

# Nádorová hypoxia – molekulárne mechanizmy a klinický význam

## Tumour Hypoxia – Molecular Mechanisms and Clinical Relevance

Takáčová M.<sup>1,2</sup>, Pastoreková S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Oddelenie molekulárnej medicíny, Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

### Súhrn

Kyslík je absolútne nevyhnutný pre fungovanie živých organizmov a zmeny v jeho koncentrácii majú dramatické následky. V nádorovom tkanive zohráva kyslík významnú úlohu v produkcii energie a modulácii oxidačno-redukčnej rovnováhy. Výsledkom jeho nedostatočnej hladiny je hypoxia, ktorá predstavuje charakteristickú črtu nádorového mikroprostredia. Kľúčovým koordinátorom odpovede na hypoxiu na bunkovej úrovni je hypoxiou-indukovaný transkripčný faktor, ktorý reguluje expresiu viac ako stovky génov zapojených do významných bunkových procesov. Z klinického hľadiska sú fenotypové zmeny navodené hypoxiou veľmi závažné. Nádorová hypoxia je asociovaná s rezistenciou voči terapii, progresiou a rekurenciou ochorenia ako aj so zvýšenou mortalitou. Preto intratumorová hypoxia predstavuje vážny terapeutický problém a jej detekcia môže prispieť k zlepšeniu stratifikácie pacientov pre vhodnú terapiu. V súčasnej dobe dostupné stratégie zamerané na detekciu hypoxie v nádorovom tkanive prinášajú pomerne dosť limitácií, napr. invazívnosť, nedostupnosť tkaniva, nízku citlivosť, nepresnú interpretáciu a pod. Na druhej strane sa však ponúka využitie endogénnych markerov hypoxie, ktorých detekcia prostredníctvom imunohistochemie je pomerne ľahká, dostupná, reprodukovateľná a použiteľná nielen prospektívne, ale aj retrospektívne na archivovaných vzorkách tkanív. Patrí medzi ne napr. karbonická anhydráza IX (CA IX), ktorá v súčasnosti predstavuje jeden z prominentných indikátorov chronickej hypoxie v nádoroch. Hypoxiou-indukované proteíny (vrátane CA IX) sú zároveň aj potenciálnymi terčami protinádorovej terapie a ich praktické využitie je predmetom intenzívneho výskumu.

### Kľúčové slová

hypoxia – nádorové mikroprostredie – hypoxiou-indukovaný faktor – rezistencia – karbonická anhydráza IX

### Summary

Oxygen is absolutely essential for correct functioning of living organisms and alterations in its concentration lead to serious consequences. In tumor tissues, oxygen plays an important role in energy production and modulation of red-ox balance. Insufficient oxygen supply within tissues results in hypoxia that is a characteristic feature of the tumor microenvironment. Hypoxia-inducible transcriptional factor represents a key executor of a cellular and molecular response to hypoxia and can activate the expression of more than hundred genes involved in various essential cellular processes. From the clinical point of view, phenotypic alterations caused by hypoxia are serious. Tumor hypoxia has been associated with resistance to therapy, disease progression and recurrence as well as increased mortality. Therefore, intratumoral hypoxia represents a clinically relevant problem, and its detection within tumors is very important for patient stratification for a suitable treatment. Currently available strategies directed towards the detection of hypoxic regions within tumor tissue suffer from numerous limitations e.g. invasiveness, inaccessibility of tumor tissue, low sensibility, inaccurate interpretation etc. On the other hand, the use of an intrinsic endogenous hypoxic marker, which can be detected through immunohistochemistry, is relatively simple, routinely available, and reproducible and can be performed on both prospective and retrospective samples. These include carbonic anhydrase IX (CA IX), one of the most strongly hypoxia-induced proteins and a prominent indicator of chronic hypoxia. Moreover, hypoxia-induced proteins (including CA IX) are also potential targets of anticancer therapy, and their practical application is a subject of intense research.

### Key words

hypoxia – tumor microenvironment – hypoxia-inducible factor – resistance – carbonic anhydrase IX

Práca bola podporená Evropským fondom pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpl – RECAMO (CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, Evropským fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Slovenskej republiky (ITMS 26240220087) a Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 2/0152/12.

This study was supported by European Regional Development Fund and the state budget of the Czech Republic for Regional Centre for Applied Molecular Oncology – RECAMO (CZ.1.05/2.1.00/03.0101), the project MEYS – NPS I – LO1413, European Regional Development Fund and the State Budget of the Slovak Republic (ITMS 26240220087) and the Slovak Scientific Grant Agency VEGA 2/0152/12.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.  
Oddelenie molekulárnej medicíny  
Virologický ústav  
Slovenská akadémia vied  
Dúbravská cesta 9  
845 05 Bratislava  
Slovenská republika  
e-mail: silvia.pastorekova@savba.sk

Obdržané/Submitted: 27. 3. 2015

Prijaté/Accepted: 13. 4. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2015183>

## Úvod

Hypoxia ako súčasť nádorového mikroprostredia a charakteristika pevných nádorov bola po prvýkrát popísaná pred viac ako 60 rokmi. Pomerne rýchlo bolo zrejmé, že bude predstavovať vážny klinický problém spojený s neúčinnou terapiou. Hoci sa za posledné obdobie podarilo prostredníctvom mnohých klinických a experimentálnych štúdií prispieť k pochopeniu hypoxie a jej vplyvu na bunkovej/molekulárnej úrovni, cieľená terapia hypoxických nádorov zostáva naďalej otvorená.

Termín hypoxia používame na označenie situácie s nedostatočnou hladinou kyslíka, ktorá nastáva nielen v nádoroch, ale aj v zdravých tkanivách a v ranách. Naproti tomu normálna hladina kyslíka v tkanivách je označovaná ako tkanivová normoxia, resp. physioxia a jej hladina je medzi tkanivami značne variabilná. Kým v prípade obličky bola dokázaná hladina kyslíka na úrovni  $9,5 \pm 2,6 \% O_2$ , tak v prípade mozgu je to hodnota  $4,4 \pm 0,3 \% O_2$  [1].

