

# Odgovor različitih tjelesnih i tumorskih stanica na smanjenu opskrbu kisikom i značaj odgovora u antitumorskoj terapiji

---

**Kolarić, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:234098>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Ana Kolarić

**Odgovor različitih tjelesnih i tumorskih stanica na smanjenu opskrbu  
kisikom i značaj odgovora u antitumorskoj terapiji**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

## **ZAVOD ZA FIZIOLOGIJU I RADIOBIOLOGIJU, VETERINARSKI FAKULTET**

**Predstojnik:** prof. dr. sc. Marinko Vilić

**Mentorice:** prof. dr. sc. Jasna Aladrović

doc. dr. sc. Lana Pađen

### **Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. izv. prof. dr. sc. Maja Belić
2. doc. dr. sc. Lana Pađen
3. prof. dr. sc. Jasna Aladrović
4. doc. dr. sc. Ana Shek Vugrovečki (zamjena)

## **Zahvale**

*Zahvaljujem svojim mentoricama, prof. dr. sc. Jasni Aladrović i doc. dr. sc. Lani Pađen, na korisnim savjetima, strpljivosti, nesebično utrošenom vremenu i pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Mojim prijateljima, ekipi iz IVSA-e, kolegama i prof. emeritus Đuri Huberu na čijim sam projektima volontirala dugi niz godina, koji su uvijek vjerovali u mene i poticali me na uspjehe.*

*Posebnu zahvalu upućujem mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci svih ovih godina.*

## POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

- AKT** - protein kinaza B, anti-apoptotska kinaza (*engl.* protein kinase B, anti-apoptotic kinase)
- ARNT** - protein aril hidrokarbon receptor nuklearni translokator (*engl.* aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein)
- ATP** - adenzin-trifosfat
- bFGF** - bazični čimbenik rasta fibroblasta (*engl.* basic fibroblast growth factor)
- BFU-E** - *engl.* burst-forming unit-erythroid
- bHLH** - bazični zavojnica-petlja-zavojnica motiv (*engl.* basic helix-loop-helix)
- BPV** - goveđi papilomavirus (*engl.* bovine papillomavirus)
- CASP** - kaspaza
- CCRC** - karcinom svijetlih stanica bubrega (*engl.* clear cell renal carcinoma)
- CD73** - ekto-5' nukleotidaza (*engl.* ecto-5'-nucleotidase)
- CFU-E** - *engl.* colony-forming unit-erythroid
- CODDD** - karboksilna o kisiku ovisna degradirajuća domena (*engl.* carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain)
- CTAD** - C-terminalna transaktivacijska domena (*engl.* C-terminal transactivation domain)
- CUL2** - *engl.* Cullin2 scaffold protein
- DAG** - diacilglicerol
- DCE-MRI** - dinamička kontrastom pojačana MRI (*engl.* dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging)
- eNOS** - endotelna sintaza dušičnog oksida (*engl.* endothelial nitric oxide synthase)
- EGFR** - receptor epidermalnog čimbenika rasta (*engl.* epidermal growth factor receptor)
- EMA** - Europska agencija za lijekove (*engl.* European Medicines Agency)
- EPO** - eritropoetin
- FDA** - Agencija za hranu i lijekove SAD-a (*engl.* U.S. Food and Drug Administration)
- FDG-PET** - pozitronska emisijska tomografija 18F-fluorodeoksiglukozom
- FIH** - čimbenik inhibicije HIF-a
- FLT-1** - receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 1 (*engl.* vascular endothelial growth factor receptor 1)
- GBM** - multiformni glioblastom (*engl.* glioblastoma multiforme)
- HDAC** - histon deacetilaza
- HIF** - hipoksijom inducirani čimbenik (*engl.* hypoxia-induced factor)
- HRE** - element odgovora na hipoksiju (*engl.* hypoxia response element)
- HPV** - humani papilomavirus
- IL-8, (6)** - interleukin 8, interleukin 6
- IP3** - inozitol 1,4,5-trifosfat

**JAK2** - Janus kinaza

**KDR** - receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 2

**LOX** - lizil okidaza

**MAPK** - MAP kinaza, proteinska kinaza aktivirana mitogenima (*engl.* mitogen-activated protein kinase)

**miRNA** - mikro RNA

**mTOR** - ciljno mjesto rapamicina u sisavaca (*engl.* mammalian target of rapamycin)

**NF-κB** – nuklearni čimbenik κB (*engl.* nuclear factor kappa B)

**NLS** - signal nuklearne lokalizacije (*engl.* nuclear localization signal)

**NODDD** - *engl.* amino-terminal oxygen-dependent degradation domain

**NTAD** - N-terminalna transaktivacijska domena (*engl.* N-terminal transactivation domain)

**NRP-1** - neuropilin-1

**PAS** - Per-Arnt-Sim domena

**PDGF** - čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (*engl.* platelet-derived growth factor)

**PHD** - prolil hidroksilazna domena (*engl.* prolyl hydroxylase domain)

**PI3K** - fosfatidilinozitol-3 - kinaza (*engl.* phosphatidylinositol-3-kinase)

**PLCγ** - fosfolipaza C γ

**RACK1** - receptor aktivirane protein kinaze C1 (*engl.* receptor of activated protein kinase C1)

**RBX1** - *engl.* RING-box 1 protein

**ROS** - reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* reactive oxygen species)

**RTK** - receptor tirozin kinaze

**SCF** - čimbenik matičnih stanica (*engl.* stem cell factor)

**sFlt** - topljiva fms-u slična tirozin kinaza 1 (*engl.* soluble fms-like tyrosine kinase 1)

**SIP-1** - *engl.* SymRK-interacting protein

**siRNA** - mala interferirajuća RNA (*engl.* small interfering RNA)

**SRC-1** - koaktivator steroidnog receptora (*engl.* steroid receptor coactivator-1)

**STAT** - prenosilac signala i aktivator transkripcije (*engl.* signal transducer and activator of transcription)

**TPO** - trombopoetin

**USF2** - (*engl.* upstream stimulatory factor-2)

**VEGF** - čimbenik rasta endotela krvnih žila (*engl.* vascular endothelial growth factor)

**VEGFR** - receptor za čimbenik rasta endotela krvnih žila

**VHL** - von Hippel-Lindau tumor supresorni protein

\*Napomena: Prema "Guidelines for Human Gene Nomenclature" (WAIN i sur., 2002) simboli za označavanje gena čovjeka pišu se svim velikim slovima u kurzivu, a proteini istim, svim velikim slovima koja nisu u kurzivu. Prema "Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat" ([http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene\\_sym](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene_sym)) simboli za gene miševa također se pišu u kurzivu, ali samo je prvo slovo simbola veliko. Proteini miša označavaju se na isti način kao i proteini čovjeka.

## **POPIS TABLICA I SLIKA**

**Slika 1.** Fiziološki adaptivni odgovori na hipoksiju.

**Slika 2.** Građa HIF podjedinica u humanim stanicama.

**Slika 3.** Aktivnost HIF- $\alpha$  u hipoksičnim i normoksičnim uvjetima u stanici.

**Slika 4.** Reprezentativni HIF-1 ciljani geni.

**Slika 5.** Proteinski produkti gena za koje postoje eksperimentalni dokazi da su direktno transkripcijski aktivirani HIF-om i njihova uloga u homeostazi kisika i drugim staničnim procesima.

**Slika 6.** Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja eritropoetina za eritropoetinski receptor.

**Slika 7.** Vaskularni odgovor na hipoksiju potaknut s HIF-1.

**Slika 8.** Prenosjenje signala u stanici nakon vezanja VEGF-a za receptor i učinci pokrenutih signalnih puteva.

**Tablica 1.** Primjeri nekih HIF-om ciljanih gena, proteina i njihova uloga u biologiji i progresiji raka.

**Tablica 2.** Odabrane skupine inhibitora aktivnosti HIF-1 u humanim malignim tumorima i mišjim modelima.

**Tablica 3.** Noviji HIF inhibitori i njihov mehanizam djelovanja.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	3
2.1. Važnost kisika za organizme .....	3
2.2. Mehanizmi prilagodbe organizma i stanica na hipoksiju .....	4
2.3. Put prijenosa signala HIF-om .....	11
2.3.1. HIF hidroksilaze kao stanični senzora kisika i ekspresija HIF- $\alpha$ u normoksiji .....	14
2.3.2. Pokretanje staničnih odgovora u hipoksiji .....	16
2.3.3. Regulacija aktivnosti HIF-hidroksilaza i HIF kompleksa .....	18
2.3.4. Transkripcija i ekspresija gena ciljanih HIF kompleksima kao stanični odgovor na hipoksiju .....	22
2.3.4.1. Funkcionalne razlike HIF- $\alpha$ izoformi .....	30
2.3.5. Odgovor hematopoetskog sustava na hipoksiju i regulacija eritropoeze .....	35
2.3.6. Angiogeneza kao odgovor krvožilnog sustava na hipoksiju .....	38
2.3.6.1. Proangiogeni čimbenici VEGF i bFGF i regulacija njihove ekspresije hipoksijom .....	40
2.3.6.1.1. Drugi citokini i hipoksija .....	45
2.4. Terapijski potencijal VEGF modulatora i FIH/PHD/pVHL/HIF sustava .....	46
2.5. Biologija tumora .....	50
2.5.1. HIF i maligni tumori .....	53
2.6. Značaj staničnog odgovora na hipoksiju u antitumorskoj terapiji .....	61
2.6.1. Lijekovi u terapiji raka koji inhibiraju aktivnost HIF-1 .....	61
2.6.2. Proangiogeni čimbenik VEGF u terapiji malignih tumora .....	66
2.6.3. Primjena inhibitora hidroksilaza, HIF-a i VEGF-a u veterinarskoj medicini .....	72
3. BUDUĆI IZAZOVI U ISTRAŽIVANJU HIF/pVHL/PHD SUSTAVA I KLINIČKOJ PRIMJENI ISTRAŽIVANJA .....	75
3.1. Kompleksnost staničnih procesa i regulacije homeostaze kisika .....	75
3.2. Ograničenja u eksperimentalnom radu i praćenju učinka lijekova .....	81
3.3. Budući izazovi u terapiji .....	83
4. ZAKLJUČCI .....	91
5. LITERATURA .....	92
6. SAŽETAK .....	111
7. SUMMARY .....	112
8. KRATKI ŽIVOTOPIS .....	113



## 1. UVOD

Kisik je jedan od najvažnijih elemenata na Zemlji za aerobne organizme (MARTIN i sur., 2017). Koriste ga za proizvodnju kemijske energije iz makromolekula hrane te je pohranjuju u molekule adenozin trifosfata (ATP-a). Pored navedene uloge, kisik je neposredno ili posredno uključen u upalne procese kroz aktivaciju citokina, izvor je reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species - ROS) koji su uključeni u patogenezu degenerativnih, kroničnih i malignih bolesti, starenje stanica i organizma i smrt stanica (THANNICKAL, 2009).

Organizmi dugoročno ne pohranjuju kisik u tkivima te se stanice neprestano moraju opskrbljivati kisikom. U nedostatnoj opskrbi što nazivamo hipoksija, sustavni odgovori organizma su eritropoeza i angiogeneza. Glavni posrednik homeostaze kisika u stanicama, esencijalan za normalan embrionalni i postnatalni razvoj je transkripcijski čimbenik nazvan "hipoksijom induciran čimbenik 1" - HIF-1 (IYER i sur., 1998a).

Molekula HIF važna je u razvoju patofizioloških procesa npr. ishemije mozga i miokarda, bolesti koronarnih arterija i infarkta te nastanku i rastu tumora (IYER i sur., 1998b; SEMENZA, 2000b; MARTON, 2013; RATCLIFFE, 2013). Novorastuća i brzo rastuća tkivima podložna su relativnoj hipoksiji te također proizvode HIF (NOVIANTI i sur., 2019).

Otkriće i razumijevanje molekularnih mehanizama kojima sve stanice prepoznaju koncentraciju kisika i odgovaraju na hipoksiju dali su temelj za razvoj novih pristupa u liječenju anemija, infarkta, upalnih stanja, retinopatija, ali i liječenju malignih bolesti (IYER i sur., 1998b; RATCLIFFE, 2006).

Vodeći se izrazitim biološkim značajem kisika u fiziologiji i patofiziologiji živućih organizama, cilj ovog rada bio je na temelju pregleda recentnije znanstvene literature detaljnije opisati molekularne mehanizme kojima zdrave i "bolesne" stanice sisavaca odgovaraju na promjene u koncentraciji O<sub>2</sub>, odnosno na hipoksemiju i hipoksiju, opisati odnos između hipoksije i glavnih adaptacijskih odgovora koji poboljšavaju opskrbu kisikom – procesa eritropoeze i angiogeneze, sažeti relevantne spoznaje o ekspresiji gena reguliranoj kisikom te naglasiti značaj mehanizama odgovora u razvoju antitumorskih terapija uz neke primjere. GIACCIA i sur. (2004) navode da je HIF kompleks vjerojatno samo jedan od proteina u složenijoj regulaciji odgovora na hipoksiju, ali pošto se smatra najznačajnijim regulatorom homeostaze kisika, u ovom radu će se prije svega opisivati stanični odgovori na dugotrajniju hipoksiju koje potiču HIF-1, HIF-2 i regulacija aktivnosti HIF-a ovisna o kisiku. Također rad će se osvrnuti na ulogu HIF-a u progresiji malignih tumora i na pojedina sredstva koja mogu ili

imaju potencijala modulirati aktivnost HIF-1/2, hidroksilaza ili vezanih signalnih puteva i koristiti se u liječenju raka. Većina istraživanja u ovom području rađena je sa svrhom razumijevanja signalnih puteva u ljudskim stanicama i otkrivanja učinkovitih manipulacija tih puteva za potrebe liječenja ili sprečavanja određenih patologija u ljudskom organizmu. Stoga je većina dostupne literature, kao i terminologije za gene, enzime i sl. iz humane medicine, no često su znanstveni eksperimenti i pretkliničke studije za potencijalne humane lijekove rađene na životinjama, sisavcima, kao modelnim organizmima te su isti stanični mehanizmi i signalni putevi prisutni kako kod ljudi tako i drugih sisavaca, koji su kao skupina i najčešći pacijenti u veterinarskoj medicini. S razvojem veterinarske medicine i biomedicine općenito, može se očekivati porast u primjeni novih antitumorskih terapija u liječenju životinja i razvoj novih protokola liječenja i u veterinarskoj onkologiji, stoga ovom području molekularne medicine treba posvetiti veću pažnju.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Važnost kisika za organizme

Udio kisika u atmosferi mijenjao se kroz Zemljinu prošlost u rasponu od 0 do gotovo 30%, a danas na nultoj nadmorskoj visini iznosi 20.95%, odnosno 209,460 ppm (čineći parcijalni tlak od oko 21kPa) te je zadnjih dvadesetak godina u blagom opadanju (MARTIN i sur., 2017). Porast udjela kisika utjecao je na evoluciju multicelularnosti, biološke kompleksnosti, pojavu rastom većih organizama i gigantizma u pojedinim skupina i smatra se uzrokom tzv. "kambrijske eksplozije života" (THANNICKAL, 2009). Kroz geološku prošlost, razvijajući se u atmosferi s kisikom, većina života na Zemlji evoluirala je tako da mu je kisik postao esencijalan za preživljavanje, a s time je postala izuzetno važna i sposobnost brzog reagiranja na promjene u dostupnosti kisika. Za aerobne organizme (pogotovo složene Metazoa) kisik u obliku molekule O<sub>2</sub> nedvojbeno je jedan od najvažnijih elemenata na Zemlji (MARTIN i sur., 2017) jer ga koriste za oslobađanje energije u procesu "staničnog disanja", odnosno za stvaranje kemijske energije za rad stanica iz hranjivih makromolekula baziranih na ugljiku, koja je pohranjena u molekulama adenzin trifosfata (ATP-a). Ovo se većim dijelom događa u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima eukariota, u kojem kisik služi kao krajnji akceptor elektrona u nastanku ATP-a (THANNICKAL, 2009). Postoje iznimke od ovisnosti o kisiku kao npr. kod višestaničnog parazita *Heneguya salminicola* koji je zbog načina života sekundarno izgubio mitohondrijski genom s genima odgovornim za respiraciju, a ATP molekule vjerojatno uzima i direktno od domaćina (YAHALOMI i sur., 2020). Anaerobni proces glikolizu koji se zbiva u stanicama svih živih organizama pa i aerobnih, mnogi jednostanični organizmi koriste kao jedini put za stvaranje energije. No ona je daleko manje učinkovita od aerobnih metaboličkih puteva, kao što je oksidativna fosforilacija koja se nadovezuje na prethodni Krebsov ciklus, u kojima je zahvaljujući kisiku bolja iskoristivost hranjivih tvari te se oslobađa četverostruko više energije potrebne za druge stanične procese (STRYER, 1993).

Fiziološka uloga O<sub>2</sub> u Metazoa nije ograničena samo na mitohondrijsku respiraciju. Istraživanja su pokazala da je O<sub>2</sub> među najkorištenijim spojevima u mnogim metaboličkim i biosintetskim putevima, čak više od ATP-a i NAD<sup>+</sup> (RAYMOND i SEGRE, 2003; THANNICKAL, 2009). Osim u metabolizmu gdje je substrat za stvaranje energije i regulator staničnih procesa (WAGNER, 2008), kisik je direktno ili indirektno uključen u upalne procese kroz aktivaciju citokina (SHAY i SIMON, 2012), izvor je reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species - ROS) koji svojim kumulativnim i neselektivnim učincima doprinose

patologijama vezanim uz dob (degenerativnim bolestima), kroničnim i malignim bolestima, prijevremenom starenju stanica i organizma i smrti stanica (THANNICKAL, 2009). Kisik tako osim što je životno važan, ujedno i polagano ubija putem oksidacijskog stresa, a izloženost trenutno visokim koncentracijama kisika toksična je za većinu živih bića (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999a). Oksidacijski stres nastaje kad produkcija ROS-a nadilazi fiziološku antioksidativnu aktivnost kojom se stanice štite od štetnog učinka ROS-a. Oksidacija dovodi do oštećenja staničnih lipida, proteina, DNA i nastanka upale, a podložne su joj sve stanice (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999b). I višak kisika putem ROS-a i manjak kisika mogu indirektno sudjelovati u genskim regulacijama i staničnoj signalizaciji te tako utjecati na strukturu i funkciju tkiva (WAGNER, 2008). Pojedine studije upućuju na to da ROS imaju i pozitivne učinke u fiziološkim procesima te neki mehanizmi u koje su uključeni mogu biti korisni u ranijim fazama života, dok su u kasnijim štetni (npr. zaraštavanje rana i fibroza tkiva) (THANNICKAL, 2009).

Organizmi dugoročno ne pohranjuju kisik u tkivima te se nekako njime moraju konstantno opskrbljivati za potrebe staničnih procesa. Aerobni jednostanični organizmi to rade putem difuzije kroz staničnu membranu, no s porastom broja stanica i veličine organizma difuzija postaje nedostatan način opskrbe pa su kod većih i složenijih višestaničnih organizama prisutni specijalizirani organi i organski sustavi (krvožilni sustav, srce, pluća, škrge, koža, krv, uzdušnice kukaca) čija je svrha prijenos i/ili dostava kisika do najudaljenijih stanica koje nisu u doticaju s atmosferskim kisikom (THANNICKAL, 2009). U sisavaca kisik iz zraka difundira preko plućnih kapilara dišnog sustava u krv te se dalje krvožilnim sustavom prenosi do svih stanica i mitohondrija, u koje opet ulazi difuzijom zahvaljujući gradijentu parcijalnog tlaka kisika ( $pO_2$ ). Zbog mnogobrojnosti skupina i vrsta životinja, ovaj rad primarno će opisivati fiziologiju i patofiziologiju sisavaca, uključujući i čovjeka.

## **2.2. Mehanizmi prilagodbe organizma i stanica na hipoksiju**

Za koordinaciju sustava i usklađivanje stalnih, ali promjenjivih potreba različitih tkiva za kisikom s adekvatnom i konstantnom opskrbom, potrebni su snažni mehanizmi koji detektiraju poremećaje homeostaze kisika i pokreću sistemske, lokalne, tkivno specifične i stanične odgovore kojima je zajednički cilj uspostaviti te održati homeostazu i normoksiju u stanicama tkiva (RATCLIFFE, 2013). Fiziološki homeostatski odgovori na nedovoljnu oksigenaciju tkiva postižu svoju svrhu sistemskim povećanjem isporuke kisika (npr. povećanjem frekvencije disanja i rada srca, broja crvenih krvnih stanica i proliferacijom kapilara) ili ograničavanjem

potreba stanica za kisikom i potrošnje kisika (npr. citostazom, promjenom energetskeg metabolizma, isključivanjem neesencijalnih staničnih funkcija i reakcija) te poticanjem preživljavanja stanica u hipoksičnom okolišu (GUILLEMIN i KRASNOW, 1997; RATCLIFFE, 2013).

Smanjen dotok krvi i hipoksemija (manjak kisika u krvi) rezultiraju smanjenom dostavom kisika do tkiva i posljedično uzrokuju tkivnu hipoksiju koja može dovesti do oštećenja i smrti stanica ako adaptacijski mehanizmi s vremenom ne uspostave homeostazu (WAGNER, 2008). Hipoksemija može biti rezultat mnogih patofizioloških stanja koja smanjuju transport kisika (razne respiratorne i kardiovaskularne bolesti) ili pada  $pO_2$  u zraku kao npr. pri usponu na velike nadmorske visine. Organizam ima sposobnost prilagodbe na hipoksemiju te može jedno vrijeme kompenzirati manjak kisika, ali stupanj do kojeg može kompenzirati ovisi o razmjerima i trajanju manjka. Značajni i nagli pad  $pO_2$  koji dovodi do akutne hipoksije kopneni sisavci ne mogu tolerirati duže od par minuta te zbog cerebralne hipoksije dolazi do nesvjestice (MARTIN i sur., 2017), a anoksija duža od 2-4 minute dovodi do smrti stanica (TURETZ i CRYSTAL, 2007). Prve reakcije organizma na pad parcijalnog tlaka koji je glavni funkcionalni regulator homeostaze (WENGER, 2002), pogotovo nagli pad, su hiperventilacija i tahikardija kojima se nastoji povećati razina kisika u cirkulirajućoj krvi i poboljšati sveukupna tkivna oksigenacija. Ova gotovo trenutna (refleksna) fiziološka promjena nastaje kroz osjet kisika u kemoreceptorskim karotidnim i neuroepitelnim tjelešcima koja djeluju kao centralizirani senzori (SEMENZA, 2000a; SEMENZA i PRABHAKAR, 2018) i posljedične učinke na respiratorne i kardiovaskularne centre u mozgu. Navedene reakcije mogu kratkoročno kompenzirati hipoksiju. Kod postupnijeg razvoja hipoksije u tkivima, kakvu je moguće doživjeti npr. tijekom sporijeg uspinjanja do velike nadmorske visine, i njenom nešto duljem trajanju, pokreću se i drugi sustavi za čiju je aktivaciju potrebno više vremena (MARTIN i sur., 2017). Tako u zdravih organizama hipoksija potiče hematološke adaptacije, tj. pojačano lučenje hematopoetskog čimbenika rasta eritropoetina u bubrezima, zbog čega dolazi do povećane produkcije eritrocita i porasta njihovog broja u cirkulaciji. Time se povećava kapacitet nosivosti kisika u krvi tijekom više dana do tjedana. Zahvaljujući ovim adaptacijskim mehanizmima ljudi mogu i bez korištenja dodatnog kisika doći do vrha Mount Everesta na 8848m, gdje se atmosferski  $pO_2$  smanjuje na 7 kPa (WEST, 2000; MARTIN i sur., 2017). Hipoksična pulmonarna vazokonstrikcija pridonosi visinskom pulmonalnom edemu. Akutna hipoksija u perifernim tkivima može uzrokovati kompenzacijsku vazodilataciju kapilara s posljedičnim povećanjem protoka ovisno o metaboličkim zahtjevima (HALLIWILL, 2003; WAGNER,

2008). Hipoksija se osjeti na staničnoj razini pa u pozadini spomenutih adaptacija čitavih organskih sustava na ovaj fiziološki podražaj stoje stanične prilagodbe kroz regulaciju i promjenjenu ekspresiju specifičnih gena važnih za preživljavanje dugotrajnije hipoksije (IYER i sur., 1998b; MARTIN i sur., 2017). Zbog kroničnih bolesti ili življenja na višim nadmorskim visinama (na više od 2500m kod većine ljudi pada saturacija hemoglobina kisikom), organizam može proživjeti dio svog životnog vijeka u hipoksemiji što može ostaviti ozbiljnije posljedice. Istraživanja na ljudima pokazala su da dugoživotno izlaganje niskom atmosferskom  $pO_2$  ima štetne učinke koji mogu ograničiti dugovječnost, povećati morbiditet i smanjiti reprodukciju (MARTIN i sur., 2017). S povećanjem nadmorske visine i smanjenjem  $pO_2$ , npr. kronična planinska bolest (karakterizirana pretjeranom policitemijom s napredovanjem do plućne hipertenzije, zatajenja desnog ventrikula i smrti), preeklampsija, intrauterino zaostajanje u rastu i smanjenje porođajne težine postaju sve učestaliji, a već postojeće kronične respiratorne bolesti imaju ubrzaniji tijek. S druge strane, populacije koje stotinama generacija nastanjuju hipoksične planinske okoliše, čini se da imaju genetičke adaptacije koje su dovele do ekspresije fenotipa koji poboljšava sposobnost preživljavanja i reprodukcije pod kroničnim hipoksičnim stresom. Kod tih populacija je pojavnost i ozbiljnost spomenutih štetnih učinaka smanjena, recimo kod Tibetanaca ne dolazi do eritrocitoze i plućne hipertenzije. Također čini se da su prošle pozitivnu selekciju gena uključenih u HIF signalni put koji koordinira stanični i sistemski odgovor na hipoksiju (BEALL i sur., 2010; SEMENZA, 2011; MARTIN i sur., 2017). Perzistentno smanjen  $O_2$  tijekom razvoja i ranog postnatalnog života stimulira brojne karakteristične promjene kao povećanje volumena pluća i sposobnosti transporta  $O_2$  krvlju (WAGNER, 2008). I kod mnogih životinjskih vrsta stanovnika hipoksičnih okoliša ili morskih sisavaca koji prolaze kroz hipoksiju pri dubokim zaronima, evolucija i prirodna selekcija dovele su do razvoja morfoloških, fizioloških i biokemijskih prilagodbi koje omogućuju preživljavanje, kao npr. veća gustoća kapilara i ukupni volumen krvi, veći postotak eritrocita, puno veća koncentracija mioglobina u mišićima, veći broj mitohondrija u stanicama, veća koncentracija pojedinih enzima i dr. (LENFANT, 1973).

Sustavni odgovori na hipoksiju, procesi kao eritropoeza i angiogeneza, dobro su poznati više desetljeća. S godinama je postalo jasno da sve stanice Metazoa na neki način moraju prepoznati da je došlo do promjene u koncentraciji kisika koji dolazi kapilarama i aktivirati stanične mehanizme, ali do prije dvadesetak godina nije bio poznat kompletni molekularni mehanizam kojim zapravo to rade i kako se reguliraju adaptivne promjene u ekspresiji gena koje vode u funkcionalne odgovore (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). 1990-ih godina

istraživanja triju znanstvenika, Gregg L. Semenze, William G. Kaelina Jr. i Peter J. Ratcliffea dovela su do otkrića koja su povezana zajedno razriješila nepoznanice u razumijevanju mehanizama prilagođavanja stanica dostupnoj razini kisika, što im je osiguralo Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu za 2019. godinu (pregled najvažnijih otkrića u HURST, 2016). Prve studije regulacije ekspresije gena koji kodira za eritropoetin dovele su na kraju Semenzu do otkrića transkripcijskog čimbenika koji se vezao na pojačivačkom mjestu jedino nakon izlaganja stanica hipoksiji, zbog čega je nazvan "hipoksijom induciran čimbenik 1" (*engl.* Hypoxia Inducible Factor 1 - HIF-1) (SEMENZA i WANG, 1992; WENGER, 2002). Daljnim istraživanjem dokazao je da se ovaj čimbenik uz ranije poznatu komponentu neosjetljivu na kisik HIF-1 $\beta$  (ranije nazvanom ARNT) sastoji od još jedne komponente osjetljive na kisik (HIF-1 $\alpha$ ) (WANG i sur., 1995; WANG i SEMENZA, 1995). Ove dvije podjedinice u hipoksiji tvore HIF-1 kompleks, koji posreduje u aktivaciji transkripcije mnogih gena. Kaelin je istraživao von Hippel-Lindau (*VHL*) tumor supresor gen, a Ratcliffe dokazao povezanost *VHL* proteina i HIF-1 $\alpha$ , odnosno da *VHL* regulira posttranslacijsku razgradnju HIF-1 $\alpha$  podjedinice. Nadalje, Kaelin i Ratcliffe sa suradnicima su istovremeno dokazali kako ova regulacija HIF-1 $\alpha$  pomoću *VHL*-a direktno ovisi o biokemijskom procesu hidroksilacije HIF-1 $\alpha$ , što je proces ovisan o kisiku (pregledno u HURST, 2016). Ovo je potvrdilo da odgovor organizma na promjenu razine kisika izravno ovisi o dostupnom kisiku u stanici i da HIF regulira stanične reakcije ovisne o kisiku.

Kao modeli za istraživanje regulacije *EPO* gena pri kojima je otkriven HIF koristile su se Hep3B i HepG2 stanične linije (SEMENZA i WANG, 1992, WANG i sur., 1995), kasnije za istraživanje HIF-a pretežno stanice bubrega koje luče eritropoetin te se mislilo da je proizvodnja HIF-a i mehanizam osjećanja hipoksije ograničen samo na ove stanice. Suprotno očekivanom, HIF je dokazan u različitim staničnim linijama kultiviranim u hipoksičnim uvjetima i postalo je jasno da osim što aktivira proizvodnju eritropoetina, vjerojatno je izražen u svim stanicama sisavaca (MAXWELL i sur. 1993a; WANG i SEMENZA, 1993; WENGER, 2002). HIF sustav pokazao se jednim od evolucijski najstarijih i najsnažnijih staničnih regulatora te je prisutan kod gotovo svih skupina u carstvu životinja (IYER i sur., 1998b; MARTIN i sur. 2017), što ne čudi s obzirom na raširenost aerobnog disanja. HIF-1 je identificiran u svih analiziranih vrsta od *Caenorhabditis elegans* do *Homo sapiens* (SEMENZA, 2004). Prisutan je i u primitivnih životinjskih vrsta koje nemaju eritropoetin, crvene krvne stanice ili ikakav specijalizirani sustav za dostavu kisika do stanica (LOENARZ i sur., 2011; RATCLIFFE, 2013). Ovo dodatno upućuje na važnost sposobnosti brzog odgovora na hipoksiju (MARTIN i sur., 2017) i sugerira

da je pojava HIF-1 predstavljala prilagodbu koja je bila ključna za evoluciju Metazoa (SEMENZA, 2004).

Nakon otkrića transkripcijskog čimbenika HIF-1 daljnjim istraživanjima pokazalo se da je on najvažniji i glavni posrednik homeostaze kisika u stanicama i esencijalan za normalan embrionalni i postnatalni razvoj (IYER i sur., 1998a). Aktivnim HIF-om posredovani mnogi odgovori na hipoksiju uključuju poticanje ekspresije spektra različitih gena u hipoksičnim stanicama. Većinom su to geni uključeni u regulaciju dostave, potrošnje O<sub>2</sub>, važne fiziološke procese koji omogućuju preživljavanje stanica kao što su metabolizam glukoze, eritropoeza, angiogeneza, stanična proliferacija, promjene vaskularnog tonusa, npr. geni koji kodiraju za glikolitičke enzime, osnovni regulator produkcije eritrocita eritropoetin (EPO), najjače regulatore angiogeneze: osnovni čimbenik rasta fibroblasta (b-FGF) i čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF) i njihove receptore (GUILLEMIN i KRASNOW, 1997; SEMENZA, 2004; SEMENZA, 2011). Signal osjetljiv na kisik nastaje putem nekoliko hidroksilaza (dioksigenaza) koje kataliziraju posttranslacijsku hidroksilaciju specifičnih ostataka u HIF-u i glavni su senzori promjena koncentracije kisika, što je objavljeno tek 2001. i 2002. godine. Ove hidroksilacije potiču inaktivaciju i degradaciju HIF- $\alpha$ , ali su potisnute u hipoksiji, što dovodi do nakupljanja HIF-a i stvaranja aktivnog transkripcijskog kompleksa u hipoksičnim stanicama koji aktivira opsežnu transkripcijsku kaskadu povezanu i s drugim staničnim signalnim putevima (EPSTEIN i sur., 2001; LANDO i sur., 2002b; RATCLIFFE, 2013).

Brojna literatura navodi da HIF osim što je jedan od osnovnih regulatora mnogih fizioloških procesa u organizmu, ujedno je i komponenta patofizioloških procesa te govori o povezanosti HIF-a i poremetnje signalnog puta s nastankom npr. ishemije mozga i miokarda, bolesti koronarnih arterija i infarkta, preeklampsije u ljudi te da igra veliku ulogu u patofiziologiji malignih tumora te rastu tumora (IYER i sur., 1998b; SEMENZA, 2000b; RATCLIFFE, 2013; MARTON, 2013). Novorastuća i brzo rastuća tkivima kao ona u kompleksnom procesu regeneracije i tumorska tkiva, zbog velikih energetske potreba podložna su relativnoj hipoksiji te također produciraju HIF (NOVIANTI i sur., 2019) pa tako fiziološki adaptacijski mehanizmi koji spašavaju stanice od apoptoze zbog hipoksije, u tumorskim stanicama postaju kontraproduktivni. Solidni tumori dokazano često sadrže regije duboke hipoksije i upravo zbog aktivacije HIF kompleksa i ovisnosti rasta tumora o aktivnom mehanizmu angiogeneze preko VEGF-a, angiogeneza je povezana s lošom ili slabijom prognozom u liječenju mnogih malignih tumora, bez obzira na primijenjen način liječenja (RATCLIFFE, 2013). Otkriće i razumijevanje molekularnih mehanizama kojima sve stanice

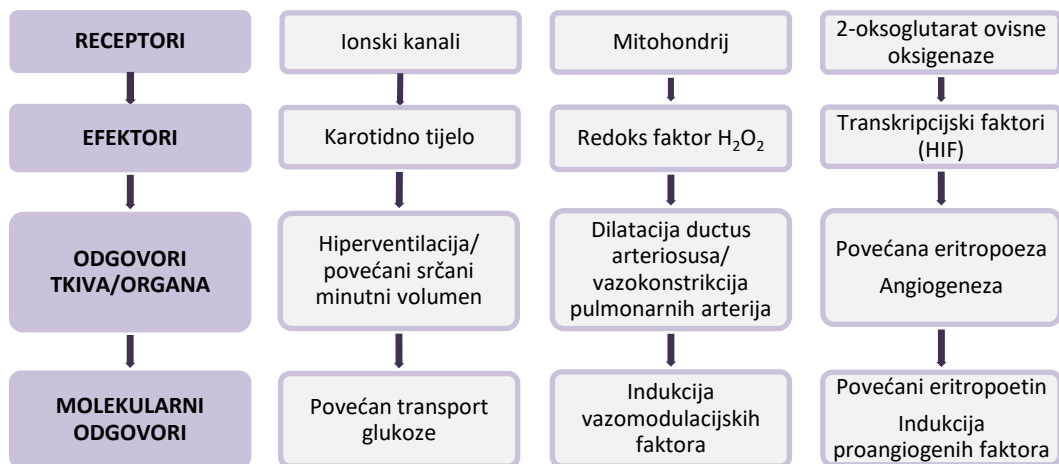


direktno "osjećaju" i odgovaraju na hipoksiju i koji regulira ekspresiju gena u životinja ujedno su dali temelj za razvoj novih pristupa u liječenju anemija, infarkta, upalnih stanja, retinopatija, poboljšanju cijeljenja rana i dr., ali i liječenju malignih bolesti (IYER i sur., 1998b; RATCLIFFE, 2006; BOTUSAN i sur., 2008). Omogućen je razvoj i poboljšanje ciljanih terapija, pametnih lijekova koje prepoznaju tumorske stanice, inhibiraju HIF, angiogenezu i rast tumora odnosno potiču apoptozu tumorskih stanica.

Stanice "osjećaju" i reagiraju na izvanstanične i unutarstanične podražaje kako bi održale homeostazu. Hipoksija za organizme predstavlja jedan od fundamentalnih fizioloških podražaja (WANG i SEMENZA, 1993) koji izaziva i brze odgovore na akutne promjene kisika kao i sporije i dugotrajnije odgovore na kronične promjene (Slika 1.) (SEМЕНZA, 2001). Svi glavni fiziološki sustavi sudjeluju u kompleksnim homeostatskim mehanizmima (SEМЕНZA, 2004). Unutarstanične koncentracije kisika održavaju se u uskom rasponu zbog rizika od oksidativnog oštećenja viškom kisika (hiperoksije) ili metaboličke smrti zbog nedovoljno kisika (hipoksije), stoga je izuzetno važno da organizam, odnosno stanice na neki način mogu osjetiti promjene ili u koncentraciji kisika ili njegovom parcijalnom tlaku (SEМЕНZA, 2001).

Ionski kanali osjetljivi na kisik posreduju brze stanične odgovore na akutnu hipoksemiju koji se, za razliku od odgovora reguliranih genskom ekspresijom, javljaju brzinom mjerenom sekundama, a jedan od najbolje poznatih primjera ovakvih odgovora kod sisavaca pokreću glomusne stanice karotidnoga i aortnoga tjelešca, arterijskih kemoreceptora čije su stanice specijalizirane za osjetljivost na kisik i koja aktivirana pokreću simpatički živčani sustav i disanje. Ionski kanali su uključeni u nekoliko kardiovaskularnih i respiratornih odgovora na niske razine kisika u fetalnom i adultnom životu i njihova disregulacija povezana je s patofiziologijom hipertenzije, srčanih aritmija i ishemijskih oštećenja neurona. Glomusne stanice karotidnih tjelešaca sadrže dopamin, električki su podražljive, mogu se depolarizirati u nekoliko milisekundi i imaju kisikom regulirane kalijeve ( $K^+$ ) kanale. Sa smanjenjem koncentracije  $O_2$ , linearno se smanjuje vjerojatnost otvaranja kalijevih kanala, što vodi u depolarizaciju membrane, otvaranje kalcijevih kanala i porast koncentracije kalcija u stanici. To inducira brze reakcije poput oslobađanja neurotransmitera (UREŃA i sur., 1994; TAYLOR i ZHULIN 1999; SEMENZA, 2011), posljedično se pojačano luče kateholamini koji povećavaju frekvenciju srca i raste krvni tlak arterijskom vazokonstrikcijom. Novija saznanja pokazuju da su u "osjećanje" promjena  $O_2$  u glomusnim stanicama uključeni ugljični monoksid i sumporovodik (SEМЕНZA i PRABHAKAR, 2018).

Dok odgovori na akutnu hipoksiju često podrazumijevaju promjene u aktivnosti već postojećih proteina, sporiji odgovori na kroničnu hipoksiju u principu uključuju promjene u genskoj ekspresiji i sintezu novih proteina te je potrebno najmanje nekoliko sati za vidljiv učinak (SEMENZA, 2000a; SEMENZA, 2001), iako se stanični odgovor pokreće gotovo trenutno te je HIF-1 zabilježen u stanici već nakon manje od dvije minute hipoksije (JEWELL i sur., 2001). Prema WANGU i sur. (1995) u Hep3B staničnoj kulturi izlaganoj 1% O<sub>2</sub>, razine *HIF-1α* i *HIF-1β* RNA dosegle su vrhunac nakon 1 do 2 sata kontinuirane hipoksije, nakon 8 sati su pale na gotovo bazalne vrijednosti te se sekundarno povećale nakon 16 sati, dok je ekspresija HIF-1α i β proteina bila najveća nakon 4-8 sati kontinuirane hipoksije. U stanicama izloženim 1% O<sub>2</sub> tijekom 4 sata pa 20% O<sub>2</sub>, koncentracije *HIF-1α* i β RNA su se smanjile ispod bazalne razine u roku od najmanje pet minuta.



**Slika 1.** Fiziološki adaptivni odgovori na hipoksiju (prema: GIACCIA i sur., 2004).

Dugo nije bilo poznato kako točno stanice "osjećaju" promjene kisika i koje se točno molekule ili strukture ponašaju kao senzori za kisik u tkivima. Mnogi znanstvenici su temeljem svojih istraživanja iznosili dokaze i sumnje da bi stanični senzori kisika ili prenosioci signala o hipoksiji u tkivima mogli biti hem proteini, ekstramitohondrijski citokromi (WANG i SEMENZA, 1993; JELKMAN i METZEN, 1996), zatim NAD(P)H oksidoreduktaze koje reduciraju ROS stvorene u tijelu, ionski kanali osjetljivi na kisik i transportni lanac elektrona (WENGER, 2000; SEMENZA 2001; GIACCIA i sur., 2004). Otkrića da se odgovori na hipoksiju mogu potaknuti kelatorima željeza i kobaltnim ionima dovela su do prijedloga da su senzori kisika feroproteini, ali ne hem-proteini (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004) te je najzad uz pomoć genetičkih metoda zaključeno da su molekule koje djeluju kao osnovni senzori

osjetljivi na promjene u koncentraciji kisika te pokretači daljnje kaskade staničnih signala i koje su prisutne u osnovi svih stanica, zapravo enzimi iz grupe prolil-hidroksilaza kojima je kisik nužan za aktivnost (EPSTEIN i sur., 2001; IVAN i sur., 2001).

### **2.3. Put prijenosa signala HIF-om**

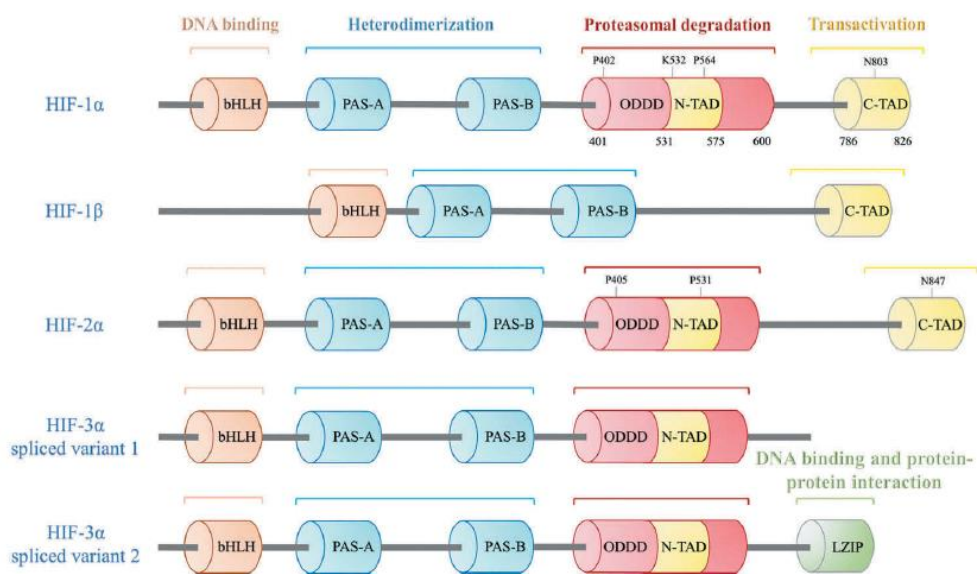
Odgovori stanica s ciljem adaptacije na nedostatak kisika mogu uključivati transkripcijske i posttranskripcijske mehanizme (GIACCIA i sur., 2004). Transkripcijski čimbenici su skupina proteina s domenom koja se može vezati za DNA, u regiji promotora ili pojačivača DNA (gena), prije ili tijekom sinteze RNA iz DNA. Prema CUMMINS i TAYLOR (2005) postoji preko 16 transkripcijskih čimbenika koji su do neke mjere osjetljivi na hipoksiju i aktiviraju se izravno ili neizravno u odgovoru na hipoksiju. HIF-1 kompleks, hipoksijom inducirani transkripcijski čimbenik-1, djeluje kao glavni regulator sistemskog, tkivno specifičnog odgovora i staničnog sveprisutnog transkripcijskog odgovora na hipoksiju (SEMENZA, 2004).

HIF kompleks je heterodimer koji se sastoji od dvije proteinske podjedinice iz potporodice bazičnih heliks-petlja-heliks proteina (bHLH – engl. basic helix-loop-helix) s Per-Arnt-Sim (PAS) domenama: HIF- $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  (WANG i sur., 1995; KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Većina proteina s PAS domenom su molekule transdukcije signala uključene u reakcije na okolišne podražaje kao što su svjetlost, koncentracija kisika, redoks potencijal i sl. i u mnogim slučajevima PAS služe za vezanje kofaktora, a i dimerizaciju  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice kod HIF-a, a HLH domena posreduje dimerizaciju i vezanje za DNA (TAYLOR i ZHULIN, 1999; SEMENZA 2000a; SEMENZA 2001). Podjedinice  $\alpha$  i  $\beta$  zapravo imaju nekoliko izoformi kodiranih na različitim genskim lokusima koje mogu biti uključene u stanični odgovor, a neke izoforme imaju i svoje podvarijante. U viših Metazoa u pravilu postoje tri HIF- $\alpha$  proteina (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  i 3 $\alpha$ ). Proteini HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  regulirani su na sličan način i imaju sličnu arhitekturu domena kojima se vežu za DNA i dimeriziraju, više se razlikuju u transaktivacijskim domenama, HIF-3 $\alpha$  podjedinica im je manje slična i slabije je poznata njezina uloga i regulacija, ali sve tri heterodimeriziraju s 1 $\beta$  (GU i sur., 1998; HU i sur., 2003; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Većina trenutnih spoznaja o strukturi i regulaciji HIF-a bazirano je na studijama HIF-1 $\alpha$  sisavaca, prvoj identificiranoj  $\alpha$  izoformi, i u manjoj mjeri HIF-2 $\alpha$  (ALBADARI i sur., 2019) pa se u literaturi uglavnom HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 kompleks spominju u objašnjenjima staničnog odgovora u koji su uključeni. HIF-1 $\alpha$  evolucijski je starija i prisutna u stanicama s jezgrom svih Metazoa (kao i 1 $\beta$ ), sveprisutna u različitim tipovima

stanica sisavaca, posebno srčanom i bubrežnom tkivu, dok su HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$  eksprimirane samo u određenim tipovima stanica i samo u kralježnjaka; HIF-2 $\alpha$  najviše je izražen u embrionalnom razvoju i vaskularnim endotelnim stanicama, plućima, srcu i placenti odraslih jediniki (WIENER i sur., 1996; EMA i sur., 1997; WIESENER i sur., 2002; GRAHAM i PRESNELL, 2017; SEMENZA i PRABHAKAR, 2018). Za HIF-2 $\alpha$  ranije su korišteni nazivi: EPAS1, HLF, HRF i MOP2, dok se nije pokazalo da se radi o istom proteinu (IYER i sur., 1998a). HIF-1 $\beta$  podjedinica koja odgovara ranije opisanom proteinu naziva aril hidrokarbon receptor nuklearni translokator - ARNT (*engl.* aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein) (WANG i sur., 1995; IYER i sur. 1998a), konstitutivno je prisutna u staničnoj jezgri (kontinuirano se sintetizira) te se pojavljuje kao podjedinica u nekoliko različitih transkripcijskih čimbenika, dok je HIF- $\alpha$  podjedinica posebno uključena u odgovor na hipoksiju, jedinstvena za HIF čimbenik, nalazi se u citoplazmi i razina joj je uvjetno regulirana, inducibilna hipoksijom WANG i sur., 1995; JIANG i sur., 1996; KALLIO i sur., 1997; IYER i sur., 1998a; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004). SEMENZA (2000a) spominje literaturu po kojoj ARNT2 i ARNT3 kao i 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  isto imaju ograničen uzorak ekspresije. Ekspresija HIF-1 $\alpha$  je u vrlo velikoj mjeri regulirana pO<sub>2</sub> u stanici, a količina podjedinice ulaskom u jezgru određuje razinu aktivnosti HIF-1 kompleksa (JIANG i sur., 1996; SEMENZA, 2000a). Sinteza  $\beta$  podjedinice nije regulirana hipoksijom (KALLIO i sur., 1997; WENGER, 2002).

