



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Kasvainhypoksia

Kaneli Auer

Biologia  
LuK-tutkielma  
Laajuus: 6 op

28.2.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Biologia

**Tekijä(t):** Kaneli Auer

**Otsikko:** Kasvainhypoksia

**Ohjaaja(t):** Katja Anttila

**Sivumäärä:** 31 sivua

**Päivämäärä:** 28.2.2025

---

Kasvainhypoksia on yleinen ilmiö kiinteiden syöpäkasvainten mikroympäristössä ja sillä on laaja-alaisia vaikutuksia syövän biologisiin prosesseihin, aggressiivisuuteen sekä hoitoresistenssiin. Hypoksian tilan synty on monimutkainen prosessi, joka saa alkunsa muun muassa kasvaimen kiihtyneen kasvun seurauksena. Tämä johtaa hapen saannin rajoittumiseen ja solujen aineenvaihdunnallisiin muutoksiin. Kasvaimen hypoksinen mikroympäristö aktivoi useita solunsisäisiä signaalintireittejä, joissa keskeisiä ovat HIF-transkriptiotekijät sekä PIM-kinaasit. Geenien ilmentymisten muutosten vaikutuksesta syöpäsolut kykenevät sopeutumaan vähähappiseen ympäristöön, mikä edistää niiden eloonjäämistä, proliferaatiota ja etäpesäkkeiden muodostusta.

Hypoksian on havaittu olevan keskeinen tekijä syöpähoitojen resistenssissä etenkin säde- ja lääkehoidoissa. Lisäksi hypoksia vaikuttaa immuunivasteisiin ja voi heikentää myös immuunoterapian tehoa. Syöpähoitojen kehittämiseksi on tärkeää ymmärtää syyt hypoksian taustalla sekä kehittää keinoja sen vaikutusten torjumiseksi. Tällaista hypoksian vaikutuksien estoon pyrkivää hypoksiamodifikaatiota ovat esimerkiksi HIF- ja PIM-estäjien käyttö. Myös kasvaimen hypoksiatilan määrittäminen erilaisin menetelmin, kuten kuvantamisella ja erilaisilla biomarkkerianalyysillä, on tärkeää syöpähoidon suunnittelun kannalta.

---

**Avainsanat:** kasvainhypoksia, HIF-transkriptiotekijät, PIM-kinaasit, syöpähoito

# SISÄLLYS

<b>1</b>	<b>Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Kasvaimen hypoksinen mikroympäristö</b> .....	<b>2</b>
2.1	Hypoksiatyypit.....	2
2.2	Verenkierto ja angiogeneesi.....	4
2.3	Aineenvaihdunta .....	5
<b>3</b>	<b>Hypoksian aktivoimat välitystiet</b> .....	<b>7</b>
3.1	HIF-transkriptiotekijät .....	7
3.2	PIM-kinaasit .....	10
<b>4</b>	<b>Hypoksia syövän hoidossa</b> .....	<b>12</b>
4.1	<b>Terapiaresistenssi</b> .....	<b>12</b>
4.1.1	Resistenssiin johtavat tekijät .....	12
4.1.2	Resistenssin torjunta .....	14
4.2	<b>Hypoksian määrittäminen</b> .....	<b>17</b>
4.2.1	Suorat menetelmät .....	17
4.2.2	Endogeeniset menetelmät.....	18
4.2.3	Fysiologiset menetelmät.....	19
<b>5</b>	<b>Yhteenveto</b> .....	<b>20</b>
	<b>Lähteet</b> .....	<b>21</b>

# 1 JOHDANTO

Happi on tärkeä osa monisoluisien aerobisten eliöiden aineenvaihduntaa ja sen puutteellisuus johtaa herkästi vakaviin kudoksellisiin vasteisiin. Kudoksissa hallitsemattomasti jakautuvat solut muodostavat massoja, joita kutsutaan kasvaimiksi. Kudoksellinen hapen niukkuuden eli hypoksian on havaittu olevan tyypillinen piirre lähes kaikkien kiinteiden syöpäkasvainten mikroympäristössä, ja ilmiö on jo vuosikymmenten ajan ollut syöpätutkimuksen keskiössä. Syövät eli pahanlaatuiset kasvaintaudit kuuluvat maailman yleisimpiin tauteihin, mikä tekee myös kasvainhypoksiasta maailmanlaajuisen ilmiön.

Hypoksialla on vaikutusta sekä normaaleihin soluihin että syöpäsoluihin, mutta solutyypin vasteet eroavat merkittävästi toisistaan. Pitkittynyt hypoksia normaalien solujen mikroympäristössä johtaa ennen pitkää ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin tai akuuttiin patologiseen solukuolemaan eli nekroosiin. Normaalin säätelyn piiristä karanneet syöpäsolut kykenevät normaaleista soluista poiketen kuitenkin sopeutumaan niukkaan happipitoisuuteen muun muassa säätelemällä geenien ilmentymistä sekä suosimalla happea vaatimatonta aineenvaihduntaa. Kasvaimessa solujen tarve sietää hypoksiaa on korostunut, sillä niiden tiheä lisääntyminen johtaa nopeasti hapensaannin vaikeuksiin.

Thomlinson ja Gray (1955) havaitsivat hypoksisen tilan keuhkosyöpäpotilaiden kasvainkudoksessa jo 70 vuotta sitten. Hapella käsiteltyjen kasvainsolujen huomattiin esimerkiksi reagoivan sädehoitoon kolme kertaa hypoksisia soluja tehokkaammin ja useat tutkimukset ovat sittemmin asettuneet tukemaan näitä havaintoja. Hypoksian onkin todettu olevan yhteydessä syövän aggressiivisuuteen sekä huonoon eloonjäämisennusteeseen. Syövän huonoennusteisuus on tulosta monista tekijöistä, mutta kasvainhypoksian näkökulmasta siihen vaikuttavat erityisesti vähähappiseen mikroympäristöön adaptoituneiden syöpäsolujen geenien ilmentymisen muutokset. Nämä muutokset johtavat herkästi etenkin kiihtyvään metastasointiin eli etäpesäkkeiden muodostukseen, genomiseen epästabiilisuuteen sekä hoitoresistenssiin niin lääkehoidon kuin sädehoidon osalta. Kasvainhypoksia on täten noussut tärkeäksi osaksi myös syöpähoitojen kehitystyötä.

## 2 KASVAIMEN HYPOKSIINEN MIKROYMPÄRISTÖ

Kasvaimen mikroympäristö (engl. tumor microenvironment) eli TME on monimutkainen ja jatkuvassa muutoksessa oleva kokonaisuus kasvaimen ympärillä, joka koostuu muun muassa erilaisista soluista, verisuonista sekä soluväliaineesta. Hypoksia on kasvaimen mikroympäristön ominaisuus, joka on tiiviissä yhteydessä muun muassa kasvainsolujen lisääntymiseen, aineenvaihduntaan sekä verisuonten muodostukseen. Hypoksisille syöpäsoluille olennaisten välitysteiden aktivaatio johtaa erilaisten kasvainhypoksiatyyppien muodostumiseen. Hypoksisten alueiden synty puolestaan johtaa herkästi sellaisten prosessien käynnistymiseen, jotka kiihdyttävät hypoksiaa ja sen vaikutuksia entisestään. Hypoksisen mikroympäristön syy-seuraussuhteet eivät siis ole täysin yksiselitteisiä.

### 2.1 Hypoksiatyyppit

Normaalissa kudoksessa hapen osapaine vaihtelee aineenvaihdunnan aktiivisuuden mukaan välillä 40–95 mmHg. Kudoksissa luokitellaan yleensä hypoksisiksi hapen osapaineen ollessa alle 10mmHg, mutta hypoksia voidaan määritellä eri tavoin eri kudoksissa aineenvaihdunnan aktiivisuuden erojen perusteella. Kasvainhypoksia voidaan luokitella kahteen eri alatyypin vallitsevan happivajeen laadun sekä sen keston perusteella. Hypoksia voi olla tyypiltään joko kroonista tai akuuttia ja eri tyypit voivat johtaa muun muassa hyvinkin erilaisten signaaliteiden aktivaatioon sekä hoitoresistenssiin. Kasvaimen mikroympäristö voi myös olla vahvasti heterogeeninen ilmentäen molempien hypoksiatyyppien alueita samanaikaisesti (Liu ym. 2023).

