

## Dwa oblicza hipoksji nowotworów

Anna Gasińska<sup>1, 2</sup>, Beata Biesaga<sup>1</sup>

Hipoksja stanowi problem terapeutyczny, ponieważ powoduje oporność na promieniowanie o niskiej gęstości jonizacji i niektóre rodzaje chemioterapii. Obecnie uważa się, że hipoksja wywołuje dwojakiego rodzaju reakcje. Obniżone stężenie tlenu  $<1\%$  ( $pO_2 < 7$  mm Hg) z jednej strony, powoduje zahamowanie proliferacji i różnicowania oraz apoptozę i nekrozę komórek. Z drugiej strony, na skutek procesów przystosowawczych, polegających na zmianie ekspresji genów, umożliwia tworzenie agresywnego fenotypu komórek, ułatwiającego wzrost i rozsiew nowotworu. Ostatnio wyróżniono w nowotworach cztery hipotetyczne subpopulacje komórek hipoksycznych: związane ze zróżnicowaniem, związane z ograniczoną dyfuzją tlenu (chroniczna hipoksja), związane z ograniczoną perfuzją krwi (ostra lub przejściowa hipoksja) oraz komórki przystosowane (adaptowane) do życia w hipoksji. Obecnie uważa się, że większe znaczenie może mieć wyróżnienie subpopulacji komórek umiarkowanie utlenowanych ( $pO_2$  0,5-20 mm Hg) dla określenia obniżonej chemo- i promienioczułości komórek, niż subpopulacji znajdujących się w chronicznej hipoksji. Metody stosowane obecnie w praktyce klinicznej do wyróżnienia hipoksycznych komórek są niezadawalające. Jednak postęp technik obrazowania hipoksji wskazuje, że w niedalekiej przyszłości będzie możliwe rozróżnienie zmian w poziomie utlenowania komórek oraz rozróżnienie chronicznej i ostrej hipoksji. Również metody z wykorzystaniem markerów molekularnych, odzwierciedlające zmiany w profilu genetycznym i ekspresji białek, mogą przyczynić się do indywidualizowania leczenia przeciwnowotworowego.

### The two aspects of tumour hypoxia

Hypoxia is a therapeutic problem as it renders solid tumours resistant to sparsely ionizing radiation and some forms of chemotherapy. At present it is postulated that tumour hypoxia induces two types of reactions. On the one hand tissue  $O_2$  concentration  $<1\%$  ( $pO_2 < 7$  mm Hg) can restrict cell proliferation and induce apoptosis and necrosis. On the other hand, there are clones within the tumour that are adapted to hypoxia through modification of gene expression, and they are responsible for creating an aggressive phenotype which can promote local and distant spread.

We may, for the present, distinguish 4 dissimilar compartments within the hypoxic component of tumours. They are hypoxia associated with differentiation, diffusion-limited (chronic), and perfusion-limited (acute or transient) and hypoxia adapted cells. It is assumed that moderately ( $pO_2$  0.5-20 mm Hg), not severely, hypoxic cells may be of the greatest importance in determining biological resistance. The methods of assessing hypoxia currently applied in clinical practice are not satisfactory. However, recent advances in imaging technologies suggest that in the near future it might be possible to track temporal changes in  $O_2$  level and acute and chronic hypoxic tumour subfractions. The ultimate goal is understanding tumour biology basing on the clinical biomarkers that reflect hypoxia-associated genetic or proteomic signatures in tumour cells, in order to individualize therapy.

**Słowa kluczowe:** hipoksja, hipoksja ostra, hipoksja chroniczna, komórki adaptowane do hipoksji, metody oceny hipoksji

**Key words:** hypoxia, acute hypoxia, chronic hypoxia, cells adapted to hypoxia, hypoxia assessment methods

Od dziesięcioleci wiadomo, że obniżone ciśnienie parcjalne tlenu (niedotlenowanie) komórek nowotworowych prowadzi do oporności na leczenie (promieniowaniem i chemiczne) oraz zwiększa ryzyko powstawania przerzutów [1]. Na zjawisko niedotlenowania tkanek (hipoksję)

i związaną z tym promieniooporność komórek po raz pierwszy zwrócił uwagę około 100 lat temu Gottwald Schwarz [2]. Wykazał on, że komórki skóry prawidłowo utlenowane (normoksja) są bardziej wrażliwe na promieniowanie od komórek niedotlenowanych (hipoksycznych). W pierwszej połowie XX wieku sporadycznie pojawiały się wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, wskazujące na wpływ niedotlenowania komórek na odpowiedź popromienną. Jednak dopiero Hal Gray wykazał, że hipoksja jest źródłem promieniooporności i wprowadził termin „efekt tlenowy” [3]. Hal Gray wraz

<sup>1</sup> Zakład Radiobiologii Klinicznej  
Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
Oddział w Krakowie

<sup>2</sup> Katedra Kosmetologii  
Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa w Katowicach

z Thomlinsonem, patologiem z Mount Vernon Hospital w Londynie, w 1955 roku, jako pierwsi udowodnili istnienie hipoksji w nowotworach [3]. Autorzy ci opisali, na podstawie mikroskopowego obrazu raka płuca, model, w którym przedstawili mechanizm tworzenia się hipoksji w nowotworach. W modelu tym wyróżnili strefę żywych komórek nowotworowych, zdolnych do proliferacji, otoczoną zrębem naczyń krwionośnych, z którego komórki drogą dyfuzji na odległość 150-180  $\mu\text{m}$  pozyskiwały tlen i środki odżywcze. W miarę wzrostu obwodowej części guza, w jego centralnej części, gdzie stężenie tlenu zbliża się do wartości zerowej (anoksja), stwierdzano martwicę. Na granicy między komórkami utlenowanymi i strefą komórek martwych obserwowano komórki hipoksyczne – niedotlenowane, lecz zdolne do życia. Ten rodzaj niedotlenowania został po raz pierwszy nazwany przez Graya i Thomlinsona chroniczną hipoksją.

W 1968 r. Tannock [4] przedstawił inny model powstawania komórek hipoksycznych w nowotworze, który jest aktualny do dziś, a jest on odwrotnością obrazu przedstawionego przez Thomlinsona i Graya. Przedstawia on dobrze utlenowane komórki nowotworowe, rosnące wokół czynnego naczynia krwionośnego, następnie kilka warstw komórek hipoksycznych, stwierdzanych w odległości 100-180  $\mu\text{m}$  od naczynia włosowatego i obszar nekrotyczny, występujący poza zasięgiem dyfuzji tlenu i środków odżywczych (anoksja).