U obje HIF podjedinice bHLH i PAS domene nalaze se prema amino (N)-terminalnom kraju, uz to HIF- $\alpha$  podjedinica na karboksilnom (C)-terminalnom kraju ima domenu degradacije ovisnu o kisiku (*engl.* oxygen-dependent degradation domain, ODDD) koja određuje stabilnost reguliranu kisikom i transkripcijsku aktivnost cijelog proteinskog kompleksa (JIANG i sur., 1997; PUGH i sur., 1997; HUANG i sur., 1998; TAYLOR i ZHULIN, 1999). HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  zapravo imaju 2 degradacijske domene ovisne o kisiku koje funkcioniraju zasebno i podložne su proteolitičkoj regulaciji: NODDD (*engl.* amino-terminal oxygen-dependent degradation domain) i CODDD (*engl.* carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain) smještene u središnjem dijelu molekule. Također sadrže dvije transaktivacijske domene na karboksi-terminalnom kraju, unutarnju aktivacijsku domenu NAD ili NTAD (*engl.* N-terminal transactivation domain) koja se preklapa s CODDD i karboksi-terminalnu aktivacijsku domenu CAD ili CTAD (*engl.* C-terminal transactivation domain) koje posreduju interakcije s koaktivatorima kao CBP (*engl.* CREB binding protein) i p300. Domena CTAD nije direktno uključena u proteolitičku regulaciju, ali se veže s cistein/histidin domenom transkripcijskog koaktivatora p300 (JIANG i sur., 1997; PUGH i sur., 1997; SCHOFIELD i

RATCLIFFE, 2004; KAELIN i RATCLIFFE, 2008; pregledno u ALBADARI i sur. 2019). Transaktivacijske domene su odvojene nizom aminokiselina koja je barem u ljudi poznata kao inhibitorna domena (ID) i ova negativna regulatorna domena potiskuje transkripcijsku aktivnost NTAD i CTAD u normoksičnim uvjetima. HIF-3 $\alpha$  podjedinici nedostaje CTAD transaktivacijska domena, a otkriveno je nekoliko varijanti same podjedinice koje se razlikuju u građi, npr. na mjestu CTAD imaju LZIP domenu (*engl.* leucine zipper) koja posreduje vezu sa DNA i protein-protein veze. (JIANG i sur., 1997; MAYNARD i sur., 2003; ALBADARI i sur., 2019) (Slika 2.).



**Slika 2.** Građa HIF podjedinica u humanim stanicama (ALBADARI i sur., 2019).

HIF-1 $\alpha$  protein se u prisutnosti kisika sintetizira kontinuirano, ali je nestabilan s vrlo kratkim vremenom poluraspada od približno 5-10 minuta i održava nisku razinu stanične ekspresije (HUANG i sur., 1996; SALCEDA i CARO, 1997), koja ovisi o stopama sinteze i razgradnje (SEMENZA, 2003). SEMENZA (2004) prema YU i sur. (1998) navodi da je poluživot HIF-1 $\alpha$  manji od jedne minute i naglašava da nijedan protein nema kraći poluživot od ovog. Zapravo, u normoksiji se  $\alpha$  podjedinica u stanicama obično ne može detektirati (WENGER, 2002). U staničnoj kulturi prvotno izloženoj hipoksiji, HIF-1 kompleks nakon 30 minuta normoksije više nije bio detektibilan (SALCEDA i CARO, 1997), dok je ekspresija *HIF1A* i *HIF1B* mRNA konstitutivna i u normoksiji i hipoksiji (KALLIO i sur., 1997). Sinteza  $\alpha$  podjedinice je regulirana mehanizmima neovisnim o O<sub>2</sub>, dok je razgradnja regulirana prvenstveno preko mehanizama ovisnih o O<sub>2</sub> (SEMENZA, 2003). Ekspresija HIF-1

eksponencijalno raste kako se smanjuje koncentracija kisika (JIANG i sur., 1996). Proteolitička stabilnost HIF- $\alpha$  i njezina transkripcijska aktivnost regulirane su različitim mehanizmima kojima je zajednička hidroksilacija određenih aminokiselinskih ostataka ovisna o kisiku (RATCLIFFE, 2006).

### **2.3.1. HIF hidroksilaze kao stanični senzori kisika i ekspresija HIF- $\alpha$ u normoksiji**

U prisutnosti kisika (u normoksičnim uvjetima), HIF kompleks je inaktiviran posttranslacijskom hidroksilacijom specifičnih aminokiselinskih ostataka (2 prolinska ostatka u humanim stanicama) (RATCLIFFE, 2007) i asparaginskog ostatka unutar  $\alpha$  podjedinice. Hidroksilacija je katalizirana specifičnim enzimima prolil-4-hidroksilazama (HIF-PH ili PHD - *engl.* prolyl hydroxylase domain) (JAAKKOLA i sur., 2001). HIF hidroksilaze, tri HIF prolil-hidroksilaze identificirane u stanicama sisavaca i HIF asparaginil-hidroksilaza, enzimi su iz skupine non-hem Fe<sup>2+</sup>-ovisnih i 2-oksoglutarat-ovisnih dioksigenaza čija je aktivnost apsolutno ovisna o kisiku, aktiviraju se samo u prisutnosti molekularnog kisika (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; SEMENZA, 2004; RATCLIFFE, 2013). Zahtjevaju kisik i 2-oksoglutarat kao kosubstrate i sadrže željezo kao kofaktor (JAAKKOLA i sur., 2001), te druge kofaktore potrebne za potpunu katalitičku aktivnost kao npr. askorbat (KIVIRIKKO i MYLLYHARJU, 1998; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; RATCLIFFE, 2006). Dioksigenaze cijepaju molekularni kisik i pomoću iona non-hem željeza kataliziraju ugradnju oba atoma kisika u njihove reakcijske produkte (RATCLIFFE, 2013). Jedan atom kisika koristi se u oksidativnoj dekarboksilaciji 2-oksoglutarata u sukcinat i CO<sub>2</sub>, a drugi atom PHD prenose na prolinske ostatke u  $\alpha$  podjedinici te se modifikacijom ovog koraka može regulirati stabilnost podjedinice (pregledno u Wenger, 2002; LANDO i sur., 2002a). PHD(1-3) imaju visoku Michaelis-Menten konstantu ( $K_m$ ) za O<sub>2</sub>, iznad fiziološkog raspona koncentracije u tkivu, tako da O<sub>2</sub> ograničava brzinu enzimatske aktivnosti i brzinu razgradnje i inaktivacije HIF- $\alpha$  (pregledno u MANALO i sur., 2005; RATCLIFFE, 2006;). MAHON i sur. (2001) otkrili su čimbenik inhibicije HIF-1 (FIH-1, *engl.* factor inhibiting HIF). Kasnije je bioinformatičkim analizama ustanovljeno da FIH odgovara HIF asparaginil-hidroksilazi (LANDO i sur. 2002b; RATCLIFFE, 2013). To je transkripcijski represor koji međudjeluje sa HIF-1 $\alpha$  i pVHL, regrutira histon deacetilaze direktno ili putem pVHL-a i dakle hidroksilacijom blokira u normoksiji vezanje transkripcijskih koaktivatora, histon acetilaza CBP i p300 s HIF-om (KALLIO i sur., 1998; LEE i sur., 2019). FIH-1 hidroksilira asparaginski ostatak unutar 1 $\alpha$  i 2 $\alpha$  CTAD (LANDO i sur., 2002a; KAELIN i RATCLIFFE, 2008) i regulira aktivnost HIF-a ovisnu o kisiku, a neovisno o bilo kojoj

promjeni u stabilnosti proteina (LANDO i sur., 2000a; RATCLIFFE, 2013). Hidroksilacija na asparaginskom ostatku predstavlja jedan od dva kisikom regulirana mehanizma kojim su HIF- $\alpha$  molekule, koje izbjegnu prolil-hidroksilaciju i posljedičnu degradaciju, spriječene u aktiviranju transkripcije pomoću koaktivatora (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; RATCLIFFE, 2006). Stoga HIF- $\alpha$  ima dualni proces regulacije koji utječu na stabilnost i transkripcijsku aktivnost neovisno o stabilnosti (PUGH i sur., 1997; RATCLIFFE i sur., 2013).

Izravno korištenje i apsolutna potreba za molekularnim kisikom kao kosubstratom u spomenutim prolil-hidroksilazama i FIH-1 čini ih osjetljivim na promjene kisika, podupirući teoriju o ulozi ovih enzima kao unutarstaničnih senzora kisika (RATCLIFFE, 2013) te se upravo zbog tih biokemijskih svojstava i smatraju sensorima kisika. PHD i FIH-1 reagiraju i na druge unutarstanične signale, uključujući ROS, dušikov oksid (NO) i određene metabolite koji mogu modulirati odgovor na hipoksiju te modificiraju i aktivnosti drugih puteva i procesa (KAELIN i RATCLIFFE, 2008).

U normoksičnim stanicama, kisik se labavo veže za željezo u PHD, PHD prenose kisik na HIF- $\alpha$  prolinske ostatke unutar obje regulatorne domene (NODDD i CODDD) čime se mijenja konformacija podjedinice i tako hidroksiliranu HIF- $\alpha$  podjedinicu prepoznaje substrat-vežuća  $\beta$  domena von Hippel-Lindau tumor supresor proteina (pVHL) (MIN i sur., 2002; RATCLIFFE, 2013) koji je sastavni dio višekomponentnog kompleksa, pVHL-E3-ubikvitin-protein ligaze. pVHL posreduje konstituiranje funkcionalnog kompleksa koji čine pVHL, Elongin B, Elongin C, CUL2 (*engl.* Cullin2 scaffold protein) i RBX1 (*engl.* RING-box 1 protein) koji veže komponentu E2 konjugiranu s ubikvitinom. Protein p53 sposoban je regrutirati E3 ubikvitin-protein ligazu, Mdm2, što pomaže proteasomskoj razgradnji HIF-1 $\alpha$ . Vežanjem pVHL za hidroksiliranu HIF- $\alpha$  dolazi dakle do aktivacije ubikvitin-proteasomskog puta, katalize reakcija, poliubikvitinacije HIF-1/2 $\alpha$  podjedinice, odnosno vezanja molekula ubikvitina za nju, što dalje inducira brzu proteolitičku inaktivaciju, destabilizaciju i ireverzibilnu degradaciju  $\alpha$  podjedinice putem 26S proteasoma (SALCEDA i CARO, 1997; MAXWELL i sur., 1999; RAVI i sur., 2000; IVAN i sur., 2001; JAAKKOLA i sur., 2001; MASSON i sur., 2001; KAELIN i RATCLIFFE, 2008; ALBADARI i sur., 2019) (Slika 3.). Katalitički aktivan proteasom je veliki proteinski kompleks prisutan u svim eukariotima, uključujući i kvasce, te u nekim prokariotima. Njegova osnovna funkcija je razgradnja stanici nepotrebnih i/ili oštećenih proteina, čime je uključen u procese regulacije metabolizma, kontrolu sinteze proteina i staničnog ciklusa, kao i imunosni odgovor (MIHALINA, 2017).

Specifičnim vezanjem pVHL-a za hidroksiprolil-ostatke HIF- $\alpha$  više od tisuću puta se povećava afinitet HIF- $\alpha$  za pVHL nakon hidroksilacije (LOENARZ i sur., 2009; RATCLIFFE, 2013).

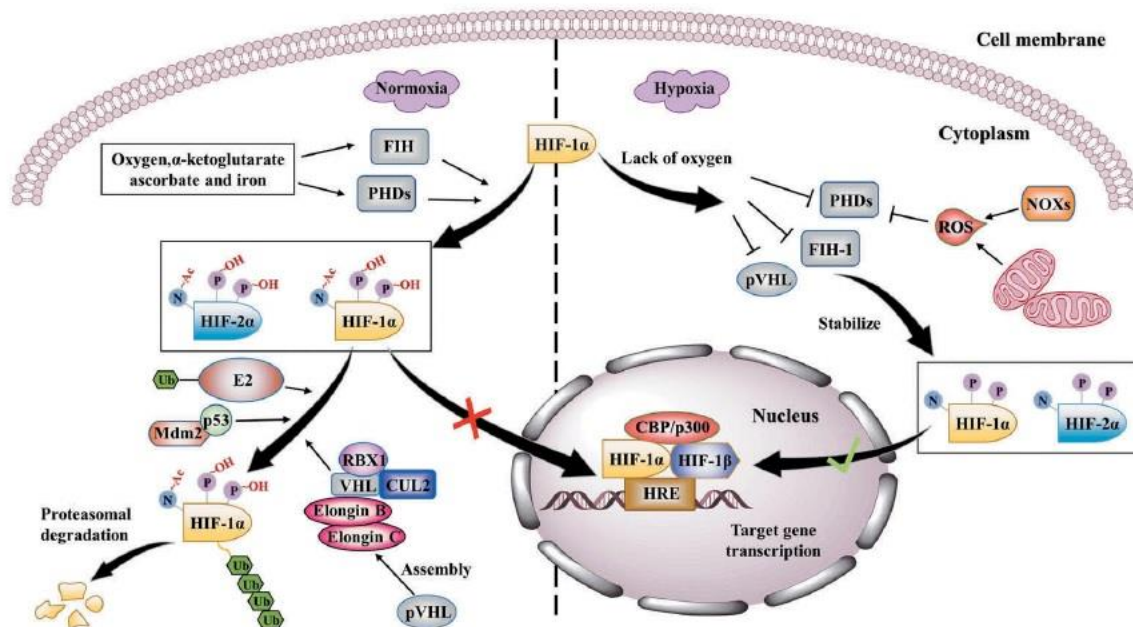
Dok 2-oksoglutarat oksigenaze prevladavaju i u eukariotskih i prokariotskih vrsta te u mnogih primitivnih organizma postoje sustavi regulacije gena kisikom (čak i s ovim oksigenazama), PHD/pVHL/HIF sustav čini se da je specifičan za carstvo životinja te sveprisutan unutar carstva (LOENARZ i SCHOFIELD, 2008; LOENARZ i sur., 2011; RATCLIFFE, 2013). Genomi viših Metazoa sadrže 3 paralogna PHD gena (*PHD1*, *PHD2*, *PHD3* ili ponegdje u literaturi *Egln2*, *Egln1*, *Egln3*) i čini se da su sva tri proteina izražena u svim tkivima, ali u različitom stupnju (BERRA i sur., 2003). ALBADARI i sur. (2019) spominju četiri hidroksilaze, PHD1-4. Razina *PHD3* mRNA visoka je npr. u srcu, dok su razine *PHD1* mRNA povećane u testesima. Vrijednosti *PHD2* i *PHD3* mRNA povećane su hipoksijom i barem u nekim tipovima stanicama reagiraju na čimbenike rasta. PHD1 je isključivo u jezgri, PHD2 većinom u citoplazmi, a PHD3 se može naći u oba odjeljka (pregledno u KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Iako sva tri pripadajuća enzima pridonose regulaciji HIF-a, u većini humanih stanica PHD2 se nalazi u najvećim količinama i time ima dominantnu ulogu u prepoznavanju promjena koncentracije kisika. U većine kralježnjaka nalazimo više PHD i HIF- $\alpha$  izoformi od kojih su najviše sveprisutni PHD2 i HIF-1 $\alpha$  (LOENARZ i sur., 2011; RATCLIFFE, 2013). Prema KAELINU (2017) PHD2 je aktivna većinu vremena, dok su PHD1 i 3 neka vrsta rezerve i čini se da imaju i neke druge funkcije nepovezane s HIF-om. Inaktivacija PHD2 u miševa, kao i inaktivacija pVHL ili HIF kompleksa, ozbiljno remeti regulaciju normalnog embrionalnog razvoja i rezultira embrionalnom smrtnošću, dok su PHD1 $^{-/-}$  i PHD3 $^{-/-}$  miševi sposobni za život (TAKEDA i sur., 2006). U staničnim linijama, inaktivacija samo PHD2 (ne i PHD1 i 3) u oksigeniranim stanicama pojačava regulaciju razine HIF-1 $\alpha$  proteina i ekspresije HIF-ciljanih gena pa je zaključeno da te izoforme imaju različite funkcije te da je PHD2 najvažniji enzim u regulaciji razina 1 $\alpha$  u normoksiji (BERRA i sur., 2003; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004).

### **2.3.2. Pokretanje staničnih odgovora u hipoksiji**

U hipoksičnim uvjetima u stanici dolazi do inhibicije PHD-a pa izostaje hidroksilacija  $\alpha$  podjedinice, pVHL ne prepoznaje HIF- $\alpha$ , ne dolazi do proteolize nego stabilizacije 1/2 $\alpha$  podjedinice te posljedičnog rasta njihovih unutarstaničnih koncentracija. Podjedinice se translociraju u jezgru stanice zahvaljujući NLS-u (*engl.* nuclear localization signal) i vežu s HIF-1 $\beta$  podjedinicom tvoreći HIF-1 ili HIF-2 kompleks (IYER i sur., 1998a; KALLIO i sur.,



1998). Komplex HIF-2 sastoji se od HIF-1 $\beta$  i HIF-2 $\alpha$  (JELKMANN, 2013). Fosforilacija je odgovorna za vezanje  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice (TAYLOR i ZHULIN, 1999). U hipoksiji  $\alpha$  podjedinica uspije vezati koaktivatore potrebne za aktiviranje transkripcije gena (RATCLIFFE, 2006). Kompleksi u jezgri djeluju kao transkripcijski čimbenici - vežu se na promotore gena ili pojačivačkim mjestima, odnosno vežu DNA na specifičnim mjestima nazvanim elementi odgovora na hipoksiju (*engl.* HRE - hypoxia response element) za njihovu veznu konsenzus sekvencu 5'-RCGTG-3' (R=A ili G), a te HRE regije su locirane u ili blizu nekog ciljanog gena (SEMENZA i sur., 1996; WENGER, 2002; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; KAELIN i RATCLIFFE, 2008; LEE i sur., 2019). Vezanje HIF- $\alpha$  vodi u uključivanje koaktivatora CBP/p300, SRC-1 i drugih (KALLIO i sur., 1998; LUO i sur., 2011; LUO i sur., 2012; pregledno u ALBADARI i sur., 2019). Nakon što se vežu i koaktivatori, cjeloviti kompleks pokreće ili pojačava transkripciju ciljanih gena pomoću RNA polimeraze II, sintezu mRNA i sintezu proteina kodiranih ciljanim genima, koji dalje posreduju fiziološke odgovore na hipoksiju (SEMENZA, 2011) (Slika 3.). Ako stanicama nedostaje funkcionalan pVHL kao npr. kod pacijenata s VHL sindromom i mutiranim *VHL* genom, doći će do disregulacije i događat će se procesi kao što se događaju u hipoksiji (WYKOFF i sur., 2000; RATCLIFFE, 2013).



**Slika 3.** Aktivnost HIF- $\alpha$  u hipoksičnim i normoksičnim uvjetima u stanici. Objašnjenje u tekstu. N – asparagin, P – prolin, Ub – ubikvitin, OH – hidroksilna skupina (ALBADARI i sur., 2019)

### 2.3.3. Regulacija aktivnosti HIF-hidroksilaza i HIF kompleksa

Biološka aktivnost HIF-1 određena je ekspresijom i aktivnošću  $1\alpha$  podjedinice čija se regulacija *in vivo* događa na više razina (SEMENZA, 2000a). Sama stabilizacija  $\alpha$  podjedinice blokiranjem ubikvitinacije i proteasomske razgradnje nije dovoljna za transkripcijski aktivan HIF u normoksičnim uvjetima, za koji je npr. potrebno i vezanje CBP/p300, što je blokirano modifikacijom asparaginskih ostataka hidroksilacijom (LANDO i sur., 2002a; WENGER, 2002). Potpuna HIF-1/2 aktivacijska kaskada ovisna je o seriji međusobno povezanih događaja, što uključuje regulaciju ekspresije mRNA i proteinske podjedinice, posttranslacijsku fosforilaciju bjelančevina, nuklearnu translokaciju HIF- $\alpha$ , heterodimerizaciju s  $\beta$  podjedinicom, vezanje HRE-DNA, uključivanje općih i tkivno specifičnih transkripcijskih kofaktora i povećanu transaktivaciju ciljanog gena posredovanu s CTAD i NTAD HIF- $\alpha$ . Svaki korak može biti pod kontrolom koncentracije kisika, drugih okolišnih parametara, čimbenika rasta, hormona, hranjivih tvari itd. Interakcije s drugim signalnim putevima omogućavaju precizno podešavanje generalnog hipoksičnog odgovora na odgovore specifične za tip stanice ili čak za ciljani gen (SEMENZA, 2000a; WENGER, 2002; ALBADARI i sur., 2019). Precizni mehanizmi regulacije translokacije HIF- $\alpha$  između jezgre i citoplazme nisu u potpunosti poznati. U prisutnosti kisika se podjedinica vjerojatno aktivno uklanja iz jezgre (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004).

Uz proteolitičku regulaciju ovisnu o kisiku i hidroksilaciji kao glavnom mehanizmu regulacije HIF-1/2- $\alpha$  u normoksiji i hipoksiji, postoje i drugi, o kisiku neovisni mehanizmi regulacije sinteze, stabilnosti ovih proteina i transkripcijske aktivnosti u normoksiji i hipoksiji. ALBADARI i sur. (2019) detaljnije opisuju povezanost tih nekih mehanizama: posttranslacijske acetilacije i deacetilacije i regulacije stabilnosti i transkripcijske aktivnosti, fosforilacije, PI3K/AKT i MAPK/ERK puteva, HSP90, HAF(SART1) i HSP70 sa spomenutim procesima. Oko nekih spoznaja i dalje nema konsenzusa. U normoksiji se ekspresija i razina HIF- $1\alpha$  može povisiti npr. onkogenom mutacijom koja aktivira PI3K i MAPK puteve ili vezanjem liganda. Također stimulacijom čimbenicima rasta, a to povećanje razlikuje se od onog izazvanog hipoksijom jer se inducira ekspresija ovisna specifično za tip stanice. Dok se hipoksijom smanjuje ili zaustavlja degradacija  $1\alpha$  i tako raste razina podjedinice u stanici, čimbenici rasta, citokini i druge signalne molekule stimuliraju sintezu  $1\alpha$  putem aktivacije proteina tirozin kinaze (PTK) i receptora tirozin kinaze i nadalje signalnih puteva (LAUGHNER i sur., 2001; FUKUDA i sur., 2002; SEMENZA, 2003; ALBADARI i sur., 2019). Proteini IGF-1, IGF-2, epidermalni čimbenik rasta (EGF) i čimbenik rasta fibroblasta 2

(FGF-2), kao i autokrini aktivacija IGF-1 i IGF-2 receptora, induciraju ekspresiju HIF-1 $\alpha$  i sintezu proteina putem aktivacije i PI3K/AKT/mTOR puta (fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B/ciljno mjesto rapamicina) i puta mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK/ERK). Također, zabilježeno je da IGF-1 (inzulinu sličan čimbenik rasta-1) inducira transkripciju HIF-2 $\alpha$  putem PI3K-mTORC2 sustava i promiče vaskularizaciju u neuroblastomu (FUKUDA i sur., 2002; pregledno u ALBADARI i sur., 2019). WENGER (2002) navodi literaturu prema kojoj u modelnim staničnim kulturama inzulin, IGF-1 i 2, EGF, FGF-2, interleukin 1 $\beta$ , čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), angiotensin II, trombin, transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ 1, čimbenik rasta porijeklom iz trombocita, čimbenik rasta hepatocita, mogu stabilizirati HIF-1 $\alpha$  u normoksiji. Citokini IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  stimuliraju vezanje HIF-1 za DNA (HELLWIG-BÜRCEL i sur., 1999). Aktivacijom ERK1 i ERK2 pa nadalje MNK1 i MNK2, eIF-4E pojačava se translacija HIF-1 $\alpha$  (pregledno u ALBADARI i sur., 2019). Signalna kaskada RAS/RAF/MEK/ERK(MAPK) esencijalna je za međustaničnu i unutarstaničnu komunikaciju, koja regulira fundamentalne stanične funkcije kao što su rast, preživljavanje i diferencijacija, a ujedno je i dominantni signalni put malignih tumora. Put MAPK također integrira signale iz složenih unutarstaničnih mreža u obavljanju staničnih funkcija (DEGIRMENCI i sur., 2020). U tumorskim stanicama česta je i aktivacija PI3K/mTOR (SORMENDI i WIELOCKX, 2018). Ras aktivacija povećava unutarstaničnu proizvodnju ROS-a i posljedično inhibira hidroksilaciju HIF-1 $\alpha$  (GERALD i sur., 2004; KAELIN i RATCLIFFE, 2008).

U hipoksiji pVHL, PHD i FIH aktivnosti su inhibirane ograničenim kisikom, ali i mehanizmima proizvodnje ROS-a u mitohondrijima preko transporta elektrona kompleksa III i sustava NOX enzima (NADPH oksidaza) što dovodi do stabilizacije HIF-1/2 $\alpha$ . Enzim NOX1 posreduje nastajanje ROS-a što djeluje kao mehanizam za pojačanu ekspresiju HIF-1 $\alpha$ , NOX1 i NOX4 na isti način pomažu u održavanju ekspresije HIF-2 $\alpha$  u karcinomu bubrega i pridonose karcinogenezi. Indukcija HIF-1 povećanim mitohondrijskim stvaranjem ROS-a u hipoksičnim stanicama zauzvrat aktivira transkripciju gena za PDK1 i LDHA koje indirektno pridonose smanjenju proizvodnja ROS-a. Ovo je regulatorni mehanizam za sprječavanje prekomjerne proizvodnje ROS-a (pregledno u ALBADARI i sur., 2019).

RATCLIFFE (2006) je pobrojao aktualne i potencijalne regulatorne čimbenike HIF hidroksilaza: dostupnost kisika, stanična razina hidroksilaza, redoks status staničnog željeza, inaktivacija hidroksilaza s ROS-om, inhibicija dušikovim oksidom (NO), dostupnost staničnog željeza, askorbata i 2-oksoglutarata, endogeni metabolički inhibitori, fumarat, sukcinat. Pojedina istraživanja snažno ukazuju da aktivnost HIF-hidroksilaza koja se odnosi na

prepoznavanje promjena kisika može biti modulirana i inhibirana redoks-signalima, barem u patofiziološkim uvjetima, i da su hipoksija i oksidativni stres zasebni regulatorni ulazni signali za puteve HIF hidroksilaza. Ono što je manje jasno je kako se to odnosi na fiziološku signalizaciju hipoksije (RATCLIFFE, 2013). SALCEDA i CARO (1997) spominju inhibitorni efekt vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) na formaciju HIF-1 i gensku ekspresiju i da su redoks-promjene vjerojatno uključene u prepoznavanje promjena kisika i/ili prijenos signala. U literaturi postoje podaci da hipoksija reducira produkciju ROS-a (HOFFMAN i sur., 2007), ali i mnogi dokazi da i visoka i niska razina  $O_2$ , odnosno inhibicija transporta elektrona u hipoksiji vodi u povećanu proizvodnju ROS-a na temelju kojih autori predlažu da je to, više nego nedostatak samog molekularnog kisika, odgovorno za smanjenje aktivnosti HIF-hidroksilaze koja signalizira hipoksiju (CHANDEL i sur., 1998; WAGNER, 2008; RATCLIFFE, 2013). Utvrđeno je da je asparagininil-hidroksilacija snažno inhibirana kada su stanice izložene čak vrlo niskim koncentracijama  $H_2O_2$  oponašajući oksidativni stres, što je imalo gotovo nikakav utjecaj na HIF prolil-hidroksilaciju te da je prolil-hidroksilacija osjetljivija na hipoksiju od asparagininil-hidroksilacije. Nadalje, reoksigencija hipoksičnih stanica potiče trenutnu hidroksilaciju i razgradnju HIF-a, dok je oporavak od inaktivacije oksidansima, barem za FIH hidroksilazu odgođen (TIAN i sur., 2011; RATCLIFFE, 2013). PHD2 i FIH imaju neke strukturne razlike. Je li ova različita osjetljivost na  $H_2O_2$  neobična osjetljivost FIH-a ili neobična rezistencija PHD2 (što ih razlikuje od ostalih dioksigenaza) nije još potpuno jasno (RATCLIFFE, 2013). Enzimi PHD2 i PHD3 su u hipoksiji inducibilni transkripcijskom aktivacijom samog HIF-a. Visoke aktivnosti enzima povećat će stopu HIF-hidroksilacije pri bilo kojem tlaku kisika (RATCLIFFE, 2006). Egzogeni izvori ROS-a inhibiraju HIF hidroksilaze i *in vitro* i u stanicama. HIF hidroksilaze su u različitom stupnju osjetljive na oštećenja oksidansima (slobodnim radikalima i ROS iz normalnih i abnormalnih metabolički procesa) koji djeluju na njih u normoksiji i mogu smanjiti brzinu hidroksilacije (PAN i sur., 2007; RATCLIFFE, 2013). Dodatak željeza i askorbata u staničnoj kulturi smanjuje razine HIF- $\alpha$  koje se primjećuju u oksigeniranim uvjetima (KUIPER i sur., 2010; RATCLIFFE, 2013), što implicira da dostupnost ovih kofaktora može biti ograničavajuća za punu aktivnost enzima čak i u prisutnosti kisika. Dokazano u kulturi stanica, aktivnost HIF hidroksilaza može biti inhibirana s dušikovim oksidom (NO se natječe s  $O_2$  za vezanje na željezo na aktivnom mjestu) ili inaktivacijom katalitičkog željeznog centra kisikovim radikalima, što potencijalno povezuje put s drugim signalnim sustavima. Koliko su i u kojim okolnostima razine 2-oksoglutarata i drugih metabolita ograničavajuće za aktivnost HIF hidroksilaza još se ispituje (RATCLIFFE, 2006; RATCLIFFE, 2013).

Prema nekim autorima NO je stabilizator HIF-1 $\alpha$  u normoksiji vjerojatno inhibirajući PHD funkciju (KIMURA i sur., 2000; pregledno u KAELIN i RATCLIFFE, 2008), dok prema drugima tretman s NO (i CO) ili ektopična ekspresija iNOS prekida HIF-1 aktivnost. WENGER (2002) ove proturječnosti objašnjava nalazom da su vjerojatno učinci NO prolazni jer početni tretman s NO povećava, ali produženi smanjuje ekspresiju HIF-1 $\alpha$  proteina i hipoksični eritropoetin. Enzim iNOS (tip 2) je sam po sebi ciljan HIF-om i moguće da djeluje pozitivnom povratnom spregom. Paradoksalno, NO zatupljuje indukciju HIF-a u hipoksiji, moguće smanjenjem potrošnje mitohondrijskog kisika i time povećanjem unutarstanične dostupnosti kisika (HAGEN i sur., 2003). Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi inhibiraju proteasomalnu razgradnju HIF-1 $\alpha$ , a u tumorskom mikrokolišu stoga mogu inducirati HIF-1 $\alpha$  (pregledno u SEMENZA, 2010b). Osim kontrolom HIF-hidroksilaza, integrirana funkcija PHD/pVHL/HIF sustava može biti podešena s više povratnih kontrola koje privremeno smanjuju aktivnost puta nakon nekog perioda aktivacije HIF-a. U to su uključeni *antisense*-HIF-1 $\alpha$  koja smanjuje regulaciju HIF-1 $\alpha$  kodirajuće mRNA, inhibitorni PAS protein (IPAS) - varijanta HIF-3 $\alpha$  koja djeluje antagonistički na HIF tako što formira inaktivne komplekse s drugim HIF- $\alpha$  proteinima i RBX2, komponenta pVHL ubikvitin E3 ligaze koja ubrzava razgradnju HIF- $\alpha$  (MAKINO i sur., 2001; UCHIDA i sur., 2004; pregled pozitivne i negativne regulacije u BARDOS i ASHROFT, 2005; pregledno u RATCLIFFE, 2013).

HSP90 (*engl.* heat shock protein) natječe se s receptorom aktivirane protein kinaze C1 (RACK1) za vezanje na PAS domenu HIF-1 $\alpha$  i pridonosi stabilizaciji HIF-1 $\alpha$ , pretežno u normoksiji. Interakcija između HIF-1 $\alpha$  i RACK1 destabilizira HIF-1 $\alpha$  proteosomalnom razgradnjom na način neovisan o kisiku. Prema literaturi čini se da HSP70 ima suprotnu ulogu od HSP90 u regulaciji HIF-1 $\alpha$ , uključen je u degradaciju u prolongiranoj hipoksiji (ne i HIF-2 $\alpha$ ). Dok akutna izloženost hipoksiji rezultira povećanom akumulacijom HIF-1 $\alpha$ , prolongirana hipoksija može inducirati selektivnu kisik-neovisnu degradaciju i smanjenje akumulacije HIF-1 $\alpha$ , ali ne i razine HIF-2 $\alpha$  proteina u staničnoj kulturi, nego povećanje HIF-2 $\alpha$  transaktivacije, što regulira HAF (*engl.* hypoxia-associated factor, poznat i kao SART1). Ovako HAF može biti posrednik u prebacivanju hipoksičnog odgovora malignih stanica s HIF-1 $\alpha$ -ovisnog na HIF-2 $\alpha$ -ovisni i daje pojašnjenje za pojačanu progresiju tumora pod dugotrajnom hipoksijom (pregledno u ALBADARI i sur., 2019).

Optimalna hipoksijom-inducirana transkripcija mnogih gena osim vezanja HIF kompleksa za DNA zahtijeva interakciju HIF-1/2 sa susjednim ili ponekad udaljenim transkripcijskim čimbenicima i koaktivacijskim proteinima kako bi nastali multiproteinski

kompleksi. Mjesta na koja se vežu za gen različita su u svakom genu reguliranom kisikom i svakom staničnom tipu. To pridonosi određenom stupnju selektivnosti tkiva i jedinstvenoj regulaciji tog gena s obzirom na njegovu razinu indukcije hipoksijom. Također igraju ulogu u specifičnosti HIF-1/2 ciljnog gena budući da mnogi poznati koaktivatori HIF-a pokazuju specifičnu fizičku interakciju samo s jednom izoformom HIF-a, pa stoga preferencijalno povećavaju aktivnost samo jedne izoforme HIF-a na određenom promotoru gena. Aktivacija ekspresije promotora endotelina-1 (ET-1) hipoksijom u endotelnim stanicama ima tri susjedna mjesta vezanja transkripcijskih čimbenika: aktivatora proteina-1 (AP-1), GATA-vezujućeg čimbenika 2 (GATA-2) i nuklearnog čimbenika-1 (NF-1) koji tvore funkcionalni kompleks s HIF-1, stabiliziraju vezanje HIF-1 i promiču regrutiranje CBP/p300. Hepatocitni nuklearni čimbenik-4 (HNF4) se veže na regiju *EPO* pojačivača, fizički međudjeluje s HIF-1 $\beta$  i surađuje s HIF-1 u indukciji *EPO* gena pod hipoksijom. Jednako, USF2 (*engl.* upstream stimulatory factor-2) specifično je esencijalan u hipoksičnoj aktivaciji HIF-2 ciljanih gena, uključujući *EPO* u linijama jetrenih i bubrežnih malignih stanica, veže se za promotore/pojačivače, ulazeći u interakciju fizički i funkcionalno s NTAD HIF-2 $\alpha$  i regrutira CBP/p300 za formaciju višefaktorskog transkripcijskog kompleksa na promotorima HIF-2 ciljanih gena. Prenosilac signala i aktivator transkripcije-3 (STAT3) uključen je u HIF-1 aktivaciju ciljanih gena tijekom hipoksije u staničnim linijama raka bubrega i dojke, ali ne u odgovor posredovan s HIF-2. Koaktivator steroidnih receptora-1 (SRC-1) formira kompleks sa CBP i međudjeluje s transaktivacijskim domenama HIF-1 $\alpha$  te tako funkcionira kao koaktivator HIF-1 $\alpha$  i pojačava hipoksijom inducirani transaktivacijski potencijal. Apurinska/apirimidinska endonukleaza-1 (APE1 ili Ref-1) ponaša se kao koaktivator za HIF-1 $\alpha$  kroz svoju redoks-aktivnost, posredujući DNA-HIF-1 vezanje i ekspresiju HIF-1 ciljanih gena (npr. VEGF i CA IX) (CARRERO i sur., 2000; pregledno o koaktivatorima u ALBADARI i sur., 2019).

Detaljno poznavanje signalnih puteva u stanici i pojedinih molekula u signalnom putu otvara mogućnosti za ciljanu manipulaciju puta sa svrhom liječenja pojedinih patologija, o čemu će više biti riječ u kasnijim poglavljima.

#### **2.3.4. Transkripcija i ekspresija gena ciljanih HIF kompleksima kao stanični odgovor na hipoksiju**

Nakon otkrića HIF-a, PHD-a, FIH-1, hidroksilacije proteina kao mehanizma kojim stanice promjene u pO<sub>2</sub> pretvaraju u promjene u ekspresiji gena, podjednako važno i dramatično bilo je otkriće izuzetne raznolikosti bioloških procesa u kojima HIF-1 igra važnu ulogu

(SEMENZA, 2004). Analizom miševa kod kojih je knockout metodom izgubljena ekspresija HIF-1 $\alpha$  ili u svim stanicama ili u pojedinačnoj staničnoj liniji, utvrđeno je više procesa u razvoju i fiziologiji koji ovise o HIF-1: kardiovaskularni razvoj, embrionalno preživljavanje, placentacija sisavaca, preživljavanje mezenhimalnih stanica i adipogeneza tijekom razvoja, razvoj B-limfocita, mliječne žlijezde i kostura (hondrogeneza), zaraštavanje rana bez ožiljaka u hipoksičnoj koži embrija (HIF-1-reguliranom TGF- $\beta$ 3 ekspresijom), a općenito u fiziologiji angiogeneza, hipoksijom inducirana glikoliza, eritropoeza, apoptoza (putem p53, čiju stabilizaciju posreduje), i remodeliranje vaskulature u plućima, osjećanje arterijskog pO<sub>2</sub> u karotidnim tijelima, upala posredovana mijeloidnim stanicama, aktivacija T-limfocita, hipoksijom inducirano prekondicioniranje miokarda i zastoj staničnog ciklusa (literatura o tome sumirana u SEMENZA, 2000b, WENGER, 2002 i SEMENZA, 2004; KOJIMA i sur., 2002; MAKINO i sur., 2003). Potpuni nedostatak HIF-1 $\alpha$  rezultira razvojnim defektima i npr. *Hif1a*<sup>-/-</sup> mijeloidne stanice (granulociti i makrofagi) potpuno su nesposobne reagirati na upalne podražaje. Mijeloidne stanice su ovisne o glikolizi za stvaranje ATP-a, što je možda rezultat hipoksičnog okoliša koji je često povezan s upalama i infekcijama. Manjak HIF-1 $\alpha$  rezultira nedostatkom ATP-a, a to narušava ključne funkcije mijeloidnih stanica: agregaciju, pokretljivost, invaziju i ubijanje bakterija (CRAMER i sur., 2003; SEMENZA, 2004). Parcijalni nedostatak (*Hif1a*<sup>+/-</sup> miševi) vodi u normalni razvoj, no rezultira oslabljenim ventilacijskim odgovorima na fiziološke podražaje, pogotovo na kroničnu hipoksiju, pa tako npr. dolazi do gubitka osjeta O<sub>2</sub> u karotidnom tijelu te npr. reducirane policitemije, hipertrofije desnog ventrikula, pulmonarne hipertenzije, remodeliranja pulmonalne vaskulature i elektrofizioloških odgovora. Iako su karotidna tijela anatomski i histološki normalna i depolariziraju se normalno kada se aplicira npr. cijanid, u biti ne pokazuju nikakvu reakciju na hipoksiju, odnosno pokazuju defektnu neuralnu aktivnost nakon izlaganja hipoksiji (YU i sur., 1999; SHIMODA i sur., 2001; KLINE i sur., 2002; WENGER, 2002; SEMENZA, 2004).

Poticanjem transkripcije gena HIF-1 indirektno sudjeluje u regulaciji procesa važnih za preživljavanje stanica, modificira stanični metabolizam glukoze i aktivira alternativne puteve koji ne zahtjevaju kisik (WOLFLE i sur., 1983; WANG i sur., 1995) (potiče anaerobnu glikolizu za dobivanje energije), smanjuje metaboličku aktivnost stanica i potrošnju kisika, povećava isporuku kisika u nedovoljno oksigenirana tkiva (kroz učinke na različite stadije angiogeneze, vazomotoriku, metabolizam željeza i iniciranjem eritropoeze) (MAXWELL, 2003), uključen je u poticanje ili prevenciju apoptoze ishemičnih stanica (CARMELIET i sur., 1998; HALTERMAN i sur., 1999; SEMENZA, 2000a), može potaknuti autofagiju (ZHANG i sur.,

2008a), utječe na signalne puteve koji djeluju na razvoj, upalne procese i regulaciju imunoloških stanica (SHAY i SIMON, 2012; LIN i SIMON, 2016), proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica, metabolizam matriksa (GUILLEMIN i KRASNOW, 1997; RATCLIFFE, 2007). Podjedinice HIF-1/2 $\alpha$  prisutne su u glomusnim stanicama karotidnih tijela i uključene u regulaciju njihovog rada (SEMENZA i PRABHAKAR, 2018).

Molekularni mehanizmi koji posreduju odgovor na hipoksiju opsežno su istraživani za *EPO* gen i eritropoetin je pružio paradigmu za ekspresiju gena reguliranu kisikom (RATCLIFFE, 2007). Iako se prvotno mislilo da je HIF isključivo dio odgovora specijaliziranih stanica bubrega koje proizvode eritropoetin ili manjim dijelom hepatocita jer je nađen u kulturi ovih stanica, kasnije je HIF-1 aktivnost zabilježena u različitim staničnim linijama sisavaca (čovjeka, miša, štakora, hrčka, svinje) kultiviranim u hipoksičnim uvjetima, a u kojima *EPO* gen nije eksprimiran (MAXWELL i sur., 1993a). Danas je poznato da je HIF sustav (prije svega HIF-1) prisutan u svim stanicama i upravlja mnogim odgovorima na hipoksiju izravnom ili neizravnom regulacijom brojnih gena čiji su proteinski produkti uključeni u funkcionalno raznolike odgovore stanica, prilično različite od eritropoetinskih i ranije spomenutih, gena s kontrastnim kinetičkim odgovorima poput slabije inducibilnih gena koji kodiraju glikolitičke enzime naspram masivno inducibilnog *EPO* gena te npr. gena koji kodiraju proteine s naizgled suprotstavljenim fiziološkim funkcijama, poput čimbenika rasta i proapoptotičkih medijatora (WANG i SEMENZA, 1993; WENGER, 2002; RATCLIFFE, 2007). SEMENZA (2004) navodi da HIF-1 izravno utječe na ekspresiju (indukcija ili represija) čak preko 70 gena, ovisno o staničnom tipu (KELLY i sur., 2003) (Slika 4.). Broj identificiranih HIF-1 ciljanih gena nastavljao je rasti pa tako SCHOFIELD i RATCLIFFE (2004) i MANALO i sur. (2005) spominju rezultate masivnih analiza genske ekspresije prema kojima je u bilo kojoj danoj stanici nekoliko stotina gena pozitivno ili negativno regulirano hipoksijom i HIF-om, KAELIN i RATCLIFFE (2008) navode da HIF kompleks utječe na ekspresiju čak 100-200 gena. Još novije pan-genomske analize vezanja HIF-a na DNA u ljudskim stanicama i kromatin-imunoprecipitacijski testovi su otkrili preko 500 ili 800 direktnih transkripcijskih meta HIF-a (MOLE i sur., 2009; XIA i sur., 2009; SCHÖDEL i sur., 2011; SEMENZA, 2012b), dok SEMENZA i PRABHAKAR (2018) navode da je identificirano čak više od 2500 HIF-om direktno ciljanih gena, ali samo podskupina ovih gena je transaktivirana u svim stanicama, dopuštajući svakoj stanici da reagira na hipoksiju na jednak način, dok su drugi geni aktivirani samo u određenom tipu stanica (KELLY i sur., 2003; SEMENZA, 2014).



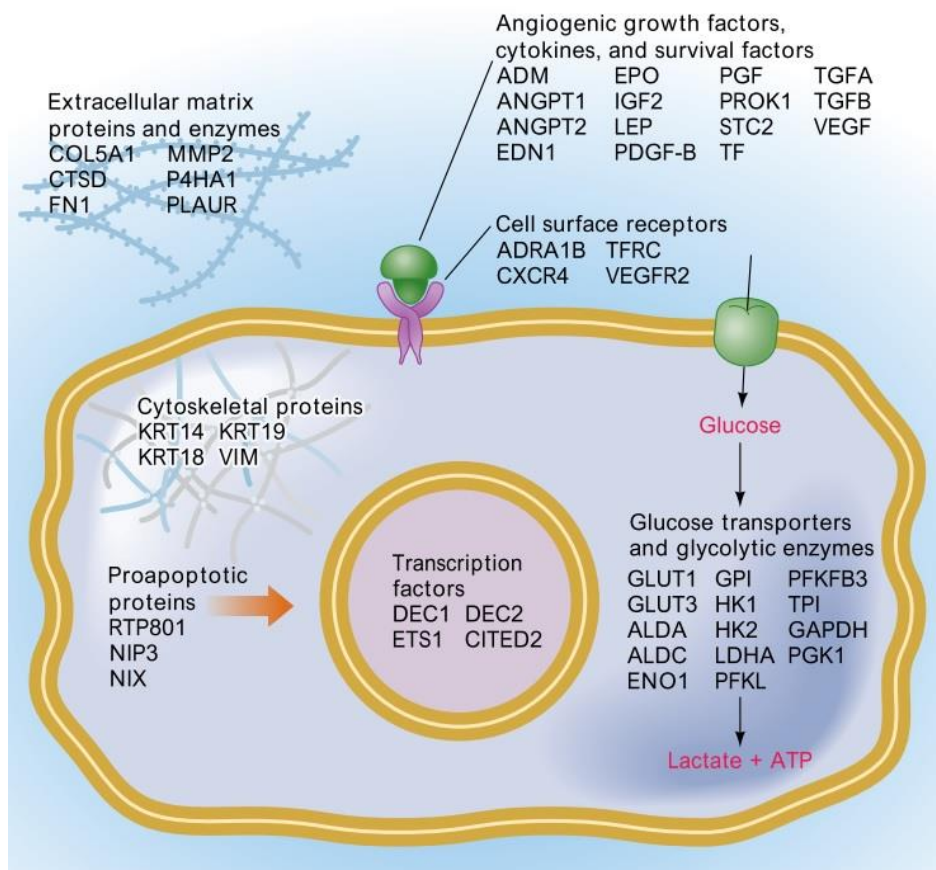
Među spektrom gena koji su transkripcijski aktivirani s HIF-1 u hipoksičnim stanicama ističu se oni uključeni u metabolizam glukoze. U uvjetima ograničene dostupnosti kisika, anaerobna glikoliza postaje dominantni oblik stvaranja ATP-a u stanicama (Pasteurov efekt), a stanice se prebacuju u mod štednje energije isključivanjem trenutno neesencijalnih staničnih funkcija koje troše energiju (HOCHACHKA i sur., 1996; GUILLEMIN i KRASNOW, 1997). Jedan od načina na koji HIF-1 potiče preživljavanje stanica u hipoksičnim uvjetima upravo je posredovanje pri prelasku s oksidativnog na glikolitički metabolizam (SEMENZA, 2011). Mnogi geni uključeni u unos glukoze i glikolizu su identificirani kao HIF-1 ciljani geni: geni koji kodiraju za minimalno 11 enzima glikolitičkog puta koji pretvaraju glukozu u piruvat i transportere glukoze koji funkcioniraju bolje pri niskom udjelu kisika, gen za tirozin hidroksilazu uključenu u odgovor dišnog sustava (SEMENZA i sur., 1994; GUILLEMIN i KRASNOW, 1997; IYER i sur., 1998a; WENGER, 2000), piruvat dehidrogenaza-kinazu 1 (PDK1) koja posreduje prijelaz s oksidativnog na glikolitički metabolizam u hipoksiji i inaktivacijom piruvat dehidrogenaze inhibira pretvorbu piruvata u acetil-koenzim A za ulazak u Krebsov ciklus i oksidaciju u mitohondrijima, zatim gen za laktat dehidrogenazu A koja katalizira pretvorbu piruvata u laktat (KIM i sur., 2006; SEMENZA, 2011), adenilat kinazu-3, inzulinu sličan čimbenik rasta-2 (IGF-2) koji ima funkciju i u proliferaciji (SEMENZA, 2001). Osim što pojačava glikolizu i smanjuje ulazak metabolita u Krebsov ciklus, HIF aktivno suprimira oksidativni metabolizam smanjenjem mitohondrijske biogeneze, poticanjem mitohondrijske autofagije (aktiviranjem ekspresije gena koji kodiraju BNIP3 i BNIP3L koji to posreduju i diferencijalno regulirajući podjedinice citokrom-oksidge kako bi se optimizirala respiratorna učinkovitost pri smanjenoj dostupnosti O<sub>2</sub> (FUKUDA i sur., 2007; ZHANG i sur. 2007; KAELIN i RATCLIFFE, 2008; ZHANG i sur., 2008a; SEMENZA, 2012b). Konvencionalno mišljenje je da stanice dišu dok se ne potroši kisik i u toj točki se prebacuju na glikolizu, što se po novijim saznanjima ne smatra baš točnim. Smatra se da i u hipoksičnim uvjetima još jedno vrijeme ima dovoljno kisika da dođe do oksidativne fosforilacije, ali sa cijenom gubitka redoks-homeostaze zbog stvorenih ROS-a. U kojoj mjeri se ovo odnosi na bolesna stanja kao rak i pulmonalnu hipertenziju treba odrediti (HAMANAKA i CHANDEL, 2009; SEMENZA, 2011). Noviji podaci sugeriraju da u nekim staničnim tipovima HIF-1 također može posredovati ekspresiju enzima transketolaze (TKT, TKTL2) iz puta pentoza-fosfata, koji neoksidativno kataliziraju proizvodnju riboze potrebne za sintezu nukleinske kiseline (ZHAO i sur., 2010; SEMENZA, 2012b).

