Patofiziologija i značaj hipoksije tumorskog tkiva

Korša, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:817752

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Lea Korša

Patofiziologija i značaj hipoksije tumorskog tkiva

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Lea Korša

Patofiziologija i značaj hipoksije tumorskog tkiva

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za onkologiju KBC Zagreb te Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Stjepka Pleštine i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

Mentor: prof.dr.sc. Stjepko Pleština

Kratice

ABC	ATP-binding cassette
Ang 2	Angiopoietin 2
ATP	Adenozin trifosfat
Akt	Protein kinaza B
CAIX	Karbonska anhidraza 9
CDK	Cyclin-dependent kinase
CT	Computed tomography
dNTP	Deoxynucleotide
eIFs	Eukaryotic Initiation Factor
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GLUT	Glucose transporter
HIF	Hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxia-response elements
IGF	Insulin-like growth factor
IRES	Internal ribosomal entry site
LDH	Lactate dehydrogenase
MCT	Monocarboxylate transporter
MDR1	Multi-drug resistance gene
miRs	micro RNA molecules
MMP	Matrix metalloproteinase
MRI	Magnetic resonance imaging

mTOR	mammalian target of rapamycin
NHE-1	Sodium/hydrogen exchanger 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PET	Positron emission tomography
PYGL	Liver glycogen phosphorylase
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel Lindau

Sadržaj

1.Sažetak
2.Summary
3. Uvod....1
4. Hipoksija tumorskog tkiva....3
4.1. Uzroci hipoksije tumorskog tkiva....3
4.2. Akutna i kronična hipoksija tumorskog tkiva....5
5. Biološki odgovor tumorskih stanica na hipoksiju....9
5.1. Uloga HIF-1....9
5.2. Metaboličko reprogramiranje....11
5.3. Supresija DNA popravka....13
6. Uloga hipoksije u obilježjima tumora....15
6.1. Stanična proliferacija....15
6.2. Apoptoza....16
6.3. Angiogeneza....17
6.4. Invazija i metastaze....19
7. Kliničke i terapijske implikacije tumorske hipoksije....21
7.1. Efekt hipoksije na radioterapiju....22
7.2. Hipoksijom posredovana rezistencija na kemoterapiju....23
7.3. Biološka terapija u hipoksiji....25
8. Zaključak....27
9. Zahvale....28
10. Literatura....29
11. Životopis....32

1. Sažetak

Naslov: Patofiziologija i značaj hipoksije tumorskog tkiva

Autor: Lea Korša

Hipoksija je smanjena razina kisika u tkivima, te je prisutna u većini solidnih tumora, uglavnom zbog neadekvatne krvne opskrbe i prebrzog rasta tumora. Razlikuju se akutna i kronična hipoksija, koje osim patofizioloških razlika, imaju i različite biološke i kliničke posljedice. Aktivacija hipoksija signalnog puta koji se odvija uglavnom preko HIF-1, stimulira neoangiogenezu, mijenja metabolizam tumora, promovira agresivnije ponašanje tumora i značajno utječe na odgovor na terapiju. Mnoga istraživanja pokazuju da hipoksija potiče transkripciju gena koji sudjeluju u progresiji tumora, što dovodi do povećane stanične proliferacije tumora i većeg metastatskog potencijala. Vjeruje se da je hipoksija ključan mikrookolišni faktor koji potiče metastaziranje tumora. Osim što je povezana sa agresivnijim fenotipom tumora, hipoksija inducira rezistenciju na radioterapiju, kemoterapiju i ostale metode liječenja tumora. Zbog toga se sve više istražuje kombinacija standardnih terapija (radioterapija, kemoterapija) sa lijekovima koji bi djelovali na HIF-1 faktor (HIF-1 inhibitori) ili na metabolizam glukoze. Međutim, kako bi se odabrali najbolji pacijenti kojima bi kombinacija HIF-1 inhibitora i radioterapije bila korisna, potrebno je na neki način prikazati hipoksiju u tumorima, što je moguće učiniti pomoću standardnih slikovnih tehnika (CT, MRI, PET), pri čemu se PET pokazao najboljim.

Bolje razumijevanje molekularnih puteva u hipoksiji može pridonijet boljim i efektivnijim terapijskim opcijama, kao i utvrđivanju prognostičkih i prediktivnih faktora.

Ključne riječi: hipoksija, solidni tumor, tumorski mikrookoliš, progresija, metastaze, rezistencija na terapiju

2. Summary

Title: Pathophysiology and significance of tumor hypoxia

Author: Lea Korša

Hypoxia is the decreased level of oxygen in tissues, and it is present in the majority of solid tumors, mainly because of the inadequate blood supply and rapid tumor growth. There are two kinds of hypoxia, acute and chronic hypoxia, which besides of the pathophysiologic differences, also have different biological and clinical consequences. Activation of hypoxia signaling pathway, which mainly occurs through HIF-1, stimulates neoangiogenesis, alters tumor metabolism, promotes a more aggressive tumor behavior and significantly affects its responsiveness to therapy. Various evidence suggest that hypoxia induces transcription of tumor progression genes leading to increased tumor cell proliferation and metastatic potential. Hypoxia is believed to be the key microenvironment factor that induces tumor metastasis Besides its connectivity with more aggressive tumor phenotype, hypoxia also induces resistance of tumorous tissue against radiotherapy, chemotherapy and other treatment modalities. Because of that, there are many studies of combination of the standard therapeutic treatment (radiotherapy, chemotherapy) and drugs that have effect on the HIF-1 (HIF-1 inhibitors), or on the glucose metabolism. However, to select patients suitable for such treatment (combination of radiotherapy and HIF-inhibitors), it is necessary to show tumor hypoxia through imaging techniques (CT, MRI, PET), whereby PET being most useful technique.

Better understanding of molecular pathways in hypoxia can contribute to more effective treatment options, along with the establishment of useful prognostic and predictive factors.

Key words: hypoxia, solid tumor, tumor microenvironment, progression, metastasis, resistance to treatment

3. Uvod

Kisik, osim što je esencijalna molekula za oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijima, također funkcionira kao važna signalna molekula i ima ulogu u širokom spektru bioloških procesa, uključujući eritropoezu, angiogenezu i staničnu diferencijaciju (Ratcliffe, 2013). Termin hipoksija se često upotrebljava kako bi se opisalo stanje manjka kisika u tkivima, koje se može pojaviti u tumorskom tkivu, ali i u normalnim tkivima (Hammond et al. 2013). Hipoksija se pojavljuje u većini solidnih tumora, kao posljedica neravnoteže između metaboličkih potreba tumorskog tkiva zbog brzog rasta i opskrbe kisikom kroz funkcionalno i strukturalno slabo razvijenu mikrovaskulaturu. Posljedično tome, tumorske stanice često imaju sposobnost prilagodbe na hipoksiju kako bi održale unutarnju ravnotežu kisika. Stanične prilagodbe na hipoksiju uključuju koordiniranu ekspresiju velikog i različitog broja grupe gena koje su regulirane od strane transkripcijskog faktora HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) (Sullivan et al. 2008). HIF je uključen u glavne dijelove tumorske biologije kao što je angiogeneza, stanično preživljenje, rezistencija na apoptozu, metaboličko reprogramiranje i pH homeostazu (Semenza, 2007). Sama tumorogeneza je proces koji se odigrava u nekoliko koraka koji uključuju genetske, epigenetske i somatske promjene koje se pojavljuju kao rezultat povećane genomske nestabilnosti uzrokovane defektima u kontrolnim točkama staničnog ciklusa. Te promjene omogućuju tumorskim stanicama da poprime karakteristike koje se razlikuju od normalnih stanica: rezistencija na inhibitore faktora rasta, proliferacija u odsutstvu egzogenih faktora rasta, otpornost na apoptozu, abnormalna angiogeneza, invazija i metastaze. Uz sve te genetske, epigenetske i somatske promjene koje se pojavljuju u tumorima, kritičan faktor koji ima bitnu ulogu u malignoj progresiji i metastaziranju i u odgovoru na terapiju je tumorski mikrookoliš (Hanahan & Weinberg, 2000). Vjeruje se da je hipoksija ključan mikrookolišni faktor koji inducira tumorske metastaze. Ona povećava adaptacije tumorskih stanica na preživljenje (neovaskularizacija, rezistencija na apoptozu), ali s druga strane stimulira tumorsku agresivnost (genska nestabilnost, metastaze,

dediferencijacija) (Lin & Yun 2010).

U posljednjem desetljeću postignut je velik napredak u istraživanju tumorske oksigenacije i njenog utjecaja na tumorsku promociju i metastaziranje, odgovora na terapiju i prognozu kod pacijenata sa solidnim tumorima. Istraživanja pokazuju relativnu rezistenciju tumora na radioterapiju, kemoterapiju te ostalih ne kirurških metoda liječenja (Dedic Plavetić et al. 2014).

U ovom radu prikazat ću mehanizme nastanka hipoksije tumorskog tkiva, te biološki odgovor na hipoksiju i i njene kliničke implikacije na terapiju i prognozu.

4. Hipoksija tumorskog tkiva

Hipoksija je manjak kisika u tkivima koja dovodi do smanjenog stvaranja energije. Hipoksija u tkivima i stanicama može nastati u raznim uvjetima, uključujući poremećaj srca i pluća, anemije, i cirkulatorne probleme (Ziello et al.2007). U zdravim tkivima nivo kisika varira ovisno o organu, ali je dobro adaptiran na potrebe odgovarajućih stanica. S druge strane, u patološki promijenjenim tkivima nivo kisika je niži nego u usporedbi sa zdravim tkivima. Istraživanja pokazuju reduciranu oksigenaciju tkiva u malignim i ne-malignim stanjima kao što su kronične upale (kronična upalna bolest crijeva, reperfuzijska ozljeda, reumatoidni artritis), srčane bolesti, dijabetička retinopatija, cistična fibroza, kronični bronhitis, psorijaza, rane, infekcije, bubrežna bolest, moždani udar (Yotnda et.al 2010).

