Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

lek. Łukasz Jaśkiewicz

Lokalizacja i ekspresja akwaporyn (AQPs) w raku niedrobnokomórkowym płuca w podtypie histologicznym: rak gruczołowy (*Adenocarcinoma*)

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: *dr hab. n. med. Agnieszka Skowrońska, prof. UWM*

Promotor pomocniczy: *dr n. med. Ewa Lepiarczyk*

Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Wydział Lekarski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Olsztyn, 2022

SPIS TREŚCI

1. Streszczenie 3
2. Summary 4
3. Wprowadzenie 5
4. Hipoteza i cel badań 10
5. Metodologia i wyniki 11
6. Oświadczenie 26
7. Wnioski 28
8. Piśmiennictwo 29

1. STRESZCZENIE

Akwaporyny (AQPs) są wysoce selektywnymi białkami błonowymi, które odgrywają istotną rolę w transkomórkowym i przeznabłonkowym transporcie wody. W ciągu ostatnich kilkunastu lat opublikowano liczne prace na temat znaczenia i funkcji AQPs u ssaków w tym człowieka, dzięki temu fizjologiczna rola akwaporyn w różnych narządach została dobrze poznana. Ostatnie doniesienia wskazują na znaczącą rolę i udział AQPs w proliferacji, migracji, inwazji i angiogenezie komórek nowotworowych. W szczególności badania nad nowotworami wskazują, że AQPs mogą być potencjalnie wykorzystane jako markery prognostyczne z uwagi na ich udział w procesie onkogenezy, progresji guza i jego inwazji.

Gruczolakorak płuc (ADC) jest najczęstszym z pierwotnych nowotworów płuc występującym u chorych w Europie i Stanach Zjednoczonych. Należy podkreślić, że jest często diagnozowany dopiero w zaawansowanym stadium choroby.

W przedstawionej pracy założono hipotezę badawczą, że poziom ekspresji białek AQP3 i AQP4 w ADC może stanowić czynnik prognostyczny i korelować z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów. Badania miały charakter retrospektywny, przeanalizowano próbki biopsyjne 79 pacjentów. Do oceny ekspresji białek AQP3 i AQP4 zastosowano metodę immunohistochemiczną. Ekspresję białka AQP3 wykazano w błonie cytoplazmatycznej tkanki nowotworowej w 82% próbach (65 z 79). Istotnie statystyczną różnicę w ekspresji AQP3 stwierdzono w tkance nowotworowej w porównaniu z grupą kontrolną (100% vs. 65%, p<0,001). Istotne różnice statystyczne ekspresji AQP3 wykazano także między pacjentami w różnym wieku (średnia 64,6 lat ±8,9 vs. średnia 60,3 lat ±6,5, p=0,017). Ponadto stwierdzono, że niska ekspresja AQP4 w błonie cytoplazmatycznej była skorelowana z bardziej zaawansowaną chorobą, m.in. obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (89% vs. 67%, p=0,046). Niska ekspresja błonowa AQP4 występowała statystycznie istotnie częściej w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką zdrową (92% w porównaniu do 32%, p<0,001).

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że próbki pobrane technikami minimalnie inwazyjnym są odpowiednie do określenia ekspresji AQP3 i AQP4 w ADC, jednakże potencjalna kliniczna wartość prognostyczna badanych akwaporyn wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: AQP3, AQP4; rak płuc; NSCLC; gruczolakorak; biopsje bronchoskopowe

2. SUMMARY

Aquaporins (AQPs) are highly selective channel proteins, which play an important role in transcellular and transepithelial water transport. Recently, numerous articles on the importance and function of AQPs in mammals, including humans, have been published, resulting in a better understanding of their physiological role in various organs. Latest reports indicate a significant role and participation of AQPs in the proliferation, migration, invasion and angiogenesis of neoplastic cells. In particular, cancer studies indicate that AQPs can potentially be used as prognostic markers due to their involvement in the process of oncogenesis as well as tumor progression and invasion.

Lung adenocarcinoma (ADC) is the most common primary lung cancer seen in patients in Europe and the United States. Noteworthy, it is often not diagnosed until the tumor is at an advanced stage.

In the present study, the research hypothesis assumed that the level of AQP3 and AQP4 protein expression in ADC may be a prognostic factor and correlate with patients' clinical and pathological outcomes. The study was retrospective and the biopsy samples of 79 patients were analysed. The protein expression of AQP3 and AQP4 was analysed based on immunohistochemical staining. AQP3 protein expression was observed in the cytoplasmic membrane of the cancer tissue in 82% of lung samples (65 of 79). Significant differences in relative protein expression of AQP3 were noted between advanced age patients compared to younger counterparts (average 64.6 years of age ±8.9 vs. average 60.3 years of age ±6.5, p=0.017). A high expression of AQP3 was significant in cancer tissue when compared to the control group (100% vs. 65%, p<0.001). Low AQP4 membrane expression was correlated with more advanced disease status, e.g. lymph nodes metastases (89% vs. 67%, p=0.046). Whereas a low AQP4 membrane expression was noted as significantly common in cancer tissue compared to non-neoplastic lung tissue (92% vs. 32%, p<0.001).

Based on the conducted studies, it can be concluded that samples collected with minimally invasive techniques are adequate to determine the expression of AQPs in ADC, however, the potential clinical prognostic value of AQP3 and AQP4 expression still requires further studies.

Keywords: AQP3, AQP4; lung cancer; NSCLC; adenocarcinoma; bronchoscopy biopsies

3. WPROWADZENIE

Akwaporyny (AQPs) należą do wysoce konserwatywnej rodziny integralnych białek błonowych (*major intrinsic proteins*). Tworzą kanały o tetramerycznej budowie lub większe polimeryczne struktury, które są odpowiedzialne za transkomórkowy i przeznabłonkowy transport wody oraz substancji nieposiadających ładunku elektrycznego takich jak mocznik, glicerol, czy pirymidyny (Agre et al., 1993, 2002; Gomes et al., 2009; Wagner et al., 2022). Budowa przestrzenna kanału akwaporyny przypomina klepsydrę. Każdy monomer akwaporyny składa się z sześciu domen transbłonowych o budowie α-helisy oraz dwóch specyficznych pętli z konserwatywnym motywem NPA (*ang. asparagine-proline-alanine*; zachowany w ewolucji motyw reszt aminokwasowych: asparagina-prolina-alanina) zawierającym asparaginę, prolinę i alaninę oraz krótkimi α-helisami, tworząc symetryczną strukturę. Pętle tworzą właściwy por, natomiast domeny transbłonowe otaczając go tworzą rusztowanie kanału. Podczas gdy niektóre akwaporyny tworzą pojedyncze tetramery, inne, np. AQP0 i AQP4 tworzą kompleksy wyższego rzędu ułożone w zmienną liczbę tetramerów (Engel & Gaub, 2008; Nicchia et al., 2010). Selektywność transportu cząsteczek przez kanał akwaporyny wynika z jego nieprzepuszczalności dla jonów hydroniowych, a przepuszczalności wyłącznie dla cząsteczek wody. Przechodzenie innych substancji zachodzi zgodnie z ich gradientem hydrostatycznym oraz osmotycznym. AQPs odkryto w komórkach wszystkich badanych organizmów zwierzęcych i roślinnych. U człowieka zidentyfikowano do tej pory 13 izoform (AQP0-12), które podzielono na grupy ze względu na rodzaj substancji jaką transportują. Pierwsza grupa to tzw. klasyczne akwaporyny biorące udział wyłącznie w transporcie cząsteczek wody: AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8; drugą grupę tworzą akwaporyny transportujące oprócz wody także glicerol, tzw. akwagliceroporyny: AQP3, 7, 9, 10; ostatnią grupę stanowią superakwaporyny AQP11, 12A, 12B. Dodatkowo badania prowadzone na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat wykazały, że AQP biorą również udział w transporcie, dwutlenku węgla, tlenku azotu czy amoniaku.

Większość AQPs jest zlokalizowana w błonie komórkowej, niektóre izoformy znajdują się w cytoplazmie, m.in. retikulum endoplazmatyczne (ER), gdzie dostarczanie ich do błony komórkowej jest regulowane i ma kluczowe znaczenie w modulacji transportu wody (Kreida & Törnroth-Horsefield, 2015). AQPs odgrywają zatem kluczową rolę w różnych procesach homeostazy komórkowej, a ich prawidłowe działanie umożliwia zachowanie równowagi osmotycznej wszystkich komórek organizmu. Odpowiadają za: utrzymanie homeostazy wodnej w organizmie, biorą udział w adhezji komórek, szlakach sygnałowych poprzez transport

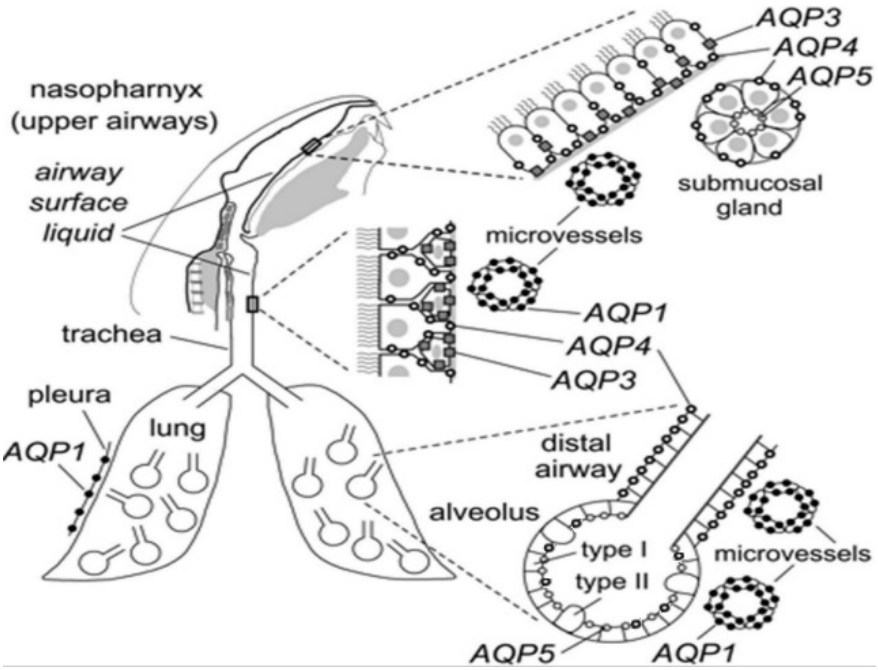
cząsteczek sygnałowych lub sprzęganie z innymi cząsteczkami zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Regulują objętość komórek, ekspresję białek, migracje komórek i apoptozę (Kitchen et al., 2015; Meli et al., 2018). Akwaporyny występują w różnych narządach człowieka m. in. w sercu, płucach, narządzie wzroku, skórze, ośrodkowym układzie nerwowym (Wagner et al., 2022). Na przykład, w erytrocytach wykazano ekspresję AQP1 i AQP3, i ich rolę w dwukierunkowym transporcie przez błony komórkowe zarówno wody, jak i drobnocząsteczkowych substancji (van Hoek & Verkman, 1992; Yang et al., 2001). Z kolei w kanalikach nerkowych resorpcja wody zależna od wazopresyny (AVP) odbywa się przy udziale AQP2 (Nielsen et al., 2002).

Oprócz funkcji fizjologicznych akwaporyny odgrywają rolę w patofizjologii wielu schorzeń. Nadekspresja AQP2 wiąże się z występowaniem zespołu nieadekwatnego wydzielania wazopresyny (SIADH) (Ishikawa et al., 2004). Natomiast, obniżone stężenie AQP3 sprzyja powstawaniu zmian w przebiegu pemfigoidu pęcherzowego (Korany et al., 2019). Z kolei AQP4 w ośrodkowym układzie nerwowym jest związana z patomechanizmem obrzęku mózgu (Papadopoulos & Verkman, 2007; Zador et al., 2009). Natomiast, odkrycie przeciwciał anty-AQP4 w surowicy pacjentów z zapaleniem nerwów wzrokowych (NMO) znacznie ułatwiło diagnostykę tego schorzenia, a stosownie przeciwciał IgG anty-AQP4 stało się podstawowym leczeniem NMO (Jarius & Wildemann, 2013; Petzold et al., 2010). W przypadku infekcji wirusowych o etiologii rotawirusowej dochodzi do zmniejszenia ekspresji AQP1, 4 i 8, co sprzyja utracie wody, a w konsekwencji prowadzi do odwodnienia (M. Cao et al., 2014).