Anaerobnom glikolizom posljedično se povećava proizvodnja laktata, time i smanjuje pH, što može ograničiti glikolizu kao izvor ATP-a unatoč dovoljnoj opskrbi glukozom. Među HIF ciljanim genima su i oni za transmembransku karboanhidrazu, enzim uključen u regulaciju pH konverzijom protona i bikarbonata u CO<sub>2</sub> kojeg eritrociti mogu transportirati do pluća (WYKOFF i sur., 2000; WENGER, 2002), gen za eritropoetin koji potiče eritropoezu (WANG i SEMENZA, 1993), gen za transferin, transferinski receptor i ceruloplazmin. Transferin je transportni protein koji prenosi željezo putem krvi i može ga vezati jedino u feri obliku. Ceruloplazmin ili feroksidaza važna je za oksidaciju fero u feri željezo, željezo je potrebno za formiranje hema i najčešći je limitirajući čimbenik u eritropoezi, a transferinski receptor omogućuje stanični unos transferina. Zbog hipoksije se povisuje ekspresija transferina i ceruloplazmina vjerojatno s ciljem povećanja zaliha i transporta željeza u eritroidno tkivo (ROLFS i sur., 1997; WENGER, 2002).

Nadalje u odgovoru na hipoksiju značajna je grupa HIF-om ciljanih gena uključenih u vaskularnu biologiju - angiogenezu, sazrijevanje krvnih žila, moduliranje vaskularnog tonusa kojim se utječe na lokalni protok krvi, među kojima su najznačajniji geni za receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta-1 (VEGFR-1 ili FLT-1) (GERBER i sur., 1997), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF-*engl.* vascular endothelial growth factor) (FORSYTHE i sur., 1996) i bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) koji potiču angiogenezu te za druge čimbenike rasta, moguće i EGVEGF (*engl.* endocrine gland derived VEGF), zatim geni za inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), za proteine hem-oksigenazu-1, inducibilnu sintazu dušikovog oksida, endotelin 1, adrenomedulin,  $\alpha_{1B}$ -adrenergični receptor koji su uključeni u modulaciju vaskularnog tonusa (pregledno u WENGER, 2002), kolagen prolil-hidroksilaze i transglutaminaze, NOS2. Neki proteini imaju više učinaka u organizmu pa tako SEMENZA (2001) adrenomedulin, ciklin G2, EPO, hem-oksigenazu 1, IGF2, IGFBP-1 -2 -3, NOS2, NIP3, p21, TGF- $\beta$ 3, VEGF spominje u skupini ciljanih gena uključenih u proces proliferacije i preživljavanja stanica.

Na Slici 4. i 5. i u Tablici 1. na 57. stranici nalazi se popis nekih od mnogih gena na koje utječe HIF kompleks i proteina koji se posljedično proizvode te pokreću sekundarne kaskadne promjene u stanicama, a pregled literature o HIF-om ciljanim genima može se naći u SEMENZA (2000a), WENGER (2002), SEMENZA (2010a i b). HIF utječe npr. i na neke transpozone kao što je s virusima povezan retrotranspozon VL30 (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004). Kompleks HIF-1 aktivira transkripciju *JMJD1A* i *JMJD2B* gena koji kodiraju za histonske demetilaze, enzime koji modificiraju kromatin u genomu mijenjajući dostupnost

DNA transkripcijskim mehanizmima i na taj način regulirajući ekspresiju više gena. Kompleks HIF-1 se tako uključuje u epigenetske kontrolne mehanizme (SEMENZA, 2010a).



**Slika 4.** Reprezentativni HIF-1 ciljani geni (SEMENZA, 2004).

Objašnjenje kratica koje nisu u tekstu ili na Slici 5: CITED (*engl.* CBP/p300-interacting transactivator), COL5A1 (*engl.* collagen V  $\alpha$ 1-subunit; kolagen V  $\alpha$ 1-podjedinica), CTSD (*engl.* cathepsin D; katepsin D), CXCR (*engl.* chemokine receptor; receptor kemokina), DEC (*engl.* differentiated embryo chondrocyte expressed), ETS (*engl.* erythroblastosis virus transforming sequence), FN (*engl.* fibronectin; fibronektin), GPI (*engl.* glucose phosphate isomerase; glukoza fosfat izomeraza), KRT (keratin), MMP (*engl.* matrix metalloproteinase; matriks metaloproteinaza), NIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein), NIX (NIP3-like), P4HA1 (*engl.* prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$ 1-subunit; prolil-4-hidroksilaza  $\alpha$ 1-podjedinica), PFKFB3 (*engl.* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3; 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bisfosfataza-3), PFKL (*engl.* phosphofruktokinase L; fosfofruktokinaza L), PGF ili PLGF (*engl.* placental growth factor; placentalni čimbenik rasta), PLAUR (*engl.* urokinase-type plasminogen activator receptor; receptor za urokinazni tip aktivatora plazminogena), PROK (prokineticin, označava se i kao EGVEGF), STC (*engl.* staniocalcin; staniokalcin), TGFA i B (*engl.* transforming growth factor- $\alpha$  i - $\beta$ ; transformirajući čimbenik rasta- $\alpha$  i - $\beta$ ), VIM (vimentin).

<b>HORMONALNA REGULACIJA</b>	
• eritropoetin	EPO
• leptin	LEP
<b>VAZOMOTORNA REGULACIJA</b>	
• endotelin-1	EDN1
• adrenomedulin	ADM
• tirozin hidroksilaza	TH
• $\alpha_{1B}$ adrenergični receptor	ADRA1B
• inducibilna sintaza dušikovog-oksida	iNOS
• endotelna sintaza dušikovog-oksida	eNOS
• hem oksigenaza	HO1
• atrijski natrijuretski peptid	ANP
<b>ANGIOGENSKA SIGNALIZACIJA</b>	
• vaskularni endotelni faktor rasta A	VEGFA
• receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta-1, -2	VEGFR1, VEGFR2
• <i>engl.</i> endothelial-gland-derived VEGF	EGVEGF
• inhibitor aktivatora plazminogena (PAI)	PAI-1
• angiopoietin 1 i 2	ANGPT1, ANGPT2
<b>METABOLIZAM ENERGIJE / GLUKOZE</b>	
• glukozni transporter-1 -3	GLUT1, GLUT3
• heksokinaza-1 i heksokinaza-2	HK1, HK2
• 6-fosfofrukto-1-kinaza L	PFKL
• gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH
• aldolaza A i aldolaza C	ALDA, ALDC
• enolaza-1	ENO1
• fosfoglicerat kinaza-1	PGK1
• laktat dehidrogenaza A	LDHA
• 6-fosfofrukto-2-kinaza	PFK2
• piruvat kinaza M	PKM
• trioza fosfat izomeraza	TPI
• karboanhidraza-9	CA IX
<b>MIGRACIJA STANICA</b>	
• receptor kemokina CXCR4	
• c-Met	
<b>TRANSPORT</b>	
• transferin	TF
• receptor transferina	TFRC
• ceruloplazmin	CP
• protein višestruke rezistencije na lijekove 1 (P-glikoprotein)	MDR1 ili ABCB1
<b>RAST I APOPTOZA STANICA</b>	
• inzulinu sličan faktor rasta i IGF-vežući protein-1	IGF i IGFBP
• NIP3 (uloga u apoptozi)	
• Endoglin	ENG
• Wilmsov tumor supresor	
• $\alpha$ -fetoprotein (negativna regulacija)	
• <i>engl.</i> calcitonin-receptor-like receptor	
<b>TRANSKRIPCijsKA REGULACIJA</b>	
• <i>engl.</i> differentiated embryo chondrocyte 1 i 2	DEC1, DEC2
• <i>engl.</i> erythroblastosis virus transforming sequence	ETS1
• p35srj	
<b>FUNKCIJE MATRIKSA I BARIJERNE FUNKCIJE</b>	
• prokolagen prolil hidroksilaza- $\alpha$ 1	
• <i>engl.</i> intestinal trefoil factor	ITF
• Ekto-5'-nukleotidaza	CD73

**Slika 5.** Proteinski produkti gena za koje postoje eksperimentalni dokazi da su direktno transkripcijski aktivirani HIF-om i njihova uloga u homeostazi kisika i drugim staničnim procesima. Kratice su iz engleskih naziva. Modificirano prema SEMENZA (2001) i SCHOFIELD i RATCLIFFE (2004).

Iznenadjujući broj i raznolikost gena na koje HIF kompleksi mogu utjecati te posljedična raznolikost pokrenutih staničnih odgovora otkriva sveukupnu kompleksnost molekularnih mehanizama i reakcija u stanici. Boljim razumijevanjem staničnih puteva ovisnih o O<sub>2</sub> postalo je sve izglednije da vezani odgovori ne mogu biti u potpunosti objašnjeni samo hipoksijom te da su u njih vjerojatno uključeni i signalni putovi neovisni o O<sub>2</sub> (WAGNER, 2008).

Uz direktnu aktivaciju transkripcije pojedinih gena preko HRE, HIF može aktivirati i sekundarne transkripcijske čimbenike koji opet pokreću određene odgovore te produljiti signalni put kroz interakcije s mrežom mikroRNA (miRNA) i drugim signalnim putevima nakon što aktivira transkripcijsku kaskadu. HIF indirektno regulira ekspresiju gena transaktivacijom gena koji kodiraju miRNA i enzime koji modificiraju kromatin. MikroRNA imaju važne funkcije u kontroli mnogih svojstava stanica, uključujući rast i diferencijaciju. Poremećaj njihove regulacije često pridonosi rastu i progresiji raka (CROSBY i sur., 2009; SEMENZA, 2012b). HIF-ovisna supresija gena je neuobičajena. Vezanje HIF-1 na DNA opaženo je samo kod gena čija se ekspresija povećava hipoksijom, a ne i kod onih sa smanjenom ekspresijom, koji su hipoksijom potisnuti, što upućuje na neizravni, ali o HIF-1 ovisni mehanizam supresije (MOLE i sur., 2009; SEMENZA, 2010b). HIF-1 smanjuje mRNA ekspresiju indirektno regulacijom transkripcijskih represora i miRNA (MANALO i sur., 2005; MOLE i sur., 2009; XIA i sur., 2009; SEMENZA, 2011). HIF- $\alpha$  također funkcionalno ulazi u HRE-neovisne interakcije s drugim putevima prijenosa signala i sistemima transkripcije, uključujući Notch, Wnt, Myc puteve (KOSCHI i sur., 2004; KEITH i SIMON, 2007; KAELIN i RATCLIFFE, 2008) i djeluje kao netranskripcijski regulator ekspresije određenih gena npr. utječući na translaciju. Sve primarne aktivnosti iniciraju sekundarne kaskadne reakcije, tako da je sveukupna složenost aktiviranja odgovora HIF-om ogromna (UNIACKE i sur., 2012; RATCLIFFE, 2013). U sisavaca inaktivacija HIF-a uzrokuje ozbiljne razvojne anomalije, što može biti jer je hipoksija sama signal za vođenje razvoja ili da su putevi hipoksije uključeni od drugih signala tijekom razvoja (IYER i sur., 1998a; KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Inaktivacija HIF- $\alpha$  jako utječe na staničnu diferencijaciju čak i u prisutnosti kisika. HIF-manipulacija utječe na širok raspon naizgled staničnih autonomnih razvojnih puteva, uključujući hematopoetskih, endotelnih, miocitnih, adipocitnih, hondrocitnih, trofoblastnih i diferencijaciju neurona. Iako temeljni mehanizmi ostaju uglavnom nepoznati, čini se vjerojatnim da su uključeni učinci i na HRE-regulirane HIF transkripcijske ciljeve kao što su Oct4 i ID-2, kao i učinci na HRE-neovisne interakcije HIF-a s drugim putevima kao što je Notch (KEITH i SIMON, 2007; KAELIN i RATCLIFFE, 2008).

#### 2.3.4.1. Funkcionalne razlike HIF- $\alpha$ izoformi

HIF kompleks s izoformom 1 $\alpha$  kao podjedinicom glavni je regulator kisikom reguliranih ekspresija gena (WENGER, 2002). U usporedbi s HIF-1 $\alpha$  koja je sveprisutno eksprimirana, HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$  imaju tkivnu ekspresiju ograničenu na određene tipove stanica (više su stanično specifične), s tim da sve tri izoforme *in vitro* i *in vivo* pokazuju djelomično preklapanje u tome gdje su eksprimirane i nađene su u mnogim organima (EMA i sur., 1997; TIAN i sur., 1997; TALKS i sur., 2000; SEMENZA, 2001; WIESENER i sur., 2002; pregledno u LOBODA, 2010). Pri akutnoj ozljedi bubrega HIF-1 $\alpha$  je uglavnom induciran u tubularnim stanicama papila, dok je HIF-2 $\alpha$  češće induciran u glomerulima i peritubularom intersticiju (ROSENBERGER i sur., 2002). HIF-2 $\alpha$  kad se eksprimira može biti neaktivna kao rezultat citoplazmatske sekvencije (PARK i sur., 2003; SEMENZA, 2004). Smatra se da HIF-1 $\alpha$  igra vrlo općenitu ulogu signalizirajući postojanje hipoksije transkripcijskoj mašineriji u jezgri svih stanica, dok HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$  imaju više tkivno-specifične funkcije, više ograničenu ili specijaliziranu ulogu u homeostazi kisika (WANG i SEMENZA, 1993; SEMENZA, 2000a; SEMENZA, 2001). U skladu s time različite HIF- $\alpha$  izoforme mogu imati preklapajuće, ali i različite skupine transkripcijskih ciljeva i oblikovati različite fiziološke odgovore na hipoksiju (HU i sur., 2003) te dijelom zato postoje razlike u tkivno-specifičnoj i vremenskoj indukcije svake izoforme (WIESENER i sur., 2002; RANKIN i sur., 2007; RATCLIFFE, 2007).

HIF-2 $\alpha$  aktivira HRE-ovisnu transkripciju skupine istih, ali i različitih gena od onih reguliranih s HIF-1 $\alpha$ , vjeruje se da HIF-2 i HIF-3 mogu međudjelovati sa mjestom vezanja za DNA HIF-1 ciljanih gena (WENGER, 2002; RATCLIFFE, 2007). Selektivna aktivacija ekspresije HIF- $\alpha$  ciljanih gena ne ovisi o selektivnom vezanju DNA na ciljanom lokusu (vežu se za istu HRE sekvencu), nego o neekvivalentnim C-terminalnim dijelovima ovih molekula pa njihov učinak na isti gen može varirati (LAU i sur., 2007). Za specifičnost djelovanja HIF-izoformi odgovorne su interakcije s drugim transkripcijskim čimbenicima i raznolikost koaktivatora i proteina koji međudjeluju s njima (LOBODA i sur., 2010).

Danas su definirani isključivo HIF-1 $\alpha$  ciljani geni, isključivo HIF-2 $\alpha$  geni i geni koji reagiraju na obje  $\alpha$  izoforme (HU i sur., 2003; RAVAL i sur., 2005; HOLMQUIST-MENGELBIER i sur., 2006) i spomenut će se neki od njih. Prema SEMENZA (2014), LOBODA i sur. (2010), RATCLIFFE (2007) i RANKIN i sur. (2008) transkripciju gena za glikolitičke enzime čini se da pokreće samo HIF-1 $\alpha$ , a ne HIF-2 $\alpha$  kao npr. PDK1, LDH-A, PGK kao i CA IX. HIF-1 $\alpha$  je zabilježena gdje i HO-1, endotelin-1, NOS2, IGF-2 i glukozni transporter-1. HIF-2 $\alpha$  dominantno regulira *EPO* gen i gene uključene u metabolizam željeza

(npr. za transferin), dok je druga skupina gena, koja uključuje VEGF i GLUT-1, regulirana i sa HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ . Po nekim autorima gen za VEGF je reguliran s HIF-2 $\alpha$  (HU i sur., 2003; RAVAL i sur., 2005; ALBADARI i sur., 2019; LEE i sur., 2019), odnosno nekoliko gena za angiogene čimbenike, uključujući VEGF (LOBODA i sur., 2010; SEMENZA, 2014). Prema WANG i SEMENZA (1995), EMA i sur., (1997), LOBODA i sur. (2012) aktivaciju transkripcije *EPO* gena i VEGF-a (barem u nekim okolnostima), glikolitičnih enzima i drugih enzima te drugih angiogenih čimbenika (LOBODA i sur., 2010) mogu potaknuti i HIF-1 i HIF-2. RANKIN i sur. (2007) dali su genetičke dokaze pomoću ciljane inaktivacije gena da HIF-1 i HIF-2 imaju različite uloge u regulaciji hipoksijom inducibilnih gena i da je *Epo* u mišjoj jetri *in vivo* prvenstveno ili isključivo reguliran s HIF-2 izoformom. Ranija literatura navodi eksperimentalne dokaze da u Hep3B stanicama HIF-1 igra presudnu ulogu u hipoksičnoj aktivaciji transkripcije *EPO* gena (WANG i SEMENZA, 1993), no prema RANKIN i sur. (2007) to je slučaj kod izoliranih HRE regija iz *Epo* lokusa, dok je u nativnom kontekstu HIF-2 $\alpha$  preferencijalno vezana na HRE u *Epo* 3' pojačivaču te su nagađali da interakcije HIF-a i drugih transkripcijskih čimbenika vezanih za nativni *Epo* lokus promiču selektivno vezanje HIF-2 $\alpha$  za to mjesto (RATCLIFFE, 2007). I prema HASSE (2010) glavni aktivator HRE u *EPO* pojačivaču je HIF-2, koji za razliku od HIF-1 $\alpha$ , sadrži elemente odgovora na željezo na 5'UTR za koju se smatra da ograničava ekspresiju HIF-2 $\alpha$  tijekom nedostatka željeza kad pretjerani eritropoetski odgovor može biti neproduktivan (SANCHEZ i sur., 2007; KAELIN i RATCLIFFE, 2008). KAELIN (2017) navodi da je *EPO* isključivo reguliran s HIF-2 te da je polimorfizam *VHL*, *EglN1* i HIF-2 $\alpha$  povezan s policitemijom i adaptacijom na visoke nadmorske visine. Neki ključni regulatori adenozijske signalizacije su direktno ciljani s HIF-om: HIF-1 povećava ekto-5'-nukleotidazu (CD73), što povećava razinu adenozijske i adenozijske receptora 2B (ADORA2B), dok je adenozijski receptor 2A (ADORA2A) ciljan s HIF-2. Adenozijski signalni put služi kao zaštitni mehanizam tijekom upalnih stanja i pruža ishemijsku toleranciju na akutnu hipoksiju (BOWSER i sur., 2017; pregledno u LEE i sur., 2019), pridonosi kardioprotektivnom učinku ishemijskog prekondicioniranja (SEMENZA, 2014). HIF-2 $\alpha$  igra važnu ulogu u remodeliranju primarne vaskularne mreže embrija (PENG i sur., 2000), u vaskularnom razvoju unutar specifičnih organa kao što su pluća (EMA i sur., 1997; PATEL i SIMON, 2008).

Literatura dokazuje postojanje promjena u transkripcijskoj aktivnosti HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  specifičnih za stanicu, uvjete ili bolest (RATCLIFFE, 2007). Dokazane su različite uloge HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  u regulaciji stanične diferencijacije i sve je više dokaza da je HIF-2 $\alpha$  posebno

značajan u poticanju rasta nekih tumora u hipoksiji kao npr. neuroblastoma ili karcinoma svijetlih stanica bubrega (CCRC) vezanih za VHL bolest, kod kojih se izrazita eritrocitoza javlja kao komplikacija. HIF-2 $\alpha$  se dovodi u vezu s poticanjem nediferenciranog fenotipa u pluripotentnim stanicama (COVELLO i sur., 2005; COVELLO i sur., 2006; HOLMQUIST-MENGELBIER i sur., 2006). U neoplastičnim tubularnim epitelnim stanicama spomenutog karcinoma, normalna predominacija ekspresije HIF-1 $\alpha$  u normalnim tubulima prelazi u predominaciju HIF-2 $\alpha$  ekspresije (ROSENBERGER i sur., 2002; RATCLIFFE, 2007). Genetičke manipulacije u CCRC stanicama pokazale su da aktivacija HIF-2 $\alpha$ , ali ne HIF-1 $\alpha$  pospješuje rast tumora. HIF-1 $\alpha$  pokreće ekspresiju gena za proapoptotičke čimbenike kao NIP3 (BNIP3) (KONDO i sur., 2002; RAVAL i sur., 2005; RATCLIFFE, 2007), a identificirani su specifični HIF-2 $\alpha$  ciljni geni koji potiskuju diferencijaciju matičnih stanica (*Oct4*) ili potiču rast (*ciklin D1*, *TGF $\alpha$* ) u uznapredovalom karcinomu svijetlih stanica bubrega. HIF-2 $\alpha$  u ovom tumoru predvodi i ekspresiju VEGF-a (RAVAL i sur., 2005). Prema KAELIN (2017) HIF-2 čini se da je primarni pokretač pVHL-defektnih tumora bubrega.

Regenerirajuće tkivo podložno je nastanku hipoksije i također stvara HIF da bi ju prevladao. Prema istraživanju NOVIATI i sur. (2019) na gušterima, 1 $\alpha$  i 2 $\alpha$  obje su važne u opskrbi kisikom i energijom u procesu regeneracije tkiva, obje su u različitim fazama stimulirale proliferaciju endotelnih stanica i stvaranje krvnih žila. Ekspresija 1 $\alpha$  javlja se ranije nego ekspresija 2 $\alpha$  i smanjuje se brže jer je 1 $\alpha$  osjetljivija na promjene koncentracije kisika. 2 $\alpha$  pojavljuje se kasnije, povećava se postupno tijekom dužeg perioda i ostaje prisutna dulje nego 1 $\alpha$ . Postavili su hipotezu da 1 $\alpha$  pomaže inicijalno stimulirati proces regeneracije tkiva, a vjerojatno kad koncentracija O<sub>2</sub> počinje rasti i dosegne neki prag, HIF-2 $\alpha$  funkcionalno zamjenjuje HIF-1 $\alpha$  koji se počeo smanjivati zbog porasta O<sub>2</sub>, no obje podjedinice igraju ulogu u prevladavanju hipoksije u tkivu (NOVIANTI i sur., 2019). Primjećeno je da je u matičnim stanicama tijekom regeneracije HIF-2 $\alpha$  potrebna od HIF-1 $\alpha$  za preživljavanje kronične hipoksije te moguće da je podjedinica 2 $\alpha$  adaptirana za kroničnu hipoksiju, zbog uloge u regulaciji gena uključenih u angiogenezu i proliferaciju stanica (HU i sur., 2003; PATEL i SIMON, 2008; NOVIANTI i sur., 2019). Utjecaj 2 $\alpha$  na proliferaciju zabilježili su i drugi npr. u jetrenim stanicama embrija zebrica (LIN i sur., 2014). HIF-1 $\alpha$  više doprinosi transkripcijskim odgovorima vođenim akutnom hipoksijom unatoč tome što se HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  vežu na slična mjesta sa sličnim afinitetom (MOLE i sur., 2009; LEE i sur. 2019). FIH-1 ostaje aktivan pri nižim koncentracijama kisika nego PHD i tako može suprimirati aktivnost HIF- $\alpha$  proteina koji izbjegnu destrukciju u umjerenj hipoksiji. Izoforna 2 $\alpha$  je relativno rezistentna na FIH-1



posredovanu inaktivaciju u usporedbi s  $1\alpha$ . Kao rezultat, dubina hipoksije potrebna za aktivaciju određenog gena koji reagira na HIF će ovisiti o njegovom zahtjevu za CTAD funkcijom (u odnosu na funkciju NTAD) i zahtjevom za  $1\alpha$  (u odnosu na  $2\alpha$ ) (pregledno u KAELIN i RATCLIFFE, 2008).

Funkcije HIF- $3\alpha$  slabo su istražene i uglavnom nisu dovoljno definirane (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Izoforna  $3\alpha$  nađena je eksprimirana u timusu, plućima, mozgu, srcu i bubregu odraslih miševa. Jedna kratka varijanta  $3\alpha$  koja nema NTAD niti CTAD domenu zabilježena je u miševa kao HIF-antagonist, inhibitor HIF-om posredovane ekspresije u hipoksiji i označen je kao inhibitorni protein PAS domene (IPAS). Jedinstvena je po tome što djeluje kao selektivni represor hipoksijom inducirane transaktivacijske funkcije HIF- $1\alpha$  i HIF- $2\alpha$  fizičkom interakcijom bHLH/PAS domene HIF- $1\alpha$ , što rezultira formacijom disfunkcionalnog kompleksa s HIF- $1\alpha$  u jezgri, transkripcijski neaktivnog. IPAS u miševa pokazuje vrlo ograničenu tkivnu ekspresiju, strogo u Purkinjeovim stanicama malog mozga i epitelu rožnice u kojoj je angiogeneza ovisna o HIF-u potisnuta i u dubokoj tkivnoj hipoksiji. NEPAS (*engl.* neonatal and embryonic PAS), varijanta  $3\alpha$  isto pronađena u miševa, predominantno je eksprimirana tijekom kasne embrionalne i rane postnatalne faze kada djeluje kao negativni regulator genske ekspresije posredovane s HIF- $1\alpha$  i HIF- $2\alpha$ , može dimerizirati s  $1\beta$  i indirektno inhibirati aktivnosti HIF- $1/2\alpha$ . Prema nekim autorima ekspresija  $3\alpha$  i aktivnost su pojačane u odgovoru na hipoksiju, po nekima  $2\alpha$  pojačava ekspresiju  $3\alpha$  mRNA. U ljudskim stanicama je isto nađeno više varijanti  $3\alpha$ , sve inducirane hipoksijom i indukcija je posredovana samo s  $1\alpha$ . (GU i sur., 1998; MAKINO i sur., 2001, MAKINO i sur., 2002; MAKINO i sur., 2007; pregledno u ALBADARI i sur., 2019). HIF- $3\alpha$  može biti uključen u povratnu negativnu regulaciju jer je njegova ekspresija transkripcijski regulirana vezanjem samog HIF-1 za HRE u promotorskoj regiji IPAS gena u hipoksiji (MAKINO i sur., 2007; SEMENZA, 2010b). Alternativno prekratanje kojim nastaje IPAS u određenim tkivima je inducirano hipoksijom (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004).

Mnoge studije su pokazale kardio-zaštitne mehanizme povećanjem HIF-a tijekom ishemije i hipoksije, a povećanje ima i zaštitnu ulogu tijekom akutnog zatajenja jetre. HIF- $1\alpha$  povećava razinu iNOS, što prigušuje ishemijsku ozljedu. *In vivo* model ishemijsko-reperfuzijske ozljede kunića pokazuje da se aktivacijom HIF- $1\alpha$  inducira HO-1 i to umanjuje proupalnu proizvodnju citokina. HIF je središnja komponenta ishemijskog predkondicioniranja u srcu. HIF- $2\alpha$  je važna u povećanju ishemijske tolerancije povećanjem regulacije gena amfiregulina i aktiviranjem signalnog puta AKT. Stabilizacija HIF-a tijekom akutne ishemije

miokarda i reperfuzijske ozljede osigurava toleranciju tkiva na ishemijsku ozljedu. Za razliku od zaštitnih učinaka HIF-a tijekom akutnih hipoksičnih stanja kada njegovi ciljani geni vezani za metabolizam, proliferaciju, preživljavanje, angiogenezu pružaju toleranciju na ishemiju, kronična stabilizacija HIF-a pokazala je štetne učinke. Porast HIF-1 $\alpha$  neophodan je i koristan za prilagodbu miokarda preopterećenju tlakom i povećanje angiogeneze, međutim, nakupljanje p53 zbog dugotrajnog preopterećenja tlakom inhibira aktivnost HIF-1 $\alpha$  i narušava srčanu angiogenezu i sistoličku funkciju, što dovodi do zatajenja srca. HIF je uključen u razvoj srčanog zaliska. Patološke razine hipoksije ili hiperglikemije dovode do promijenjenih razina VEGF-a koji djeluje na endotelne stanice, čime doprinose kongenitalnim srčanim manama (LEE i sur., 2019). Osim o trajanju ishemije/hipoksije, učinak HIF-1 na ishod ishemije može ovisiti o dobi i vrsti životinje (ZHANG i sur. 2018).

HIF osim što je glavni regulator tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja i može imati zaštitni učinak, uključen je i u patofiziologiju i patogenezu nekih bolesti i procesa u kroničnim hipoksičnim stanjima, npr. kongestivnog zatajenja srca, kroničnog oštećenja bubrega te ima kompleksnu ulogu u patogenezi kronične opstruktivne bolesti pluća. U slučaju kroničnih bolesti teško je odrediti u kojem se točno trenutku i kada HIF uključuje u patogenezu. Ujedno i HIF-om transaktivirani geni pridonose zaštitnim ili patološkim odgovorima. Transformirajući faktor rasta (TGF- $\beta$ 1) koji najsnažnije potiče fibrogenezu, inhibira ekspresiju PHD2 i potiče stabilizaciju HIF-1 $\alpha$  u fibroblastima (i u normoksiji) pa je tako HIF uključen u patogenezu pulmonarne fibroze. Također u fibrozu jetre zbog aktiviranih profibrotičkih medijatora (mehanizmima ovisnim ili neovisnim o kisiku), kao što su PDGF, FGF i čimbenici rasta vezivnog tkiva, svi ciljani HIF-1 $\alpha$  (pregledno u LEE i sur., 2019). Analiza na knockout embrijima miševa otkrila je da potpuni nedostatak HIF-1 $\alpha$  dovodi do ugibanja embrija sredinom graviditeta sa defektima otvorene neuralne cijevi, srčanim i vaskularnim malformacijama, vaskularnom regresijom, smanjenom eritropoezom, po čemu normalni razvoj sve tri komponente cirkulatornog sustava (srce, žile, eritrociti) ovisi o HIF-1 (IYER i sur., 1998a; WENGER, 2002; YOON i sur., 2006; SEMENZA i PRABHAKAR, 2018). Kako je u miševa bez HIF-1 tako je i u miševa bez HIF-2 došlo do ugibanja embrija te je zabilježena nedovoljna proizvodnja kateholamina koja je vodila ka embrijskoj smrtnosti, vjerojatno zbog bradikardije (TIAN i sur., 1998; WENGER, 2002). Intermitentna hipoksija prisutna npr. kod opstruktivne apneje u snu povećava u glomusnim stanicama karotidnih tijela HIF-1 $\alpha$ -ovisnu ekspresiju *Nox2* i pripadajući prooksidantni enzim i smanjuje HIF-2 $\alpha$ -ovisnu ekspresiju *Sod2*, koji kodira antioksidantni enzim superoksid dismutazu 2 (SOD2), što pridonosi stalno povišenim razinama

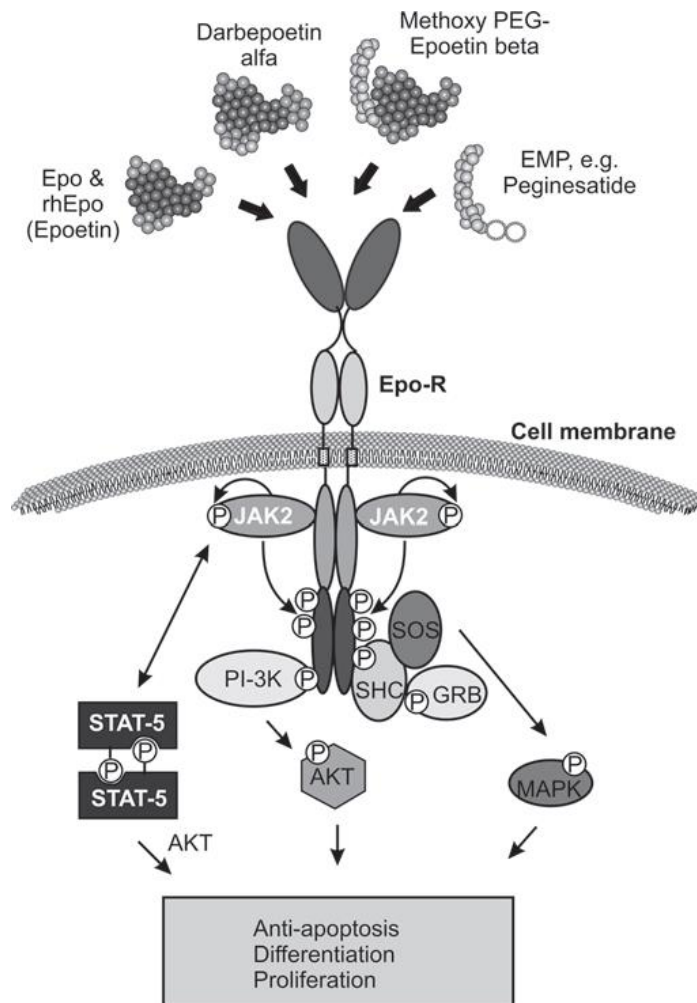
ROS-a i patofiziologiji bolesti (pregledno u SEMENZA i PRABHAKAR, 2018). Čimbenik VEGF koji kontrolira angiogenezu kako u normalnom tako i u tumorskom tkivu i eritropoetin, dva su proteina kritična za lokalni, odnosno sistemski odgovor na hipoksiju posredovan aktivacijom HIF kompleksa (SEMENZA i PRABHAKAR, 2018), slijedi ih bFGF te će u nastavku biti detaljnije opisana njihova uključenost u odgovor i regulacija, kao primjer.

### **2.3.5. Odgovor hematopoetskog sustava na hipoksiju i regulacija eritropoeze**

Glavni homeostatski mehanizam za održavanje tkivne oksigenacije posredovan HIF-om jest povećanje broja eritrocita u cirkulaciji kroz poticanje sinteze eritropoetina i posljedično povećanje intenziteta eritropoeze (WANG i SEMENZA 1993). Eritropoeza je složeni proces nastanka crvenih krvnih stanica, visoko specijaliziranih stanica s funkcijom transporta O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>, iz pluripotentnih matičnih stanica, reguliran nizom citokina (stimulirajućih i inhibirajućih čimbenika rasta), a kojeg najviše potiče i kontrolira glikoproteinski hormon eritropoetin (EPO) (WANG i SEMENZA, 1993; PAVLIŠA, 2006). U sisavaca, koštana srž je dominantno mjesto proizvodnje eritrocita nakon rođenja i u odrasloj dobi, dok su to u fetalnom stadiju jetra i slezena (JELKMANN i METZEN, 1996). Eritropoetin je jedini hematopoetski čimbenik rasta čija je proizvodnja regulirana tlakom kisika u tkivima (pO<sub>2</sub>) i tkivna hipoksija je najjači podražaj za njegovu proizvodnju (PAVLIŠA, 2006). Parcijalni tlak O<sub>2</sub> u tkivu, ovisi o arterijskom pO<sub>2</sub>, koncentraciji hemoglobina i njegovom afinitetu za vezanje O<sub>2</sub>, stupnju lokalnog protoka krvi, stupnju stanične potrošnje kisika. U odraslih sisavaca, glavno mjesto proizvodnje eritropoetina su bubrezi, odnosno intersticijski fibroblasti uz peritubularne kapilare kore bubrega i vanjskog sloja srži, bez očiglednih specijaliziranih obilježja. U određenom postotku sintetiziraju ga i hepatociti, što čini jetru glavnim ekstrarenalnim mjestom proizvodnje (BACHMANN i sur., 1993; MAXWELL i sur., 1993b; RATCLIFFE, 2007; RATCLIFFE, 2013). U fetusu jetra je primarno mjesto proizvodnje (JELKMANN i METZEN, 1996; KAELIN 2017). U glodavaca, hipoksijom inducibilna *Epo* mRNA u zanemarivim količinama detektirana je i u drugim organima, kao npr. slezeni, plućima, mozgu, testisima, koštanoj srži (diskutabilno), što je isto sugeriralo postojanje mehanizama osjetljivih na kisik i u drugim organima (TAN i sur., 1992; MAXWELL i sur. 1993a; JELKMANN i METZEN, 1996). Intersticijski fibroblasti bubrega u hipoksiji pojačano proizvode eritropoetin što je inducirano dominantno eksprimiranim HIF-2 $\alpha$  (LEE i sur., 2019). Aktivacija HIF-a u epitelnim stanicama proksimalnih tubula koje ne sintetiziraju EPO mogu negativno modulirati EPO produkciju i eritropoezu (FARSIJANI i sur., 2016). O HIF-u ovisna indukcija PHD3 vjerojatno potiskuje

povratnom spregom hepaticnu EPO produkciju i suzbija HIF odgovor na produljenu hipoksiju (MINAMISHIMA i sur., 2009).

Cirkulirajuće razine eritropoetina mogu se povisiti nekoliko stotina puta unutar nekoliko sati nakon hipoksične stimulacije (RATCLIFFE, 2006). Eritropoetin krvlju dolazi prvenstveno do koštane srži gdje se veže na izvanstanični dio specifičnih, eritropoetinskih receptora na eritrogenim ranim i kasnim progenitorskim stanicama, što uzrokuje konformacijsku promjenu receptora, a ona aktivira Janus kinazu 2 (JAK2), protein vezan za citoplazmatski dio receptora. Aktivacijom JAK2 počinje unutarstanično prenošenje signala. Dolazi do fosforilacije citoplazmatskih ostataka EPO receptora te aktivacije citosolnih proteina, STAT-5 (prenosioca signala i aktivatora transkripcije-5), MAP kinaze (MAPK), fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K) i anti-apoptotske kinaze (AKT). Kinaze ili fosfotransferaze su enzimi koji prenose fosfatne grupe na specifične molekule (supstrate), a proces zovemo fosforilacija. Biološka posljedica ovih složenih kaskadnih događaja je supresija apoptoze i stimulacija preživljavanja, proliferacija i diferencijacija eritrocitnih progenitorskih stanica, CFU-E (*engl.* colony-forming unit-erythroid), BFU-E (*engl.* burst-forming unit-erythroid), sazrijevanje proeritroblasta i normoblasta (Slika 6.) te na kraju povećanje koncentracije eritrocita u krvi nakon nekoliko dana (PAVLIŠA, 2006; pregledno u JELKMANN, 2013). Retikulocitoza postaje očita otprilike 3-4 dana nakon akutnog povećanja eritropoetina u plazmi, potrebno je par dana za sazrijevanje i diferencijaciju proeritroblasta do retikulocita u četiri do pet dioba stanica (JELKMANN i METZEN, 1996). Nakon stimulacije eritropoeze nastaje privremena policitemija (eritrocitoza) što povećava kapacitet krvi za prijenos kisika, smanjuje se hipoksija i negativnom povratnom spregom smanjuje proizvodnja eritropoetina (PAVLIŠA, 2006). Na taj način je HIF kompleks u hipoksiji uključen u regulaciju proizvodnje eritrocita. Normalna niska koncentracija eritropoetina omogućuje samo malom postotku CFU-E da prežive i proliferiraju, dok ostatak podliježe apoptozi. Dugoročna stimulacija proizvodnje eritropoetina pri rezidentnosti na visokim nadmorskim visinama postaje negativnom prilagodbom zbog toga što se zajedno s porastom hematokrita povećava viskoznost krvi i rad srca. Pri visokom  $pO_2$  u tkivu, proizvodnjom ROS-a može se inhibirati ekspresija *EPO* gena. Također može biti inhibirana molekulama GATA-2 i nuklearnim čimbenikom  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) u kroničnim upalnim stanjima (JELKMANN i METZEN, 1996; LA FERLA i sur., 2002).



**Slika 6.** Unutarstanično prenošenje signala nakon vezanja eritropoetina za eritropoetinski receptor. Objašnjenje u tekstu. SHC (*engl.* SH2 adaptor protein C), SOS (*engl.* Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor), GRB (*engl.* growth factor receptor bound protein) (JELKMANN, 2013).

Ukoliko nedostaje EPO (npr. zbog bubrežnih bolesti), EPO receptor ili dolazi do pogrešaka u signalizaciji, eritroidne progenitorske stanice ne sazrijevaju i podliježu apoptozi na razini CFU-E i eritroblasta (PAVLIŠA, 2006, JELKMANN, 2013). Eritropoetin ujedno potiče skladištenje željeza u njih povećanjem ekspresije transferinskih receptora (WEISS i sur., 1997; PAVLIŠA, 2006), a i HIF kompleks pojačava ekspresiju receptora i samog transferina. Nedostatak eritropoetina vodi u anemiju (JELKMANN i METZEN, 1996), no za normalnu eritropoezu potrebni su i metali željezo, kobalt, vitamini B<sub>12</sub>, C, folati te manjak navedenih spojeva također vodi u anemiju.

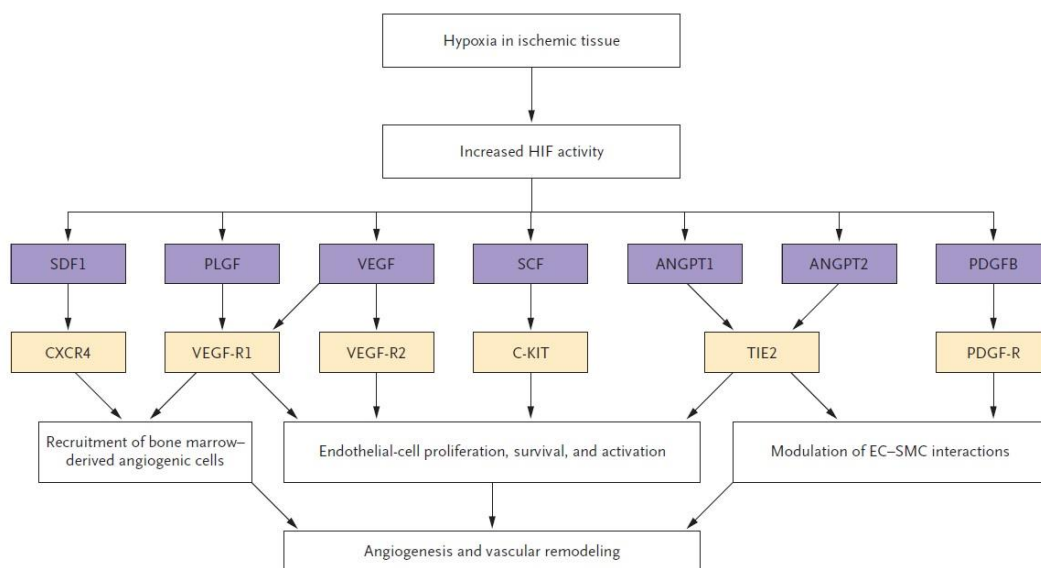
Djelovanje eritropoetina uglavnom je ograničeno na eritrocitnu lozu, no uz interakciju s drugim citokinima, također može povećati rast pluripotentnih matičnih stanica i megakariocitnih progenitora te može poticati rast u nehematopoetskim tkivima, a ima određene

uloge u CNS-u. Osim na hematopoetskim progenitorskim stanicama, receptori za eritropoetin nađeni su i na mišićnim, endotelnim, renalnim epitelnim stanicama, stanicama srčanog mišića i neuronima, a ekspresija *EPO* gena zabilježena je u mozgu, očima, testisu. Hipoksija dovodi do povećane ekspresije eritropoetinskih receptora na neuronima čime oni postaju pojačano osjetljivi na eritropoetin. *In vitro* eritropoetin može stimulirati migraciju i proliferaciju endotelnih stanica, inducirati proliferaciju i kontrakciju vaskularnih glatkomišićnih stanica, ima neurotrofne učinke na kultivirane neurone te *in vivo* podržava preživljavanje ozlijeđenih neurona i stimulira angiogenezu (pregledno u JELKMANN i METZEN, 1996; MAXWELL, 2003; PAVLIŠA, 2006). Eritropoetin štiti kardiomiocyte od ishemije i infarkta, pretpostavlja se da pri upali i ishemiji potiče neovaskularizaciju mobiliziranjem endotelnih progenitorskih stanica (EPC) iz koštane srži (PAVLIŠA, 2006).

### **2.3.6. Angiogeneza kao odgovor krvožilnog sustava na hipoksiju**

Kako bi se sva tkiva i stanice opskrbile kisikom, osim eritrocita kao prijenosnika kisika, prijeko je potrebna mreža krvnih žila kojima se oni prenose u sve dijelove tijela. Angiogeneza, složeni proces nastajanja novih kapilara iz već postojećih, od posebnog je značaja kada potrebe za kisikom nadilaze trenutnu opskrbu i nužno treba omogućiti veći protok krvi i kisika. Tijekom fiziološkog razvoja, angiogeneza igra vitalnu ulogu u stvaranju krvnih žila organa u razvoju kao npr. mozga, bubrega ili udova tijekom embriogeneze, ali je uglavnom u mirovanju u tijelu odraslih jedinki, s prolaznom aktivacijom tijekom zacjeljivanja rana i reproduktivnog ciklusa (GARCIA, 2020). Nove kapilare formiraju se pupanjem iz postojećih kapilara i postkapilarnih venula u nekoliko koraka: najprije lokalno dolazi do razgradnje bazalne membrane krvne žile, odvajanja pericita, formiraju se pupoljci prema hipoksičnom tkivu, zatim ovdje migriraju endotelne stanice i dijele se, formira se lumen nove nezrele kapilare i premještaju se periciti, sazrijevaju nove kapilare, a obližnji pupoljci mogu se spojiti i stvarati petlje (FOLKMAN, 1986). Neovaskularizacija tkiva javlja se i u različitim patološkim stanjima, poznato je da može biti aktivirana rastom solidnih tumora i može ubrzati progresiju bolesti kod malignih neoplazija. Fiziološka angiogeneza regulirana je ravnotežom i složenim interakcijama između pozitivnih i negativnih angiogenih čimbenika. Poznato je preko 24 proangiogenih čimbenika, od kojih najsnažniji učinak imaju čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF) i bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) čiju ekspresiju snažno potiče sistemska i lokalna hipoksija (PAVLIŠA, 2006; GARCIA, 2020). Proangiogeni čimbenici također su uključeni u remodeliranje kolateralnih krvnih žila iz postojećih arteriola kako bi se zaobišla stenotična ili začepljena

područja arterija (arteriogeneza, za koju se smatra da ju ne potiče hipoksija nego upala) (WEEL i sur., 2008). Formiranje i sazrijevanje krvnih žila su vrlo složeni procesi koji zahtijevaju koordinirano djelovanje angiopoietina, trombocitnog čimbenika rasta B (PDGFB - *engl.* platelet-derived growth factor B), trombocitnog aktivirajućeg čimbenika (PAF - *engl.* platelet activating factor) i drugih čimbenika (BUSSOLINO i sur., 1996; JAIN, 2003 cit. po FERRARA i sur., 2004). HIF-1 kontrolira ekspresiju više gena koji kodiraju za angiogene čimbenike rasta kao VEGF, stromalni čimbenik 1 (SDF1), čimbenik rasta placente (PLGF), PDGFB, angiopoietin 1 i 2 (ANGPT1 i ANGPT2), čimbenik matičnih stanica (SCF - *engl.* stem cell factor ili c-kit ligand) i dr. koji su uključeni u različite korake angiogeneze (REY i SEMENZA, 2010). Angiogeni čimbenici se vežu za određene receptore na endotelnim stanicama krvnih žila, pericitima, glatkim mišićnim stanicama kao i na angiogenim stanicama iz koštane srži (uključujući endotelne progenitorske stanice, mezenhimalne matične stanice, proangiogene mijeloidne stanice) do kojih dolaze cirkulacijom i stimuliraju ih na mobilizaciju iz koštane srži u ishemično tkivo te potiču angiogenezu, arteriogenezu i vaskularno remodeliranje (BOSCH-MARCÈ i sur., 2007; SEMENZA, 2011) (Slika 7.). U posljednjim desetljećima utvrđeno je da osim VEGF-VEGFR i druge različite signalne molekule igraju važnu ulogu u angiogenezi, poput ephrin-Eph receptora, angiopoietin-Tie i Delta-Notch sustava (SCHIBUYA, 2011). Molekula VEGF ima ključnu ulogu u regulaciji fiziološke i patološke angiogeneze.