Hypoxia rôzneho stupňa je charakteristická pre väčšinu pevných nádorov. Prispieva k nej mnoho rôznych faktorov vrátane rýchleho rastu nádorovej masy a jej nedostatočnej vaskularizácie. Je známe, že aj v rámci konkrétneho nádora je situácia veľmi heterogénna, a tak odlišujeme miesta s miernou hypoxiou ( $\leq 2 \% O_2$ ) od miest so striktnou hypoxiou ( $< 0,1 \% O_2$ ). Pritom pre vyjadrenie hladiny koncentrácie kyslíka sa najčastejšie v medicíne používa buď milimeter ortuťového stĺpca ( $1 \text{ mmHg} = 0,13 \% O_2 = 133,322 \text{ Pa}$ ) alebo percento ( $1 \% O_2 = 7,6 \text{ mmHg}, 1 \text{ 013 kPa}$ ) [1]. Okrem toho dochádza v tkanive často aj k striedaniu fázy hypoxie s fázou reoxygénácie.

K vzniku hypoxie dochádza v dôsledku proliferácie nádorových buniek, ktoré sa dostanú do vzdialenosti prekračujúcej difúziu kapacitu kyslíka z najbližšej cievy ( $100\text{--}150 \mu\text{m}$ ) a sú nedostatočne zásobované kyslíkom a nutričnými látkami. Okrem toho cievny systém nádorového tkaniva je veľmi nedokonalý, vytvára množstvo slepých zakončení, obštrukcií a nefunkčných arterio-venózných prepojení, čím prispieva k narastajúcej absencii kyslíka a živín v tkanive ako aj k vytváraniu nádorového mikrospros-

tredia s nižším pH [2]. Dlhodobá existencia hypoxie v nádorovom tkanive má za následok odumieranie buniek a vznik nekrotických oblastí obklopených prežívajúcimi adaptabilnými bunkami.

## Adaptácia buniek na hypoxiu

Hypoxia predstavuje nepriaznivý faktor, ktorý v mnohých situáciách môže viesť k bunkovej smrti. Avšak práve v dôsledku adaptácie na hypoxiu dokážu mnohé bunky prežiť aj spomínané nepriaznivé podmienky. V procese adaptácie na hypoxiu sa spúšťa kaskáda rôznych zmien v génovej expresii a metabolizme s cieľom eliminovať stres vyvolaný hypoxiou a umožniť prežívanie nádorových buniek (obr. 1A). Výsledkom toho je tzv. tolerancia hypoxie, ktorá výrazne prispieva k rozvoju karcinogenézy a k rezistencii na rádioterapiu a chemoterapiu [3]. Jedným z prvých adaptačných mechanizmov na hypoxiu je inhibícia bunkovej smrti. Okrem toho dochádza k indukcii angiogenézy s cieľom zvýšiť okysličenie nádorových buniek. Hypoxické nádorové bunky nadobúdajú tzv. onkogénny metabolizmus a podliehajú s vyššou frekvenciou mutáciám. Významný je aj vplyv hypoxie na schopnosť buniek invadovať a metastázovať. Hypoxia tak vytvára selekčný tlak v prospech klonálnej expanzie nádorových buniek s agresívnejším fenotypom [4].

## Signálna dráha indukovaná hypoxiou a hypoxiou-indukovaný faktor

Kľúčovú pozíciu pri reakcii na zníženú dostupnosť kyslíka na molekulovej úrovni má hypoxiou-indukovaný faktor (HIF), ktorý spúšťa expresiu cieľových génov nevyhnutných pre prežitie buniek [5]. HIF je transkripčný faktor regulujúci expresiu génov zodpovedných za reakciu bunky na hypoxické prostredie. Je to heterodimér tvorený z dvoch podjednotiek, z konštitutívne exprirovanej  $\beta$ -podjednotky (označovanej HIF- $\beta$ , resp. ARNT) a z regulovateľnej  $\alpha$ -podjednotky, ktorej stabilita a transkripčná aktivita závisí od koncentrácie kyslíka. Podjednotka  $\alpha$  sa nachádza v troch izoformách, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (inak známa ako EPAS-endotelálny proteín s PAS doménou) a HIF-3 $\alpha$  [6].

## Regulácia stability a aktivity transkripčného faktora HIF-1

Transkripcia génu HIF-1 $\alpha$  je závislá predovšetkým na aktivite transkripčného faktora SP1. Avšak v promótorovej oblasti génu *HIF-1 $\alpha$*  sú prítomné väzbové miesta aj pre iné transkripčné faktory, ako napr. AP-1, NF-1, NF- $\kappa$ B. V podmienkach hypoxie je účinnosť translácie proteínu HIF-1 $\alpha$  zaručená prostredníctvom existencie IRES (internal ribosome entry site) sekvencie v 5'-neprekladanej oblasti [7].

## Prolyl- a asparaginyhydroxylácia a ubikvitinácia

K degradácii podjednotky HIF-1 $\alpha$  v normoxických podmienkach dochádza prostredníctvom degradačnej domény závislej od kyslíka (oxygen-dependent degradation domain – ODD) [8]. V ODD doméne sú dva prolylové zvyšky (Pro<sup>564</sup> a Pro<sup>402</sup>), ktoré sú hydroxylované enzýmami s prolyl hydroxylázovou doménou (prolyl hydroxylase domain – PHD), pričom k spomínanej reakcii dochádza v závislosti od kyslíka a iónov železa (Fe<sup>2+</sup>) [9,10]. Doposiaľ boli identifikované tri prolyl hydroxylázy závislé na 2-oxoglutaráte (PHD1, PHD2 a PHD3), ktorých aktivita je v podmienkach buď hypoxie alebo pri nahradení Fe<sup>2+</sup> alebo 2-oxoglutarátu potlačená, čo vedie k stabilizácii HIF-1 $\alpha$  podjednotky [11]. Štúdie založené na RNA interferencii odhalili, že vo väčšine buniek je pre aktiváciu proteínu HIF postačujúce potlačenie aktivity PHD2 [12,13]. Za normálnych okolností je vo väčšine buniek dominantný enzým PHD2, avšak v podmienkach so zvýšenou expresiou PHD1 (napr. v odpovedi na stimuláciu hormónmi) alebo PHD3 (napr. pri predĺženom trvaní hypoxie) dochádza k posilneniu ich funkcie v rámci hydroxylácie podjednotky HIF-1 $\alpha$  [13].

Pri degradácii podjednotky HIF-1 $\alpha$  sú hydroxylované proliny rozpoznávané nádorovým supresorovým proteínom von Hippel-Lindau (VHL), ktorý sa spolu s elongínom B a C, Cullinom 2 a Rbx podieľa na vytvorení funkčnej E3 ubikvitín ligázy (pVHL-elonginB-elonginC-Cul2-Rbx) ubikvitinujúcej podjednotku HIF-1 $\alpha$  pred následnou degradáciou v proteazóme (obr. 1B) [14].