Kroonisen hypoksian synnyn peruseriaatteet tunnistettiin jo Thomlinsonin ja Grayn (1955) tutkimuksessa. Krooninen hypoksia saa alkunsa hiussuonten välittämän hapen diffuusion vähenemisestä ja sitä kutsutaankin siksi usein myös diffuusion rajoittamaksi hypoksiaksi (engl. diffusion-limited hypoxia). Diffuusiovaikeudet johtuvat syöpäsoluille olennaisesta liiallisesta proliferatiosta eli uudiskasvusta. Aktiivinen proliferaatio johtaa solumassan tiheyden nopeaan kasvuun, mikä puolestaan vaikeuttaa joidenkin solujen hapensaantia merkittävästi, sillä niiden etäisyys lähimpään verisuoneen on äkillisesti kasvanut (Bayer & Vaupel, 2012; Nobre ym. 2018). Akuutti hypoksia puolestaan on seurausta vähentyneestä perfuusiosta eli veren läpivirtauksesta ja sitä kutsutaankin siksi myös perfuusion rajoittamaksi hypoksiaksi (engl. perfusion-limited hypoxia). Akuutti hypoksia johtuu epätasaisesti ja vajaasti kehittyneiden verisuonten eripituisista sulkeutumiskausista ja toisin kuin kroonisessa hypoksiassa, tila voidaan kumota palauttamalla veren virtaus takaisin normaaliksi (Nobre ym. 2018).

Kroonisen hypoksian syöpäsoluissa useat hypoksiavasteet on havaittu vahvemmiksi kuin akuutin hypoksian soluissa, mikä sai tutkijat alun perin uskomaan kroonisen hypoksian vaikuttavan syövän aggressiivisuuteen akuutteja hypoksiajaksoja voimakkaammin. Muun muassa hypoksiastressin sietämisen kannalta olennaisia transkriptiofaktoreita sekä niiden aktivoimia geenejä tuotetaan kroonisessa hypoksiassa enemmän. Lisäksi pitkittyneen hypoksian on havaittu lisäävän syöpäsolujen invasiivisuuskapasiteettia (Alqawi ym. 2007; Bayer & Vaupel, 2012). Akuuttia hypoksiaa ei ensin tunnistettu kroonisen hypoksian ohella yhtä yleiseksi tai uhkaavaksi tekijäksi syövässä. Sittemmin monet akuutin hypoksian vasteet on kuitenkin monilta osin havaittu kroonistakin hypoksiaa monimutkaisemmiksi ja vaikeahoitoisemmiksi. Durand ja Leopard (1995) havaitsivat tutkimuksessaan, että vähintään puolet levyepiteelikarsinoomaa ympäröivistä verisuonista ilmensivät akuuttiin hypoksiaan viittaavia ajoittaisia perfuusiomuutoksia. Lisäksi 15–20 % sädehoidolle resistentistä soluista vaikutti kärsivän nimenomaan akuuteista happivajejaksoista. Aiemmin pelkäsi mekanistiseksi ominaisuudeksi tulkitun ilmiön sijasta he ehdottivat, että epäsäännöllinen perfuusio olisi yksi kasvainhypoksian synnyn tärkeimmistä periaatteista, ja että hoidossa tulisi kiinnittää enemmän huomiota hypoksian laatuun.

Thews ym. (2004) tutkimuksessa krooniselle hypoksialle altistetuilla rotilla perfuusio eli veren läpivirtaus suonissa oli voimakkaampaa kuin rotilla, jotka puolestaan altistettiin akuutille hypoksialle. Useamman verisuonen läpi virtaava veri kroonisessa hypoksiassa johti vähäisempään kasvaimen kasvuun, vaikka verisuonten tiheydessä ryhmien välillä ei havaittu eroavaisuuksia. Akuutille hypoksialle altistuneiden rottien kohdalla perfuusio puolestaan heikkeni huomattavasti ja useampi verisuoni ei kuljettanut verta lainkaan. Tutkimustuloksista kävi ilmi, että pitkäaikainen sopeutuminen vähähappisuuteen vaikuttaa kroonisen hypoksian tapauksessa verisuonten toiminnallisuuteen parantavasti ja täten mahdollistaa tehokkaamman hapen diffuusion soluille.

Vakava-asteisen hypoksian on havaittu johtavan myös solusyklin pysähtymiseen ja sen myötä normaalien happiolosuhteiden palautuessa mittaviin DNA-vaurioihin. Akuutin hypoksian solujen on kuitenkin havaittu kykenevän jatkamaan DNA-replikaatiota hapellisten olosuhteiden palatessa kudokseen toisin kuin kroonisen hypoksian solujen. Kroonisessa hypoksiassa solujen replikaatiivinen uudelleenkäynnistyminen on estetty useilla replikaatioinhibiittoreilla, minkä seurauksena solut kuolevat. Akuutisti hypoksisen kasvaimen solujen kyky jatkaa replikoitumista johtaa kuitenkin kertyviin DNA-vaurioihin sekä genomiseen epästabiilisuuteen, mikä te-

kee kasvaimista aggressiivisia ja vaikeahoitaisia (Pires ym. 2010). Uudet löydökset hypoksia-tyyppien merkittävästä eroavaisuudesta mahdollistavat monipuolisempien hoitokeinojen kehityksen ja niiden perusteella erityisesti akuuttiin hypoksiaan olisi kiinnitettävä jatkossa enemmän huomiota.

## *2.2 Verenkierto ja angiogeneesi*

Hiussuonten määrä ja laatu ovat suorassa yhteydessä kudosten hapensaantiin ja näin ollen siihen, miten hypoksiaisia alueita muodostuu. Judah Folkman (1971) ehdotti tutkimukseensa pohjaten, että verisuonten uudismuodostus eli angiogeneesi on tärkeä prosessi osana kehittyvän kasvaimen selviytymistä, kasvua sekä myöhemmin myös etäpesäkkeiden muodostusta. Verisuonten muodostuminen kasvaimen ympäristöön poikkeaa kuitenkin tavallisesta verisuonten kehityksestä, mikä johtaa herkästi hapettomien alueiden syntymiseen. Siinä missä normaalin kudoksen verisuonet ovat järjestäytyneet hierarkisesti täysin erilaistuneisiin ja tasaisesti jakautuneisiin eri suonityyppeihin, kasvaimen verisuonitus on epätasainen niin kehitykseltään kuin järjestäytyneisyydeltään (Nagy ym. 2009).

Kasvainten verisuonet järjestäytyvät usein serpentiinimäiseen muotoon ja ne voivat olla halkaisijaltaan hyvinkin eri kokoisia. Lisäksi ne haarautuvat epätasaisesti, mikä johtaa erilaisiin epämuodostumiin, kuten umpikujiin, tukoksiin sekä vuotaviin seinämiin. Myös niin kutsutut arteriovenoosiset suntit (engl. arteriolar-venous shunts), joissa veri kulkee sydäimestä tulevasta valtimosta suoraan laskimoon ilman niiden välissä tyypillisesti ilmenevää hiussuonitusta, ovat kasvaimille tyypillisiä (Nagy ym. 2009; Siemann, 2011). Poikkeavan verisuonittuneisuuden myötä myös verenkierto on usein epäsäännöllistä eikä aina noudata tiettyä yhdensuuntaista reittiä. Osassa suonista veri ei kulje jatkuvasti, vaan se voi virrata vaihtelevia reittejä pitkin ja toisinaan vaihtelevasti jopa eri suuntiin samassa suonessa (Chaplin ym. 1987).

Terveessä kudoksessa järjestelmällinen verisuonitus on taattu tarkasti säädellyillä molekylaarisilla pro-angiogeenisillä sekä anti-angiogeenisillä säätelytekijöillä, jotka toimivan imusuoniston kanssa yhteistyössä varmistavat kontrolloidun ja tarpeenmukaisen verisuonten muodostuksen sekä verenkierron. Tunnetuimpiin pro-angiogeenisiin säätelijöihin kuuluvat endoteelikasvutekijät (engl. vascular endothelial growth factors) eli VEGF:t. Tärkeimpiä anti-angiogeenisiä tekijöitä puolestaan ovat trombospondiinit, angiostatiini sekä endostatiini (Huang & Bao, 2004). Normaalissa kudoksessa molempia angiogeenisiä säätelytekijöitä eritetään tasapainoisesti aineenvaihdunnallisten vaatimusten perusteella, toisin kuin aggressiivisesti kasvavassa

syöpäsolupopulaatioissa, jossa pro-angiogeenisten tekijöiden on havaittu selvästi yliekspressoituvan (Siemann, 2011). Tätä angiogeenisten tekijöiden tasapainon kallistumaa kohti pro-angiogeenisten tekijöiden ylituotantoa kutsutaan angiogeeniseksi vaihdokseksi (engl. angiogenic switch) ja muun muassa alhaisen happipitoisuuden on havaittu vaikuttavan positiivisesti sen käynnistymiseen (Baeriswyl & Christofori, 2009). Voimakas pro-angiogeenisten tekijöiden ilmentyminen on siis mitä todennäköisimmin taustalla kasvainten verisuonten kaoottisessa järjestäytymisessä, mikä johtaa sekä akuuttiin että krooniseen hypoksiaan.