Ze względu na znaczenie komórek hipoksycznych w reakcji popromiennej, z początkiem lat 70. ubiegłego wieku, w celu określenia cech biologicznych tych komórek, podjęto szereg badań radiobiologicznych, prowadzonych na modelach zwierzęcych i liniach komórkowych. W pracach tych potwierdzono, że komórki hipoksyczne charakteryzują się około 3-krotnie mniejszą promieniowrażliwością na powszechnie stosowane promieniowanie o niskiej gęstości jonizacji, w porównaniu do komórek dobrze utlenowanych oraz brakiem zdolności do proliferacji [5-9]. Stwierdzono, że komórki mogą przeżywać w warunkach niedotlenowania przez kilka dni, po czym albo, w sprzyjających warunkach, zyskują dostęp do tlenu i przeżywają lub giną. Wykazano, że odsetek niedotlenowanych komórek różni się znacznie pomiędzy różnymi nowotworami i wynosi średnio 20% (0-50%) [10, 11]. Komórki hipoksyczne, będące w stanie chronicznego niedotlenowania, mogą być odpowiedzialne za niepowodzenia radioterapii. Promieniooporność tych komórek jest związana z brakiem tlenu, odpowiedzialnego za utrwalanie uszkodzeń DNA, wywołanych promieniowaniem. Wykazano, że w przypadku stosowania wysokiej pojedynczej dawki promieniowania odpowiedź popromienną determinowała frakcja komórek hipoksycznych (występująca w ciśnieniu cząstkowym tlenu poniżej 0,5 mm Hg). Zakładano, że przy frakcjonowanym napromienianiu komórki te ulegają utlenowaniu (reoksygenacji) i dlatego nie odgrywają takiego znaczenia, jak przy napromienianiu jednorazowym. Jednak już wówczas zdawano sobie sprawę z istnienia w nowotworach subpopulacji komórek o pośrednim stopniu utlenowania (pomiędzy dobrze utlenowanymi, a znajdującymi się w radiobiologicznej hipok-

sji), które mogłyby mieć istotny wpływ na wynik radioterapii [10], jednak ich znaczenie marginalizowano.

Rodzaj hipoksji, związany ze zbyt dużą odległością od naczynia krwionośnego, a co za tym idzie brakiem dostępu do tlenu i składników odżywczych, określono mianem hipoksji chronicznej w odróżnieniu od ostrej (*acute*) hipoksji przejściowej, wyróżnionej przez niektórych badaczy pod koniec lat 70. ubiegłego wieku [10, 12].

Podział na 2 rodzaje hipoksji: chroniczną i przejściową odzwierciedla różne mechanizmy jej powstania w guzie. Chroniczna hipoksja jest wynikiem zaburzenia równowagi między zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen w szybko dzielących się nowotworach, a zmniejszoną dostawą tlenu, przez tworzącą się w guzach nowotworowych sieć nieprawidłowych naczyń krwionośnych. W sieci tej występuje wiele nietypowych rozgałęzień, pętli i połączeń, co powoduje wolniejszy przepływ krwi. Dodatkowo naczynia krwionośne w guzie cechuje większa przepuszczalność błony podstawnej i brak unerwienia. W ścianie naczyń guza występuje tylko niewielka liczba pericytów i komórek mięśni gładkich, lub komórki te mogą w ogóle nie występować. Skutkuje to mniejszą stabilizacją naczyń i gorszym zabezpieczeniem przed przerwaniem lub pęknięciem pod wpływem fizjologicznych wahań ciśnienia krwi. Taka budowa naczynia w nowotworze może prowadzić także do niedrożności naczynia w wyniku różnicy ciśnień pomiędzy naczyniem i mięszem guza (ograniczona perfuzja krwi). Prowadzi to do stanu ostrej hipoksji niedokrwiennej, czyli przejściowego (trwającego od kilku minut do kilku godzin) niedotlenowania komórek nowotworowych, położonych blisko naczynia krwionośnego. Powoduje to zmiany (np. fosforylacji lub stanu *redox*) białek obecnych w komórkach [1].

Od dawna wiadomo, że nowotwory mogą się różnić po względem perfuzji (przepływu krwi) i gradientu stężenia tlenu. Powstanie tego gradientu uwarunkowane jest różnymi czynnikami, jak np.: wahania w stężeniu tlenu we krwi kapilarnej, zależne od dynamiki mikrocykulacji, współczynnik dyfuzji tlenu, transport tlenu cieczą pozanaczyniową, zużycie tlenu przez tkankę, oraz nagromadzenie produktów metabolizmu, np. kwasu mlekowego.

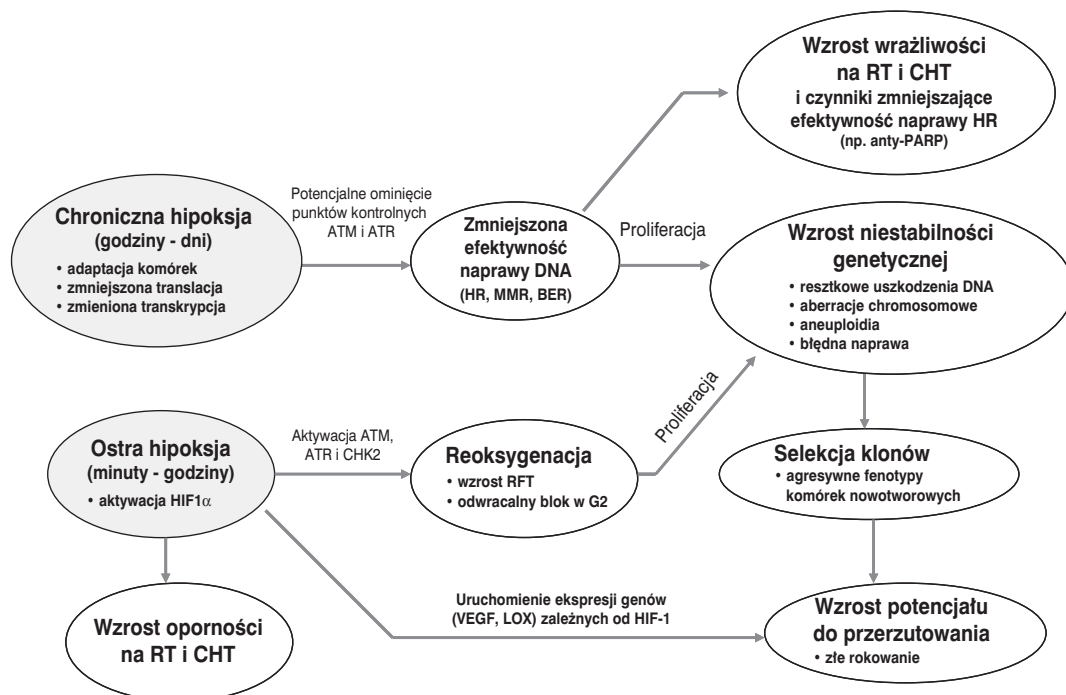
Wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, publikowane w latach 80. ubiegłego wieku, zwracały uwagę na obecność w nowotworze trzech subpopulacji komórek: 1) dobrze utlenowanych, promieniowrażliwych (ciśnienie parcjalne tlenu około 20 mm Hg), 2) w chronicznej hipoksji, uważanych za promieniooporne (ciśnienie parcjalne tlenu <0,5 mmHg), odpowiedzialnych za niepowodzenia radioterapii oraz 3) niewielkiej liczby komórek w ostrej hipoksji, spowodowanej okresowym zamknięciem naczyń włosowatych (o pośrednich wartościach parcjalnego ciśnienia tlenu, wynoszącym 0,5-20 mm Hg). Już w tym okresie sugerowano, że komórki chronicznie hipoksyczne mogą być bardziej promieniowrażliwe niż będące w ostrej hipoksji [12], ale dopiero wyniki badań klinicznych miały to potwierdzić.