**Slika 7.** Vaskularni odgovor na hipoksiju potaknut s HIF-1.

Različiti čimbenici (označeni ljubičasto) vežu se na receptore (označene narančasto). EC (endotelne stanice), SMC (glatke mišićne stanice) (SEMENZA, 2011).

### 2.3.6.1. Proangiogeni čimbenici VEGF i bFGF i regulacija njihove ekspresije hipoksijom

Kada u hipoksičnim uvjetima dođe do formiranja HIF kompleksa, on se veže za HRE na 5'-kraju *VEGF* gena ili u području HRE *b-FGF* gena te gena za pripadajuće receptore i pojačava njihovu transkripciju. Porast sekrecije biološki aktivnog VEGF-a djelomično je uzrokovan porastom transkripcije *VEGF* gena te posttranskripcijski porastom stabilnosti *VEGF* mRNA. Unutarnje ribosomsko ulazno mjesto (IRES) osigurava uspješan ulaz *VEGF* mRNA u ribosome. pVHL tumor supresor protein regulira ekspresiju VEGF na posttranskripcijskoj razini (LEVY i sur., 1996; BOS i sur., 2005; pregledno u SHIH i CLAFFEY, 1998 cit. po PAVLIŠA, 2006). Na ekspresiju *VEGF* gena, mRNA i/ili oslobađanje proteina mogu utjecati i drugi citokini (EGF, PGE2, TGF- $\beta$ / $\alpha$ , IL-1 $\beta$ / $\alpha$ , IL-6, mitogen malignih stanica IGF-I), barem u staničnim kulturama, te stanična diferencijacija i transformacija, tako nekoliko nepovezanih promjena u staničnim regulatornim putevima rezultira u pojačanoj ekspresiji VEGF-a (FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997).

Protein VEGF s pripadajućim receptorima regulira vaskulogenezu tijekom embriogeneze i kasnije angiogeneze. Ukupno ima barem sedam *VEGF* gena i do četiri za receptore (VEGFR), a pet gena za ove čimbenike postoje u genomima sisavaca. VEGF porodica uključuje dimerni glikoprotein VEGF-A, zatim VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, čimbenik rasta placente PLGF i VEGF-E (Orf-VEGF) (pregledno u SCHIBUYA, 2011). Izomorfni oblici VEGF (A-D) imaju fizičke razlike, također neki čimbenici vežu se za isti, a neki za različiti tip VEGF receptora. Djelovanje VEGF-A predstavlja korak koji ograničava brzinu u normalnom i patološkom rastu krvnih žila. VEGF-C i VEGF-D reguliraju limfatičnu angiogenezu i vežu se za VEGFR-3 (pregledno u FERRARA i sur., 2004; PAVLIŠA, 2006). VEGF-B je primarno distribuiran u skeletnim mišićima i miokardu i koeksprimiran s VEGF-A (OLOFSSON i sur., 1996). Četiri glavne humane izoforme FERRARA i sur. (2005) navode pod oznakama VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, i VEGF<sub>206</sub> prema broju aminokiselina, a VEGF<sub>165</sub> kao fiziološki najznačajniju izoformu. VEGF-A ima glavnu ulogu u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi, najviše je istražena, a ujedno ima i raznolike funkcije: uz proangiogenu aktivnost povećava vaskularnu permeabilnost, stimulira stanične migracije linije makrofaga i endotelnih stanica (SCHIBUYA, 2011). Sama izoforma isto ima svoje varijetete. Hipoksijom i HIF-om inducirana ekspresija *VEGF* gena stvara protein VEGF-A koji se može vezati za dva transmembranska receptora na endotelnim stanicama, VEGFR-1 (Flt-1) ili VEGFR-2 (KDR/Flk1 u ljudi/miševa) i aktivira ih. Oba receptora imaju slične fiziološke učinke i imaju citoplazmatsku tirozin kinaznu domenu.



Nekinasni receptori, neuropilin 1 i 2 (NRP-1, NRP-2) koji se obično povezuju s neuralnim sustavom, ujedno su i receptori za neke izoforme VEGF-a koji prezentiraju VEGF<sub>165</sub> receptoru VEGFR-2 i potenciraju signalizaciju VEGFR-2 (TERMAN i sur., 1992; de VRIES i sur., 1992; SOKER i sur., 1998; FERRARA, 2004; FERRARA i sur., 2004; FERRARA i sur., 2005).

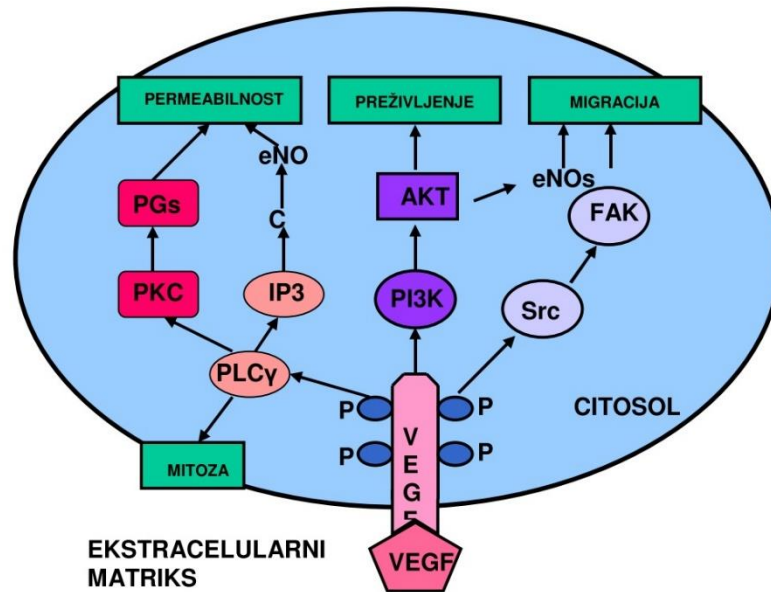
Vežanjem za izvanstanični dio spomenutih receptora, VEGF pokreće sekundarne kaskadne stanične reakcije koje započinju autofosforilacijom tirozinskih ostataka unutarstanične domene receptora, a rezultiraju višestrukim učincima VEGF-a na endotelne stanice krvnih žila koji zajedno dovode do neoangiogeneze: stimulirane su na migraciju, diobu, formiranje lumena, potaknuto je njihovo preživljavanje, mijenja se propusnost kapilara, ekspresija gena i pripadajućih specifičnih proteina (DVORAK i sur., 1995).

Preživljenje endotelnih stanica ovisno o VEGF-u je djelomično posredovano aktivacijom anti-apoptotske kinaze (AKT) koja je sama aktivirana s PI3K, dok je mehanizam aktivacije PI3K nedovoljno poznat. Aktivirana AKT fosforilira i inhibira proapoptotski protein zvan Bad te dolazi do inhibicije kaspaza - proteolitičkih enzima važnih u procesima apoptoze, nekroze i upale. Enzim AKT ujedno putem fosforilacije uzrokuje Ca<sup>2+</sup> neovisnu aktivaciju endotelne sintaze dušikovog oksida (*engl.* endothelial nitric oxide synthase - eNOS) što je neophodno za staničnu migraciju. Glavni mitogeni signalni mehanizam za VEGF je preko fosfolipaza C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) signalnog puta. Također aktivacija PLC $\gamma$  vodi stvaranju inozitol 1,4,5-trifosfata (IP3) i diacilglicerola (DAG) hidrolizom fosfatidilinozitol 4,5-difosfata te posljedičnoj mobilizaciji unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup>. Prenošenjem signala pomoću Ca<sup>2+</sup> dolazi do eNOS aktivacije čime se stvara NO, što ujedno rezultira povećanom međustaničnom permeabilnošću. Isto tako, aktivirana PLC $\gamma$  aktivira PKC (*engl.* protein kinase C) što vodi stvaranju COX-izvedenih prostaglandina uključujući PGI<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub> i posljedično tome vazodilataciji i povećanoj permeabilnosti krvnih žila (ZENG i sur., 2001; PAVLIŠA, 2006).

Receptor VEGFR-2 je glavni posrednik mitogeneze i preživljavanja endotelnih stanica i mikrovakularne permeabilnosti (FERRARA i sur., 2005). Glavni proangiogeni signal generira se iz aktiviranog VEGFR-2 s mjesta 1175-PY (1173-PY u miševa), a preferirani i ključni put za signalizaciju i proliferaciju endotela koji se inicira je PLC $\gamma$ -PKC-MAPK, SH2 domena PLC $\gamma$  specifično se veže na 1175-PY mjesto. Receptor VEGFR-2 ujedno i stimulira sekreciju različitih proteina kao von Willebrandovog čimbenika (vWF) iz endotelnih stanica, a u staničnoj kulturi iz embrionskih matičnih stanica. Signal s ovog receptora važan je za endotelnu specifikaciju progenitorskih stanica s receptorom dok je druga domena na receptoru važna za migraciju stanica. Receptor VEGFR-1 ima visok afinitet za VEGF-A, za jedan red veličina veći

od VEGFR-2, ali je njegova tirozin kinazna aktivnost približno 10 puta slabija od aktivnosti VEGFR-2 i signalna kaskada nije u potpunosti poznata pa se smatra da je izravna proangiogena aktivnost VEGFR-1 obično slaba ili nije otkrivena. Pored vaskularnih endotelnih stanica, VEGFR-1 eksprimiran je na stanicama loze makrofaga i olakšava njihovu migraciju, a u migracijski signal uključen je protein RACK1 kroz VEGFR-1/RACK1/PI3K/AKT put (pregledno u SHIBUYA, 2011). Receptor VEGFR-1 ne posreduje učinkoviti mitogeni signal u endotelnim stanicama i može u nekim okolnostima, osobito tijekom ranog embrionalnog razvoja, obavljati inhibitornu ulogu sekvstriranjem VEGF-a i sprječavanjem njegove interakcije s VEGFR-2, a čini se da VEGFR-1 igra bitnu ulogu u hematopoezi, u regrutaciji monocita i drugih stanica dobivenih iz koštane srži koje se mogu smjestiti u krvnu žilu tumora, kao i u indukciji metaloproteinaza matriksa i parakrinom otpuštanju čimbenika rasta iz endotelnih stanica (regulira ekspresiju mnogih gena u endotelu kao MMP9 i nekih čimbenika rasta) (pregledno u FERRARA i sur., 2004; FERRARA i sur., 2005). Topljivi oblik VEGFR-1 (sFlt-1), može se naći u trofoblastima, ali i različitim drugim stanicama i negativno regulira angiogenezu. Negativna uloga VEGFR-1 neovisna je o aktivnosti tirozin kinaze, ovisi o domeni za vezanje liganda (HIRATSUKA i sur., 1998; SHIBUYA, 2011). Receptor VEGFR-3 je eksprimiran na limfnim endotelnim stanicama i uključen je u stimulaciju limfangiogeneze (FERRARA i sur., 2004; SHIBUYA, 2011). Broj VEGF receptora po stanici varira u različitim tkiva (PAVLIŠA, 2006). Na Slici 8. shematski je prikazana signalizacija putem VEGF receptora.

Iako primarno djeluje na endotel krvnih žila, VEGF ima učinak i na druge vrste stanica ako imaju VEGF receptor pa tako stimulira monocito-makrofagnu kemotaksiju, ima učinak na limfocite, granulocitno-makrofagne progenitorske stanice, osteoblaste, epitelne stanice, receptori su izraženi i na tumorskim stanicama koje luče VEGF (HEROLD-MENDE i sur., 1999; PAVLIŠA, 2006), a učinke mitogeneze/preživljavanja ima i na živčane stanice (CARMELIET, 2003), esencijalan je za enhondralno okoštavanje (GERBER i sur., 1999), keratinociti u zaraštavanju eksprimiraju *VEGF* mRNA te se pretpostavlja da je ponegdje potreban i za održavanje diferenciranog stanja krvnih žila (FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997).



**Slika 8.** Prenošenje signala u stanici nakon vezanja VEGF-a za receptor i učinici pokrenutih signalnih puteva. Objasnjenje u tekstu. FAK (*engl.* focal adhesion protein), Src (proto-onkogeni tirozin-protein kinaza) (PAVLIŠA, 2006)

Osim u angiogenezi VEGF ima značajnu ulogu u upalnim procesima, nekim patološkim stanjima pošto povećava permeabilnost, zaraštanju rana, razvoju embrija, reproduktivnom ciklusu i graviditetu (DVORAK i sur., 1995). Miševi koji nemaju VEGF receptore ugibaju u embrionalnoj fazi razvoja (SHALABY i sur., 1999). Niski  $pO_2$  tijekom treninga pojačava mišićnu ekspresiju VEGF-a koji se pokazao ključnim angiogenim čimbenikom rasta u skeletnim mišićima te nema odgovarajućeg paralelnog ili kompenzacijskog puta za VEGF u skeletnim mišićima. Delecija gena u knockout miševima uzrokuje nestanak 2/3 mišićnih kapilara u regijama bez VEGF-a, tijekom vremena ne dolazi do porasta broja kapilara, nego kasnije do apoptoze. Delecija *VEGF-a* u plućima isto dovodi do apoptoze stanica i fenotipa sličnog emfizemu (pregledno u WAGNER, 2008). S druge strane, povećanje ekspresije *VEGF* gena povezana je s patogenezi bolesti kao npr. reumatoidnim artritismom (KOCH i sur., 1994), psorijazom, endometriozom (FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997), VEGF je uključen u intraokularnu neovaskularizaciju povezanu s dijabetičkom retinopatijom i dobnom degeneracijom makule (FERRARA i sur, 2005), ali naročito se veže uz maligni rast tumora i metastaziranje (DIRIX i sur., 1997). Postoje indikacije da VEGF ima ulogu u patogenezi emfizema i kroničnog bronhitisa i njihovim različitim patofiziološkim manifestacijama (PAVLIŠA, 2006).

Čimbenici rasta fibroblasta (FGF) čine porodicu od barem sedam polipeptida od kojih su najbolje istraženi kiseli FGF i neglikolizirani bazični FGF. Osim na fibroblastima, receptori velikog afiniteta za b-FGF nađeni su na površini endotelnih i epitelnih stanica, stanica glatkih mišića, hondrocita, hepatocita, tumorskim stanicama i dr. Makrofagi kao odgovor na hipoksiju uz VEGF produciraju b-FGF. Vežući se za specifični glikozilirani polipeptidni receptor s N-vezanim karbohidratnim ostatkom neophodnim za funkciju, b-FGF potiče formiranje molekula DAG i IP3 koje sekundarno aktiviraju protein kinazu C i mobiliziraju  $Ca^{2+}$  te tako posreduju mitogenezu - indukciju mitoze u stanici (PAVLIŠA, 2006). Polipeptid b-FGF je multipotentni čimbenik koji posreduje u nizu procesa nužnih za angiogenezu, stimulira proliferaciju mnogih tipova stanica, migraciju, diferencijaciju stanica i kemotaktični je čimbenik za brojne stanice pa tako i za endotelne stanice za koje je i mitogen, stimulira ih na proizvodnju kolagenaze i aktivatora plazminogena, te proteaza koje razgrađuju bazalne membrane i inducira migraciju endotelnih stanica u kolageni matriks i formiranje lumena (pregledno u KLAGSBRUN, 1989; BUSSOLINO i sur., 1996; PAVLIŠA, 2006). Prema nekim istraživanjima i FGF se uključuju u zaraštanje rana i oporavak tkiva, embrionalni razvoj i diferencijaciju, neuralne funkcije i neuralne degeneracije, a bFGF je neophodan za održavanje proliferacije hematopoetskih progenitorskih stanica (KASHIWAKURA i TAKAHASHI, 2005; PAVLIŠA, 2006). Dokazano *in vitro*, b-FGF može potaknuti angiogenezu i poboljšati perfuziju ishemičnog miokarda u kojem je kao i VEGF nađen u povišenoj koncentraciji, pomoći u liječenju perifernih vaskularnih patologija, a mogao bi imati ulogu u etiologiji bolesti kao što je kronična opstruktivna plućna bolest (PAVLIŠA, 2006). Povišene serumske koncentracije b-FGF-a nađene su u ljudi s koronarnom bolesti srca, aterosklerotskim lezijama, s različitim tipovima malignih oboljenja zajedno uz povišen VEGF, a b-FGF kao i VEGF pridonosi rastu i angiogenezi brojnih tumora (BUSSOLINO i sur., 1996; DIRIX i sur., 1997; PAVLIŠA, 2006). U mnogim tumorskim staničnim linijama je izražen bFGF, a ekspresija PLGF je zabilježena u staničnim linijama nekih karcinoma mliječne žlijezde, kolona i bubrega (pregledno u BUSSOLINO i sur., 1996).

Djelovanjem spomenutih proangiogenih čimbenika i indukcijom angiogeneze povećava se vaskularna gustoća u hipoksičnim tkivima i time smanjuje udaljenost na kojoj kisik mora difundirati do cilja. Lokalni protok krvi u patofiziološkim uvjetima kontroliran je modulacijom vaskularnog tonusa kroz stvaranje NO djelovanjem iNOS-a, CO pomoću hemeoksigenaze 1, endotelina 1, adrenomedulina, ili aktivacijom  $\alpha_{1B}$ -adrenergičkog receptora, čiji su svi geni ciljani s HIF-1. NO je najpotentniji medijator vazodilatacije. HIF-1 posreduje angiogenezu pomoću mehanizama mnogo kompleksnijih od jednostavne VEGF indukcije, vjerojatno

uključivanjem dodatnih gena čiji proteinski produkti sudjeluju u sazrijevanju žila (pregledno u WENGER, 2002; BUSSOLINO i sur., 1996).

#### **2.3.6.1.1. Drugi citokini i hipoksija**

Citokini su mali glikoproteini koje oslobađaju mnoge vrste stanica (uz eritropoetin kao iznimku) na razne podražaje i izazivaju odgovor vežući se na specifične receptore na površini ciljane stanice te je obično potrebno usklađeno istovremeno djelovanje više citokina, čime se postiže uvećavanje signala. Djeluju lokalno - autokrino, parakrino, a iznimno endokrino poput pravog hormona, kao npr. EPO (PAVLIŠA, 2006). Različiti citokini mogu djelovati slično ili isto, jedan čimbenik rasta može imati višestruke funkcije ovisno o ciljanoj stanici te nisu specifični za staničnu liniju, ali pokazuju svoj učinak pretežno samo na prekursorskoj stanici jedne linije. Hematopoetski čimbenici rasta (također citokini) koji djeluju na kolonije hematopoetskih stanica kao npr. EPO, trombopoetin (TPO) upravljaju hematopoezom: imaju ulogu u međustaničnoj komunikaciji, potiču preživljavanje prekursorskih stanica supresijom apoptoze, potiču proliferaciju stanica, kontroliraju i reguliraju proces diferencijacije, kojim u konačnici nastaju zrele funkcionalne stanice iz multipotentnih progenitornih prekursorskih stanica. Negativni regulatori hematopoeze inhibiraju staničnu proliferaciju kao npr. interferoni, TGF- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor beta), TNF- $\alpha$ , prostaglandini E i dr. (MAREVIĆ, 2019). Čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je citokin sa središnjom ulogom u upali, apoptozi i imunosnom odgovoru. Može imati ulogu u razvoju limfoidnog tkiva i u regulaciji diferencijacije matičnih hematopoetskih stanica i progenitorskih stanica, a kao i TNF- $\beta$  inhibirati ekspresiju gena za VEGFR-2 (FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997; PAVLIŠA, 2006). Protein TNF- $\alpha$  djeluje na krvne žile, osobito venule povećavajući protok krvi i propusnost krvnih žila. Interleukini, citokini koje izlučuju leukociti i ujedno djeluju na njih, imaju višestruki učinak koje je vezan i s NF- $\kappa$ B reguliranom transkripcijom. Interleukin-1 (IL-1), 1 $\beta$  dominantan u ljudi, 1 $\alpha$  u miševa, koji primarno stvaraju monociti i makrofagi, ali i mnoge druge stanice, inicira upalne reakcije. Povezan je i s remodeliranjem kostiju, sekrecijom inzulina, regulacijom apetita, regulacijom tjelesne temperature, razvojem neuronalnog fenotipa. Interleukin IL-6 uglavnom stvaraju stimulirani monociti, fibroblasti i endotelne stanice, ali i mnoge druge stanice. Sudjeluje u upalnom i imunom odgovoru, djeluje kao čimbenik rasta na određen tip stanica, recimo kolonije hematopoetskih stanica, indirektno je povezan s aktivnom angiogenezom jer potiče ekspresiju VEGF-a (pregledno u PAVLIŠA, 2006).

Sve je više znanstvenih dokaza da hipoksija potiče promjene imunološkog sustava, a mononuklearne stanice su osobito osjetljive na hipoksemiju u zdravih jedinki. U eksperimentalnim uvjetima, hipoksija potiče endotelne stanice krvnih žila na sekreciju IL-6, što dovodi do povećanja njihove propusnosti. IL-6 u hipoksiji izlučuju i stanice glatkih mišića krvnih žila i mononuklearne stanice. Humani alveolarni makrofagi i mononuklearne stanice periferne krvi pojačano luče IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Proizvodnja IL-6 viša je u monocita pacijenata sa sindromom apneje u snu te je povišena razina TNF- $\alpha$ . U određenim patofiziološkim stanjima odgovor na hipoksiju može biti smanjen, kao recimo eritropoetinski odgovor u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti ili u anemijama kroničnih bolesti, a to može biti posredovano spomenutim citokinima (pregledno u PAVLIŠA, 2006).

Ekspresija *VEGF* i *EPO* gena osim hipoksijom može biti modulirana hormonima, genskim alteracijama i citokinima (JELKMANN, 1998). Interferon (IFN- $\gamma$ ), IL-1 i TNF- $\alpha$  imaju suprimirajući učinak na eritrogene progenitorske stanice, a TNF može pojačavati njihovu apoptozu. U *in vitro* studijama IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  inhibiraju hipoksijom potaknuto lučenje EPO, aktivacijom transkripcijskih čimbenika GATA-2 i NF- $\kappa$ B. Studije uglavnom upućuju na inhibitorni učinak proinflamatornih citokina na ekspresiju EPO i poticajni učinak na sintezu čimbenika rasta krvnih žila. TNF- $\alpha$  sudjeluje u neovaskularizaciji putem indukcije sinteze VEGF-a. Prema nekim radovima TNF- $\alpha$  stimulira, a prema drugima smanjuje ekspresiju *b-FGF* mRNA. Uz to, studije ukazuju da b-FGF može potaknuti sintezu VEGF-a. U normooksničnim uvjetima IL-1 $\beta$  povećava koncentraciju HIF-1 $\alpha$  proteina i aktivira *VEGF* gen putevima koji su ovisni o NF- $\kappa$ B. Također IL-1 povećava stabilnost *VEGF* mRNA. IL-6 posreduje povećanu ekspresiju VEGF-a transkripcijskim mehanizmom preko STAT-3, a ekspresiju bFGF-a preko JAK/STAT3 i PI3K/AKT puteva, barem *in vitro*. Učinak IL-6 nije posredovan isključivo pomoću DNA elemenata u području promotorskog područja, nego i kroz specifične motive locirane u području 5'- netranslatiranog područja *VEGF* mRNA (pregledno u PAVLIŠA, 2006).

#### **2.4. Terapijski potencijal VEGF modulatora i FIH/PHD/pVHL/HIF sustava**

Terapijsku važnost ekspresije HIF-1 $\alpha$  u ishemičnim stanjima već su prije 20-ak godina prepoznali IYER i sur. (1998a) kada su konstruirali *HIF1- $\alpha$*  promotor i predložili da bi se mogao koristiti u staničnom testu za probir lijekova koji povećavaju ekspresiju HIF-1 $\alpha$  *in vivo*. Razjašnjavanje aktivacije signalnih puteva u hipoksiji otvorilo je mogućnosti za njihovu manipulaciju i postizanje željenih ishoda u liječenju ili prevenciji određenih patoloških stanja,

kao npr. inaktivacijom ili aktivacijom različitih komponentni HIF signalnog puta ili molekula koje HIF potiče, kao VEGF. Počeo se istraživati terapijski potencijal kompetitivnih inhibitora HIF-hidroksilaza (IVAN i sur., 2002; HEWITSON i SCHOFIELD, 2004; NANGAKU i sur., 2007) pomoću analoga 2-oksoglutarata, ili inhibitora molekula čiju ekspresiju pripadajućih gena pojačava HIF. Inhibicija kojom se smanjuje PHD aktivnost ili povećava HIF aktivnost pokazala se uspješnom manipulacijom odgovora u liječenju patologija povezanih s nedovoljnom oksigenacijom tkiva kao što su anemije, ishemijski poremećaji, infarkti miokarda, kongestivno zatajenje srca, moždani udar, ishemične bolesti bubrega i neke kronične ozljede bubrega, akutne ozljede pluća, fibroza pluća i jetre. Ovom metodom stabilizira se HIF- $\alpha$ , inducira transkripcijska aktivnost HIF kompleksa te potiče proizvodnja eritrocita, vazodilatacija, poboljšava perfuzija, rast novih, kolateralnih krvnih žila i preživljavanje tkiva (PUGH i RATCLIFFE, 2003; KASIGANESAN i sur., 2007; pregledno u KAELIN i RARCLIFFE, 2008; LEE i sur., 2019). U slučajevima kao kronična ishemija udova zbog opstruktivne ateroskleroze ovo može biti alternativa nekim kirurškim zahvatima na žilama (FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997) Inhibitori PHD-a za liječenje spomenutih stanja korišteni su u predkliničkim modelima na životinjama, a neki su ušli u fazu kliničkih ispitivanja na ljudima (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Radi se na razvijanju EglN (PHD) inhibitora za liječenje anemije i ishemijskih bolesti za *per os* primjenu. Inaktivacija sva tri EglN (PHD) uzrokovala je neprekidnu proizvodnju i visoke razine hepatičkog EPO i može ispraviti anemiju kod anefričnih glodavaca. Prva generacija oralno dostupnih EglN inhibitora je napredovala čak do treće faze kliničkih testiranja u ljudi, za anemiju uzrokovanu kroničnom bolesti bubrega, nakon dobrih rezultata iz druge faze. Inhibicija EglN, koristeći genetske i farmakološke alate, pokazala se korisnim i u mišjim modelima infarkta miokarda i moždanog tkiva, a potrebno je tek istražiti ove dobrobiti na modelima velikih životinja (pregledno u KAELIN, 2017). LEE i sur. (2019) navode nekoliko načina koji ciljaju HIF put, najčešće se koriste aktivatori HIF-a, koji stabiliziraju HIF pri normalnim koncentracijama kisika, a interesantna je i farmakološka aktivacija HIF-a inhibicijom PHD-a. Upješniji su se pokazali inhibitori PHD-a nego povećanje HIF- $\alpha$  preko npr. adenovirusa i sl. (REY i sur., 2009; SEMENZA, 2011). Dokazana je korist dimetiloksalilglicina (DMOG), kompetitivnog inhibitora 2-oksoglutarat oksigenaza uključujući i PHD, djeluje na proces hidroksilacije prolina. Nespecifični PHD inhibitori kao vadadustat, roksadustat, molidustat i daprodustat se klinički ispituju za liječenje anemije u pacijenata s kroničnim bubrežnim bolestima, zatajenjima bubrega (REY i sur., 2009; KAELIN, 2017; LEE i sur., 2019). Pristupi koji se također istražuju su direktna suplementacija ciljanih molekula koje su niže u kaskadnom putu HIF-a kao eritropoetin ili agonisti receptora za koje je dokazana

uloga u HIF signalizaciji. Eritropoetin se istražuje zbog njegovog efekta zaštite srca i bubrega od akutnih ozljeda ili za tretiranje anemije u kroničnim bubrežnim bolestima. Specifični agonisti adenozijskih receptora kao neladenoson (ADORA1 agonist) ili regadenoson (ADORA2A agonist) su u kliničkim ispitivanjima kako bi se bolje razumio učinak koji mogu imati na zaštitu organa. Često korišten inhalacijski anestetik sevofluran može imati učinke kondicioniranja posredovane povećanjem HIF-1 $\alpha$  i smanjenjem kaspaze-3 (LEE i sur., 2019).

Hipoksija i HIF-hidroksilaza/pVHL/HIF sustav igraju podjednako važnu ulogu u patofiziologiji ishemijskih kardiovaskularnih bolesti, infarktu miokarda, moždanog udara, kroničnih bolesti pluća i u tumorigenezi (SEMENZA, 2000b; WENGER, 2002). Dokazano je da su nakon infarkta miokarda HIF-1 i VEGF pojačano izraženi u tkivu miokarda (GARCIA i sur., 2020). Raste broj podataka koji ukazuju da stabilizacija HIF-a štiti od ishemije i infarkta, dok s druge strane pridonosi patogenezi raka i hipoksične pulmonarne hipertenzije. Stoga su lijekovi koji povećavaju ekspresiju HIF-1 $\alpha$  korisni u liječenju ishemičnih stanja, no u terapiji neoplazija bi polučili kontraefekt odnosno poticali rast tumora, dok bi inaktivacija HIF-1 mogla biti od terapijske koristi kod tumora i nekih plućnih bolesti (hipertenzije). Učinci ovih manipulativnih terapija i dalje su predmet istraživanja (SEMENZA, 2000b i 2001; LEE i sur. 2019). U slučaju kardiovaskularnih bolesti, povećana aktivnost HIF-1 potaknuta HIF-1 $\alpha$  genskom terapijom (VINCENT i sur., 2000; KELLY i sur., 2003), malim molekularnim inhibitorima aktivnosti proliil-hidroksilaza (IVAN i sur., 2002) ili inhibitorima interakcije HIF-1 $\alpha$ -VHL (WILLAM i sur., 2002), može inducirati neovaskularizaciju ishemijskog tkiva. Mali molekularni inhibitori aktivnosti HIF-1 mogu biti korisni kao sredstva u terapiji raka (YEO i sur., 2003). Pošto je HIF-1 opći regulator homeostaze kisika u stanicama i utječe na mnoge fiziološke procese, ako se koristi kao terapijska meta treba imati na umu da liječenje može rezultirati nenamjernim i neželjenim nuspojavama. Za ublažavanje nuspojava alternativa je fokusiranje na proteine HIF-1 ciljanih gena. Primjena npr. eritropoetina može smanjiti apoptozu izazvanu ishemijom u bolesnika s akutnim cerebralnim ili miokardijalnim infarktom (CAI i sur., 2003; PARSA i sur., 2003; SEMENZA, 2004). Pitanje je također može li nužna dugotrajna primjena inhibitora PHD-a u npr. liječenju anemije, dovesti do neželjenih nuspojava poput poticanja rasta tumora ili štetnih učinaka na sistemsku fiziologiju. Pretpostavlja se da razine HIF- $\alpha$  potrebne za tumorigenezu premašuju one potrebne za eritropoezu i/ili da je tumorigeneza povezana s npr. *VHL* mutacijama uzrokovana deregulacijom HIF-a i gubitkom drugih funkcija pVHL. Delecija *HIF-1 $\alpha$*  pogoršava gubitak tkiva u pretkliničkim modelima infarkta miokarda (SHOHET i GARCIA, 2007). Gubitak funkcije PHD2 ili pVHL u srcu povezan je s razvojem



dilatativne kardiomiopatije, što ukazuje na to da bi kronična stabilizacija HIF-a mogla biti štetna (LEI i sur., 2008; MINAMISHIMA i sur., 2008) Aktivacija HIF-a može imati prednost u odnosu na liječenje rekombinantnim VEGF-om. Tako je kratkotrajna izloženost VEGF-u povezana s rastom propusnih žila koje mogu biti neželjene u liječenju ishemijskog tkiva. Suprotno tome, transgena ekspresija stabiliziranog gena za HIF-1 $\alpha$  u koži miševa potiče rast novih žila slabe propusnosti (ELSON i sur., 2001; RATCLIFFE, 2006).

Hipoksijom inducirana ekspresija može se oponašati inaktivacijom PHD-a konkurentnim analogima substrata, kelatorima željeza, oksidacijom ili zamjenom s ionima metala kao kobalt, rezultat toga je da prolinski ostaci nisu hidroksilirani. Proteasomalni inhibitori ili mutacija enzima E1 koji aktivira ubikvitin stabilizira  $\alpha$  podjedinicu, ali ovi inhibitori utječu na translokaciju podjedinice u jezgru pa ne dolazi do transkripcijske aktivacije gena (KALLIO i sur., 1999; EPSTEIN i sur., 2001; WENGER, 2002). Kelatori željeza remete povezanost VHL-a i HIF-1 $\alpha$ , u hipoksiji ostaju vezani te izostaje ubikvitinacija (SEMENZA, 2000a). ROS mogu modulirati HIF aktivnost utjecajem na brzinu hidroksilacije HIF- $\alpha$ . Genetske i farmakološke intervencije koje pojačavaju ili smanjuju stvaranje ROS-a pojačavaju ili smanjuju akumulaciju (nehidroksiliranog) HIF- $\alpha$ . Mogući mehanizam uključuje direktnu inhibiciju enzima, što je moguće *in vitro*, ili učinke ROS-a na razine askorbata, Fe(II) ili intermedijare Krebsovog ciklusa (KAELIN i RATCLIFFE, 2008).

Kisik je limitirajući substrat za hidroksilaciju u fiziološkim stanjima, ali čini se da u patofiziološkim stanjima i u normoksiji željezo i askorbat također mogu biti limitirajući (KNOWLES i sur., 2003; SEMENZA, 2004). U staničnim kulturama, antagonisti askorbinske kiseline i 2-oksoglutarata mogu smanjiti regulaciju HIF- $\alpha$  u tumorskim stanicama, vjerojatno pojačavanjem aktivnosti prolil-hidroksilaze, a i prema istraživanjima na miševima, antitumorski učinci antioksidansa kao askorbinske kiseline posljedica su smanjene regulacije HIF- $\alpha$  (KNOWLES i sur., 2003; GAO i sur., 2007; KAELIN i RATCLIFFE, 2008; KUIPER i sur., 2010). Mijenjanjem dostupnosti kofaktora hidroksilaza moglo bi se modulirati signalni put mijenjanjem brzine hidroksilacije pri bilo kojoj koncentraciji O<sub>2</sub>. Ujedno promjene u relativnim razinama metaboličkih međuposrednika potencijalno mogu modulirati HIF-signalizaciju. Hidroksilaze HIF-a mogu biti inhibirane citratom, izocitratom, sukcinatom, fumaratom, malatom, oksaloacetatom i piruvatom, zbog čega je potisnuta hidroksilacija i može se aktivirati HIF i u normalnim i tumorskim stanicama. Najjači učinci opaženi su sa fumaratom i sukcinatom koji inhibiraju sve tri PHD, u kompeticiji su sa 2-oksoglutaratom. Ove molekule manje su učinkoviti inhibitori FIH-1, koja je osjetljivija na citrat i oksaloacetat (POLLARD i sur., 2005;

HEWITSON i sur., 2007; pregledno u KAELIN i RATCLIFFE, 2008). JAAKKOLA i sur. (2001) su testirali učinak askorbata i nekoliko 2-oksoglutarat analoga na sposobnost inhibiranja PHD-a. N-oksalilglicin, N-oksalil-2S-alanin (i drugi) umjesto 2-oksoglutarata potpuno inhibiraju PHD, ali učinak nije jednostavno samo zbog kelacije  $\text{Fe}^{2+}$ . Željezo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) je labavo vezano u katalitičkom centru PHD-a i može biti istisnuto ili zamijenjeno drugim metalima kao  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i time PHD može izgubiti katalitičku aktivnost. Tako se npr. u eksperimentalnim uvjetima može pokrenuti transkripcija *EPO* gena nespecifičnim inhibitorima hidroksilaza, kobaltnim ionima (kobalt klorid) i kelatorima željeza (desferioksamin uklanja  $\text{Fe}^{2+}$ ), kao i drugi hipoksični odgovori koje pokreće HIF (JAAKKOLA i sur., 2001; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; RATCLIFFE, 2006). Pitanje je do koje mjere je aktivnost HIF-hidroksilaza regulirana fiziološkim ili patološkim promjenama u staničnoj dostupnosti  $\text{Fe}^{2+}$ . Pokazalo se da suplementacija sa željezom ili askorbatom znatno reducira razinu HIF-1 $\alpha$  što je ovisno o funkcionalnom sistemu hidroksilaza. Prema eksperimentima u kulturama tkiva postoje indikacije da su brzorastući zloćudni tumori povezani sa staničnom deficijencijom željeza u tumorskoj masi. Razumijevanje u kojoj mjeri ovo doprinosi aktivaciji HIF-a i potencijalno angiogenezi tumora interesantno je za buduće studije (LE i RICHARDSON, 2002; KNOWELS i sur., 2003; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004).

## 2.5. Biologija tumora

Tumore (neoplazije) obilježava poremećena regulacija kontrolnih mehanizama diobe stanica pa se one neograničeno umnožavaju ili regulacija vijabilnosti stanica pa se smanjuje apoptoza stanica koja je rezultat povećane ekspresije izlučenih čimbenika rasta/preživljavanja (SEMENZA, 2000b; HANAHAN i WEINBERG, 2011; SEMENZA, 2012a). Mutacije gena mijenjaju količinu ili funkciju proteina koji nadziru stanični rast, diobu i popravak DNA i velikim dijelom su odgovorne za nastanak zloćudnih stanica. Mutirani onkogeni i tumor-supresorski geni su dvije glavne skupine gena povezanih s tumorima (MSD priručnik, 2021).

S obzirom da povećanje tkivne mase povećava potrebe za kisikom, porast broja stanica povezan je s aktiviranjem HIF sustava (RATCLIFFE, 2013) pa tako koristan fiziološki mehanizam u slučaju tumorskog bujanja postaje štetan jer aktiviran pridonosi preživljavanju i rastu tumorskog tkiva. Oksigenacija tumora regulirana je ovim unutarnjim mehanizmima samih tumorskih stanica, ostale normalne stanice organizma izvan tumora nemaju neki utjecaj (WENGER, 2002). U tumorskim stanicama normalni mehanizmi povratne sprege poremećeni su somatskim mutacijama i epigenetskim promjenama (HARRIS, 2002; SEMENZA, 2010b).

Solidni tumori mogu rasti zahvaljujući difuziji kisika i hranjivih tvari iz okolnog krvotoka, ali samo do određene veličine. Prema animalnim modelima, za daljnje bujanje neoplazija i održavanje metaboličkih zahtjeva rastućeg tumora neophodna je dodatna krvožilna opskrba (HANAHAN i WEINBERG, 2011; GARCIA i sur., 2020). Lokalni rast olakšavaju enzimi (npr. kolagenaze) i citokini koji razaraju ili mijenjaju susjedna tkiva (MSD priručnik, 2021). Tumorski rast tako s vremenom prelazi vlastite angiogene sposobnosti pa se razvija hipoksija (MARTANO i sur., 2020). Kada je opskrba kisika i nutrijenta nedovoljna za stanice, tumori ne mogu rasti više od 2 mm u promjeru. Istraživanja mikrookoliša tumora otkrila su da HIF-1 među glavnim regulatorima putem kojeg stanice raka nadvladaju okolišni stres adaptacijama (FOLKMAN, 1971; SHIN i sur., 2015). Kao i kod zdravih stanica, VEGF (posebno VEGF-A) je ključni proangiogeni čimbenik koji izlučuju i tumorske stanice kako bi osigurale dodatnu perfuziju, upravo zbog njegove uloge u stimulaciji staničnog preživljavanja, mitogenezi, migraciji, diferencijaciji, krvožilnoj propusnosti i mobilizaciji progenitorskih stanica u perifernu cirkulaciju. Osim samih stanica i tumorska stroma može biti izvor VEGF-a, ovisno o tipu tumora (FERRARA i sur., 2004; GARCIA i sur., 2020). VEGF promovira ekstravazaciju plazmatskog fibrinogena i vodi do odlaganja fibrina, što utječe na tumorski ekstracelularni matriks. Ovako modificirani ekstracelularni matriks, posljedično potiče migraciju makrofaga, fibroblasta i endotelnih stanica (DVORAK i sur., 1995; PAVLIŠA, 2006). Ekspresija HIF-1 $\alpha$  direktno korelira sa VEGF ekspresijom i vaskularnosti mnogih malignih tumora. HIF-1 $\alpha$  i VEGF su glavni regulatori angiogeneze u tumorskom mikrookolišu i ključni u progresiji tumora te im je pojačana ekspresija u velikoj raznolikosti tumora. Zabilježena je povezanost VEGF-a te HIF- $\alpha$  s nepovoljnom prognozom jer aktivira gene relevantne u angiogenezi, invaziji i metastaziranju (pregledno u FERRARA i DAVIS-SMYTH, 1997 i MARTANO i sur., 2020). Angiogeneza u neoplazijama osim rastu pridonosi invazivnosti, metastazama, razvoju i progresiji mnogih humanih i animalnih malignih tumora (KIM i sur., 1993; MAIOLINO i sur., 2001; RESTUCCI i sur., 2002; RESTUCCI i sur., 2003; FERRARA i sur., 2004; MARTANO i sur., 2016; MARTANO i sur., 2020).

Mikrookoliš solidnih tumora karakteriziraju područja duboke hipoksije, acidoza, slobodni radikali, citokini i vezan je uz brojne abnormalnosti u ekspresiji i signalnom putu VEGF-a i njegovih receptora (GARCIA i sur., 2020). Pojačana ekspresija VEGF-a može se javiti neovisno o hipoksiji zbog onkogene mutacije *RAS*, mutacije u Wnt signalnom putu i tumor-supresorskih gena (ZHANG i sur., 2001; FERRARA i sur., 2005). Stanice tumora karakterizira poremećena proliferacija stanica, poremećaj difuzije, stimulirana je angiogeneza.

Krvne žile koje se formiraju unutar solidnih tumora često su strukturno i funkcionalno abnormalne, što dovodi do izrazite prostorne i vremenske heterogenosti u perfuziji tumorskog tkiva, poremećaja mikrocirkulacije. Posljedice su nedostatak ili čak prekid opskrbe kisikom u mikrookolišu tumora, ozbiljna hipoksija te s vremenom neke tumorske stanice postaju nekrotične zbog nedostatka kisika. Nekroza je uz hipoksiju još jedna prepoznatljiva intrinzička značajka solidnih tumora (SEMENZA, 2012a i b; ALBADARI i sur., 2019). Kako bi izbjegle smrt, tumorske stanice se i neovisno o angiogenezi trebaju prilagoditi hipoksičnim uvjetima. Stoga je kod većine solidnih tumora loš klinički ishod značajno povezan i sa gustoćom krvnih žila i hipoksijom u tumoru (SEMENZA, 2000b).

Hipoksija posreduje u prelasku s aerobnog na anaeroban metabolizam energije (ALBANDARI i sur., 2019). Tumorske stanice mijenjaju svoj metabolizam kako bi potaknule rast, preživljavanje, proliferaciju. U tumorskim stanicama i ostalim proliferirajućim stanicama preferirano se koristi glikolitički nad oksidativnim metabolizmom za stvaranje ATP-a, stupanj unosa glukoze i glikoliza dramatično se povećavaju, glukoza fermentira u laktat čak i u prisutnosti kisika i potpuno funkcionalnih mitohondrija, dolazi do tzv. aerobne glikolize. Ovaj proces, poznat pod nazivom Warburgov učinak, otkriven prije više od 90 godina, čije se funkcije i dalje istražuju, a postoje prijedlozi da je to adaptacijski mehanizam koji podržava biosintetske zahtjeve nekontrolirane proliferacije, anaboličke procese potrebne za staničnu proliferaciju. Zbog laktata smanjuje se pH u mikrookolišu (javlja se acidoza strome) što po nekim hipotezama pridonosi invazivnosti. Ipak, Warburgov efekt smatra se ranim događajem u onkogenezi koja je posljedica početne onkogene mutacije, javljajući se prije invazije stanica, kao i u benignim i ranim lezijama, a mijenja i mitohondrijski redoks-potencijal te produkciju ROS-a. Brzina metabolizma glukoze aerobnom glikolizom je veća, takva da se proizvodnja laktata iz glukoze događa 10-100 puta brže od potpune oksidacije glukoze u mitohondrijima. Po jednoj od hipoteza ova razlika u kinetici je razlog zašto maligni tumori koriste aerobnu glikolizu (WARBURG, 1925; WARBURG i sur., 1927; pregledno u LIBERTI i LOCASALE, 2016). Pregledno o metabolizmu i karakteristikama tumora pisali su HSU i SABATINI (2008), HANAHAN i WEINBERG (2011) i SORMENDI i WIELOCKX (2018). Adaptacijski mehanizmi u hipoksiji otežavaju liječenje čineći tumorsko tkivo otporno na kemo- i radijacijsku terapiju (MARTON, 2013).

### 2.5.1. HIF i maligni tumori

U većini humanih i animalnih primarnih solidnih malignih tumora i njihovim metastazama zabilježene su povišene razine HIF-1 $\alpha$  ili HIF-2 $\alpha$  proteina u hipoksičnim stanicama (ili oba kao npr. kod raka dojke) u odnosu na okolno normalno tkivo. Stanice raka s najvećom razinom ekspresije HIF-1 $\alpha$  nalaze se na najvećoj udaljenosti od krvne žile i stoga su najviše hipoksične (u ZHONG i sur., 1999; TALKS i sur., 2000; SEMENZA, 2003; SEMENZA, 2010b popis tipova tumora s imunohistokemijski dokazanim razinama HIF- $\alpha$  u biopsatima). Mnogi eksperimentalni i klinički podaci dokazuju da prekomjerna ekspresija HIF-1/2 $\alpha$  korelira s inhibicijom apoptoze, proliferacijom tumorskih stanica i metastazama, s lošom prognozom u pacijenata s malignim tumorima mliječne žlijezde, gušterače, jednjaka i drugim tumorima (KOUKOURAKIS i sur., 2002; pregledno u SEMENZA, 2003; DeBERARDINIS i sur., 2008; RANKIN i GIACCIA, 2008; SHIN i sur., 2015). Također studije pokazuju da postoji značajna povezanost između prekomjerne ekspresije HIF-1/2 $\alpha$  u karcinomu skvamoznih stanica glave i vrata, malignim tumorima mozga (oligodendrogliom), dojke, cerviksa, orofarinksa, jajnika (u kombinaciji s pojačanom ekspresijom p53), endometrija maternice, dr. i smanjenog preživljavanja pacijenata (mortaliteta) i neuspjeha liječenja (pregled radova i tipova tumora u SEMENZA, 2003; SEMENZA, 2010b). Zabilježeno je sniženo preživljavanje pacijenata s najvećom razinom HIF-1 $\alpha$  u malignim tumorima dojke, a s napredovanjem bolesti povećavao se postotak stanica s prekomjerenom ekspresijom HIF-1 $\alpha$ . Prekomjerna ekspresija također može biti prognostički pokazatelj nepovoljnog ishoda (DALES i sur., 2005; SEMENZA, 2012a). Rani stadiji bolesti obično su povezani s dobrom prognozom, ali studije ranih stadija malignih tumora jednjaka, dojke, cerviksa i endometrija pokazale su da je podskupina bolesnika čiji su tumori sadržavali visoku razinu HIF-1 $\alpha$  imala značajno povećanu stopu smrtnosti (SEMENZA, 2010b; MADEJ i sur., 2013). HIF-1 $\alpha$  razine uobičajeno su najviše u vijabilnim stanicama koje okružuju područje nekroze. Iako se uobičajeno vjeruje da je hipoksija prisutna samo u središnjim regijama velikih tumora, nekroza i perinekrotična HIF-1 $\alpha$  ekspresija zabilježena je u duktalnom karcinomu *in situ*, prema tome, ozbiljna hipoksija može biti prisutna čak i prije razvoja invazivnog karcinoma (BOS i sur., 2001; SEMENZA, 2012a).