### 2.3 Aineenvaihdunta

Verisuonten kehityksen tavoin myös syöpäsolujen aineenvaihdunta poikkeaa merkittävästi normaalien solujen aineenvaihdunnasta ja niille olennaista on muun muassa poikkeava glukoosinkäyttö. Normaalit nisäkäsolut saavat energiansa joko aerobisessa soluhengityksessä tai maitohappokäymisessä. Maitohappokäymistä hyödynnetään kuitenkin lähes ainoastaan hapettomissa olosuhteissa, kun taas hapen läsnä ollessa solut hyödyntävät aerobista respiraatiota.

Jo aikaisessa kehitysvaiheessa syöpäsolut käyvät läpi niille tyypillisen aineenvaihdunnallisen muutoksen, josta käytetään nimitystä Warburg-efekti. Otto Warburgia pidetään yhtenä ensimmäisistä kasvaimen energiametabolian tutkijoista ja tutkimuksissaan hän osoitti, että kasvainkudoksessa maitohappoa tuotetaan energiametabolisiin tarpeisiin myös hapen läsnä ollessa toisin kuin normaalissa kudoksessa, jossa maitohappokäymistä käytetään energianlähteenä lähes tulkoon ainoastaan happivajeessa (Warburg, 1925). Poikkeuksena tästä ovat urheilusuoritukset, joissa käytetään aina hieman myös anaerobista aineenvaihduntaa.

Syöpään sairastumisen tiedetään johtuvan useista eri tekijöistä ja niin kutsutuista toissijaisista syistä, mutta Otto Warburg ehdotti syövän ensisijaiseksi syyksi solujen hapen käytön korvautumista sokerien fermentoinnilla. Syöpäsolujen ilmentämää Warburg-efektiin perustuvaa fenotyyppiä kutsutaan myös aerobiseksi glykolyysiksi ja sille ominaista on kasvanut glukoosin sisäänotto. Määrällisesti kasvavat eli proliferoivat syöpäsolut vaativat kasvavassa määrin ATP:tä lisääntyntä biomassatuotantaan varten ja pyrkivät vastaamaan tarpeisiin vaihtamalla aineenvaihdunnallisia mekanismejaan. ATP-tuotanto oksidatiivisen fosforylaation kautta on yleisesti ottaen kuitenkin huomattavasti glykolyysiä tehokkaampaa, eikä fenotyypin muutokselle olekaan löydetty täysin yksimielistä selitystä (Liberti & Locasale, 2016). Sen on kuitenkin ehdo-



tettu olevan lisääntyntä proliferaatiota tukeva sopeutumismekanismi, jossa lisääntyneen glukosinoton ajatellaan toimivan hiilenlähteenä lisääntyneitä biosynteettisiä prosesseja, kuten lipidien ja proteiinien tuotantoa varten (Hosios ym. 2016).

Warburg-efektiin perustuvaan aerobiseen glykolyysiin johtavia mekanismeja ei siis tunneta täysin. Glukoosinkuljettajien (engl. glucose transporters) eli GLUT:ien proteiiniperheen tiedetään kuitenkin olevan tärkeä syöpäsolujen muuntuneen aineenvaihdunnan mahdollistaja. Luokan 1 GLUT:ien rakenne ja toiminta tunnetaan parhaiten, ja luokkaan kuuluvien GLUT-1:n sekä GLUT-3:n transkription on havaittu olevan korkeampi syöpäkudoksessa kuin tavallisessa kudoksessa. Niiden yli-ilmentymisen on ehdotettu olevan vastuussa glukosin sisäänoton lisääntymisestä syöpäsoluissa (Mellanen ym. 1994; Yamamoto ym. 1990). Warburg-efektin lisäksi kasvaimen aineenvaihdunta on vahvasti glykolyyttistä jo pelkästään siitä syystä, että kasvaimen sisällä vallitsevat hypoksiset olosuhteet. GLUT-1-proteiinin ilmentymisen on myös havaittu myös olevan sitä korkeampi, mitä kauempana solu sijaitsee verisuonista. Havainto viittaa GLUT-1:n vahvaan rooliin etenkin diffusion rajoittamassa eli kroonisessa hypoksiassa, jolle tyypillistä on kasvanut etäisyys verisuoniin ja siitä johtuva happivaje (Rademakers ym. 2011).

Lisääntyneiden biosynteettiset prosessien myötä syöpäsolujen tarve tuottaa useita eri aineenvaihduntatuotteita eli metaboliitteja kasvaa. Lisääntyneen lipidien ja aminohappojen tuotannon myötä syöpäsolujen on muun muassa ylläpidettävä sitraattitasoja normaalien solujen aineenvaihdunnasta poikkeavalla tavalla. Normaaleissa soluissa sitraattia muodostuu sitruunahappokierrossa asetyylikoentsyymi-A:n avulla, mitä hypoksisissa soluissa muodostuu vähemmän. Tämä saa hypoksiset solut hyödyntämään vaihtoehtoisia tapoja ylläpitää sitraattitasoja. Solut voivat esimerkiksi karboksyloida normaalisti sitruunahappokierrossa toimivaa  $\alpha$ -ketoglutaraattia muodostaakseen isositraattia, josta isomerisoinnin avulla saadaan muokattua sitraattia (Wise ym. 2011). Myös pyruvaatti on hypoksisille syöpäsoluille tärkeä metaboliitti, minkä tuotanto syöpäsoluissa lisääntyy. Pyruvaatin muuntaminen laktaatiksi on välttämätön osa glykolyysiä ja ATP:n muodostusta hypoksisissa soluissa. Tämän lisäksi pyruvaatti toimii usein osana rasvahappoja ja sitä voidaan käyttää myös ei-välttämättömien aminohappojen muodostuksessa. Sekä sitraatti että pyruvaatti ovat tärkeä osa asetyylikoentsyymi-A:n synteesiä, jolla puolestaan on vaikutusta DNA:n histoniproteiinien asetylaatioon. Syöpäsoluissa histonien asetylaatiolla on vaikutusta etenkin syövälle tyypillisen glukosiaineenvaihdunnan käynnistymiseen, sillä se mahdollistaa vaihtoehtoiselle aineenvaihdunnalle olennaisten geenien transkription (Paredes ym. 2021).

### 3 HYPOKSIAN AKTIVOIMAT VÄLITYSTIET

Hapesta riippuvainen aineenvaihdunta on johtanut monisoluisilla aerobisilla organismeilla tarkoin säädeltyihin hypoksiavasteisiin. Kaikki solut reagoivat ja pyrkivät sopeutumaan hypoksiaan, mutta normaalista säätelystä poikkeavat syöpäsolut ovat lisäksi oppineet käyttämään normaaleja hypoksiavasteita hyväkseen. Monet hypoksiavasteina muodostetut proteiinit ja niiden kasvaneet määrät soluissa ovatkin yhteydessä syöpähoitojen toimimattomuuteen.