W celu poprawy wyników leczenia napromienianiem przeprowadzano liczne badania kliniczne w celu

zmniejszenia niekorzystnego wpływu hipoksji poprzez podawanie promienioculaczy, stosowanie związków bioredukcyjnych, oddychanie tlenem hiperbarycznym (praca przeglądowa – Overgaard i wsp. [13]). Pod koniec lat 80. XX wieku okazało się, że w ten sposób nie uzyskano spektakularnej poprawy wyników leczenia [14-17]. Za przyczynę takiego stanu rzeczy uznano występowanie w nowotworach komórek przejściowo niedotlenowanych, na które nie działają związki promienioculające, zastępujące działanie tlenu oraz inne metody pokonywania chronicznej hipoksji, jak np. oddychanie tlenem hiperbarycznym. Należy jednak zaznaczyć, że drugą przyczyną niepowodzenia, dotyczącą części badań, mogła być mała liczebność (średnio 60) analizowanych grup chorych. Potwierdzać to może metaanaliza Overgaard i wsp. [18], przeprowadzona dla około 10 000 chorych na różnego typu nowotwory złośliwe, która wykazała poprawę wyleczalności miejscowej i czasu całkowitych przeżyć chorych, leczonych napromienianiem skojarzonym z lekami

modyfikującymi promieniowrażliwość komórek hipoksycznych.

Niepowodzenia stosowanych sposobów terapii spowodowały rozwój nowych metod oceny frakcji komórek hipoksycznych *in vivo*. Należy tu wymienić elektrodę Eppendorfa oraz przeciwciała wiążące się z nitroimidazolami (markerami komórek hipoksycznych), które podane dożylnie umożliwiają pomiar stężenia tlenu w guzie. W oparciu o wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, prowadzonych z zastosowaniem tych metod, stwierdzono, że w różnych częściach guza występują duże różnice w poziomie parcjalnego ciśnienia tlenu, które mogą w znaczący sposób wpływać na odpowiedź popromienną [19-21]. Evans i Koch [22], uwzględniając wyniki innych autorów i opierając się na wynikach własnych badań, wyróżnili w nowotworze cztery subpopulacje komórek o różnym stopniu utlenowania. Zaliczyli do nich: komórki dobrze utlenowane (fizjologiczne utlenowanie tkanki nowotworowej >10% tlenu), komórki w stanie łagodnej hipoksji (utlenowanie około 2,5%), komórki w umiar-



**Ryc. 1.** Model niestabilności genetycznej indukowanej przez hipoksję. Komórki ekspozycje okresowo na hipoksję mogą aktywować punkty kontrolne odpowiedzialne za cykl komórkowy, w których odgrywają rolę kinazy ATM i ATR. Powoduje to zatrzymanie komórek w cyklu i naprawę uszkodzeń wywołanych przez reaktywne formy tlenu (RFT). Nienaprawione uszkodzenia DNA w proliferujących komórkach mogą prowadzić do niestabilności genetycznej i selekcji klonów o agresywnym i zmienionym fenotypie, co może zwiększać potencjał do przerzutowania. Ostra hipoksja może indukować ekspresję genu HIF-1  $\alpha$ , czego następstwem może być wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za angiogenezę i przerzutowanie (tj. VEGF i LOX). Przebywanie dłuższy czas komórek w chronicznej hipoksji może prowadzić do niestabilności genetycznej w wyniku zmniejszonej syntezy białek, odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA, co skutkuje błędną naprawą w komórkach proliferujących i wzrostem częstości mutacji. Hipoksja może zwiększać lub zmniejszać wrażliwość na chemioterapię (CHT) i radioterapię (RT), co zależy od poziomu i czasu trwania hipoksji, a także aktywacji szlaków molekularnych, indukowanych przez ten proces. Schemat wg Bristowa i Hilla [1], zmodyfikowany

Objaśnienie skrótów: ATM – *ataxia teleangiectasia*, kinaza białkowa kodowana przez zmutowany gen ATM;  
 ATR – *Rad3-related kinase*, kinaza ATR;  
 CHK2 – *checkpoint kinase 2*, kinaza efektorowa;  
 HR – *homologous recombination*, rekombinacja homologiczna;  
 MMR – *mismatch repair*, naprawa niedopasowanych nukleotydów;  
 BER – *base-excision repair*, naprawa z wycięciem zasad;  
 PARP – *poly(ADP-ribose) polymerase*, polimeraza poli(ADP-rybozy);  
 VEGF – *vascular endothelial growth factor*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu;  
 LOX – *lysyl oxidase*, oksydaza lizynowa

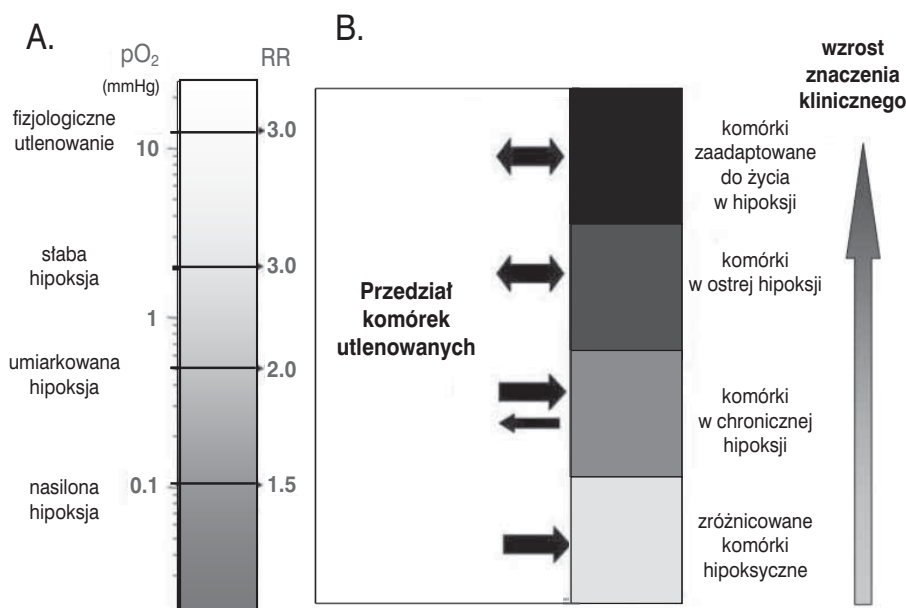
owanej hipoksji (utlenowanie w przybliżeniu 0,5%) i komórki w nasilonej hipoksji (w których utlenowanie wynosi około 0,1%). Eksperymentalne badania nad przeżywalnością komórek o różnym stopniu utlenowania wykazały, że frakcja komórek w stanie pośredniej hipoksji (parcjalne ciśnienie tlenu w granicach 0,5-20 mmHg) może mieć większe znaczenie w odpowiedzi nowotworów na frakcjonowaną radioterapię (powodować większą promieniooporność), niż frakcja komórek w chronicznej hipoksji, jak uważano dotychczas [22, 23]. W tym okresie wykazano również, że różne nasilenie i czas trwania hipoksji mogą wywoływać różną reakcję biologiczną w nowotworze oraz mieć różny wpływ na punkty kontrolne cyklu komórkowego i naprawę uszkodzeń DNA [1, 24].