Intratumorska hipoksija loš je prognostički čimbenik (SEMENZA, 2012a i b). Hipoksija i aktivacija HIF-a i HIF-om ciljanih gena u tumorskim i stromalnim stanicama solidnim tumorima povezani su s progresijom primarnih tumora i njihovih metastaza, agresivnim fenotipovima što uključuje otpornost na radioterapiju i kemoterapiju, metastaze (pojačava metastaziranje) i lošu prognozu pacijenta. Povezanost hipoksije s lošom prognozom neovisna

je o načinu liječenja (operacija, radioterapija, kemoterapija) i primijećena je u mnogih različitim tipova tumora (BRIZEL i sur., 1996; SEMENZA, 2003; CHI i sur., 2006; SEMENZA, 2012a; RATCLIFFE, 2013; ALBANDARI i sur., 2019).

Protein HIF je intrinzički marker tumorske hipoksije. Kisik inače ima presudnu ulogu u uspjehu radijacijske terapije, reagira sa slobodnim elektronima u DNA koji nastaju zbog terapije zračenjem. Ova interakcija čini radijacijska oštećenja trajnim i to objašnjava otpornost na radioterapiju hipoksičnih stanica koje imaju niske razine kisika (BROWN, 2002; ALBADARI i sur., 2019). Hipoksična frakcija malignih tumora je otporna na radijacijsku terapiju zbog smanjenog stvaranja radikala kisika (MOELLER i sur., 2007). Zračenje inducira aktivnost HIF-1 što vodi u produkciju VEGF-a i drugih angiogenih citokina koji štite endotelne stanice tumorskih žila od smrti inducirane radijacijom (MOELLER i sur., 2004; SEMENZA, 2010b). Utjecaj hipoksije na kemorezistenciju može se prepisati utjecaju nekoliko čimbenika: niskoj koncentraciji lijeka u hipoksičnim stanicama udaljenim od funkcionalnih krvnih žila, činjenici da većina lijekova za liječenje malignih tumora ciljaju proliferirajuće stanice, no hipoksične stanice su "izgladnjele" i oslabljene proliferacije u usporedbi s aerobnim stanicama i tako kemoterapeutici imaju manje utjecaja na njih. Otpornost na citotoksičnu kemoterapiju može povećati i smanjenje razine staničnog ROS-a u prelasku s oksidativnog na reduktivni metabolizam. Hipoksični mikrookoliš povezan je s genomskom nestabilnošću, genskim alteracijama, mutagenezom i lošom prognozom. Na primjer, zbog hipoksije se mogu selektirati stanice koje izražavaju mutacije i p53 (tumor supresor gena) i Bcl-2 (proteina koji inhibira apoptozu) u onkogeno transformiranim stanicama i time hipoksija pridonosi malignosti i metastazama solidnih tumora (GRAEBER i sur., 1996; BROWN, 2002; SEMENZA, 2010b i 2012b; ALBADARI i sur., 2019).

Stanice raka utječu na svoj mikrookoliš otpuštajući izvanstanične signale za poticanje tumorske angiogeneze, stimuliraju proliferaciju stanica, migraciju i invazivnost putem aktivacije VEGFR-1 signalizacije. Povišena koncentracija serumskog VEGF-a nađena je u pleuralnim izljevima maligne etiologije (primarnih karcinoma pluća ili sekundarnih metastaza, zatim u pacijenata s različitim tipovima malignih tumora i više vrijednosti koreliraju s lošijom prognozom u nekih solidnih tumora (npr. karcinoma pluća nemalih stanica i dr.) (GARCIA i sur., 2020). Ekspresija HIF-1 $\alpha$  je u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom VEGF-a i gustoćom mikrovaskulature u većini tumora središnjeg živčanog sustava, raku jajnika, duktalnom karcinomu dojke, adenokarcinomu kolona, adenokarcinomu endometrija, duktalnom pankreasnom adenokarcinomu, karcinomu malih stanica pluća (MADEJ i sur., 2013). Zasnjih

15 godina jako je napredovalo razumijevanje uloge VEGF-a u tumorskom mikrookolišu pa se tako sada zna da signalizacija inducirana s VEGF-A ima dodatne, o angiogenezi nezavisne uloge, u razvoju i progresiji malignih tumora kao što su utjecaj na:

1. tumorske stanice - potičući proliferaciju, migraciju i invazivnost stanica kroz aktivaciju signalizacije VEGFR-1-om,
2. matične stanice tumora - potičući njihove opće značajke (*engl.* stemness) kroz aktivaciju VEGF-A/NRP-1 puta i samoobnavljanje kroz VEGFR-2/STAT3 signalizaciju,
3. imunostne stanice - kroz VEGFR-1-3 i NRP-1 signalizaciju u hematopoetskim stanicama (VEGFR-1), dendritičnim stanicama (VEGFR-3), makrofagima (VEGFR-1 i 3), T-stanicama (VEGFR-1 i 2), regulatornim T-stanicama (VEGFR-1 i 2, NRP-1), mijeloidnim supersorskim stanicama. Tako stanice malignih tumora pridonose imunosupresiji u tumorskom mikrookolišu, različitim mehanizmima što uključuje aberantnu hematopoezu, oslabljeno sazrijevanje i funkciju dendritičnih stanica i T-stanica, inhibiciju preživljavanja aktiviranih T-stanica i dr., kako bi izbjegle prepoznavanje od strane imunološkog sustava. Osim angiogeneze, mogući su alternativni načini vaskularizacije tumora (pregledno u GARCIA i sur. 2020).

HIF su kroz pojačanu ekspresiju mnogih gena i sintezu pripadajućih proteina uključeni u mnoge ključne aspekte biologije malignih tumora i važne korake u progresiji tumora kao što je spomenuta angiogeneza i izbjegavanje imunološkog sustava, očuvanje matičnih stanica, epitelno-mezenhimalna tranzicija, invazija, metastaziranje (LIAO i sur., 2007; RANKIN i GIACCIA, 2008). Uključeni su u otpornost na radijacijsku terapiju i kemoterapiju, metabolizam glukoze i metaboličko reprogramiranje (indukcija glikolize), signalizaciju autokrinog čimbenika rasta, regulaciju pH, inhibiciju apoptoze, imortalizaciju (pregled radova u SEMENZA, 2010b; SEMENZA, 2012b). Od ovih funkcija najosnovnije su angiogeneza i metabolizam glukoze, koje kontroliraju dostavu i upotrebu kisika (SEMENZA, 2010b), a važne su i u proliferaciji i metastaziranju raka (ZHONG i sur., 1999; KAMBAYASHI i sur., 2015).

Četiri skupine izravnih HIF-1 ciljanih gena koji su posebno relevantni u progresiji raka kodiraju angiogene čimbenike, čimbenike preživljavanja i čimbenike invazivnosti, transportere glukoze i glikolitičke enzime važne za metaboličke adaptacije (SEMENZA, 2003). Nedavna istraživanja potvrdila su da HIF-1 ima utjecaj na metastatski potencijal posredovanjem epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT), potiskujući ekspresiju E-kaderina putem proteina Wnt signalnog puta (npr. SNAIL, TWIST, SIP-1), što je esencijalno za invaziju i metastaziranje stanica malignih tumora (CAVALLARO i CHRISTOFORI, 2004; pregledno u SHIN i sur., 2015). Tako npr. HIF dokazano ima ulogu u metastaziranju raka dojke u pluća (SEMENZA,

2012a). E-kaderin djeluje kao adhezijski protein između epitelnih stanica (SHIN i sur., 2015). HIF-1 aktivira transkripciju gena za represore koji blokiraju ekspresiju E-kaderina i drugih proteina koji pridonose rigidnom citoskeletu, adheziji među stanicama i drugim diferenciranim karakteristikama epitelnih stanica (*ID2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TCF3*, *ZEB1* i 2). HIF-1 također posreduje ekspresiju gena (*TGFA*, *VIM*) koji potiču fleksibilni citoskelet i druge karakteristike mezenhimalnog fenotipa. Nadalje, aktivira transkripciju gena važnih za invazivnost i metastaziranje: gena za proteaze koje degradiraju (*CTSC*, *MMP2*, *MMP9*, *MMP14*, *PLAUR*) ili remodeliraju (*LOX*, *LOXL2*, *LOXL4*) ekstracelularni matriks unutar primarnog tkiva i na udaljenim mjestima metastaza, za čimbenike pokretljivosti (*AMF*, *MET*), čimbenike vaskularne permeabilnosti (*VEGF*, *ANGPT2*) koji promiču intravazaciju tumorskih stanica u krvne žile, gene za proteine na površini stanice (*L1CAM*) i izlučene proteine (*ANGPTL4*) koji pridonose ekstravazaciji stanica raka u parenhim na mjestu metastaza (pregledno u SEMENZA, 2012b). Dokazano je npr. da HIF ima ulogu u metastazama raka dojke u pluća kroz transkripcijsku aktivaciju gena za angiopoetinu sličan protein 4 (*ANGPTL4*) i L1 staničnu adhezijsku molekulu (*L1CAM*), kojima se stimulira ekstravazacija cirkulirajućih malignih stanica hipoksičnog primarnog tumora dojke iz plućnih žila, te aktivaciju gena za proteine iz porodice lizil oksidaza (*LOX*, *LOXL2*, *LOXL4*), koje potiču invazivnost i stvaranje metastatskih niša. Molekula *L1CAM* povećava interakciju hipoksičnih tumorskih stanica s endotelnim stanicama. Čini se da je HIF-1 $\alpha$ , ali ne i HIF-2 $\alpha$  potrebna za hipoksijom-induciranu *L1CAM* ekspresiju. Cirkulirajuće stanice koje se prihvate za endotelne stanice u plućnim krvnim žilicama (marginacija) izlučuju *ANGPTL4*, koji inhibira interakciju endotelnih stanica. Time se olakšava ekstravazacija tumorskih stanica iz lumena krvne žile u plućni parenhim. Manje od 0.1% tumorskih stanica koje uđu u krvožilni sustav uspostave metastatsku leziju, što ukazuje da je ekstravazacija iz cirkulacije u tkivno mikrookruženje povoljno za preživljavanje i proliferaciju ograničavajući korak u metastaziranju (MINN i sur., 2005; SEMENZA, 2012a).

Među čimbenicima rasta ili preživljavanja koji sudjeluju u autokrinoj signalizaciji, a kodirani su genima reguliranim HIF-om, su npr. *TGFA* u karcinomu svijetlih stanica bubrega, *IGF2* u kolorektalnom karcinomu, *VEGF* u kolorektalnom, gastričnom i pankreasnom raku, *EDNI* u raku dojke, prostate, jajnika, *ADM* u raku prostate i pankreasa, *EPO* u raku dojke, prostate bubrega i u melanomu. Imortalizacija matičnih stanica raka također zahtijeva ekspresiju *TERT*, čimbenike pluripotentnosti kao *NANOG* i *OCT4* (*POU5F1*), čimbenike koji blokiraju staničnu senescenciju kao što su glikolitički enzimi GPI i PGM. Unos glukoze u neoplastičnim i metastatskim stanicama izrazito je povećan u odnosu na normalne stanice te



služi kao osnova za klinički test koji se koristi za probir pacijenata s rakom na okultne metastaze (FDG-PET). HIF-1 potiče transkripciju *IGF2* gena, što olakšava preživljavanje tumorskih stanica i u okruženju sa smanjenim udjelom kisika (MADEJ i sur., 2013), transformirajućeg čimbenika rasta i druge čimbenike rasta te time inducira proliferaciju u stanicama raka (FELDSER i sur., 1999). SEMENZA (2012b) je sumirao radove o spomenutim ekspresijama gena reguliranim HIF-om koji su uključeni u biologiju tumora, a prikaz gena, puni nazivi proteina i njihove uloge u progresiji malignih tumora nalaze se u Tablici 1.

**Tablica 1.** Primjeri nekih HIF-om ciljanih gena, proteina i njihova uloga u biologiji i progresiji raka. Prema SEMENZA (2010a i b) i SEMENZA (2012a i b).

GEN	KODIRANI PROTEIN	ULOGA U BIOLOGIJI I PROGRESIJI RAKA
<i>ABCB1</i>	Protein višestruke rezistencije na lijekove 1 ( <i>engl. multidrug resistance protein 1</i> )	otpornost na kemoterapiju
<i>ADM</i>	Adrenomedulin ( <i>engl. adrenomedullin</i> )	autokrini rast povećana proliferacija/preživljavanje stanica
<i>ALDOA1</i>	Aldolaza 1 ( <i>engl. aldolase 1</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>AMF (GPI)</i>	Autokrini čimbenik pokretljivosti ( <i>engl. autocrine motility factor</i> ) ili Glukoza 6-fosfat izomeraza ( <i>engl. glucose-6-phosphate isomerase</i> )	invazivnost i metastaziranje imortalizacija; metaboličko reprogramiranje
<i>ANGPT1</i> <i>ANGPT2</i>	Angiopoietin 1 (hrv. i <i>engl.</i> ) Angiopoietin 2	angiogeneza
<i>ANGPTL4</i>	Angiopoietinu sličan protein 4 ( <i>engl. angiopoietin-like 4</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>BNIP3 (NIP3)</i>	BNIP3 protein ( <i>engl. BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>BNIP3L</i>	BNIP3L protein ( <i>engl. BCL2 interacting protein 3 like</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>CAR9</i>	Karboanhidraza 9 ( <i>engl. carbonic anhydrase 9</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>CTSD</i>	Catepsin D ( <i>engl. cathepsin D</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>CTSC</i>	Catepsin C ( <i>engl. cathepsin C</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>CXCL12 (SDF1)</i>	Stromalni čimbenik 1 ( <i>engl. stromal-derived factor 1</i> )	angiogeneza
<i>EDN1</i>	Endotelin 1 ( <i>engl. endothelin 1</i> )	autokrini rast povećana proliferacija/preživljavanje stanica
<i>ENO1</i>	Enolaza 1 ( <i>engl. enolase 1</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>EPO</i>	Eritropoietin ( <i>engl. erythropoietin</i> )	autokrini rast povećana proliferacija/preživljavanje stanica
<i>PFKL</i>	Fosfofruktokinaza L ( <i>engl. phosphofructokinase L</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>PGF (PLGF)</i>	Placentalni čimbenik rasta ( <i>engl. placental growth factor</i> )	angiogeneza
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerat kinaza 1 ( <i>engl. phosphoglycerate kinase 1</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>PTGS2</i>	Ciklooksigenaza 2 ( <i>engl. cyclooxygenase 2</i> )	angiogeneza; invazivnost i metastaziranje
<i>GLUT1(SLC2A1)</i> <i>GLUT3</i>	Glukoza transporter 1 Glukoza transporter 3 ( <i>engl. glucose transporter 1, 3</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza ( <i>engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>HK1</i> <i>HK2</i>	Heksokinaza 1 Heksokinaza 2 ( <i>engl. hexokinase 1 i 2</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>ID2</i>	Inhibitor diferencijacije 2 ( <i>engl. inhibitor of differentiation 2</i> )	epitelno-mezehimalna tranzicija
<i>IGF2</i>	Inzulinu sličan čimbenik rasta 2 ( <i>engl. insulin-like growth factor 2</i> )	autokrini rast povećana proliferacija/preživljavanje stanica

<i>KITLG</i>	Kit ligand/čimbenik matičnih stanica ( <i>engl. kit ligand/stem cell factor</i> )	angiogeneza
<i>L1CAM</i>	L1 stanična adhezijska molekula ( <i>engl. L1 cell adhesion molecule</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>LDHA</i>	Laktat dehidrogenaza A ( <i>engl. lactate dehydrogenase A</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>LOX</i>	Lizil oksidaza ( <i>engl. lysyl oxidase</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>LOXL2</i> <i>LOXL4</i>	LOX-u sličan enzim 2 LOX-u sličan enzim 4 ( <i>engl. LOX-like 2, 4</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>MCT4</i>	Monokarboksilat transporter 4 ( <i>engl. monocarboxylate transporter 4</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>MET</i>	Receptor za čimbenik rasta hepatocita ( <i>engl. hepatocyte growth factor receptor</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>MMP2</i> <i>MMP9</i> <i>MMP14</i>	Matriks metaloproteinaza 2 Matriks metaloproteinaza 9 Matriks metaloproteinaza 14 ( <i>engl. matrix metalloproteinase 2, 9, 14</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>NHE1</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> izmjenjivač 1 ( <i>engl. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>PDGFB</i>	Čimbenik rasta porijeklom iz trombocita B ( <i>engl. platelet-derived growth factor B</i> )	angiogeneza
<i>PDK1</i>	Piruvat dehidrogenaza kinaza 1 ( <i>engl. pyruvate dehydrogenase kinase 1</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>PGM</i>	Fosfoglukomutaza/fosfoglicerat mutaza ( <i>engl. phosphoglucomutase/phosphoglycerate mutase</i> )	imortalizacija; metaboličko reprogramiranje
<i>PKM2</i>	Piruvat kinaza M2 ( <i>engl. pyruvate kinase M2</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>PLAUR</i>	Receptor za urokinazni tip aktivatora plazminogena ( <i>engl. urokinase plasminogen activator receptor</i> )	invazivnost i metastaziranje
<i>OCT4 (POU5F1)</i>	Oktamer vežuća bjelančevina 4 ( <i>engl. octamer binding protein 4</i> )	održavanje matičnih stanica; imortalizacija samoobnavljajući autokrini rast/preživljavanje
<i>SLC16A3</i>	Monokarboksilatni transporter 4 ( <i>engl. monocarboxylate transporter 4</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>SNAI1</i>	Snail	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>SNAI2</i>	Slug	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>TERT</i>	Telomeraza ( <i>engl. telomerase</i> )	imortalizacija samoobnavljajući autokrini rast/preživljavanje
<i>TGFA</i> <i>TGFB</i>	Transformirajući čimbenik rasta $\alpha$ Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ ( <i>engl. transforming growth factor <math>\alpha</math>, <math>\beta</math></i> )	autokrini rast povećana proliferacija/preživljavanje stanica
<i>TCF3</i>	Transkripcijski čimbenik 3 ( <i>engl. transcription factor 3</i> )	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>TWIST1</i>	TWIST1	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>TKT</i>	Transketolaza ( <i>engl. transketolase</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>TKTL2</i>	Transketolazi sličan protein 2 ( <i>engl. TKT-like 2</i> )	metaboličko reprogramiranje
<i>VEGF</i>	Vaskularni endotelni čimbenik rasta ( <i>engl. vascular endothelial growth factor</i> )	Imortalizacija, samoobnavljajući autokrini rast/preživljavanje, angiogeneza, povećana proliferacija/preživljavanje stanica
<i>VIM</i>	Vimentin	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>ZEB1</i>	<i>engl. zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<i>ZEB2</i>	<i>engl. zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>	epitelno-mezenhimalna tranzicija

Osim zbog intratumorske hipoksije, signalnih molekula male molekularne težine kao ROS, razina proteina 1 $\alpha$  i 2 $\alpha$  u tumorskim stanicama i stromi može biti prekomjerno izražena i u normoksiji (mehanizmom neovisnom o O<sub>2</sub>) zbog različitih genskih alteracija: mutacija onkogeni npr. *ERBB2* (što rezultira novom ili pojačanom funkcijom proteina produkata gena koji promiču progresiju tumora; "gain-of-function mutations") ili mutacije mnogih i različitih tumor supresorskih gena koje rezultiraju smanjenjem ili gubitkom funkcije pripadajućeg

proteina, a koji inače suprimiraju progresiju tumora npr. VHL i PTEN ("loss-of-function mutations"). Ove mutacije oponašaju učinak hipoksije pa ili povećavaju sintezu HIF-1 $\alpha$  ili smanjuju razgradnju HIF-1 $\alpha$  (zbog smanjenje ubikvitinacije ili hidroksilacije) (SEMENZA, 2001; SEMENZA, 2003; SEMENZA, 2012b, ALBADARI i sur., 2019). Mutacije u *PTEN*, *TSC*, *PML*, aktiviraju HIF potičući translaciju HIF- $\alpha$  proteina, a mogu ga aktivirati i mutacije enzima Krebsovog ciklusa fumarat hidrataze i sukcinat dehidrogenaze (POLLARD i sur., 2005; pregledno u RATCLIFFE, 2013). Ova se dva mehanizma međusobno ne isključuju - genske promjene mogu pojačati odgovor na hipoksiju i uzrokovati poremetnju regulacije HIF-a. U pacijenata s ranim stadijem raka jednjaka, kombinacija prekomjerne ekspresije HIF-1 $\alpha$  i BCL2 bila je povezana s neuspješnom reakcijom na fotodinamičku terapiju (KOUKOURAKIS i sur., 2001; SEMENZA, 2003). SEMENZA (2010b) je dao pregled radova o tumorima sa zabilježenom povišenom razinom HIF-1 $\alpha$  uslijed gubitka funkcije određenih tumorsupresorskih gena. Najčešći primjer za to su mutacija *P53* u mnogih tumora ili nasljedna mutacija *VHL*, koje smanjuju ubikvitinaciju podjedinica 1 $\alpha$ /2 $\alpha$  i aktiviraju cijeli HIF-signalni put, zatim mutacije *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* u paragangliomu, *IDH1* i *PTEN* u glioblastomu i druge (RAVI i sur., 2000). Mutacija *VHL* uzrokuje von Hippel-Lindau bolest, autosomalno dominantni neoplastični sindrom manifestiran angiogenim tumorima, sporadičnim karcinoma svijetlih stanica bubrega (CCRC - *engl.* clear cell renal carcinoma) i jako kapilarnim hemangioblastomima (u retini, malom mozgu). Proteini onkogenih virusa kao što su HPV, Epstein-Barr, hepatitis B virus, herpesvirus Kaposi sarkoma, humani virus leukemije T-stanica, također povećavaju aktivnost HIF-1, na različite načine. HPV-16 onkoproteini mogu potaknuti tumorsku angiogenezu pojačavanjem ekspresije VEGF-a, ali i povezanih čimbenika kao angiogenina 1, CXCL-16, FGF-2, TGF- $\beta$ , IL-8 i dr. Trebalo bi istražiti ovu povezanost animalnog BPV-a u npr. ekvinom sarkoidu (FERRARA i sur., 2004; SEMNEZA, 2010b; LI i sur., 2011; MARTANO i sur. 2020). Na PI3K/AKT/mTOR i MAPK/ERK puteve u tumorskom mikrookolišu povoljno utječe selekcija stanica sa somatskim mutacijama koje aktiviraju onkogene i inaktiviraju tumor supresorske gene. Ove mutacije nekontrolirano vode stanice kroz stanični ciklus i sprječavaju apoptozu. Dok je HIF-1 $\alpha$  ekspresija ovisna i o mTOR kompleksu 1 i 2 (mTORC1 i mTORC2) u stanicama renalnog karcinoma, HIF-2 $\alpha$  ekspresija ovisi isključivo o mTORC2 (TOSCHI i sur., 2008; ALBADARI i sur., 2019).

Složeni putevi HIF-hidroksilaza koji su se razvili tako da odgovaraju fiziološkim (ne onkogenim) svrhama, kada se aktiviraju onkogenim mutacijama ili mikrookolišnom hipoksijom u tumoru, aktivirat će se u cijelosti, odnosno sve njegove komponente, od kojih se

pretpostavlja da neke jesu, a neke nisu protumorigene. Stoga unatoč dokazanoj povezanosti hipoksije, cjelokupnog HIF sustava i agresivnih tumora, tj. HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$  i progresije raka, ne može se govoriti o jednostavnoj uzročno-posljedičnoj povezanosti, ona nije apsolutna i nije dosljedno potkrijepljena genetskim dokazima (SEMENZA, 2010b; RATCLIFFE, 2013). Umjesto toga, studije sugeriraju da su specifične komponente (za razliku od same aktivacije cijelog HIF-sustava) odgovorne za protumorigena djelovanja, da su neke komponente HIF sustava antitumorigene i da su pro- i antitumorigena djelovanja HIF-a specifična ovisno o kontekstu. Npr., PHD/pVHL/HIF sustav je sveprisutan u životinjskim stanicama, ali rak povezan s VHL-om vrlo je tkivno specifičan i uglavnom ograničen na rak bubrega, feokromocitom i očni/CNS hemangioblastom (RATCLIFFE, 2013). Učinak prekomjerne ekspresije HIF-1 $\alpha$  na preživljavanje pacijenata ovisi o tipu malignog tumora i prisutnosti ili odsutnosti genetskih promjena koje utječu na ravnotežu između pro- i antiapoptotičnih čimbenika (SEMENZA, 2003). Inaktivacija različitih komponenti HIF puta (npr. HIF-1 $\alpha$  naspram HIF-2 $\alpha$ ) može imati različite ili čak suprotne učinke na rast tumora, što je do sada najjasnije definirano u karcinomu svijetlih stanica bubrega s oštećenim pVHL (KAELIN, 2002). Tako, dok prekomjerna ekspresija HIF-2 $\alpha$  u CCRC potiče rast tumora i ekspresiju gena koji kodiraju čimbenike preživljavanja poput VEGF-a, ekspresija HIF-1 $\alpha$  ima obrnut učinak na rast tumora. HIF-2 $\alpha$  se općenito smatra protumorigenijim od HIF-1 $\alpha$ , ipak, zabilježena je nedosljednost u protumorigenim učincima HIF-2 $\alpha$  pa inaktivacija HIF-2 $\alpha$  u drugim kontekstima potiče rast tumora (pregledno u RATCLIFFE, 2013). Čini se da je HIF-2 primarni upravljač pVHL-defektnih tumora bubrega. pVHL ima i funkcije neovisne o HIF-u i gubitak pVHL-a nije dovoljan da uzrokuje tumore bubrega, za to su potrebni dodatni kooperativni genski događaji (KAELIN, 2017). Učinak različitih izoformi  $\alpha$  podjedinice na rast CCRC-a može biti odraz događaja koji mijenjaju transkripcijsku selektivnost HIF- $\alpha$  tijekom rasta tumora, koja može biti drugačija u normalnim stanicama (RATCLIFFE, 2007). Temeljem istraživanja na kulturi stanica miševa, krajnji učinak HIF- $\alpha$  na rast tumora ovisi o više varijabli: npr. o tipu stanice od kojih potječe tumor, o mjestu tumora, a moguće i međudjelovanju HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Kao što je već rečeno nisu sve podjedinice podjednako izražene u svim stanicama. U patogenezi raka klonska selekcija favorizira one maligne stanice u kojima je povećana aktivnost HIF-1 (SEMENZA, 2000c; SEMENZA, 2010b). Karcinom bubrežnih stanica je najčešća primarna renalna neoplazija u ljudi i domaćih životinja (pasa, mačaka i konja), s niskom incidencijom u životinja u usporedbi s ljudima, a CCRC je u domaćih životinja rijedak podtip (WOLDEMESKEL, 2013).

## **2.6. Značaj staničnog odgovora na hipoksiju u antitumorskoj terapiji**

Maligni tumori su danas u nekim razvijenim zapadnim zemljama jedan od 3 glavna uzroka smrtnosti ljudi i među glavnim uzrocima smrtnosti pasa kućnih ljubimaca (IYER i sur., 1998b; SEMENZA, 2004; WOLDEMESKEL, 2013). Antitumorska terapija vezana za stanični odgovor na hipoksiju razvijala se ili u smjeru manipulacije signalnog puta prije aktivacije ciljanih gena HIF kompleksom ili manipulacije nakon aktivacije gena i proizvodnje proteina, djelovanjem na komponente njihovih daljnih vezanih signalnih puteva. Također uglavnom je usmjeravana na dvije glavne fiziološke značajke: blokiranje opskrbe tumora krvlju, kisikom i hranjivim tvarima i blokiranje metaboličkih puteva kojima se proizvodi energija za stanice. U posljednje vrijeme za sve veći broj lijekova pokazalo se da mogu inhibirati HIF-1, a ujedno su identificirani i potvrđeni kao sredstva od koristi u terapiji malignih tumora te će neki od njih biti spomenuti kao primjer.

### **2.6.1. Lijekovi u terapiji raka koji inhibiraju aktivnost HIF-1**

Spoznaje o hipoksičnom mikrokolišu solidnih tumora i povezanosti hipoksije s agresivnim, metastatskim i rezistentnim oblicima tumora iskorištene su za razvoj ciljanih terapija na rak s nekoliko pristupa, uključujući gensku terapiju, rekombinantne anaerobne bakterije i upotrebu prolijejkova aktiviranih hipoksijom (REY i SEMENZA, 2010; WILSON i HAY, 2011; BARAN i KONOPLEVA, 2017; ALBADARI i sur., 2019). U pretkliničkim i kliničkim studijama inhibicija aktivnosti HIF-1/2 pokazala je izražene učinke na angiogenezu i rast tumora. Noviji važan pristup u razvoju ciljanih terapija je iskorištavanje prednosti selektivne indukcije HIF-1/2 u hipoksiji. Međutim, kao što je ranije rečeno regulacijski putovi HIF-1/2 vrlo su složeni zbog čega je dizajniranje selektivnih HIF-1/2 inhibitora vrlo izazovan zadatak. Tako rastući broj spojeva koji ciljaju HIF-1/2 i koji su razvijeni i klasificirani na temelju njihovih inhibitornih mehanizama, čini se da ne inhibiraju put HIF-1/2 na način da su im pojedine izoforme specifične mete. Uzimajući u obzir regulaciju transkripcijske aktivacije HIF-1/2 koja ovisi o nizu međusobno povezanih događaja, uključujući povišene ravnotežne razine HIF-1/2 $\alpha$  fiziološkom stimulacijom kao i genetskim promjenama, HIF-1/2 $\alpha$  nuklearnu translokaciju, heterodimerizaciju s  $\beta$  podjedinicom, HRE-DNA vezanje, uključivanje koaktivatora i formaciju aktivnog transkripcijskog kompleksa, uloženo je mnogo napora da se modulira i umiješa u svaki korak ovih događaja. Mnogi sintetizirani HIF-1/2 inhibitori djeluju na 1 $\alpha$  ili 2 $\alpha$  ili obje podjedinice kroz direktne mehanizme, dok mnogi drugi spojevi i odobreni lijekovi indirektno inhibiraju aktivnost HIF-1/2 zbog povezanosti HIF-1/2 signaliziranja s

drugim staničnim putevima kao PI3K/AKT/mTOR putem ili nadovezujućim putevima (anti-VEGF terapija) (pregled o sredstvima u terapiji raka u XIA i sur., 2012; MASOUND i LI, 2015; ALBADARI i sur., 2019).

Inhibitori HIF-1 mogu senzibilizirati tumore na radijacijsku terapiju, pošto zračenje inducira aktivnost HIF-1 što utječe na klinički odgovor. Tretman tumora u miševa s HIF-1 inhibitorom YC-1 dramatično je povećao destrukciju krvnih žila induciranu radijacijom (MOELLER i sur., 2004). HIF-1 inhibitor PX-478 isto blokira u tumorskom ksenograftu ekspresiju VEGF-a induciranu radijacijom. Lijekovi koji inhibiraju prijenos signala P13K-om i ERK-om također inhibiraju HIF-1 i SP1, koji se oboje vežu za promotor *VEGF* gena. Za sve veći broj kemijskih spojeva pokazalo se da blokiraju rast tumorskih ksenograftova, vaskularizaciju i poboljšavaju odgovore na kemoterapiju i radijacijsku terapiju u različitim mišjim modelima te inhibiraju aktivnost HIF-a kroz djelovanje širokog spektra molekularnih mehanizama: smanjenjem razine *HIF-1 $\alpha$*  mRNA, smanjenjem sinteze HIF-1 $\alpha$  proteina, povećanjem HIF-1 $\alpha$  degradacije, smanjenjem heterodimerizacije HIF podjedinica, vezanja HIF-a za DNA i smanjenjem transkripcijske aktivnosti HIF-a. Mnogi od njih su lijekovi u fazi kliničkih ispitivanja ili su već odobreni za liječenje malignih tumora ili drugih bolesti (pregledno u SEMENZA, 2010b i 2012a).

Nekoliko tradicionalno korištenih kemoterapeutika kasnije su se pokazali kao snažni HIF-1 inhibitori (npr. topotekan, Taxotere). Liječenje doksorubicinom 5 dana inhibiralo je HIF-1-ovisnu transkripciju i značajno smanjilo razinu mRNA koje kodiraju angiogene citokine SCF, SDF-1 i VEGF u ksenograftovima humanog raka prostate (LEE i sur., 2009; SEMENZA, 2010b). U pilot-kliničkom ispitivanju topotekana u pacijenata s uznapredovalim stadijem raka različitog tipa i pojačanom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  (dokazanom na biopsatima tumora), u 4 od 7 istraživanih pacijenata razine proteina HIF-1 $\alpha$  bile su nemjerljive u biopsijama rađenim poslije tretmana topotekanom, a nakon jednog ciklusa u 7 od 10 pacijenata smanjen je protok krvi što su pokazali serijski DCE-MRI (*engl.* dynamic contrast-enhanced magnetic resonance) skenovi (KUMMAR i sur., 2011). U mnogim modelima inhibitori HIF-1 blokiraju ekspresiju različitih proangiogenih čimbenika i tumorsku vaskularizaciju. Za digoksin, koji se desetljećima koristi za liječenje srčanih bolesti, kasnije se pokazalo da ujedno inhibira aktivnost HIF-1 (kao i neki drugi srčani glikozidi), blokira rast primarnog tumora, vaskularizaciju, invaziju i metastaze u *ex vivo* i *in vivo* testovima (SEMENZA, 2012a). Konkretno, može inhibirati rast ksenograftova humanog raka prostate, učinak je ovisan o njegovoj inhibiciji ekspresije HIF-1 $\alpha$  u malignim stanicama (ZHANG i sur., 2008). U jednoj studiji, terapija miševa koji nose primarni tumor

dojke MDA-MB-435 digoksinom smanjila je plućni metastatski teret za >96% (ZHANG i sur., 2012). Trebalo bi istražiti da li iste ili slične doze imaju sličan učinak na druge vrste životinja.

Berberin, prirodni produkt, potiče razgradnju HIF-1 $\alpha$  i ima antiangiogeni efekt i u tumorskim i u endotelnim stanicama. Se-metil-selenocistein (MSC), inducira razgradnju HIF-1 $\alpha$  i senzibilizira hipoksične stanice raka na učinke kemoterapeutika irinotekana. YC-1, aktivator guanilat ciklaze, inducira razgradnju HIF-1 $\alpha$  nepoznatim mehanizmom, PX-478 inhibira translaciju HIF-1 $\alpha$  još neodređenim mehanizmom i senzibilizira tumorske ksenograftove na radijacijsku terapiju kao i YC-1 i deguelin (HSP90 inhibitor). Ehinomicin blokira limfom i rast akutne mijelogene leukemije uništavanjem matičnih stanica raka. Mnogi lijekovi iz kategorije onih koje utječu na sintezu HIF- $\alpha$  pokazuju preferencijalnu aktivost prema 1 $\alpha$ , s manje ili nikakvim učinkom na 2 $\alpha$ . Lijekovi koji sprečavaju sintezu HIF-1 uključuju i antitumorske lijekove koji inhibiraju receptore tirozin kinaza kao BCR/ABL, EGFR i HER2 i time neizravno inhibiraju aktivnost mTOR-a. Bortezomib, u SAD-u odobren za liječenje limfoma marginalne zone i multiplog mijeloma, inhibira transkripcijsku aktivnost HIF-1 ciljajući CTAD u 1 $\alpha$  koja ulazi u interakciju s p300, ne narušavajući interakciju. U stanicama raka prostate bortezomib blokira ekspresiju HIF-1 $\alpha$  proteina inhibicijom PI3K/AKT/mTOR i ERK signalizacije (pregledno u SEMENZA, 2012b).

Direktno inhibiranje funkcije transkripcijskog čimbenika molekulama nalik lijeku je teško (lakše je inhibirati npr. receptore steroidnih hormona), no zabilježen je takav učinak nekih poliamida koji blokiraju vezanje HIF-a za *VEGF* promotor, HRE regije (OLENYUK i sur., 2004; VIGER i DERVAN, 2006; KAELIN i RATCLIFFE, 2008). KAMBAYASHI i sur., (2015) navode da su poznati lijekovi s HIF-1 $\alpha$  inhibitornim potencijalom vrlo raznoliki, ali da nema specifičnog inhibitora same HIF-1 $\alpha$  molekule. Na primjer lijekovi s funkcijom mTOR, HSP90 ili HDAC inhibitora indirektno smanjuju regulaciju i ekspresiju HIF- $\alpha$  (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Primjeri nekih skupina lijekova i predstavnika tih skupina kao i mehanizmi djelovanja kojima smanjuju aktivnost HIF-1 i rast tumorskih ksenografta nalaze se u Tablici 2. XIA i sur. (2012) i SEMENZA (2010b) dali su pregled literature o tim lijekovima, a GARCIA i sur. (2020) pregled kliničkih ispitivanja za određena sredstva i kombinacije terapija.

Novi mali molekularni HIF inhibitori (2ME2, 17-AAG, YC-1, topotekan i drugi, Tablica 3.), kao potencijalna sredstva u terapiji malignih tumora s različitim mehanizmima djelovanja na HIF-1/2 $\alpha$  ili općenito HIF, ispitani su pretežno na staničnim kulturama i alograftovima. Benzopirani-1,2,3-triazol smanjuje ekspresiju VEGF-a i angiogenezu ovisno o dozi, ima

sinergijski učinak s gefitinibom, inhibitorom receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR - *engl.* epidermal growth factor receptor) koji se koristi klinički u liječenju raka pluća i dojke s mutiranim i pretjerano aktivnim EGFR-om. BIX01294, ovisno o koncentraciji, može smanjiti proliferaciju stanica neuroblastoma, smanjuje ekspresiju HIF-1 u kulturi stanica humanog hepatocelularnog karcinoma. Kardenolid kalaktin pokazuje citotoksični učinak na stanične linije malignih tumora dojke. Nanočestica CRLX-101 dizajnirana je s ciljem da se akumulira u solidnim tumorima i sporo otpušta CPT (kamptotekin) tijekom duljeg razdoblja. CRLX-101 može poboljšati efikasnost kemoradioterapije za lokalno uznapredovali rektalni rak i kad je korišten kao monoterapija ili u kombiniranoj terapiji. Može poboljšati učinkovitost kad je korišten sam ili u kombinaciji s bevacizumabom u metastatskom trostruko negativnom raku dojke u mišjim modelima, ima veću efikasnost i bolju podnošljivost u pretkliničkim mišjim modelima gastričnog adenokarcinoma od svojeg matičnog spoja CPT-a i njegovih sintetičkih analoga irinotekana (CPT-11) i topotekana (TPT). CRLX-101 ju u II. fazi kliničkih ispitivanja kao kombinirana terapija s drugim antitumorskim lijekovima za nekoliko tipova tumora. Dizajnirani EZN-2208 (PEG-SN38) u kombinaciji s ATRA-ATO, trenutnim standardom u liječenju oboljelih od akutne promijelocitne leukemije, bio je vrlo učinkovit u liječenju onih oboljelih koji su razvili rezistenciju na ATO ili nose PLZF-RAR $\alpha$  receptor. Gliceolini (I, II, i III) su grupa fitoaleksina iz soje s različitim biološkim djelovanjem, antiestrogenskim, antikontraktilnim u glatkim mišićima žila, pojačavaju osjetljivost na inzulin, inhibiraju sintezu melanina, a najvažnije, reguliraju rast tumora i inhibiraju ekspresiju VEGF-a u stanicama raka kroz regulaciju HIF-1 $\alpha$ . IDF-11774 može kroz regulaciju ekspresije VHL-a potaknuti degradaciju HIF-1 $\alpha$  i inhibirati akumulaciju HIF-1 $\alpha$  *in vitro* i *in vivo*, a u usporedbi s LW6, čiji je derivat, potentnije djeluje u kulturi stanica kolorektalnog karcinoma i topljiviji je u vodi. LBH589 (panobinostat) je HDAC inhibitor koji pokazuje antitumorske učinke *in vitro* i *in vivo* na različite hematološke malignosti i solidne tumore (npr. Hodgkinove i ne-Hodgkinove limfome, multipli mijelom, hepatocelularni karcinom, karcinom gušterače i pluća nemalih stanica), a učinak na glioblastom kroz interferenciju sa stabilnosti HIF-1 $\alpha$ , potičući njezinu razgradnju. MPT0G157 uz protuupalni učinak pokazuje antitumorsku aktivnost *in vitro* i *in vivo* pogotovo u kulturi stanica humanog kolorektalnog karcinoma. Vorinostat, u SAD-u odobren pan-HDAC inhibitor, u korištenju za liječenje kutanog limfoma T-stanica, pokazao je anti-HIF-1/2 aktivnost u hepatocelularnom karcinomu (*in vitro* i *in vivo*), *in vitro* u staničnim linijama osteosarkoma i glioblastoma. NNC 55-0396, derivat mibefradila i selektivni blokator Ca<sup>2+</sup> kanala T-tipa, znatno suprimira hipoksijom inducirano stvaranje ROS-a u mitohondrijima i tako blokira aktivaciju HIF-1, rast tumora i angiogenezu *in vitro* i *in vivo*. Analozii kresoksim-metila



inhibiraju hipoksijom induciranu transkripcijsku aktivnost HIF-1 u kulturi stanica humanog kolorektalnog karcinoma, djeluju na kompleks 3 u mitohondrijima. PT2385 i PT2399 su selektivni HIF-2 $\alpha$  inhibitori (antagonisti) koji alosterički blokiraju njegovu dimerizaciju s HIF-1 $\beta$ . Pokazali su efikasnost u ksenograftovima i staničnim linijama svijetlih stanica renalnog karcinoma i poželjni sigurnosni profil u ksenograftskim modelima, bez nepovoljnih kardiovaskularnih nuspojava koje su povezane s kemoterapijskim sredstvima usmjerenim na VEGF receptor. Međutim, dulje liječenje s PT2399 uzrokovalo je unakrsnu rezistenciju u ksenograftskim modelima, vjerojatno zbog mutacija na mjestu vezanja u HIF-2 $\alpha$ . Pregled radova o spomenutim malim molekularnim inhibitorima i više o njihovim karakteristikama saželi su ALBADARI i sur. (2019).

**Tablica 2.** Odabrane skupine inhibitora aktivnosti HIF-1 u humanim malignim tumorima i mišjim modelima. Modificirano prema SEMENZA (2010b), SEMENZA (2012a i 2012b), SEMENZA, 2003.

TIP LIJEKA	PRIMJER LIJEKA	MEHANIZAM DJELOVANJA
Antraciklini (DNA interkalator)	Doksorubicin Daunorubicin Ehinomicin	- smanjeno vezanje HIF-1 i HIF-2 za DNA - može se vezati na HRE na DNA umjesto HIF-1
EGFR inhibitori	Cetuksimab (C225)  Gefitinib Erlotinib	- smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$
Srčani glikozidi *	Digoksin	- smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$ - inhibicija translacije <i>HIF-1/2<math>\alpha</math></i> mRNA u protein
Inhibitori histonske deacetilaze (HDAC) HDAC inhibitori klase II **	Trihostatin A (TSA)  LAQ824	- povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$ - smanjena HIF-1 $\alpha$ transaktivacija
HSP90 inhibitori **	17-alilaminogeldanamicin (17-AAG)	- povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$ (RACK1-ovisne ubikvitinacije i proteasomske razgradnje; blokiraju vezanje RACK1)
Inhibitori mikrotubula *	Taxotere  2-metoksiestradiol (2-ME2)	- smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$ - inhibicija translacije <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA i translokacije 1 $\alpha$ u jezgru
mTOR inhibitori *	Rapamicin Temsirolimus (CCI-779) Everolimus (RAD-001) YC-1	- smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$ (inhibiraju mTOR-ovisnu translaciju <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA u protein) - YC-1 može i povećati razgradnju HIF-1 $\alpha$ (nije poznat način)
Inhibitori proteasoma	Bortezomib	- smanjenje HIF-1 transaktivacije (djeluje na CTAD HIF-1 $\alpha$ )
Inhibitori topoizomeraze I i II*	Topotekan NSC-644221 Kamptotekin	- smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$
Antibiotik	Akriflavin	- inhibicija dimerizacije HIF-1/2 $\alpha$ s HIF-1 $\beta$ , veže se i za HIF-1 i 2 $\alpha$
Aminoflavon	AFP-464	- inhibicija <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA stabilnosti i translacije HIF1 $\alpha$ u protein
Sintetički oligonukleotidi *	EZN-2968	- inhibicija translacije <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA u protein vezanjem za mRNA - smanjenje sinteze HIF-1 $\alpha$

Inhibitori tioredoksina **	PX-12	- povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$
Antioksidansi**	Askorbinska kiselina (vitamin C) N-acetil cistein	- inducira degradaciju HIF-1/2 $\alpha$ proteina
HER2 <sup>neu</sup> inhibitor	Trastuzumab (monoklonsko protutijelo)	- inhibicija mTOR-ovisne translacije <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA u proteine
Spojevi selena	Se-metilselenocistein (MSC)	- povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$
Ostalo	PX-478	- djelovanje na sintezu HIF-1 $\alpha$ (inhibira translaciju nepoznatim mehanizmom)
* mnogi lijekovi u ovoj kategoriji preferencijalno pokazuju aktivnost protiv HIF-1 $\alpha$ , s manjim ili nikakvim učinkom na 2 $\alpha$ ** većina lijekova u ovoj kategoriji pokazuje sličnu aktivnost protiv HIF-1 $\alpha$ i HIF-2 $\alpha$		

**Tablica 3.** Noviji HIF inhibitori i njihov mehanizam djelovanja (ALBADARI i sur., 2019).

INHIBITOR	MEHANIZAM INHIBICIJE
Benzopiraniol triazol	povećanje hidroksilacije HIF-1 $\alpha$
BIX01294	povećanje hidroksilacije HIF-1 $\alpha$ /razgradnje HIF-1 $\alpha$ proteina
Kardenolidi	smanjenje transkripcijske aktivnosti HIF-1
CRLX-101	smanjenje akumulacije HIF-1 $\alpha$ proteina
EZN-2208	smanjenje ekspresije i transkripcijske aktivnosti HIF-1 $\alpha$ proteina
Gliceolini	smanjenje translacije/stabilnosti HIF-1 $\alpha$
IDF-1174	povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$
LBH589	povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$
MPT0G157	povećanje razgradnje HIF-1 $\alpha$
Vorinostat	smanjenje translacije/stabilnosti/nuklearne lokalizacije HIF-1/2 $\alpha$
NNC 55-0396	smanjenje ekspresije/translacije HIF-1 $\alpha$ proteina povećanje hidroksilacije HIF-1 $\alpha$
Analozi kresoksim-metila	Smanjenje stabilnosti HIF-1 $\alpha$
PT2385 i PT2399	Smanjenje heterodimerizacije HIF-2

Mnogi HIF-om ciljani geni vezani su za invazivnost i metastaze zloćudnih tumora, kao npr. geni za LOX enzime. Monoklonska antitijela ili mali molekularni inhibitor usmjeren protiv LOX-a mogli bi biti korisni za terapiju malignih tumora dojke. U nekim staničnim kulturama  $\beta$ -aminopropionitril može inhibirati LOX (SEMENZA, 2012a)

### 2.6.2. Proangiogeni čimbenik VEGF u terapiji malignih tumora

Još je 1971. Folkman predložio da bi antiangiogeneza bila učinkovita terapijska strategija u liječenju malignih tumora (FERRARA, 2005). Godine 1993. pokazalo se da djelovanje monoklonskog protutijela na VEGF potiskuje rast tumora *in vivo* (FERRARA i sur., 2004). Zbog važnosti angiogeneze u biologiji tumora, razvoj lijekova za terapiju tumora stoga je uvelike bio usmjeren na inhibiciju angiogeneze blokiranjem VEGF-A ili njegovih receptora i prijenosa signala te na tipove tumore za koje se zna da su dobro vaskularizirani i angiogeneza pridonosi njihovoj progresiji. Pošto VEGF pridonosi toleranciji imunološkog sustava na

tumorske stanice, ciljanje VEGF-VEGFR sustava ujedno je prepoznato kao dobar pristup za povećanje imunog odgovora na tumor u bolesnika s rakom, posebno u kombinaciji s imunoterapijama za rak (GARCIA i sur., 2020). Inhibicija angiogeneze u tumoru može povećati učinak primjenjene kemoterapije i radioterapije (PAVLIŠA, 2006.) Kombiniranje anti-VEGF terapije s kemo- ili radioterapijom ima veći antitumorski učinak nego bilo koji tretman samostalno te je o mehanizmu takvog potenciranja postavljeno više hipoteza koje se međusobno ne isključuju. Ujedno ovakve kombinacije omogućuju korištenje nižih doza kemoterapije čime se smanjuje toksičnost (KLEMENT i sur., 2000; FERRARA i sur., 2004). Ciljanje angiogeneze kao značajke tumora predloženo je kao univerzalni pristup liječenju solidnih tumora (GARCIA i sur., 2020) i možda je bolji pristup nego ciljanje sinteze ili razgradnje HIF- $\alpha$  podjedinice što može imati puno više neželjenih nuspojava zbog širokog spektra gena na koji HIF direktno ili indirektno utječe.