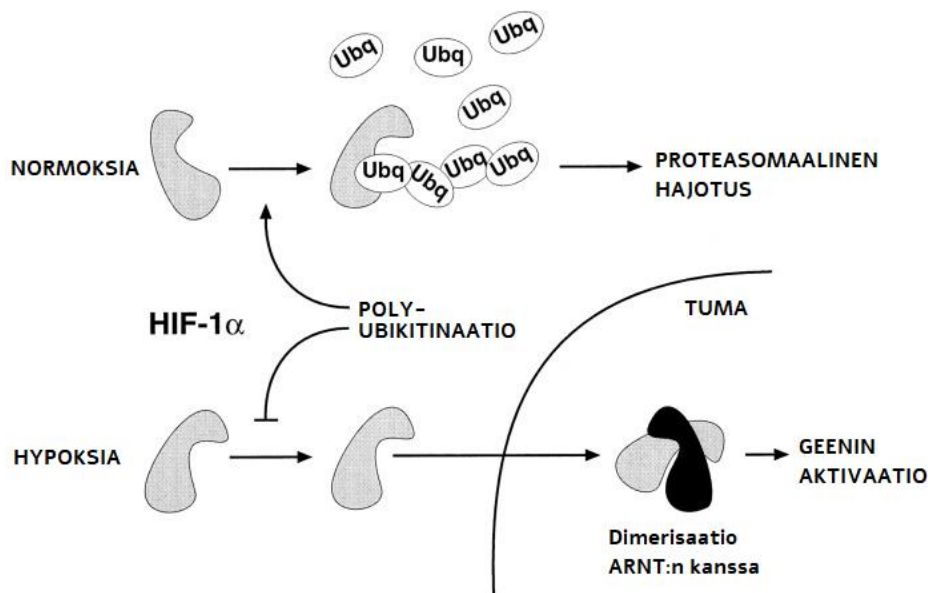
#### 3.1 HIF-transkriptiotekijät

Tärkeimpiin syöpäsolujen hypoksiastressin aktivoimiin reaktioteihin kuuluvat HIF (hypoxia-inducible factor) -transkriptiofaktoreiden käynnistämät HIF-välitystiet, jotka ovat tärkeässä osassa myös normaalien solujen hypoksiavasteessa. HIF-proteiinit koostuvat kahdesta alayksiköstä: HIF-1 $\alpha$  ja HIF-1 $\beta$ , joka tunnetaan myös nimellä ARNT. HIF-1 $\alpha$  dimerisoituu hypoksisissa olosuhteissa ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) -proteiinin kanssa ja toimii tämän jälkeen transkriptiofaktorina. Transkriptiofaktorikompleksi tunnistaa hypoksisissa olosuhteissa useita kohdegeenejä, joiden ekspression tavoitteena on ylläpitää solujen homeostaasia vähähappisessa ympäristössä. HIF:it sitoutuvat hypoksiaresponsiivisiin elementteihin (engl. hypoxia response element) eli HRE:ihin solun metaboliasta, selviytymisestä ja proliferaatiota vastaavien geenien promoottori- tai tehostaja-alueilla (Bartoszewski ym. 2019; Wang ym. 1995).

HIF:it löydettiin tutkittaessa hematopoeettisen kasvuhormonin eli erytropoietiinin (EPO) roolia hypoksiassa. Veren happipitoisuuden laskiessa EPO:n tuotanto kytkeytyy nopeasti päälle, mikä käynnistää erytropoeettiset vasteet ja näin ollen veren hapenkuljetus tehostuu. EPO-geenin tehostajajakson tarkastelu paljasti erityisen proteiinin, jonka sitoutuminen oli kytköksissä hypoksiaan ja joka nimettiin HIF-1:ksi. HIF-1:n sitoutuminen erityiseen EPO-geenin tehostajakohtaan todettiin välttämättömäksi transkription aloitukselle (Semenza & Wang, 1992; Wang & Semenza, 1993). Myöhemmin HIF-proteiinien on todettu vaikuttavan samalla tavalla useisiin muihinkin geeneihin ja HIF-1 rinnalle on löydetty myös HIF-2 isomuoto, jonka toiminta poikkeaa ensin löydetyistä HIF-1:stä.

Normoksisissa eli normaalien happipitoisuuden soluissa HIF- $\alpha$ -proteiinialayksikön ekspression on todettu olevan negatiivisesti säädelty polyubikitinaation sekä proteasomaalisen hajotuksen kautta ja ilmiötä on tutkittu erityisesti HIF-1 $\alpha$ :n kohdalla (kuva 1). Kallio ym. (1999) osoittivat

tutkimuksessaan, että normaaleissa happipitoisissa olosuhteissa HIF-1 $\alpha$  polyubikitinoidaan, mutta hypoksian vallitessa ubikitinaatioaktiivisuus vähenee huomattavasti. HIF-1 $\alpha$ :n määrän havaittiin normaalin happitason vallitessa kohoavan, jos proteasomien toiminta estettiin. Myöhemmin Ohh ym. (2000) tutkimuksessa HIF-proteiinien ubikitinaation todettiin olevan yhteydessä Von Hippel-Lindau-proteiinin (pVHL) toimintaan. Aktiivinen pVHL-proteiini vaatii toimiakseen sekä toiminnallisen  $\alpha$ -että  $\beta$ -domeenin, joista  $\beta$ -domeeni sitoutuu suoraan HIF-proteiiniin merkiten sen hajotettavaksi ja  $\alpha$ -domeeni puolestaan osallistuu sitoutumalla elongiineihin estäen transkriptiota tapahtumasta. Sekä  $\alpha$ -että  $\beta$ -domeenien tiedetään olevan alttiita kohtia mutaatioille perinnöllisessä von Hippel-Lindaun taudissa, jolle ominaista ovat lukuisat ympäri kehoa muodostuvat kasvaimet ja joka aiheutuu VHL-proteiinin toimimattomuudesta. Von Hippel-Lindaun tauti johtaakin liialliseen HIF-proteiinien tuotantoon, sillä niiden määrää säätelevä ubikitinaatiojärjestelmä ei toimi normaalisti.



**Kuva 1. Ubikitiinin rooli proteasomaalisessa hajotuksessa HIF-1 $\alpha$ :n aktivaatiossa.** HIF-1 $\alpha$  polyubikitinoidaan normoksisissa olosuhteissa ja hajotetaan nopeasti proteasomissa. Hypoksia saa HIF-1 $\alpha$ :n välttymään ubikitinoinnilta, mikä johtaa lisääntyneeseen tumakuljetukseen ja dimerisaatioon ARNT:n kanssa, mikä puolestaan mahdollistaa kohdegeenin transkription aloituksen. Muokattu (Kallio ym. 1999).

Downes ym. (2018) sekvensoivat HIF-proteiinin tärkeimpien isomuotojen, HIF-1 $\alpha$  ja HIF2 $\alpha$ :n, transkriptomeja ja havaitsivat niiden ilmentävän jo tunnettuja rakenteellisia sekä toiminnallisia samankaltaisuuksia, mutta myös olennaisia poikkeavuuksia. HIF-1 ja HIF-2 proteiinien ei muun muassa olla samankaltaisuudestaan huolimatta havaittu säätelevän samoja geenejä, vaikka näin aikaisemmin ajateltiin. HIF-transkriptiofaktoreista tunnetuin on HIF-1. Downes

ym. (2018) havaitsivat HIF-1 $\alpha$ :n säätelevän erityisesti energiametaboliaa, minkä he arvelivat viittaavan HIF-1 $\alpha$ :n merkittävään rooliin erityisesti akuuteissa metaboliamuutoksissa ja täten etenkin nopeammassa hapen konsentraatiomuutoksissa. HIF-1 $\alpha$  on todettu säätelevän useampia sellaisia geenejä, jotka lisäävät mitokondriaalista autofagiaa ja näin ollen laskevan mitokondriaalista massaa. Mitokondriaalisen massan kontrolloinnin ajatellaan toimivan tehokkaana keinona säädellä ATP-tasoa sekä toisaalta tapana välttää reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista. HIF-1 $\alpha$ :n säätelyn piiriin kuuluviin geeneihin tiedetään kuuluvan myös esimerkiksi punasoluntuotantoa lisäävä erytropoietiini (*EPO*), useat glykolyttiset entsyymit sekä glukosin solukalvokuljetusta tehostava *GLUT1* (Semenza, 2000). Lisäksi HIF-1 $\alpha$ :n uskotaan vaikuttavan etäpesäkkeiden muodostumiseen ja muun muassa mitatut HIF-1 $\alpha$  määrät ovat korkeammat etäpesäkkeissä kuin ensisijaisissa kasvaimissa (Zhong ym. 1999).

Vähemmän tutkittu HIF-2 $\alpha$  vaikuttaisi olevan tärkeässä asemassa ennemminkin kroonisessa hypoksiassa, sillä sen osuuden on havaittu kasvavan pidentyneessä hypoksiatilassa. Teoriaa tukevat myös havainnot HIF-2 $\alpha$ :n säätelemästä rasvahappojen ja lipoproteiinien sisäänotosta. Tämän on arveltu toimivan mekanismina energian keräämiseen muun muassa lisääntyntä proliferaatiota varten, mikä on yksi tärkeä ominaispiirre etenkin kroonisessa hypoksiassa. Lisäksi HIF-2 $\alpha$ :n on havaittu aikaansaavan useiden kollageenien ja kollageeniä muokkaavien entsyymien ilmentymistä, joiden uskotaan olevan yhteydessä verisuonten uudismuodostukseen eli angiogeneesiin (Downes ym. 2018).

