponašanje koje pokazuju stanice unutar tumora, jest uspostava simbiotskih odnosa. Suradnja između stanica, prilagodljivost i heterogenost, značajke su koje pokazuju složenost karcinogeneze. Prikupljeno znanje o tumorskom metabolizmu pridonijelo je razvoju novih terapija, kao i već spomenute, nove primjene starih lijekova. Razvijaju se novi biomarkeri: dijagnostički, prognostički i prediktivni. U zamahu je relativno mlada znanost, metabolomika, koja je u istraživanju tumora pronašla veliku primjenu. Dragocjeno znanje proizlazi upravo iz integracije metabolomike s drugim „omikama“: genomikom, transkriptomikom, proteomikom i epigenomikom.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici, profesoricu Maji Sirotković Skerlev na pomoći oko izrade ovog diplomskog rada, motivaciji koju mi je pružila i pristupačnosti.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je pružila bezuvjetnu podršku tijekom svih šest godina studija.

Veliko hvala i mojim prijateljima na podršci, razumijevanju i vjeri u mene.



## 9. LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Sep 12;68(6):394–424.
2. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2017. – tablični podaci | Hrvatski zavod za javno zdravstvo.
3. Dieterich M, Stubert J, Reimer T, Erickson N, Berling A. Influence of lifestyle factors on breast cancer risk. *Breast Care (Basel)*. 2014/11/25. 2014 Dec;9(6):407–14.
4. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*. 2010/01/18. 2010 Jul 28;293(2):133–43.
5. Yu K-H, Snyder M. Omics Profiling in Precision Oncology. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Aug;15(8):2525–36.
6. Hayes DF. OMICS-based personalized oncology: if it is worth doing, it is worth doing well! *BMC Med*. 2013 Dec 17;11(1):221.
7. Holzinger A, Dehmer M, Jurisica I. Knowledge Discovery and interactive Data Mining in Bioinformatics - State-of-the-Art, future challenges and research directions. *BMC Bioinformatics*. 2014;15(Suppl 6):11.
8. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. 2000-Hanahan.pdf. 2000;100:57–70.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
10. Sirotković-Skerlev M. Patogenetski koraci u razvitku tumorske bolesti. In: Vrbanec D, Kulić A, editors. *Novosti u dijagnostici i liječenju solidnih tumora*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. p. 1–6.
11. Marek L, Ware KE, Fritzsche A, Hercule P, Helton WR, Smith JE, et al. Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor-Mediated Autocrine Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Mol Pharmacol*. 2009 Jan;75(1):196–207.
12. Arcucci A, Ruocco MR, Granato G, Sacco AM, Montagnani S. Cancer: An Oxidative Crosstalk between Solid Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts. *Biomed Res Int*. 2016 Aug 9;2016:1–7.
13. Avagliano A, Granato G, Ruocco MR, Romano V, Belviso I, Carfora A, et al. Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts: The Slavery of Stromal Fibroblasts. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 5;2018.
14. Martin GS. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell*. 2003 Sep 1;4(3):167–74.
15. Hoppe-Seyler F, Butz K. Tumor suppressor genes in molecular medicine. *Clin Investig*. 1994 Aug;72(8):619–30.
16. Daugherty RL, Serebryanny L, Yemelyanov A, Flozak AS, Yu H-J, Kosak ST, et al.  $\alpha$ -Catenin is an inhibitor of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5260–5.

17. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Mar 1;6(3):a026104.
18. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002 Feb 1;1(1):19–30.
19. White E, DiPaola RS. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5308–16.
20. Zhu S, Feng N, Lin G, Tong Y, Jiang X, Yang Q, et al. Metabolic Shift Induced by  $\omega$ -3 PUFAs and Rapamycin Lead to Cancer Cell Death. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(6):2318–36.
21. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan 1;31(1):9–18.
22. Ferrara N. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009 Dec;20(4):158–63.
23. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27–47.
24. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 2003 Oct 14;3(1):17.
25. Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark H-J, Fusenig N, Nieto MA, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1;117(13):2827–39.
26. Kovač Z. Patofiziologija tumorskog rasta. *Med Vjes.* 1996;28:13–32.
27. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010 Jun;31(6):220–7.
28. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1486 LP-1495.
29. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):2013 LP-2021.
30. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008 Oct 1;18(5):349–55.
31. Ohashi T, Aoki M, Tomita H, Akazawa T, Sato K, Kuze B, et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. *Cancer Sci.* 2017 Jun;108(6):1128–34.
32. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519–30.
33. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science (80- ).* 1956 Feb 24;123(3191):309 LP-314.
34. WEINHOUSE S, WARBURG O, BURK D, SCHADE AL. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science (80- ).* 1956 Aug 10;124(3215):267 LP-272.

35. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
36. Icard P, Shulman S, Farhat D, Steyaert J-M, Alifano M, Lincet H. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resist Updat*. 2018;38:1–11.
37. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol*. 2017 Aug 1;12(February):833–42.
38. Long J-P. Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? *World J Clin Oncol*. 2016;7(1):122.
39. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Dec 2;105(48):18782 LP-18787.
40. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec 4;104(49):19345 LP-19350.
41. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010 Aug;35(8):427–33.
42. Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(3):230–4.
43. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(2):111–20.
44. J.M. C, M. T, D. W-M, J.A. A, A. A, A. B, et al. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence : MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle*. 2013;12(9):1371–84.
45. Morrot A, Fonseca LM da, Salustiano EJ, Gentile LB, Conde L, Filardy AA, et al. Metabolic Symbiosis and Immunomodulation: How Tumor Cell-Derived Lactate May Disturb Innate and Adaptive Immune Responses. *Frontiers in Oncology Frontiers*; Mar 23, 2018 p. 81.
46. Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*. 2017;44(3):198–203.
47. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2009 Dec 1;8(23):3984–4001.
48. Matoba S, Kang J-G, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science (80- )*. 2006 Jun 16;312(5780):1650 LP-1653.
49. Johnson RF, Witzel I-I, Perkins ND. p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF- $\kappa$ B. *Cancer Res*. 2011/07/08. 2011 Aug 15;71(16):5588–

- 97.
50. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*. 2017;168(4):657–69.
  51. Zhou Z, Ibekwe E, Chornenkyy Y. Metabolic Alterations in Cancer Cells and the Emerging Role of Oncometabolites as Drivers of Neoplastic Change. *Antioxidants*. 2018;7(1):16.
  52. Zong W, Rabinowitz JD, White E, Road F, Brunswick N. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell*. 2016 Mar 3;61(5):667–76.
  53. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics*. 2016 Sep 2;12(9):148.
  54. Klassen A, Faccio AT, Canuto GAB, da Cruz PLR, Ribeiro HC, Tavares MFM, et al. Metabolomics: Definitions and significance in systems biology. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. p. 3–17.
  55. Mathé E, Hays JL, Stover DG, Chen JL. The Omics Revolution Continues: The Maturation of High-Throughput Biological Data Sources. *Yearb Med Inform*. 2018;27(1):211–22.
  56. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite Measurement: Pitfalls to Avoid and Practices to Follow. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):277–304.
  57. Liu X, Locasale JW. Metabolomics: A Primer. *Trends Biochem Sci*. 2017/02/11. 2017 Apr;42(4):274–84.
  58. Penkert J, Ripperger T, Schieck M, Schlegelberger B, Steinemann D, Illig T, et al. On metabolic reprogramming and tumor biology: A comprehensive survey of metabolism in breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 11;7(41):67626–49.
  59. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest*. 2014 Jan 2;124(1):398–412.
  60. Wolpaw AJ, Dang C V. Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy. *Trends Cell Biol*. 2018 Mar 1;28(3):201–12.
  61. Armitage EG, Southam AD. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics*. 2016;12(10).
  62. Mathe E, Hays JL, Stover DG, Chen JL. The Omics Revolution Continues : The Maturation of High-Throughput Biological Data Sources The Continued Promise of Cancer Informatics. *Yearb Med Inf*. 2018;211–22.
  63. Günther UL. Metabolomics Biomarkers for Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3–4):153–65.
  64. McCartney A, Vignoli A, Biganzoli L, Love R, Tenori L, Luchinat C, et al. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treat Rev*. 2018 Jun;67:88–96.
  65. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *J Mass Spectrom*. 2016 Jul;51(7):461–75.