Hipoksija je prisutna u većini solidnih tumora, oko 90%, zbog nesposobnosti vaskularnog sustava da opskrbi brzorastući tumor sa potrebnom količinom kisika (Cosse & Michiels 2008). U posljednjem desetljeću povećao se broj tumora u kojima se nalaze područja hipoksije i uključuje karcinom endometrija, melanom, limfom, karcinom dojke, karcinom mokraćnog mjehura, tumore glave i vrata, karcinom bubrega, kolorektalni karcinom, karcinom želuca, karcinom prostate i karcinom pluća. Ti hipoksični tumori su rezistentni na konvencionalnu kemoterapiju, radioterapiju i staničnu terapiju (Yotnda et.al 2010).

4.1. Uzroci hipoksije tumorskog tkiva

Hipoksija tumora događa se kao rezultat neravnoteže između stanične potrebe za kisikom i stanične opskrbe kisikom. Hipoksiju može uzrokovati više faktora, od kojih je većina povezana sa perfuzijom, difuzijom i anemijom (Vaupel & Harrison 2004).

Hipoksija povezana sa perfuzijom je uzrokovana sa neadekvatnom krvnim protokom u tkivima. Brzorastući hipoksični tumori imaju slabu vaskularnu biodistribuciju (vaskularnu arhitekturu) i/ili manji broj krvnih žila (vaskularna desintetizacija) (Yotnda et al.2010).

Također tumorska mikrovaskulatura često ima teške strukturne i funkcionalne abnormalnosti

kao što su disorganizirana vaskularna mreža, dilatacije, produžene i tortuozne krvne žile, intermitentna staza, manjak fizioloških/farmakoloških receptora, odsutnost regulacije protoka koje mogu kompromitirati opskrbu tkiva kisikom (Vaupel & Harrison 2004). Upalni citokini koji se oslobađaju pod utjecajem hipoksije mogu aktivirati neutrofile koji također mogu oštetiti tumorske krvne žile te na taj način povećati permeabilnost žila. Sam rast tumora može dovesti do komprimiranja krvnih žila tumorskom masom i visokim intersticijskim tlakom te smanjiti dostavu kisika (Yotnda et al.2010).

Hipoksija povezana sa difuzijom je uzrokovana sa povećanom difuzijskom udaljenosti zbog tumorske ekspanzije (Vaupel & Harrison 2004). Visoko proliferacijske tumorske stanice koje prerastu neovaskularizaciju također sudjeluju u formiranju hipoksičnih regija tumora. Proliferacija direktno povećava udaljenost difuzije za kisik i nutrijente , tako će stanice koje su udaljene više od 70 mikrometara dobiti neadekvatnu količinu kisika, te će se stvarati hipoksične regije u povećanim tumorima (Vaupel & Harrison 2004).

Dfuzijski povezana hipoksija može biti uzrokovana i pogoršanjem difuzijske „geometrije˝, npr. konkurentni prema kontrakurentni protok krvi unutar tumorske mikrovaskulature (Vaupel & Harrison 2004). Visoka proliferacija tumorskih stanica povezana je sa visokom konzumacijom kisika i nutrijenata, također uzrokujući hipoksiju.

Hipoksije povezane s anemijom su povezane sa smanjenom sposobnosti krvi da prenosi kisik i mogu nastati kao posljedica s tumorom povezane anemije ili terapijom inducirane anemije. Eksperimentalne studije su pokazale da je opskrba tumora kisikom znantno smanjena i hipoksija povećana kada je hemoglobin ispod 100-120 g/L, pogotovo kada smanjen kapacitet prijenosa kisika korelira sa smanjenom perfuzijom (Vaupel & Harrison 2004). Anemijom uzrokovane hipoksije spadaju u hematopatske hipoksije (smanjene sposobnosti krvi da prenosi kisik). Kod teških pušača u krvi se nalazi povišen ugljični monoksid koji ima visok afinitet za vezanje s hemoglobinom te nastaje karboksihemoglobin koji ne može prenositi kisik te može dovesti do stanja koja se vide u anemičnoj hipoksiji (toksična hipoksija) (Cosse & Michiels 2008).

Bilo koja kombinacija ili svi navedeni mehanizmi mogu izazvati hipoksiju tumorskog tkiva.

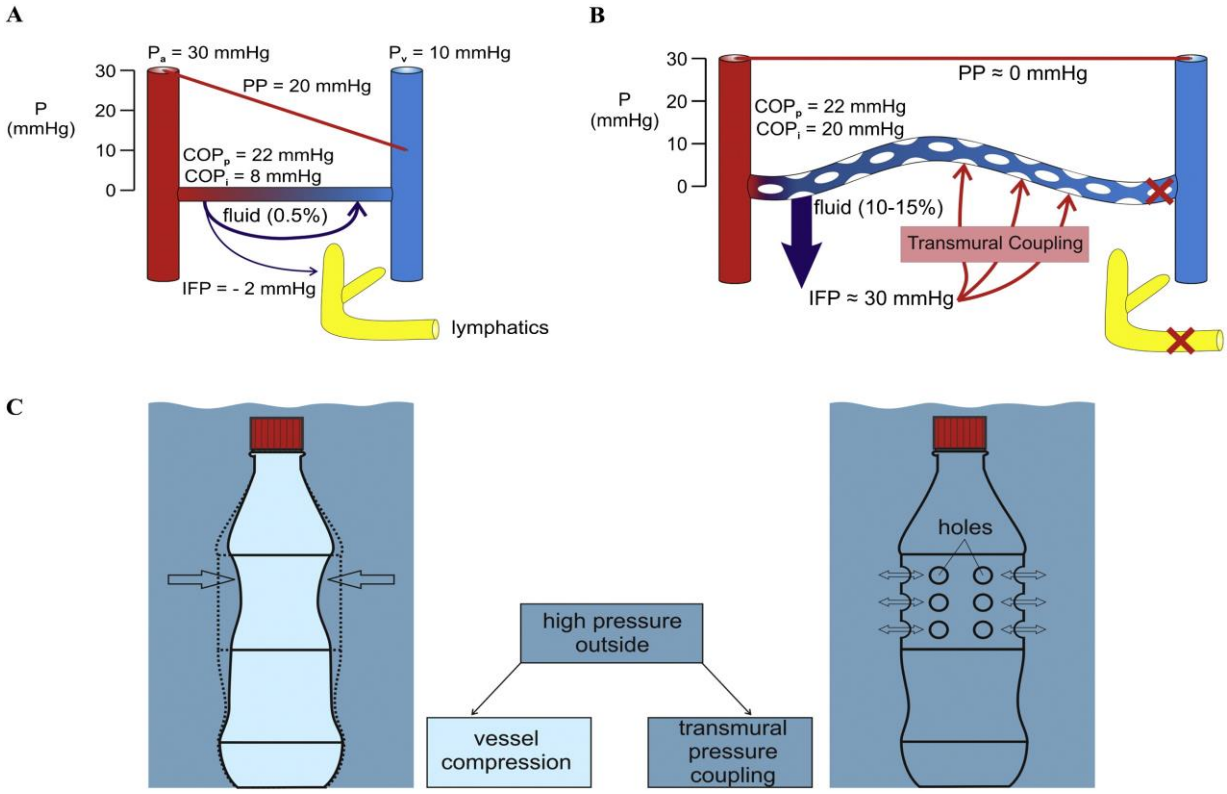
4.2. Akutna i kronična hipoksija tumorskog tkiva

Prema klasifikaciji korištenoj u eksperimentalnoj i kliničkoj onkologiji, postoje dva glavna tipa hipoksije u humanim tumorima: akutna i kronična. Thomlinson i Grey (Thomlinson & Grey 1955) postavili su temelj za opis kronične, odnosno difuzijski limitirane hipoksije. Kronična hipoksija je uglavnom uzrokovana u kritičnom ograničenju difuzije kisika iz tumorske mikrovaskulature u okolno tkivo (Bayer et. Al 2011). To se uglavnom događa zbog visoke stope proliferacije tumorskih stanica koja rezultira brzom ekspanzijom tumora. Zbog toga, tumorska područja imaju veću udaljenost od najbližih kapilara nego što je mogućnost difuzije kisika (Cosse & Michiels 2008). Brown (Brown 1979) je prvi komentirao postojanje akutne hipoksije i njeno značenje u biologiji tumora i terapiji. Prema njemu, akutna hipoksija (perfuzijska) se uglavnom događa zbog privremenog, lokalnog poremećaja u perfuziji ili varijacijama u protoku crvenih krvnih stanica (Bayer et al. 2011). Abnormalna vaskularna mreža i visoki intersticijski tlak mogu kao posljedicu imati abnormalan krvni protok što će rezultirati akutnom (prolaznom) hipoksijom (Cosse & Michiels 2008).

S patofiziološkog gledišta, akutna hipoksija se može podijeliti u dvije podgrupe: ishemična hipoksija i hipoksemična hipoksija. Ishemična hipoksija je uzrokovana prolaznim zastojima krvotoka (potpuno ili značajno smanjena perfuzija) zbog fizičke opstrukcije nastale nakupinama tumorskih stanica, krvnih stanica ili fibrinskim ugrušcima unutar lumena krvnih žila. Akutna hipoksemična hipoksija nastaje zbog prolazne, značajne redukcije kisika unutar krvnih žila (Bayer et al. 2011).