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że poszczególne izoformy AQPs odgrywają znaczącą rolę w procesach migracji, inwazji, przerzutów, proliferacji, lekooporności i późniejszego rokowania w określonych typach raka (Moon et al., 2022). Ze względu na istotną rolę AQPs i ich powszechne występowanie, badania prowadzone są na modelach zwierzęcych, mysich nokautach (*null mice*) pozbawionych genów AQPs oraz *in vitro* i *in vivo* w celu poznania komórkowych mechanizmów odpowiedzialnych m.in. za powstawanie guzów (Dajani et al., 2018; Verkman et al., 2008). Stwierdzono, że AQPs bezpośrednio odgrywają znaczącą rolę w co najmniej trzech dobrze poznanych cechach charakterystycznych dla komórki nowotworowej. Biorą udział w procesie angiogenezy, kluczowym dla dostarczania składników odżywczych i substancji niezbędnych do progresji nowotworu, są zaangażowane w inwazję nowotworu i potencjał przerzutowy, ułatwiają i zwiększają transport reaktywnych form tlenu (ROS) oraz nasilają karcynogenezę i progresję nowotworu (Moon et al., 2022). Wykazano,

że AQP3 jest czynnikiem prognostycznym i ma udowodnioną rolę w progresji raka żołądka poprzez szlak B-kateniny (Zhou et al., 2016). Ponadto zaangażowana jest w zdolność migracji, a tym samym inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych w raku piersi poprzez FGF-2 oraz aktywację szlaku Akt i ERK1/2 (X.-C. Cao et al., 2013; Satooka & Hara-Chikuma, 2016). Natomiast AQP4 odpowiada za migrację i inwazję komórek w glejaku wielopostaciowym i jest czynnikiem predykcyjnym oporności na chemioterapię (Lan et al., 2017a). W przypadku AQP5 wykazano dotychczas jej udział w proliferacji i migracji komórek nowotworowych w raku piersi (Jung et al., 2011). Według Kang i wsp. (2015) wysoka ekspresja AQP5 wraz z wysoką koekspresją AQP1 i AQP3 sprzyja występowaniu przerzutów do węzłów chłonnych w raku gruczołowym jelita grubego.

W odniesieniu do układu oddechowego człowieka dotychczas zidentyfikowano cztery AQP (AQP1, AQP3, AQP4 i AQP5). W badaniu przeprowadzonym przez Kreda i wsp. (2001) po raz pierwszy opisano dystrybucję tkankową i komórkową lokalizację AQPs, które pośredniczą w transporcie wody przez nabłonek dróg oddechowych człowieka. Był to pierwszy krok w kierunku lepszego zrozumienia znaczącej roli AQPs w homeostazie nabłonka dróg oddechowych człowieka. AQP1 została zidentyfikowana w śródbłonku naczyniowym naczyń płucnych w błonie szczytowej i podstawno-bocznej oraz śródbłonku naczyń włosowatych. AQP3 występuje w nabłonku oraz komórkach podstawnych nabłonka tchawicy, oskrzeli i oskrzelików oraz w pneumocytach typu II, natomiast AQP4 w błonie podstawno-bocznej komórek nabłonka walcowatego urzęsionego i pneumocytach typu I. AQP5 zidentyfikowano w błonie szczytowej nabłonka gruczołów podśluzówkowych oraz pneumocytach typu I (Agre et al., 2002; King et al., 2004; Y. Song et al., 2017; Wittekindt & Dietl, 2019).



Yadav, E., Yadav, N., Hus, A., & Yadav, J. S. (2020). Aquaporins in lung health and disease: Emerging roles, regulation, and clinical implications. Respiratory medicine, 174, 106193. (modyfikacja)

Rak płuca jest obecnie drugim najczęstszym nowotworem złośliwym na świecie, rocznie odnotowuje się 2 miliony nowych zachorowań i 1,76 miliona zgonów (Bray et al., 2018). Z całą mocą należy podkreślić, że 5-letnie przeżycie w przypadku raka płuca wynosi tylko 18,4% dla nowo zdiagnozowanych pacjentów, co stanowi najniższy odsetek w porównaniu z innymi nowotworami (SEER Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site. National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://Seer.Cancer.Gov/Statfacts/Html/All.Html). Zgodnie z klasyfikacją WHO nowotwory płuca dzieli się na gruczolakoraka, raka płaskonabłonkowego, raka drobnokomórkowego, raka wielkokomórkowego i raka wielkokomórkowego neuroendokrynnego (Travis et al., 2015; Zappa & Mousa, 2016). Gruczolakorak (ADC), rak płaskonabłonkowy i rak wielkokomórkowy to podtypy tzw. grupy niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), które stanowią 85% wszystkich przypadków raka płuca (Sher et al., 2008). Wśród NSCLC najczęściej występuje ADC, dotyczy 40% wszystkich raków płuc, i jest możliwy do wykrycia we wcześniejszych stadiach przed rozprzestrzenieniem się poza płuca (Zappa & Mousa, 2016). Jednak pomimo postępów w leczeniu medycznym i chirurgicznym, ADC wykazuje dużą zdolność do szybkiej progresji i charakteryzuje się złym rokowaniem (Janssen-Heijnen, 2003).

Analizując obecny stan wiedzy na temat znaczenia AQPs w chorobach płuc z opublikowanych dotychczas prac wynika, że w raku płuc często obserwuje się zmiany w ekspresji AQP1, AQP3, AQP4 i AQP5 (Chae et al., 2008b; Woo et al., 2008; Xia et al., 2014;

Zhang et al., 2010). Prowadzone były m. in. badania *in vitro* z użyciem linii komórkowych raka płuc (Ben et al., 2008; Elkhider et al., 2020; Hoque et al., 2006; Wei & Dong, 2015), jak również badania na tkankach pobranych w trakcie zabiegów operacyjnych (Liu et al., 2007; MacHida et al., 2011; Warth et al., 2011). Dużo prac poświęcono AQP5 w NSCLC, która może być powiązana z progresją choroby (Jo et al., 2016; T. Song et al., 2015). Ponadto wykazano pozytywną korelację tej izoformy z zaawansowaniem przerzutów guza do węzłów chłonnych, co wskazuje na znaczącą rolę AQP5 w progresji nowotworu (Z. Q. Zhang et al., 2011).

AQP3 jest niezbędna do rozwoju struktur lipidowych poprzez dostarczanie glicerolu, który jest również substratem do produkcji adenozyno-5′-trifosforanu (ATP), ponadto bierze udział w proliferacji i wzroście komórek (Bienert & Chaumont, 2014). Zwiększoną ekspresję AQP3, a tym samym jej wpływ na proces kancerogenezy opisano dotychczas m. in. w przypadku raka jelita grubego, jajnika, piersi i trzustki (Marlar et al., 2017). Natomiast AQP4 odgrywa kluczową rolę w homeostazie wodnej ośrodkowego układu nerwowego i regulacji bariery krew-mózg (BBB; *ang. blood–brain barrie*) w migracji astrocytów, tworzeniu blizn glejowych (Nagelhus & Ottersen, 2013). W procesie onkogenezy najlepiej udokumentowany jest wpływ AQP4 na nowotwory OUN, w szczególności glejaka wielopostaciowego (Lan et al., 2017b; Levy et al., 2019).

4. HIPOTEZA I CEL BADAŃ

W oparciu o dotychczasowe dane literaturowe, dotyczące znaczenia prognostycznego AQPs w niektórych nowotworach założyliśmy hipotezę: *Tkanki pochodzące z rutynowo pobieranych biopsji (badanie bronchofiberoskopowe) mogą posłużyć do oznaczenia ekspresji AQP3 i AQP4 w celach prognostycznych u pacjentów z ADC.* Jest to preferowana metoda diagnostyczna stosowana w przypadku zmian zlokalizowanych wewnątrz oskrzeli, które są blisko danego oskrzela lub w przypadku krwioplucia.

Za główny cel niniejszej pracy przyjęto ocenę poziomu ekspresji białek AQP3 i AQP4 z analizą wartości prognostycznej w powiązaniu z parametrami klinicznopatologicznymi, w odniesieniu do przeżycia pacjentów ADC.

Cel ten zrealizowano w oparciu o niżej wymienione cele szczegółowe:

1. Oznaczenie ekspresji wymienionych powyżej akwaporyn w tkankach pochodzących z rutynowo pobieranych biopsji w celach prognostycznych u pacjentów z ADC.
2. Określenie korelacji poziomu ekspresji białek AQP3 i AQP4 w raku gruczołowym płuc z danymi kliniczno-patologicznymi.

5. METODOLOGIA I WYNIKI

Niniejsza rozprawa doktorska została oparta na oryginalnej pracy opublikowanej w 2022 roku, dotyczącej lokalizacji oraz ekspresji AQP3 i AQP4 u pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem gruczołowym płuca w korelacji z danymi klinicznymi, **Journal of Clinical Medicine**; Jaskiewicz L et al., *Expression Profiles of AQP3 and AQP4 in Lung Adenocarcinoma Samples Generated via Bronchoscopic Biopsies.* 11, 5954., DOI: 10.3390/jcm11195954; IF_{2021}=4,964.

Dokonano analizy retrospektywnej materiału biopsyjnego pobranego od pacjentów hospitalizowanych w latach 2010-2012 w Samodzielnym Publicznym Zespole Gruźlicy i Chorób w Olsztynie (obecnie Warmińsko-Mazurskie Centrum Chorób Płuc w Olsztynie). Dane kliniczne zostały zebrane na podstawie dokumentacji medycznej. Łącznie przenalizowano 466 przypadków raka płuca, z czego w 166 przypadkach potwierdzono rozpoznanie raka gruczołowego płuca. Ostatecznie po wnikliwej analizie ilości oraz jakości pozostałego materiału biopsyjnego w bloczkach parafinowych do badań włączono 79 pacjentów. Grupę kontrolną stanowili pacjenci, którzy zostali poddani badaniu bronchoskopowemu z innych przyczyn, a w materiale histopatologicznym nie stwierdzono obecności raka.

Do określenia poziomu ekspresji wybranych akwaporyn zastosowano metodę immunohistochemii z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu do barwień BenchMark (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA), co pozwoliło uzyskać takie same warunki barwienia dla wszystkich analizowanych tkanek, powtarzalność, precyzję i dokładność otrzymanych barwień. Do oceny wyniku barwienia zastosowano metodę półilościową obejmującą zarówno intensywność barwienia, jak i procent zajętych komórek dla uzyskania najbardziej wiarygodnych i miarodajnych wyników. Wzorowaliśmy się na badaniach Bellezza et al., 2017 i Klein et al., 1999, 2001. Przyjęto skalę porządkową 0 – brak barwienia, 1 – słabe barwienie, 2 – umiarkowane barwienie, 3 – silne barwienie, natomiast odsetek wybarwionych komórek mierzono jako zmienną ciągłą (0-100%) i oceniono następująco: 0 – brak barwienia, 1 – <33%, 2 – 34-66%, 3 – >67%. Wartość dla dodatnio wybarwionych komórek została następnie pomnożona przez wartość intensywności barwienia. Wyniki punktacji były następnie oceniane półilościowo. Ekspresję AQP3 i AQP4 zdefiniowano jako „niską ekspresję" z punktami 0-2 i jako „wysoką ekspresję" z punktami, odpowiednio 3-9. Wybarwiony materiał został poddany niezależnej ocenie przez 2 specjalistów w dziedzinie patomorfologii.

W analizie statystycznej wykorzystano test χ^2 oraz test t-studenta do oceny zależności między ekspresją AQP3 i AQP4, a danymi kliniczno-patologicznymi. Do oceny normalności rozkładu dla wieku wykorzystano test Shapiro-Wilka. Prawdopodobieństwo przeżycia oszacowano metodą Kaplana-Meiera, a różnice w medianie przeżycia porównano za pomocą testu log-rank. Jedno- i wielozmienne predyktory śmiertelności ogólnej oszacowano za pomocą analizy regresji Coxa. Istotność statystyczną uznano przy wartości p-value < 0,05.