66. Metabolon. The Five Key Elements of a Successful Metabolomics Study Metabolomics : Completing the Biological Picture [Internet]. [cited 2018 Dec 7]. Available from: <https://www.metabolon.com/application/files/2415/0388/1050/The-5-Key-Elements-of-a-Successful-Metabolomics-Study.pdf>
67. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem*. 2015 Jul;407(17):4879–92.
68. Kim K, Mall C, Taylor SL, Hitchcock S, Zhang C, Wettersten HI, et al. Mealtime, temporal, and daily variability of the human urinary and plasma metabolomes in a tightly controlled environment. *PLoS One*. 2014;9(1):e86223.
69. Teo CC, Chong WPK, Tan E, Basri NB, Low ZJ, Ho YS. Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2015;66:1–18.
70. Wawrzyniak R, Kosnowska A, Macioszek S, Bartoszewski R, Markuszewski MJ. New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: Plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K. *Sci Rep*. 2018 Dec 22;8(1):9541.
71. LCGC. Metabolomics: Prospects and Pitfalls. 2015;(March).
72. Ganti S, Weiss RH. Urine metabolomics for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2011;29(5):551–7.
73. Emwas A-H, Luchinat C, Turano P, Tenori L, Roy R, Salek RM, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics*. 2015;11(4):872–94.
74. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jul 16;17(7):451–9.
75. Kang YP, Ward NP, DeNicola GM. Recent advances in cancer metabolism: a technological perspective. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):31.
76. Fiehn O, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Lee DY, Lu Y, et al. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *Plant J*. 2008 Feb 4;53(4):691–704.
77. de Raad M, Fischer CR, Northen TR. High-throughput platforms for metabolomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2016 Feb 1;30:7–13.
78. Lacy P, McKay RT, Finkel M, Karnovsky A, Woehler S, Lewis MJ, et al. Signal intensities derived from different NMR probes and parameters contribute to variations in quantification of metabolites. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e85732–e85732.
79. Bathen TF, Geurts B, Sitter B, Fjøsne HE, Lundgren S, Buydens LM, et al. Feasibility of MR Metabolomics for Immediate Analysis of Resection Margins during Breast Cancer Surgery. *PLoS One*. 2013;8(4):e61578.
80. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The Human Urine Metabolome. Dzeja P, editor. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e73076.

81. Kurhanewicz J, Vigneron DB, Brindle K, Chekmenev EY, Comment A, Cunningham CH, et al. Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: prospects for translation to clinical research. *Neoplasia*. 2011 Feb;13(2):81–97.
82. Adamson EB, Ludwig KD, Mummy DG, Fain SB. Magnetic resonance imaging with hyperpolarized agents: methods and applications. *Phys Med Biol*. 2017/04/06. 2017 Jul 7;62(13):R81–123.
83. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol Case Stud*. 2015 Oct 24;1(1):a000588.
84. Faubert B, DeBerardinis RJ. Analyzing Tumor Metabolism In Vivo. *Annu Rev Cancer Biol*. 2017;1(1):99–117.
85. Gravel S-P, Avizonis D, St-Pierre J. Metabolomics Analyses of Cancer Cells in Controlled Microenvironments. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY; 2016. p. 273–90.
86. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498–504.
87. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2018/05/14. 2018 Jul 2;46(W1):W486–94.
88. Muir A, Danai L V., Vander Heiden MG. Microenvironmental regulation of cancer cell metabolism: implications for experimental design and translational studies. *Dis Model Mech*. 2018;11(8):dmm035758.
89. Yu L, Chen X, Sun X, Wang L, Chen S. The glycolytic switch in tumors: How many players are involved? *J Cancer*. 2017;8(17):3430–40.
90. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*. 2011 Jul 31;43(9):869–74.
91. Noh S, Kim DH, Jung WH, Koo JS. Expression levels of serine/glycine metabolism-related proteins in triple negative breast cancer tissues. *Tumor Biol*. 2014;35(5):4457–68.
92. Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, et al. Glycolytic Enzymes Can Modulate Cellular Life Span. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):177 LP-185.
93. Kim J, Dang C V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2005 Mar 1;30(3):142–50.
94. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab*. 2016 Nov 8;24(5):657–71.
95. Vaupel P, Multhoff G. Accomplices of the hypoxic tumor microenvironment compromising antitumor immunity: Adenosine, lactate, acidosis, vascular endothelial growth factor, potassium ions, and phosphatidylserine. *Front Immunol*. 2017;8(DEC):1887.