Kronična hipoksija se može podijeliti u tri podgrupe: difuzijska hipoksija, hipoksemična hipoksija i perfuzijska hipoksija. Kronična hipoksemična hipoksija nastaje zbog dugoročnog reduciranog nivoa kisika u krvi koji može nastati zbog anemije povezane s tumorom ili inducirane terapijom (anemična hipoksija) ili funkcionalne hipoksije koju nalazimo kod pušača. Još jedan podtip kronične hipoksije može nastati zbog stagnirajućeg protoka koji je rezultat intersticijske hipertenzije nastale zbog propusnosti mikrovaskulature. U normalnim tkivima, razlika perfuzijskog tlaka između arterijskog i venskog kraja iznosi otrpilike 20 mmHg koji potiče krv kroz kapilare. Tumorska tkiva su obilježena sa dilatiranom, produženom,

tortuoznom i propusnom mikrovaskulaturom, nedostatnom limfnom drenažom i povećanim intersticijskim tlakom. Transmuralni spoj između povišenog intersticijskog i mikrovaskularnog tlaka može rezultirati u prekinutoj razlici perfuzijskih tlakova (oko 0 mmHg). Nedostatak razlike perfuzijskog tlaka između arterijskog i venskog kraja kapilara ne dopušta protok krvi i posljedično dovodi do hipoksije (Bayer et.al 2011). Sličnost tog fenomena može se prikazati preko situacije prikazane na slici 1, gdje je čvrsto zatvorena boca pod vodom komprimirana zbog povećanog tlaka u vanjskom hidrostatskom tlaku, dok boca s rupama (koja predstavlja propusnu vaskulaturu) nije.



Slika 1. Hipoksija nastala zbog propusne mikrovaskulature. (A) perfuzijske razlike tlaka između arterijskog i venskog kraja normalne i (B) propusne tumorske vaskulature

(C) normalna plastična boca pod vodom (lijevo) kao znak tlakom uzrokovane kompresije boce/žile, i plastična boca s rupama ispod vode (desno) kao znak izjednačavanja tlakova kod propusne tumorske mikrožile. Izvor: Bayer et al. (2011) Int J Radiat Oncol Biol Phys 80:965-968.

Po definiciji, samnjena/prekinuta opskrba kisikom je zajednička za svaki podtip hipoksije, međutim perfuzijski-ovisna opskrba nutrijentima, uklanjanje otpadnih tvari i dostava antitumorskih tvari može varirati ovisno o podtipovima, što je prikazano u tablici 1. Zbog toga, definiranje podtipova hipoksije ima velik utjecaj na razumijevanje tumorske biologije, patofiziološke posljedice, uspješnost radijacije, dostavu lijekova (Bayer et al.2011).

Tablica 1. Patofiziološke posljedice različitih tipova/podtipova hipoksije. Izvor: : Bayer et al. (2011) Acute versus chronic hypoxia: why a simplifield classification is simply not enough. Int J Radiat Oncol Biol Phys 80:965-968.

Tip hipoksije	**Podtip hipoksije**	**Perfuzija**	**Opskrba kisikom**	**Opskrba nutrijentima**	**Uklanjanje otpada**	**Dostava antitumorskih tvari**
Akutna	Ishemična	Zastoj protoka	Prekinuta	Prekinuta	Prekinuto	Prekinuta
	Hipoksemična	Održana	Jako smanjena	Održana	Održano	Održana
Kronična	Difuzijska	Održana	Smanjena/ prekinuta	Smanjena/ prekinuta	Smanjena/ prekinuta	Samnjena / prekinuta
	Hipoksemična (anemična)	Održana	Smanjena	Održana	Održano	Održana
	IHT-inducirana	Smanjena	Smanjena	Smanjena	Smanjeno	Smanjena

IHT- intersticijska hipertenzija u tumorskom centru

Osim što se razlikuju u patofiziologiji, akutna i kronična hipoksija imaju različite biološke i kliničke posljedice. Stanice inkubirane pod kroničnom hipoksijom nekoliko tjedana mogu imati višu invazivnu stopu nego pod akutnom hipoksijom. S druge strane, stanice izložene kroničnoj hipoksiji nisu sposobne započeti replikaciju nakon reoksigenacije, stoga ne mogu sudjelovati u tumorogenezi. Podaci o biološkim posljedicama sugeriraju da akutna hipoksija dovodi do agresivnijih, invazivnih fenotipova. To se vjerojatno događa zbog promjena u genskoj ekspresiji, proteomu i transkriptomu (Bayer & Vaupel 2012). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da in vitro akutna hipoksija dovodi do genomske nestabilnosti zbog smanjenog popravka oštećenog DNA ili zbog oslobađanja slobodnih radikala nakon reoksigenacije (Bennewith & Durand 2004). Nema točno definiranih vremenskih okvira u kojima se razvijaju akutna i kronična hipoksija u eksperimentalnoj onkologiji. In vitro inkubacijsko vrijeme i in vivo ekspozicijsko vrijeme koje se pojavljuje u literaturi je varijabilno, a ponekad se vremena i preklapaju. Vrijeme i posljedice izloženosti ovise i o tumoru, ali i o metodama detekcije hipoksije (Bayer & Vaupel 2012).

5. Biološki odgovor tumorskih stanica na hipoksiju

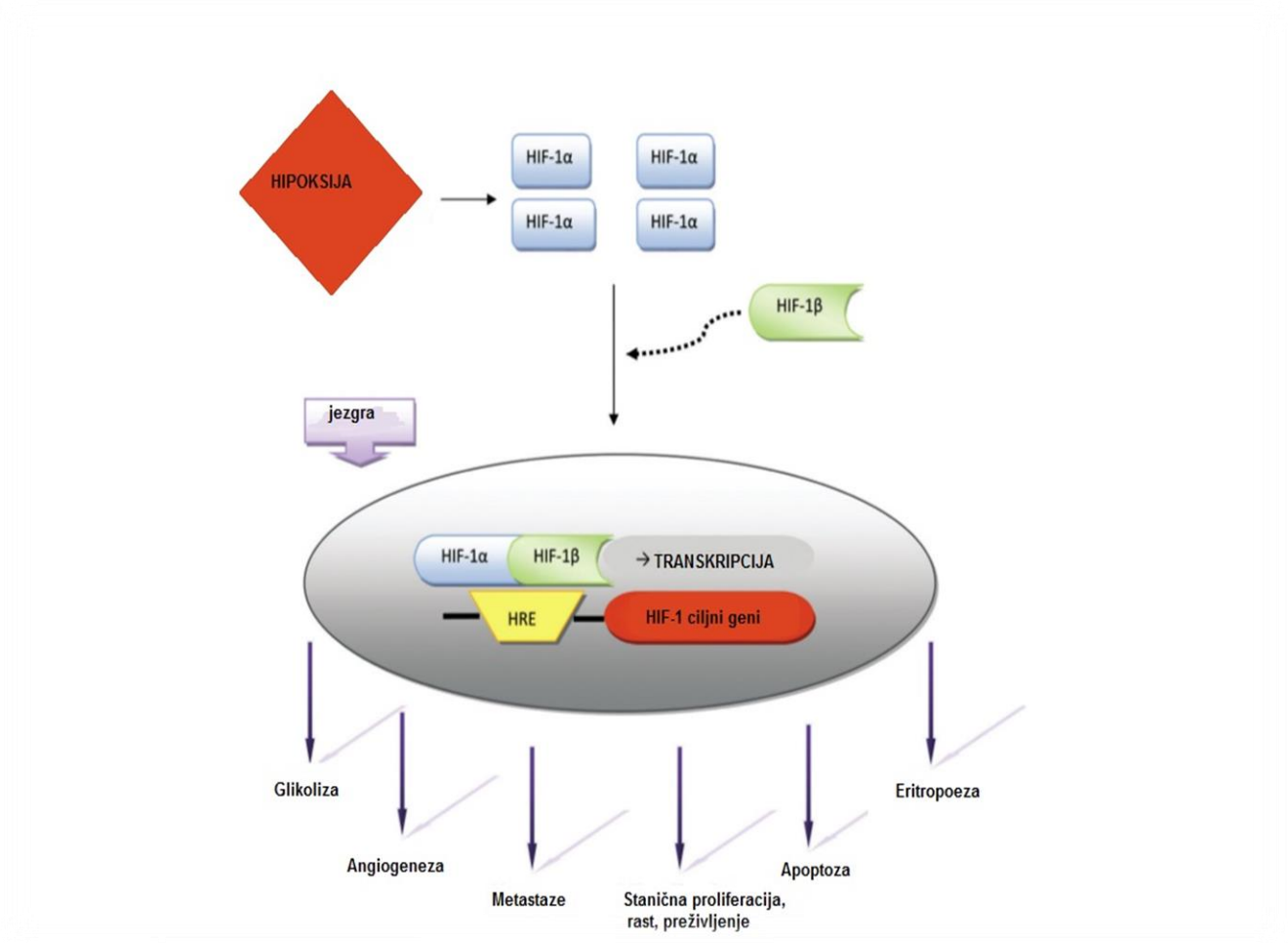
Tumorski mikrookoliš je metabolički heterogen; stanice blizu funkcionalne mikrovaskulature su dobro oksigenirane i ovise o oksidativnom metabolizmu, dok su udaljene stanice loše oksigenirane i ovise o glikolizi. Tumorske stanice usvajaju promjene u staničnom metabolizmu kao što su prelazak sa oksidativne fosforilacije na glikolizu, povećana sinteza glikogena; prelazak sa glukoze na glutamin kao glavni supstrat za sintezu masnih kiselina (Ratcliffe 2013).

Stanični odgovor na hipoksiju je moduliran preko grupe transkripcijskih faktora HIF, koja sadrži HIF-1a, HIF-2a i HIF-3a. Smatra se da je glavni regulator opskrbe i potrebe za kisikom HIF-1, koji koordinira metaboličko reprogramiranje na transkripcijskom nivou (Koh & Powis 2012). U hipoksičnim stanicama HIF-1 povećava ekspresiju transportera glukoze, glikolitičkih enzima (LDH-A, MCT-4) koji stimuliraju potrošnju glukoze, konverziju na laktate i izbacivanje laktata iz stanice. S druge strane, dobro oksigenirane stanice imaju ekspresiju MCT-1 i LDH-8, koji posreduju intracelularni transport laktata i njegovu konverziju u piruvat koji je potreban za oksidativni metabolizam (Semenza 2013).