Obecność AQP3 stwierdzono w błonie cytoplazmatycznej tkanki nowotworowej w 82% zbadanych próbek. Istotne różnice ekspresji białka AQP3 wykazano porównując średni wiek pacjentów z „niską ekspresją AQP3" z grupą z „wysoką ekspresją AQP3" (średnia 64,6 lat ±8,9 vs. średnia 60,3 lat ±6,5, p=0,017). Wysoka ekspresja AQP3 była statystycznie istotnie wyższa w tkance nowotworowej w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,001), podczas gdy niska ekspresja błonowa AQP4 występowała częściej w tkance nowotworowej w porównaniu z nienowotworową tkanką płuc (p<0,001). Co więcej, niska ekspresja błonowa AQP4 była dodatnio skorelowana z bardziej zaawansowanym stadium choroby, m.in. obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (p=0,046).

Nasze badanie miało pewne ograniczenia i wymagało retrospektywnej interpretacji. Biorąc pod uwagę, że ustalenia opierają się na ograniczonej liczbie próbek wyniki takich analiz należy traktować z ostrożnością. Po pierwsze wykonano je w jednym szpitalu, a liczba przypadków była ograniczona. Po drugie, chociaż materiał pobrany podczas bronchoskopii lub przezklatkowej biopsji guzów płuca był analizowany przez doświadczonych patologów, nie można całkowicie wykluczyć zmienności między obserwatorami. Ponadto większość pacjentów była w zaawansowanym stadium choroby i nie było dostępu do materiału pochodzącego z resekcji całego guza.

Wartość prognostyczna ekspresji AQP3 i AQP4 dla próbek uzyskanych technikami minimalnie inwazyjnymi uzasadnia zasadność dalszych badań tym bardziej, że nasze badania wykazały, że próbki te były wystarczające do określenia ekspresji badanych AQPs w ADC. Ponadto rola AQPs w różnych typach nowotworów wskazuje na potrzebę ustalenia, czy ich izoformy są odpowiednimi celami terapeutycznymi i/lub diagnostycznymi, ze względu na ich kluczowe znaczenie w wielu procesach patofizjologicznych zachodzących w płucach.

Journal of
Clinical Medicine

MDPI

Article

Expression Profiles of AQP3 and AQP4 in Lung Adenocarcinoma Samples Generated via Bronchoscopic Biopsies

Lukasz Jaskiewicz [1,*], Karolina Hejne [2], Blazej Szostak [3], Karolina Osowiecka [4], Mariusz T. Skowronski [5], Ewa Lepiarczyk [1], Anna Doboszynska [6], Marta Majewska [1], Pawel Kordowitzki [5] and Agnieszka Skowronska [1,*]

1 Department of Human Physiology and Pathophysiology, School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, al. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn, Poland
2 Department of Pathomorphology and Forensic Medicine, School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, ul. Zolnierska 18, 10-561 Olsztyn, Poland
3 Provincial Specialist Hospital, ul. Zolnierska 18, 10-561 Olsztyn, Poland
4 Department of Psychology and Sociology of Health and Public Health, School of Public Health, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, al. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn, Poland
5 Department of Basic and Preclinical Sciences, Institute for Veterinary Medicine, Nicolaus Copernicus University, ul. Gagarina 1, 87-100 Torun, Poland
6 Department of Pulmonology, School of Public Health, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, ul. Jagiellońska 78, 10-357 Olsztyn, Poland
* Correspondence: lukasz.jaskiewicz@uwm.edu.pl (L.J.); agnieszka.skowronska@uwm.edu.pl (A.S.)

Abstract: Aquaporins (AQPs) are highly conserved channel proteins which are mainly responsible for the exchange of water and small molecules and have shown to play a pivotal role in the development and progression of cancer. Lung adenocarcinoma is the most common primary lung cancer seen in patients in Europe and the United States. However, in patients it is often not diagnosed until the advanced tumor stage is present. Previous studies provided strong evidence that some members of the AQP family could serve as clinical biomarkers for different diseases. Therefore, we aimed to investigate how AQP3 and AQP4 protein expression in lung adenocarcinoma (ADC) biopsy samples correlate with clinical and pathological parameters. The protein expression of AQP3 and AQP4 was analyzed based on immunohistochemical staining. AQP3 protein was observed in the cytoplasmic membrane of cancer tissue in 82% of lung samples. Significant differences in relative protein expression of AQP3 were noted between advanced age patients compared to younger counterparts ($p = 0.017$). A high expression of AQP3 was significant in cancer tissue when compared to the control group ($p < 0.001$), whereas a low AQP4 membrane expression was noted as significantly common in cancer tissue compared to non-neoplastic lung tissue ($p < 0.001$). Moreover, a low AQP4 membrane expression was positively correlated with a more advanced disease status, e.g., lymph node metastases ($p = 0.046$). Based on our findings, AQP3 and AQP4 could be used as biomarkers in ADC patients.

Keywords: AQP3; AQP4; aquaporin; lung cancer; NSCLC; adenocarcinoma; bronchoscopy biopsies

check for updates

Citation: Jaskiewicz, L.; Hejne, K.; Szostak, B.; Osowiecka, K.; Skowronski, M.T.; Lepiarczyk, E.; Doboszynska, A.; Majewska, M.; Kordowitzki, P.; Skowronska, A. Expression Profiles of AQP3 and AQP4 in Lung Adenocarcinoma Samples Generated via Bronchoscopic Biopsies. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5954. https://doi.org/10.3390/jcm11195954

Academic Editor: Marco Scarci

Received: 15 September 2022
Accepted: 8 October 2022
Published: 9 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Members of the aquaporin (AQP) family are expressed in different cells, tissues, and organs, and as channel proteins they are responsible for the exchange of water, small molecules, and, in consequence, they maintain cell stability and integrity [1–3]. Not only in physiological conditions do AQPs play a role but also in the pathophysiological conditions of the human body, when the water equilibrium is altered [4,5]. To date, four AQPs (AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5) have been identified in the human respiratory tract [6–8]. Due to their before-mentioned critical imperative role in cell stability and integrity, it appears logical that AQPs, which also regulate numerous downstream effector signaling molecules,

are involved in cancer development and progression. In the last decades, compelling evidence has been provided underpinning the contribution of AQPs in tumor biology [9–13]. In consequence, AQPs have been suggested as a possible target for cancer treatment and potential predictive biomarkers.

Lung cancer is the second most common malignant tumor worldwide, counting around 2 million cases and 1.76 million deaths per year [14]. The 5-year survival rate of lung cancer patients is only 18.4%, which reflects the lowest rate compared to other cancers. Although considerable improvement in treatment strategies for lung cancer has been reached over the last 40 years, the 5-year survival rate of lung cancer patients has minimally declined [15]. Lung epithelial tumors are commonly divided into adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, small-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and large-cell neuroendocrine carcinoma according to the WHO classification of lung tumors [16–18]. Noteworthy, lung adenocarcinoma (ADC) shows a high ability to progress rapidly and exhibits a poor prognosis [19]. Like all types of lung cancers, squamous cell carcinoma and large-cell carcinoma, are strongly associated with smoking and are diagnosed in approximately 30% and 10% of all lung cancer cases, respectively [20–23]. Previous studies partially deciphered the important role of certain AQP isoforms, for example in ADC [24], or in lung cancer cell lines [25–27]. More precisely, high protein levels of the AQP3 isoform were identified in proximal and terminal bronchioles and in the apical membrane of all columnar cells facing the lumen of type I and II pneumocytes [6].

Based on the before-mentioned facts, our study intended to shed light on the role of specifically AQP3 and AQP4 in ADC to extend the knowledge and clarify their value as potential predictive and/or diagnostic biomarkers. Herein, we analyzed tumor biopsy samples of 79 ADC patients at different clinical stages (CS): CS I, 3 patients; CS II, 6 patients; CS III, 16 patients; and CS IV, 54 patients. The samples were generated via bronchofiberoscopy or thoracic biopsy and further analyzed via an immuno-histochemical approach. Noteworthy, to our best knowledge, we are the first group evaluating very small biopsy specimens acquired through bronchoscopy in ADC patients with regard to the protein expression of AQP3 and AQP4.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Patient Characteristics

Herein, we have retrospectively analyzed biopsy samples (material generated either from bronchoscopy or thoracic biopsies) of lung adenocarcinomas obtained at the Center for Pulmonary Diseases in Olsztyn (Poland) between 2010 and 2012. Clinical and pathologic data was generated from medical records. Biopsy tissue samples were formalin-fixed and paraffin-embedded. Two pathologists (K.H. and B.S.) examined the histological slides of pre-selected cases independently, in a blinded fashion, and re-confirmed the diagnosis of ADC according to the WHO classification. A total of 466 lung cancer cases were prescreened, of which 165 cases were diagnosed with ADC. For the final evaluation 79 cases were taken into consideration. The control group consisted of patients without cancer, who underwent bronchoscopy or biopsy for other reasons. The ADC patients were divided according to their sex into the three age groups. All experiments of this retrospective study were performed in accordance with the Bioethics Committee localized at the School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland (BC approval No. 3/2018 from 11 January 2018). Clinical and pathological features of patients included in this study are shown in Table 1.

2.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using the BenchMark automated staining machine (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA). Different dilutions of antibodies, time, and temperature of incubation were tested in a pre-study. Based on this, antibodies against AQP 3 and 4 were used at a dilution of 1:200; with an affinity-purified rabbit polyclonal antibody against AQP3 (Biorbyt Ltd., orb47955, Cambridge, UK) and an

affinity-purified rabbit polyclonal antibody against AQP4 (Affinity Biosciences; AF5164, Cincinnati, OH, USA). Tissue sections (thickness of 4 µm) were deparaffinized in xylene, rehydrated in three graded alcohol chambers, and treated with 3% hydrogen peroxide in methanol at room temperature for the blocking of endogenous peroxidase activity. The avidin–biotin–peroxidase technique was used for the visualization of AQP3 and AQP4 antibodies (Agilent Technologies, Inc., K5005, Dako REAL Detection System, Hamburg, Germany), followed by a chromogen detection with diaminobenzidine (DAB). As a positive control for AQP3, renal tissue samples, and for AQP4 gastric tissue samples were used (Figures 1E and 2E, respectively). In addition, immunoglobulins from non-immunized rabbits were used as a negative control (dilution 1:200, Figures 1D and 2D, respectively). The microscopic analysis was carried out using an Olympus light microscope (BX41, Tokyo, Japan), and pictures were taken with an Olympus XC50 (Tokyo, Japan) integrated camera.

Table 1. Clinicopathological features of patients diagnosed with ADC in this study.

Variables		*n*	(%)
Total number of patients		79	
Mean Age ± SD, years (range)		61.8 ± 7.7 (47–81)	
Gender			
	Female	27	(34.2)
	Male	52	(65.8)
CS			
	I	3	(3.8)
	II	6	(7.6)
	III	16	(20.2)
	IV	54	(68.4)
T			
	Tx	2	(2.5)
	T0	1	(1.3)
	T1	12	(15.2)
	T2	29	(36.7)
	T3	4	(5.1)
	T4	26	(32.9)
	no data	5	(6.3)
N			
	N0	10	(12.7)
	N1	7	(8.9)
	N2	38	(48.1)
	N3	22	(27.8)
	no data	2	(2.5)
M			
	M0	26	(32.9)
	M1	53	(67.1)
Intention to treat			
	radical	19	(24.0)
	palliative	59	(74.7)
	no consent	1	(1.3)
Radical treatment	operation + adjuvant radiochemotherapy	8	(42.1)
	radiochemotherapy	7	(36.8)
	operation	4	(21.1)
Palliative treatment	palliative chemotherapy	41	(69.5)
	palliative radiotherapy	5	(8.5)
	molecular targeted therapy	4	(6.8)
	symptomatic treatment	3	(5.1)
	no data	6	(10.1)

n—number; ±SD—standard deviation; CS—clinical stage; T—primary tumor; N—regional lymph nodes; M—distant metastasis.