Hypoksiatilan muuntumista akuutista krooniseksi ja sen seurauksena HIF-1 $\alpha$ :n vaihtumista HIF-2 $\alpha$ :an on nimitetty HIF vaihdokseksi (engl. HIF-switch). Bartoszewski ym. (2019) tutkivat HIF-proteiinien vaihdosta ja tulivat päätelmään, että se voisi olla seurausta sopeutumismekanismien kehittymisestä pitkittynyttä hypoksiaa vastaan ja johtuisi muun muassa HIF-1 $\alpha$ :n ja HIF-2 $\alpha$ :n mRNA:iden stabiilisuuseroista. Erot HIF-1 $\alpha$  ja HIF-2 $\alpha$  ilmentymisen välillä ovat kuitenkin osin edelleen epäselviä. On myös ehdotettu, että ainoastaan HIF-1 $\alpha$  vaikuttaisi kriittisesti kasvaimen muodostumiseen, kun taas HIF-2 $\alpha$ :lla näyttäisi olevan ainoastaan kohtalainen vaikutus kasvaimen muodostumisen tehokkuuteen (Hoefflin ym. 2020).

Yksi tärkeimmistä HIF-1 $\alpha$ :n vaikutuksista perustuu Warburg-aineenvaihdunnan käynnistymiseen HIF-1 $\alpha$ :n toimiessa välttämättömänä transkription aloittajana monille entsyymeille, jotka edistävät glykolyysiä (Hoefflin ym. 2020). HIF-1 $\alpha$  säätelee muun muassa glykolyysisäätelijä fosfoglyseraattimutaasi 1:stä (engl. glycolysis regulator phosphoglycerate mutase 1, PGAM1)

sekä useita laktaattidehydrogenaaseja (Firth ym. 1994; Kim ym. 2022). PGAM1 on tärkeä glykolyysin kahdeksannen vaiheen fosfaattiryhmän muutoksen katalysoija ja laktaattidehydrogenaasit puolestaan säätelevät glykolyysin loppupuolella esiintyvää reaktiota, jossa hapen puutteesta johtuen pyruvaatti muutetaan laktaatiksi.

HIF-transkriptiofaktoreiden on yhdessä havaittu vaikuttavan merkitsevästi angiogeneesin säätelyyn ja erityisesti VEGF-reseptorien geenien ilmentymiseen. VEGF toimii joko endoteelisoluspesifisten reseptorien kautta kemotaktisesti eli solujen liikkeeseen vaikuttavasti tai mitogeenisesti eli solujen jakautumista lisäävästi. Tällaisia endoteelisoluspesifisiä reseptoreita ovat VEGFR-1, VEGFR-2 sekä VEGFR-3. Näistä VEGFR-1 ja VEGFR-2-reseptorit kuuluvat hypoksian säätelyn piiriin. VEGFR-1 säätely tapahtuu HIF-proteiinia sitovan promoottorin välityksellä, kun taas VEGFR-2 säädellään post-transkriptionaalisesti (Tang ym. 2004). Epätyypillinen verisuonten muodostuminen ei siis ole ainoastaan kasvainhypoksian aiheuttaja, vaan myös sen seuraus.

### 3.2 *PIM-kinaasit*

HIF-transkriptiotekijät ovat osoittautuneet monien solun hypoksiavasteiden ensisijaisiksi säätelijöiksi. Poikkeuksena tästä toimivat kuitenkin PIM (Provirus Integration site for Moloney leukemia virus) -kinaasit, jotka ovat seriini/treoniini proteiinikinaaseja, joiden on havaittu toimivan HIF-aloitteisesta transkriptiosta irrallisina entsyymeinä. PIM-kinaaseja on kolmea erityyppiä: PIM-1, PIM-2 ja PIM-3. PIM-kinaasit tunnetaan kenties parhaiten niiden suorasta kyvystä fosforyloidella ohjelmoidulle solukuolemalle eli apoptoosille olennaista Bcl2 assosioitua solukuoleman edistäjää (engl. Bcl-2-associated death promoter) eli BAD-proteiinia. Näin ollen PIM-kinaasit voivat auttaa soluja välttämään apoptoosia. Niiden on todettu kuitenkin myös säätelevän kasvaimen solujen selviytymistä vähähappisissa olosuhteissa esimerkiksi alentamalla reaktiivisten happiyhdisteiden määrää säätelemällä muun muassa mitokondrion toimintoja osittain samaan tapaan kuin HIF-1 $\alpha$  (Warfel ym. 2016). PIM-kinaasit ovat erityisen suuressa roolissa eturauhassyövässä, jossa niitä tuotetaan runsaasti. Eturauhasen kasvainten tiedetään myös olevan erityisen hypoksisia (Cibull ym. 2006) ja havaintoon pohjaten kiinnostus PIM-kinaasien roolista kasvainhypoksiassa saikin osin alkunsa.

Toisin kuin suurimmalla osalla proteiinikinaaseja, PIM-kinaaseilla ei ole lainkaan säätelyyn erikoistuneita alueita, vaan ne pysyvät translaatiosta lähtien aktiivisina. Toth ym. (2022) selvit-

tivät tutkimuksessaan PIM-kinaasien säätelyä hypoksisissa olosuhteissa ja havaitsivat, ettei hypoksia suoraan vaikuttanut PIM-kinaasien määriin eivätkä HIF-transkriptiotekijöiden säätelyyn piiriin kuuluvat proteiinitasot nousseet soluissa yhdessä PIM-tasojen kanssa. Havaintojen perusteella hypoksian voitiin päätellä vaikuttavan PIM-kinaaseihin translaation jälkeisen säätelyn tasolla. Tutkimuksessa osoitettiin hypoksian vaikuttavan nimenomaan PIM-kinaasien ubiquitinaatioon sekä niiden proteosomaaliseen hajotukseen estävästi, ja normoksiassa ubiquitinaatiota tapahtuikin huomattavasti enemmän. Tutkittavien PIM-1 ja PIM-2-kinaasien proteosomaalisen hajotukseen välttäminen oli riippuvaista ubiquitiineja poistavien deubikitinaatioproteiinien eli DUB:ien aktivaatiosta. PIM-kinaasit hyötyivät erityisesti eräästä DUB-proteiineihin kuuluvasta ubiquitiinispesifisestä proteaasista (engl. ubiquitin-specific protease), USP28:sta.

USP28:n on aikaisemmin havaittu osallistuvan myös HIF-1 $\alpha$ :n deubikitinaation säätelyyn (Flügel ym. 2012). Sillä on lisäksi havaittu olevan solusykliä sääteleviä ominaisuuksia sen säätellessä muun muassa solusyklin tarkistuspisteiden kinaaseja vaikuttaen näin solusyklin pysäyttämiseen ja apoptoosiin (Zhang ym. 2006). USP28 deubikitinoini myös esisyöpägeeninä toimivaa MYC proto-onkogeeniä (engl. MYC proto-oncogene) eli MYC-säätelygeeniä, minkä on todettu toimivan yhdessä PIM-kinaasien kanssa ja edistävän kasvainten muodostumista (Kim ym. 2010). Toth ym. (2022) tutkimuksessa USP28 poistogeeniset syöpäsolut muodostivat kasvaimia ja kasvattivat kasvainten kokoa huomattavasti hitaammin kuin solut, joissa USP28 toimi normaalisti. Lisäksi poistogeenisistä soluista mitattiin pienemmät PIM-1 pitoisuudet. Tutkimuksen tulokset tukevat päätelmää siitä, että USP28:n säätelemät PIM-kinaasien määrät todella vaikuttavat syövän etenemiseen.

PIM-kinaaseilla vaikuttaisi olevan myös yhteys HIF-transkriptiotekijöiden ilmentymiseen. Cassillas ym. (2018) tutkimuksessa geneettisen tai kemiallisen PIM-kinaasiaktiivisuuden estämisen huomattiin vähentävän sekä HIF-1 $\alpha$ :n että HIF-2 $\alpha$ :n määriä sekä HIF-1:n transkriptionaalista aktiivisuutta. PIM-kinaasin esto johti HIF-proteiinien proteosomaaliseen hajotukseen hypoksisista olosuhteista huolimatta, jolloin hajotusta ei normaalisti tapahdu. Tulokset tukevat teoriaa siitä, että syöpäsolut tehostavat PIM-kinaasien ilmentymistä vasteena hypoksiaan, mikä puolestaan mahdollistaa tehokkaamman HIF-1 tuotannon. PIM-kinaasien yhteys hypoksiaan ei HIF-proteiineihin verrattuna ole vielä yhtä tunnettu, mutta useiden niiden roolia korostavien tutkimustulosten perusteella PIM-kinaasien rooliin perehtyminen voisi tuoda tärkeää lisätietoa kasvainhypoksian syiden ja seurausten ymmärtämiseen.