W kolejnych latach nowoczesne techniki z zakresu biologii molekularnej umożliwiły dalszy rozwój metod identyfikacji komórek hipoksycznych. I tak, na podstawie badań nad profilem ekspresji genów i białek, w komórkach niedotlenowanych, wyróżniono komórki przystosowane do życia w warunkach hipoksji o zachowanej zdolności do proliferacji [24-26]. Adaptacja ta polega na zmianie profilu transkrypcji genów, która pociąga za sobą modyfikację ekspresji białek, umożliwiających ucieczkę komórki spod mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy, a tym samym kontynuowanie proliferacji [26]. Zmiana profilu transkrypcji jest związana z aktywacją w stanie hipoksji odpowiednich czynników transkrypcyjnych, stymulujących ekspresję określonych genów (Ryc. 1). Jednym z najważniejszych czynników transkrypcyjnych, którego nadekspresję wykazano w stanie hipoksji, jest białko HIF 1 (*hypoxia induced factor*) [27]. Białko to w warunkach niedoboru tlenu pobudza ekspresję około kilkudziesięciu genów kodujących białka odpowiedzialne za przystosowanie komórek do hipoksji.

Są to między innymi białka zaangażowane w procesy: metabolizmu beztlenowego (np. enzymy glikolityczne), transportu glukozy (np. białko GLUT 1 – *glucose transporter 1*), hematopoezy (np. erytropoetyna), transportu żelaza (np. transferyna), a także angiogenezy (np. VEGF, naczyniowo – śródbłonkowy czynnik wzrostu, *vascular endothelial growth factor*) [28].

Omawiając te zmiany należy przypomnieć, że na początku ubiegłego wieku biochemik niemiecki Otto Warburg po raz pierwszy zwrócił uwagę na zdolność komórek nowotworowych do przeżywania w warunkach niedotlenowania. Postawił on hipotezę, że rozwój raka jest procesem anaerobowym i do powstania nowotworu prowadzą zaburzenia metabolizmu [29]. Twierdził, że komórki nowotworowe odżywiają się glukozą, a nie tlenem, jak komórki zdrowe. Efekt ten, nazwany „efektem Warburga”, został wprowadzie w następnych latach podważony, ale zainteresowanie tą hipotezą wzrosło na początku lat 80. ubiegłego stulecia, kiedy stwierdzono, że zmieniony metabolizm komórek nowotworowych jest wynikiem mutacji, które doprowadziły do rozwoju nowotworu.

W 2007 r. Wilson [30] podsumował ówczesną wiedzę na temat hipoksji i jej wpływu na odpowiedź popromienną, a także przedstawił jej potencjalne znaczenie w praktyce klinicznej. Przedstawił nomogram – hipotetyczną zależność pomiędzy poziomem niedotlenowania komórek, wskazującym na rodzaj hipoksji i względną promieniowrażliwością, jaki ten stan wywołuje (Ryc. 2A). W modelu tym najmniej promieniowrażliwe są komórki, o najniższym poziomie utlenowania (parcjalne ciśnienie tlenu 0,1 mm Hg). Pośrednią promieniowrażliwością charakteryzują się komórki o słabym i średnim utlenowaniu (parcjalne ciśnienie tlenu w granicach 0,1-10 mm Hg), natomiast najbardziej promieniowrażliwe są komórki



**Ryc. 2.** Schemat przedstawiający (A) nomogram - hipotetyczną zależność pomiędzy stopniem utlenowania komórek, wskazującym na rodzaj hipoksji i względną promieniowrażliwością (RR – *relative radiosensitivity*), jakie ten stan wywołuje, oraz (B) cztery subpopulacje komórek hipoksycznych, wyróżniane w nowotworze i ich domniemane znaczenie kliniczne. Rycina wg G. Wilsona [30], zmodyfikowana

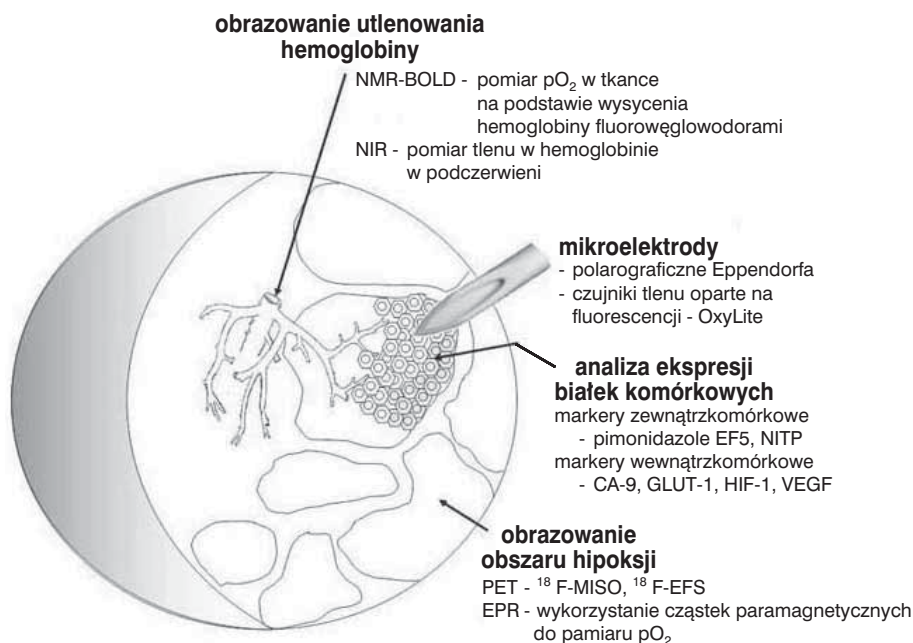
dobrze utlenowane (parcjalne ciśnienie tlenu  $\geq 10$  mm Hg). Wilson przedstawił graficznie znaczenie kliniczne każdej z czterech subpopulacji komórek hipoksycznych, wyróżnianych w nowotworze (Ryc. 2B). W podziale tym uwzględnił wyróżnione niedawno hipoksyczne komórki zróżnicowane, które nie stwarzają istotnego zagrożenia klinicznego ze względu na ich zdeterminowany los i niższy od dzielących się komórek metabolizm. Na obecność tej subpopulacji komórek zwrócili uwagę po raz pierwszy Janssen i wsp. [31], którzy w obrębie nowotworów terenu głowy i szyi, w warstwie komórek zrogowaciałych wykazali obecność komórek w chronicznej hipoksji. Na przedstawionym schemacie, komórki w stanie przejściowej i chronicznej hipoksji stanowią pośrednie zagrożenie kliniczne, ponieważ w zależności od nasilenia i czasu trwania niedotlenowania mogą one albo ulec śmierci albo po procesie reoksygenacji z powrotem wrócić do cyklu komórkowego i podjąć podziały. Natomiast największe znaczenie kliniczne posiadają komórki przystosowane do życia w hipoksji (zaadaptowane do hipoksji), ponieważ jest to wyselekcjonowana grupa komórek ze zmienionym metabolizmem, charakteryzująca się trwałymi zmianami genetycznymi [25, 32]. Należy do nich mutacja genu GLUT1, która zapewnia komórkom transport glukozy i oddychanie beztlenowe. Umożliwia to progresję w cyklu komórkowym, a także brak wrażliwości na apoptozę, zdolność do różnicowania się i wzrost potencjału angiogennego, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu oporności na leczenie i progresji nowotworu. Obecność

tych komórek można wykazać w obszarach hipoksji w preparatach barwionych immunohistochemicznie [30]. Tak więc, w przeciwieństwie do klasycznego tłumaczenia zjawiska hipoksji, obecnie uważa się, że hipoksja ma dwa oblicza. Z jednej strony, powoduje zahamowanie proliferacji, różnicowanie i śmierć komórek. Z drugiej strony, na skutek procesów przystosowawczych zachodzących w komórkach, jest podstawowym biologicznym mechanizmem, powodującym wzrost i progresję nowotworu [1, 26, 32].