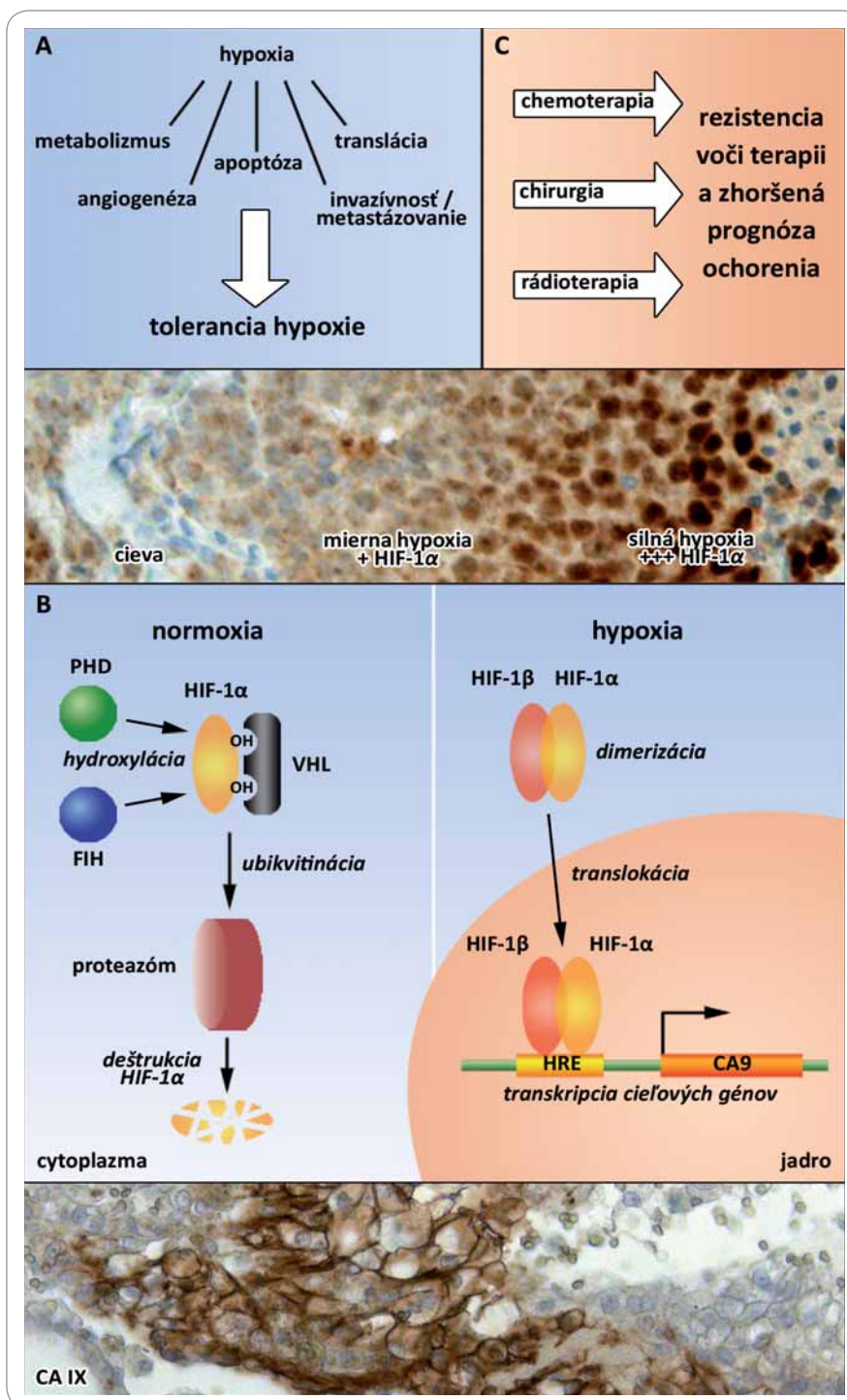
K degradácii podjednotky HIF-1 $\alpha$  v normoxii dochádza za menej ako 5 minút. Proteín HIF-1 $\alpha$  má okrem bHLH/PAS a ODD domény aj transaktivačnú doménu (N-TAD t.j. N-terminálnu resp. C-TAD t.j. C-terminálnu) [15]. V rámci C-TAD domény dochádza k hydroxylácii asparagínových zvyškov (Asn<sup>803</sup>) prostredníctvom asparaginyln hydroxylázy závislej na 2-oxoglutaráte (inak označovanej ako FIH – faktor inhibujúci HIF). Spomínaná hydroxylácia bráni naviazaniu sa ko-aktivátorov CBP (CREB-väzbový proteín) a p300, čím dochádza k inhibícii transaktívacie HIF-1 $\alpha$  v normoxických podmienkach [7,16].

V hypoxii sú enzýmy PHD aj FIH v dôsledku nízkej hladiny O<sub>2</sub> inaktívované, čo má za následok stabilizáciu podjednotky HIF-1 $\alpha$ , jej translokáciu do jadra a dimerizáciu s podjednotkou HIF-1 $\beta$ . Takto vytvorený komplex HIF-1 sa spolu s ko-aktivátormi (CBP/p300, Ref-1, SRC-1, TIF2) viaže na hypoxické responzívne elementy (HRE-hypoxia response element; 5'-G/ACGTG-3') nachádzajúce sa v promótorových, resp. enhancerových oblastiach jednotlivých hypoxiou-regulovaných cieľových génov a spúšťa ich transkripciu (obr. 1B). Najznámejšie cieľové gény sú zahrnuté vo viacerých významných procesoch, akými sú glykolýza, erythropoéza a angiogenéza [17,18].

### Fosforylácia

Fosforylácia podjednotky HIF-1 $\alpha$  je realizovaná prostredníctvom p42/p44 a p38 kináz. Vzhľadom na osem serínových zvyškov v HIF-1 $\alpha$ , ktoré môžu byť fosforylované prostredníctvom mitogénom-aktivovanej proteín kinázy (mitogen-activated protein kinases – MAPK), platí, že aktivovaná MAPK signálna dráha vedie k zvýšenej transkripčnej aktivite komplexu HIF-1 [19]. Transaktivačná funkcia komplexu HIF-1 je zvýšená nielen v dôsledku preferenčne zvýšenej väzby HIF- $\beta$  k fosforylovanej  $\alpha$ -podjednotke, ale aj v dôsledku toho, že fosforylácia Thr<sup>796</sup> bráni hydroxylácii Asn<sup>803</sup> prostredníctvom proteínu FIH [20,21].