2.3. Scoring System for Immunohistochemistry Results

A semiquantitative immunohistochemistry score (based on the staining intensity and the percentage of stained cells) was established according to a previously published scoring system [28–31]. Briefly, staining intensity was defined using an ordinal scale (0—no staining, 1—weak staining, 2—moderate staining, 3—strong staining), while the percentage

of stained cells was measured as a continuous variable (0–100%) and was graded as follows: 0—no staining, 1—<33%, 2—34–66%, 3—>67%. The value for positively stained cells was then multiplied by the value for staining intensity. The scoring results were further evaluated by a semiquantitative approach in which AQP3 and AQP4 expression was defined as "low expression" with scores 0–2 and as "high expression" with scores 3–9. All stained slides were examined in a blinded fashion by two pathologists (K. H. and B. S.).

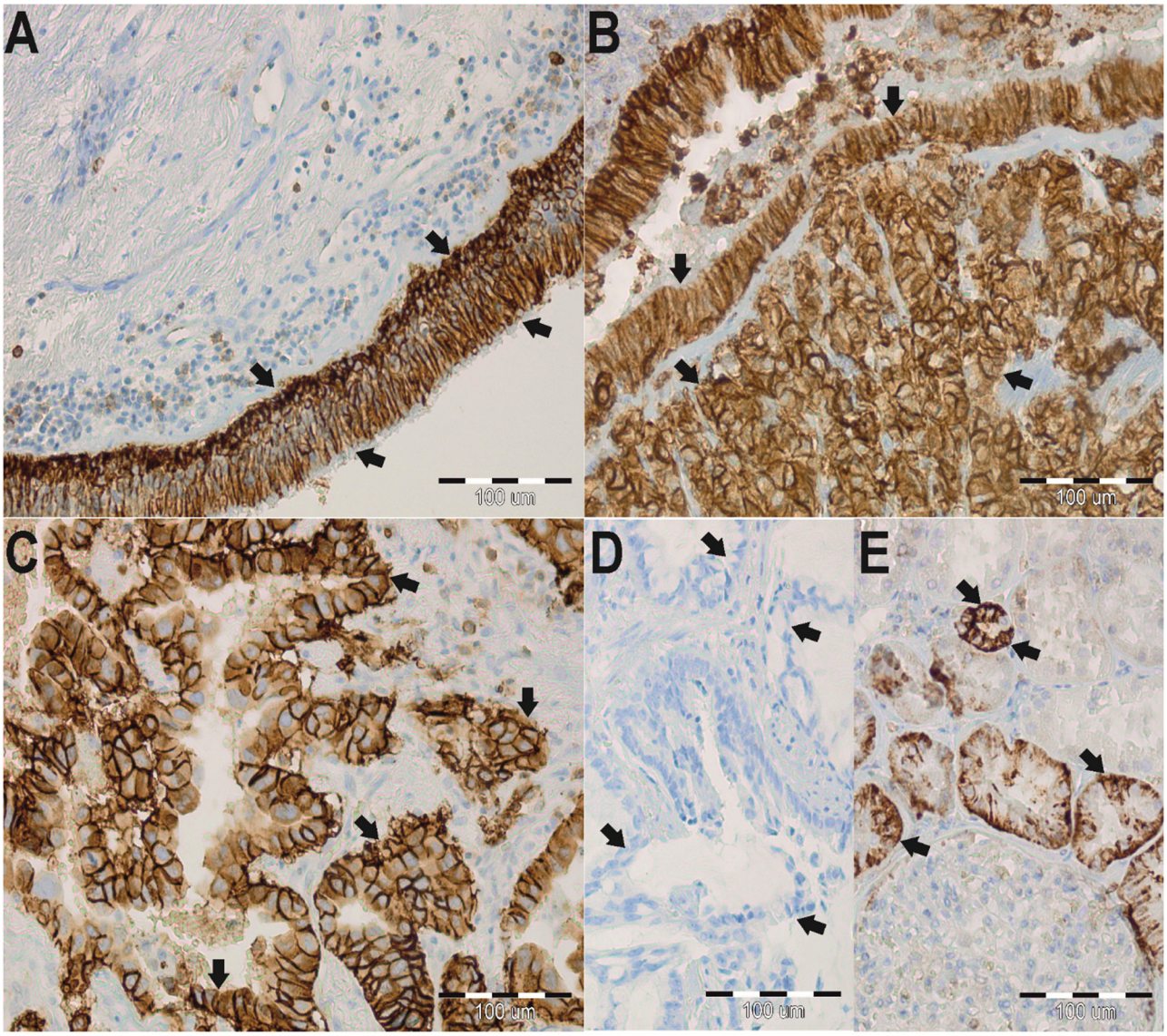


Figure 1. Immunohistochemistry (IHC) staining of aquaporin 3 (AQP3) in paraffin-embedded sections of the lung adenocarcinoma (ADC) from humans. Anti-AQP3 antibody labels in non-neoplastic lung tissues. Arrows indicate the localization of the basolateral plasma membranes of surface epithelium in whole plasma membranes of basal cells of the bronchus (**A**). Anti-AQP3 antibody labels in the cancer lung tissues. Arrows indicate the localization of AQP3 in the cytoplasmic membrane in the cancer cells (**B**,**C**). No staining was observed when isotype-specific immunoglobulins from non-immunized rabbits were used instead of the primary antibody (negative control) (**D**). Immunoperoxidase labeling of AQP3 from the human kidney (positive control) (**E**). The labeling is seen in the basolateral plasma membrane of the renal collecting ducts. The blue color represents a positive staining for the hematoxylin counterstain, and the brown color represents positive AQP3 stain.

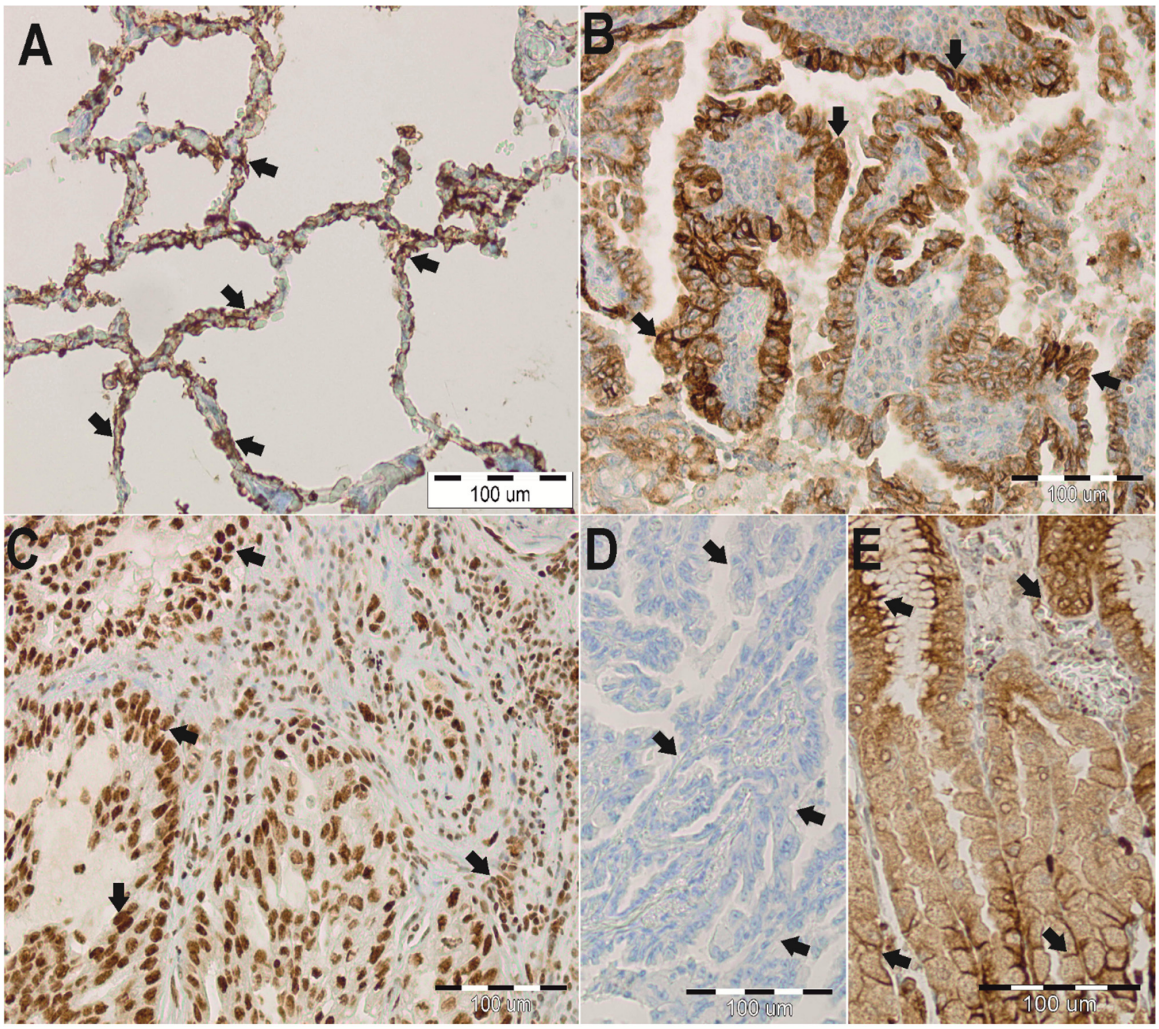


Figure 2. Immunohistochemistry (IHC) staining of aquaporin 4 (AQP4) in paraffin-embedded sections of the lung adenocarcinoma (ADC) from humans. Anti-AQP4 antibody labels in non-neoplastic lung tissues. Arrows indicate the localization of the type I pneumocytes and macrophages (**A**). Anti-AQP4 antibody labels in the cancer lung tissues. Arrows indicate the localization of AQP4 in the cytoplasmic membrane in the cancer cells (**B**) and aberrant nuclear reaction in cancer cells (**C**). No staining was observed when isotype-specific immunoglobulins from non-immunized rabbits were used instead of the primary antibody (negative control) (**D**). Immunoperoxidase labeling of AQP4 from the human stomach (positive control) (**E**). The labeling is seen in the basolateral plasma membrane of the surface epithelial cells and parietal cells of gastric gland cells. The blue color represents a positive staining for the hematoxylin counterstain, and the brown color represents positive AQP4 stain.

2.4. Statistical Analysis

Descriptive statistics for group characteristics were used. For the comparison between the AQPs expression profiles, and the clinicopathological findings, the χ^2 test and *t*-student test were used. The normality of the age distribution was tested using the Shapiro–Wilk test. Survival probabilities were estimated by Kaplan–Meier method and the differences in survival median were compared using the log-rank test. Univariable and multivariable predictors of overall mortality were estimated through Cox regression analysis. Univariate variables with $p \leq 0.1$ were included in the multivariable model. Overall survival (OS) was defined as the time from histopathological diagnosis to death. A p-value < 0.05 was considered to be significant. The analysis was conducted using Statistica, version 13 (http://statistica.io, accessed on 21 December 2021) TIBCO Software Inc., Krakow, Poland (2017).

3. Results

3.1. Immunohistochemistry Results for AQP3 and AQP4

Immunohistochemical stainings were performed to determine the localization and expression profile of AQP3 and AQP4 in ADC samples (Figure 3). Based on the analysis of non-neoplastic lung tissue, AQP3 expression was detected in the basolateral plasma membranes of surface epithelium, in plasma membranes of basal cells of the bronchus, and also in the apicolateral surfaces of type II pneumocytes and macrophages (Figure 1A). AQP4 was expressed in type I pneumocytes and macrophages. Although there was no AQP4 expression in the membranes of type I pneumocytes and macrophages, an aberrant nuclear-cytoplasmic AQP4 expression was detected (Figure 2A). In 82% of analyzed ADC samples, AQP3 was observed in the cytoplasmic membrane (Figure 1B,C).