5.1. Uloga HIF-1

HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od dvije podjedinice, HIF-1a i HIF-1b. HIF-1a je reguliran preko kisika, dok je HIF-1b konstitutivno izražen. Kada postoji normalan nivo kisika (normoksija), HIF-1a brzo degradira, dok hipoksija stabilizira HIF-1a i dovodi do njegove akumulacije. U prisutnosti kisika dolazi do hidroksilacije HIF-1a podjedinice i njenog vezivanja za von Hippel-Lindau (VHL) tumor supresor protein što dovodi do ubikvitinizacije i proteosomske degradacije. No, kada je opskrba kisikom limitirana, enzimi koji modificiraju HIFa (HIF hidroksilaze) postaju inaktivne i dolazi do stabilizacije HIFa i translokacije u jezgru. Kada dođe u jezgru, HIFa heterodimezira sa HIF-1b i veže se za specifične DNA sekvence

koje se nazivaju HRE (hypoxia responsive element). Neki od ciljnih gena do čije aktivacije dolazi su vaskularni endotelni čimbenik rasta A (VEGF), karbonska anhidraza IX (CA IX), GLUK1 i eritropoetin (Hammond et al.2014). Međutim, u nekim uvjetima dovoljne opskrbe kisikom, ekspresija HIF-1a se može povećati. HIF-1 u tumorskim stanicama može biti aktiviran ako tumor supresor geni izgube funkciju (npr. VHL), i/ili ako onkogeni poprime funkciju što rezultira porastom aktivnosti PI3K/AKT/mTOR signalnog puta. Načini na koje dolazi do povišenog nivoa HIF-1 proteina su različiti, tako će VHL protein mutacija stabilizirati HIF-1a protein, dok će aktivacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta stimulirati mRNA translaciju HIF-1a. Nakon stabilizacije, HIF-1a aktivira transkripciju brojnih gena uključenih u angiogenezu, proliferaciju, glikolizu, i pH regulaciju (slika 2) (Meijer et.al 2012). Regulacija angiogeneze i metabolizma je posredovana preko transkripcijske aktivnosti HIF-1a/HIF-1b heterodimera, dok je regulacija stanične proliferacije posredovana i preko transkripcijskih i netranskripcijskih efekata HIF-1a (Semenza 2013). HIF-1 je također medijator u metaboličkim promjenama koje pogoduju tumorskoj progresiji i rezistenciji na terapiju. Inhibitori HIF-a ili metaboličkih enzima mogu tumor učiniti pogodnijim za antineoplastičke tretmane (Wilson & Hay 2011). Isto tako, HIF pridonosi transaktivaciji gena koje kodiraju mikro RNA molekule (miRs). Mirko RNAs su male RNA molekule koje povezuju specifične mRNA sekvence, i na taj način inhibiraju translaciju ili stimuliraju njihovu degradaciju. Mnogi tipovi stanica pokazuju povećanu ekspresiju miR-210 koja je tipična za hipoksičan odgovor (Qin et al.2014). Pokazalo se da je prekomjerna ekspresija HIF-1 u tumorima povezana sa lošijom prognozom i povećanom tumorskom agresivnošću (Rohwer & Cramer 2011).

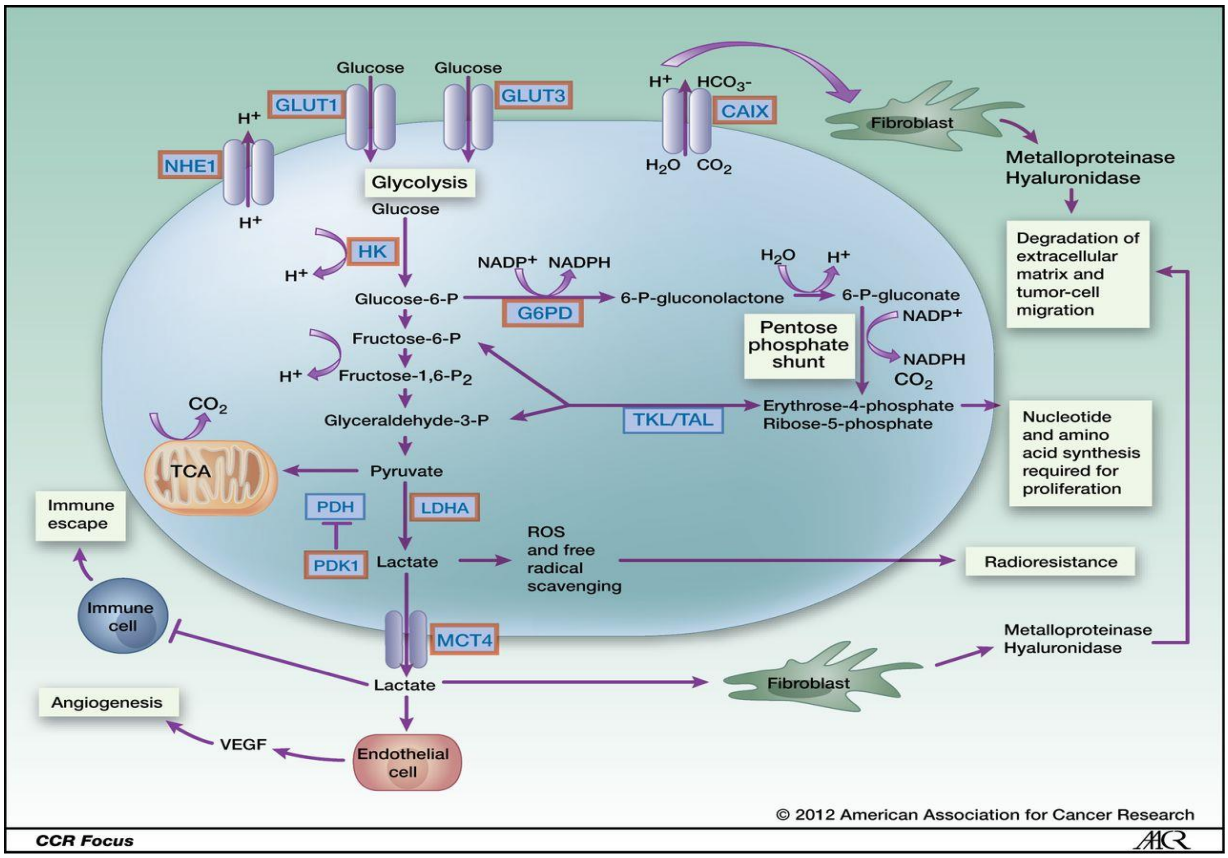


Slika 2. Hipoksija regulira brojne transkripcijske factore. HIF ima ključnu ulogu u transkripciji gena koji sudjeluju u tumorskoj progresiji, angiogenezi, eritropoezi, metabolizmu, apoptozi i remodeliranju tkiva. Prema: Dedić Plavetić et al.(2014) Period biol 116:361-364.

5.2. Metaboličko reprogramiranje

U aerobnim uvjetima, normalne stanice proizvode energiju preko mitohondrijske oksidativne fosforilacije i malim dijelom glikolizom. U hipoksičnim uvjetima, tumorske stanice se prebacuju na glikolizu za proizvodnju energije; proces kojim se dobiva piruvat, laktat i vodikovi ioni se naziva anaerobna glikoliza (Pasteurov efekt). Međutim, obilježje tumorskih stanica je visoka konzumacija glukoze i proizvodnja laktata čak i u prisutnosti kisika (aerobna

glikoliza, Warburg efekt). HIF-1 započinje transkripciju gena koji kodiraju transportere i enzime koji sudjeluju u glikolizi i pentoza fosfatnom putu. Ti transporteri i enzimi sudjeluju u ulasku glukoze u stanicu (GLUT1, GLUT3), fosforilaciji glukoze u glukoza-6-fosfat (HK), konverziji glukoza-6-fosfata u 6-fosfoglukanolakton koji sudjeluje u pentoza fosfatnom putu (G6PD), konverziji piruvata u laktat(LDHA), transport laktata (MCT4) i pH regulaciji (CAIX, NHE1). Također aktivacija PDK1 inhibira konverziju piruvata u acetil koenzim A (acetil CoA), što rezultira u smanjenom prolasku kroz oksidativnu fosforilaciju. Pentoza fosfatni put sintetizira prekursore nukleotida i aminokiselina koje su potrebne za rast tumorskih stanica i proliferaciju, te se oslobađa ugljični dioksid koji dovodi do acidifikacije ekstracelularnog matriksa preko karbonska anhidraze (CAIX). Glikolitički metabolizam u tumorima korelira sa rezistencijom na radioterapiju. Laktati i kiseline mogu dovesti do sekrecije hijaluronidaze i metaloproteinaze te na taj način povećati incidenciju metastaza. Također inhibiraju funkciju dendritičkih stanica i T stanica te mogu izazvati angiogenezu (slika 3) (Meijer et al. 2012). Glikolitički produkti piruvat i laktat induciraju akumulaciju HIF-1a, te na taj način stvaraju mehanizam povratne sprege u kojem HIF-1 uzrokuje glikolitički metabolizam sa povišenom koncentracijom piruvata/laktata koji za uzvrat povećavaju HIF-1 aktivnost (Semenza 2010). Osim HIF-1, aktivirani onkogeni (npr. RAS, MYC) i PI3K/AKT/mTOR put također sudjeluju u regulaciji metaboličke promjene na glikolizu (Meijer 2010). Hipoksija također potiče ekspresiju gena za enzime potrebne za pretvorbu glukoze u glukagon kao što su HK1, PGM1, UGP2, GYS1; inhibira jetrenu glikogen fosforilazu (PYGL) te time inhibira glikogenolizu. Pretvorba glukoze u glukagon služi kao rezerva metaboličkog supstrata (Semenza 2013).



Slika 3. Metabolizam glukoze u tumorima i agresivno ponašanje tumora

Izvor: Meijer et al.(2012) Clin Cancer Res 858: 5585-5594.