Okrem horeuvedených modifikácií bola vo vzťahu k regulácii stability a aktivity proteínu HIF-1 $\alpha$  popísaná aj lyzínacetylácia, nitrozylácia a sumoylácia [22–24].



Obr. 1A. Molekulárne mechanizmy vedúce k hypoxickej tolerancii.

1B. Regulácia stabilizácie a transaktívacie transkripčného faktora HIF-1 v závislosti od kyslíka. V normoxických podmienkach dochádza k hydroxylácii podjednotky HIF-1 $\alpha$  prostredníctvom prolyln hydroxyláz (PHD) a asparaginyln hydroxyláz (FIH). Hydroxylované proliny sú rozpoznávané nádorovým supresorovým proteínom von Hippel-Lindau (VHL). Po ubiquitinácii je podjednotka HIF-1 $\alpha$  degradovaná v proteazóme. V hypoxických podmienkach nedochádza k hydroxylácii HIF-1 $\alpha$  a následne ani k VHL-sprostredkovanej degradácii, čoho výsledkom je stabilizácia a dimerizácia s podjednotkou HIF-1 $\beta$ . Po translokácii do jadra a rozpoznaní hypoxického-responzívneho elementu (HRE) je aktivovaná transkripcia hypoxiou-regulovaných génov napr. karbonickej anhydrázy 9 (CA9).

1C. Rezistencia hypoxických nádorov voči terapii a jej klinický význam.

### Ostatné izoformy $\alpha$ -podjednotky proteínu HIF

Vzhľadom na podobnú štruktúru a aminokyselinovú sekvenciu medzi podjednotkami HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  je zrejmé, že budú mať aj podobné mechanizmy regulácie. Okrem toho však existujú aj rozdiely, napr. v distribúcii jednotlivých izoformiem. Kým HIF-1 $\alpha$  mRNA je exprimovaná vo väčšine ľudských tkanív, tak expresia HIF-2 $\alpha$  je obmedzená a skôr špecifická pre endotelové bunky [25].

Podjednotka HIF-3 $\alpha$  je v hypoxických podmienkach schopná rovnako ako ostatné dve izoformy dimerizácie s  $\beta$ -podjednotkou a následnej transaktívacie cieľových génov [26]. Doposiaľ bolo identifikovaných niekoľko skrátených variantov HIF-3 $\alpha$  vznikajúcich v dôsledku zostrihu (splicingu). Z nich najviac charakterizovaný je tzv. inhibičný proteín s PAS doménou (IPAS), ktorý je skrátený o časť nachádzajúcu sa za PAS B doménou. Vzhľadom na chýbajúce domény (ODD a TAD) nie je IPAS schopný transaktívacie cieľových génov. Jeho expresia však môže byť v hypoxických podmienkach zvýšená prostredníctvom HIF-1 $\alpha$  transaktívacie. Naproti tomu bolo pozorované, že IPAS má dominantne negatívny vplyv na HIF-1 $\alpha$ , čo naznačuje existenciu negatívnej spätnej väzby [27].

### Hypoxiou-indukované cieľové gény a ich úloha v bunke

S ohľadom na *in vivo* rozdiely medzi jednotlivými bunkami a tkanivami, ktoré sa na zmeny v dostupnosti kyslíka musia nevyhnutne adaptovať, nie je vôbec prekvapivé, že dôsledky vyvolané aktíviou transkripčného komplexu HIF sa od bunky k bunke líšia. Jednou z foriem adaptácie nádorových buniek na hypoxiu je pomerne rýchle zníženie syntézy proteínov (až na úroveň 30–40 % normálnej hladiny), nakoľko proteosyntéza predstavuje energeticky náročný proces, ktorý je pre bunku v takto obmedzených podmienkach neudržateľný (obr. 1A) [3]. Na druhej strane napriek zníženej hladine proteosyntézy existuje skupina proteínov, ktorých hladina je v podmienkach hypoxie indukovaná.

V dnešnej dobe je známa viac ako stovka cieľových génov, ktoré sú rozpoznávané transkripčným komplexom HIF a ktoré sa

podieľajú na erytropoéze, angiogenéze a metabolizme glukózy [28,29]. Najstarší a najviac preskúmaný mechanizmus regulácie transkripcie v podmienkach hypoxie je známy pre hormón erytropoetín (EPO) produkovaný prevažne v obličke a nevyhnutný pre erytropoézu [30]. V podmienkach s nízkou hladinou kyslíka je indukovaná expresia EPO, ktorá vedie k zvýšenej tvorbe červených krviniek v snahe zachovať homeostázu dostatočným prísunom kyslíka do tkanív. Hypoxia indukuje aj expresiu vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF) a jeho receptora (VEGFR), ktoré sa zúčastňujú na angiogenéze a stimulujú proliferáciu endotelových buniek. Okrem toho je cirkulácia krvi regulovaná cievnym tlakom prostredníctvom produkcie: NO (NO syntázou – iNOS), CO (hém oxygenázou 1 – HO-1), endotelínu (ET-1), adrenomedulínu (ADM) a  $\alpha_1$ -adrenergného receptora. V hypoxii dochádza aj k zvýšenej expresii proteínov, akými sú matrixová metaloproteináza (MMP), inhibitor plazminogénového aktivátora (PAI) a angiopoetín [28].

Expresia génov erytropoézy a angiogenézy je zahrnutá v celkovej a systémovej odpovedi organizmu na hypoxiu. Okrem toho však prebiehajú aj reakcie na úrovni bunky. Jednou z nich je prepnutie bunky z aeróbného na anaeróbný metabolizmus. Spomínaný efekt, ktorý zahŕňa zníženie oxidačnej fosforylácie a zvýšenie anaeróbnej glykolyzy, bol po prvýkrát popísaný Pasteurom. V dôsledku anaeróbnej glykolyzy je však hladina vytvoreného ATP nedostatočná. Z dôvodu zvýšeného príjmu glukózy do bunky je indukovaná expresia glukózových transportérov (GLUT1 a GLUT3). Okrem toho však dochádza aj k indukcii a zvýšenej aktivite glykolytických enzýmov (napr. hexokináza 1/2 – HK1/2, laktát dehydrogenáza A – LDHA, pyruvát dehydrogenáza kináza 1 – PDK1). Ich expresia je regulovaná práve prostredníctvom komplexu HIF-1 a v procese adaptácie bunky na hypoxické prostredie [31,32].