96. Marchiq I, Pouysségur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl)*. 2016 Feb;94(2):155–71.
97. Sattler UGA, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C, et al. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol*. 2010 Jan 1;94(1):102–9.
98. Ogrodzinski MP, Bernard JJ, Lunt SY. Deciphering metabolic rewiring in breast cancer subtypes. *Transl Res*. 2017;189:105–22.
99. Yaligar J, Thakur SB, Bokacheva L, Carlin S, Thaler HT, Rizwan A, et al. Lactate MRSI and DCE MRI as surrogate markers of prostate tumor aggressiveness. *NMR Biomed*. 2011/05/25. 2011 Jan;25(1):113–22.
100. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, et al. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):916 LP-921.
101. Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, et al. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol*. 1997 Feb;150(2):409–15.
102. Doldi V, Callari M, Giannoni E, D’Aiuto F, Maffezzini M, Valdagni R, et al. Integrated gene and miRNA expression analysis of prostate cancer associated fibroblasts supports a prominent role for interleukin-6 in fibroblast activation. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):31441–60.
103. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, et al. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6945 LP-6956.
104. Kim JW, Dang C V. Cancer’s molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res*. 2006;66(18):8927–30.
105. Zhao L, Mao Y, Zhao Y, Cao Y, Chen X, Zhao L, et al. Role of multifaceted regulators in cancer glucose metabolism and their clinical significance. *Oncotarget*. 2016;7(21):31572–85.
106. Eidelman E, Twum-Ampofo J, Ansari J, Siddiqui MM. The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. *Front Oncol*. 2017;7(June):1–6.
107. Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012/09/23. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
108. Cappelletti V, Iorio E, Miodini P, Silvestri M, Dugo M, Daidone MG. Metabolic Footprints and Molecular Subtypes in Breast Cancer. *Dis Markers*. 2017;2017.
109. Gomes AS, Ramos H, Soares J, Saraiva L. p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2018 May 1;131:75–86.
110. El Ansari R, McIntyre A, Craze ML, Ellis IO, Rakha EA, Green AR. Altered glutamine metabolism in breast cancer; subtype dependencies and alternative adaptations. *Histopathology*. 2018;72(2):183–90.
111. Lanning NJ, Castle JP, Singh SJ, Leon AN, Tovar EA, Sanghera A, et al. Metabolic profiling of

- triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer Metab.* 2017;5(1):6.
112. Vigneron A, Vousden KH. p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging (Albany NY)*. 2010 Aug 16;2(8):471–4.
  113. Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol.* 2017/04/06. 2017 Jun 2;429(11):1595–606.
  114. Eriksson M, Ambroise G, Ouchida AT, Lima Queiroz A, Smith D, Gimenez-Cassina A, et al. Effect of Mutant p53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol Cell Biol.* 2017 Nov 28;37(24):e00328-17.
  115. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009;23(5):537–48.
  116. Rajeshkumar N V, Dutta P, Yabuuchi S, de Wilde RF, Martinez G V, Le A, et al. Therapeutic Targeting of the Warburg Effect in Pancreatic Cancer Relies on an Absence of p53 Function. *Cancer Res.* 2015 Aug 15;75(16):3355 LP-3364.
  117. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.* 2013/09/03. 2013 Sep 3;123(9):3664–71.
  118. Varlakhanova N V, Cotterman RF, deVries WN, Morgan J, Donahue LR, Murray S, et al. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation.* 2010/05/27. 2010 Jul;80(1):9–19.
  119. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival. *Cell Cycle.* 2010 Sep 1;9(17):3515–33.
  120. Chen B, Tang H, Liu X, Liu P, Yang L, Xie X, et al. miR-22 as a prognostic factor targets glucose transporter protein type 1 in breast cancer. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2):410–7.
  121. Jiang S, Zhang L, Zhang H, Hu S, Lu M, Liang S, et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating <em>hexokinase 2</em> in breast cancer cells. *EMBO J.* 2012 Apr 18;31(8):1985 LP-1998.
  122. Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y, et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J Biol Chem.* 2012/05/16. 2012 Jun 29;287(27):23227–35.
  123. Lin A, Li C, Xing Z, Hu Q, Liang K, Han L, et al. The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 $\alpha$  signalling in triple-negative breast cancer. *Nat Cell Biol.* 2016/01/11. 2016 Feb;18(2):213–24.
  124. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015 Sep 15;5(10):2929–43.
  125. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2014 May 1;106(5):dju055-dju055.
  126. Kulkoyluoglu-Cotul E, Arca A, Madak-Erdogan Z. Crosstalk between Estrogen Signaling and