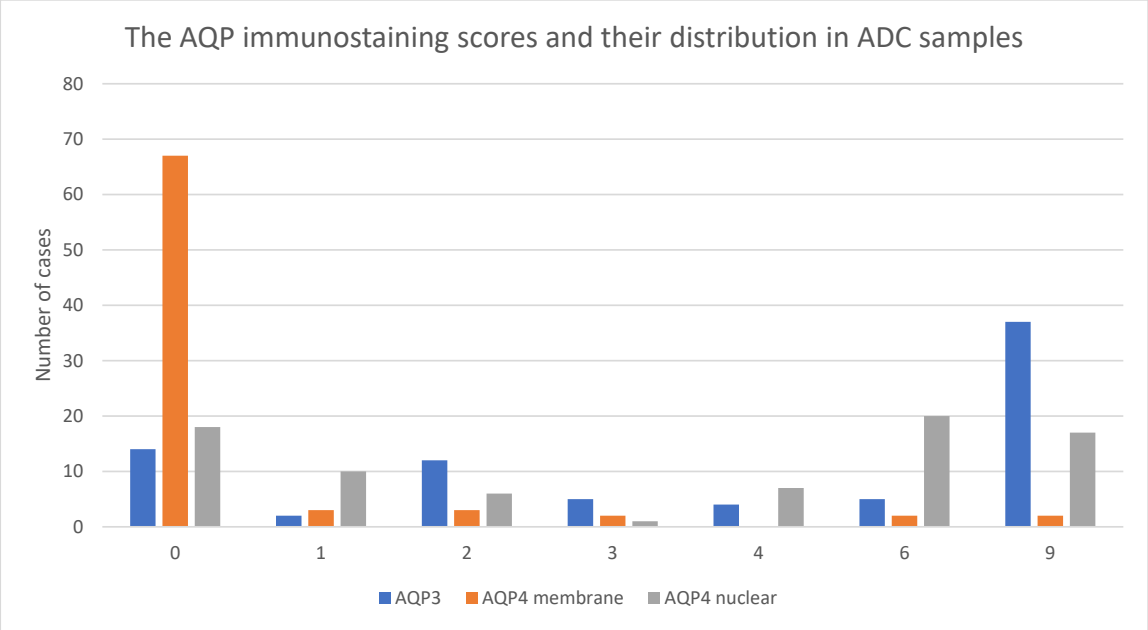


Figure 3. Bar diagram representing the number of lung adenocarcinoma (ADC) samples (Y axis) with low (0–2) or high (3–9) immunostaining scores (X axis) of aquaporin 3 (AQP3; blue bars), aquaporin 4 (AQP4) expressed in the cytoplasmic membrane (orange bars) or AQP4 expressed in the nucleus (grey bars).

A high immunoreactivity of AQP3 (scores 3–9) was observed in 100% of control samples, thus significantly different compared to a 65% expression in ADC samples ($p < 0.001$). When comparing the mean age of patients from the "low AQP3 expression" group with the "high AQP3 expression" group, a significant difference could be revealed (64.6 ± 8.9 years of age vs. 60.3 ± 6.5 years of age, $p = 0.017$). Interestingly, a significant ($p = 0.017$) lower relative AQP3 expression (scores 0–2) was detected in older patients (average 64.6 ± 8.9 years of age) compared to younger counterparts (average age 60.3 ± 6.5 years). It is worth noting that AQP3 expression was not influenced either by gender or tumor characteristics (Table 2). However, a relative AQP4 protein expression was observed in the cytoplasmic membrane of cancer cells in 16% of ADC samples. Furthermore, in 77% of the analyzed samples, we detected an aberrant nuclear reaction in cancer cells of varying intensity (Figure 2B,C). Interestingly, a low AQP4 expression (scores 0–2) was significantly ($p < 0.001$) more common in ADC samples (92%) than in samples of the control group (32%). Furthermore, a low AQP4 membrane expression was present in 89% of ADC samples, compared to a high AQP4 expression (scores 3–9), and it was correlated with worse cancer-related characteristics with lymph nodes metastases, which was a significant difference ($p = 0.046$). However, no differences were identified between AQP4 membrane expression and age, gender, or TNM stages (Table 2).

Table 2. Relationship between aquaporin 3 (AQP3) and aquaporin 4 (AQP4) and clinical-/pathological features of patients diagnosed with lung adenocarcinoma (ADC) in this study.

Variables	AQP3 Score					AQP4 Membrane Score					AQP4 Nuclear Score				
	Low		High		*p*-Value	Low		High		*p*-Value	Low		High		*p*-Value
	n	(%)	*n*	(%)		*n*	(%)	*n*	(%)		*n*	(%)	*n*	(%)	
Mean Age ±SD (years)	64.6 ± 8.9		60.3 ± 6.5		0.017	61.6 ± 7.5		64.5 ± 9.9		0.38	62.6 ± 8.2		61.2 ± 7.3		0.44
Gender															
Female	8	(29)	19	(37)	0.44	24	(33)	3	(50)	0.40	15	(44)	12	(27)	0.11
Male	20	(71)	32	(63)		49	(67)	3	(50)		19	(56)	33	(73)	
CS															
I–II	3	(10)	6	(12)	0.39	7	(10)	2	(33)	0.21	6	(18)	3	(7)	0.31
III	8	(29)	8	(16)		15	(20)	1	(17)		6	(17)	10	(22)	
IV	17	(61)	37	(72)		51	(70)	3	(50)		22	(65)	32	(71)	
T															
T1	8	(32)	4	(9)	0.06	10	(15)	2	(50)	0.20	6	(21)	6	(14)	0.70
T2	7	(28)	22	(48)		27	(40)	2	(50)		13	(45)	16	(38)	
T3	2	(8)	2	(4)		4	(6)	0	(0)		1	(3)	3	(7)	
T4	8	(32)	18	(39)		26	(39)	0	(0)		9	(31)	17	(41)	
N															
N0	2	(7)	8	(16)	0.74	8	(11)	2	(33)	0.046	7	(21)	3	(7)	0.07
N1	3	(11)	4	(8)		5	(7)	2	(33)		5	(15)	2	(5)	
N2	14	(52)	24	(48)		37	(52)	1	(17)		14	(43)	24	(54)	
N3	8	(30)	14	(28)		21	(30)	1	(17)		7	(21)	15	(34)	
M															
M0	11	(39)	15	(29)	0.37	22	(30)	4	(67)	0.07	13	(38)	13	(29)	0.38
M1	17	(61)	36	(71)		51	(70)	2	(33)		21	(62)	32	(71)	
Intention to treat															
radical	8	(30)	11	(22)	0.43	16	(22)	3	(50)	0.13	9	(27)	10	(23)	0.70
palliative	19	(70)	40	(78)		56	(78)	3	(50)		25	(73)	34	(77)	

±SD—standard deviation; low AQP—0–2 scores, high AQP—3–9 scores.

3.2. Correlation among AQPs Expression, Outcome and Clinical Factors

The 2-year overall survival (OS) rate of patients with low and high AQP3 expression did not differ significantly (36% vs. 22%, respectively, $p = 0.32$). There were no significant differences in OS among samples with low or high AQP4 membrane (23% vs. 67%, respectively, $p = 0.09$; and nuclear expression 29% vs. 25% $p = 0.53$; Figure 4A–C). In the uni- variate analysis, a significant ($p < 0.05$) influence of tumor size, distant metastases, and treatment intention on OS was detected. The more advanced the disease, the worse the prognosis for the patients (Table 3).

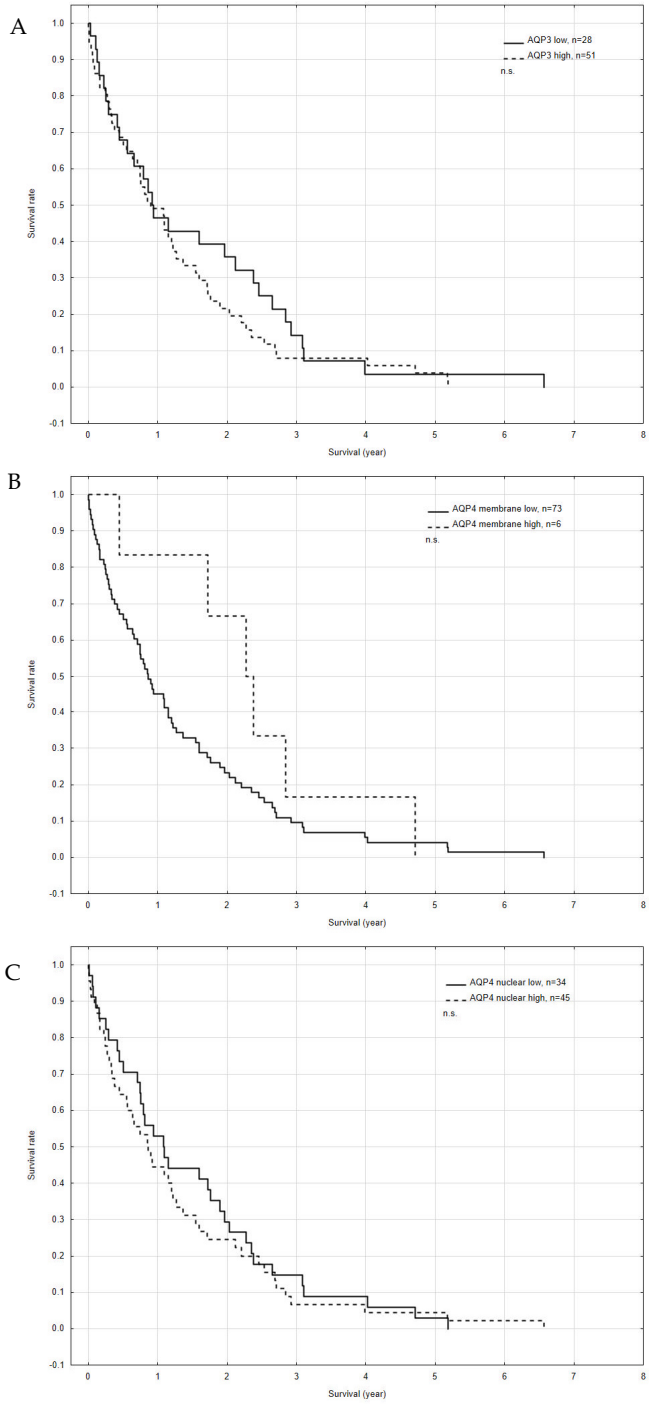


Figure 4. Kaplan–Meier survival curves for overall survival (OS) according to the expression of aquaporin 3 (AQP3) (**A**); aquaporin 4 (AQP4) membrane expression (**B**); and AQP4 nuclear expression (**C**). n.s.—no significance.

Table 3. Table shows the univariate and multivariate analyses for overall survival (OS) of all patients suffering from lung adenocarcinoma (ADC).

	Univariate OS Analysis			Multivariate OS Analysis		
Variables	**HR (95% CI)**		***p***	**HR (95% CI)**		***p***
Age	1.01	(0.98–1.04)	0.54			
Gender						
Female	1.00	Reference				
Male	1.44	(0.90–2.30)	0.13			
CS						
I–II	1.00	Reference		1.00	Reference	
III	0.82	(0.35–1.93)	0.66	0.72	(0.26–1.99)	0.53
IV	2.37	(1.15–4.86)	0.02	-	-	
T						
T1	1.00	Reference		1.00	Reference	
T2	1.42	(0.70–2.87)	0.33	1.48	(0.69–3.16)	0.31
T3	3.70	(1.12–12.23)	0.03	2.79	(0.70–11.14)	0.15
T4	2.04	(0.99–4.19)	0.05	1.44	(0.62–3.33)	0.40
N						
N0	1.00	Reference				
N1	1.00	(0.38–2.64)	1.00			
N2	1.01	(0.50–2.04)	0.99			
N3	1.70	(0.80–3.63)	0.17			
M						
M0	1.00	Reference		1.00	Reference	
M1	2.54	(1.54–4.19)	<0.001	1.48	(0.42–5.23)	0.54
Intention to treat						
radical	1.00	Reference		1.00	Reference	
palliative	2.34	(1.37–4.01)	<0.001	1.27	(0.51–3.13)	0.61
AQP 3						
low	1.00	Reference				
high	1.26	(0.78–2.01)	0.34			
AQP 4 membrane						
low	1.00	Reference				
high	0.57	(0.24–1.31)	0.18			
AQP 4 nuclear						
low	1.00	Reference				
high	1.15	(0.73–1.80)	0.54			

HR—hazard ratio; CI—confidence interval; low aquaporin (AQP)—0–2 scores; high AQP—3–9 scores.