5.3. Supresija DNA popravka

U pokušaju da se prilagode na hipoksične uvjete, tumorske stanice smanjuju stanične procese koji uključuju veliku energetsku potrošnju. Pokazalo se da je u hipoksičnim uvjetima generalni odgovor na hipoksiju supresija DNA popravka (homologna i nehomologna rekombinacija, popravak krivo sparenih baza). Sami mehanizmi koji su uključeni u supresiju su razni i uključuju ulogu HIF-a, micro-RNA i epigenetske modifikacije (Hammond 2014). Inaktivacija MMR pridonosi mutagenezi i tumorogenezi jer MMR popravlja krivo sparene baze tijekom replikacije DNA i ima ulogu u zastoju staničnog ciklusa i apoptozi kod određenih

oštečenja DNA. Hipoksija utječe na popravak krivo sparenih baza inhibicijom ekspresije MLH1, MSH2 i MSH6 što rezultira u promjenama prepoznavanja i inicijacije popravka krivo sparenih baza. Inhibicija ekspresije MSH2 i MSH6 je inducirana putem HIF-1, dok je histonska deacetilacija uzrok inhibicije MLH1 (Cosse & Michiels 2008). Za vrijeme replikacije DNA, oštečenja od strane slobodnih kisikovih radikala (ROS) mogu dovesti do prekida dvostruke zavojnice. Prekid dvostruke zavojnice je genotoksični tip oštečenja DNA koje može dovesti do kromosomske fragmentacije, translokacije i delecije, te je potreban brz popravak. Popravak prekida dvostruke zavojnice se događa kroz homolognu rekombinaciju, koje se događa u S ili G2 fazi staničnog ciklusa, i nehomolognu rekombinaciju koja se događa u svim fazama staničnog ciklusa. Hipoksija smanjuje ekspresiju RAD51, BRCA1, BRCA2 koji su odgovorni za homolognu rekombinaciju, i NSB1, Ku70, Ku80 koji su odgovorni za nehomolognu rekombinaciju (Cosse & Michiels 2008). Mehanizam smanjene regulacije RAD51 i BRCA1 ovisi o formaciji represivnog E2F4/p130 kompleksa na E2F mjestu promotora i neovisan je o HIF-1a i fazi staničnog ciklusa. Važno je da se hipoksijom posredovana supresija popravka DNA može dogoditi u raznim stanjima oksigenacije, a ne samo u slučaju anoksije, što ukazuje da će veći udio tumora imati smanjenu mogućnost DNA popravka. U slučaju teže hipoksije (<0.1% kisika), pojavljuju se specifični odgovori kojih nisu opaženi u slučaju blažih hipoksija. Pod teškom hipoksijom dva mehanizma (brzi i odgođeni) mogu utjecati na članove faktora eukariotske inicijacije (eIFs), koji uništavaju inicijaciju mRNA translacije. U brzom odgovoru inhibiran je eIF2a, dok je u odgođenom odgovoru inaktiviran eIF4 zbog produljene izloženosti teškoj hipoksiji. U odsutnosti kisika, aktivnost ribonukleotidnih reduktaza je smanjena , što dovodi do smanjenja nivoa dNTPa i replikacijskog stresa (Hammond 2014). Inhibicijom popravka DNA, vjerojatno kako bi očuvala potrošnju energije, hipoksija pridonosi genetskoj nestabilnosti, te izabire klonove tumorskih stanica agresivnijeg fenotipa (Cosse & Michiels 2008).

6. Uloga hipoksije u obilježjima tumora

6.1. Stanična proliferacija

Hipoksija i sa hipoksijom povezan nedostatak nutrijenata pridonosi usporavanju proliferacije, zajedno sa povećanom udaljenosti od tumorskih krvnih žila. Hipoksija regulira staničnu proliferaciju preko staničnog ciklusa i sinteze proteina.

Stanična proliferacija je kontrolirana preko c-Myc koji inducira ekspresiju nekoliko ciklina (D1,D2) i ciklin ovisnih kinaza (CDK4) (Cosse & Michiels 2008). C-Myc je transkripcijski faktor koji regulira masu mitohondrija i potrošnju kisika i poznato je da je smanjen u raznim tumorima (Ziello et al. 2007). Također, c-Myc smanjuje ekspresiju ciklin ovisnih inhibitora (p21, p27) i kodirajućih gena proteina koji su uključeni u zastoj rasta. U hipoksiji, stabilizacija HIF-1a dovodi do zastoja staničnog ciklusa preko inhibicije transkripcijske aktivnosti c-Myc (Cosse & Michiels 2008). Smanjene razine c-Myc u tumorskim stanicama dovode do povećane glikolize i smanjene mitohondrijske oksidacije , što su ključne karakteristike tumorskih stanica koje preživljavaju i proliferiraju u hipoksičnim uvjetima tumorskog mikrookoliša (Zhang et al. 2007). Kako bi očuvala vitalne funkcije i spriječila staničnu smrt, hipoksična stanica smanjuje procese koji uključuju visoku energetsku potrošnju, uključujući i translaciju. Međutim, translacija mRNA koja je važna za staničnu adaptaciju na hipoksiju, kao što je HIF-1a, HIF-1b, VEGF, PDGF, se odvija preko neovisnog puta translacije zbog prisutnosti unutarnjeg ribosomskog ulaza (IRES) u 5'-nekodirajuće regije mRNA. Smanjena proliferacija tumorskih stanica može utjecati na efektivnost kemoterapeutika, pošto su oni više efektivni prema proliferacijskim stanicama (Cosse & Michiels, 2008).

Kako bi nastavile rasti u u hipoksičnim uvjetima, tumorske stanice se prilagode na odsutnost egzogenih signala rasta, i postanu otporne na anti-proliferativne signale (Harris, 2002).

U hipoksičnom mikrookolišu, tumorske stanice rastu neovisno o egzogenim signalima rasta jer same izražavaju čimbenike rasta ili konstitutivno aktiviraju signalni put tih čimbenika rasta. Hipoksija može potaknuti tumorske stanice na ekspresiju raznih signala rasta kao što su EGF, inzulin, IGF-1, IGF-2 i PDGF, koji su poznati da promoviraju staničnu proliferaciju. HIF-

1a aktivira transkripciju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i VEGFR1 koji promovira proliferaciju endotelnih stanica i formaciju krvnih žila. Tumorske stanice također modificiraju signalni put inhibitora rasta. Tumor supresor PTEN može inhibirati PI3K/AKT put i regulirati stanični rast i preživljenje. Mutacije PTEN mogu promovirati rast tumora i sinergistički preko HIF posredovanih odgovora (Ruan et al. 2009).

6.2. Apoptoza

Tumor raste nekontrolirano zbog neravnoteže između stanične proliferacije i stanične smrti. Za razliku od normalnih stanica, tumorske stanice mogu slomiti ravnotežu između pro-apoptotičnih i anti-apoptotičnih čimbenika kako bi promovirali stanično preživljenje u različitim okolišnim uvjetima, kao što je hipoksični stres, radijacija, kemoterapija. Sami menhanizmi regulacije apoptoze u hipoksiji nisu posve jasni. Smatra se da je mitohondrijska propusnost centralni mehanizam u hipoksiji-posredovanoj apoptozi. HIF-1a promovira otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citoplazmu , i ta p53 ovisna apoptoza je posredovana preko Apaf-1 i kaspaze 9. Taj proces može biti poništen preko članova Bcl-2 grupe anti-apoptotičnih molekula kao što su Bcl-2 i Bcl-xL. Međutim Bax, još jedan član Bcl-2 grupe, spada u pro-apoptotičnu molekulu, i može povečati apoptozu izazvanu hipoksijom. HIF-1 aktivira BNIP3 i NIX, koji potiču mitohondrijsku propusnost i staničnu smrt preko mehanizma koji ne uključuje citokrom c i kaspazu (Ruan et al.2009). Dvostruka uloga hipoksije na regulaciju apoptoze je djelomično zbog uloge HIF-1, budući da HIF-1 promovira ekspresiju gena koji kodiraju i pro-apoptotične proteine (PUMA, BNIP3, BNIP3L) i anti-apoptotične proteine (Mcl-1, IAP-2) (Cosse & Michiels 2008). Također, samo fosforilirana HIF-1a veže HIF-1b u hipoksiji, dok defosforilirana forma HIF-1a veže p53 i potiče pro-apoptotičke efekte. Inicijacija apoptoze preko p53 se događa preko indukcije gena koji kodiraju pro-apoptotične proteine kao što su Bax, Puma, Fas, i preko direktne interakcije sa članovima Bcl2 obitelji. Dolazi do aktivacije Bax, a do inhibicije anti-apoptotičnih Bcl-XL i Bcl-2 (Cosse & Michiels

2008). Zbog toga, fosforilacijski status HIF-1a u hipoksiji je ključan faktor u odluci potiče li HIF apoptozu ili ne. Efekt HIF-1a na apoptozu također ovisi o tipu tumora i o prisutnosti ili odsutstvu genetičkih promjena koje mijenjaju ravnotežu između pro i anti-apoptotičkih faktora (Ruan et al.2009).

Međutim, izloženost hipoksiji može i povećati otpornost na apoptozu. Iako je hipoksija toksična i za tumorske stanice i normalne stanice, tumorske stanice mogu poprimiti genetske i adaptivne promjene u odgovoru na hipoksiju, što im može omogučiti otpornost na apoptozu i povečati njihovu sposobnost na preživljenje i proliferaciju u usporedbi s normalnim stanicama (Harris 2002). Tumorske stanice su razvile brojne mehanizme za izbjegavanje apoptoze posredovane preko HIF-1 u hipoksičnim uvjetima. Hipoksija može povećati ekspresiju MDM2, p-53 negativnog modulatora, i povećati staničnu otpornost na apoptozu in vivo, i promovirati metastaziranje (Zhang & Hill 2004).