Zjawisko hipoksji jest przedmiotem bardzo intensywnych badań w licznych laboratoriach radiobiologicznych. Dzięki nowoczesnym metodom z zakresu biologii molekularnej coraz lepiej poznawane są procesy biologiczne zachodzące w niedotlenowanych komórkach. Wydaje się jednak, że klinicyści w dalszym ciągu nie są w pełni przekonani o znaczeniu tego parametru biologicznego dla odpowiedzi nowotworów na różnego typu leczenie i w dalszym ciągu aktualne jest stwierdzenie Overgaarda o tym, że hipoksja jest adorowana tylko w laboratoriach, ale ignorowana w praktyce klinicznej [18].

### Metody oceny hipoksji w nowotworach

W celu wyróżnienia komórek hipoksycznych w ludzkich nowotworach opracowano szereg metod, które mogą służyć jako markery prognostyczne w wyborze odpowiedniego sposobu leczenia. Metody pomiaru hipoksji w nowotworach można podzielić na cztery grupy (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Schemat przedstawiający metody pomiaru hipoksji w nowotworach. Obrazowanie utlenowania hemoglobiny w krwi obwodowej i rejonów hipoksycznych w tkance nowotworowej; analiza ekspresji białek wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, związanych z hipoksją oraz pomiar utlenowania za pomocą mikroelektrod. Rycina wg G. Wilsona [30], w modyfikacji własnej

Objaśnienie skrótów:

NMR-BOLD – nuclear magnetic resonance - blood oxygenation level, NIR – near infrared spectroscopy,

EP5 – fluoropochodna etanidazolu, NITP – 7(-)[4<sup>2</sup>-(2-nitroimidazol-1-butyl)-theophylline,

CA 9 – carbonic anhydrase 9, GLUT-1 – glucose transporter-1, HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1,

VEGF – vascular endothelial growth factor, PET – positron emission tomography, F-MISO –  $^{18}F$ -Misonidazole,

EPR – electron paramagnetic resonance

Należą do nich: 1. metody oceny ekspresji białek komórki – markery wewnątrzkomórkowe lub zewnątrzkomórkowe, 2. mikroelektrody, 3. obrazowania utleniania hemoglobiny oraz 4. obrazowania obszaru hipoksji. Metody te, ze względu na sposób pomiaru, możemy ogólnie podzielić na pośrednie i bezpośrednie. Pośrednie metody pomiaru hipoksji dostarczają pozytywnego wyniku w przypadku braku obecności tlenu. Bezpośredniego pomiaru stężenia tlenu w nowotworze można dokonać przy zastosowaniu mikroelektrod lub analizy obrazowej utleniania hemoglobiny.

W praktyce klinicznej najwcześniej zaczęto stosować metody pośrednie, oparte głównie na immunohistochemicznym barwieniu egzo- i endogennych markerów komórek znajdujących się w stanie niedotlenowania. Ważną zaletą tych metod jest możliwość uzyskania na ich podstawie informacji na temat przestrzennego rozmieszczenia komórek hipoksycznych w guzie. Warunki niedotlenowania wywołują w komórkach zmiany w ekspresji wielu genów, które zależą od nasilenia i czasu trwania hipoksji. Tak więc, endogenne markery hipoksji są produktami genów, które są aktywowane w warunkach hipoksji. Regulują one takie procesy biologiczne jak: metabolizm glukozy, proliferacja komórek, angiogeneza, apoptoza, unieśmiertelnienie i migracja.

Wyróżnienie ekspresji endogennych markerów metodą immunohistochemiczną stało się popularną metodą zastępczą (*surrogate markers*) dla pomiaru poziomu utlenowania nowotworu w warunkach klinicznych. Zaletą tej metody jest także to, że nie wymaga ona dożylnego podania znacznika i jest prosta w wykonaniu. Niestety, stwierdza się trudności w interpretacji barwienia i wiarygodności markerów odzwierciedlających hipoksję. Ekspresją wielu z endogennych markerów hipoksji kieruje czynnik transkrypcyjny HIF-1 (*hypoxia-inducible transcription factor 1*). Białko to jest heterodimerem, który składa się z podjednostek HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ . W warunkach normoksji poziom HIF-1 $\alpha$  jest niski, ponieważ podjednostka ta podlega procesowi ubikwitynizacji i degradacji w proteosomach. Proces ten zachodzi po połączeniu HIF 1 $\alpha$  z grupami hydroksylowymi, katalizowanym przez hydroksylazę prolinową i białko VHL (*Hippel-Lindau tumour suppressor protein*). Natomiast w stanie hipoksji rozkład podjednostki HIF-1 $\alpha$  zostaje zahamowany, ponieważ hydroksylaza prolinowa wymaga jako kosubstratu tlenu. Podjednostka  $\alpha$  przedostaje się wówczas do jądra komórkowego i łączy się z podjednostką  $\beta$ . Powstały heterodimer przyłącza się do specyficznych sekwencji genów HRE (*hypoxia response elements*) i w ten sposób uruchamiana jest ekspresja określonych genów w odpowiedzi na niedotlenienie [1, 27]. Są to między innymi geny kodujące VEGF, dehydrogenazę mleczanową A, enzymy glikolityczne – anhidraza węglanowa 9 (CA9 – *carbonic anhydrase 9*) oraz transportery glukozy (GLUT1 i GLUT3) oraz syntaza tlenu azotu i insulinoподобny czynnik wzrostu. Tak więc, **białko HIF 1**, czy też jego podjednostka  $\alpha$  jest endogennym markerem, stosowanym do badania poziomu jego ekspresji i często wykorzystywanym dla oceny poziomu hipoksji w guzie

[33]. W przyszłości białko to może być wykorzystane do terapii przeciwnowotworowej [34].

**Anhidraza węglanowa 9** jest często oznaczanym endogennym markerem poziomu niedotlenowania. Jest to enzym katalizujący odwracalną reakcję powstawania wodorowęglanowego jonu z wody i dwutlenku węgla. Anhidrazy węglanowe są metaloenzymami, o szerokim spektrum działania w komórkach ssaków i występują przynajmniej w 14 izoformach. Niektóre z nich zlokalizowane są w cytozolu, inne, jak np. anhidraza węglanowa 9, związane są z błoną komórki. Dane eksperymentalne wykazują, że w warunkach hipoksycznych (z progową wartością parcjalnego ciśnienia tlenu od 20 mm Hg; 2,6% O<sub>2</sub>) poziom białka CA-9 wzrasta w czasie od 4 do 24 godzin. Ekspresja białka CA-9 jest związana z chroniczną hipoksją. Enzym ten bierze udział w procesach związanych z utrzymywaniem odpowiedniego zewnątrzkomórkowego stężenia pH, co łączy się ze wzrostem komórek nowotworowych i tworzeniem przerzutów. Podwyższone stężenie tego białka występuje na powierzchni komórek niektórych zdrowych tkanek (erytrocyty, śluzówka żołądka, jelit i pęcherzyka żółciowego), a także w wielu nowotworach w martwiczo zmienionych okolicach. Znaczenie prognostyczne tego markera wykazano w wielu badaniach klinicznych [35, 36].