4. Discussion

Herein, we investigated the protein expression profiles of AQP3 and AQP4 in neoplastic and non-neoplastic lung tissue biopsy samples. The first difference, which is worth emphasizing, between our approach and those from previous research groups is the way of sample generation. So far, samples have been obtained during surgery from patients suffering from ADC. There is no doubt that these studies have significantly contributed to a better understanding of AQP's role in cancers. However, biopsy samples as those in our current study have rarely been studied directly. According to standard procedures in many clinics, it is important to collect material for histological examination, once lung cancer is suspected. During this microscopic evaluation, the type and subtype of the tumor are determined, and if mandatory, further molecular tests are performed [32]. In the presented cases, bronchoscopy was a routine examination. Furthermore, biopsies taken under bronchoscopic control are often the only way to obtain specimens for the diagnostic purposes. Nevertheless, the choice of an adequate diagnostic test depends on the tumor localization [33,34].

With regard to our initial question, if AQPs could be used as reliable prognostic indicators in ADC, it has to be said that, for instance, in hepatic cancer, the immunohistochemical detection of AQP1 represents a reliable way to differentiate between cholangiocarcinoma,

hepatocellular carcinoma, and metastatic colorectal carcinomas. Moreover, evaluating AQP1 concentrations in the urine of patients suffering renal cell carcinoma has shown to be a helpful biomarker [35,36]. A decreased overall survival of cutaneous melanoma patients has been linked to a positive AQP1 expression, and an increased AQP3 expression in skin cancer patients [37–39] and lung cancers [40] has been detected. In line with the previous mentioned studies, we detected significant ($p < 0.001$) high AQP3 expression levels in 65% of all ADC biopsies. Further, we showed that AQP3 was distinctively expressed in the cytoplasmic membrane of cancer cells in 65 of 79 lung carcinoma biopsies (Figure 1B,C), whereas in non-neoplastic lung samples, AQP3 was localized in basolateral plasma membranes of the surface epithelium (Figure 1A). Interestingly, AQP3 expression was present regardless of gender and tumor characteristics. However, no significant correlation was found between the 2-year overall survival (OS) of patients and the AQP3 expression. We observed an interesting tendency that patients with a low AQP3 expression in ADC had a better overall survival rate (31%) than patients with high AQP3 expression (50%). The before-mentioned findings are comparable to previous research in which AQP3 has been suggested to have a significant role in tumor biology as it alters cellular signaling, encourages tumor development, and contributes to proliferation, epithelial–mesenchymal transition and metastasis [13,41,42].

Concerning the question of how AQPs facilitate cell migration, it appears likely that water entry into the leading edge of the cell enhances the formation of the so-called lamellipodium [43]. So far, there is a clear consensus in the literature that AQP3 is involved in the development of lipid structures by providing glycerol and that AQP3 is involved in cell proliferation and growth by encouraging ATP and therefore may play a key role in tumor energy metabolism [44,45]. Moreover, AQP3 appears to be involved in the process of angiogenesis in lung cancer through the HIF-2α-VEGF pathway, and AQP3 does also play a role in cell invasion, partly via the AKT-MMPs pathway [40]. On contrary, Kusayama and colleagues (2011) observed that the immunostaining pattern of AQP3 in human primary squamous cell carcinoma (SCC) was dependent on cancer type since an eminent AQP3 expression was detectable in skin SCC but only a poor expression in lung SCC [46]. Furthermore, it has been shown that the suppression of AQP3 either with AQP inhibitors or AQP3-siRNA-induced cell death in the SCC cell lines [46]. The signaling pathways and the functions associated with AQPs in lung cancer have thus been studied to elucidate their contribution to tumor development.

The role of AQP4 in ADC still needs further elucidation, that is why we selected it to be the subject of our investigation [47]. Warth and colleagues (2011) identified for the first time an AQP4 expression (isoforms M1 and M23) in differentiated ADC [48]. Moreover, they emphasized the link between AQP4 and physiological lung function, which appears to decrease with advancing tumor dedifferentiation. In our study, a significantly ($p < 0.001$) higher AQP4 expression was seen in ADC samples compared to non-neoplastic samples. In lung tissue of the control group, AQP4 was localized in type I pneumocytes and macrophages, whereas in the ADC group, a different localization pattern was observed. It is still unclear which factors are responsible for the expression as well as for the distribution of AQP4. More research is needed to answer the question how the lung environment/different extracellular components affect the AQP4 expression in tumors.

Our results demonstrated that a low AQP4 membrane expression was correlated with more advanced cancer stages, meaning the presence of lymph node metastases (89% vs. 67%, $p < 0.05$, respectively). Xu and colleagues found a subsequent loss of AQP4 during carcinogenesis in gastric cancer and suggested AQP4 as a marker for normal proliferating gastric cells [49,50]. Previous reports showed that AQP4 was poorly expressed in ADC cells and overexpression of AQP4 could inhibit the migration and invasion of cancer cells through the suppressive role of miR-196b [51]. In contrast to the results of Warth and colleagues (2011), which showed that higher AQP4 expression profiles were related to a more advantageous prognosis in stage I ADC patients [48], we could not find significant differences in survival rates between the low- and high-AQP4 expression groups.

Nevertheless, we are aware of certain limitations in our study. Due to the fact that our findings are based on a limited number of samples, the results should be treated with considerable caution. Moreover, the biopsy samples were generated in one hospital and the access to ADC cases was limited. Secondly, although the material has been analyzed by experienced pathologists, inter-observer variability cannot be neglected. In addition, most of the ADC patients were at an advanced disease stage, and no surgical materials were available. Importantly though, the collected material was unique research material due to its very small amount, which could be used for AQP protein staining.

5. Conclusions

Developing a profound and evidence-based understanding of how AQP3 and 4 are interacting with signaling pathways that are known to have a crucial relevance in lung cancer development and progression will be extraordinarily important for the detection of novel therapeutic strategies. However, the potential clinical prognostic value of AQP3 and AQP4 expression for bronchoscopy samples or material from transthoracic needle aspiration still warrants further elucidation. Nevertheless, our study showed that these specimens were adequate to determine the expression of AQPs in ADCs.

Author Contributions: Conceptualization, L.J., A.S. and A.D.; methodology, A.S., L.J. and E.L.; validation, B.S. and K.H.; formal analysis, L.J. and K.O.; investigation, L.J., A.S. and E.L.; data curation, L.J. and M.M.; writing—original draft preparation, L.J. and. A.S.; writing—review and editing, P.K., L.J. and A.S.; visualization, M.T.S. and K.O.; supervision, A.S.; project administration, L.J.; funding acquisition, A.S. and M.T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the School of Medicine (61.610.001-110), University of Warmia and Mazury, in Olsztyn, Poland.

Institutional Review Board Statement: Bioethics Committee, School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, in Olsztyn (approval No. 3/2018 from 11 January 2018).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the fact that the experimental design was included in retrospective study, meaning that all human tissue samples were analyzed many years after the patients' death. Due to the retrospective character of our study patients did not sign special consent form for this analysis since at the sampling time point the purpose was for diagnostic reasons. The Local Bioethical Committee approved the usage of these samples for research purposes, under the condition, that the patients who underwent biopsy are not alive.

Data Availability Statement: Data are available upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Agre, P.; Sasaki, S.; Chrispeels, M.J. Aquaporins: A family of water channel proteins. *Am. J. Physiol. Physiol.* **1993**, *265*, F461. [CrossRef]
2. Gomes, D.; Agasse, A.; Thiébaud, P.; Delrot, S.; Gerós, H.; Chaumont, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **2009**, *1788*, 1213–1228. [CrossRef] [PubMed]
3. Agre, P.; King, L.S.; Yasui, M.; Guggino, W.B.; Ottersen, O.P.; Fujiyoshi, Y.; Engel, A.; Nielsen, S. Aquaporin water channels—From atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* **2002**, *542*, 3–16. [CrossRef] [PubMed]
4. King, L.S.; Agre, P. Pathophysiology of the Aquaporin Water Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **1996**, *58*, 619–648. [CrossRef] [PubMed]
5. King, L.S.; Yasui, M. Aquaporins and disease: Lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **2002**, *13*, 355–360. [CrossRef]
6. Kreda, S.M.; Gynn, M.C.; Fenstermacher, D.A.; Boucher, R.C.; Gabriel, S.E. Expression and Localization of Epithelial Aquaporins in the Adult Human Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *24*, 224–234. [CrossRef] [PubMed]
7. King, L.S.; Nielsen, S.; Agre, P.; Brown, R.H. Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin-1-null humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1059–1063. [CrossRef]
8. Verkman, A. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2007**, *159*, 324–330. [CrossRef] [PubMed]

9. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 789–799. [CrossRef] [PubMed]
10. Verkman, A.S.; Hara-Chikuma, M.; Papadopoulos, M.C. Aquaporins—New players in cancer biology. *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 523–529. [CrossRef]
11. Ribatti, D.; Ranieri, G.; Annese, T.; Nico, B. Aquaporins in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 1550–1553. [CrossRef]
12. Papadopoulos, M.C.; Saadoun, S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochim. Biophysica. Acta BBA Biomembr.* **2015**, *1848*, 2576–2583. [CrossRef] [PubMed]
13. Dajani, S.; Saripalli, A.; Sharma-Walia, N. Water transport proteins-aquaporins (AQPs) in cancer biology. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36392–36405. [CrossRef] [PubMed]
14. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [CrossRef] [PubMed]
15. *SEER Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA. Available online: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html (accessed on 22 February 2022).
16. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Nicholson, A.G.; Yatabe, Y.; Austin, J.H.M.; Beasley, M.B.; Chirieac, L.R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D.B.; et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1243–1260. [CrossRef]
17. Sher, T.; Dy, G.K.; Adjei, A.A. Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83*, 355–367. [CrossRef] [PubMed]
18. Zappa, C.; Mousa, S.A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5*, 288–300. [CrossRef]
19. Janssen-Heijnen, M. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* **2003**, *41*, 245–258. [CrossRef]
20. Perez-Moreno, P.; Brambilla, E.; Thomas, R.; Soria, J.-C. Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Molecular Subtypes and Therapeutic Opportunities. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2443–2451. [CrossRef] [PubMed]
21. Khuder, S.A. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer* **2001**, *31*, 139–148. [CrossRef]
22. Cardarella, S.; Johnson, B.E. The Impact of Genomic Changes on Treatment of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 770–775. [CrossRef] [PubMed]
23. Rekhtman, N.; Tafe, L.J.; Chaft, J.; Wang, L.; Arcila, M.E.; Colanta, A.; Moreira, A.L.; Zakowski, M.F.; Travis, W.D.; Sima, C.S.; et al. Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod. Pathol.* **2013**, *26*, 511–522. [CrossRef]
24. Zhang, Z.-Q.; Zhu, Z.-X.; Bai, C.-X.; Chen, Z.-H. Aquaporin 5 expression increases mucin production in lung adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* **2011**, *25*, 1645–1650. [CrossRef]
25. Hoque, M.O.; Soria, J.-C.; Woo, J.; Lee, T.; Lee, J.; Jang, S.J.; Upadhyay, S.; Trink, B.; Monitto, C.; Desmaze, C.; et al. Aquaporin 1 Is Overexpressed in Lung Cancer and Stimulates NIH-3T3 Cell Proliferation and Anchorage-Independent Growth. *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 1345–1353. [CrossRef] [PubMed]
26. Ben, Y.; Chen, J.; Zhu, R.; Gao, L.; Bai, C. Upregulation of AQP3 and AQP5 induced by dexamethasone and ambroxol in A549 cells. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2008**, *161*, 111–118. [CrossRef] [PubMed]
27. Wei, X.; Dong, J. Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro. *Oncol. Rep.* **2015**, *34*, 1440–1448. [CrossRef]
28. Klein, M.; Picard, E.; Vignaud, J.M.; Marie, B.; Bresler, L.; Toussaint, B.; Weryha, G.; Duprez, A.; LeClere, J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: Strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J. Endocrinol.* **1999**, *161*, 41–49. [CrossRef]
29. Klein, M.; Vignaud, J.-M.; Hennequin, V.; Toussaint, B.; Bresler, L.; Plénat, F.; Leclère, J.; Duprez, A.; Weryha, G. Increased Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor Is a Pejorative Prognosis Marker in Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 656–658. [CrossRef] [PubMed]
30. Bucciarelli, E.; Sidoni, A.; Bellezza, G.; Cavaliere, A.; Brachelente, G.; Costa, G.; Chaplet, M.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Low dentin matrix protein 1 expression correlates with skeletal metastases development in breast cancer patients and enhances cell migratory capacity in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *105*, 95–104. [CrossRef]
31. Bellezza, G.; Vannucci, J.; Bianconi, F.; Metro, G.; Del Sordo, R.; Andolfi, M.; Ferri, I.; Siccu, P.; Ludovini, V.; Puma, F.; et al. Prognostic implication of aquaporin 1 overexpression in resected lung adenocarcinoma. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **2017**, *25*, 856–861. [CrossRef] [PubMed]
32. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Noguchi, M.; Nicholson, A.G.; Geisinger, K.R.; Yatabe, Y.; Beer, D.G.; Powell, C.A.; Riely, G.J.; Van Schil, P.E.; et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6*, 244–285. [CrossRef] [PubMed]
33. Kim, J.; Lee, H.; Huang, B.W. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *Am. Fam. Physician* **2022**, *105*, 487–494. [PubMed]
34. Yung, R.C.W. Tissue diagnosis of suspected lung cancer: Selecting between bronchoscopy, transthoracic needle aspiration, and resectional biopsy. *Respir. Care Clin. N. Am.* **2003**, *9*, 51–76. [CrossRef]
35. Morrissey, J.J.; Kharasch, E.D. The Specificity of Urinary Aquaporin 1 and Perilipin 2 to Screen for Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* **2013**, *189*, 1913–1920. [CrossRef] [PubMed]