Brojni lijekovi su prošli klinička ispitivanja kao antitumorska sredstva na temelju sposobnosti inhibicije angiogeneze (SEMENZA, 2003), a na tržištu već godinama postoje pripravci koji se naširoko koriste u liječenju mnogih solidnih tumora djelujući na VEGF i njegov receptor kao npr. anti-VEGF-A neutralizirajuća antitijela i inhibitori multikinaze (SCHIBUYA i sur., 2011). Sorafenib, sunitinib su npr. odobreni u liječenju ljudi s uznapredovalim rakom bubrega (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). FERRARA i sur. (2004) navode neke VEGF inhibitore koji su tada bili u fazama kliničkih ispitivanja: humanizirano monoklonsko protutijelo (VEGF-A) bevacizumab koji je danas odobren na tržištu, VEGF-trap (kimerni topivi VEGF receptor), monoklonsko protutijelo Anti-VEGFR2, PTK787 i ZD6474 inhibitori receptora tirozin kinaze (RTK) (VEGFR-1, VEGFR-2), Bay 43-9006 inhibitor RAF kinaze (također i inhibitor nekoliko RTK), SU11248 i AG013676 inhibitori nekoliko RTK. Uz spomenute, razvijen je niz malih molekularnih inhibitora RTK-a, VEGFR-a i dalje se radi na tome, a najnapredniji ovakav inhibitor je PTK787 dizajniran za oralnu upotrebu (WOOD i sur., 2000; FERRARA i sur., 2005). Ciljanje VEGF-VEGFR sustava osim u terapiji malignih tumora, zanimljivo je i kao dio proangiogene terapije u liječenju neuronskih degeneracija i ishemijskih bolesti kao što se npr. anti-VEGF protutijelo ranibizumab koristi za liječenje makularnih degeneracija i edema zbog koroidnih neovaskularizacija. Potencijalna primjena bevacizumaba u drugih neonkoloških indikacija, poput reumatoidnog artritisa, psorijaze, endometrioze i cerebralnog edema, zaslužuje razmatranje (FERRARA i sur., 2004).

Bevacizumab se primjenjuje u kliničkoj praksi humane medicine već 15 godina. Bio je jedan od prvih ovakvih ciljanih terapija i prvi odobren inhibitor angiogeneze (2004. godine u

Americi) te je pokrenuo novi smjer u antitumorskoj terapiji (FERRARA i sur., 2004). Mehanizam djelovanja bevacizumaba i sličnih pripravaka je sljedeći: veže se na sve izoforme VEGF-A i time sprečava njegovu interakciju s receptorima Flt1 (VEGFR-1) i KDR (VEGFR-2) na površini endotelnih stanica. To inhibira rast krvnih žila, inducira regresiju novonastalih žila, normalizira se tumorska krvožilna mreža te olakšava isporuka citotoksične kemoterapije. Smanjenjem vaskularizacije tumora koči se njegov rast, "izgladnjuje" se i smanjuje tumor. Bevacizumab prije svega cilja mikrookoliš tumora, a manje same tumorske stanice, kojeg karakteriziraju složene interakcije između malignih stanica, normalnih stanica i izvanstaničnog matriksa. Zbog ove složenosti, učinci inhibicije VEGF-a vjerojatno su specifični za tip tumora i mikrookoliš (GARCIA i sur., 2020). Klinička učinkovitost ovakvih lijekova dobro je procijenjena. Treba naglasiti da njihova primjena ne pruža potpuno izlječenje pacijenata s malignim tumorima, ali im produljuje život. Bevacizumab je inicijalno odobren za terapiju metastatskog kolorektalnog raka, primjenjuje se u kombinaciji s kemoterapijom čije djelovanje poboljšava, te često s inhibitorima određenih enzima i komponenti imunološkog sustava. Danas se koristi u liječenju nekoliko vrsta solidnih tumora, uznapredovalih ili metastatskih malignih tumora sa slabom prognozom bolesti: metastatskog raka dojke, raka pluća nemalih stanica (najčešćeg oblika kod ljudi), multifornog glioblastoma, karcinoma bubrežnih stanica, raka jajnika, jajovoda i cerviksa, primarnog peritonealnog raka. Dokazano je da pacijenti koji koriste bevacizumab uz kemoterapiju žive duže (SANDLER i sur., 2006; pregledno u GARCIA i sur., 2020). Iako je u međuvremenu od kada je odobren bevacizumab također odobreno mnoštvo ciljanih terapija pokrećući eru personalizirane medicine (više od desetak drugih antiangiogenih terapija uglavnom malih molekularnih multikinaznih inhibitora koje ciljaju VEGF i/ili druge proangiogene ili onkogene signalne putove), bevacizumab je zbog višestruko utvrđene učinkovitosti do danas ostao najčešće korišten inhibitor angiogeneze i dio standarda u liječenju. Pošto bevacizumab ima i svojstva imunomodulacije, istražuju se kombinirana liječenja sa sinergijskim učinkom. Nedavno su odobrene kombinacije bevacizumaba s imunoterapijom raka pluća nemalih stanica, a klinička ispitivanja su pokazala koristi ove kombinacije i u liječenju hepatocelularnog karcinoma. Karcinomi renalnih stanica veoma su vaskularni, poremećena regulacija HIF-a rezultira posebno visokim razinama ekspresije VEGF-a i do danas su odobrena mnoga antiangiogena sredstva u liječenju, uključujući VEGFR-1-3 inhibitor tivozanib, inhibitore multi-kinaze sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib i lenvatinib, inhibitore mTOR-a temsirolimus i everolimus koji dodatno ciljaju onkogenu signalizaciju. Antiangiogena terapija ostaje standardni pristup u liječenju karcinoma renalnih stanica, s bevacizumabom kao važnom opcijom izbora među dostupnim sredstvima. U novije vrijeme

kombinira se s imunoterapijom i s ciljanim terapijama na PD-L1 (*engl.* programmed death-ligand 1), PARP (*engl.* poly (ADP-ribose) polymerase), EGFR, mTOR, HER2 (*engl.* human epidermal growth factor receptor-2), HDAC, aromataze. Od strane Europske agencije za lijekove (EMA) tako je npr. odobrena kombinirana terapija PD-L1 inhibitora avelumaba i inhibitora multikinaze aksitiniba, ciljajući imunost i angiogenezu. Kombinacija bevacizumaba i atezolizumaba pokazala je dobre rezultate što također ide u prilog ovom novijem pristupu liječenju (pregledno u GARCIA i sur., 2020). GARCIA i sur. (2020) također su dali pregled kliničkih ispitivanja i kako su ta iskustva i znanja dovela do novih kombinacija terapija. U pretkliničkim modelima bevacizumab postiže maksimalnu inhibiciju rasta tumorskih stanica pri dozi od 1–2 mg/kg dva puta tjedno. Drugi preparati zahtjevaju puno veće doze da bi postigli maksimalnu inhibiciju. Učinak bevacizumaba je različit ovisno o tipu tumora, a najučinkovitiji se pokazao u kombinaciji s kemoterapijom kolorektalnog karcinoma i karcinoma pluća nemalih stanica te kad se samostalno primjenjuje u raku bubrežnih stanica. Druga faza ispitivanja bevacizumaba s kemoterapijom kod tumora pankreasa pokazala je ohrabrujuće rezultate, kao i s interferonom- $\alpha$  u melanomu, s EGFR-antagonistom u karcinomu pluća nemalih stanica, s radioterapijom u rektalnih tumora i kao monoterapija u raku jajnika (pregledno u FERRARA i sur., 2004). U nekim solidnim malignim tumorima (npr. gušterače, želuca, prostate) bevacizumab nije pokazao značajniji učinak u liječenju. Potencijalni razlozi različite učinkovitosti su gusta stroma tumora koja sprječava dovoljnu perfuziju tumora, suvišnost angiogenih čimbenika koja rezultira otpornošću na liječenje i interferencija drugih signalnih putova s angiogenom signalizacijom (GARCIA i sur., 2020). Treća faza ispitivanja na pacijentima s uznapredovalim, izrazito pretretiranim metastatskim rakom dojke pokazala su da dodavanje bevacizumaba kemoterapiji kapecitabinom nije poboljšalo preživljavanje bez progresije (MILLER i sur., 2002). U nekoliko mišjih modela primjećeno je da VEGFR-2 antitijelo DC-101 ili mali molekularni inhibitor tirozin kinaze sunitinib, reduciraju primarni rast tumora i vaskularizaciju, ali povećavaju metastaze, vjerojatno jer je smanjena angiogeneza dovela do povećane intratumorske hipoksije i aktivnosti HIF-a. Neuspjeh bevacizumaba u usporavanju progresije raka dojke, može biti zbog ekspresije ostalih angiogenih čimbenika rasta ovisne o HIF-u. Suprotno tome, HIF inhibitori su u mišjim modelima s ortotopskom transplantacijom dramatično smanjili metastaze humanih stanica raka dojke u pluća utječući na više koraka u metastatskom procesu. Sveukupno rezultati sugeriraju da kombinacija s HIF inhibitorima može poboljšati učinkovitost antiangiogenih sredstava (pregledno u SEMENZA, 2012b).

Primjena bevacizumaba, kao i ostalih spomenutih preparata, dakako može izazvati nuspojave, od kojih su najčešće hipertenzija, umor ili astenija, proljev i bolovi u trbuhu, proteinurija različitog intenziteta (najčešće kod renalnih tumora). Od ozbiljnih nuspojava najčešće su gastrointestinalne perforacije, krvarenja i arterijska tromboembolija čija je incidencija različita ovisno o vrsti tumora, nadalje, komplikacije zacjeljivanja rana pa se bevacizumab ne primjenjuje barem mjesec dana od operacije. Upotreba je kontraindicirana tijekom trudnoće, zbog bitne uloge VEGF-signalizacije u embriofetalnom razvoju i angiogenezi (GARCIA i sur., 2020; <http://www.ema.europa.eu>). Kod dugotrajne primjene uočeno je smanjenje težine jajnika i maternice te odsutnost žutog tijela zbog suzbijanja angiogeneze u ženskom reproduktivnom traktu te fizealna displazija uočena na primatima. Promjene u zoni rasta kostiju i jajniku bile su reverzibilne prestankom liječenja (FERRARA i sur., 2004). Sveukupno, bevacizumab se dobro podnosi u različitim vrstama tumora i u kombinaciji s nizom kemoterapijskih protokola (GARCIA i sur., 2020).

U Republici Hrvatskoj, kao i u Europskoj uniji, Avastin (bevacizumab) je odobren za liječenje metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s paklitakselom jer bolesnici mogu imati kliničke koristi od produljenog preživljenja bez progresije bolesti, čak i ako sveukupno preživljenje nije produljeno. FDA je povukla odobrenje za liječenje ovog karcinoma sa spomenutom kombinacijom kod bolesnika koji nisu bili prethodno liječeni kemoterapijom, na temelju rezultata nedavna dva klinička ispitivanja koji ukazuju na minimalan učinak na inhibiciju rasta tumora bez dokaza o produljenju života ili povećanju kvalitete življenja u usporedbi s primjenom standardne kemoterapije. Intezivno se ispituju nove kombinacije lijekova i pristupi u liječenju. Na temelju novih kliničkih ispitivanja mogu se očekivati i nove promjene u odobrenjima kombinacija pojedinih lijekova za ove i druge maligne tumore. Prema podacima na stranici Halmed-a tako je recimo EMA ukinula odobrenje za liječenje metastatskog karcinoma dojke Avastinom u kombinaciji s docetakselom zbog nedovoljno dokaza o pozitivnom učinku ove kombinacije lijekova na preživljenje bez progresije bolesti.

Primjenom inhibitora angiogeneze može doći do selekcije tumorskih stanica koje su adaptirane na hipoksične uvjete, a to su stanice koje će najvjerojatnije preživjeti smanjenu perfuziju i koje će vjerojatnije biti otporne na radijaciju i kemoterapiju i imaju povećani invazivni i metastatski potencijal te smrtnost pacijenta. Zbog uključenosti HIF-1 u otpornost na kemoterapiju i radijaciju, inhibicija aktivnosti HIF-1 može biti važna komponenta u kombiniranim antiangiogenim terapijama. Uz to i specijalizirane inhibitore angiogeneze, mnoga nova antitumorska sredstva koja ciljaju određene molekule staničnih puteva prenosa

signala također imaju antiangiogene učinke, uvelike zbog indirektnog inhibiranja aktivnosti HIF-1, a inhibiraju i rast ksenografta (BAY 43-9006 meta mu je RAF kinaza, CCI-779: mTOR; Celebex: COX2; PD98059: MEK; ZD-1839: EGFR tirozin kinaze; imatinib/Gleevec: BCR-ABL i PDGFR tirozin kinaza inhibitor i drugi (HOCKEL i VAUPEL, 2001; SEMENZA, 2003; SEMENZA, 2010b).

Prema SEMENZA (2003) neizlječivi karcinom bubrežnih stanica (RCC) koji je povezan s mutacijama VHL-a i abundantno vaskulariziran, multififormni glioblastom i orofaringealni tumori su dobri kandidati za terapiju usmjerenu na HIF-1. Svi eksperimentalni podaci upućuju da je HIF-1 uključen u patofiziologiju RCC-a, ima učinak i na tumorske i na stromalne stanice te se čini da se pojačana aktivnost HIF-1 pojavljuje u najranijim neoplastičnim lezijama. HIF-1 ciljani geni koji se aktiviraju u RCC-u uključuju *VEGF*, kao i *PDGFB* i *TGF- $\alpha$*  čiji pripadajući proteini aktiviraju PDGF i EGF receptore, a oni su među važnijima u signalizaciji tirozin kinaza putem PI3K i MAPK za stimulaciju stanične proliferacije i preživljavanja. Primjena inhibitora HIF-1 zajedno s tirozin kinaznim inhibitorom koji cilja VEGF/PDGF i/ili EGFR, jedna je od potencijalnih terapijskih kombinacija u ovoj bolesti (SEMENZA, 2003). Među solidnim tumorima, CCRC imaju najviše razine VEGF-a vjerojatno zbog gubitka pVHL-a i deregulacije HIF-2 i najosjetljiviji su na pojedinačne lijekove usmjerene protiv VEGF-a kao bevacizumab, ili na VEGF-ov receptor (KDR) kao sunitinib, sorafenib, axitinib, pazopabib i cabozantinib (CHOUEIRI i MOTZER, 2017; KAELIN, 2017). Protein VHL na neki način djeluje kao negativni regulator VEGF-a i drugih proteina induciranih hipoksijom (FERRARA i sur., 2004). CCRC najčešći je oblik karcinoma bubrega u ljudi, inaktivacija *VHL* je tipično prva mutacija u patogenezi. Somatska inaktivacija *VHL* i deregulacija HIF-a (naročito HIF-2 $\alpha$ ) pokreće sporadične karcinome bubrega i HIF-2 $\alpha$  inhibitor je obećavajuć za terapiju ove bolest. (KAELIN, 2017). Identificiran je džep u PAS B domeni HIF-2 $\alpha$  na koji se potencijalno može utjecati lijekovima te su identificane kemikalije koje se mogu vezati za taj džep i spriječiti 2 $\alpha$  da dimerizira s HIF-1 $\beta$ . Od njih je kasnije razvijen prvi u klasi mali molekularni inhibitor HIF-2 $\alpha$  PT2385 i zatim PT2399. Oni su u prekliničkim modelima i ranim kliničkim ispitivanjima pokazali antitumorsku aktivnost protiv staničnih linija i ksenograftova pVHL-defektnog CCRC-a i metastaskog CCRC-a koji je snažno pretretiran. Razvijani su za liječenje raka bubrega (CHO i sur., 2016; WALLACE i sur., 2016; KAELIN, 2017). Multififormni glioblastom (GBM) je izrazito invazivan tumor s kojim pacijenti obično ne počive dulje od godine dana. U primarnim tumorima obično se primjećuje gubitak funkcije PTEN-a i dobitak funkcije EGFR-a i vjerojatno je hipoksijom inducirana ekspresija HIF-1 $\alpha$  uključena u patofiziologiju bolesti.

Među gliomima koji su isto jako vaskularizirani tumori, postoji jaka korelacija između ekspresije HIF-1 $\alpha$ , stupnja tumora i vaskularizacije tumora. U pacijenta s GBM-om, inhibitor HIF-1 mogao bi biti učinkovit u kombinaciji s derivatima rapamicina (koji ciljaju povećanu PI3K/AKT/mTOR signalizaciju induciranu gubitkom funkcije PTEN) kao antiangiogenim sredstvima i/ili inhibitorima tirozin kinaza. U pacijenata s orofaringealnim rakom, prekomjerna ekspresija HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru povezana je s rezistencijom na radijaciju i povećanim mortalitetom (bez obzira na stadij tumora ili druge biomarkere) i može predvidjeti otpornost na radijaciju u metastazama u limfnom čvoru. Kombinacija prekomjerne ekspresije HIF-1 $\alpha$  i mutiranog p53 također definira podskupinu tumora jajnika koji bi mogli biti osjetljivi na liječenje inhibitorima HIF-1 (pregledno u SEMENZA, 2003).

HIF-1 $\alpha$  može biti stabiliziran ili mu se pojačati ekspresija putem genetskih i epigenetskih alteracija povezanih s receptorom epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i signalnim putem PI3K/AKT/mTOR, inaktivacijom pVHL te RAS/RAF/MEK/ERK putevima značajnim u tumorima, što daje mogućnosti za manipulaciju ovim signalnim putevima u liječenju određenih patofizioloških procesa (SHIN i sur., 2015).

### **2.6.3. Primjena inhibitora hidroksilaza, HIF-a i VEGF-a u veterinarskoj medicini**

Antitumorska terapija temeljena na manipulaciji mehanizama odgovora stanica na hipoksiju istraživala se i razvijala prvenstveno s ciljem primjene u humanoj medicini, no korištenjem životinja u pretkliničkim istraživanjima za ove i druge humane lijekove i terapije, otvorio se put razvoja i primjene tih terapija i u veterinarskoj medicini, na temelju dobrih rezultata testiranja na eksperimentalnim životinjskim modelima. HIF- $\alpha$  je od značaja u karcinogenezi i ljudi i veterinarskih pacijenata, no povezanost zloćudnih tumora i HIF-a u polju veterinarske medicine slabo je istražena te je dostupno vrlo malo literaturnih podataka, pogotovo o primjeni antitumorske terapije modulacijom HIF-signalnog puta (KAMBAYASHI i sur., 2015). Više se istraživala ekspresija VEGF-a u tumorima i korelacija angiogeneze, tumorskog rasta i prognoze (MAIOLINO i sur., 2001; RESTUCCI i sur., 2002; RESTUCCI i sur., 2003).

Istraživanja npr. kaninih mamarnih tumora (CMT) - *engl.* canine mammary tumor) uglavnom su imala fokus na histološke fenotipove, molekularne podtipove tumora, ponašanje tumora i vezane prognostičke čimbenike, međutim mikrokoliš ovih tumora nije istražen u detalje. Studija autora SHIN i sur. (2015) ide u prilog tome da i kod pasa, kao što je to slučaj kod ljudi, HIF-1 $\alpha$  potencijalno može biti uključen u tumorigenezu i povećanje malignosti



tumora mliječne žlijezde. Potvrđena je pozitivna korelacija između ekspresije HIF-1 $\alpha$  i svojstva malignih CMT-a, te u tumorima različitog podrijetla (epitelijalnim, mezenhimalnim). Histološki tipovi CMT-a koji su imali najvišu ekspresiju HIF-1 $\alpha$  bili su oni s najlošijom prognozom pa povećana ekspresija HIF-1 $\alpha$  može imati prognostičku vrijednost (SHIN i sur., 2015). Tumori mliječne žlijezde pasa su jedan od najčešćih solidnih tumora u nekastriranih kuja i oko 50% ovih tumora je maligno. Zlatni standard u liječenju je operacija, dok su drugi tipovi liječenja ovih tumora u veterini u eksperimentalnoj fazi te nema dostupnih informacija o upotrebi antiangiogene terapije u CMT-u, ali teoretski maligni CMT bi posebno trebao biti vrlo osjetljiv na antiangiogenu terapiju (SLEECKX i sur., 2011). MEES i sur. (2011) ukazali su na povezanost hipoksije i metabolizma u kaninom mamarnom karcinomu.

MARTANO i sur. (2020) prvi su dokazali da je u sarkoidu konja prisutna povećana ekspresija HIF-1 $\alpha$  i pretpostavili da HIF-1 $\alpha$ , zajedno s VEGF-om, može imati ulogu u razvoju sarkoida. Ekvini sarkoidi su najčešći fibroblastični benigni tumori kože u porodici Equidae. Pošto ne reagiraju svi sarkoidi na terapiju unatoč dostupnom izboru brojnih tretmana, HIF-1 mogao bi u budućnosti biti jedna od ciljanih molekula u terapiji konjskog sarkoida (MARTANO i sur., 2020).

Osteosarkom je najčešći tumor kostiju u pasa, čini 85% svih malignosti skeleta (PETTY i sur., 2008). Primjena bevacizumaba na pseće stanice osteosarkoma ksenotransplantirane u miša inhibirala je njihov rast, što sugerira da bi inhibitori VEGF-a mogli biti klinički korisni u liječenju osteosarkoma kod pasa. Osteosarkom pasa inače se koristi u pretkliničkim studijama kao model za osteosarkome kod ljudi. Ovi rezultati upućuju na to da bevacizumab može imati pozitivan klinički učinak u liječenju osteosarkoma u ljudi (SCARF i sur., 2013). O povezanosti ekspresije VEGF-a i angiogeneze, progresije bolesti i neoplastične proliferacije u kaninom oralnom karcinomu skvamoznih stanica bavili su se MARTANO i sur. (2016), njihovi rezultati su u skladu s ostalom literaturom.

KAMBAYASHI i sur. (2015) u staničnim linijama i uzorcima limfoma pasa također su potvrdili ekspresiju HIF-1 $\alpha$ . Njihovi rezultati sugeriraju da HIF-1 $\alpha$  pridonosi proliferaciji i/ili preživljavanju stanicama limfoma u pasa i da bi se HIF-1 $\alpha$  inhibitori mogli koristiti kao sredstva u terapiji ovih tumora te su prvi pokazali vezu između HIF-1 $\alpha$  i limfoma pasa. HIF-1 $\alpha$  inhibitori, ehinomicin, YC-1 i 2-metoksiestradiol, suprimirali su proliferaciju staničnih linija kaninih limfoma, a u ksenograftovima na mišu tretman ehinomicinom rezultirao je regresijom tumora ovisnoj o dozi. Limfomi su najčešći oblik hematopoetske malignosti u pasa, a oboljeli se liječe kemoterapijom s više lijekova. Stopa remisije je 80% i može trajati više od 9 mjeseci,

ali gotovo svi bolesnici imaju recidiv i razvijaju rezistenciju na lijekove te su poželjni novi tretmani. Pretpostavlja se da se ehinomicin, koji je pokazao učinak *in vivo*, klinički može koristiti kao sredstvo protiv raka, no njegove nuspojave na pse treba istražiti prije upotrebe. Budući da povećanje doze dovodi do regresije tumora, ehinomicin bi se trebao primjenjivati u velikim dozama ili u kombinaciji s drugom kemoterapijom ako se koristi u liječenju. Kako se HIF-1 $\alpha$  stabilizira u kaninim stanicama limfoma neovisno o kisiku, kao u normoksiji, još je nejasno. U humanim stanicama fosforilacija mTOR-a i/ili p70 S6 kinaze (S6K1) pridonosi stabilizaciji HIF-1 neovisnoj o kisiku, no ovi autori u svojim analizama nisu dobili povezanost (KAMBAYASHI i sur., 2015).

CHEN i sur. (2020) istraživali su ekspresiju HIF-1 $\alpha$  i VEGF-a u felinom mamarnom karcinomu i njihovu korelaciju s kliničkim stadijima, histologijom, metastazama i stopom preživljavanja te zaključili da povišena ekspresija HIF-1 $\alpha$  može ukazati na lošu prognozu.

MADEJ i sur. (2013) detektirali su HIF-1 u najčešćim malignim i benignim tumorima epitelnih stanica u kuja (adenokarcinomima i adenomima), a u usporedbi s adenomima, u adenokarcinomima je uočena značajno viša ekspresija HIF-1 $\alpha$  koja je bila u pozitivnoj korelaciji s određenim prognostički nepovoljnim osobinama tumora tj. stupnjem malignosti tumora (ekspresija raste s porastom stupnja malignosti) i proliferacijskim potencijalom te vaskularizacijom tumora. Rezultati ovih autora ujedno upućuju na sličnu biološku ulogu HIF-1 $\alpha$  u pasa i ljudi i potvrđuju prikladnost životinjskih modela u istraživanjima progresije tumora u ljudi (MADEJ i sur., 2013).

U svrhu antiangiogene strategije u liječenju pasa s multiplim malignim oboljenjima razvijeni su npr. trombospondin-1, mimetički peptidi te endogeni inhibitori angiostatin i endostatin te toceranib fosfat (MATEJČIĆ, 2018). Toceranib fosfat (Palladia), odobren je za terapiju neresektabilnog, rekurentnog, kutanog mastocitoma pasa drugog (srednjeg stupnja) ili trećeg stupnja (visokog stupnja) prema Patnaiku. Inhibitor je malih molekula multi-kinaze, djeluje izravno protutumorski i antiangiogeno, ima antiproliferacijski učinak na endotelne stanice *in vitro* (ne djeluje dakle direktno na VEGF). Toceranib selektivno inhibira djelovanje tirozin kinaze, nekoliko članova obitelji razgradnog receptora tirozin kinaze (RTK), od kojih su neki uključeni u rast tumora, patološku angiogenezu i metastatsku progresiju raka, receptora VEGFR-2, receptora trombocitnog čimbenika rasta (PDGFR) i receptora čimbenika matičnih stanica (c-Kit). Inducira zastoj staničnog ciklusa i daljnju apoptozu u staničnim linijama tumora koje izražavaju aktivirajuće mutacije u RTK-u razgrađene kinaze, c-Kit-u. Rast psećeg tumora mastocita često je potaknut aktivacijskom mutacijom u c-Kit-u. Ima brojne nuspojave koje

najčešće zahvaćaju gastrointestinalni sustav, a očituju se kao proljev, povraćanje, letargija, gubitak težine, ulceracije i krvarenja (podaci iz službene upute o lijeku). Toceranib je bio prvi lijek protiv raka namjenjen samo psima. U ispitivanjima na psima pokazalo se da uništava, smanjuje ili zaustavlja rast tumora u 60% slučajeva. Primjenjuje se oralno svaki drugi dan. Onkolozima su psi zanimljivi za istraživanja jer se pokazalo da često oboljevaju od istog tipa zloćudnih bolesti kao i ljudi (<https://www.ema.europa.eu>). Bevacizumab i aflibercept ulaze u interakciju s VEGF-om pasa na sličan način kao s humanim VEGF-om, ali ne i s VEGF-om mačaka i konja te je moguća njihova terapijska primjena kod pasa. Sigurnost i učinkovitost treba klinički istražiti (MUELLERLEILE i sur., 2019).

### **3. BUDUĆI IZAZOVI U ISTRAŽIVANJU HIF/pVHL/PHD SUSTAVA I KLINIČKOJ PRIMJENI ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Kompleksnost staničnih procesa i regulacije homeostaze kisika**

Samo otkriće HIF kompleksa i njegove uloge u homeostazi kisika omogućilo je razvoj novih lijekova za različita patološka stanja, poboljšanje terapijskih strategija koje se oslanjaju na stanične mehanizme koji detektiraju promjene kisika i bolje postavljanja prognoza. Regulacije signalnih puteva HIF-a ovisne i neovisne o kisiku i dalje se istražuju, kao i stanično-specifična genska ekspresija i povezanost s izoformama, ali i same osnove kao što su recimo biokemijska i biofizička svojstva HIF-hidroksilaza. Također signalni putevi koji reguliraju sintezu HIF podjedinica nisu tako intenzivno istraživani kao putevi degradacije te i dalje dolazi do novih otkrića o međusobnim interakcijama molekula iz više signalnih puteva. Sve u svemu ima prostora za nove spoznaje. Prema BERRA i sur. (2003) jedan od izazova je identificiranje *in vivo* substrata, funkcije, međudjelovanja PHD izoformi u različitim fiziološkim okolnostima.

Proces angiogeneze, tumorigeneza, sveukupna regulacija PHD-a, HIF-1/2 molekula (onog što one reguliraju i što njih regulira) i mehanizam "osjećanja" promjena kisika i prijenosa tog signala je izrazito kompleksna, kao i postizanje homeostaze kisika, što u svojim radovima naglašavaju mnogi autori. Nakon prvotne indukcije gena za eritropoetin HIF-om, kako su se otkrivali mnogi geni na čiju transkripciju može utjecati HIF, što je isto ukazivalo na kompleksnost i važnost HIF-signalnog puta, bilo je zbujujuće kako jedna molekula može pokrenuti toliko i tako raznolikih gena i odgovora od kojih su neki stanično-specifični i to u stanicama s možda različitim tlakovima kisika. Zbog povezanosti s drugim signalnim putevima u regulaciji i u kaskadi reakcija koje pokrene više HIF izoformi, zatim više hidroksilaza

uključenih u odgovore na hipoksiju i njihova regulacija na više razina, moguće je da na prvi pogled jedna jedina molekula može pokrenuti toliko raznolikih odgovora i pruža se fleksibilnost u odgovoru (WENGER, 2002; SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004; RATCLIFFE, 2007; ALBADARI i sur., 2019; LEE i sur., 2019). Funkcionalna interakcija HIF-a s drugim čimbenicima transkripcije može odrediti podskupinu ciljanih gena (s npr. HIF-1) koja se aktivira u nekoj određenoj hipoksičnoj stanici (SEMENZA, 2003). Razumijevanje tih interakcija i kako one utječu na selektivno vezanje HIF izoformi daje uvid u to kako su upravljani specifični odgovori na hipoksiju (RATCLIFFE, 2007). WENGER (2002) navodi proteine iz drugih signalnih puteva s kojima HIF-1 $\alpha$  općenito ulazi u interakcije. IPAS pridonosi složenosti u regulaciji HIF-om induciranih gena u hipoksiji (ALBADARI i sur., 2019). Pošto se IPAS može vezati na različite izoforme, a one imaju i različite transkripcijske mete, mogu promijenjati karakter transkripcijskog odgovora (RATCLIFFE, 2013). "Microarray" analize ekspresije otkrile su mnoge potencijalne HIF-1-om ciljane gene u pVHL-deficijentnim stanicama, što je zahtjevalo buduće eksperimente koji će definirati da li su ti novi geni HIF-om direktno ili indirektno ciljani i razriješiti oprečne rezultate kao npr. jedne studije po kojoj HIF-1 regulira Flt-1 receptor, a po drugoj je to dovedeno u pitanje (pregledno u WENGER, 2002). IYER i sur. (1998a) spominju da miševi izražavaju nekoliko različitih izoformi proteina HIF-1 $\alpha$  koje ljudi ne ekspimiraju i da biološka aktivnost ovih varijanti proteina nije poznata. Možda ima još ovakvih razlika među vrstama sisavaca ili u genima koje HIF može transkripcijski aktivirati. Kako su otkrivani pojedini proteini kod različitih vrsta tako su ih nazivali različitim imenima, a kasnije se pokazalo da su u biti homologni i imaju istu funkciju. Tako se u starijoj literaturi mogu naći i druga imena za HIF proteine (WANG i sur., 1995).

Postoje drugi, HIF-neovisni signalni putevi koji se mogu aktivirati u hipoksiji, kao što je signalni put nuklearnog čimbenika kapa-B (NF- $\kappa$ B) te postoje studije koje podupiru ideju da su hipoksija i upala međusobno ovisne. Zapravo, mnoga istraživanja pokazuju da iako hipoksija može uzrokovati upalu tkiva, stabilizacija HIF-a može prigušiti upalu tkiva i pospješiti njegovo obnavljanje. Protuupalni inhibitori hidroksilaza kao DMOG kojima se smanjuje upala, razvijeni su upravo na spomenutim saznanjima (BARTELS i sur., 2013; ELTZSCHIG i CARMELIET, 2011; LEE i sur., 2019). Razumijevanje biologije kontrole HIF-1 $\alpha$  neovisne o kisiku postalo je sve jasnije za razliku od kontrole HIF-2 $\alpha$  neovisne o kisiku koju je potrebno detaljnije istražiti. O ulozi i temeljima tih kisik-neovisnih mehanizama u regulaciji HIF-1/2 $\alpha$  potrebna su dodatna pojašnjenja s obzirom na postojeće oprečne rezultate (ALBADARI i sur., 2019).

Regulacija izoforme HIF-3 $\alpha$  najslabije je poznata i razumljiva, funkcije u odgovoru na hipoksiju su uglavnom nepoznate, iako se obično ova izoforma smatra negativnim regulatorom HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ . To sve, i u kojim je sve stanicama najviše prisutna, bi svakako trebalo dodatno istražiti pošto se pokazalo da postoji razlika u transkripcijskom učinku HIF kompleksa na ciljane gene u različitim tipovima stanica, ovisno o izoformi  $\alpha$  podjedinice u kompleksu, a i da ima više podvarijanti 3 $\alpha$  podjedinice. U ljudskim stanicama nađeno je barem sedam varijanti, koje sve ulaze u interakciju s 1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ . Duge HIF-3 $\alpha$  varijante u hipoksiji su bile lokalizirane u jezgri, dok je HIF-3 $\alpha$ 4 nađena u citoplazmi. Interakcije HIF-3 $\alpha$  varijanti s HIF-1 $\alpha$  mogu inhibirati nuklearnu translokaciju obje podjedinice. Nijedna od dugih HIF-3 $\alpha$  varijanti nije bila sposobna za efikasnu indukciju HRE reportera u eksperimentu prekomjerne ekspresije, nego je inhibirala transkripcijsku aktivaciju reportera pomoću HIF-1 i HIF-2. SiRNA *knockdown* endogenih HIF-3 $\alpha$  varijanti vodila je u smanjenja ekspresije određenih HIF-ciljanih gena, dok je pojačana regulacija pojedinih dugih varijanti HIF-3 $\alpha$  pojačala ekspresiju određenih HIF-ciljanih gena, ovisno o varijanti i ciljanom genu, u uvjetima u kojima HIF- $\beta$  nije bio limitirajući čimbenik. Ovi podaci ukazuju na to da varijante HIF-3 $\alpha$  mogu imati svestranije i specifičnije uloge u regulaciji odgovora na hipoksiju nego što se prethodno očekivalo (HEIKKILA i sur., 2011). S obzirom na sve više dokaza o biološki različitim funkcijama HIF-1 $\alpha$  nasuprot HIF-2 $\alpha$  i drugih izoformi, razumijevanje mehanizama koji ograničavaju aktivnost HIF-2 $\alpha$  je od interesa (MOLE i sur., 2009). Definiranje precizne uloge svakog od člana HIF porodice koji se djelomično i preklapaju u ekspresiji i funkciji, uloge HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  u pokretanju odgovora na hipoksiju u različitim stanicama ili ovisno o trajanju hipoksije i općenito uloge svake izoforme i njihovih varijanti u homeostazi kisika je domena koja i dalje ima potencijala za istraživanje. Raspravlja se i o tome da li neka izomorfa isključivo ili dominantno potiče ekspresiju gena i u kojim stanicama. Neke razlike između HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  mogu ovisiti o jedinstvanim miRNA i transkripcijskim koaktivatorima (LOBODA i sur., 2010; LOBODA i sur., 2012). Zabilježene su dodatne tri potencijalno antagonističke molekule HIF-1 koje se prirodno pojavljuju, čiji se značaj još treba definirati (aHIF, HIF-1 $\alpha$ Z, dominantno-negativni HIF-1 $\alpha$ ). Moguće je da se različiti transkripcijski odgovori na HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  integriraju na način koji podržava određenu vrstu fiziološke prilagodbe na hipoksiju što treba još pojasniti i ispitati. Na primjer HIF-2 $\alpha$  možda može inducirati u hipoksiji i druge gene, ne samo za eritropoetin i transferin, a čija je funkcija uključena specifično u poticanje eritropoeze, no za sad malo što ide u prilog tome. Razumijevanje različitih funkcija različitih HIF- $\alpha$  izoformi i u kojim stanicama su maksimalno ekspimirane potencijalno je korisno za poboljšanja u terapijskim pristupima, na način da se dizajniraju novi specifični aktivatori ili inhibitori

različitih HIF podjedinica npr. aktivator HIF-2 $\alpha$  za indukciju produkcije EPO u liječenju anemija (RATCLIFFE, 2007) ili terapijsku korist za srce koje zatajuje (SEMENZA, 2014). KAELIN i RATCLIFFE (2008) isto spominju da je opisana 1 $\alpha$  varijanta kojoj nedostaje CTAD, a nastaje alternativnim prekrajanjem. Dominantno-negativni oblik HIF-1 $\alpha$  mogao bi biti prikladan za primjenu genske terapije (SEMENZA, 2000a). ALBADARI i sur. (2019) naglašavaju da je i dalje vrlo izazovno razviti specifičnije i time selektivnije HIF-1/2 inhibitore kojih gotovo ni nema, odnosno za kliničku primjenu nijedan nije odobren. S novim spoznajama o strukturi HIF-a, molekularnih mehanizmima i interakcijama s drugim signalnim putevima vjerojatno će doći do razvoja efikasnijih inhibitora.

Izrazita izraženost IPAS-a u rožnici ima svoje biološko značenje gdje se IPAS suprotstavlja funkciji HIF-1 $\alpha$ , suzbija aktivaciju *VEGF* gena i neovaskularizaciju epitela rožnice, a to je važno u održavanju prozirnosti rožnice i jasan vid. Selektivna negativna regulacija IPAS-a na HIF-1 $\alpha$  mogla bi se iskoristiti u kompromitiranju tumorske angiogeneze i drugih patoloških stanja povezanih s povišenom aktivacijom HIF-1 $\alpha$ . Pokazalo se da stanice hepatoma koje eksprimiraju IPAS proizvode tumore sa sporijom stopom rasta i nižom vaskularnom gustoćom u odnosu na stanice divljeg tipa (MAKINO i sur., 2001; ALBADARI i sur., 2019).

Istraživanja ekspresije u zdravih miševa otkrivaju da su funkcije HIF-1 šire od prilagodbe na hipoksiju: HIF-1 $\alpha$  nađena je eksprimirana u različitim normoksičnim organima, unutar posebnih tipova stanica, sugerirajući da dodatni čimbenici kao stanična diferencijacija i odgovor na čimbenike rasta reguliraju ekspresiju HIF-1 $\alpha$ . Ekspresija HIF-1 $\alpha$  u normoksičnom mozgu miša, čini se da je uključena u regulaciju cirkadijskog ritma, jer se pokazalo da HIF-1 može međudjelovati s *Per1*. Detektirana je nova izoforma HIF-1 $\alpha$  s ekspresijom u postmejotičkim spermatidama u mišjem testisu, u spermatozoidnom repu te je zabilježeno da je ekspresija povećana u aktiviranim T-stanicama. Njezine funkcije u ovim stanicama tek treba istražiti. Indukcija HIF-1 $\alpha$  zabilježena je nakon izlaganja miševa vrućini što im je povećalo temperaturu tijela. Pokazalo se da ovaj efekt nije zbog tkivne hipoksije koja se sekundarno javlja, već se događa izravnom stabilizacijom proteina koja uključuje HSP90 (pregledno u WENGER, 2002).

Precizni regulatorni mehanizmi uključeni u kontrolu nuklearno-citoplazmatske lokalizacije HIF- $\alpha$ , što je vjerojatno posredovano aktivnim isključivanjem podjedinice iz jezgre u prisutnosti kisika, nisu u potpunosti poznati. Prostora za nova saznanja ima vezano za manje poznato kao npr. dodatne posttranslacijske modifikacije HIF- $\alpha$  podjedinica (uključujući

fosforilaciju i acetilaciju) i njihove povezanosti s putevima osjetljivim na promjene kisika (SCHOFIELD i RATCLIFFE, 2004). Prekomjerno eksprimirani HIF-1 $\alpha$  protein konstitutivno se lokalizira u jezgru u normoksiji. Dakle, nuklearna se translokacija može regulirati normoksičnom inhibicijom, a ne hipoksičnom aktivacijom, a prekomjerna ekspresija HIF-1 $\alpha$  može zasititi ovaj inhibični mehanizam. Tumor supresorski protein p14<sup>ARF</sup> može sekvestrirati HIF-1 $\alpha$  u jezgru, čime inhibira njegovu transaktivacijsku funkciju (pregledno u WENGER, 2002).

Dok je HIF glavni čimbenik u određivanju staničnog odgovora na hipoksiju, značajan broj sekundarnih putova može modulirati globalni transkriptomski odgovor. Nadalje, s obzirom na raznolik niz aktiviranih transkripcijskih čimbenika, vjerojatno je da se mogu stvoriti brojni signali dok stanica prelazi iz normoksije u hipoksiju. Transkripcijski ishod hipoksije vjerojatno ovisi o stupnju i opsegu doživljene hipoksije i staničnim potrebama za kisikom. Potrebne su daljnje studije kako bi se utvrdio niz signalnih događaja dok stanica prelazi iz normoksije u blagu, umjerenu, ozbiljnu i smrtonosnu hipoksiju (CUMMINS i TAYLOR, 2005).

I dalje se istražuje o samim temeljima procesa i molekulama uključenim u hipoksične odgovore i na biokemijskoj razini. Superporodica 2-oksoglutarat dioksidogenaza široko je zastupljena i među prokariotima i eukariotima, ali do danas nije jasno jesu li HIF hidroksilaze razvile jedinstvene katalitičke značajke ili su relativno obične oksigenaze ovisne o 2-oksoglutaratu koje jednostavno koriste svoje apsolutne potrebe za molekularnim kisikom u signalnoj ulozi. U fokusu znanstvenika je evolucijsko podrijetlo funkcije prepoznavanja promjena kisika 2-oksoglutarat oksigenaza kod viših životinja. Ove oksigenaze i srodni enzimi oksidiraju i male i velike molekulske supstrate i uključeni su u različite biološke funkcije. HIF hidroksilaze su ograničene na više eukariote što možda upućuje da se sustav razvio kao odgovor na izazov održavanja homeostaze kisika u višestaničnim životinjama (RATCLIFFE, 2006). Treba utvrditi u kojoj se mjeri preklapaju aktivnosti i funkcije tri PHD sisavaca, prostorno i vremenski, a u kojoj mjeri su jedinstvene (npr.  $K_m$  za O<sub>2</sub>, ciljani proteini za modifikaciju, odnos koncentracije O<sub>2</sub> i enzimatske aktivnosti svake PHD u živim stanicama i dr.) (SEMENZA, 2001; WENGER, 2002, SEMENZA, 2004). Pojedini radovi upućuju na to da PHD1 u tumoru dojke može biti inducirana estrogenom, odnosno uključena je u proliferaciju stanica raka dojke koja ovisi o estrogenu. Još uvijek se traga za mehanizmom koji stoji u pozadini toga, a moguće da je samo odraz funkcije PHD1 neovisne o HIF-u (KAELIN, 2017).

Plinski transmiteri imaju ulogu u akutnim odgovorima na promjene kisika, HIF u odgovoru na kroničnu intermitentnu hipoksiju, a postoji veza između ova dva sustava kroz ROS

koji se produciraju tijekom intermitentne hipoksije i pojačavaju disregulacijom ekspresije HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ . Postoji mutualni antagonizam između 1/2 $\alpha$  u karotidnim tijelima i niže neuralne komponente kemosenzornog refleksa, a ravnoteža između prooksidans-aktivnosti ovisne o HIF-1 $\alpha$  i antioksidacijske aktivnosti ovisne o HIF-2 $\alpha$  određuje redoks stanje karotidnih tijela, što zauzvrat određuje zadanu točku simpatičkog živčanog sustava i kardiorespiratornu homeostazu. Ova ravnoteža može biti poremećena okolišnim (intermitentna hipoksija) ili genetskim uzrocima, što vodi u povećanu simpatičku aktivaciju i razvoj hipertenzije. Lijekovi koji selektivno inhibiraju HIF-1 ili HIF-2 mogu spriječiti razvoj hipertenzije kod opstruktivne apneje u snu ili potaknuti hipertenziju u drugih. Na primjer HIF-2 $\alpha$  selektivni inhibitori, koji su pod evaluacijom kao terapija protiv raka, mogu dovesti do neravnoteže između aktivnosti HIF-1 i HIF-2, rezultirajući hipertenzijom i abnormalnostima u disanju (CHO i sur., 2016; SEMENZA i PRABHAKAR, 2018).

Kao što je ranije rečeno, ne može se govoriti o jednostavnoj vezi – da aktivacija ili poremećaj regulacije HIF signalnog puta uzrokuje ili potiče maligni fenotip ili je odgovoran za progresiju malignih tumora, pošto su mnogi čimbenici uključeni u sve te procese, iako su među HIF ciljanim genima mnogi povezani s karakteristikama malignih tumora. Iako je ukupni zaključak da HIF-1/2 $\alpha$  promiču progresiju raka, povezanost nije apsolutna. Na primjer, dok je gubitak funkcije HIF-1 $\alpha$  smanjio rast SW480 ksenografta karcinoma debelog crijeva, gubitak funkcije HIF-2 $\alpha$  povećao je rast ksenografta i imunohistokemijska analiza biopsata otkrila je značajnu povezanost između gubitka ekspresije proteina HIF-2 $\alpha$  i uznapredovalog stadija tumora (IMMAMURA i sur., 2009). Suprotno tome, RAVAL i sur. (2005) su u svom istraživanju ksenograftova karcinoma bubrežnih stanica 786-O zabilježili da HIF-1 $\alpha$  dobitak funkcije usporava, a HIF-2 $\alpha$  dobitak funkcije pojačava rast tumora te ističu da ovo upućuje na to da terapijsko ciljanje HIF sustava barem kod ovih tumora treba uzeti u obzir specifične funkcije izoformi HIF-a. Ove razlike u utjecaju izoformi na rast tumora dovode se u vezu i sa suprotnim učincima na ekspresiju specifičnih gena (npr. za BNIP3, D1, TGF). Zbog supresivnih interakcija između HIF- $\alpha$  izoformi, supresija rasta tumora s HIF-1 $\alpha$  možda proizlazi iz direktnog učinka, indirektnog učinka uslijed smanjene regulacija HIF-2 $\alpha$  ili obojeg. Nikakvi učinci nisu uočeni na jednoslojnu kulturu u standardnim uvjetima za kulture. KAELIN (2017) u svom radu napominje da nema dokaza da su npr. gubitak VHL-a ili aktivacija HIF-a dovoljni da uzrokuju rak (npr. u nastanku CCRC-a uz poremećenu regulaciju potrebne su dodatne genske mutacije) te da je u mnogim slučajevima HIF jednostavno marker lošeg ponašanja tumora te treba biti oprezan kad se razmišlja o stvarnoj uzročnoj ulozi HIF-a u progresiji raka.