- Breast Cancer Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;30(1):25–38.
127. Whelan KA, Schwab LP, Karakashev S V, Franchetti L, Johannes GJ, Seagroves TN, et al. The Oncogene HER2/neu (ERBB2) Requires the Hypoxia-inducible Factor HIF-1 for Mammary Tumor Growth and Anoikis Resistance. *J Biol Chem.* 2013 May 31;288(22):15865–77.
  128. Lim SO, Li CW, Xia W, Lee HH, Chang SS, Shen J, et al. EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple-negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape. *Cancer Res.* 2016 Mar 1;76(5):1284–96.
  129. Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016 Oct 7;95(40):e4975–e4975.
  130. Xu J, Fan S, Rosen EM. Regulation of the Estrogen-Inducible Gene Expression Profile by the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Endocrinology.* 2005 Apr 1;146(4):2031–47.
  131. Privat M, Radosevic-Robin N, Aubel C, Cayre A, Penault-Llorca F, Marceau G, et al. BRCA1 induces major energetic metabolism reprogramming in breast cancer cells. *PLoS One.* 2014 Jul 10;9(7):e102438–e102438.
  132. Yi YW, Kang HJ, Bae I. BRCA1 and Oxidative Stress. *Cancers (Basel).* 2014 Apr 3;6(2):771–95.
  133. Tang MKS, Kwong A, Tam K-F, Cheung ANY, Ngan HYS, Xia W, et al. BRCA1 deficiency induces protective autophagy to mitigate stress and provides a mechanism for BRCA1 haploinsufficiency in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2014;346(1):139–47.
  134. Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer.* 2006;5(1):17.
  135. Makhov PB, Golovine K V, Kutikov A, Canter DJ, Rybko VA, Roshchin DA, et al. Reversal of epigenetic silencing of AP-2alpha results in increased zinc uptake in DU-145 and LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011 Dec 1;32(12):1773–81.
  136. Huang L, Kirschke CP, Zhang Y. Decreased intracellular zinc in human tumorigenic prostate epithelial cells: a possible role in prostate cancer progression. *Cancer Cell Int.* 2006;6(1):10.
  137. Giannoni E, Taddei ML, Morandi A, Comito G, Calvani M, Bianchini F, et al. Targeting stromal-induced pyruvate kinase M2 nuclear translocation impairs oxphos and prostate cancer metastatic spread. *Oncotarget.* 2015 Sep 15;6(27):24061–74.
  138. Valencia T, Kim JY, Abu-Baker S, Moscat-Pardos J, Ahn CS, Reina-Campos M, et al. Metabolic Reprogramming of Stromal Fibroblasts through p62-mTORC1 Signaling Promotes Inflammation and Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2014 Jul 14;26(1):121–35.
  139. Cutruzzolà F, Giardina G, Marani M, Maccone A, Paiardini A, Rinaldo S, et al. Glucose metabolism in the progression of prostate cancer. *Front Physiol.* 2017;8(FEB).
  140. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr 1;7:256.
  141. Vaughan RA, Garcia-Smith R, Trujillo KA, Bisoffi M. Tumor necrosis factor alpha increases aerobic glycolysis and reduces oxidative metabolism in prostate epithelial cells. *Prostate.* 2013

- Oct 1;73(14):1538–46.
142. Lukey MJ, Katt WP, Cerione RA. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2017;22(5):796–804.
  143. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2009/11/02. 2010 Jan 21;29(3):313–24.
  144. Hosios AM, Hecht VC, Danai L V, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, et al. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*. 2016 Mar 7;36(5):540–9.
  145. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med*. 2012 Jan 26;18(4):624–9.
  146. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):339–44.
  147. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009/02/15. 2009 Apr 9;458(7239):762–5.
  148. Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, Kemp S, Liu Y, Hill BG, et al. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*. 2013/01/28. 2014 Jan 30;33(5):556–66.
  149. Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA. Pegylated Arginine Deiminase (ADI-SS PEG<sub>20,000</sub> mw</sub>) Inhibits Human Melanomas and Hepatocellular Carcinomas <strong>&lt;em>in Vitro</em>&/strong> and <strong>&lt;em>in Vivo</em>&/strong>; *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5443 LP-5450.
  150. Casero Jr RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 May 1;6:373.
  151. Korde Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol*. 2013;11(1):118.
  152. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol*. 2016;214(3):249–57.
  153. Sun L, Song L, Wan Q, Wu G, Li X, Wang Y, et al. cMyc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions. *Cell Res*. 2015 Mar 20;25:429.
  154. Samanta D, Park Y, Andrabi SA, Shelton LM, Gilkes DM, Semenza GL. PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Res*. 2016 Aug 1;76(15):4430 LP-4442.
  155. Budczies J, Pfitzner BM, Györfy B, Winzer K-J, Radke C, Dietel M, et al. Glutamate enrichment as new diagnostic opportunity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2015 Apr 1;136(7):1619–28.