Białko **GLUT1** jest przedstawicielem rodziny białek odpowiedzialnych za transport glukozy przez błony komórek, która jest ważnym substratem w metabolizmie komórek. W warunkach fizjologicznych białko to jest obecne wyłącznie w erytrocytach, komórkach śródbłonna naczyń mózgu i mięśniach [37]. Ekspresja tego białka koreluje z przewlekłym niedotlenieniem tkanek i ograniczonym dostępem do glukozy, dlatego często jego obecność stwierdza się w nowotworach [38, 39]. Dla niekontrolowanego wzrostu komórki nowotworowe potrzebują stałego źródła energii, którą zapewnia przyspieszony proces glikolizy (oddychania beztlenowego). Glikoliza beztlenowa to proces, w wyniku którego glukoza jest metabolizowana do pirogronianu, a następnie do kwasu mlekowego. Proces ten dostarcza znacznie mniej energii (dwie cząsteczki ATP), niż spalanie glukozy w warunkach tlenowych (36 cząsteczek ATP). W wielu nowotworach wysoki poziom tego transportera koreluje z krótszym czasem wolnym od przerzutów i gorszym całkowitym przeżyciem chorych [35, 40-43].

Do **egzogennych markerów komórek hipoksycznych** zaliczamy głównie 2- nitroimidazole, takie jak: **pimonidazol** (najczęściej stosowany w prospektywnych badaniach klinicznych), **EF5** (fluoropochodna etanidazolu) i **NITP** (2-nitroimidazol sprzężony z teofiliną – substancją, dzięki której powstają stabilne kompleksy z białkami, RNA i DNA w komórkach hipoksycznych). Te związki chemiczne (uwalniacze) są prolekami podawanymi dożylnie, które przy niskim stężeniu tlenu (pO<sub>2</sub> <1 mm Hg) wiążą się z makrocząsteczkami komórki przy udziale nitroreduktaz i są biochemicznie degradowane wyłącznie w komórkach hipoksycznych [20, 22]. Ich ilość jest zatem odwrotnie proporcjonalna do stężenia tlenu w guzie, a obecność wykrywana najczęściej immunohistochemicz-

nie, dzięki sprzężonym z nimi przeciwciałom monoklonalnym. Wykazano, że zwiększony wychwyt pimonidazolu wskazuje raczej na obecność komórek w chronicznej hipoksji – zróżnicowanych i skeratyzowanych.

Przedstawione metody oceny hipoksji w guzie nowotworowym oparte są na analizie jednego markera. Metody diagnostyczne oparte na jednym markerze mają szereg ograniczeń, jak np. utrata czułości i swoistości w przypadku zastosowania do diagnozowania licznej i heterogennej grupy. Dlatego nowe podejście do testów radiobiologicznych opiera się na analizie setek lub tysięcy genów lub białek, na podstawie których można uzyskać wzór genetyczny czy białkowy dla tkanki, narządu, różnych nowotworów, osób chorych lub zdrowych. Zaletą tych metod jest potrzeba niewielkiej ilości materiału do analizy – w przypadku badania ekspresji genów niewielki fragment świeżej tkanki, a w przypadku testów proteomicznych kropla krwi, wydzielinę czy płucznicy.

W ostatnich latach opracowano szereg metod służących do bezpośredniej oceny stopnia utlenowania komórek nowotworowych, które znalazły zastosowanie w praktyce klinicznej. Należy do nich **mikroelektroda Eppendorfa**, która przez wiele lat uważana była za metodę referencyjną („złoty standard”) dla pomiaru hipoksji. Elektroda ta, wprowadzona do praktyki klinicznej z początkiem lat 80. ubiegłego wieku, mierzy w guzie stężenie tlenu zużywanego w procesie oddychania, w oparciu o polarograficzną metodę oceny stężenia tlenu. Mierzy ona bezpośrednio stężenie tlenu w objętości guza (a nie w pojedynczych komórkach czy warstwie komórek), ponieważ jest ona chroniona przez metalową igłę o średnicy 300 mikronów, która służy do penetracji tkanki. Tak więc, elektroda Eppendorfa podaje przeciętną wartość stężenia tlenu w mierzonej objętości (w której mogą znajdować się również komórki dobrze utlenowane). W przeprowadzonym niedawno wielośrodkowym badaniu klinicznym, dotyczącym 397 chorych, przy zastosowaniu tej metody wykazano, iż średnia wartość  $pO_2$  dla raków terenu głowy i szyi wynosi 9 mm Hg (1,2%  $O_2$ ), z tym, że 38% guzów posiadało wartość poniżej 5 mm Hg (0,66%  $O_2$ ) i 19% poniżej 2,5 mm Hg (0,33%  $O_2$ ). Wskazuje to na fakt, że w badanych nowotworach większość komórek hipoksycznych znajduje się w słabej lub umiarkowanej hipoksji [44]. Badania eksperymentalne dowodzą, że bardzo niskie wartości  $pO_2$ , wykazywane przez elektrodę, są najprawdopodobniej wynikiem pomiaru w obszarze, w którym przepływ krwi czasowo został zamknięty, tj. ostrej hipoksji. Jest to także metoda inwazyjna, której stosowanie ogranicza się do łatwo dostępnych guzów [30]. Ograniczenia w stosowaniu tych elektrod stwarza głównie ich budowa.

Ostatnio zastosowano nową technologię do pomiaru bezpośredniego stężenia  $pO_2$ , opartą na zjawisku wygaszania fluorescencji przez tlen. Technika ta oparta jest na fluoryzujących kompleksach rutenu, zanurzonych w matrycy gumowej z końcówką o średnicy 220 mikronów, umieszczonej w sondzie z włókna optycznego. Włókno optyczne wprowadzone jest bezpośrednio do guza. Związek fluoryzujący jest wzbudzany przez foto-

diodę, emitującą fale o długości 460 nm. Poziom fluorescencji jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia tlenu na końcu sondy. Metoda ta jest zależna od temperatury, dlatego pomiar ilościowy wymaga korekty dla temperatury, na podstawie czujnika umieszczonego na sondzie. Jest to także metoda inwazyjna, której stosowanie jest ograniczone do łatwo dostępnych guzów, a ponadto przy zastosowaniu tej techniki nie jest możliwe odróżnienie komórek nekrotycznych od hipoksycznych, jak również zróżnicowanie poziomu hipoksji. Urządzenie dostępne komercyjnie nazywa się OxyLite.

W ostatnich latach opracowano szereg nieinwazyjnych metod bezpośredniego pomiaru tlenu, związanych z nowoczesnymi technikami obrazowania. Najbardziej obiecująca z tych metod to technika pozytonowej tomografii emisyjnej **PET** (*positron emission tomography*). Opiera się ona na detekcji promieniowania  $\gamma$ , powstającego w wyniku anihilacji pozytonu emitowanego z krótko żyjącego izotopu, ulegającego rozpadowi  $\beta^+$ , np. fluoru –  $^{18}F$ , podawanego dożylnie przed badaniem. Do określenia stężenia tlenu wykorzystuje się wiele radiofarmaceutyków, które gromadzą się specyficznie w tkankach hipoksycznych. Do związków tych należą pochodne nitroimidazolu, zawierające  $^{18}F$ , takie jak: fluoromisonidazole ( $^{18}F$  – MISO, misonidazol znakowany fluorem F18),  $^{18}F$ -EF5 ((2-(2-nitro-1H-imidazolo-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-[ $^{18}F$ ] pentafluoropropyl)-acetamid)) i arabinozyd fluorozomycyny ( $^{18}F$ -FAZA),  $^{64}Cu$  lub  $^{60}Cu$  diacetylo-bis N4-metytiosemikarbazon (Cu ATSM). Fluor 18 jest najczęściej stosowanym izotopem w badaniach PET z uwagi na stosunkowo długi okres półrozpadu, w porównaniu z izotopami innych pierwiastków możliwych do zastosowania w tej metodzie. Dodatkowo  $^{18}F$  cechuje się najkrótszym zasięgiem pozytonów w badanym środowisku (organizmie pacjenta), zanim dojdzie do ich anihilacji z elektronami.