### 3.2. Ograničenja u eksperimentalnom radu i praćenju učinka lijekova

Napredak tehnologije i metoda u eksperimentalnom radu omogućio je detekciju i mjerenja određenih molekula unutar stanica čime su se rasvijetlile nepoznanice o pojedinim staničnim događajima i reakcijama. Kada su HIF-hidroksilaze jasno definirane kao veza između dostupnosti kisika i regulacije ekspresije gena u životinja, to je otvorilo nove smjerove u istraživanju (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Treba naglasiti da se velika većina istraživanja staničnih procesa ili tumora radi na kulturi stanica te ponekad postoje sumnje odražavaju li rezultati dobiveni na taj način stvarne stanične interakcije živog organizma te se ponekad mogu dobiti i kontradiktorni podaci. RATCLIFFE (2006) naglašava ovu nužnu upotrebu nefizioloških uvjeta za reakcije u *in vitro* testovima. WENGER (2002) spominje da dobiveni *in vitro* podaci vezani za pojedine regulatore ekspresije HIF- $\alpha$  mogu biti ograničeni na korištene modele stanične kulture i da ne odražavaju nužno fiziološku situaciju *in vivo*. Primjena ksenograftova donekle rješava ovaj problem kao i uzgoj miševa s genskim modifikacijama. SEMENZA (2003) detaljnije elaborira o tumorskim ksenograftskim modelima kao trenutnom standardu u prekliničkim ispitivanjima potencijalnih antitumorskih sredstava te o manjkavostima i ograničenjima ovih modela. Ksenograftski test je ujedno najčešća eksperimentalna metoda za dokazivanje da je određeni genski produkt uključen u rast tumora, a uključuje subkutano ubrizgavanje tumorskih stanica s transfektiranim ekspresijskim vektorima u imunodeficientnog (*nude* ili SCID) miša. Ovi pristupi su korišteni i u proučavanju HIF kompleksa. Rak se razvija zbog mutacija i postupne selekcije određenih skupina tumorskih stanica. Maligne tumore karakterizira izrazito visoki stupanj genetske heterogenosti. Među milijunima stanica u tumoru, vjerojatno postoje subpopulacije koje su otporne na bilo koje pojedinačno terapijsko sredstvo i zbog toga su za uspješnije liječenje uznapredovalog raka uglavnom potrebni protokoli s više lijekova. Taj stupanj genetičke heterogenosti ne postoji u tumorskim ksenotransplantatima. Također ključno ograničenje ovih modela vezano je za presudnu važnost interakcija koje se odvijaju između stanica tumora i stromalnog mikrokoliša. Čimbenici potrebni za angiogenezu, invazivnost i metastaze u jednom tkivu značajno se razlikuju od onih potrebnih na drugom mjestu. Potkožni prostor gdje su ksenograftovi ne pruža isto mikrokruženje kao uobičajena mjesta zloćudnog tumora kao što su mliječna žlijezda, debelo crijevo ili npr. pluća. Također, većina oboljelih umire od metastaza koje se ne mogu modelirati inkapsuliranim potkožnim ksenograftom. Pošto se ksenograft-testovi provode na imunodeficientnim miševima, populacije upalnih stanica koje su uključene u progresiju malignih tumora nisu zastupljeni u ovim modelima (SEMENZA, 2003). Iz ovoga je vidljiva

nužnost kliničkih ispitivanja, kad se u pretkliničkim pokaže zadovoljavajuća sigurnost ispitivanog sredstva. Upotreba ortotopske transplantacije umanjuje problem mikrookoliša tumora. Na primjer stanice glioblastoma ubrizgane u mozak glodavaca tvore tumore koji dijele izuzetnu histološku sličnost s invazivnim humanim glioblastomima. Određene humane stanične linije raka dojke, kada se ubrizgaju u masni jastučić mliječne žlijezde, pokazuju visoku učestalost metastaza. Ovi modeli stoga omogućuju i pružaju priliku za analizu uloge HIF-1 u invaziji i metastaziranju. Postoje i modeli raka razvijeni inženjeringom mutacija tumor supresorskih gena ili onkogeni u mišjem genomu. Ovim pristupom se mogu modelirati nasljedni sindromi s predispozicijom za tumore u kojima je heterozigotna mutacija tumor supresor gena (npr. *TP53*) prisutna u zametnoj liniji. Za većinu onkogeni, mutacije nisu otkrivene u zametnoj liniji, vjerojatno jer bi rezultirale razvojnim defektima. Novi pristupi, poput upotrebe retrovirusne infekcije ciljnog tkiva za poticanje ekspresije onkogeni, mogli bi pružiti bolje mišje modele malignih tumora koji reproduciraju heterogenost progresije raka. Imaju neke nedostatke kao modeli za ispitivanje djelotvornosti potencijalnih terapijskih sredstava, ali su rješivi. Nove slikovne tehnike kao snimanje *in vivo*, razvoj magnetske rezonancije i pozitronske emisijske tomografije mogu omogućiti praćenje apoptoze i proliferacije tumorskih stanica, angiogeneze, protoka krvi, oksigenacije i metabolizma glukoze. Također mogu se koristiti za praćenje općenitog odgovora pacijenta na terapiju ili mete lijeka na terapiju (npr. inhibitorima kinaze, kinaznih receptora ili HIF-1) i korelacije molekularnog učinka s ishodom u pacijenta (pregledno o navedenom u SEMENZA, 2003). U prvoj fazi ispitivanja u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva, dinamički MRI s kontrastom koji može procijeniti akutne ili kratkoročne promjene u vaskularnosti i propusnosti tumora, pokazao se mogućim markerom farmakološkog odgovora na PTK787, inhibitor tirozin kinaza VEGFR-a (MORGAN i sur., 2003; FERRARA i sur., 2004). Praćenje aktivnosti HIF-a *in vivo* za testiranje odgovora na lijek na početku liječenja bilo bi korisno za dokazivanje da lijek pogađa svoj cilj. Tehnike snimanja koje prate perfuziju tumora (DCE-MRI) ili unos glukoze (FDG-PET) mogu biti korisne u tu svrhu, ali su to neizravne metode i izrazito skupe (SEMENZA, 2012b). Treba utvrditi da li vidljive promjene na DCE-MRI donekle predviđaju bilo kakvu dugotrajnu kliničku korist ili preživljenje, u tom slučaju bi snimanje bilo korisno za identificiranje pacijenata koji će vjerojatnije odgovoriti na liječenje, anti-VEGF i HIF-terapiju i sl. (FERRARA i sur., 2004).

### 3.3. Budući izazovi u terapiji

Precizno određivanje HIF transkriptoma pružilo je molekularnu osnovu za povezanost između intratumorske hipoksije i invazije, metastaziranja i smrtnosti pacijenata (HOCKEL i VAUPEL, 2001). U ovoj, možemo reći, molekularnoj fiziologiji i patofiziologiji i rastućem trendu personalizirane (precizne) medicine, koja teži učinkovitijoj terapiji usmjerenoj na pojedinog pacijenta, primjeni ciljanih kemoterapeutika i smanjenju negativnih nuspojava, izazov je pretočiti znanstvene podatke u kliničku primjenu. Bolji i precizniji učinci terapija leže u dizajnu vrlo preciznih lijekova.

Tradicionalne kemoterapije daju se pacijentima u maksimalno podnošljivim dozama kao citotoksična sredstva namijenjena ubijanju što većeg broja tumorskih stanica koje se dijele. No ti lijekovi ubijaju i druge stanice koje se dijele, npr. krvotvorne stanice. Zato se daju epizodno, nakon čega slijede intervali od 2-3 tjedna bez lijekova, tijekom kojih dolazi do oporavka koštane srži. Nažalost, često dolazi i do oporavka tumora što dovodi do selekcije otpornih stanica i pojave metastaza te na kraju to i ubija pacijenta (SEMENZA, 2010b). Neki tumori su otporni ili mogu postati otporni na pojedine lijekove te je potrebno dodatno istražiti molekularne osnove toga kako bi se razvile učinkovitije npr. antiangiogene terapije. FERRARA i sur. (2004) spominju studije koje sugeriraju da regrutacija pericita putem tumorske krvožilne mreže, proces koji primarno ovisi o PDGFR- $\beta$  signalizaciji, je u kasnom stadiju tumora mehanizam otpornosti na terapije koje samo ciljaju VEGF, što upućuje da kombinacije terapija ciljanih i na VEGF i PDGF mogu biti obećavajuće. SEMENZA (2012b) navodi da HIF-1 posreduje rezistenciju na imatinib kroz metaboličko reprogramiranje, aktivirajući ekspresiju transketolaze i povećavajući pritom tok glukoze kroz neoksidativni dio puta pentoza-fosfata. Iako je razumijevanje mehanizama rezistencije na antiangiogenetsko liječenje napredovalo, učinkoviti klinički pristupi za prevladavanje rezistencije na liječenje npr. bevacizumabom još nisu dostupni (GARCIA i sur., 2020).

Ono čemu se također sve više teži je identifikacija biomarkera koji bi mogli predvidjeti kod koje skupine pacijenata će određena terapija izazvati dobar odgovor. GARCIA i sur. (2020) ističu da unatoč intenzivnim naporima i dalje nisu identificirani pouzdani i validirani prediktivni biomarkeri koji bi recimo omogućili personaliziraniju uporabu bevacizumaba. Svejedno, očekuje se da će bevacizumab ostati ključno antiangiogeno sredstvo u terapiji oboljelih od raka, kako zbog svoje opsežno utvrđene učinkovitosti u kombinaciji s kemoterapijom za odobrene indikacije, tako i zbog toga što je obećavajući partner u novim ciljanim kombiniranim tretmanima, zbog rastućeg broja dokaza o daljnjim poboljšanim ishodima liječenja u

kombinaciji s imunoterapijom ili npr. PARP inhibitorima kod raka jajnika. Druga trenutno dostupna antiangiogena sredstva nisu pokazala tako dosljednu djelotvornost u odnosu na indikacije, niti imaju utvrđen profil kliničke djelotvornosti i sigurnosti na temelju opsežnog kliničkog iskustva i iskustva na tržištu (GARCIA i sur., 2020). DALES i sur. (2005) dokumentirali su da prekomjerna ekspresija HIF-1 $\alpha$  predviđa rani recidiv kod malignih tumora dojke, također statistički značajno može predvidjeti rizik od metastaza. Pošto je kod podskupine bolesnika čiji su zloćudni tumori dojke, cerviksa, endometrija sadržavali visoku razinu HIF-1 $\alpha$  nađena značajno povećana stopa smrtnosti, imunohistokemijska detekcija HIF-1 $\alpha$  ima potencijala za odabir pacijenata za koje može biti indicirana agresivnija terapija ili onih koji mogu imati koristi od inhibitora HIF-1 $\alpha$  puta. Testiranje ove hipoteze kliničkim ispitivanjima je opravdano (DALES i sur. 2005; SEMENZA, 2010b). U znanstvenim krugovima raspravlja se da li HIF- $\alpha$  pridonosi poboljšavanju fitnesa ili agresivnosti stanica raka *in vivo* ili je stvar u tome da će vrlo agresivni tumori vjerojatnije prerasti svoju opskrbu krvlju i postati hipoksičniji od indolentnijih tumora, u tom slučaju HIF- $\alpha$  je biljeg malignog ponašanja stanica, a ne da mu pridonosi (KAELIN i RATCLIFFE, 2008). Raste broj znanstvenika koji naglašavaju prognostičku važnost ekspresije HIF-1 $\alpha$ , neki navode da i imunohistokemija VEGF-a može poslužiti za prognozu malignosti i potencijala za rast, biti indikator prognoze, barem kod nekih tumora (AEBERSOLD i sur., 2001; MARTANO i sur., 2016). U literaturi je dokumentirano da nema značajne korelacije između ekspresije mRNA za HIF-1 $\alpha$  i VEGF u hipofiznim adenomima, ekspresija VEGF u takvim tumorima ne mora bitno ovisiti o ekspresiji HIF-1 $\alpha$ . SHIN i sur. (2007) su izmjerili više razine ekspresije *HIF-1 $\alpha$*  i *VEGF* mRNA u tkivima ranog ili kasnog stadija karcinoma debelog crijeva nego u adenomu debelog crijeva i sugerirali da MMP2, HIF-1 $\alpha$  i VEGF mogu biti korisni parametri za otkrivanje rane karcinogeneze i napredovanja karcinoma debelog crijeva. Uzimajući za primjer humani karcinom jajnika, preživljavanje je značajno skraćeno kod onih pacijenata čije neoplastične stanice pokazuju snažnu ekspresiju HIF-1 $\alpha$  u jezgri i HIF-2 $\alpha$  u citoplazmi u usporedbi s onima kod kojih stanice imaju nisku ili nikakvu ekspresiju HIF-1 $\alpha$ . Ekspresija HIF-1 $\alpha$  u staničnoj jezgri predstavlja neovisni prognostički čimbenik (OSADA i sur., 2007). MEES i sur. (2011) kao najvažnije moguće endogene biljege hipoksije navode HIF-1 $\alpha$ , ugljičnu anhidrazu IX (CA IX), GLUT1 i 3, ali naglašavaju da nisu dokazali svoju selektivnost za hipoksiju jer je njihova ekspresija pod utjecajem i drugih parametara osim hipoksije te da je najrelevantniji marker za kvalitativno i kvantitativno određivanje tumorske hipoksije, eksperimentalno i klinički, egzogeni marker hipoksije pimonidazol, široko prihvaćen kao pouzdani marker.

Još su 2008. Kaelin i Ratcliffe istaknuli da područje intenzivnog istraživanja jest i metabolizam tumora, razumijevanje kako tumorske stanice imaju koristi od povećane glikolize i stvara li takav energetski metabolizam neke jedinstvene ranjivosti koje se mogu iskoristiti u terapijske svrhe. Kako bi se ubile tumorske stanice uskraćujući im energiju, potrebno je eliminirati i glukozu i kisik (LIBERTI i LOCASALE, 2016). Prema SEMENZA (2010) angiogeneza je bila glavni fokus biologije i terapije zloćudnih tumora tijekom posljednjeg desetljeća, dok će metabolizam tumora vjerojatno privući sličnu pozornost tijekom sljedećeg desetljeća, odnosno sada smo u tom dobu. Inhibitorima HIF-a djeluje se i na metabolizam, pošto je ekspresija mnogih enzima i pod utjecajem HIF-čimbenika. Sve više se radi na poticanju imunskog sustava u liječenju tumora. Kako se produbljuje naše razumijevanje patofiziologije bolesti na staničnoj i molekularnoj razini i njenog odnosa sa signaliziranjem hipoksije, tako se otkrivaju dodatne niše gdje bi se moglo genetički, biokemijski i metabolički uplesti u svrhu liječenja.

U 20 godina, od prvog izvješća o prekomjernoj ekspresiji HIF-1 $\alpha$  u primarnim humanim malignim tumorima i njihovim metastazama (ZHONG i sur., 1999.), prikupljen je velik broj znanstvenih podataka koji precizno opisuju mehanizme i posljedice povećane aktivnosti HIF-1 tijekom progresije raka. Izazov je identificirati za svakog pacijenta individualno da li kod tumora HIF-1 ima važnu ulogu u patogenezi bolesti i hoće li biti dobar kandidat za terapiju koja uključuje HIF-inhibitore. Isto tako izazovno je identificirati klinički učinkovite, sigurne, s čim manje nuspojava kombinacije lijekova ili općenito načine liječenja, kojima će dodavanje HIF-1 inhibitora pojačavati učinak ili imati dodani učinak, dobre široko dostupne testove koji će pokazati učinak inhibitora HIF-1 (ili nedostatak učinka) na kritične aspekte biologije malignih tumora (SEMENZA, 2010b).

Više od 60 različitih dioksidogenaza koriste za aktivnost željezo i  $\alpha$ -ketoglutarat pa je za kliničke upotrebe lijekova s utjecajem na te molekule vrlo poželjan razvoj specifičnih inhibitora ili aktivatora točno određene hidrosilaze (npr. jedne od PHD). Međutim, npr. u pacijenata s Chuvash policitemijom, čak i vrlo malo povećana signalizacija putem HIF-a (koja traje jedno vrijeme i sistemska je) ima patološke učinke, stoga se u kliničkoj primjeni takvih sredstava treba pristupiti pažljivo i na konzervativan način. Korištenje produkta HIF-om ciljanih gena kao terapijsko sredstvo možda se pokazalo vrlo uspješno u slučaju rekombinantnog eritropoetina za poticanje eritropoeze kod anemije pacijenata s kroničnim zatajenjem bubrega, no primjena jednog angiogenog čimbenika kao VEGF-a za liječenje ishemijskih poremećaja, s ciljem stimulacije vaskularnog remodeliranja, nije uspješna jer je to proces koji zahtjeva

koordinirano djelovanje više HIF-ovisnih angiogenih čimbenika. Jedna potencijalna prednost upotrebe proteina nekog gena kao terapijskog sredstva je što oni djeluju odmah, dok su učinci HIF-1 $\alpha$  genske terapije ili PHD inhibitora/aktivatora odgođeni jer zahtjevaju transkripciju i translaciju produkta ciljanog gena (GORDEUK i PRCHAL, 2006; BOSCH-MARCÈ i sur., 2007; SEMENZA; 2011). Terapijske koristi ciljanog inhibiranja ili indukcije HIF-a i dalje se istražuju.

Koji od mnogih učinaka VEGF-a na razne procese (mitogenezu, angiogenezu, preživljavanje endotela, indukciju metaloproteinaza i čimbenika rasta, regulaciju propusnosti/protoka, regrutiranje endotelnih progenitornih stanica i dr.) ima najveći terapijski značaj za kliničku učinkovitost lijeka, npr. bevacizumaba kao standardnog u terapiji, može biti relativno, razlikovati se ovisno o stadiju maligne bolesti (rani stadij nasuprot uznapredovalom) ili tipu tumora, da li se bevacizumab primjenjuje kao jedino sredstvo ili u kombinaciji s kemoterapijom. U slučaju monoterapije (npr. za karcinom bubrežnih stanica) učinak na mitogenezu, angiogenezu i preživljavanje endotelnih stanica vjerojatno će prevladavati. Suprotno tome, pojačavanje kemoterapije bevacizumabom vjerojatno će se oslanjati na senzibilizaciju endotela na citotoksična sredstva ili na poboljšanje isporuke kemoterapije tumorskim stanicama nakon preoblikovanja krvožilne mreže tumora. Sve je više dokaza da su VEGF i VEGFR izraženi u raznim leukemijama i drugim hematološkim malignim bolestima pa bi inhibicija njihove signalizacije mogla koristiti u liječenju takvih stanja, što se klinički ispituje (KLEMENT i sur., 2000; JAIN, 2001; FERRARA i sur., 2004).

Dokazano je da kombinacija anti-VEGF s kemoterapijom ili terapijom zračenjem rezultira aditivnim ili sinergijskim antitumorskim učinkom (KLEMENT i sur., 2000; KOZIN i sur., 2001), no raspravlja se o mehanizmu takvog potenciranja. Prema Klementu i suradnicima kemoterapija, posebno kada se daje u malim dozama ("metronomska terapija"), preferencijalno oštećuje endotelne stanice, a blokada VEGF-a utišava ključni signal za preživljavanje endotelnih stanica te tako pojačava antitumorske učinke kemoterapije na stanice. Prema JAINU (2001) i istraživanju rektalnog karcinoma WILLET-a i sur. (2004), antiangiogena terapija dovodi do uklanjanja brojnih nezrelih, jače propusnih kapilara, pada intersticijskog tlaka i "normalizacije" krvožilne mreže tumora koja učinkovitije isporučuje kisik, ali i kemoterapiju tumorskim stanicama. Ovi su učinci brzi, međutim, prolazni.

S obzirom na brojne funkcije s kojima je HIF povezan, znanstvenici su suglasni da mijenjanje njegove aktivnosti treba raditi s oprezom i razmišljati o negativnim posljedicama. Ishemijsko predkondicioniranje ili nespecifični PHD inhibitori općenito pojačavaju HIF

signalni put, ali ne usmjeravaju specifično njegov učinak. Brojne *in vivo* studije i nedavna klinička ispitivanja na ljudima pokazuju da stabilizacija HIF-a može biti od koristi u akutnim hipoksičnim stanjima poput akutne ozljede organa ili kod transplantacije organa, te stvarati sveopći zaštitni fenotip u svim organima, ali može nedostajati specifični učinak u određenim kroničnim bolestima i dovesti do neočekivanih ili nepovoljnih posljedica zbog dugotrajne stabilizacije HIF-a. Ciljanje HIF signalnog puta u kroničnim bolestima stoga je složenije i učinak stabilizacije HIF-a diskutabilan u različitim studijama, no ipak obećava učinkovito upravljanje ili odgađanje napredovanja bolesti. Stabilizatori HIF-a i određeni identificirani ciljni proteini aktivno se istražuju kao moguće opcije liječenja u raznim kliničkim okruženjima i procjenjuju se njihovi sigurnosni profili. Novija sredstva koja ciljaju signalni put HIF-a s povećanom specifičnošću trebala bi omogućiti širu i sigurniju kliničku upotrebu ovih molekula (LEE i sur., 2019).

Potrebna su i važna klinička ispitivanja za testiranje hipoteze da će dodavanje jednog ili više HIF inhibitora trenutnim standardnim terapijskim protokolima za liječenje određenih malignih bolesti povećati preživljenje oboljelih, na način da smanjuje metastaziranje i druge kritične korake u progresiji koji su posredovani s HIF-1/2. Pogotovo kod onih malignih tumora koji uzrokuju najveću smrtnost, teški su za liječenje i u uzorcima uzetim biopsijom imaju visoku razinu HIF-1 $\alpha$  (SEMENZA, 2012a). Utvrđen je sve veći broj lijekova koji različitim molekularnim mehanizmima inhibiraju aktivnost HIF-a, a mnogi od njih su već odobreni (barem u nekim zemljama) za druge indikacije pa bi i za njih trebalo pokrenuti klinička ispitivanja kako bi se testirala hipoteza o produljenju preživljavanja (SEMENZA, 2012b).

Prostora za istraživanje u budućnosti ima i u području otkrivanja najbolje terapijske doze. U ksenografskom mišjem modelu zabilježeno je da npr. tretman ehinomicinom rezultira regresijom tumora ovisno o dozi (KAMBAYASHI i sur., 2015), tako da se mogu istraživati učinkovitosti određenih doza novih, ali i već poznatih kemoterapijskih sredstava na određene tumore i definirati najučinkovitije terapijske doze uzimajući u obzir toksičnost preparata. Neka poznata sredstva poput topotekana, za koja se pokazalo da mogu inhibirati HIF-1, u prijašnjim kliničkim ispitivanjima nisu pokazali značajne antitumorske učinke. No tada su se davali kao citotoksična sredstva, epizodno u maksimalno toleriranoj dozi, dok njihova trenutna primjena kao HIF inhibitora uključuje čestu primjenu, u nižim dozama, u nastojanju da se održi kontinuirana inhibicija aktivnosti HIF-a. U ranije spomenutom pilot-farmakodinamičkom ispitivanju sa 16 bolesnika s uznapredovalim stadijem raka i prekomjernom ekspresijom HIF-1 $\alpha$ , oralna primjena topotekana u dozi od 1,6 mg/m<sup>2</sup>/dan x 5 dana/tjedan x 2 tjedna/28-dnevni

ciklus rezultirala je smanjenim protokom krvi tumora i gubitkom ekspresije HIF-1 $\alpha$ . Tijekom ispitivanja, doza topotekana smanjena je na 1,2 mg/m<sup>2</sup>/dan zbog mijelosupresije, iako nije poznato je li ta nuspojava odraz citotoksičnosti zbog oštećenja DNA ili je izravna posljedica inhibicije HIF-a, neovisno o oštećenju DNA. Uzimajući u obzir obje doze, treba utvrditi može li režim inhibicije HIF-a na način "dva tjedna s/dva tjedna bez inhibitora" biti učinkovita strategija i kako omogućiti kroničnu upotrebu topotekana kao inhibitora HIF-a. Za digoksin je recimo dobro utvrđena razina lijeka u krvi koja je sigurna i terapijska (u kontekstu srčanih bolesti) (KUMMAR i sur., 2011; SEMENZA, 2012b). SEMENZA (2012) se osvrće na tvrdnje da su nova sredstva za maligne tumore specifična, a prenamijenjeni lijekovi nespecifični te ističe da što je lijek stariji, to je vjerojatnije da se uoče njegova dodatna djelovanja te da ne treba potpuno zanemariti već testirane lijekove. Recimo inhibitor HIF-a akriflavin, koji snažno inhibira rast ksenografta malignog tumora prostate i metastaze raka dojke u pluća na mišjim modelima, korišten je ranije kao antimikrobno sredstvo (trenutno nije dostupan u obliku pogodnom za primjenu kod pacijenata).

Novе kombinacije lijekova se također kontinuirano istražuju. Neke nužno ne pokazuju bolju učinkovitost, kao što recimo u 2. fazi kliničkog ispitivanja LBH589 s bevacizumabom u bolesnika s rekurentnim gliomom visokog stupnja nije značajno skratio razdoblje preživljavanja bez napredovanja bolesti u usporedbi s monoterapijom bevacizumabom (LEE i sur., 2015; ALBADARI i sur., 2019). Kombiniranje nekoliko HIF inhibitora može dopustiti niže doze svakog pojedinog lijeka, čime se smanjuje vjerojatnost neciljanih učinaka. Kombinirana terapija također može smanjiti vjerojatnost selekcije onih stanica koje su otporne na lijekove. Tradicionalne kemoterapije i postojeći terapijski protokoli također mogu biti učinkovitiji ako se primjenjuju s HIF inhibitorom, posebno kod malignih tumora kod kojih je povećana ekspresija HIF-1 $\alpha$  dokazana u dijagnostičkoj biopsiji i u onim slučajevima u kojima postojeća terapija inducira aktivnost HIF-a. Učinak pojačavaju različiti mehanizmi ovisno o staničnom tipu i tipu kemoterapije. Hipoksijom inducirani čimbenici reguliraju ekspresiju gena koji kodiraju ATP-vezujuće kasetne prijenosnike za više lijekova, uključujući MDR1 (ABCB1) i BCRP (ABCG2), kojima kemoterapijski lijekovi izlaze iz malignih stanica. Zatim, HIF-1 inhibira starenje malignih stanica uzrokovano kemoterapijom, inhibira ekspresiju proapoptičnih mitohondrijskih proteina (BAX, BID) i kaspaza (CASP3, CASP8, CASP10), potiče ekspresiju antiapoptičnih proteina (BCL2, BIRC5), sprečava oštećenje DNA uzrokovano kemoterapijom inhibiranjem ekspresije proteina topoizomeraze IIa ili DNA-ovisnog kompleksa protein kinaze. Reprogramiranje metabolizma ovisno o HIF-1 može



smanjiti razinu ROS-a i time inhibirati staničnu smrt uzrokovanu kemoterapijom (pregledno u SEMENZA, 2012b). Inhibiranjem svega ovog pojačat će se učinak kemoterapije.

Dodavanje inhibitora HIF-1/2 u trenutne protokole kemoterapije pokazalo se korisnim u brojnim pretkliničkim studijama. Kombinirana terapija idealno bi trebala biti personalizirana na temelju vrste mutacija u tom specifičnom malignom tumoru pacijenta i bilo bi bolje uključiti dva lijeka koji inhibiraju aktivnost HIF-1/2 sinergijski, različitim molekularnim mehanizmima. Kao esencijalni dio HIF-1/2 transkripcijskog kompleksa, koaktivatori mogu predstavljati dodatnu terapijsku metu u liječenju malignih bolesti (LUO i sur., 2012; ALBADARI i sur., 2019). Prema SEMENZI (2011), ako se želi postići da inhibicija HIF-a i PHD-a ima čim manje nuspojava, trebalo bi inhibitore primjenjivati lokalno, kratkoročno i u kombinaciji s drugim tretmanima koji selektivno pojačavaju posljedice modulacije aktivnosti HIF-a u oboljelom tkivu. Pri odabiru inhibitora HIF-1/2, osim nuspojava koje mogu ovisiti o dozi treba uzeti u obzir i interakciju između lijekova i toksičnost. Potrebne su dodatne studije kako bi se razotkrila velika složenost regulacije HIF-a i razvili precizniji tretmani protiv raka (ALBADARI i sur., 2019).

Kao i za sve lijekove, tako i kod razvoja i primjene HIF inhibitora za terapiju raka treba voditi računa o učinkovitosti, sigurnosti i kontraindikacijama. Kod pacijenata s teškom ishemijskom kardiovaskularnom bolešću HIF inhibitori mogu pogoršanje stanje. Mnogi opisani inhibitori sprječavaju aktivnost HIF-a u nekim, ali ne i svim testiranim staničnim linijama malignih tumora. Razlog je možda razvoj rezistencije staničnih linija pa razine lijekova nisu dovoljno visoke za inhibiciju aktivnosti HIF-a, ciljani put možda ne doprinosi aktivnosti u otpornoj staničnoj liniji ili se kao odgovor na tretman aktivira alternativni put (SEMENZA, 2012b). Ovo dodatno naglašava važnost nastojanja da se učinkovitost prati i *in vivo*.

Zbog potencijalnih vrsno specifičnih enzima, biokemijskih karakteristika, kofaktora, razlika u strukturi molekula (npr. receptora, proangiogenih čimbenika i dr.), trebalo bi za uloge i djelovanje HIF-a u patofiziologiji malignih bolesti provjeriti da li to sve vrijedi i kod pojedinih vrsta životinja. Iz istih razloga potrebno je vidjeti koji se npr. VEGF i HIF-inhibitori, razvijeni za potrebe humane medicine, mogu primijeniti za liječenje domaćih životinja. U veterinarskoj medicini primjenu personaliziranih, preciznih, specifičnih terapija kontinuirano prati opći problem cijene liječenja životinja, koja je često previsoka za vlasnike i u slučaju konvencionalnih terapija, a pogotovo ovakvih ciljanih terapija, što ne zaobilazi niti liječenje nekih malignih oboljenja koje često može samo produljiti život. Također farmaceutske kompanije nemaju dovoljno interesa za razvoj neprofitabilnih lijekova dozama prilagođenim

za životinje pa se često u veterini koriste lijekovi razvijeni za primjenu kod ljudi ili za druge vrste životinja, uz prilagodbe doza. Može se očekivati da će se s vremenom, kada skupe terapije postanu standard i cijena im padne, sve više ovakvih terapija pretočiti i u veterinarsku medicinu.

## 4. ZAKLJUČCI

1. Sve stanice s jezgrom prepoznaju koncentraciju kisika i reagiraju na hipoksiju.
2. HIF/PHD/pVHL sustav prisutan je u svim stanicama sisavaca i glavni je u kompleksnoj, autonomnoj staničnoj regulaciji homeostaze kisika. Dokazano direktno i indirektno utječe na ekspresiju izrazito velikog broja gena, ima izrazito široku i važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima općenito, ali i u biologiji malignih tumora.
3. Kako bi se održala homeostaza i normoksija u stanicama, aktiviraju se fiziološki mehanizmi kojima se nedovoljno oksigenirano tkivo nastoji opskrbiti kisikom, odnosno povećava se stvaranje eritrocita (eritropoeza) i potiče stvaranje novih krvnih žila (angiogeneza), a VEGF je najbitniji proangiogeni čimbenik.
4. Inhibicija HIF-a i u stanicama malignih tumora i u stromi koži rast tumora, vaskularizaciju, metaboličko reprogramiranje, invaziju, metastaziranje i otpornost na zračenje i kemoterapiju, a pojačana ekspresija HIF-1 $\alpha$  povezana je s povećanim rizikom od smrtnosti pacijenata kod mnogih tumora.
5. Izoforme HIF- $\alpha$  nisu jednako eksprimirane u svim stanicama i ne djeluju uvijek na sve iste ciljne gene. Proširivanjem ili potvrđivanjem znanja o njihovim funkcijama i prisutnosti u pojedinim tipovima stanicama, kao i o regulaciji HIF-1/2 vjerojatno će biti razvijeni novi precizni lijekovi, usmjereni na svaku izoformu, za terapiju malignih bolesti, ali i drugih oboljenja.
6. Osim hipoksije, različiti mehanizmi pridonose HIF-1/2 signalizaciji i regulaciji, uključujući molekule kao što su ROS, citokini i čimbenici rasta te mutacije. Zbog kompleksnosti u regulatornim putevima i procesima u koje je uključen HIF, nije jednostavno dizajnirati selektivne HIF-1/2 $\alpha$  inhibitore. Tome se teži, kao i identifikaciji kombinacija lijekova u terapiji malignih bolesti u kojima će HIF-1/2 $\alpha$  inhibitori imati aditivni ili sinergijski učinak. Ovakve inhibitore bi trebalo dodavati u kemoterapijske protokole.
7. Korištenje životinjskih modela u pretkliničkim ispitivanjima za potrebe humane medicine, ujedno može potvrditi učinkovitost terapija kod pojedinih skupina životinja koje su korištene u tu svrhu te s vremenom ti dokazano učinkoviti lijekovi mogu biti prilagođeni za primjenu kod životinja.
8. Povezanost ekspresije HIF- $\alpha$  i čestih tumora u životinja nije dovoljno istražena.

## 5. LITERATURA

<http://www.ema.europa.eu> (bevacizumab). pristupljeno 15.07.2021.

- AEBERSOLD, D. M., P. BURRI, K. T. BEER, J. LAISSUE, V. DJONOV, R. H. GREINER, G. L. SEMENZA (2001): Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 a Novel Predictive and Prognostic Parameter in the Radiotherapy of Oropharyngeal Cancer. *Cancer Res.* 61, 2911-2916.
- ALBADARI, N., S. DENG, W. LI (2019): The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin. Drug Discov.* 14, 667-682.
- BACHMANN, S., M. L. E. HIR, K. ECKARDT (1993): Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 335-341.
- BARAN, N., M. KONOPLEVA (2017): Molecular Pathways: hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 23, 2382-2390.
- BARTELS, K., A. GRENZ, H. K. ELTZSCHIG (2013): Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18351-18352.
- BEALL, C. M., G. L. CAVALLERI, L. DENG, R. C. ELSTON, Y. GAO, J. KNIGHT, C. LI, J. C. LI, Y. LIANG, M. MCCORMACK, H. E. MONTGOMERY, H. PAN, P. A. ROBBINS, K. V. SHIANNNA, S. C. TAM, N. TSERING, K. R. VEERAMAH, W. WANG, P. WANGDUI, M. E. WEALE, Y. XU, Z. XU, L. YANG, M. J. ZAMAN, C. ZENG, L. ZHANG, X. ZHANG, P. ZHAXI, Y. T. ZHENG (2010): Natural selection on EPAS1 (HIF-2 $\alpha$ ) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11459-11464.
- BELLOT, G., R. GARCIA-MEDINA, P. GOUNON, J. CHICHE, D. ROUX, J. POUYSSÉGUR, N. M. MAZURE (2009): Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2570-2581.
- BERRA, E., E. BENIZRI, A. GINOUVÈS, V. VOLMAT, D. ROUX, J. POUYSSÈGUR (2003): HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082-4090.
- BOS, R., H. ZHONG, C. F. HANRAHAN, E. C. MOMMERS, G. L. SEMENZA, H. M. PINEDO, M. D. ABELOFF, J. W. SIMONS, P. J. van DIEST, E. van der WALL (2001): Levels of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  during breast carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 309-314.
- BOS, R., P. J van DIEST, J. S. de JONG, P. van der GROEP, P. van der VALK, E. van der WALL (2005): Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 46, 31-36.
- BOSCH-MARCÉ, M., H. OKUYAMA, J. B. WESLEY, K. SARKAR, H. KIMURA, Y. V. LIU, H. ZHANG, M. STRAZZA, S. REY, L. SAVINO, Y. F. ZHOU, K. R. McDONALD, Y. NA, S. VANDIVER, A. RABI, Y. SHAKED, R. KERBEL, T. LAVALLEE, G. L. SEMENZA (2007): Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ. Res.* 101, 1310-1318.
- BOTUSAN, I.R., V. G. SUNKARI, O. SAVU, A. I. CATRINA, J. GRÜNLER, S. LINDBERG, T. PEREIRA, S. YLÄ-HERTTUALA, L. POELLINGER, K. BRISMAR, S.-B. CATRINA (2008): Stabilization of HIF-1 $\alpha$  is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 19426-19431.

- BRIZEL, D. M., S. P. SCULLY, J. M. HARRELSON, L.J. LAYFIELD, J. M. BEAN, L. R. PROSNITZ, M. W. DEWHIRST (1996): Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56, 941-943.
- BROWN, J. M. (2002): Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 1, 453-458.
- CAI, Z., D. J. MANALO, G. WEI, E. R. RODRIGUEZ, K. FOX-TALBOT, H. LU, J. L. ZWEIER, G. L. SEMENZA (2003): Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79-85.
- CARMELIET, P. (2003): Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases, *Nat. Rev. Genet.* 4, 710-720.
- CARMELIET, P., Y. DOR, J. M. HERBERT, D. FUKUMURA, K. BRUSSELMANS, M. DEWERCHIN, M. NEEMAN, F. BONO, R. ABRAMOVITCH, P. MAXWELL, C. J. KOCH, P. RATCLIFFE, L. MOONS, R. K. JAIN, D. COLLEN, E. KESHERT (1998): Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.
- CARRERO, P., K. OKAMATO, P. COUMAILLEAU, S. O'BRIEN, H. TANAKA, L. POELLINGER (2000): Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* 20, 402-415.
- CAVALLARO, U., G. CHRISTOFORI (2004): Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118-132.
- CHANDEL, N. S., E. MALTEPE, E. GOLDWASSER, C. E. MATHIEU, M. C. SIMON, P. T. SCHUMACKER (1998): Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11715-11720.
- CHI, J. T., Z. WANG, D. S. NUYTEN, E. H. RODRIGUEZ, M. E. SCHANER, A. SALIM, Y. WANG, G. B. KRISTENSEN, A. HELLAND, A. L. BORRESEN-DALE, A. GIACCIA, M. T. LONGAKER, T. HASTIE, G. P. YANG, M. J. van de VIJVER, P. O. BROWN (2006): Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 3, e47.
- CHO, H., X. DU, J. P. RIZZI, E. LIBERZON, A. A. CHAKRABORTY, W. GAO, I. CARVO, S. SIGNORETTI, R. K. BRUICK, J. A. JOSEY, E. M. WALLACE, W. G. KAELIN (2016): On-target efficacy of a HIF-2 $\alpha$  antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* 539, 107-111.
- CHOUERI, T. K., R. J. MOTZER (2017): Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 376, 354-366.
- CRAMER, T., Y. YAMANISHI, B. E. CLAUSEN, I. FÖRSTER, R. PAWLINSKI, N. MACKMAN, V. H. HAASE, R. JAENISCH, M. CORR, V. NIZET, G. S. FIRESTEIN, H.-P. GERBER, N. FERRARA, R. S. JOHNSON (2003): HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 112, 645-657.
- COVELLO, K. L., J. KEHLER, H. YU, J. D. GORDAN, A. M. ARSHAM, C.-J. HU, P. A. LABOSKY, M. C. SIMON, B. KEITH (2006): HIF-2 $\alpha$  regulates O ct-4 effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557-570.
- COVELLO, K. L., M. C. SIMON, B. KEITH (2005): Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by a hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res.* 65, 2277-2286.
- CUMMINS, E. P., C. T. TAYLOR (2005): Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 450, 363-371.

- DALES J. P., S. GARCIA, S. MEUNIER-CARPENTIER, L. ANDRAC-MEYER, O. HADDAD, M. N. LAVAUT, C. ALLASIA, P. BONNIER, C. CHARPIN (2005): Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int. J. Cancer*. 116, 734-739.
- DeBERARDINIS, R. J., J. J. LUM, G. HATZIVASSILIOU, C. B. THOMPSON (2008): The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*. 7, 11-20.
- de VRIES, C., J. A. ESCOBEDO, H. UENO, K. HOUCK, N. FERRARA, L. T. WILLIAMS (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255, 989-991.
- DEGIRMENCI, U., M. WANG, J. HU (2020): Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. *Cells*. 9, 198.
- DIMMELER, S. (2010): Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1088-1093.
- DIRIX L.Y, P. B. VERMEULEN, A. PAWINSKI, A. PROVE, I. BENOY, C. De POOTER, M. MARTIN, A. T. Van OOSTEROM (1997): Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br. J. Cancer*. 76, 238-243.
- DVORAK, H. F., L. F. BROWN, M. DETMAR, A. M. DVORAK (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146, 1029-1039.
- YOON, D., Y. D. PASTORE, V. DIVOKY, E. LIU, A. E. MLODNICKA, K. RAINEY, P. PONKA, G. L. SEMENZA, A. SCHUMACHER, J. T. PRCHAL (2006): Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J. Biol. Chem.* 281, 25703-25711.
- ELSON, D. A., G. THURSTON, L. E. HUANG, D. G. GINZINGER, D. McDONALD, R. S. JOHNSON, J. M. ARBEIT (2001): Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 5, 2520-2532.
- ELTZSCHIG, H. K., P. CARMELIET (2011): Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* 364, 656-665.
- EMA, M., S. TAYA, N. YOKOTANI, K. SOGAWA, Y. MATSUDA, Y. FUJII-KURIYAMA (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4273-4278.
- EPSTEIN, A. C. R., J. M. GLEADLE, L. A. MCNEILL, K. S. HEWITSON, J. O'ROURKE, D. R. MOLE, M. MUKHERJI, E. METZEN, M. I. WILSON, A. DHANDA, Y.-M. TIAN, N. MASSON, D. L. HAMILTON, P. JAAKKOLA, R. BARSTEAD, J. HODGKIN, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, C. J. SCHOFIELD, P. J. RATCLIFFE (2001): *C. elegans* EGL-9 and Mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 107, 43-54.
- FARSIJANI, N. M., Q. LIU, H. KOBAYASHI, O. DAVIDOFF, F. SHA, J. FANDREY, T. A. IKIZLER, P. M. O'CONNOR, V. H. HAASE (2016): Renal epithelium regulates erythropoiesis via HIF-dependent suppression of erythropoietin. *J. Clin. Investig.* 126, 1425-1437.
- FELDSER, D., F. AGANI, N. V. IYER, B. PAK, G. FERREIRA, G. L. SEMENZA (1999): Reciprocal positive regulation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 59, 3915-3918.

- la FERLA, K., C. REIMANN, W. JELKMANN, T. HELLWIG-BURGEL (2002): Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kB. *FASEB J.* 16, 1811-1813.
- FERRARA, N., K. J. HILLAN, H. P. GERBER, W. NOVOTNY (2004): Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391-400.
- FERRARA, N., K. J. HILLAN, W. NOVOTNY (2005): Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 328-335.
- FERRARA, N., R. S. KERBEL (2005): Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.
- FERRARA, N., T. DAVIS-SMYTH (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25.
- FOLKMAN, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
- FOLKMAN, J. (1986): How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46, 467-473.
- FORSYTHE, J. A., B. H. JIANG, N. V. IYER, F. AGANI, S. W. LEUNG, R. D. KOOS, G. L. SEMENZA (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604-4613.
- FUKUDA, R., K. HIROTA, F. FAN, Y. D. JUNG, L. M. ELLIS, G. L. SEMENZA (2002): Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MPA kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 38205-38211.
- FUKUDA, R., H. ZHANG, J.-W. KIM, L. SHIMODA, C. V. DANG, G. L. SEMENZA (2007): HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 129, 111-122.
- GAO, P., H. ZHANG, R. DINAVAH, F. LI, Y. XIANG, V. RAMAN, Z. M. BHUJWALLA, D. W. FELSHER, L. CHENG, J. PEVSNER, L. A. LEE, G. L. SEMENZA, C. V. DANG (2007): HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell.* 12, 230-238.
- GARCIA, J., H. I. HURWITZ, A. B. SANDLER, D. MILES, R. L. COLEMAN, R. DEURLOO, O. L. CHINOT (2020): Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev.* 86, 102017.
- GERBER, H. P., T. H. VU, A. M. RYAN, J. KOWALSKI, Z. WERB, N. FERRARA (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med.* 5, 623-628.
- GERBER, H. P., F. CONDORELLI, J. PARK, N. FERRARA (1997): Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/ KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.
- GIACCIA, A. J., M. C. SIMON, R. JOHNSON (2004): The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 18, 2183-2194.
- GORDEUK, V. R., J. T. PRCHAL (2006): Vascular complications in Chuvash polycythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* 32, 289-294.
- GRAEBER, T. B., C. OSMANIAN, T. JACKS, D. E. HOUSMAN, C. J. KOCH, S. W. LOWE, A. J. GIACCIA (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.

- GRAHAM, A.M., J. S. PRESNELL (2017): Hypoxia Inducible Factor (HIF) transcription factor family expansion, diversification, divergence and selection in eukaryotes. *PLOS ONE*. 12, e0179545.
- GU, Y.-Z., S. M. MORAN, J. B. HOGENESCH, L. WARTMAN, C. A. BRADFIELD (1998): Molecular characterization and chromosomal localization of a third a-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3a. *Gene Expr.* 7, 205-213.
- GUILLEMIN, K., M. A. KRASNOW (1997): The hypoxic response: Huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12.
- HAGEN, T., C.T. TAYLOR, F. LAM, S. MONCADA (2003): Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*. 302, 1975-1978.
- HALLIWILL, J. R. (2003): Hypoxic regulation of blood flow in humans. Skeletal muscle circulation and the role of epinephrine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543, 223-236.
- HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (1999a): Oxygen is a toxic gas-an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. U: *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, 1-35
- HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (1999b): Oxidative stress, adaptation, damage, repair and death. U: *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, 246-350.
- HALTERMAN, M. W., C. C. MILLER, H. J. FEDEROFF (1999): Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J. Neurosci.* 19, 6818-6824.
- HAMANAKA, R. B., N. S. CHANDEL (2009): Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 894-899.
- HANAHAAN, D., R. A. WEINBERG (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144, 646-674.
- HAASE, V. H. (2010): Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 299, F1-F13-
- HARRIS, A. L. (2002): Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 38-47.
- HEIKKILÄ, M., A. PASANEN, K. I. KIVIRIKKO, J. MYLLYHARJU (2011): Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3885-3901.
- HELLWIG-BÜRCEL, T., K. RUTKOWSKI, E. METZEN, J. FANDREY, W. JELKMANN (1999): Interleukin-1β and Tumor Necrosis Factor-α Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Hematopoiesis.* 94, 1561-1567.
- HEROLD-MENDE, C., H. H. STEINER, T. ANDL, D. RIEDE, A. BUTTLER, C. REISSER, N. E. FUSENIG, M. M. MUELLER (1999): Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab. Invest.* 79, 1573-1582.
- HEWITSON, K. S., C. J. SCHOFIELD (2004): The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov. Today.* 9, 704-711.
- HEWITSON, K. S., B. M. LIENARD, M. A. McDONOUGH, I. J. CLIFTON, D. BUTLER, A. S. SOARES, N. J. OLDHAM, L. A. McNEILL, C. J. SCHOFIELD, C.J. (2007): Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 282, 3293-3301.
- HIRATSUKA, S., O. MINOWA, J. KUNO, T. NODA, M. SHIBUYA (1998): Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 9349-9354.