156. Kung H-N, Marks JR, Chi J-T. Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLOS Genet.* 2011 Aug 11;7(8):e1002229.
157. Pollari S, Käkönen S-M, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, et al. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(2):421–30.
158. Tang X, Ding C-K, Wu J, Sjol J, Wardell S, Spasojevic I, et al. Cystine addiction of triple-negative breast cancer associated with EMT augmented death signaling. *Oncogene.* 2016 Nov 21;36:4235.
159. Wang Z, Shi X, Li Y, Fan J, Zeng X, Xian Z, et al. Blocking autophagy enhanced cytotoxicity induced by recombinant human arginase in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death & Dis.* 2014 Dec 11;5:e1563.
160. White MA, Lin C, Rajapakshe K, Dong J, Shi Y, Tsouko E, et al. Glutamine Transporters Are Targets of Multiple Oncogenic Signaling Pathways in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res.* 2017 Aug 1;15(8):1017 LP-1028.
161. Zacharias NM, McCullough C, Shanmugavelandy S, Lee J, Lee Y, Dutta P, et al. Metabolic Differences in Glutamine Utilization Lead to Metabolic Vulnerabilities in Prostate Cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
162. Cernei N, Heger Z, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Babula P, et al. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker—a review. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 4;14(7):13893–908.
163. Lima AR, Bastos M de L, Carvalho M, Guedes de Pinho P. Biomarker discovery in human prostate cancer: An update in metabolomics studies. *Transl Oncol.* 2016;9(4):357–70.
164. Heger Z, Gumulec J, Cernei N, Polanska H, Raudenska M, Masarik M, et al. Relation of exposure to amino acids involved in sarcosine metabolic pathway on behavior of non-tumor and malignant prostatic cell lines. *Prostate.* 2016 May 1;76(7):679–90.
165. Khan AP, Rajendiran TM, Bushra A, Asangani IA, Athanikar JN, Yocum AK, et al. The Role of Sarcosine Metabolism in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia.* 2013;15(5):491-IN13.
166. Heger Z, Merlos Rodrigo MA, Michalek P, Polanska H, Masarik M, Vit V, et al. Sarcosine Up-Regulates Expression of Genes Involved in Cell Cycle Progression of Metastatic Models of Prostate Cancer. *PLoS One.* 2016 Nov 8;11(11):e0165830–e0165830.
167. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech.* 2013 Nov;6(6):1353–63.
168. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008 Feb 16;371(9612):569–78.
169. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug 1;4:579.
170. Naska A, Olsen A, Tjønneland A, Thiébaud ACM, Trichopoulou A, Gullberg B, et al. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.

- Am J Clin Nutr. 2008 Nov 1;88(5):1304–12.
171. Jones Supervisors Margaret Currie Elisabeth Phillips Mark Hampton M. Does fat provide energy for breast tumour cell invasion and metastasis? 2015;
  172. Chang H-H, Moro A, Takakura K, Su H-Y, Mo A, Nakanishi M, et al. Incidence of pancreatic cancer is dramatically increased by a high fat, high calorie diet in KrasG12D mice. PLoS One. 2017 Sep 8;12(9):e0184455–e0184455.
  173. Qiu W, Lu H, Qi Y, Wang X. Dietary fat intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. Oncotarget. 2016 Apr 22;7(24):37390–406.
  174. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Feb 1;9:162.
  175. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. Curr Opin Cell Biol. 2007 Apr 1;19(2):215–22.
  176. Porstmann T, Griffiths B, Chung Y-L, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, et al. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. Oncogene. 2005 Jun 27;24:6465.
  177. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. Cell Metab. 2008 Sep 3;8(3):224–36.
  178. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Oct 1;8:774.
  179. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer. 2007 Oct 1;7:763.
  180. Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? Carcinogenesis. 2015/06/19. 2015 Jun;36 Suppl 1(Suppl 1):S203–31.
  181. Merino Salvador M, Gómez de Cedrón M, Merino Rubio J, Falagán Martínez S, Sánchez Martínez R, Casado E, et al. Lipid metabolism and lung cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2017;112(2017):31–40.
  182. Balaban S, Lee LS, Schreuder M, Hoy AJ. Obesity and Cancer Progression: Is There a Role of Fatty Acid Metabolism? Biomed Res Int. 2015 Mar 19;2015:1–17.
  183. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. Dis Model Mech. 2013 Nov;6(6):1353–63.
  184. Wise DR, Ward PS, Shay JES, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011/11/21. 2011 Dec 6;108(49):19611–6.
  185. Valli A, Rodriguez M, Moutsianas L, Fischer R, Fedele V, Huang H-L, et al. Hypoxia induces a lipogenic cancer cell phenotype via HIF1 $\alpha$ -dependent and -independent pathways. Oncotarget. 2015;6(4):1920–41.