Inną zaletą pozytonowej tomografii emisyjnej jest możliwość łączenia tej metody z innymi technikami obrazowymi, takimi jak tomografia komputerowa, a przez to uzyskanie dokładniejszej informacji o lokalizacji obszarów niedotlenowania i zmian obszarów hipoksji w trakcie leczenia [45-47]. Na podstawie badania PET można uzyskać trójwymiarowe mapy hipoksji w obrębie ciała. Ograniczeniem tej metody jest niewielki zasięg głębokościowy pomiaru hipoksji (wynoszący 5-8 mm), a także trudności spowodowane słabą rozdzielczością w przypadku analizy dużych obszarów [48], jak również wysokie koszty aparatu PET.

Inne nieinwazyjne techniki obrazowania, stosowane do pomiaru stężenia tlenu, to techniki związane ze zjawiskiem rezonansu magnetycznego, jak **spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego** (NMR – *nuclear magnetic resonance*) i **spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego** (EPR – *electron paramagnetic resonance*) [49]. Metoda spektroskopii NMR polega na wzbudzaniu spinów jąder atomów, znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym, poprzez szybkie zmiany kierunku wektora pola magnetycznego, z odpowiednią częstotliwością, a następnie rejestrację promie-

niowania elektromagnetycznego, powstającego na skutek zjawiska relaksacji. W oparciu o tę technikę dokonuje się bezpośredniego pomiaru miejscowego stężenia tlenu, na podstawie widma NMR perfluorowęglowodorów, zależnych od stężenia tlenu [50]. Związki te podawane są do regionu zainteresowania przez iniekcję – bezpośrednio do guza lub dożylną. Jednak, ponieważ związki te łączą się z tlenem, lokalizacja fluorowęglowodorów i depozytowanie tych związków są ograniczone do regionów o dobrym przepływie krwi. Podstawowe fizyczne założenia techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego są analogiczne do wykorzystywanych w spektroskopii NMR, ale badane są spiny elektronów, a nie spiny jąder atomowych. Pomiary te są nieinwazyjne i w zależności od typu rezonatora i zastosowanej frekwencji możliwe są pomiary na różnej głębokości (powierzchniowe rezonatory i spektroskopia 1200 MHz – głębokość od 10 mm; bardzo niska częstotliwość 300-600 MHz lub bardziej inwazyjne rezonatory 1200 MHz – głębokość do więcej niż 80 mm).

W celu oceny poziomu hipoksji w guzie wykorzystuje się także pośrednie parametry, związane z dostawą tlenu. Jedną z najczęściej stosowanych metod był pomiar stężenia hemoglobiny w krwi obwodowej i w wielu pracach wykazano prognostyczne znaczenie tego parametru. Jednak, ponieważ nowotwory różnią się zdolnością do perfuzji krwi, która zależy od unaczynienia i ciśnienia śródmiąższowego, coraz częściej do pomiaru przepływu krwi stosuje się obecnie metodę **BOLD – MRI** (*blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging*), to jest rezonansu magnetycznego, opartego na efekcie zależnym od poziomu utlenowania krwi. Technika ta jest pośrednią metodą pomiaru perfuzji i utlenowania krwi, opartą o różnice w paramagnetycznych właściwościach deoksyhemoglobiny i oksyhemoglobiny. **BOLD-MRI** nie wymaga podawania materiałów kontrastowych i umożliwia wykonanie szeregu obrazów przestrzennych o dużej rozdzielczości. Jednak pomiary te odzwierciedlają tylko zmiany w wysyceniu hemoglobiny, natomiast do obliczenia całkowitego wysycenia hemoglobiny, czy też poziomu tlenu wymagane są dodatkowe informacje, dotyczące różnicy w poziomie sygnału MRI między chorymi oddychającymi przed pomiarem powietrzem o zawartości 21% tlenu i pacjentami, którym podano karbogen (95% tlenu + 5% CO<sub>2</sub>) [51]. Z kolei, metoda spektroskopii w podczerwieni – **NIR** (*near infrared spectroscopy*) polega na ilościowym pomiarze tlenu w hemoglobinie naczyń krwionośnych, na podstawie analizy widma w podczerwieni. Ciała ludzkie emitują promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie dalekiej podczerwieni, którego częstotliwość zależy od temperatury ciała. Ciała o temperaturze pokojowej emitują najwięcej promieniowania o długości fali rzędu 10 μm. Obszary cieplejsze mogą emitować więcej promieniowania i o mniejszej długości, co pozwala na wykrycie przepływu krwi. Dlatego zastosowanie tej metody może dostarczyć dodatkowych informacji na temat dostawy tlenu z naczyń do tkanki i jego pojemności. Porównanie danych na temat hemoglobiny

i stężenia tlenu może dostarczyć dodatkowych informacji na temat podaży i popytu tlenu w tkance [52].

## Podsumowanie

Nowotwory stanowią heterogenną populację komórek o różnym stopniu utlenowania. Decydującą rolę w promiennej odpowiedzi na frakcjonowaną radioterapię odgrywa nie chroniczna hipoksja, której obecność okazała się mniej istotna dla nowotworów niż sądzono, lecz komórki zaadaptowane do życia w warunkach hipoksycznych (0,5-20 mm Hg). W warunkach niedoboru tlenu komórki te mogą oddychać beztlenowo, a zdobytą energię podczas glikolizy wykorzystywać do proliferacji. Dlatego uważa się, że określenie „frakcja komórek hipoksycznych” może być mylące.

W celu wyboru odpowiedniej terapii powinno się odróżniać hipoksję ostrą od chronicznej, choć nie jest to łatwe, ponieważ obecnie nie są dostępne metody rozróżniające te dwa rodzaje hipoksji. W przyszłości, przypuszczalnie stosowane będą różne rodzaje leczenia w celu pokonywania różnych rodzajów hipoksji. Przykładem takiej strategii może być leczenie według schematu ARCON z tirazapaminą. Obecnie, do wyróżnienia komórek niedotlenowanych można stosować równocześnie dwie metody, które mogą dostarczać uzupełniających informacji. Przykładem mogą być nitroimidazole, wyróżniające komórki o niższym stężeniu tlenu (0,02-2%) i elektrody igłowe, które są najbardziej wrażliwe przy wyższych stężeniach tlenu [54]. Przy stosowaniu nitroimidazoli należy pamiętać, że połowiczny czas życia komórek hipoksycznych wynosi 24 godziny [53] i dlatego zaleca się pobranie wycinka nowotworu po upływie 1-2 godzin od podania tych środków [24].