## 4 HYPOKSIA SYÖVÄN HOIDOSSA

Hypoksia on läsnä lähes kaikissa kiinteissä kasvaimissa ja siksi sen vaikutukset on tärkeää ottaa huomioon myös syövän hoidossa. Hypoksisen mikroympäristön tiedetään vaikuttavan syövän hoitovasteeseen monissa erilaisissa hoitomuodoissa ja useammasta eri syystä. Hypoksian määrittäminen ei aina ole yksinkertaista, mutta hoitojen onnistumisen kannalta se on kuitenkin olennaista. Syöpähoitojen optimoimiseksi on tärkeää ymmärtää sekä syyt muuntuneiden hoitokriteerien taustalla että tavat mitata kasvaimen hypoksiatilaa.

### 4.1 *Terapiaresistenssi*

Syöpäkasvainten kyky vastustaa hoitoa on suuri haaste syöpähoidoissa. Yksi keskeisimmistä terapiaresistenssiä aiheuttavista mekanismeista onkin kasvainten hypoksia. Hypoksisen ympäristön aktivoimat solunsisäiset signaalintiretit lisäävät vastustuskykyä muun muassa säde- sekä lääkehoidoille ja vaikuttavat osin myös syövän leikkauksen tuloksiin. Normoksiset syöpäsolut vastaavat hoitoihin usein hypoksisia soluja tehokkaamin, sillä hypoksiassa aktivoituu mekanismeja, jotka mahdollistavat solujen kontrolloimattoman jakautumisen sen estoon pyrkivistä hoidoista huolimatta. Hypoksisen mikroympäristön aiheuttamat ongelmat hoidoille ovat kuitenkin monisyisiä. Siitä huolimatta niiden ratkomiseen on myös onnistuttu kehittämään erilaisia strategioita

#### 4.1.1 Resistenssiin johtavat tekijät

Syövän yleisimpiin hoitomuotoihin kuuluu sädehoito, jossa ionisoivaa säteilyä käyttäen pyritään vaurioittamaan tiheästi jakautuvien syöpäsolujen rakenteita ja näin pienentämään kasvaimia. Thomlinson ja Gray (1955) löysivät tutkimuksessaan perustan sille, että hypoksialla on vaikutus sädehoidon tehokkuuteen. Happivajeesta kärsivien solujen havaittiin tällöin olevan peräti kolme kertaa resistentimpiä säteilylle kuin normaalihappisten solujen. Hypoksisten solujen onkin useasti todettu olevan resistentimpiä sädehoidolle siksi, että toimiakseen hoito tarvitsee happea. Sädehoito perustuu reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumisen aiheuttamiin DNA-vaurioihin, joiden kertyminen soluun johtaa lopulta sen kuolemaan. Hypoksisissa olosuhteissa reaktiivisten happiyhdisteiden muodostuminen on kuitenkin rajallista. Happi reagoi normaaliolosuhteissa vauriokohtien kanssa lisäksi niin, että sädehoidolla aiheutettujen DNA-katkoksien korjaaminen estyy. Hypoksiassa DNA-katkoksia kyetään kuitenkin korjaamaan, eikä vaurioiden aiheuttamisesta tällöin ole hyötyä (Bouleftour ym. 2021).

Toisena yleisenä hoitomuotona syövässä hyödynnetään lääkitystä, josta käytetään usein myös nimityksiä sytostaattihoito ja kemoterapia. Hoidon tarkoituksena on usein estää solunjakautumista kasvaimissa muun muassa DNA- ja RNA-synteesiä vaurioittamalla. Lääkkeet voivat kuitenkin olla myös biologisia täsmälääkkeitä, jotka keskittyvät esimerkiksi verisuonten kasvun estämiseen. Hypoksiset solut ovat resistenttejä syöpää vastaan kehitetyille lääkkeille monista syistä. Yhtenä syynä voidaan pitää hypoksisten solujen kasvanutta etäisyyttä verisuonista, jolloin ne pysyttelevät pitkälti lääkeaineiden tavoittamattomissa (Brown & Wilson, 2004). Toisena selittävänä tekijänä on hypoksian yhteys lääkeresistenssiin vaikuttaviin geeneihin. Muun muassa HIF-1:n yli-ilmentymisen hypoksisisissa kasvaimissa on havaittu olevan yhteydessä P-glykoproteiinin lisääntyneeseen ilmentymiseen (Wartenberg ym. 2003). P-glykoproteiini tunnetaan myös nimellä monilääkeresistenttiproteiini 1 (engl. multidrug resistance protein 1) eli MDR1, ja nimensä mukaisesti se tekee solut resistenteiksi monille lääkkeille pumpaamalla niitä solun ulkopuolelle. Osa lääkkeistä taas pyrkii aiheuttamaan DNA-vaurioita sädehoidon tavoin ja hapen puute heikentää niiden toimintaa samaan tapaan kuin sädehoitoresistenssissä (Batchelder ym. 1996). Vähähappisuus näyttäisi tällaisten lääkkeiden kohdalla vaikeuttavan siis vaurioiden aiheuttamista sekä toisaalta mahdollistavan niiden korjaamisen. Myös aikaisemmin tarkasteltujen hypoksian indusoimien PIM-kinaasien on havaittu vaikuttavan lääkeaineiden toimintaan haitallisesti (Casillas ym. 2018).

Hypoksialla on vaikutusta myös syöpäkirurgian mahdollisuuksiin. Kasvaimen leikkaus on operaationa hyödyllinen potilaalle silloin, kun syöpä ei vielä ole levittäytynyt etäpesäkkeiden muodossa laajalti ympäri kehoa. Tämä pätee toisaalta pitkälti myös muihin hoitomuotoihin. Hypoksia vaikuttaa kuitenkin etäpesäkkeiden muodostumiseen eli metastasointiin tukemalla monia sen edellyttämiä aineenvaihdunnallisia muutoksia syöpäsoluissa. Syöpäsolujen metastaattisen eli etäpesäkkeellisen fenotyypin tiedetään nykyisin johtuvan useista solun läpikäymistä valintaprosesseista, joita myös monet hypoksian aktivoimat mekanismit tukevat. Syöpäsoluille tyypillisen HIF-1 ja HIF-2 ylituotannon on muun muassa havaittu säätelevän E-kadheriini- ja vimentiniinitasoja eturauhassyövässä. Nämä kaksi proteiinia ovat tärkeä osa metastasoinnin epiteeli-mesenkyyymi siirtymää (epithelial–mesenchymal transition) eli EMT:tä, jossa epiteelisolut irtoavat toisistaan ja muuttuvat liikkumiskykyisemmiksi. Tämä osaltaan mahdollistaa syöpäsolujen etäpesäkkeiden muodostamisen (Luo ym. 2006). Syöpäleikkauksen jälkeisen hypoksian tilan on myös ehdotettu johtavan todennäköisemmin syövän paikalliseen uusiutumiseen ja aggressiivisempiin syöpäsolukantoihin. Govaert ym. (2014) tutkimuksessa havaittiin, että maksan



leikkauksen jälkeen syntyvä hypoksia edistää mikrometastaasien kasvua ja jäljelle jääneiden syöpäsolujen metastasointikapasiteettia.

Joissain tapauksissa syövän hoitoon voidaan käyttää myös immunologista hoitoa, minkä tehoon hypoksialla myös on vaikutusta. Immunoterapia pyrkii tehostamaan elimistön omaa immuunijärjestelmää ja tavoitteena on saada se hyökkäämään syöpäsoluja vastaan. Hypoksisen mikroympäristön on kuitenkin havaittu muuttavan kasvainvastaisten immuunisolujen (engl. anti-tumor immune cells) ja immunosuppressiivisten solujen (engl. immunosuppressive cells) väliä lukusuhteita niin, että hypoksiassa immunosuppressiivisten solujen määrä on normaalia korkeampi. Immunosuppressiiviset solut, kuten regulatoriset T-solut (engl. regulatory T-cells) eli Treg solut sekä myeloidiperäiset suppressorisolut (engl. myeloid-derived suppressor cells) eli MDSC:t, vaikuttavat syöpäsoluihin kohdistunutta puolustusvastetta heikentävästi erittämällä immunosuppressiivisia tekijöitä. Tämä heikentää kasvainvastaisten immuunisolujen kuten CD8<sup>+</sup>-T-solujen sekä luonnollisten tappajasolujen (engl. natural killer cells) eli NK-solujen tehoa, jolloin myös immunoterapian toimivuus heikkenee. Lisäksi hypoksialle tyypilliset verisuonten muodostuksen muutokset vaikuttavat myös immunoterapiaan, sillä immuunisolujen pääsy kasvainalueelle vaikeutuu (Kopecka ym. 2021).