186. Lim JY, Kwan HY. Roles of Lipids in Cancer. 2018;
187. Swinnen J V, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006 Jul;9(4):358–65.
188. Baumann J, Sevinsky C, Conklin DS, Manuscript A. Lipid biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(10):1509–17.
189. Huang W-C, Zhau HE, Chung LWK. Androgen receptor survival signaling is blocked by anti-beta2-microglobulin monoclonal antibody via a MAPK/lipogenic pathway in human prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2010/01/13. 2010 Mar 12;285(11):7947–56.
190. Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, Langerød A, Moon S-H, Rodriguez-Barrueco R, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1–2):244–58.
191. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. <em>De novo</em> Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):8117 LP-8126.
192. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Müller B, Brockmüller S, Seppänen-Laakso T, et al. Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of Altered Membrane Lipid Metabolism in Breast Cancer Progression. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3236 LP-3245.
193. Morad SAF, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec 13;13:51.
194. Nagahashi M, Ramachandran S, Kim EY, Allegood JC, Rashid OM, Yamada A, et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res*. 2012 Feb 1;72(3):726–35.
195. Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, et al. Rb Regulates DNA Damage Response and Cellular Senescence through E2F-Dependent Suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell*. 2009 Apr 7;15(4):255–69.
196. Qu Q, Zeng F, Liu X, Wang QJ, Deng F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: Emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis*. 2016;7(5):1–9.
197. Schlaepfer IR, Nambiar DK, Ramteke A, Kumar R, Dhar D, Agarwal C, et al. Hypoxia induces triglycerides accumulation in prostate cancer cells and extracellular vesicles supporting growth and invasiveness following reoxygenation. *Oncotarget*. 2015;6(26).
198. Monaco ME. Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2017;8(17):29487–500.
199. Hoy AJ, Balaban S, Saunders DN. Adipocyte–Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):381–92.
200. Brown MD, Hart CA, Gazi E, Bagley S, Clarke NW. Promotion of prostatic metastatic migration towards human bone marrow stroma by Omega 6 and its inhibition by Omega 3 PUFAs. *Br J Cancer*. 2006/03/07. 2006 Mar 27;94(6):842–53.

201. Lazar I, Clement E, Attane C, Muller C, Nieto L. A new role for extracellular vesicles: how small vesicles can feed tumors' big appetite. *J Lipid Res.* 2018 Oct 1;59(10):1793–804.
202. Nieman KM, Kenny HA, Penicka C V, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011 Oct 30;17(11):1498–503.
203. Menendez JA. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010 Mar 1;1801(3):381–91.
204. Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Menendez J. Pharmacological blockade of Fatty Acid Synthase (FASN) reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) by transcriptionally inhibiting 'HER2 super-expression' occurring in high-dose trastuzumab-conditioned SKBR3/Tzb100 breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2007 Oct 1;31(4):769–76.
205. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo Y-Y, et al. Fatty Acid Synthase Gene Is Up-regulated by Hypoxia via Activation of Akt and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1. *Cancer Res.* 2008 Feb 15;68(4):1003 LP-1011.
206. Moreau K, Dizin E, Ray H, Luquain C, Lefai E, Foufelle F, et al. BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 2006 Feb 10;281(6):3172–81.
207. Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandror K V. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes.* 2010/01/12. 2010 Apr;59(4):775–81.
208. Antalis CJ, Arnold T, Rasool T, Lee B, Buhman KK, Siddiqui RA. High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug 23;122(3):661–70.
209. Park JH, Vithayathil S, Kumar S, Sung P-L, Dobrolecki LE, Putluri V, et al. Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016 Mar 8;14(9):2154–65.
210. Dutta A, Sharma-Walia N. Curbing Lipids: Impacts ON Cancer and Viral Infection. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences* . 2019.
211. Weichselbaum RR. Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Dec 1;12(6):683–9.
212. Zhou C, Wang M, Zhou L, Zhang Y, Liu W, Qin W, et al. Prognostic significance of PLIN1 expression in human breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):54488–502.
213. LIU Y, ZUCKIER LS, GHESANI N V. Dominant Uptake of Fatty Acid over Glucose by Prostate Cells: A Potential New Diagnostic and Therapeutic Approach. *Anticancer Res* . 2010 Feb 1;30(2):369–74.
214. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, et al. Dysregulation of Sterol Response Element-Binding Proteins and Downstream Effectors in Prostate Cancer during Progression to Androgen Independence. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):2212 LP-2221.
215. Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, et al. FAS expression

- inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene*. 2005 May 16;24:5389.
216. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: A metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*. 2004 Jan 1;91(1):47–53.
  217. Marques RB, Dits NF, Erkens-Schulze S, van Ijcken WFJ, van Weerden WM, Jenster G. Modulation of androgen receptor signaling in hormonal therapy-resistant prostate cancer cell lines. *PLoS One*. 2011 Aug 4;6(8):e23144–e23144.
  218. Zhao H, Kim Y, Wang P, Lapointe J, Tibshirani R, Pollack JR, et al. Genome-wide characterization of gene expression variations and DNA copy number changes in prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2005 May 1;63(2):187–97.
  219. Monaco ME, Creighton CJ, Lee P, Zou X, Topham MK, Stafforini DM. Expression of Long-chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 in Breast and Prostate Cancers Is Associated with Sex Steroid Hormone Receptor Negativity. *Transl Oncol*. 2010 Apr;3(2):91–8.
  220. Andrews C, Humphrey PA. Utility of ERG Versus AMACR Expression in Diagnosis of Minimal Adenocarcinoma of the Prostate in Needle Biopsy Tissue. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7).
  221. Carnell AJ, Kirk R, Smith M, McKenna S, Lian L-Y, Gibson R. Inhibition of Human  $\alpha$ -Methylacyl CoA Racemase (AMACR): a Target for Prostate Cancer. *ChemMedChem*. 2013 Oct 1;8(10):1643–7.
  222. Yue S, Li J, Lee S-Y, Lee HJ, Shao T, Song B, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab*. 2014 Mar 4;19(3):393–406.
  223. Pelton K, Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2012/07/21. 2012 Dec;12(6):751–9.
  224. Sorvina A, Bader CA, Caporale C, Carter EA, Johnson IRD, Parkinson-Lawrence EJ, et al. Lipid profiles of prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2018;9(85):35541–52.
  225. Weber GF. Time and Circumstances: Cancer Cell Metabolism at Various Stages of Disease Progression. *Front Oncol*. 2016;6(December):1–9.
  226. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008 Mar 13;452:230.
  227. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*. 2007 Jan 1;11(1):37–51.
  228. Caneba CA, Bellance N, Yang L, Pabst L, Nagrath D. Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration. *Am J Physiol Metab*. 2012 Aug 14;303(8):E1036–52.
  229. Shi Z, Wang B, Chihanga T, Kennedy MA, Weber GF. Energy Metabolism during Anchorage-Independence. Induction by Osteopontin-c. *PLoS One*. 2014 Aug 26;9(8):e105675.

230. Pascual G, Domínguez D, Benitah SA. The contributions of cancer cell metabolism to metastasis. *Dis Model Mech*. 2018;11(8):dmm032920.
231. Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS-O, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2016 Dec 7;541:41.
232. Park JH, Vithayathil S, Kumar S, Sung P-L, Dobrolecki LE, Putluri V, et al. Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*. 2016 Mar 8;14(9):2154–65.
233. Chlebowski RT, Blackburn GL. Abstract S5-08: Final survival analysis from the randomized Women's Intervention Nutrition Study (WINS) evaluating dietary intervention as adjuvant breast cancer therapy. *Cancer Res*. 2015 May 1;75(9 Supplement):S5-08 LP-S5-08.
234. Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:23–32.
235. Ramchandani D, Unruh D, Lewis CS, Bogdanov VY, Weber GF. Activation of carbonic anhydrase IX by alternatively spliced tissue factor under late-stage tumor conditions. *Lab Invest*. 2016 Oct 10;96:1234.
236. Tanti J-F, Bost F. The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells AU - Ben Sahra, Issam. *Autophagy*. 2010 Jul 1;6(5):670–1.
237. Haugrud AB, Zhuang Y, Coppock JD, Miskimins WK. Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(3):539–50.
238. Zawacka-Pankau J, Grinkevich V V., Hünten S, Nikulenkov F, Gluch A, Li H, et al. Inhibition of Glycolytic Enzymes Mediated by Pharmacologically Activated p53. *J Biol Chem*. 2011 Dec 2;286(48):41600–15.



## Životopis

### OSOBNE INFORMACIJE

Helena Penić-Grgaš

Zagreb (Hrvatska)

helena.penic@gmail.com

Datum rođenja 17/03/1995

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2013.–2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

2009.–2013. Sedma gimnazija, Zagreb (Hrvatska)

2001.–2009. Osnovna škola Antuna Mihanovića, Zagreb (Hrvatska)

### OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici: engleski, ruski

### AKTIVNOSTI

Demonstrator na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kolegij: "Klinička propedeutika" (2018./2019.)

Demonstrator na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2016./2017., 2017./2018. i 2018./2019.)

### PRIZNANJA I NAGRADE:

Dekanova nagrada za izvrsnost u akademskoj godini 2013./2014., za najbolju studenticu 1. godine studije

### CERTIFIKATI:

Certifikat za neposredno održavanje života - ILS (engl. Immediate Life Support) Europskog društva za reanimaciju (ERC), Dubrovnik 2018. godine