Jest jednak prawdopodobne, że metoda oceny niedotlenowania komórek odpowiednia dla jednego typu nowotworu może być niemiarodajna dla drugiego typu nowotworu i może dawać różne wyniki, w zależności od stopnia złośliwości i stanu zaawansowania klinicznego [22]. Przyszłe propozycje dotyczą opracowania nieinwazyjnych technik oraz biomarkerów do oceny frakcji komórek w ostrej i chronicznej hipoksji, równocześnie z pomiarem stężenia tlenu w komórkach, co umożliwiłoby wybór odpowiedniego leczenia. A nowe spojrzenie na hipoksję może przyczynić się do opracowania nowych schematów radioterapii i indywidualizacji leczenia.

## Podziękowania

*Autorki składają serdeczne podziękowania panu Prof. dr. hab. Janowi Skołyszewskiemu za cenne uwagi do maszynopisu pracy oraz pani mgr Kai Niesiołowskiej za pomoc w wykonaniu rycin.*

**Prof. dr hab. med. Anna Gasińska**  
Zakład Radiobiologii Klinicznej  
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków  
e-mail: zsgasins@cyf-kr.edu.pl



## Piśmiennictwo

1. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Rev* 2008; 8: 180-92.
2. Schwarz G. Ueber desensibilisierung gegen Rontgen- und radiumstrahlen. *Munch Med Wochenschrift* 1909; 56: 1217-8.
3. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-49.
4. Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; 22: 258-73.
5. Gray LH, Conger AD, Ebert M i wsp. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-48.
6. Powers WE, Tolmach LI. A multicomponent x-ray survival curve for mouse lymphosarcoma cells irradiated in vivo. *Nature* 1963; 16: 710-11.
7. Thomlinson RH, Craddock EA. The gross response of an experimental tumour to single doses of x-rays. *Br J Cancer* 1967; 21: 108-23.
8. Whillans DW, Hunt JW. A rapid-mixing comparison of the mechanisms of radiosensitization by oxygen and misonidazole in CHO cells. *Radiat Res* 1982; 90: 126-41.
9. Koch CJ, Stobbe CC, Bump EA. The effect on the Km for radiosensitization at 0 degree C of thiol depletion by diethylmaleate pretreatment: quantitative differences found using the radiation sensitizing agent misonidazole or oxygen. *Radiat Res* 1984; 98: 41-53.
10. Tannock IF. Oxygen diffusion and the distribution of cellular radiosensitivity in tumours. *Br J Radiol* 1972; 45: 515-24.
11. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 695-712.
12. Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 1979; 52: 650-6.
13. Overgaard J, Horsman MR. Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6: 10-21.
14. Henk JM, Kunkler PB, Smith CW. Radiotherapy and hyperbaric oxygen in head and neck cancer. Final report of first controlled clinical trial. *Lancet* 1977; 2: 101-3.
15. Henk JM. Late results of a trial of hyperbaric oxygen and radiotherapy in head and neck cancer: a rationale for hypoxic cell sensitizers? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12:1339-41.
16. Phillips TL, Wasserman TH, Johnson RJ i wsp. Final report on the United States Phase I Clinical Trial of the hypoxic cell radiosensitizer, misonidazole. *Cancer* 1981; 48: 1697-704.
17. Urtasun RC, Coleman CN, Wasserman TH i wsp. Clinical trials with hypoxic cell sensitizers: time to retrench or time to push forward? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 1691-6.
18. Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4066-74.
19. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-65.
20. Evans SM, Jenkins WT, Joiner B i wsp. 2-Nitroimidazole (EF5) binding predicts radiation resistance in individual 9L s.c. tumors. *Cancer Res* 1996; 56: 405-11.
21. Woods ML, Koch CJ, Lord EM. Detection of individual hypoxic cells in multicellular spheroids by flow cytometry using the 2-nitroimidazole, EF5, and monoclonal antibodies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 34: 93-101.
22. Evans SM, Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett.* 2003; 195: 1-16.
23. Wouters BG, Brown JM. Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy. *Radiat Res* 1997; 147: 541-50.
24. Höckel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 2001; 28 (2 Suppl 8): 36-41.
25. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 4-9.
26. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 2008; 13: 21-26.
27. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-80.
28. Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer* 2003; 2-23.
29. Warburg O. On the origin of cancer. *Science* 1956; 123: 309-14.
30. Wilson GD. Hypoxia and prognosis: the oxygen tension mounts. *Front Biosci* 2007; 12: 3502-18.
31. Janssen HL, Hoebbers FJ, Sprong D i wsp. Differentiation-associated staining with anti-pimonidazole antibodies in head and neck tumors. *Radiother Oncol* 2004; 70: 91-7.
32. Axelsson H, Fredlund E, Ovenberger M. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin in cell Develop Biol* 2005; 16: 554-63.
33. Hui EP, Chan ATC, Pezzella F i wsp. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$ , carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2595-604.
34. Semenza G. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin in Cancer Biol* 2009; 19: 12-16.
35. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM i wsp. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer; relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer* 2003; 89:1290-97.
36. Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J i wsp. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2935-47.
37. Younes M, Lechago LV, Somoano JR i wsp. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 1164-67.
38. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 2002; 35: 9-26.
39. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Phys* 2005; 202: 654-62.
40. Ogawa J, Inoue H, Koide S. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 189-92.
41. Haber RS, Rathan A, Weiser KR i wsp. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma. A marker for poor prognosis. *Cancer* 1998; 83: 34-40.
42. Cantuaria G, Fagotti A, Ferrandia G i wsp. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 1144-50.
43. Kunkel M, Reichert TE, Benz P i wsp. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1015-24.
44. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V i wsp. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multicenter study. *Radiother Oncol* 2005; 77: 18-24.
45. Rischin D, Hicks RJ i wsp. Prognostic significance of [18F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol* 2005; 24: 2098-104.
46. Herwarth D, Eschmann SM, Scheiderbauer F i wsp. Kinetic analysis of dynamic 18F-fluoromisonidazole PET correlates with radiation treatment outcome in head-and-neck cancer. *BMC Cancer* 2005; 5: 152.
47. Eschmann SM, Paulsen F, Bedeshem C i wsp. Hypoxia-imaging with 18F-misonidazole and PET: changes of kinetics during radiotherapy of head-and-neck cancer. *Radiother Oncol* 2007; 83: 406-10.
48. Busk M, Horsman MR, Overgaard J. Resolution in PET hypoxia imaging: voxel size matters. *Acta Oncol* 2008; 47: 1201-10.
49. Swartz HM, Khan N, Buckley J i wsp. Clinical applications of EPR: overview and perspectives. *NMR Biomed* 2004; 17: 335-51.
50. Sotak CH, Hees PS, Huang HN i wsp. A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Magn Reson Med* 1993; 29: 188-95.
51. Diergarten T, Martirosian P, Kottke R i wsp. Functional characterization of prostate cancer by integrated magnetic resonance imaging and oxygenation changes during carbogen breathing. *Invest Radiol* 2005; 40: 102-9.
52. Kim JG, Zhao D, Song Y i wsp. Interplay of tumor vascular oxygenation and tumor pO2 observed using near-infrared spectroscopy, an oxygen needle electrode and 19F MR pO2 mapping. *J Biomed Opt* 2003; 8: 53-62.
53. Ljungkvist ASE, Bussink J, Kaanders JHAM i wsp. Hypoxic cell turnover in different solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 24: 2098-104.
54. Evans SM, Du KL, Chalin AA i wsp. Patterns and levels of hypoxia in head and neck squamous cell carcinoma and their relationship to patient outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69:1024-31.

Otrzymano: 1 października 2009 r.  
Przyjęto do druku: 6 października 2009 r.