V hypoxii pozorujeme okrem zmien v metabolizme buniek aj iné javy. Jedným z nich je acidóza, ktorá v nádorových bunkách spôsobuje kyslejšie extracelulárne pH oproti extracelulárnemu pH v zdravom tkanive. Naproti tomu

hodnoty intracelulárneho pH sú medzi nádorovými a zdravými bunkami porovnateľné. Stabilné intracelulárne pH je pre každú bunku nevyhnutné. K jeho udržiavaniu prispieva expresia viacerých membránových transportérov a výmenníkov, medzi ktoré patria napr. monokarboxylátový transportér (MCT4) alebo sodíkovo-vodíkový výmenník (NHE1). Do skupiny hypoxiou-indukovaných génov, ktorých produkty sa podieľajú na regulácii pH, patrí aj membránová karbonická anhydráza IX (CA IX). V podmienkach hypoxie dochádza okrem doposiaľ spomínaných génov aj k indukcii expresie génov zodpovedných za bunkovú proliferáciu, adhéziu, invazivnosť a i. [33].

### Nádorová hypoxia a jej klinický význam

Na základe mnohých klinických štúdií je zrejmé, že hypoxické nádory sú rezistentnejšie voči dostupnej protinádorovej terapii, vrátane rádio- a chemoterapie [34]. K chemorezistencii dochádza nielen na základe faktu, že aplikované chemoterapeutiká sú vzhľadom k nedostatočnej cievnej sieti neefektívne doručované do hypoxických oblastí nádorov, ale aj kvôli zníženej proliferatívnej aktivite hypoxických buniek a zníženej apoptóze (v dôsledku mutácie *p53*) (obr. 1C) [35]. K chemorezistencii prispieva tiež hypoxiou-indukovaná expresia génu množopčetnej liekovej rezistenice (*MDR1*), v promótorovej oblasti ktorého sa nachádza funkčné HRE miesto a produktom ktorého je P-glykoproteín [36]. Takto rezistentné bunky nie sú prostredníctvom konvenčnej chemoterapie efektívne eliminované.

Nádorová hypoxia predstavuje vážny problém aj z hľadiska rádioterapie. Pacienti s hypoxickými nádormi dosahujú oveľa horšie liečebné výsledky s celkovo kratšou dobou prežívania. Fenomén rádiorezistencie bol po prvýkrát popísaný v roku 1955 Thomlinsonom a Grayom, ktorí odhalili prítomnosť hypoxických nádorových buniek v malígnych nádoroch [37]. Rádiosenzitivita tkanív je založená na fakte, že dobre oksyložené tkanivá sú senzitivnejšie na letálny efekt ionizujúceho žiarenia nakoľko molekuly kyslíka reagujú s vznika-

júcimi voľnými radikálmi v miestach poškodenia DNA a fixujú ich, v dôsledku čoho dochádza k bunkovej smrti. Výsledkom nedostatočnej hladiny kyslíka je až trojnásobne vyššia rezistencia hypoxických buniek voči rádioterapii v porovnaní so situáciou v normoxii.

Súčasný chemo- a rádioterapeutický prístup sú v dôsledku hypoxiou-indukovanej rezistencie schopné dostatočne a účinne eliminovať len senzitivné nádorové bunky. Rezistentné bunky sú ochránené a následne poskytujú základ pre relaps ochorenia a vznik nových nádorov a metastáz, ktoré sú malignejšie, invazívnejšie a rezistentnejšie, čím sa prognóza pacienta výrazne zhoršuje. Preto sa do pozornosti dostávajú nové stratégie, ktoré by prispeli k riešeniu spomínaného problému. V prípade rádioterapie sa využíva zvýšenie oxygenácie tumoru (prostredníctvom hyperbarickej oxygenácie, transfúzie a aplikácie erytropoetínu) a frakcionovaná rádioterapia. Prínosom frakcionácie je dosiahnutie vyváženého účinku rádioterapie, t.j. maximálny biologický účinok na nádorové bunky a súčasne minimálny účinok na zdravé tkanivo [38]. V prípade chemoterapie sa ako riešením javí využitie metronomickej chemoterapie, ktorá je založená na dlhodobom podávaní nízkych dávok chemoterapie. Na rozdiel od konvenčnej chemoterapie je účinnejšia a dobre tolerovaná [39].

V súvislosti s rezistenciou na terapiu sa v súčasnej dobe do pozornosti dostáva aj problematika nádorových kmeňových buniek, ktoré sa podieľajú na raste a udržiavaní nádorov a prispievajú k rekurencii nádorového ochorenia po terapii [40]. Hypoxia prispieva k dediferenciacii nádorových buniek ako aj k navodeniu a udržiavaniu kmeňového fenotypu. Hoci mechanizmy a signálne dráhy ovplyvňujúce hypoxiu a nádorové kmeňové bunky nie sú úplne objasnené, výsledky výskumu poukazujú na interakciu medzi transkripčným faktorom HIF-1 $\alpha$  a transkripčnými faktormi zodpovednými za fenotyp kmeňových buniek, napr. Sox2, Klf4, c-Myc, Oct4 a Nanog ako aj signálnymi dráhami napr. Notch, Wnt alebo Smad/TGF $\beta$ , ktoré sú zodpovedné za proliferáciu a diferenciaciu buniek [41–43].

Okrem spomínanej rezistencie voči konvenčným protinádorovým stratégiám je existencia hypoxie spojená aj s horšou prognózou z pohľadu chirurgického riešenia ochorenia. Hlavnou príčinou je predovšetkým fakt, že hypoxické nádory majú predispozíciu k získaniu metastatického fenotypu a invazívnosti, a pre nádorové bunky je charakteristická zvýšená frekvencia mutácií [35].

### Stratégie stanovenia nádorovej hypoxie

Nádorová hypoxia predstavuje relevantný klinický fenomén, ktorý ovplyvňuje terapiu a progresiu nádorového ochorenia ako aj celkové prežívanie pacientov. Detekcia hypoxických oblastí v nádoroch je preto kritická z pohľadu stratifikácie pacientov pre optimálnu terapiu ako aj z pohľadu prognózy ochorenia.