#### 4.1.2 Resistenssin torjunta

Hypoksian aiheuttaman terapiaresistenssin torjuminen on ollut tutkimuksen päämääränä jo pitkään. Hypoksian resistenssiä aiheuttavien vaikutusten torjuntaa voidaan kutsua myös hypoksiamodifikaatioksi (engl. hypoxia modification). Hypoksian muokkaamiseen ja terapiaresistenssin ehkäisyyn onkin kehitetty muun muassa useita hypoksiassa aktiivisten proteiinien, kuten HIF:ien, VEGF:n ja PIM-kinaasien estäjiä. Estäjien toiminta pyrkii usein tavalla tai toisella verisuonten muodostumisen estoon, mikä vaikeuttaa kasvainten kasvua ja helpottaa täten monien hoitomuotojen hyödyntämistä. Myös hapen määrän lisääminen kasvaimiin, solujen hapen käyttöön liittyvät muokkaukset sekä sädehoitoa tehostavat sädeherkistäjät (engl. radiosensitizers) ovat osa hypoksiamodifikaatiota.

Erytisesti HIF-1 $\alpha$ -estäjiä on kehitetty useita, ja niiden toimintamekanismit ovat hyvin vaihtelevia. HIF-1 $\alpha$ -estäjien toiminta voi perustua HIF-1 $\alpha$ :n transkription tai translaation estämiseen, HIF-1 $\alpha$ :n stabiilisuuden muokkaamiseen, heterodimerisaation estoon, tumakuljetuksen tai DNA:han sitoutumisen torjuntaan tai HIF-kohdegeenien muokkaukseen (Qannita ym. 2024).

VEGF on tärkeä HIF-transkriptiofaktoreiden säätelyn piiriin kuuluva proteiini, jonka ilmentymiseen pyritään monesti puuttumaan terapiaresistenssin hoidossa, sillä se on tärkeä osa verisuonten muodostumista. Lee ym. (2000) tutkimuksessa VEGF:n estäjän havaittiin olevan verisuonituksen taantumisen lisäksi yhteydessä hapen mediaaniosapaineen kohoamiseen sekä alentuneisiin hypoksialukemiin. Epäsuoran verisuonituksen kautta tapahtuvan hypoksiavaikutuksen lisäksi VEGF:llä vaikuttaisi siis olevan myös suurempi vaikutus happitasoihin.

PIM-estäjät kytkeytyvät myös vahvasti VEGF:n ja HIF:ien toimintaan. Erityisesti PIM1-kinaasin ylituotannon on todettu olevan yhteydessä joidenkin angiogeneesiä estävien lääkkeiden toimimattomuuteen. Syynä tähän voidaan pitää PIM-kinaasien kykyä säädellä HIF-transkriptiotekijöiden stabiilisuutta, jotka puolestaan säätelevät vahvasti VEGF:n tuotantoa hypoksiassa (Casillas ym. 2018). Warfel ym. (2016) tutkimuksessa selvisi, että hypoksisissa olosuhteissa PIM-kinaasit vähentävät syöpäsolujen oksidatiivista stressiä lisäämällä antioksidanttien ilmentymistä sekä vähentämällä reaktiivisten happilyhdisteiden kertymistä. PIM-kinaasien estäjät täten mahdollistavat reaktiivisten happilyhdisteiden kertymisen soluihin, mikä jo itsessään voi johtaa hypoksisten solujen kuolemaan, mutta mikä voi myös tehostaa monien hoitomuotojen toimintaa. PIM-kinaasi inhibiittorit voisivat siis olla tehokas hoitomuoto hypoksisten kasvainten torjunnassa.

Estäjien lisäksi hypoksiaan ja sen aiheuttaman resistenssin torjuntaan on kokeiltu myös suurempia lähestymistapoja. Muun muassa hemoglobiinin määrällä on arveltu olevan vaikutusta terapian mahdollisuuksiin, ja sen määrää on pyritty kasvattamaan muun muassa potilaille tehdyillä verensiirroilla. Hoitovasteen ja hemoglobiinin yhteyttä ei kuitenkaan täysin tunneta. Pelkkä lähtötilanteessa mitattu hemoglobiinitaso ei ole osoittautunut merkittäväksi syövän ennustetekijäksi, mutta keskimääräinen viikoittainen alin hemoglobiinitaso (engl. Average Weekly Nadir Hemoglobin Levels) eli AWNH sen sijaan on. Grogan ym. (1999) tutkimuksessa havaittiin, että mitä alhaisempi AWNH kohdunkaulan syöpää sairastavalla potilaalla oli, sitä huonompi oli viiden vuoden eloonjäämisennuste. Verensiirto paransi ennustetta, mutta se heikkeni, jos hemoglobiinitaso putosi jälleen sädehoidon aikana. Oikeana ajankohtana tehtyä verensiirtoa voitaisiin siis pitää mahdollisena tapana parantaa sädehoidon toimivuutta ja sen kautta potilasennustetta. Myös hengitetyn hapen pitoisuuden säätelyllä on pyritty vaikuttamaan sädehoidon toimivuuteen. Suit ym. (1972) tutkimuksessa rintasyöpää kantavat hiiret hengittivät 100 prosentista happea, minkä todettiin parantavan merkittävästi sädehoitovastetta. Vaikutus

oli suurempi hyperbaarisissa eli ylipaineisissa olosuhteissa kuin normobaarisissa eli normaali-paineisissa, mikä tukee hyperbaarisen hapen käytön mahdollisuuksia sädehoitoherkistäjänä syövän hoidossa.

Uudempi lähestymistapa kasvainhypoksian hoitoon on hapen kulutuksen vähentäminen syöpäsoluissa, sillä kasvaimen hapenpuute on pitkälti peräisin suuresta hapenkulutuksesta. Secomb ym. (1995) tutkimuksen perusteella hapenkulutuksen vähentäminen 30 prosentilla vaikuttaisi teoriassa verenvirtauksen lisäämistä ja hyperbaarista happea tehokkaammalta tavalta vähentää hypoksiaa. Hapenkulutuksen väheneminen ei tutkimuksessa toteutettujen teoreettisten mallien perusteella pelkästään nostaisi veren happipitoisuutta, vaan vähentäisi myös happigradienteja eli epätasaisesta hapensaannista johtuvia hapen osapaineen vaihteluja kasvaimen sisällä. Hapenkulutuksen lasku voitaisiin aikaansaada muun muassa solusyklin pysäyttämällä, lämpöä lisäämällä tai oksidatiivista fosforylaatiota estämällä. Erilaiset solujen hapen käyttöä vähentävät aineet ovatkin osoittautuneet prekliinisten tutkimusten perusteella toimiviksi ja niillä uskotaankin olevan paikka tulevaisuuden syöpähoidoissa (Horsman ym. 2021).

Hapen toimintaa jäljittelevät kemialliset aineet ovat osin syrjäyttäneet aiemmat hypoksiasta johtuvan hoitoresistenssin torjuntamekanismit. Näillä sädeherkistäjinä tunnetuilla aineilla on kyky herkistää resistentit syöpäsolukannat sädehoidolle hypoksisissa olosuhteissa mahdollistamalla DNA-vaurioiden muodostumisen samoin periaattein kuin happi normoksisissa olosuhteissa. Yleisimpiä radioherkistäjiä ovat luontaisina antibiootteina esiintyvät nitroimidatsolit. Nitroimidatsolien aktivoituminen ja kyky muodostaa kovalenttisia sidoksia makromolekyyleihin hypoksiassa sai tutkijat kiinnostumaan niiden käytöstä sädeherkistäjinä (Adams, 1973), mutta myöhemmin niiden käytössä havaittiin muun muassa korkeista annoksista johtuvia neurotoksisia sivuvaikutuksia (Wasserman ym. 1980). Osa tutkimuksista on osoittanut sädeherkistäjien käytön myös hyödyttömäksi, mutta toisaalta eräässä pään ja kaulan alueen syöpään keskittyneessä laajassa meta-analyysissä niiden käytön havaittiin parantavan kasvainten paikallista kontrollointia sekä yleistä ennustetta huomattavasti, vaikka hyödyt yksittäin vaikuttivatkin pieniltä (Overgaard, 2011). Tulokset viittaavat mahdollisuuteen hyödyntää sädeherkistäjiä jatkossa etenkin pään ja kaulan alueen syövässä, kunhan aineiden sivuvaikutukset eivät koidu ongelmaksi.