6.3. Angiogeneza

Lolakni rast i mogućnost metastaziranja velikog broja malignih tumora ovisi o formaciji novih krvnih žila. Da bi rasli više od 1 do 2 mm u promjeru , solidni tumori zahtijevaju krvnu opskrbu kako bi dobili dovoljno nutrijenata i kisika (Ruan et al. 2009). Tumorska angiogeneza započinje sa aktivacijom endotelnih stanica od strane specifičnih čimbenika rasta. Aktivacija endotelnih stanica dovodi do degradacije ekstracelularnog matriksa i bazalnih membrana od strane aktiviranih proteaza, dopuštajući migraciju i proliferaciju endotelnih stanica i formaciju nezrelih krvnih žila. U usporedbi s normalnim tkivima, krvne žile tumora su dilatirane , imaju brojne arterio-venske shuntove , i nisu diferencirane u arteriole, kapilare i venule. Zbog tih obilježja, krvni protok je diskontinuiran i krvna opskrba tumora je neadekvatna, te i dalje postoje područja akutne i kronične hipoksije u vaskulariziranim tumorima (Cosse & Michiels 2008).

Hipoksija može inducirati brojne faktore angiogeneze kao što su VEGF, IL-8, angiogenin,

FGF, PDGF. VEGF ima ključnu ulogu u fiziologiji formacije krvnih žila i patološkoj angiogenezi u rastu tumora. Pojačana regulacija VEGF i drugih čimbenika, kao što je angiopoetin 2 (Ang 2), promovira inicijaciju i progresiju angiogeneze. VEGF-A je izražen u većini stanica i privlači vodi neovaskulaturu u hipoksična područja tumorskog tkiva (Ruan et al. 2009). Za vrijeme hipoksije, HIF-1 veže regulatornu regiju na VEGF genu, te time potiče njegovu transkripciju i ekspresiju (Ziello et al. 2007). Hipoksija može promovirati aktivnost HIF-1 da poveća regulaciju VEGF kao okidača za inicijaciju angiogeneze, ali također može smanjiti aktivnost angiogenog inhibitora trombospondina kako bi stvorila okoliš pogodan za angiogenezu (Ruan et al. 2009). Također, hipoksija regulira nekoliko metaloproteinaza koje posreduju u razgradnji ekstracelularnog matriksa i time pridonose proliferaciji i migraciji endotelnih stanica u matriks (Cosse & Michiels 2008).

S obzirom na dosadašnje postojeće dokaze, postoje dva različita modela, hipoksični krizni model i akceleracijski model, koji objašnjavaju ulogu hipoksije za vrijeme inicijacije ili ubrzanja angiogeneze. U vaskularnom kriznom modelu, hipoksija može inducirati VEGF da promovira inicijaciju angiogeneze. Međutim, akceleracijski model predlaže da hipoksija nije odgovorna za inicijaciju angiogeneze i da je ta inicijacija posredovana preko ne-hipoksičnih mehanizama, kao što je indukcija VEGF preko aktivacije onkogena. Jednom kada je angiogeneza započeta, tumorske stanice rastu brzo što dovodi do hipoksije. HIF-1 je tada povećan da bi ubrzao angiogenezu (Dewhirst et al. 2008).

Kada se sve uzme u obzir, hipoksija može promovirati angiogenezu na dva načina: prvo, preko direktne stimulacije ekspresije brojnih faktora angiogeneze koji su uključeni u rast i preživljenje endotelnih stanica; i drugo, inducirajući mikrookoliš koji omogućuje preživljenje tumorskih stanica, migraciju, i invaziju (Ruan et al. 2009).

6.4. Invazija i metastaze

Metastaziranje tumora je diseminacija tumorskih stanica iz primarnog rasta tumora prema udaljenim organima, pračeno stvaranjem sekundarnih tumora. Tumorske stanice se mogu širiti preko dva puta : krvnim žilama ili limfnim žilama. Tumorske stanice mogu pristupiti krvotoku direktno iz krvnih žila primarnog tumora ili indirektno, preko limfnog sustava (Gilkes & Semenza, 2013). Proces stvaranja metastaza se sastoji od nekoliko koraka, prvo tumorske stanice trebaju prekinuti kontakt sa susjednim stanicama, invadirati ekstracelularni matriks, penetrirati krvne žile (intravazacija), zatim trebaju preživjeti obranu imunog sustava domaćina, te izaći iz krvnih žila (ekstravazacija) u tkivo gdje se mogu implantirati i proliferirati (Cosse & Michiels 2008). U hipoksičnim uvjetima , tumorske stanice poprimaju seriju promjene kako bi preživjele, ali i kako bi se proširile i promovirale invaziju i metastaze. Kliničke studije su pokazale da je hipoksija tumora jedna od važnih obilježja mikrookoliša za diseminaciju tumorskih stanica. Međutim, mehanizmi koji dovode do povišenog metastatskog potencijala tumorskih stanica izloženih hipoksiji i uloga HIF-1a u metastaziranju nisu točno definirani (Ruan et al. 2009).

Prvi korak u metastaziranju uključuje epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). Dobro polarizirane, adhezivne epitelne stanice su pretvorene u ne-polarizirane mezenhimalne stanice. EMT je proces koji zahtijeva koordinaciju nekoliko staničnih događaja, uključujući prekid intracelularne adhezije posredovane preko kadherina i adherina, reorganizaciju citoskeletne arhitekture i degradaciju bazalne membrane. Hipoksija i prekomjerna ekspresija HIF-1 a promoviraju EMT i metastatske fenotipove (Ruan et al.2009). Hipoksijom inducirana aktivacija HIFa je povezana sa gubitkom E-kadherina, što je obilježje invazije i ključni element EMT. Mnogi geni koji reguliraju EMT su inducirani hipoksijom, kao što su SNAIL1, SLUG, TWIST, te smanjuju ekspresiju E-kadherina. Gubitak ili redukcija ekspresije E-kadherina je često nađen u naprednim stadijima karcinoma, uključujući i duktalni karcinom dojke (Gilkes & Semenza 2013).

Da bi se dogodila invazija, tumorske stanice moraju degradirati bazalnu membranu. Matriks metaloproteinaze (MMP) su obitelj cink ovisnih endopeptidaza koje degradiraju

ekstracelularni matriks. MMP-2 i MMP-9 razgrađuju kolagen tipa 4, koji je glavna komponenta bazalne membrane. Povećane razine MMP-2 u bioptatima karcinoma dojke povezan je sa lošijom prognozom. Hipoksija potiče povećanu ekspresiju i aktivnost MMP-2 i MMP-9 preko HIF-1 ovisnog procesa (Gilkes & Semenza 2013).

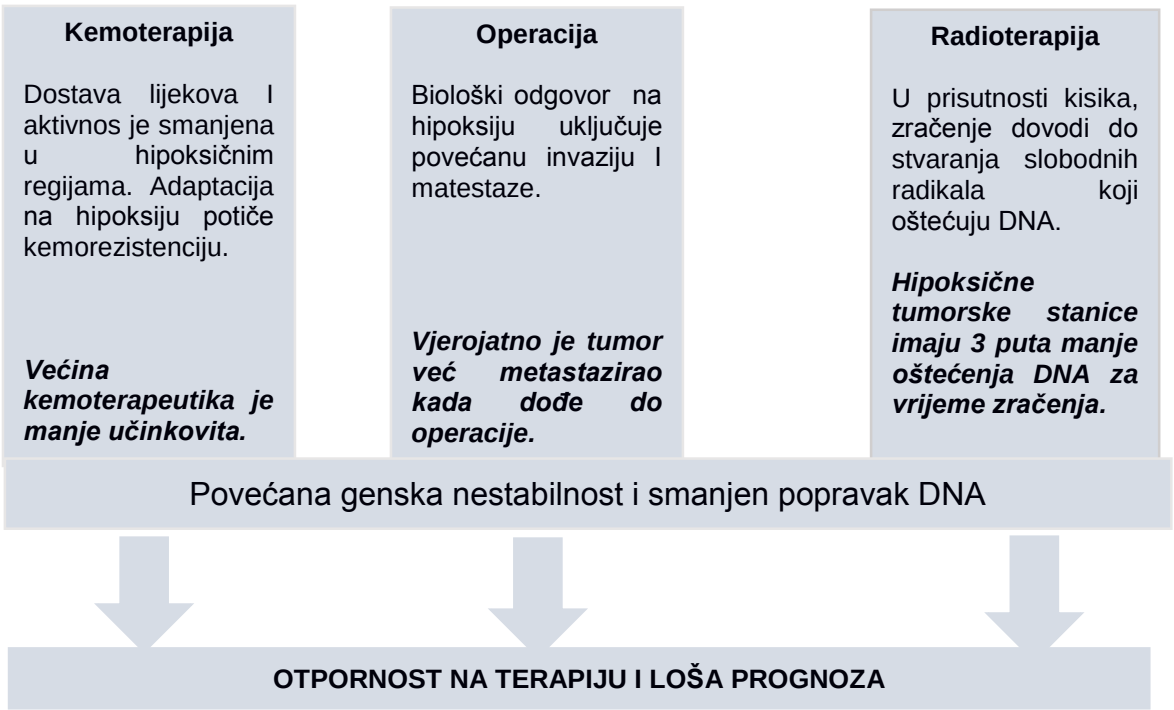
Aktivacija plazminogena putem urokinaze (uPA/uPAR) je regulirana od strane hipoksije inducirane ekspresije uPAR i uključena je u razgradnju esktracelularnog matriksa. uPA se veže za uPAR receptro i potiče aktivaciju uPA proteaze , koja pretvara plazminogen u plazmin. Plazmin oslobađa nekoliko proteolitičkih enzima uključujući gelatinaze i kolagenaze. Stadij intravazacije je također reguliran preko hipoksije, pošto hipoksija promovira angiogenezu i samim time ekspresiju vazodilatatora kao što je VEGF. Obilježja krvnih žila tumora, kao i visoki intersticijski tlak, pomažu intravazaciji tumorskih stanica u krvne žile tumora (Cosse & Michiels 2008).

Ekstravazacija uključuje adheziju tumorskih stanica na endotel krvnih žila, poznato kao marginacija. Nedavno su identificirani HIF ciljni geni koji potiču ekstravazaciju putem marginacije tumorskih stanica (L1CAM, CD24) (Gilkies & Semenza 2013).