Jeden z najstarších spôsobov, ktorý bol po prvýkrát popísaný v roku 1986 Weissom a Fleckensteinom, predstavuje lokálne použitie polarografickej mikroelektrody v nádorovom tkanive pacienta *in vivo*. Aplikáciou tohto merania bola potvrdená existencia hypoxického mikroprostredia v nádorovom tkanive (porovnanie hladiny koncentrácie kyslíka v zdravom prsníku – 65 mmHg vs. v prsníkovom karcinóme – 30 mmHg) [44]. Kým na jednej strane je táto metóda vzhľadom na technické vybavenie ľahko realizovateľná, tak na druhej strane má invazívny charakter a jej použitie je limitované vzhľadom k dostupnosti nádorového tkaniva.

Alternatívu k mikroelektrode predstavuje aplikácia pimonidazolu – nitroimidazolovej zlúčeniny, ktorá je redukovaná v podmienkach hypoxie a ktorá sa selektívne viaže na makromolekuly v hypoxických bunkách. Pimonidazol sa podáva pred odberom biopsie a následne je jeho akumulácia v hypoxických oblastiach tkaniva (pod hladinou koncentrácie kyslíka 10 mmHg) vizualizovaná prostredníctvom špecifických protilátok a imunohistochemie [45]. Tento prístup je prínosný nielen z pohľadu detekcie nádorovej hypoxie prostredníctvom tzv. exogénneho markera, ale aj z dôvodu senzitivácie hypoxických

buniek, ktoré sú následne citlivejšie voči rádioterapii [46].

Za posledné dve desaťročia sa do popredia dostávajú nové zobrazovacie stratégie, ktoré ponúkajú širší pohľad vzhľadom na lokalizáciu a dynamiku nádorovej hypoxie. Takýto neinvazívny prístup stanovenia hypoxie v nádorovom tkanive ponúka napr. pozitronová emisná tomografia (PET). Táto stratégia je veľmi vhodná nie len preto, že ponúka celkový pohľad na nádorové tkanivo, ale aj z dôvodu možnosti opakovaného merania, ako aj širokej aplikovateľnosti pre všetky typy nádorov. Pre úspešnosť a relevantnosť zobrazovania je však veľmi dôležité, aby mal použitý rádioaktívne-značený nosič optimálne farmakokinetické parametre a aby bol minimalizovaný signál z pozadia. Zjednodušene sa PET nosiče dajú rozdeliť do dvoch skupín vzhľadom na to, či majú alebo nemajú nitroimidazolový charakter.

Medzi vybraných zástupcov nitroimidazolovej skupiny patria [<sup>18</sup>F]-fluoromisonidazol ([<sup>18</sup>F]-FMISO), [<sup>18</sup>F]-fluoroazomycin arabinosid ([<sup>18</sup>F]-FAZA) a [<sup>18</sup>F]-fluoroerytroimidazol ([<sup>18</sup>F]-FETNIM). Mechanizmus ich fungovania spočíva v redukcii NO<sub>2</sub> skupiny v hypoxických bunkách a v naviazaní sa vytvorených aniónov na makromolekuly nádorových buniek. V nekrotických oblastiach nedochádza k redukcii, v dôsledku čoho nosič difunduje von z bunky [47]. K zástupcom druhej skupiny nosičov patria [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglukóza ([<sup>18</sup>F]-FDG; s pomerne širokým klinickým využitím) a Cu-ATSM (komplex medi- a dithiosemikarbazónu, pri ktorom dochádza k redukcii Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>1+</sup>). Prvý zavedený nosič, [<sup>18</sup>F]-FMISO, predstavuje tzv. zlatý štandard a bol najviac používaný na identifikáciu hypoxických oblastí v nádorových tkanivách pacientov. V porovnaní s novoobjavenými nosičmi však vykazuje suboptimálne vlastnosti. Do popredia sa preto dostáva Cu-ATSM nosič, ktorý je účinnejšie vychytávaný bunkami a poskytuje lepšie zobrazovacie možnosti [48]. Navyše kým v prípade nitroimidazolových nosičov značených s izotopom [<sup>18</sup>F] je počas rozpadu necelé 2 hod, tak vzhľadom na skutočnosť, že nosič Cu-ATSM môže byť značený

aj s izotopmi s dlhším polčasom rozpadu (12,7 hod pri [<sup>64</sup>Cu] alebo 61,9 hod pri [<sup>67</sup>Cu]), je jeho použitie vhodné tiež na predĺžené merania [49].

Alternatívou k PET je magnetická rezonancia (MRI), predovšetkým BOLD MRI (blood oxygen level dependance MRI). Princíp tejto metódy spočíva v existencii deoxyhemoglobínu v hypoxických podmienkach, ktorý vytvára lokálny magnetický gradient a dokáže interagovať v externom magnetickom poli [50]. Nevýhoda spočíva v negatívnom vplyve distribúcie krvi ako aj celkového objemu krvi v organizme na získané údaje. Metóda ako taká neposkytuje absolútne hodnoty koncentrácie kyslíka v tkanive, ale zachytáva len zmeny v oxygenácii krvi. Okrem BOLD MRI sa najnovšie objavuje aj DCE MRI (dynamic contrast-enhanced MRI) stratégia založená na nízkomolekulovom gadolíniovom nosiči.

Doposiaľ spomínané prístupy zamerané na detekciu nádorovej hypoxie prinášajú množstvo výhod, ale aj mnohé nevýhody. Okrem toho, že niektoré z nich majú invazívny charakter, sú pomerne dosť zaťažené nádorovou heterogenitou a dajú sa uplatniť len prospektívne. Naproti tomu detekcia tzv. endogénneho bunkového markera charakteristického pre hypoxiu umožňuje jeho aplikáciu aj v retrospektívnych štúdiách.

Prostredníctvom špecifickej protilátky je možné prítomnosť markera stanoviť imunohistochemicky, rutinným spôsobom, prospektívne aj retrospektívne na archivovaných vzorkách. Na základe získaných výsledkov je možné konfrontovať expresiu endogénneho hypoxického markera s histopatologickými parametrami, progresiou a rekurenciou ochorenia, výsledkom liečby a pod. Okrem možnosti detekcie samotného realizátora bunkovej odpovede na hypoxiu – proteínu HIF-1, ponúka sa aj možnosť detekcie jeho cieľových génov (v podobe proteínov), ako napr. GLUT1 a VEGF. Na základe mnohých doposiaľ publikovaných štúdií sa za najrelevantnejší marker nádorovej hypoxie označuje proteín CA IX.