36. Morrissey, J.J.; Mobley, J.; Song, J.; Vetter, J.; Luo, J.; Bhayani, S.; Figenshau, R.S.; Kharasch, E.D. Urinary Concentrations of Aquaporin-1 and Perilipin-2 in Patients with Renal Cell Carcinoma Correlate with Tumor Size and Stage but not Grade. *Urology* **2014**, *83*, 256.e9–256.e14. [CrossRef]
37. Nakakoshi, M.; Morishita, Y.; Usui, K.; Ohtsuki, M.; Ishibashi, K. Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. *Biol. Cell* **2006**, *98*, 95–100. [CrossRef]
38. Shen, L.; Zhu, Z.; Huang, Y.; Shu, Y.; Sun, M.; Xu, H.; Zhang, G.; Guo, R.; Wei, W.; Wu, W. Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, 313–318. [CrossRef]
39. Zhao, H.; Yang, X.; Zhou, Y.; Zhang, W.; Wang, Y.; Wen, J.; Zhang, Z.; Shen, L. Potential role of aquaporin 3 in gastric intestinal metaplasia. *Oncotarget* **2015**, *6*, 38926–38933. [CrossRef]
40. Liu, Y.L.; Matsuzaki, T.; Nakazawa, T.; Murata, S.-I.; Nakamura, N.; Kondo, T.; Iwashina, M.; Mochizuki, K.; Yamane, T.; Takata, K.; et al. Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Hum. Pathol.* **2007**, *38*, 171–178. [CrossRef]
41. Marlar, S.; Jensen, H.H.; Login, F.H.; Nejsum, L.N. Aquaporin-3 in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2106. [CrossRef]
42. Moosavi, M.-S.; Elham, Y. Aquaporins 1, 3 and 5 in Different Tumors, their Expression, Prognosis Value and Role as New Therapeutic Targets. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 615–625. [CrossRef] [PubMed]
43. Bisi, S.; Disanza, A.; Malinverno, C.; Frittoli, E.; Palamidessi, A.; Scita, G. Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 565–573. [CrossRef] [PubMed]
44. Hara-Chikuma, M.; Verkman, A.S. Prevention of Skin Tumorigenesis and Impairment of Epidermal Cell Proliferation by Targeted Aquaporin-3 Gene Disruption. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 326–332. [CrossRef] [PubMed]
45. Hara-Chikuma, M.; Verkman, A.S. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 221–231. [CrossRef]
46. Kusayama, M.; Wada, K.; Nagata, M.; Ishimoto, S.; Takahashi, H.; Yoneda, M.; Nakajima, A.; Okura, M.; Kogo, M.; Kamisaki, Y. Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **2011**, *102*, 1128–1136. [CrossRef] [PubMed]
47. Lin, G.; Chen, L.; Lin, L.; Lin, H.; Guo, Z.; Xu, Y.; Hu, C.; Fu, J.; Lin, Q.; Chen, W.; et al. Comprehensive Analysis of Aquaporin Superfamily in Lung Adenocarcinoma. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 873. [CrossRef]
48. Warth, A.; Muley, T.; Meister, M.; Herpel, E.; Pathil, A.; Hoffmann, H.; Schnabel, P.A.; Bender, C.; Buness, A.; Schirmacher, P.; et al. Loss of aquaporin-4 expression and putative function in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 161. [CrossRef]
49. Xu, H.; Zhang, Y.; Wei, W.; Shen, L.; Wu, W. Differential expression of aquaporin-4 in human gastric normal and cancer tissues. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2009**, *33*, 72–76. [CrossRef]
50. Li, J.; Wang, L.; He, F.; Li, B.; Han, R. Long noncoding RNA LINC00629 restrains the progression of gastric cancer by upregulating AQP4 through competitively binding to miR-196b-5p. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 2973–2985. [CrossRef]
51. Wu, X.; Wu, G.; Zhang, H.; Peng, X.; Huang, B.; Huang, M.; Ding, J.; Mao, C.; Peng, C. MiR-196b Promotes the Invasion and Migration of Lung Adenocarcinoma Cells by Targeting AQP4. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2021**, *20*, 1533033820985868. [CrossRef]

6. OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczamy, że publikacja:

Jaskiewicz, L.; Hejne, K.; Szostak, B.; Osowiecka, K.; Skowronski, M.T.; Lepiarczyk, E.; Doboszynska, A.; Majewska, M.; Kordowitzki, P.; Skowronska, A. ***Expression Profiles of AQP3 and AQP4 in Lung Adenocarcinoma Samples Generated via Bronchoscopic Biopsies***. *J. Clin. Med.* **2022**, 11, 5954., DOI: 10.3390/jcm11195954,

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Łukasz Jaśkiewicz 55% - współudział w: opracowaniu koncepcji, metodologii, przeprowadzenia badania, analizy wyników, napisaniu artykułu, przechowywaniu danych oraz nadzorowaniu projektu

..... Olsztyn, 14.11.2022

lek. Łukasz Jaśkiewicz

Karolina Hejne 5% - współudział w: przeprowadzeniu badania

..... Olsztyn, 14.11.2022

lek. Karolina Hejne

Błażej Szóstak 5% - współudział w: przeprowadzeniu badania

..... Olsztyn, 14.11.2022

lek. Błażej Szóstak

Karolina Osowiecka 5% - współudział w: analizie wyników oraz opracowaniu graficznym

..... Olsztyn, 14.11.2022

dr n. o zdr. Karolina Osowiecka

Mariusz T. Skowroński 2,5% - współudział w: opracowaniu graficznym oraz pozyskaniu środków finansowych

..... Olsztyn, 14.11.2022

prof. dr hab. Mariusz T. Skowroński

Ewa Lepiarczyk 5% - współudział w: opracowaniu metodologii i przeprowadzeniu badania

..... Olsztyn, 14.11.2022

dr n. med. Ewa Lepiarczyk

Anna Doboszyńska 5% - współudział w: przeprowadzeniu koncepcji

..... Olsztyn, 14.11.2022

prof. dr hab. n. med. Anna Doboszyńska

Marta Majewska 2,5% - współudział w: przechowywaniu danych

..... Olsztyn, 14.11.2022

dr hab. n. med. Marta Majewska, prof. UWM

Pawel Kordowitzki 5% - współudział w: napisaniu artykułu

..... Olsztyn, 14.11.2022

dr Paweł Kordowitzki

Agnieszka Skowrońska 10% - współudział w: opracowaniu koncepcji, metodologii, przeprowadzeniu badania, napisaniu artykułu oraz pozyskaniu środków finansowych

..... Olsztyn, 14.11.2022

dr hab. n. med. Agnieszka Skowrońska, prof. UWM

7. WNIOSKI

W odniesieniu do założonej hipotezy:

Tkanki pochodzące z rutynowo pobieranych biopsji (badanie bronchofiberoskopowe) mogą posłużyć do oznaczenia ekspresji AQP3 i AQP4 w celach prognostycznych u pacjentów z ADC.

Wykazano, że badane próbki były odpowiednie do określenia ekspresji AQP u chorych z ADC. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, jesteśmy pierwszą grupą oceniającą próbki biopsyjne uzyskane techniką bronchofiberoskopową u chorych z ADC pod kątem ekspresji AQP3 i AQP4. Jednak potencjalna kliniczna wartość prognostyczna ekspresji AQP3 i AQP4 dla materiału biopsyjnego wymaga nadal dalszych badań i walidacji.

W odniesieniu do celów szczegółowych:

Oznaczenie ekspresji wymienionych powyżej akwaporyn w tkankach pochodzących z rutynowo pobieranych biopsji w celach prognostycznych u pacjentów z ADC.

Określenie korelacji poziomu ekspresji białek AQP3 i AQP4 w raku gruczołowym płuc z danymi kliniczno-patologicznymi.

Uzyskanie popartego dowodami zrozumienia interakcji AQP3 i AQP4 ze szlakami sygnałowymi, o których wiadomo, że mają kluczowe znaczenie w rozwoju i progresji raka płuc, będzie niezwykle ważne dla wykrywania nowych strategii terapeutycznych. Na podstawie naszych badań nie możemy jednoznacznie stwierdzić, że ekspresja AQP3 i 4 może być rozpatrywana jako wskaźnik prognostyczny, jednakże dowiedliśmy, że występują istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji między tkanką zmienioną nowotworowo w przebiegu ADC w porównaniu ze zdrową. W przypadku AQP3 wykazano także istotne różnice między wiekiem chorych, a stopniem ekspresji AQP3. Stwierdzono również, że niska błonowa ekspresja AQP4 może korelować z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Uzyskane wyniki stanowią bazę do dalszych projektów badawczych.