U pretkliničkim modelima, uspješna delecija HIF-1a inhibira primarni rast tumora, suprimira plućne metastaze i produljuje preživljenje. Gubitak HIF-1a inhibira ekspresiju markera bazalnog karcinoma dojke , kao i brojne gene uključene u epitelno-mezenhimalnu tranziciju (Fu et al. 2014). Ekspresija brojnih gena koji su povezani sa metastazama karcinoma dojke su povećani u hipoksičnim uvjetima, što je povezano sa lošijom prognozom. Bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji uključuju hipoksijom stimulirane metastaze karcinoma dojke može pridonijeti boljim prognostičkim kao i terapeutskim implikacijama (Dedić Plavetić et al. 2014).

7. Kliničke i terapijske implikacije tumorske hipoksije

Važnost hipoksije na prognozu i terapiju pokazala se u nekoliko studija, te je povezana sa rezsitencijom na postojeću terapiju, uključujući kemoterapiju, radioterapiju i kirurgiju.(slika 4) Hipoksične stanice su rezistentne na kemoterapiju iz nekoliko razloga, uključujući udaljenost od krvnih žila, niska proliferacija stanica u hipoksičnim područjima. Efikasnost radioterapije ovisi o brojnim faktorima, kao što je postotak stanica izloženih radiobiološkim razinama hiposkije tumora. Prisutnost kisika u vrijeme ionizirajučeg zračenja dovodi do proizvodnje slobodnih radikala koji oštećuju DNA, te je otežan stanični popravak DNA. Posljedica toga je da hipoksične stanice mogu biti do tri puta rezistentnije na zračenje od stanica u normalnim koncentracijama kisika. Hipoksija tumora je povezana s lošom prognozom i kod kirurškog odstranjenja , pošto biološki odgovori na hipoksiju uključuju povećanu invaziju i metastaze (Hammond et al.2014).



Slika 4. Hipoksični tumori su rezistentni na terapiju i povezani s lošom prognozom

Izrađeno prema Hammond et al.(2014) Clinical Oncology 26:277-288.

7.1. Efekt hipoksije na radioterapiju

HIF-1 ima važnu ulogu u rezistenciji tumora na radioterapiju, kroz postradijacijsku vaskularnu zaštitu, ili kroz povećan anti-oksidativni kapacitet preko inicijacije glikolitičkog metabolizma tumora (Meijer et al.2012).

Radijacijom inducirana reoksigenacija je proces u kojem preživjele hipoksične tumorske stanice postanu bolje oksigenirane poslije zračenja zbog smrti aerobne populacije stanica. Zbog toga, nekoliko sati poslije zračenja dolazi do pada aktivnosti HIF-1, međutim u isto vrijeme stvaraju se slobodni kisikovi radikali koji potiču stabilizaciju HIF-1a. HIF-1 je odgovoran za vaskularnu zaštitu, oporavak krvne opskrbe tumora postradijacijski zbog stimulacije angiogeneza i vaskulogeneze. Regulacija HIF-1 stimulira tumorske stanice na proizvodnju VEGF i drugih proangiogenih faktora koji potiču angiogenezu i štite mikrovaskulaturu od radijacijom izazvana endotelne apoptoze. Drugi razlog zbog kojeg su hipoksične tumorske stanice rezistentne na radioterapiju je zbog povećanih endogenih antioksidansa kroz akumulaciju piruvata, laktata, glutation/glutation disulfida, NAD(P)H/NAD(P)+ koji se nakupljaju tijekom glikolitičkog metabolizma. Te molekule uspješno skupljaju slobodne radikale i na taj način smanjuju oštećenja DNA koje slobodni radikali uzrokuju. U pretkliničkim istraživanjima, blokada HIF-1a i tumorskog metabolizma glukoze utječe na tumorski mikrookoliš, stimulira metaboličke alternacije i senzitizira brojne tumore na radijaciju (Meijer et al. 2012). Postoji nekoliko skupina lijekova koji inhibiraju aktivnost HIF-1 i rast tumora kao što su antraciklini (doxorubicin), inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta (cetuximab), inhibitori topoisomeraze 1 (topoectan) (Semenza 2010). Pošto HIF-1 nije izražen u svim tumorskim stanicama, inhibicija aktivosti HIF-1 ne bi bila efektivna kao monoterapija. Zato bi klinička istraživanja trebala kombinirati inhibiciju HIF-1 sa radioterapijom i fokusirati se na optimalnu selekciju pacijenata (Moeller & Dewhirst 2006).

Modulacija metabolizma glukoze u tumorima se može događati na nekoliko razina, direktno preko inhibicije enzima i transportera uključenih u metabolizam glukoze, ili indirektno preko

anti-HIF-1 terapije (Tennant et al. 2010). Buduća istraživanja trebala bi istražiti jesu li inhibitori HIF-1 i metabolizma glukoze korisni u kliničkoj praksi. Posebnu pažnju treba posvetiti efektu inhibicije HIF-1 na glikolitički i redoks status tumora, te je potrebno utvrditi optimalno vrijeme za uvođenje inhibitora tijekom terapije (Meijer et al.2012).

Kako bi se odabrali prikladni pacijenti za takvu kombinaciju terapije, potrebno je koristiti slikovne pretrage koje bi pokazale ekspresiju HIF-1, promjene u metabolizmu glukoze i samim tim odgovor na radioterapiju. Postoje brojni potencijalni slikovni pristupi koji bi se mogli koristiti za identifikaciju hipoksičnih tumora. PET, MRI i CT su tehnike koje se koriste u rutinskoj kliničkoj praksi, i kada se koriste da pokažu hipoksiju predviđaju lošiju prognozu na radioterapiju u onih tumora koji se identificiraju kao hipoksični. PET markeri, posebno nitroimidazol, su vjerojatno najtočnija metoda pošto direktno identificiraju prisutnost hipoksije, dok su oni bazirani na perfuziji indirektni te stoga i manje specifični. PET oslikavanje hipoksije se može iskoristiti kako bi se izabrali pacijenti sa hipoksičnim tumorima koji bi mogli ići na dodatne terapije, ili preko hipoksija posredovanih lijekova, ili povišenjem radijacijske doze na cijeli tumor ili, ako je pretraga dovoljno precizna, samo na hipoksična područja (Horsman et al. 2012).

7.2. Hipoksijom posredovana rezistencija na kemoterapiju

Hipoksija u tumorima je povezana sa rezistencijom na kemoterapiju. Velika difuzijska udaljenost koja odvaja hipoksična područja od krvnih žila ograničava distribuciju lijekova, dok nizak ekstracelularni pH u tumorima smanjuje ulazak lijekova u stanice. S druge strane, obilježja mikrookoliša tumora, osobito hipoksija, potiču stanične prilagodbe koje pridonose rezistenciji na kemoterapeutike. Te prilagodbe smanjuju primitak lijekova preko smanjenog ekstracelularnog pH i preko ekspresije ksenobiotske pumpe. Efektivnost kemoterapeutika je također smanjena zbog hipoksijom inducirane promjene puta stanične smrti i selekcije rezistentnih stanica (Cosse & Michiels 2008).

Nizak ekstracelularni pH pridonosi tumorskoj invazivnosti jer potiče degradaciju ekstracelularnog matriksa. Uz to, nizak pH smanjuje stanični primitak kemoterapeutika koji imaju disocijacijsku konstantu između 7.5 i 9.5, kao što su doksorubicin i vinkristin (Cosse & Michiels 2008). Jedan od molekularnih mehanizama kojim HIF-1 pridonosi u rezistenciji na lijekove je to što HIF-1 aktivira MDR1 gen u odgvoru na hipoksiju. MDR1 kodira za membranski P-glikoprotein (P-gp) koji pripada obitelji ABC transportera (Rohwer & Cramer 2011). ABC transporteri funkcioniraju kao energetski ovisne membranske pumpe koje transportiraju ksenobiotike kako bi održale intracelularnu koncentraciju ispod toksičnog nivoa (Cosse & Michiels 2008). P-gp može smanjiiti intracelularnu koncentraciju nekoliko kemoterapeutika kao što su vinka alkaloidi, antraciklini i paclitaxel. Ekspresija P-gp kao odgovora na hipoksiju je uočena u mnogim tumorskim stanicama, uključujući gliom, karcinom želuca, karcinom dojke, i karcinom kolona (Rohwer & Cramer 2011).

Kemoterapeutici su djelotvorniji prema stanicama u proliferaciji, te će zato sporo proliferacijske stanice koje se nalaze na većoj udaljenosti od tumorskih krvnih žila biti otpornije na kemoterapiju. Cilj kemoterapije je oštetiti komponente tumorskih stanica kako bi ih eliminirale apoptozom, nekrozom ili autofagijom. Način stanične smrti je određen tipom prouzročene štete, dozom lijeka i staničnog tipa. Većina kemoterapeutika potiču oštećenje DNA, a apoptoza je primarni mehanizam staničnog odgovora na DNA oštećenje. Tako je još jedan mehanizam rezistencije na kemoterapiju uzrokovan hipoksijom, inhibicija apoptoze (Cosse & Michiels 2008).

Mnogi mehanizmi hipoksijom posredovane rezistencije na kemoterapiju pokazani su na MDA-MB 231 staničnoj liniji karcinoma dojke. Prekondicioniranje hipoksijom tih stanica karcinoma dojke dovodi do rezsitencije na mnoge skupine kemoterapeutika kao što su antraciklini, etoposid, mitoxantron. Akutna izloženost tim lijekovima dovodi do brojnih jezgernih i citoplazmatskih promjena (Sullivan et al. 2008).

Stanice sa većom ekspresijom HIF-1a su efektivnije u popravku dvostruke zavojnice DNA, rezistentnije na karboplatinu, etoposid i zračenje u usporedbi sa stanicama kojima nedostaje HIF-1a. Hipoksija može stimulirati kemorezistenciju na doksorubicin u eksperimentalnim

modelima na MCF-7 i HCC1973 staničnim linijama. Hipoksija pridonosi i povećanoj epitelno mezenhimalnoj tranziciji preko modulirane ekspresije E-kadherina i vimentina. Hipoksija smanjuje ekspresiju E-kadherina i povećava ekspresiju vimentina. Tan IIA vraća njihovu ekspresiju na kontroliranu razinu. Ti efekti trebaju biti još potvrđeni u dodatnim in vivo istraživanjima (Dedić Plavetić et al.2014).