### Karbonická anhydráza IX

Karbonická anhydráza IX (CA IX) patrí do rodiny karbonických anhydráz – zinok-

-viazúcich metaloenzymov, ktoré katalyzujú reverzibilnú hydratáciu oxidu uhličitého na bikarbonátový ión a protón a prostredníctvom tejto aktivity sa zúčastňujú na rôznych biologických procesoch.

Prvotné informácie týkajúce sa identifikácie, charakterizácie a distribúcie CA IX boli získané prostredníctvom špecifickej monoklonovej protilátky M75 [51–53]. Na základe imunohistochemických analýz ľudských tkanív je potvrdená expresia proteínu CA IX v prirodzených podmienkach predovšetkým v tkanivách tráviaceho traktu, hlavne v bunkách sliznice žalúdka [54]. Proteín CA IX sa tiež nachádza v epiteli tenkého čreva a jeho expresia klesá smerom ku konečníku. Na druhej strane v porovnaní s obmedzenou expresiou CA IX v normálnych tkanivách je k dnešnému dňu identifikované a popísané celé spektrum najrozličnejších typov nádorových tkanív derivovaných z obličiek, pažeráka, hrubého čreva, pankreasu, pečene, pľúc, matrice, vaječníkov, mozgu, prsníka a štítnej žľazy [55–67].

Hypoxická regulácia génu *CA9* sa uskutocňuje prostredníctvom väzby transkripčného faktora HIF-1 do oblasti HRE lokalizovanej v pozícii –10/–3 vzhľadom na transkripčný počiatok [68]. V prípade svetlobunkových obličkových nádorov, u ktorých v dôsledku mutácií génu *VHL* dochádza k stabilizácii proteínu HIF-1 aj v normoxických podmienkach, pozorujeme vysokú hladinu CA IX a tzv. difúzny profil jej expresie v tkanive [69]. Na druhej strane v prípade nádorov s funkčným proteínom VHL je expresia proteínu CA IX viazaná do perinekrotických oblastí a vykazuje tzv. fokálny profil [68].

CA IX predstavuje vysoko aktívny transmembránový enzým, ktorého hlavná funkcia spočíva v ochrane hypoxických nádorových buniek pred intracelulárnou acidózou [70]. V kooperácii s bikarbonátovými transportérmi umožňuje efektívnejší prenos bikarbonátových iónov do bunky, čím neutralizuje vnútrobunkové pH. Navyše akumulácia protónov vo vonkajšom prostredí vedie k acidifikácii nádorového mikroprostredia. Okrem toho proteín CA IX predstavuje aktívny komponent bunkového migračného aparátu, v ktorom sa

podieľa na regulácii bunkovej adhézie ako aj pH regulácie na okraji migrujúcich buniek [71]. Vzhľadom na spomínané skutočnosti môžeme konštatovať, že proteín CA IX zohráva kľúčovú úlohu pri vzniku proinvasívneho nádorového mikroprostredia a súčasne predstavuje relevantnú molekulu metastatickej kaskády.

### CA IX – marker nádorovej hypoxie

Na základe mnohých štúdií bolo potvrdené, že expresia CA IX stanovená prostredníctvom imunohistochemie, alebo PCR-amplifikácie je úzko spojená s agresívnejším fenotypom a so zlou prognózou nádorového ochorenia, s mnohými histopatologickými parametrami, s rezistenciou na terapiu a prežívaním pacientov. Okrem toho vo vzťahu k iným metódam detekcie hypoxie v nádorovom tkanive bola dokázaná korelácia medzi CA IX a meraniami s mikroelektrodou, resp. medzi CA IX a exogénnym markerom hypoxie – pimonidazolom [72–75]. K detekcii CA IX dochádza v relatívne rozsiahlych perinekrotických oblastiach, ktoré sú tvorené aj mierne hypoxickými a/alebo reoxygovanými bunkami. Je teda zrejmé, že v porovnaní s imunohistochemickým značením proteínu HIF-1 ako aj jeho cieľových génov (*VEGF*, *GLUT1*) dochádza k miernym diskrepanciám oproti proteínu CA IX. Vysvetlenie spočíva najmä v rôznej senzitivite analyzovaných proteínov na hladinu kyslíka, v rôznych spôsoboch regulácie expresie hypoxických génov, resp. v rôznej stabilite proteínov (polčas rozpadu CA IX v okysličených bunkách je až 38 hod) [76–79]. Navyše Olive et al dokázali, že CA IX exprimujúce bunky z perinekrotických oblastí sú viabilné, klonogénne a rezistentné voči ionizujúcemu žiareniu [73].

S príchodom moderných prístupov založených na multianalýzach bol identifikovaný set hypoxických génov (tzv. hypoxic signature), ktorého súčasťou je aj CA IX a ktorého význam bol potvrdený z pohľadu prognózy ochorenia ako aj predikcie terapie [80–82].

Vzhľadom na unikátny profil expresie proteínu CA IX v nádorových tkanivách (v porovnaní so zdravými tkanivami) ako aj jeho významnú funkciu vo vzťahu k pH regulácii, adhézii a migrácii nádoro-

rových buniek nie je prekvapivé, že patrí k pomerne často študovaným nádorovým biomarkerom. Významná je však nielen pozícia CA IX ako endogénneho markera hypoxie a prognostického indikátora, ale aj potenciál proteínu CA IX slúžiť ako terapeutický terč buď pre špecifické protilátky alebo inhibítory jeho enzymatickej aktivity [83].

## Záver

Nádorová hypoxia je klinicky významný fenomén so značným vplyvom na selekciu agresívnych nádorových subpopulácií a progresiu nádorovej choroby. Poznatky získané pri štúdiu tohto javu značne prispeli k pochopeniu príčin rezistencie hypoxických nádorov voči konvenčnej protinádorovej liečbe. Podnietili tiež rozvoj nových, cielených diagnostických a terapeutických stratégií, ktoré pri racionálnom uplatnení v onkologickej praxi môžu podstatne zlepšiť klinický manažment pacientov s rakovinou.