8. PIŚMIENNICTWO

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., & Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology*, *542*(1), 3–16. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818

Agre, P., Sasaki, S., & Chrispeels, M. J. (1993). Aquaporins: a family of water channel proteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *265*(3), F461–F461. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.3.F461

Bellezza, G., Vannucci, J., Bianconi, F., Metro, G., del Sordo, R., Andolfi, M., Ferri, I., Siccu, P., Ludovini, V., Puma, F., Sidoni, A., & Cagini, L. (2017). Prognostic implication of aquaporin 1 overexpression in resected lung adenocarcinoma†. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, *25*(6), 856–861. https://doi.org/10.1093/icvts/ivx202

Ben, Y., Chen, J., Zhu, R., Gao, L., & Bai, C. (2008). Upregulation of AQP3 and AQP5 induced by dexamethasone and ambroxol in A549 cells. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *161*(2), 111–118. https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.12.007

Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1840*(5), 1596–1604. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Cao, M., Yang, M., Ou, Z., Li, D., Geng, L., Chen, P., Chen, H., & Gong, S. (2014). Involvement of aquaporins in a mouse model of rotavirus diarrhea. *Virologica Sinica*, *29*(4), 211–217. https://doi.org/10.1007/s12250-014-3469-z

Cao, X.-C., Zhang, W.-R., Cao, W.-F., Liu, B.-W., Zhang, F., Zhao, H.-M., Meng, R., Zhang, L., Niu, R.-F., Hao, X.-S., & Zhang, B. (2013). Aquaporin3 Is Required for FGF-2-Induced Migration of Human Breast Cancers. *PLoS ONE*, *8*(2), e56735. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056735

Chae, Y. K., Woo, J., Kim, M. J., Kang, S. K., Kim, M. S., Lee, J., Lee, S. K., Gong, G., Kim, Y. H., Soria, J. C., Jang, S. J., Sidransky, D., & Moon, C. (2008). Expression of aquaporin 5 (AQP5) promotes tumor invasion in human non small cell lung cancer. *PLoS ONE*, *3*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002162

Dajani, S., Saripalli, A., & Sharma-Walia, N. (2018). Water transport proteins-aquaporins (AQPs) in cancer biology. *Oncotarget*, *9*(91), 36392–36405. https://doi.org/10.18632/oncotarget.26351

Elkhider, A., Wang, B., Ouyang, X., Al-Azab, M., Walana, W., Sun, X., Li, H., Tang, Y., Wei, J., & Li, X. (2020). Aquaporin 5 promotes tumor migration and angiogenesis in non–small cell lung cancer cell line H1299. *Oncology Letters*, *19*(3), 1665–1672. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11251

Engel, A., & Gaub, H. E. (2008). Structure and Mechanics of Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *77*(1), 127–148. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.154450

Fukuhara, S., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Masaoka, T., Miyoshi, S., Mori, H., Fukushima, Y., Yasui, M., Kanai, T., & Suzuki, H. (2014). Mucosal expression of aquaporin-4 in the stomach of histamine type 2 receptor knockout mice and *Helicobacter pylori* -infected mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *29*, 53–59. https://doi.org/10.1111/jgh.12771

Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., & Chaumont, F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1788*(6), 1213–1228. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.009

Hoque, M. O., Soria, J. C., Woo, J., Lee, T., Lee, J., Jang, S. J., Upadhyay, S., Trink, B., Monitto, C., Desmaze, C., Mao, L., Sidransky, D., & Moon, C. (2006). Aquaporin 1 Is Overexpressed in Lung Cancer and Stimulates NIH-3T3 Cell Proliferation and Anchorage-Independent Growth. *The American Journal of Pathology*, *168*(4), 1345. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2006.050596

Ishikawa, S., Saito, T., & Kasono, K. (2004). Pathological Role of Aquaporin-2 in Impaired Water Excretion and Hyponatremia. *Journal of Neuroendocrinology*, *16*(4), 293–296. https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01177.x

Janssen-Heijnen, M. (2003). The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*, *41*(3), 245–258. https://doi.org/10.1016/S0169-5002(03)00230-7

Jarius, S., & Wildemann, B. (2013). Aquaporin-4 Antibodies (NMO-IgG) as a Serological Marker of Neuromyelitis Optica: A Critical Review of the Literature. *Brain Pathology*, *23*(6), 661–683. https://doi.org/10.1111/bpa.12084

Jo, Y. M., Park, T. I., Lee, H. Y., Jeong, J. Y., & Lee, W. K. (2016). Prognostic significance of aquaporin 5 expression in non-small cell lung cancer. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, *50*(2), 122–128. https://doi.org/10.4132/jptm.2015.10.31

Jung, H. J., Park, J.-Y., Jeon, H.-S., & Kwon, T.-H. (2011). Aquaporin-5: A Marker Protein for Proliferation and Migration of Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *6*(12), e28492. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028492

Kang, B. W., Kim, J. G., Lee, S. J., Chae, Y. S., Jeong, J. Y., Yoon, G. S., Park, S. Y., Kim, H. J., Park, J. S., Choi, G.-S., & Jeong, J. Y. (2015). Expression of Aquaporin-1, Aquaporin-3, and Aquaporin-5 Correlates with Nodal Metastasis in Colon Cancer. *Oncology*, *88*(6), 369–376. https://doi.org/10.1159/000369073

King, L. S., Kozono, D., & Agre, P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(9), 687–698. https://doi.org/10.1038/nrm1469

Kitchen, P., Day, R. E., Salman, M. M., Conner, M. T., Bill, R. M., & Conner, A. C. (2015). Beyond water homeostasis: Diverse functional roles of mammalian aquaporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1850*(12), 2410–2421. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.023

Klein, M., Picard, E., Vignaud, J., Marie, B., Bresler, L., Toussaint, B., Weryha, G., Duprez, A., & Leclere, J. (1999). Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *Journal of Endocrinology*, *161*(1), 41–49. https://doi.org/10.1677/joe.0.1610041

Klein, M., Vignaud, J.-M., Hennequin, V., Toussaint, B., Bresler, L., Plénat, F., Leclère, J., Duprez, A., & Weryha, G. (2001). Increased Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor Is a Pejorative Prognosis Marker in Papillary Thyroid Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(2), 656–658. https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7226

Korany, M. M., Amer, M. A., Rashed, L. A., & Saleh, M. A. (2019). Downregulation of aquaporin 3 in bullous pemphigoid patients. *Archives of Dermatological Research*, *311*(2), 93–97. https://doi.org/10.1007/s00403-018-1884-y

Kreda, S. M., Gynn, M. C., Fenstermacher, D. A., Boucher, R. C., & Gabriel, S. E. (2001). Expression and Localization of Epithelial Aquaporins in the Adult Human Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *24*(3), 224–234. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.3.4367

Kreida, S., & Törnroth-Horsefield, S. (2015). Structural insights into aquaporin selectivity and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, *33*, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.08.004

Lan, Y.-L., Wang, X., Lou, J.-C., Ma, X.-C., & Zhang, B. (2017a). The potential roles of aquaporin 4 in malignant gliomas. *Oncotarget*, *8*(19), 32345–32355. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16017

Lan, Y.-L., Wang, X., Lou, J.-C., Ma, X.-C., & Zhang, B. (2017b). The potential roles of aquaporin 4 in malignant gliomas. *Oncotarget*, *8*(19), 32345–32355. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16017

Levy, M., Barletta, S., Huang, H., Grossman, S. A., Rodriguez, F. J., Ellsworth, S. G., Dzaye, O., & Holdhoff, M. (2019). Aquaporin-4 Expression Patterns in Glioblastoma Pre-Chemoradiation and at Time of Suspected Progression. *Cancer Investigation*, *37*(2), 67–72. https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1564927

Liu, Y. L., Matsuzaki, T., Nakazawa, T., Murata, S. ichi, Nakamura, N., Kondo, T., Iwashina, M., Mochizuki, K., Yamane, T., Takata, K., & Katoh, R. (2007). Expression of aquaporin

3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Human Pathology*, *38*(1), 171–178. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.07.015

MacHida, Y., Ueda, Y., Shimasaki, M., Sato, K., Sagawa, M., Katsuda, S., & Sakuma, T. (2011). Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential. *Human Pathology*, *42*(5), 669–678. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.07.022

Marlar, S., Jensen, H. H., Login, F. H., & Nejsum, L. N. (2017). Aquaporin-3 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2106. https://doi.org/10.3390/ijms18102106

Meli, R., Pirozzi, C., & Pelagalli, A. (2018). New Perspectives on the Potential Role of Aquaporins (AQPs) in the Physiology of Inflammation. *Frontiers in Physiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00101

Moon, C. S., Moon, D., & Kang, S. K. (2022). Aquaporins in Cancer Biology. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.782829

Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiological Reviews*, *93*(4), 1543–1562. https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013

Nicchia, G. P., Rossi, A., Mola, M. G., Pisani, F., Stigliano, C., Basco, D., Mastrototaro, M., Svelto, M., & Frigeri, A. (2010). Higher order structure of aquaporin-4. *Neuroscience*, *168*(4), 903–914. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.008

Nielsen, S., Frøkiær, J., Marples, D., Kwon, T.-H., Agre, P., & Knepper, M. A. (2002). Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. *Physiological Reviews*, *82*(1), 205–244. https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2001

Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric Nephrology*, *22*(6), 778–784. https://doi.org/10.1007/s00467-006-0411-0

Petzold, A., Pittock, S., Lennon, V., Maggiore, C., Weinshenker, B. G., & Plant, G. T. (2010). Neuromyelitis optica-IgG (aquaporin-4) autoantibodies in immune mediated optic neuritis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *81*(1), 109–111. https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.146894

Satooka, H., & Hara-Chikuma, M. (2016). Aquaporin-3 Controls Breast Cancer Cell Migration by Regulating Hydrogen Peroxide Transport and Its Downstream Cell Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(7), 1206–1218. https://doi.org/10.1128/MCB.00971-15

SEER Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site. National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html. (n.d.).

Sher, T., Dy, G. K., & Adjei, A. A. (2008). Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, *83*(3), 355–367. https://doi.org/10.4065/83.3.355

Song, T., Yang, H., Ho, J. C. M., Tang, S. C. W., Sze, S. C. W., Lao, L., Wang, Y., & Zhang, K. Y. (2015). Expression of aquaporin 5 in primary carcinoma and lymph node metastatic carcinoma of non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, *9*(6), 2799–2804. https://doi.org/10.3892/ol.2015.3108

Song, Y., Wang, L., Wang, J., & Bai, C. (2017). Aquaporins in respiratory system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *969*, 115–122. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_7

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, Lucian. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1243–1260. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630

van Hoek, A. N., & Verkman, A. S. (1992). Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(26), 18267–18269. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36953-4

Verkman, A. S., Hara-Chikuma, M., & Papadopoulos, M. C. (2008). Aquaporins—new players in cancer biology. *Journal of Molecular Medicine*, *86*(5), 523–529. https://doi.org/10.1007/s00109-008-0303-9

Wagner, K., Unger, L., Salman, M. M., Kitchen, P., Bill, R. M., & Yool, A. J. (2022). Signaling Mechanisms and Pharmacological Modulators Governing Diverse Aquaporin Functions in Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1388. https://doi.org/10.3390/ijms23031388

Warth, A., Muley, T., Meister, M., Herpel, E., Pathil, A., Hoffmann, H., Schnabel, P. A., Bender, C., Buness, A., Schirmacher, P., & Kuner, R. (2011). Loss of aquaporin-4 expression and putative function in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, *11*(1), 161. https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-161

Wei, X., & Dong, J. (2015). Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro. *Oncology Reports*, *34*(3), 1440–1448. https://doi.org/10.3892/or.2015.4107

Wittekindt, O. H., & Dietl, P. (2019). Aquaporins in the lung. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *471*(4), 519–532. https://doi.org/10.1007/s00424-018-2232-y

Woo, J., Lee, J., Chae, Y. K., Kim, M. S., Baek, J. H., Park, J. C., Park, M. J., Smith, I. M., Trink, B., Ratovitski, E., Lee, T., Park, B., Jang, S. J., Soria, J. C., Califano, J. A., Sidransky, D., & Moon, C. (2008). Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation. *Cancer Letters*, *264*(1), 54–62. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.029

Xia, H., Ma, Y.-F., Yu, C.-H., Li, Y.-J., Tang, J., Li, J.-B., Zhao, Y.-N., & Liu, Y. (2014). Aquaporin 3 knockdown suppresses tumour growth and angiogenesis in experimental non-

small cell lung cancer. *Experimental Physiology*, *99*(7), 974–984. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.078527

Yang, B., Ma, T., & Verkman, A. S. (2001). Erythrocyte Water Permeability and Renal Function in Double Knockout Mice Lacking Aquaporin-1 and Aquaporin-3. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 624–628. https://doi.org/10.1074/jbc.M008664200

Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., & Manley, G. T. (2009). Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke. In *Aquaporins* (pp. 159–170). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_7

Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, *5*(3), 288–300. https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07

Zhang, Z., Chen, Z., Song, Y., Zhang, P., Hu, J., & Bai, C. (2010). Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. *Journal of Pathology*, *221*(2), 210–220. https://doi.org/10.1002/path.2702

Zhang, Z. Q., Zhu, Z. X., Bai, C. X., & Chen, Z. H. (2011). Aquaporin 5 expression increases mucin production in lung adenocarcinoma. *Oncology Reports*, *25*(6), 1645–1650. https://doi.org/10.3892/or.2011.1241

Zhou, Y., Wang, Y., Wen, J., Zhao, H., Dong, X., Zhang, Z., Wang, S., & Shen, L. (2016). Aquaporin 3 promotes the stem-like properties of gastric cancer cells via Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway. *Oncotarget*, *7*(13), 16529–16541. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7664