7.3. Biološka terapija u hipoksiji

Hipoksija potiče neoangiogenezu koja dovodi do formiranja abnormalne vaskularne mreže. Strukturne abnormalnosti krvnih žila tumora dovode do abnormalnog tumorskog mikrookoliša (hipoksija, acidoza, visoki intersticijski tlak). Ta obilježja onemogućuju dostavu lijekova i smanjuju efektivost terapije. Zbog toga se u terapiji koriste antiangiogeni lijekovi koji dovode do normalizacije vaskulature i poboljšavaju efektivnost kemoterapije i radioterapije. Normalizacija se može postići preko VEGF signalnog puta, koji ima ključnu ulogu u stvaranju tumorskih krvnih žila. Uglavnom se koriste bevazicumab (protutijelo na VEGF) i protutijelo na VEGFR2 (Dc101) kako bi poboljšali strukuru i funkciju krvnih žila (Cosse & Michiels 2008).

Međutim, nedavna klinička istraživanja dovode u pitanje njihovu efektivnost u karcinomu dojke. Pretklinički pokusi sugeriraju da bi antiangiogeni lijekovi mogli i povćati invaziju i metastaze karcinoma dojke. Sunitinib i bevazicumab dovode do proliferacije tumorskih matičnih stanica preko stimulacije intratumorkse hipoksije u ksenograftima karcinoma dojke. Pretklinička ispitivanja indiciraju da bi HIF inhibitori i dikloracetat (DCA) mogli povećati efikasnost bevazicumaba kao inhibitora angiogeneze (Dedić Plavetić et al.2014).

Topotekan je inhibitor topoizometaze I koji potiče DNA oštećenje i citotoksičnost. Također, inhibira HIF-1a te se koristio zajedno sa bevazicumabom kako bi se pokazalo utječe li na aktivnost bevazicumaba. Dodatak topotekana bevazicumabu u ksenograftima doveo je do dodatne inhibicije transkripcijske aktivnosti HIF-1, značajne inhibicije proliferacije i indukcije apoptoze. Ti rezultati značajno sugeriraju mogućnost kombinacije anti-VEGF protuijela i HIF

inhibitora u terapiji protiv hipoksičnog tumorskog mikrookoliša (Rapsidara et al. 2009).

Dikloracetat (DCA) reaktivira mitohondrijsku respiraciju te povećava efekt bevazicumaba. DCA i bevazicumab zajedno su drastično smanjili rast tumora u usporedbi sa samostalnom terapijom. Te je njihova kombinacija još jedna potencijalna antineoplastična strategija (Kumar et al. 2013).

Melanomi koji imaju V600E BRAF mutaciju pokazuju povećanu ekspresiju HIF-1a. Vemurafenib koji cilja mutirani BRAF odobren je za tretman uznapredovalih melanoma. Rezistencija na vemurafenib je u prepoznata u sve većem broju. Vemurafenib rezistentni melanomi odgovaraju na terapiju sa porastom razine HIF-1a, što služi kao jedan od mehanizama njihove rezistencije (Dedić Plavetić et al.2014).

8. Zaključak

Hipoksija je prisutna u mnogim solidnim tumorima, uglavnom zbog neadekvatne krvne opskrbe i brzog rasta tumora. Kako bi se prilagodile na hipoksiju, tumorske stanice poprimaju brojna obilježja, uključujući i povećanu ekspresiju HIF-1 faktora koji potiče transkripciju gena uključenih u progresiju tumora, angiogenezu, eritropoezu, promjene u metabolizmu, apoptozu i remodeliranje tkiva. Zbog tih obilježja, hipoksija i povećana ekspresija HIF-1 faktora povezana je sa lošijom prognozom i rezistencijom na radioterapiju, kemoterapiju i biološku terapiju tumora. Provedena su istraživanja u kojima se pokazala bolja djelotvornost radioterapije i biološke terapije u kombinaciji sa HIF-1 inhibitorima, ili inhibitorima metabolizma glukoze. To otvara mogućnost za kombinaciju dosadašnjih metoda liječenja (radioterapija, kemoterapija, biološka terapija) sa specifičnim lijekovima koji djeluju na HIF kako bi se postigli bolji rezultati, nego primjenom samo jedne metode, npr.radioterapiije. Bolje razumijevanje efekta tumorske hipoksije i tumorskog mikrookoliša može nam omogućiti nove strategije kojima bi mogli djelovati na hipoksične tumore.

9. Zahvale

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc Stjepku Pleštini na uloženom vremenu, trudu i stručnim savjetima koji su mi pomogli u pisanju ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem svim svojim prijateljima, posebno Katarini i Juliji koje su uvijek uz mene.

Posebnu zahvalu upućujem prijateljici i kolegici Anji, bez koje razdoblje provedeno na fakultetu ne bi bilo isto. Zahvaljujem i sestri Ani i roditeljima koji su me podržavali kroz studij medicine.

10. Literatura

1. Bayer C, Shi K, Astner ST et al (2011) Acute versus chronic hypoxia: why a simplified classification is simply not enough. Int J Radiat Oncol Biol Phys 80:965–968.
2. Bayer C, Vaupel P (2012) Acute versus chronic hypoxia in tumors. Strahlenthere Onkol 188:616-627.
3. Bennewith KL, Durand RE (2004) Quantifying transient hypoxia in human tumor xenografts by flow cytometry. Cancer Res 64:6183–6189.
4. Cosse J P, Michiels C (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. Mol Cancer Ther 8(7): Anticancer Agents Med Chem 8 (7):790-797.
5. Dedić Plavetić N, Barić M, Bradić L, Kulić A, Pleština S (2014) Hypoxia in solid tumors: biological responses to hypoxia and implications on therapy and prognosis. Period biol 116:361-364.
6. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. Nat Rev Cancer 8:425-437.
7. Hammond E M, Asselin M C, Forster D, O'Connor J P B, Senra J M, Williams K J (2014) The Meaning, Measurement and Modification of Hypoxia in the Laboratory and the Clinic. Clinical Oncology 26:277-288.
8. Gilkes D M, Semenza G L 2013 Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. Future Oncol 9(11): 1623-1636.
9. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. Cell 100:57-70.
10. Harris AL. (2002) Hypoxia-A key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer 2:38-47.
11. Horsman M R, Mortensen L S, Petersen J B, Busk M, Overgaard J 2012 Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. Nat Rev Clin Oncol 9(12): 674-687.

12. Koh M Y, Powis G (2012) Passing the baton: The HIF switch. Trends Biochem Sci 37(9): 364–372.
13. Kumar K, Wigfield S, Gee H E, Devlin C M, Singleton D, Li J L, Buffa F, Huffman M, Sinn A L, Silver J, Turley H, Leek R, Harris A L, IVAN M (2013) Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. J Mol Med (Berl) 91:749-758.
14. Lin Q, Yun Z (2010) Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. Cancer Biol Ther 9:949-956.
15. Meijer T W H, Kaanders J H A M, Span P N, Bussink J (2012) Targeting Hypoxia, HIF-1, and Tumor Glucose Metabolism to Improve Radiotherapy Efficacy. Clin Cancer Res 18: 5585-5594.
16. Moeller BJ, Dewhirst MW. (2006) HIF-1 and tumour radiosensitivity. Br J Cancer. 95:1–5.
17. Qin Q, Ferong W, Baosheng L (2014) Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 33:50.
18. Rapsidara A, Hollingshead M, Uranchimeg B, Bonomi C A, Borgel SD, Carter J P et al. (2009) Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. Mol Cancer Ther 8:1867-1877.
19. Ratcliffe P J (2013) Oxygen sensing and hypoxia signaling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. J Physiol 591:2027-2042.
20. Rohwer N, Cramer T (2011) Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. Drug Resistance Updates 14:191-201.
21. Ruan K, Song G, Ouyang G (2009) Role of Hypoxia in the Hallmarks of Human Cancer. Journal of Cellular Biochemistry 107:1053-1062.
22. Semenza GL (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene 29:625-634.
23. Semenza G L (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia

and oncogenic mutations. The Journal of Clinical Investigation 123: 3664-3671.

24. Sullivan R, Pare G C, Frederiksen L J, Semenza G L, Graham C H (2008) Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is activity associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. Mol Cancer Ther 7: 1961-1973.
25. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E (2010) Targeting metabolic transformation for cancer therapy. Nat Rev Cancer 10:267-277.
26. Vaupel P, Harrison L (2004) Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. Oncologist 9:4-9.
27. Wilson W R, Hay M P (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. Nat Rev Cancer 11:393-410.
28. Yotnda P, Wu D, Swanson AM (2010) Hypoxic Tumors and Their Effect on Immune Cells and Cancer Therapy. U Yotnda P, ed. Immunotherapy of Cancer, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, str.1-29.
29. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y (2007) Hypoxia-inducible Factor (HIF-)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. Yale Journal of Biology and Medicine 80:51-60.
30. Zhang L, Hill RP (2004) Hypoxia enchances metastatic efficiency by upregulating Mdm2 in KHT cells and increasing resistance to apoptosis. Cancer Res 64:4180-4189.
31. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI et al. (2007) HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. Cancer Cell 11:407-420.

11. Životopis

Zovem se Lea Korša. Rođena sam 19.03.1991. u Zagrebu.

Nakon završene osnovne škole, 2006.godine upisala sam XV.gimnaziju-matematički smjer u Zagrebu. Maturirala sam 2010. godine sa odličnim uspjehom.

Medicinski fakultet u Zagrebu upisala sam 2010.godine. Prisustovala sam na međunarodnom znanstvenom kongresu studenata i mladih znanstvenika biomedicinskog područja CROSS 10, CROSS 11 i CROSS 12.

Aktivno se služim engleskim jezikom. Informatički sam pismena.