## Literatúra

- Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A et al. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011; 15(6): 1239–1253. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
- Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5863–5870.
- Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG et al. Targeting hypoxia tolerance in cancer. *Drug Resist Updat* 2004; 7(1): 25–40.
- Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 2000; 6(4): 157–162.
- Pugh CW, Gleadle J, Maxwell PH. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res* 2001; 3(5): 313–317.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(12): 5510–5514.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295(5556): 858–861.
- Huang LE, Gu J, Schau M et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(14): 7987–7992.
- Ivan M, Kondo K, Yang H et al. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001; 292(5516): 464–468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM et al. Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292(5516): 468–472.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5): 343–354.
- Berra E, Benizri E, Ginouves A et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 2003; 22(16): 4082–4090.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004; 279(37): 38458–38465.
- Iwai K, Yamana K, Kamura T et al. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12436–12441.
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; 272(31): 19253–19260.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; 16(12): 1466–1471.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* 2001; 49(5): 614–617.
- Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16(10): 1151–1162.
- Richard DE, Berra E, Gothi E et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; 274(46): 32631–32637.
- Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 2001; 20(41): 5779–5788.
- Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* 2004; 383(3): 429–437.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111(5): 709–720.
- Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN et al. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 2007; 26(1): 63–74.
- Cheng J, Kang X, Zhang S et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 2007; 131(3): 584–595.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 189–204.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998; 7(3): 205–213.
- Makino Y, Cao R, Svensson K et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001; 414(6863): 550–554.
- Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; 203(8): 1253–1263.
- Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 2003; 54: 17–28.
- Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(9): 4304–4308.
- Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 2000; 106(7): 809–812.
- Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 2005; 90(6): 791–797.
- Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 266–276.
- Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1408–1416.
- Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6): 437–447.
- Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; 62(12): 3387–3394.
- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9(4): 539–549.
- Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J Radiat Res* 2011; 52(5): 545–556.
- Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR. Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol* 2009; 16(2): 7–15.
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD et al. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102(5): 789–795. doi: 10.1038/sj.bjc.6605551.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005; 9(5): 617–628.
- Li Y, Laterra J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Res* 2012; 72(3): 576–580. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3070.
- Holcakova J, Nekulova M, Orzol P et al. Mechanisms of drug resistance and cancer stem cells. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S34–S41.
- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C et al. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51(12): 3316–3322.
- Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH et al. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71(2): 270–277.
- Janssens GO, Rademakers SE, Terhaard CH et al. Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide for laryngeal cancer: results of a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(15): 1777–1783. doi: 10.1200/JCO.2011.35.9315.
- Lee ST, Scott AM. Hypoxia positron emission tomography imaging with 18F-fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med* 2007; 37(6): 451–461.
- Holland JP, Lewis JS, Dehdashti F. Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu-ATSM. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 53(2): 193–200.
- Laforest R, Dehdashti F, Lewis JS et al. Dosimetry of 60/61/62/64Cu-ATSM: a hypoxia imaging agent for PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32(7): 764–770.
- Ogawa S, Menon RS, Tank DW et al. Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. *Biophys J* 1993; 64(3): 803–812.
- Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M et al. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 1992; 187(2): 620–626.
- Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 1994; 9(10): 2877–2888.
- Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 1996; 33(3): 480–487.
- Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997; 112(2): 398–408.
- Liao SY, Aurelio ON, Jan K et al. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of

- clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997; 57(14): 2827–2831.
56. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH et al. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57(12): 2362–2365.
57. Turner JR, Odze RD, Crum CP et al. MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum Pathol* 1997; 28(6): 740–744.
58. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998; 153(1): 279–285.
59. Vermeylen P, Roufosse C, Burny A et al. Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 1999; 14(4): 806–811.
60. Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J et al. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol* 2000; 114(3): 197–204.
61. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158(3): 905–919.
62. Haapasalo JA, Nordfors KM, Hilvo M et al. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 473–477.
63. Kowalewska M, Radziszewski J, Kulik J et al. Detection of carbonic anhydrase 9-expressing tumor cells in the lymph nodes of vulvar carcinoma patients by RT-PCR. *Int J Cancer* 2005; 116(6): 957–962.
64. Niemela AM, Hynninen P, Mecklin JP et al. Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(9): 1760–1766.
65. Jarvela S, Parkkila S, Bragge H et al. Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors. *BMC Cancer* 2008; 8: 1. doi: 10.1186/1471-2407-8-1.
66. Takacova M, Bullova P, Simko V et al. Expression pattern of carbonic anhydrase IX in Medullary thyroid carcinoma supports a role for RET-mediated activation of the HIF pathway. *Am J Pathol* 2014; 184(4): 953–965. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.002.
67. Rosenberg V, Pastorekova S, Zatovicova M et al. Relation between carbonic anhydrase IX serum level, hypoxia and radiation resistance of head and neck cancers. *Klin Onkol* 2014; 27(4): 269–275.
68. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60(24): 7075–7083.
69. Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61(13): 5215–5222.
70. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004; 577(3): 439–445.
71. Svastova E, Witarski W, Csaderova L et al. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J Biol Chem* 2012; 287(5): 3392–3402. doi: 10.1074/jbc.M111.286062.
72. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; 61(17): 6394–6399.
73. Olive PL, Aquino-Parsons C, MacPhail SH et al. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res* 2001; 61(24): 8924–8929.
74. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* 2003; 104(1): 85–91.
75. Iakovlev VV, Pintilie M, Morrison A et al. Effect of distributional heterogeneity on the analysis of tumor hypoxia based on carbonic anhydrase IX. *Lab Invest* 2007; 87(12): 1206–1217.
76. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E et al. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7992–7998.
77. Tomes L, Emberley E, Niu Y et al. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81(1): 61–69.
78. Rafajova M, Zatovicova M, Kettmann R et al. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 24(4): 995–1004.
79. Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW et al. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 49(3): 325–335.
80. Winter SC, Buffa FM, Silva P et al. Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res* 2007; 67(7): 3441–3449.
81. Buffa FM, Harris AL, West CM et al. Large meta-analysis of multiple cancers reveals a common, compact and highly prognostic hypoxia metagene. *Br J Cancer* 2010; 102(2): 428–435.
82. Toustrup K, Sorensen BS, Alsner J et al. Hypoxia gene expression signatures as prognostic and predictive markers in head and neck radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 2012; 22(2): 119–127. doi: 10.1016/j.semradonc.2011.12.006.
83. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol* 2015; 31: 52–64. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.08.002.