- HOCHACHKA, P. W., L. T. BUCK, C. J. DOLL, S. C. LAND (1996): Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9493-9498.
- HÖCKEL, M., C. KNOOP, K. SCHLENGER, B. VORNDRAN, E. BAUSSMANN, M. MITZE, P. G. KNAPSTEIN, P. VAUPEL (1993): Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother. Oncol.* 26, 45-50.
- HOCKEL, M., P. VAUPEL (2001): Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266-276.
- HOFFMAN, D. L., J. D. SALTER, P. S. BROOKES (2007): Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ.* 292, H101-108.
- HOLMQUIST-MENGENBIER, L., E. FREDLUND, T. LÖFSTEDT, R. NOGUERA, S. NAVARRO, H. NILSSON, A. PIETRAS, J. VALLON-CHRISTERSSON, A. BORG, K. GRADIN, L. POELLINGER, S. PÅHLMAN (2006): Recruitment of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 $\alpha$  promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 10, 413-423.
- HU, C.-J., L.-Y. WANG, L. A. CHODOSH, B. KEITH, M. C. SIMON (2003): Differential roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9361-9374.
- HUANG, L. E., Z. ARANY, D. M. LIVINGSTON, H. F. BUNN (1996): Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 32253-32259.
- HUANG, L. E., J. GU, M. SCHAU, H. F. BUNN (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7987-7992.
- HURST, J. H. (2016): William Kaelin, Peter Ratcliffe, and Gregg Semenza receive the 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award. *J. Clin. Investig.* 126, 3628-3638.
- HSU, P. P., D. M. SABATINI (2008): Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.
- IMAMURA, T. K., HIROTOSHI, M.-T. HERRAIZ, D.-Y. PARK, Y. MIZUKAMI, M. MINO-KENDUSON, M. P. LYNCH, B. R. RUEDA, Y. BENITA, R. J. XAVIER, D. C. CHUNG (2009). HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  have divergent roles in colon cancer. *Int. J. Canc.* 124, 763-771.
- IVAN, M., T. HABERBERGER, D. C. GERVASI, K. S. MICHELSON, V. GÜNZLER, K. KONDO, H. YANG, I. SOROKINA, R. C. CONAWAY, J. W. CONAWAY, W. G. KAELIN JR. (2002): Biochemical purification and pharmacological inhibition on hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13459-13464.
- IVAN, M., K. KONDO, H. YANG, W. KIM, J. VALIANDO, M. OHH, A. SALIC, J. M. ASARA, W. S. LANE, W. G. KAELIN JR (2001): HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 292, 464-468.
- IYER, N. V., L. E. KOTCH, F. AGANI, S. W. LEUNG, E. LAUGHNER, R. H. WENGER, M. GASSMANN, J. D. GEARHART, A. M. LAWLER, A. Y. YU, G. L. SEMENZA (1998a): Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 12, 149-162.
- IYER, N. V., S. W. LEUNG, G. L. SEMENZA (1998b): The human hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* 52, 159-165.
- JAKKOLA, P., D. R. MOLE, Y.-M. TIAN, M. I. WILSON, J. GIELBERT, S. J. GASKELL, A. VON KRIEGSHEIM, H. F. HEBESTREIT, M. MUKHERJI, C. J. SCHOFIELD, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE (2001): Targeting of HIF- $\alpha$  to the von

- Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- JACOBSON, J. M., J. R. MICHAEL, M. H. JAFRI, G. H. GURTNER (1990): Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *J. Appl. Physiol.* 68, 1252-1259.
- JAIN, R. K. (2003): Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Med.* 9, 685-693.
- JELKMANN, W. (1998): Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 555-559.
- JAIN, R. K. (2001): Normalizing tumor vasculature with antiangiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Med.* 7, 987-989.
- JELKMANN, W., E. METZEN (1996): Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann. Anat.* 178, 391-403.
- JEWELL U. R., I. KVIETIKOVA, A. SCHEID, C. BAUER, R. H. WENGER, M. GASSMANN (2001): Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15, 1312-1314.
- JIANG, B.-H., G. L. SEMENZA, C. BAUER, H. H. MARTI (1996): Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol.* 271, 1172-1180.
- JIANG, B. H., J. Z. ZHENG, S. W. LEUNG, R. ROE, G. L. SEMENZA (1997): Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272, 19253-19260.
- KAELIN, W. G. (2002): Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer* 2, 673-682.
- KAELIN, W. G. (2017): The VHL tumor suppressor gene: Insights into oxygen sensing and cancer. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 128, 298-307.
- KAELIN JR., W. G., P. J. RATCLIFFE (2008): Oxygen sensing by Metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393-402.
- KALLIO, P. J., K. OKAMOTO, S. O'BRIEN, P. CARRERO, Y. MAKINO, H. TANAKA, L. POELLINGER (1998): Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J.* 17, 6573-6586.
- KALLIO, P. J., I. PONGRATZ, K. GRADIN, J. MCGUIRE, L. POELLINGER (1997): Activation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5667-5672.
- KALLIO, P. J., W. J. WILSON, S. O'BRIEN, Y. MAKINO, L. POELLINGER (1999): Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6519-6525.
- KAMBAYASHI, S., M. IGASE, K. KOBAYASHI, A. KIMURA, T. SHIMOKAWA MIYAMA, K. BABA, S. NOGUCHI, T. MIZUNO, M. OKUDA (2015): Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1405-1412.
- KASHIWAKURA, I., T. TAKAHASHI (2005): Fibroblast growth factor and ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Lymphoma.* 46, 329-333.
- KEITH, B., M. C. SIMON (2007): Hypoxia inducible factors, stem cells and cancer. *Cell* 129, 465-472.
- KELLY, B. D., S. F. HACKETT, K. HIROTA, Y. OSHIMA, Z. CAI, S. BERG-DIXON, A. ROWAN, Z. YAN, P. A. CAMPOCHIARO, G. L. SEMENZA (2003): Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in

- nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ. Res.* 93, 1074-1081.
- KIM, K. J., B. LI, J. WINER, M. ARMANINI, N. GILLETT, H. S. PHILLIPS, N. FERRARA (1993): Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo, *Nature* 362, 841-844.
- KIM J.-W., I. TCHERNYSHYOV, G. L. SEMENZA, C. V. DANG (2006): HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177-185.
- KIMURA, H., A. WEISZ, Y. KURASHIMA, K. HASHIMOTO, T. OGURA, F. D'ACQUISTO, R. ADDEO, M. MAKUUCHI, H. ESUMI (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: Control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95, 189-197.
- KIVIRIKKO, K. I., J. MYLLYHARJU (1998): Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol.* 16, 357-368.
- KLAGSBRUN, M. (1989): The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog. Growth. Factor. Res.* 1, 207-235.
- KLEMENT, G., S. BARUCHEL, J. RAK, S. MAN, K. CLARK, D. J. HICKLIN, P. BOHLEN, R. S. KERBEL (2000): Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J. Clin. Invest.* 105, R15-R24.
- KLINE, D. D., Y.-J. PENG, D. J. MANALO, G. L. SEMENZA, N. R. PRABHAKAR (2002): Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *PNAS.* 99(2), 821-826.
- KOCH, A. E., L. HARLOW, G. K. HAINES, E. P. AMENTO, E. N. UNEMORI, W. L. WONG, R. M. POPE, N. FERRARA (1994): Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 152, 4149-4155.
- KOJIMA, H., H. GU, S. NOMURA, C. C. CALDWELL, T. KOBATA, P. CARMELIET, G. L. SEMENZA, M. V. SITKOVSKY (2002): Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -deficient chimeric mice. *PNAS.* 99(4), 2170-2174.
- KONDO, K., J. KICO, E. NAKAMURA, M. LECHPAMMER, W. G. J. KAELIN (2002): Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel- Lindau protein. *Cancer Cell.* 1, 237-246.
- KOSCHI, M., Y. KAGEYAMA, E. A. PETE, I. HORIKAWA, J. C. BARRETT, L. E. HUANG (2004): HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23, 1949-1956.
- KOUKOURAKIS, M. I., A. GIATROMANOLAKI, J. SKARLATOS, L. CORTI, S. BLANDAMURA, M. PIAZZA, K. C. GATTER, A. L. HARRIS (2001): Hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res.* 61, 1830-1832.
- KOUKOURAKIS, M. I., A. GIATROMANOLAKI, E. SIVRIDIS, C. SIMOPOULOS, H. TURLEY, K. TALKS, K. C. GATTER, A. L. HARRIS (2002): Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53, 1192-1202.
- KNOWLES, H. J., R. P. RAVAL, A. L. HARRIS, P. J. RATCLIFFE (2003): Effect of ascorbate on the activity of hypoxia inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 63, 1764-1768.

- KUMMAR, S., M. RAFFELD, L. JUWARA, Y. HORNEFFER, A. STRASSBERGER, D. ALLEN, S. M. STEINBERG, A. RAPISARDA, S. D. SPENCER, W. D. FIGG, X. CHEN, I. BARIS TURKBEY, P. CHOYKE, A. J. MURGO, J. H. DOROSHOW, G. MELILLO (2011): Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1a in advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 17, 5123-5131.
- KUIPER, C., I. G. M. MOLENAAR, G. U. DACHS, M. J. CURRIE, P. H. SYKES, M. C. M. VISSERS (2010): Low ascorbate levels are associated with increased hypoxia-inducible factor-1 activity and an aggressive tumor phenotype in endometrial cancer. *Cancer Res.* 70, 5749-5758.
- KOZIN, S. V., Y. BOUCHER, D. J. HICKLIN, P. BOHLEN, R. K. JAIN, H. D. SUIT (2001): Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts *Cancer Res.* 61, 39-44.
- LANDO, D., D. J. PEET, D. A. WHELAN, J. J. GORMAN, M. L. WHITELAW (2002a): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science.* 295, 858-861.
- LANDO, D., D. J. PEET, J. J. GORMAN, D. A. WHELAN, M. L. WHITELAW, R. K. BRUICK (2002b): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466-1471.
- LAU, K.W., Y.-M. TIAN, R. R. RAVAL, P. J. RATCLIFFE, C. W. PUGH (2007): Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br. J. Cancer.* 96, 1284-1292.
- LAUGHNER, E., P. TAGHAVI, K. CHILES, P. C. MAHON, G. L. SEMENZA (2001): HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3995-4004.
- LE, N. T. V., D. R. RICHARDSON (2002): The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1603, 31-46.
- LEE, K., D. Z. QIAN, S. REY, H., J. O. LIU, G. L. SEMENZA (2009): Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 2353-2358.
- LEE, E. Q., D. A. REARDON, D. SCHIFF, J. DRAPPATZ, A. MUZIKANSKY, S. A. GRIMM, A. D. NORDEN, L. NAYAK, R. BEROUKHIM, M. L. RINNE, A. S. CHI, T. T. BATCHELOR, K. HEMPFLING, C. MCCLUSKEY, K. H. SMITH, S. C. GAFFEY, B. WRIGLEY, K. L. LIGON, J. J. RAIZE, P. Y. WEN (2015): Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro Oncol.* 17, 862-867.
- LEE, J. W., J. KO, C. JU, H. K. ELTZSCHIG (2019): Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* 51, 1-13.
- LEI, L., S. MASON, D. LIU, Y. HUANG, C. MARKS, R. HICKEY, I. S. JOVIN, M. PYPART, R. S. JOHNSON, F. J. GIORDANO (2008): Hypoxia inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3790-3803.
- LENFANT, C. (1973): High Altitude Adaptation in Mammals. *Am. Zool.* 13, 447-456.
- LEVY, A. P., N. S. LEVY, M. A. GOLDBERG (1996): Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 271, 2746-2753.
- LI, G., L. HE, E. ZHANG, J. SHI, Q. ZHANG, A. D. LE, K. ZHOU, X. TANG (2011): Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1a and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 311, 160-170.

- LIAO, D., C. CORLE, T. N. SEAGROVES, R. S. JOHNSON (2007): Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* 67, 563-572.
- LIN, T. Y., C. F. CHOU, H. Y. CHUNG, C. Y. CHIANG, C. H. LI, J. L. WU, H. J. LIN, T. W. PAI, C. H. HU, W. S. TZOU (2014): Hypoxia-inducible factor 2 alpha is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the zebrafish embryo. *PLoS One.* 9, 7.
- LIBERTI, M. V., J. W. LOCASALE (2016): The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends Bioch. Sci.* 41, 211-218.
- LIN, N., M. C. SIMON (2016): Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *J. Clin. Invest.* 126, 3661-3671.
- LOBODA, A., A. JOZKOWICZ, J. DULAK (2012): HIF-1 versus HIF-2 is one more important than the other? *Vascul Pharmacol.* 56, 245-51.
- LOBODA, A., A. JOZKOWICZ, J. DULAK (2010): HIF-1 i HIF-2 transcription factors - similar but not identical. *Mol. Cells* 29, 435-442.
- LOENARZ, C., M. L. COLEMAN, A. BOLEININGER, B. SCHIERWATER, P. W. H. HOLLAND, P. J. RATCLIFFE, C. J. SCHOFIELD (2011): The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. *Embo Rep.* 12, 63-70.
- LOENARZ, C., J. MECINOVIĆ, R. CHOWDHURY, L. A. McNEILL, E. FLASHMAN, C. J. SCHOFIELD (2009): Evidence for a stereoelectronic effect in human oxygen sensing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48,1784-1787.
- LOENARZ, C., C. J. SCHOFIELD (2008): Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 4, 152-156.
- LUO, W., H. HU, R. CHANG, J. ZHONG, M. KNABEL, R. O'MEALLY, R. N. COLE, A. PANDEY, G. L. SEMENZA (2011): Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 145, 732-744.
- LUO, W., R. CHANG, J. ZHONG, A. PANDEY, G. L. SEMENZA (2012): Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia inducible factor 1 that is required for breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E3367-E3376.
- MADEJ, J. A., J. P. MADEJ, P. DZIEGIEL, B. PULA, M. NOWAK (2013): Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular density in mammary adenomas and adenocarcinomas in bitches. *Acta Vet. Scand.* 55, 73.
- MAIOLINO, P., S. PAPPARELLA, B. RESTUCCI, G. De VICO (2001): Angiogenesis in Squamous Cell Carcinomas of Canine Skin: An Immunohistochemical and Quantitative Analysis. *J. Comp. Pathol.* 125, 117-121.
- MAHON, P. C., K. HIROTA, G. L. SEMENZA (2001). FIH-1 : a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675-2686.
- MAKINO, Y., R. CAO, K. SVENSSON, G. BERTILSSON, M. ASMAN, H. TANAKA, Y. CAO, A. BERKENSTAM, L. POELLINGER (2001): Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414,550-554.
- MAKINO Y, A. KANOPKA, W. J. WILSON, H. TANAKA, L. POELLINGER (2002): Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J. Biol. Chem.* 277, 32405-32408.
- MAKINO, Y., H. NAKAMURA, E. IKEDA, K. OHNUMA, K. YAMAUCHI, Y. YABE, L. POELLINGER, Y. OKADA, C. MORIMOTO, H. TANAKA (2003): Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T-cells. *J. Immunol.* 171, 6534-6540.

- MAKINO, Y., R. UENISHI, K. OKAMOTO, T. ISOE, O. HOSONO, H. TANAKA, A. KANOPKA. L. POELLINGER, M. HANEDA, C. MORIMOTO (2007): Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J. Biol. Chem.* 282, 14073-14082.
- MANALO, D. J., A. ROWAN, T. LAVOIE, L. NATARAJAN, B. D. KELLY, S. Q. YE, J. G. N. GARCIA, G. L. SEMENZA (2005): Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659-669.
- MAREVIĆ, S. (2019): Protuupalni učinci statina u bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- MARTANO, M., G. ALTAMURA, K. POWER, B. RESTUCCI, F. CARELLA, G. BORZACCHIELLO, P. MAIOLINO (2020): Evaluation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in equine sarcoid: An immunohistochemical and biochemical study. *Pathogens*. 9, 58.
- MARTANO, M., B. RESTUCCI, D. M. CECCARELLI L. L. MUZIO, P. MAIOLINO (2016): Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine oral squamous cell carcinomas. *Oncol. Lett.* 11, 399-404.
- MARTIN, D., H. MCKENNA, V. LIVINA (2017): The human physiological impact of global deoxygenation. *J. Physiol. Sci.*, 67, 97-106.
- MARTON, I. (2013): Izraženost HIF-1 (  $\alpha$  ) i VEGF u neuroendokrinima karcinomima dojke. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- MASOUD, G. N., W. LI (2015): HIF- 1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin B.* 5, 378-389.
- MASSON, N., C. WILLAM, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20, 5197-5206.
- MATEJČIĆ, B. (2018): Suvremeni modaliteti konzervativne terapije tumorskih bolesti pasa i mačaka u veterinarskoj medicini. Diplomski rad. Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- MAXWELL P. (2003): HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2712-2722.
- MAXWELL, P H, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE (1993a): Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: Evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2423-2427.
- MAXWELL, P. H, M. K. OSMOND, C. W. PUGH, A. HERYET, L. G. NICHOLLS, C. C. TAN, B. G. DOE, D. J. P. FERGUSON, M. H. JOHNSON, P. J. RATCLIFFE (1993b): Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 44, 1149-1162.
- MAXWELL, P.H., M. S. WIESENER, G. W. CHANG, S. C. CLIFFORD, E. C. VAUX, M. E. COCKMAN, C. C. WYKOFF, C. W. PUGH, E. R. MAHER, P. J. RATCLIFFE (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- MAYNARD, M. A., H. QI, J. CHUNG, E. H. L. LEE, Y. KONDO, S. HARA, R. C. CONAWAY, J. W. CONAWAY, M. OHH (2003): Multiple splice variants of the human HIF-3 $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 11032-11040.
- MEES, G., C. VANGESTEL, R. DIERCKX, S. LOOMANS, N. VAN DAMME, K. PEREMANS, H. DE ROOSTER, B. VAN GOETHEM, P. PAUWELS, R. DUCATELLE, C. VAN DE WIELE (2011): Metabolic correlates of tumour hypoxia in malignant canine mammary carcinoma. *Res. Vet. Sci.* 91, e125-e128.

- MIHALINA, M. (2017): Proteasom - struktura i funkcija. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Osijek
- MILLER, K. D., L. I. CHAP, F. A. HOLMES, M. A. COBLEIGH, P. K. MARCOM, L. FEHRENBACHER, M. DICKLER, B. A. OVERMOYER, J. D. REIMANN, A. P. SING, V. LANGMUIR, H. S. RUGO (2002): Phase III trial of capecitabine (Xeloda) plus bevacizumab (Avastine) versus capecitabine alone in women with metastatic breast cancer (MBC) previously treated with an anthracycline and a taxane. *Breast Cancer Res. Treat.* 76, S37
- MIN, J.-H., H. YANG, M. IVAN, F. GERTLER, W. G. KAELIN JR., N. P. PAVLETICH (2002): Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1869.
- MINN, A. J., G. P. GUPTA, P. M. SIEGEL, P. D. BOS, W. SHU, D. D. GIRI, A. VIALE, A. B. OLSHEN, W. L. GERALD, J. MASSAGUE (2005): Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.
- MINAMISHIMA, Y. A., J. MOSLEHI, N. BARDEESY, D. CULLEN, R. T. BRONSON, W. G. KAELIN JR. (2008): Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236-3244.
- MINAMISHIMA, Y. A., J. MOSLEHI, R. F. PADERA, R. T. BRONSON, R. LIAO, W. G. KAELIN JR. (2009): A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5729-5741.
- MOELLER, B. J., Y. CAO, C. Y. LI, M. W. DEWHIRST (2004): Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* 5, 429-441.
- MOELLER, B. J., R. A. RICHARDSON, M. W. DEWHIRST (2007): Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 241-248.
- MOLE, D. R., C. BLANCHER, R. R. COPLEY, P. J. POLLARD, J. M. GLEADLE, J. RAGOISSIS, P. J. RATCLIFFE (2009): Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J. Biol. Chem.* 284, 16767-16775.
- MORGAN, B., A. L. THOMAS, J. DREVS, J. HENNIG, M. BUCHERT, A. JIVAN, M. A. HORSFIELD, K. MROSS, H. A. BALL, L. LEE, W. MIETLOWSKI, S. FUXUIS, C. UNGER, K. O'BYRNE, A. HENRY, GRAHAM R. CHERRYMAN, D. LAURENT, M. DUGAN, D. MARMÉ, W. P. STEWARD (2003): Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a biomarker for the pharmacological response of PTK787/ZK 222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, in patients with advanced colorectal cancer and liver metastases: results from two phase I studies. *J. Clin. Oncol.* 21, 3955-3964.
- MSD priručnik (2021): <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/pregled-malignih-tumora/stanicne-i-molekularne-osnove-zlocudnosti>. Pristupljeno 20.09.2021.
- MUELLERLEILE, L.-M., B. BUXBAUM, B. NELL, D. A. FUX (2019): In-vitro binding analysis of anti-human vascular endothelial growth factor antibodies bevacizumab and aflibercept with canine, feline, and equine vascular endothelial growth factor. *Res. Vet. Sci.* 124, 233-238.
- NANGAKU M., Y. IZUHARA, S. TAKIZAWA, T. YAMASHITA, Y. FUJII-KURIYAMA, O. OHNEDA, M. YAMAMOTO, C. VAN YPERSELE DE STRIHO, N. HIRAYAMA, T. MIYATA (2007): A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis

- and exerts organ protection against ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2548-2554.
- NOVIANTI, T., V. JUNIANTITO, A. A. JUSUF, E. A. ARIDA, S. W. A. JUSMAN, M. SADIKIN (2019): Expression and role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in tissue regeneration: a study of hypoxia in house gecko tail regeneration. *Organogenesis* 15, 69-84.
- OLENYUK, B. Z., G. J. ZHANG, J. M. KLCO, N. G. NICKOLS, W. G. KAELIN JR., P. B. DERVAN (2004): Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence sequence-specific hypoxia response element antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16768-16773.
- OLOFSSON B., K. PAJUSOLA, A. KAIPAINEN, G. VONEULER, V. JOUKOV, O. SAKSELA, A. ORPANA, R. PETTERSON, K. ALITALO, U. ERIKSSON (1996): Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2576-2581.
- OSADA, R., A. HORIUCHI, N. KIKUCHI, J. YOSHIDA, A. HAYASHI, M. OTA, Y. KATSUYAMA, G. MELLILO, I. KONISHI (2007): Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ , and von Hippel–Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 38, 1310-1320.
- PARK, S. K., A. M. DADAK, V. H. HAASE, L. FONTANA, A. J. GIACCIA, R. S. JOHNSON (2003): Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1-(HIF-1): role of cytoplasmic trapping of HIF-2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4959-4971.
- PARSA, C. J., A. MATSUMOTO, J. KIM, R. U. RIEL, L. S. PASCAL, G. B. WALTON, R. B. THOMPSON, J. A. PETROFSKI, B. H. ANNEX, J. S. STAMLER, W. J. KOCH (2003): A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest.* 112, 999-1007.
- PAVLIŠA, G. (2006): Razina eritropoetina, angiogenetskih čimbenika i upalnih citokina u serumu prije i nakon korekcije teške hipoksemije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- PAN, Y., K. D. MANSFIELD, C. C. BERTOZZI, V. RUDENKO, D. A. CHAN, A. J. GIACCIA, M. C. SIMON (2007): Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 27, 912-925.
- PATEL, S. A., M. C. SIMON (2008): Biology of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  in development and disease. *Cell Death Differ.* 15, 628-34.
- PENG, J., L. ZHANG, L. DRYSDALE, G. H. FONG (2000): The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays an important role in vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8386-8391.
- PETTY, J. C., S. E. LANA, D. H. THAMM, J. B. CHARLES, A. M. BACHAND, J. M. BUSH, E. J. EHRHART (2008): Glucose transporter 1 expression in canine osteosarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* 6, 133-140.
- POLLARD, P. J., J. J. BRIERE, N. A. ALAM, J. BARWELL, E. BARCLAY, N. C. WORTHAM, T. HUNT, M. MITCHELL, S. OLPIN, S. J. MOAT, I. P. HARGREAVES, S. J. HEALES, Y. L. CHUNG, J. R. GRIFFITHS, A. DALGLEISH, J. A. McGRATH, M. J. GLEESON, S. V. HODGSON, R. POULSOM, P. RUSTIN, I. P. M. TOMLINSON (2005): Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 $\alpha$  in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231–2239.



- PUGH, C. W., J. F. O'ROURKE, M. NAGAO, J. M. GLEADLE, P. J. RATCLIFFE (1997): Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 11205-11214.
- PUGH, C. W., P. J. RATCLIFFE (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677-684.
- RANKIN, E. B., M. P. BIJU, Q. LIU, T. L. UNGER, J. RHA, R. S. JOHNSON, M. C. SIMON, B. KEITH, V. H. HAASE (2007): *J. Clin. Invest.* 117, 1068-1077.
- RANKIN, E., A. GIACCIA (2008): The role of hypoxia-inducible factors in tumourigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678-685.
- RANKIN, E. B., J. RHA, T. L. UNGER, C. H. WU, H. P. SHUTT, R. S. JOHNSON, M. C. SIMON, B. KEITH, V. H. HAASE (2008): Hypoxia-inducible factor (HIF)-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene.* 27, 5354-5358.
- RATCLIFFE, P. J. (2006): Understanding hypoxia signalling in cells - a new therapeutic opportunity? *Clin. Med.* 6, 573-578.
- RATCLIFFE, P. J. (2007): HIF-1 and HIF-2 : working alone or together in hypoxia ? *The J. Clin. Investig.* 117, 862-865.
- RATCLIFFE, P. J. (2013): Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: The implications of physiology for cancer. *J. Physiol.* 591, 2027-2042.
- RAVAL, R. R., K. W. LAU, M. G. B. TRAN, H. M. SOWTER, S. J. MANDRIOTA, J.-L. LI, C. W. PUGH, P. H. MAXWELL, A. L. HARRIS, P. J. RATCLIFFE (2005): Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5675-5686.
- RAVI, R., B. MOOKERJEE, Z. M. BHUJWALLA, C. H. SUTTER, D. ARTEMOV, Q. ZENG, L. E. DILLEHAY, A. MADAN, G. L. SEMENZA, A. BEDI (2000): Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 14, 34-44.
- RESTUCCI, B., S. PAPPARELLA, P. MAIOLINO, G. De VICO (2002): Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumors. *Vet. Pathol.* 39, 488-493.
- RESTUCCI, B., P. MAIOLINO, O. PACIELLO, M. MARTANO, G. De VICO, S. PAPPARELLA (2003): Evaluation of Angiogenesis in Canine Seminomas by Quantitative Immunohistochemistry. *J. Comp. Pathol.* 128, 252-259.
- REY, S., G. L. SEMENZA (2010): Hypoxia-inducible factor-1- dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 86, 236-242.
- ROLF, A., I. KVIETIKOVA, M. GASSMANN, R. H. WENGER (1997): Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055-20062.
- ROSENBERGER, C., S. MANDRIOTA, J. S. JÜRGENSEN, M. S. WIESENER, J. H. HÖRSTRUP, U. FREI, P. J. RATCLIFFE, P. H. MAXWELL, S. BACHMANN, K.-U. ECKARDT (2002): Expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1721-1732.
- SALCEDA, S., J. CARO (1997): Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647.
- SANCHEZ, M., B. GALY, M. U. MUCKENTHALER, M. W. HENTZE (2007): Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  expression in iron deficiency. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 420-426.

- SANDLER, A., R. GRAY, M. C. PERRY, J. BRAHMER, J. H. SCHILLER, A. DOWLATI, R. LILENBAUM, D. H. JOHNSON (2006): Paclitaxel carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542-2550.
- SCHARF, V. F., J. P. FARESE, A. R. COOMER, R. J. MILNER, D. P. TAYLOR, M. E. SALUTE, M. N. CHANG, D. NEAL, D. W. SIEMANN (2013): Effect of bevacizumab on angiogenesis and growth of canine osteosarcoma cells xenografted in athymic mice. *Am. J. Vet. Res.* 74, 771-778.
- SCHÖDEL, J., S. OIKONOMOPOULOS, J. RAGOSSIS, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE, D. R. MOLE (2011): High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117, e207-217.
- SCHOFIELD, C. J., P. J. RATCLIFFE (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 343-354.
- SEMENZA, G. L. (2000a): HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. App. Physiol.* 88, 1474-1480.
- SEMENZA, G. L. (2000b): HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983-1991.
- SEMENZA, G. L. (2000c): Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 71-103.
- SEMENZA, G. L. (2001): HIF-1, O<sub>2</sub> and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1-3.
- SEMENZA, G. L. (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Canc.* 3, 721-732.
- SEMENZA, G. L. (2004): Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. *Physiology.* 19, 176-182.
- SEMENZA, G. L. (2010a): Oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews. Syst. Biol. Med.* 2, 336-361.
- SEMENZA, G. L. (2010b): Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 29, 625-634.
- SEMENZA, G. L. (2011): Oxygen sensing, homeostasis and disease. *N. Eng. J. Med.* 365, 537-547.
- SEMENZA, G. L. (2012a): Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends Mol. Med.* 18, 534-543.
- SEMENZA, G. L. (2012b): Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 207-214.
- SEMENZA, G. L. (2014): Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 39-56.
- SEMENZA, G. L., B.-H. JIANG, S. W. LEUNG, R. PASSANTINO, J.-P. CONCORDETI, P. MAIREI, A. GIALLONGO (1996): Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* 275, 32529-32537.
- SEMENZA, G. L., N. R. PRABHAKAR (2018): The role of hypoxia-inducible factors in carotid body (patho) physiology. *J. Physiol.* 596, 2977-2983.
- SEMENZA, G. L., P. H. ROTH, H.-M. FANG, G. L. WANG (1994): Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763.
- SEMENZA, G. L., G. L. WANG (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447-5454.
- SHAY, J. E. S., M. C. SIMON (2012): Hypoxia-inducible factors: Crosstalk between inflammation and metabolism. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 23, 389-394.

- SHALABY, F., J. ROSSANT, T. P. YAMAGUCHI, M. GERTSENSTEIN, X. B. WU, M. L. BREITMAN, A. C. SCHUH (1999): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- SHIBUYA, M. (2011): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* 2, 1097-1105.
- SHIH S. C., K. P. CLAFFEY (1998): Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int. J. Experiment. Pathol.* 79, 347-357.
- SHIN, J. E., S. A. JUNG, S. E. KIM, Y. H. JOO, K. N. SHIM, T. H. KIM, K. YOO, I. H. MOON (2007): Expression of MMP-2, HIF-1 alpha and VEGF in colon adenoma and colon cancer. *Korean J Gastroenterol.* 50, 9-18.
- SHIMODA, L. A., MANALO, D. J., SHAM, J. S., SEMENZA, G. L., AND SYLVESTER, J. T. (2001) Partial HIF-1 $\alpha$  deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 281, L202-L208.
- SHIN, J. I., H.-Y. LIM, H.-W. KIM, B.-J. SEUNG, J.-H. SUR (2015): Analysis of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression relative to other key factors in malignant canine mammary tumours. *J. Compar. Pathol.* 153, 101-110.
- SHOHET, R.V., J. A. GARCIA (2007): Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J. Mol. Med.* 85, 1309-1315.
- SLEECKX, N., H. DE ROOSTER, E. J. B. VELDHUIS KROEZE, C. VAN GINNEKEN, L. VAN BRANTEGEM (2011): Canine mammary tumours, an overview. *Reprod. Dom. Anim.* 46, 1112-1131.
- SOKER, S., S. TAKASHIMA, H. Q. MIAO, G. NEUFELD, M. KLAGSBRUN (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 92, 735-745.
- SORMENDI, S., B. WIELOCKX (2018): Hypoxia Pathway Proteins As Central Mediators of Metabolism in the Tumor Cells and Their Microenvironment *Front Immunol.* 9, 40.
- STRYER, L. (1991): *Biokemija*, 2. izdanje, Školska knjiga, Zagreb.
- TAKEDA, T., V. C. HO, H. TAKEDA, L.-J. DUAN, A. NAGY, G.-H. FONG (2006): Placental but Not Heart Defects Are Associated with Elevated Hypoxia-Inducible Factor  $\alpha$  Levels in Mice Lacking Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8336-8346.
- TALKS, K. L., H. TURLEY, K. C. GATTER, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE, A. L. HARRIS (2000): The factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157, 411-421.
- TALKS, K., L. TURLEY, K. C. GATTER, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE, A. L. HARRIS (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157, 411-421.
- TAN, C. C., K. U. ECKARDT, J. D. FIRTH, P. J. RATCLIFFE (1992): Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 263, 474-481.
- TAYLOR, B. L., I. B. ZHULIN (1999): PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 479-506.
- TERMAN, B. I., M. DOUGHER-VERMAZEN, M. E. CARRION, D. DIMITROV, D. C. ARMELLINO, D. GOSPODAROWICZ, P. BÖHLEN (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579-1586.
- THANNICKAL, V. J. (2009): Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *Am. J. Respirat. Cell Mol. Biol.* 40, 507-510.

- TIAN, H., R. E. HAMMER, A. M. MATSUMOTO, D. W. RUSSELL, S. L. McKNIGHT (1998): The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 12, 3320-3324.
- TIAN Y., K.K. YEOH, M. K. LEE, T. ERICSSON, B. M. KESSLER, H. B. KRAMER, M. J. EDELMANN, C. WILLIAM, C. W. PUGH, C. J. SCHOFIELD, P. J. RATCLIFFE (2011): Differential sensitivity of HIF hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 286, 13041-13051.
- TIAN H., S. L. McKNIGHT, D. W. RUSSELL (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11, 72-82.
- TOSCHI, A., E. LEE, N. GADIR, M. OHH, D. A. FOSTER (2008): Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J. Biol. Chem.* 283, 34495-34499.
- TURETZ, M. L., R. G. CRYSTAL (2007): Mechanisms and consequences of central nervous system hypoxia. In: *Neurobiology of disease*. Editor: Sid Gilman. 681-688.
- UCHIDA, T., F. ROSSIGNOL, M. A. MATTHAY, R. MOUNIER, S. COUETTE, E. CLOTTE, C. CLERICI (2004): Prolonged hypoxia differentially regulates HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of HIF-1 $\alpha$  natural antisense. *J. Biol. Chem.* 279, 14871-14878.
- UNIACKE, J. C. E. HOLTERMAN, G. LACHANCE, A. FRANOVIC, M. D. JACOB, M. R. FABIAN, J. PAYETTE, M. HOLCIK, A. PAUSE, S. LEE (2012): An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486, 126-129.
- UREÑA, J., R. FERNANDEZ-CHACÓN, A. R. BENOT, G. A. DE TOLEDO, J. LÓPEZ-BARNEO (1994): Hypoxia induces voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10208-10211.
- van WEEL V., R. B. van TONGEREN, V. W. van HINSBERGH, J. H. van BOCKEL, P. H. QUAX (2008): Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. *Ann. Vascular Surg.* 22, 582-597.
- VINCEN, K. A., K. G. SHYU, Y. LUO, M. MAGNER, R. A. TIO, C. JIANG, M. A. GOLDBERG, G. Y. AKITA, R. J. GREGORY, J. M. ISNER (2000): Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 $\alpha$ /VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 102, 2255-2261.
- VIGER, A., P. B. DERVAN (2006): Exploring the limits of benzimidazole DNA-binding oligomers for the hypoxia inducible factor (HIF) site. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 8539-8549.
- WAGNER, P. D. (2008). The biology of oxygen. *Europ. Respirat J.* 31, 887-890.
- WALLACE, E. M., J. P. RIZZI, G. HAN, P. M. WEHN, Z. CAO, X. DU, T. CHENG, R. M. CZERWINSKI, D. D. DIXON, B. S. GOGGIN, J. A. GRINA, M. M. HALFMANN, M. A. MADDIE, S. R. OLIVE, S. T. SCHLACHTER, H. TAN, B. WANG, K. WANG, S. XIE, R. XU, H. YANG, J. A. JOSEY (2016): A small-molecule antagonist of HIF2 $\alpha$  is efficacious in preclinical models of renal cell carcinoma. *Canc. Res.* 76, 5491-5500.
- WAIN, H. M., E. A. BRUFORD, R. C. LOVERING, M. J. LUSH, M. W. WRIGHT, S. POVEY (2002): Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79, 464-470.
- WANG, G. L., B.-H. JIANG, E. A. RUE, G. L. SEMENZA (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5510-5514.
- WANG, G. L., G. L. SEMENZA (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4304-4308.
- WANG, G. L., G. L. SEMENZA (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237.

- WARBURG O. (1925): The metabolism of carcinoma cells. *J Canc. Res.* 9, 148–163.
- WARBURG O., F. WIND, E. NEGELEIN (1927): The metabolism of tumors in the body. *J. Gener. Physiol.* 8, 519-530.
- WEISS, G., T. HOUSTON, S. KASTNER, K. JÖHRER, K. GRUNEWALD, J. H. BROCK (1997): Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood* 89, 680-687.
- WENGER, R. H. (2000): Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *The J. Exper. Biol.* 203, 1253-1263.
- WENGER, R. H. (2002). 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.* 16, 1151-1162.
- WEST, J. B. (2000): Human limits for hypoxia: The physiological challenge of climbing Mt. Everest. *Ann. New York Acad. Sci.* 899, 15-27.
- WIENER, C. M., G. BOOTH, G. L. SEMENZA (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 225, 485-488.
- WILSON, W.R., M. P. T. HAY (2011): Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 11, 393-410.
- WILLAM, C., N. MASSON, Y. M. TIAN, S. A. MAHMOOD, M. I. WILSON, R. BICKNELL, K. U. ECKARDT, P. H. MAXWELL, P. J. RATCLIFFE, C. W. PUGH (2002): Peptide blockade of HIF $\alpha$  degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10423-10428.
- WILLETT, C. G., Y. BOUCHER, E. DI TOMASO, D. G. DUDA, L. L. MUNN, R. T. TONG, D. C. CHUNG, D. V. SAHANI, S. P. KALVA, S. V. KOZIN, M. MINO, K. S. COHEN, D. T. SCADDEN, A. C. HARTFORD, A. J. FISCHMAN, J. W. CLARK, D. P. RYAN, A. X. ZHU, L. S. BLASZKOWSKY, H. X. CHEN, P. C. SHELLITO, G. Y. LAUWERS, R. K. JAIN (2004): Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer, *Nat. Med.* 10, 145-147.
- WIESENER, M.S., J. S. JURGENSEN, C. ROSENBERGER, C. K. SCHOLZE, J. H. HÖRSTRUP, C. WARNECKE, S. MANDRIOTA, I. BECHMANN, U. A. FREI, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE, S. BACHMANN, P. H. MAXWELL, K.-U. ECKARDT (2002): Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 17, 271-273.
- WOLDEMESKEL, M. (2013): Renal Cell Carcinoma in Humans and Animals: A Brief Literature Review. *J. Clin. Exp. Pathol.*, S7
- WOLFLE, D., H. SCHMIDT, K. JUNGERMANN (1983): Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur. J. Biochem.* 135, 405-412.
- WOOD, J. M., G. BOLD, E. BUCHDUNGER, R. COZENS, S. FERRARI, J. FREI, F. HOFMANN, J. MESTAN, H. METT, T. O'REILLY, E. PERSOHN, J. ROSEL, C. SCHNELL, D. STOVER, A. THEUER, H. TOWBIN, F. WENGER, K. WOODS-COOK, A. MENRAD, G. SIEMEISTER, M. SCHIRNER, K.H. THIERAUCH, M.R. SCHNEIDER, J. DREVS, G. MARTINY-BARON, F. TOTZKE (2000): PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration, *Canc. Res.* 60, 2178-2189.
- WYKOFF, C. C., N. J. P. BEASLEY, P. H. WATSON, K. J. TURNER, J. PASTOREK, A. SIBTAIN, G. D. WILSON, H. TURLEY, K. L. TALKS, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH, P. J. RATCLIFFE (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Canc. Res.* 60, 7075-7083.

- XIA, X., M. E. LEMIEUX, W. LI, J. S. CARROLL, M. BROWN, X. S. LIU (2009): Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4260-4265.
- XIA, Y., H. K. CHOI, K. LEE (2012): Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 49, 24-40.
- YAHALOMI, D., S. D. ATKINSON, M. NEUHOF, E. SALLY CHANG, H. PHILIPPE, P. CARTWRIGHT, J. L. BARTHOLOMEW, D. HUCHON (2020): A cnidarian parasite of salmon (*Myxozoa*: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. *Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 5358-5363.
- YEO, E. J., Y. S. CHUN, Y. S. CHO, J. KIM, J. C. LEE, M. S. KIM, J. W. PARK (2003): YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 516-525.
- YU, A. Y., M. G. FRID, L. A. SHIMODA, C. M. WIENER, K. STENMARK, G. L. SEMENZA (1998): Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol.* 275, L818-826.
- YU, A. Y., SHIMODA, L. A., IYER, N. V., HUSO, D. L., SUN, X., MCWILLIAMS, R., BEATY, T., SHAM, J. S., WIENER, C. M., SYLVESTER, J. T., AND SEMENZA, G. L. (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1. *J. Clin. Invest.* 103, 691-696
- ZHANG, X., J. P. GASPARD, D. C. CHUNG (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia, *Canc. Res.* 61 6050-6054.
- ZHANG, H., P. GAO, R. FUKUDA, G. KUMAR, B. KRISHNAMACHARY, K. I. ZELLER, C. V. DANG, G. L. SEMENZA (2008): HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Canc. Cell* 11, 407-420.
- ZHANG, H., M. BOSCH-MARCE, L. A. SHIMODA, Y. S. TAN, J. H. BAEK, J. B. WESLEY, F. J. GONZALEZ, G. L. SEMENZA (2007): Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892-10903.
- ZHANG, H., C. C. L. WONG, H. WEI, D. M. GILKES, P. KORANGATH, P. CHATURVEDI, L. SCHITO, J. CHEN, B. KRISHNAMACHARY, P. T. WINNARD JR, V. RAMAN, L. ZHEN, W. A. MITZNER, S. SUKUMAR, G. L. SEMENZA (2012): HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 31, 1757-1770.
- ZHANG, Z., L. YAO, J. YANG, Z. WANG, G. DU (2018): PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia. *Mol. Med. Rep.* 18, 3547-3554.
- ZHANG, H., D. Z QIAN, Y. SUN TAN, K. LEE, P. GAO, Y. R. REN, S. REY, H. HAMMERS, D. CHANG, R. PILI, C. V. DANG, J. O. LIU, G. L. SEMENZA (2008b): Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 $\alpha$  synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19579-19586.
- ZHAO, F. (2010): Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1 $\alpha$ -induced metabolic reprogramming. *Oncogene* 29, 2962-2972.
- ZENG H, H. F. DVORAK, D. MUKHOPADHYAY (2001): Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 26969-26979.
- ZHONG, H., A. M. De MARZO, E. LAUGHNER, M. LIM, D. A. HILTON, D. ZAGZAG, P. BUECHLER, W. B. ISAACS, G. L. SEMENZA, J. W. SIMONS (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Canc. Res.* 59, 5830-5835.

## 6. SAŽETAK

---

### Odgovor različitih tjelesnih i tumorskih stanica na smanjenu opskrbu kisikom i značaj odgovora u antitumorskoj terapiji

Sve stanice s jezgrom "osjećaju" koncentraciju O<sub>2</sub> i reagiraju na hipoksiju. Glavni posrednik homeostaze kisika u stanicama sisavaca je transkripcijski faktor nazvan hipoksijom inducirani faktor 1 (HIF-1). HIF je heterodimerni kompleks koji se sastoji od dvije proteinske podjedinice, HIF- $\alpha$  i HIF- $\beta$ . Podjedinica  $\alpha$  ima izoforme 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  i 3 $\alpha$  i sve tri heterodimeriziraju s 1 $\beta$ . U prisutnosti kisika (u normoksičnim uvjetima), HIF kompleks je inaktiviran posttranslacijskom hidroksilacijom  $\alpha$  podjedinice enzimima prolil-4-hidroksilazama (HIF-PH ili PHD - *engl.* prolyl hydroxylase domain), nakon čega slijedi razgradnja HIF-1 $\alpha$  podjedinice koja je regulirana von Hippel-Lindau tumor supresornim proteinom (pVHL). Nedostatkom kisika i izostankom hidroksilacije HIF- $\alpha$  podjedinice, zbog koje bi se u normoksiji ona razgradila, njenom stabilizacijom i translokacijom u jezgru te posljedičnom aktivacijom HIF kompleksa, promjene u dostupnosti kisika pretvaraju se u promjene ekspresije gena, transkripcijski odgovor na hipoksiju. HIF-ovi direktno ili indirektno reguliraju ekspresiju nekoliko stotina gena u svim tipovima stanica i pokreću kaskadne sekundarne reakcije ispreplićući se sa više signalnih puteva. Protein HIF- $\alpha$  tako regulira mnoge odgovore na hipoksiju uključujući adaptacije na anaerobni metabolizam, pojačava intenzitet eritropoeze, angiogenezu, utječe na vazomotorne funkcije i disanje. Fiziološkim mehanizmima koji se aktiviraju u hipoksiji nastoji se nedovoljno oksigenirano tkivo opskrbiti kisikom. Kompleks HIF je esencijalan za normalan razvoj i ima ulogu u patofiziološkim odgovorima na ishemiju/hipoksiju. Prekomjerno izražen protein HIF-1/2 $\alpha$  povezan je s progresijom tumora i metastatskim potencijalom, rezistencijom na radioterapiju i kemoterapiju i višim mortalitetom pacijenata, a faktor rasta endotela krvnih žila (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF) utječe na angiogenezu tjelesnih i tumorskih stanica. U prekliničkim i kliničkim studijama inhibicija HIF-1/2 $\alpha$  aktivnosti ima učinke na angiogenezu i rast u tumorima te se kontinuirano radi na razvoju selektivnih HIF-1/2 $\alpha$  inhibitora. Ovaj rad sažeo je spoznaje o tome kako stanice "osjećaju" i reagiraju na dostupnost kisika, kako je to povezano malignim tumorima i kako se te spoznaje mogu iskorisiti u terapiji.

**Ključne riječi:** homeostaza kisika, hipoksijom inducirani faktor, angiogeneza, tumori, antitumorska terapija

## 7. SUMMARY

---

### **The response of various somatic and tumor cells to a reduced oxygen supply and the importance of response in antitumor therapy**

All cells with a nucleus "sense" the concentration of O<sub>2</sub> and respond to hypoxia. The major mediator of oxygen homeostasis in mammalian cells is a transcription factor called hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF is a heterodimeric complex consisting of two protein subunits, HIF- $\alpha$  and HIF- $\beta$ . The  $\alpha$  subunit has isoforms 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$  and all three heterodimerize with 1 $\beta$ . In the presence of oxygen (under normoxic conditions), the HIF complex is inactivated by posttranslational hydroxylation of the  $\alpha$  subunit by the enzyme prolyl-4-hydroxylase (HIF-PH or PHD - prolyl hydroxylase domain), followed by degradation of the HIF-1 $\alpha$  subunit regulated by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL). Lack of oxygen and lack of hydroxylation of the HIF- $\alpha$  subunit, due to which it would degrade in normoxia, its stabilization and translocation in the nucleus and consequent activation of the HIF-complex, changes in oxygen availability are converted into changes in gene expression, transcriptional response to hypoxia. HIFs directly or indirectly regulate the expression of several hundred genes in all cell types and trigger cascading secondary responses by intertwining with multiple signaling pathways. The HIF- $\alpha$  protein thus regulates many responses to hypoxia including adaptations to anaerobic metabolism, enhances the intensity of erythropoiesis, angiogenesis, affects vasomotor functions, and respiration. Physiological mechanisms that are activated in hypoxia tend to supply insufficiently oxygenated tissue with oxygen. The HIF complex is essential for normal development and plays a role in the pathophysiological responses to ischemia/hypoxia. Overexpressed HIF-1/2 $\alpha$  protein is associated with tumor progression and metastatic potential, resistance to radiotherapy and chemotherapy, and higher patient mortality, and vascular endothelial growth factor (VEGF) affects the angiogenesis of somatic and tumor cells. In preclinical and clinical studies, inhibition of HIF-1/2 $\alpha$  activity has effects on tumor angiogenesis and growth, and work is continuously ongoing to develop selective HIF-1/2 $\alpha$  inhibitors. This paper summarized the findings on how cells "sense" and respond to oxygen availability, how this is associated with malignant tumors, and how these findings can be used in therapy.

**Key words:** oxygen homeostasis, hypoxia inducible factor, angiogenesis, cancer, anticancer therapy



## **8. KRATKI ŽIVOTOPIS**

Nakon završene Gimnazije Josipa Slavenskog Čakovec, upisala sam Veterinarski fakultet i studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom cijelog trajanja studija volontirala sam na Zavodu za biologiju sudjelujući na međunarodnim i domaćim projektima zaštite velikih zvijeri koje je vodio prof. emeritus Đuro Huber, te sam se na fakultetu uključivala i u druge dostupne aktivnosti vezane za divlje životinje. Pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Martine Đuras i izv. prof. dr. sc. Tomislava Gomerčića napisala sam rad koji je objavljen u studentskom časopisu Veterinar. U Zavodu za biologiju radila sam kao demonstrator u nastavi. Od prve godine studija, na oba fakulteta aktivno sam sudjelovala u radu i vođenju studentskih udruga BIUS i IVSA. U organizaciji IVSA-e bila sam na kraćim studentskim razmjena u Južnoj Africi, Nizozemskoj i Srbiji te kao jedan od predstavnika udruge na EAEVE/IVSA konferenciji u Beču. Tijekom studija bavila sam se i mnogim izvannastavnim aktivnostima. Kao član udruga BIUS, BIOM, HYL A sudjelovala sam u edukaciji javnosti o radu udruga i zaštiti bioraznolikosti te sudjelovala na mnogim terenskim stručnim i znanstvenim projektima iz područja zaštite prirode i divljih životinja (kralježnjaka) i praćenja influence divljih ptica. Pred kraj studija, radila sam studentske poslove u Zoološkom vrtu grada Zagreba. U slobodno vrijeme planinarim, bicikliram i boravim u prirodi.