## 4.2 Hypoksian määrittäminen

Kasvaimen hypoksiatilaa ei voi päätellä sen koosta, kehitysasteesta tai histologiasta. Siispä hypoksian määrittämiseen on täytynyt kehittää erillisiä menetelmiä. Tutkimuksen avulla on pyritty löytämään keinoja arvioida kasvainten hypoksiaa, mutta kliiniseen hypoksiamäärittämiseen ei toistaiseksi ole käytössä tiettyä yleistynyttä menetelmää. Kasvainhypoksian määrittämisen menetelmät voidaan jakaa kolmeen pääryhmään: suoriin, fysiologisiin ja endogeenisiin. Menetelmä voi siis perustua joko suoraan happikonsentraation mittaamiseen, happimolekyylien fysiologisten prosessien tulkitsemiseen tai vaihtoehtoisesti endogeenisten eli sisäsyntyisten merkkiaineiden ilmentymisen arviointiin (Walsh ym. 2014). Toisinaan hypoksian määrittämiseen käytettävät menetelmät jaetaan jyrkemmin suoriin ja epäsuoriin menetelmiin, tai vastaavasti hypoksiamarkkereihin ja kuvantamiseen perustuviin menetelmiin.

### 4.2.1 Suorat menetelmät

Suorana happikonsentraatiota mittaavana menetelmänä voidaan käyttää kudokseen asetettavia elektrodeja, jotka ovat yksi yleisimmistä kasvainhypoksian happitasojen määrittämistavoista. Niiden käyttö perustuu hapen reaktioihin sensorin läheisyydessä, mikä mahdollistaa datan keräämisen juuri asetetun anturin alueelta (Gatenby ym. 1988). Ongelmat elektrodien käytössä kohdistuvatkin pitkälti menetelmän invasiivisuuteen sekä siihen, ettei anturi erota elävää ja kuollutta kudosta toisistaan. Tämä johtaa herkästi hypoksiatilan yliarviointiin, jos mitattavaksi päätyykin kuollut kudos (Vaupele ym. 2007).

Muita suorita menetelmiä ovat muun muassa fosforesenssisammutus (engl. phosphorescence quenching), jossa tarkastellaan happimolekyylien ja fosforesenssivärien välisiä vuorovaikutuksia sekä elektronin paramagneettista resonanssia (engl. electron paramagnetic resonance), jossa hapelle selektiivinen pariton elektroni injektoidaan kudokseen. Myös Overhauser-tehostettu MRI (engl. Overhauser-enhanced MRI) on suora tapa hypoksian määrittämiseen ja siinä hapen mittaukseen yhdistetään magneettikuvaus. Menetelmä perustuu kudoksen vesiprotonien hyperpolarisaatioon ja tulostuvien reflektoidun datan. Nämä menetelmät ovat happielektrodeihin nähden huomattavasti vähemmän invasiivisia, mutta eivät yhtä laajalti käytettyjä tai kaikkialla lääketieteellisesti hyväksytyjä toimenpiteitä (Walsh ym. 2014)

#### 4.2.2 Endogeeniset menetelmät

HIF-1-proteiineja voidaan käyttää hypoksian määrittämisessä kasvainkudoksesta, ja menetelmä on yksi tunnetuista endogeenisistä määrittystavoista. Hapen läsnä ollessa tuotettu HIF-1 ohjautuu proteosomiin hajotettavaksi ja hajotus hidastuu hapen osapaineen laskiessa (Kallio ym. 1999). Tätä tietoa hyödyntäen Liu ym. (2005) loivat HIF-1 riippuvaisista hypoksiaresponsiivisista elementeistä eli HRE:istä viiden kopion promoottorin (5HRE), jonka aktiivisuutta seurattiin vihreällä fluoresenssiproteiini -reportterigeenillä (d2EGFP). 5HRE-d2EGFP geenillä varustetut melanoomasolut ilmensivät fluoresenssia vasteena hypoksiaan, ja fluoresenssin intensiivisyys oli yhteydessä hapen määrään. Vahvasti hypoksisessa kudoksessa fluoresenssisignaali oli siis suuri, kun taas kudoksen käsittely hapella johti nopeaan fluoresenssisignaalin laskuun.

Myös HIF-1:n säätelyn piiriin kuuluvia proteiineja voidaan hyödyntää hypoksian määrittämisessä. Kasvaimen aineenvaihduntaan vahvasti kytkeytynyt GLUT1 toimii endogeenisenä hypoksiamarkerina useassa eri syöpätyypissä. Glykolyysin tehostuminen hypoksisessa kasvaimessa saa aikaan glukoosinkuljettajaproteiinin tuotannon lisääntymisen, jolloin kasvaimesta mitattu GLUT1-proteiinin määrä kertoo tehokkaasti vallitsevasta hypoksiatilasta. GLUT1-proteiinin ilmentymisen on myös havaittu olevan sitä korkeampi, mitä kauempana solu sijaitsee verisuonista. Solun etäisyys verisuonista taas kertoo osin vallitsevan happivajeen vakavuudesta (Rademakers ym. 2011; Walsh ym. 2014).

Toinen laajalti hyväksytty endogeeninen tapa hypoksian määrittämiseen on komeettamäärittäminen (engl. comet assay), mikä keskittyy yksittäisten solujen DNA-vaurioiden mittaamiseen. Säteilyn tiedetään aiheuttavan selkeästi enemmän DNA-vaurioita vähähappisissa soluissa kuin happivajeesta kärsivissä soluissa, mikä onkin syy kasvainhypoksian aiheuttamalle sädehoitoresistenssille. Komeettamäärittämisessä voidaan esimerkiksi analysoida säteilyn aiheuttamien DNA-vaurioiden kertymistä ja korjautumista. Komeettamäärittäminen pyrkii mittaamaan hypoksisen solujen osuutta kasvainnäytteestä, ja menetelmä on havaittu toimivaksi esimerkiksi sädehoitoa saavilla pään ja kaulan alueen syövästä kärsivillä potilailla. Komeettamäärittäminen tarjoama data ei aina korreloi suoraan kudoksesta mitatun hapen osapaineen kanssa, mutta sen on havaittu ennustavan tehokkaasti etenkin lyhyen aikavälin hoitotuloksia, mikä käytännön kannalta on usein hyödyllistä (Le ym. 2003).

### 4.2.3 Fysiologiset menetelmät

Nitroimidatsolit voivat toimia sädeherkistäjien lisäksi fysiologisina hypoksiamarkkereina. Niiden käytössä sädeherkistäjinä on havaittu muun muassa korkeista annoksista johtuvia neurotoksisia sivuvaikutuksia (Wasserman ym. 1980), mutta niiden eri muodot, kuten pimonidatsoli tai 2-nitroimidatsoli EF5, ovat yleisessä käytössä niille kehitettyjen vasta-aineiden kohteina. Vasta-aineilla voidaan todentaa hypoksisia alueita immunohistokemiallisin menetelmin, joissa käytettävä nitroimidatsolien määrä on huomattavasti alhaisempi (Raleigh ym. 1996).

Nitroimidatsoleja hyödynnetään myös positroniemissiotomografiassa- eli PET-kuvantamisessa, joka on yleistynyt fysiologinen menetelmä hypoksian määrittämiseen. Se on tekniikkana ei-invasiivinen ja siinä hyödynnetään suonensisäisesti annosteltuja isotooppileimatutuja merkkiaineita, joiden jakautumista kudoksiin voidaan tarkastella PET-kameralla. Säteilevällä isotoopilla leimatut merkkiaineet ovat elimistössä fysiologisesti esiintyviä molekyyliä tai niiden analogisia vastineita. Hypoksian määrittämisessä yleisimmin käytettyjä merkkiaineita ovatkin fluori-18-isotoopilla leimatut nitroimidatsolit (Perez ym. 2023). Nitroimidatsolit päätyvät soluihin passiivisen diffuusion kautta, joissa ne pelkistyvät. Normoksisissa olosuhteissa molekyylit uudelleenhapetetaan ja ne diffusoituvat soluista ulos toisin kuin hypoksiassa, jossa pelkistyminen johtaa aineen jumiutumiseen solujen sisään. Nitroimidatsolin jumiutumisenopeus on kääntäen verrannollinen paikallisen hapen osapaineen kanssa, ja kertyminen voidaan havaita PET-kameralla. Vain elävässä kudoksessa aktiiviset reduktaasit ovat välttämättömiä nitroimidatsolin pelkistymiselle, mikä varmistaa sen, että yhdiste kertyy ainoastaan eläviin hypoksisiin soluihin (Fleming ym. 2015).

## 5 YHTEENVETO

Hypoksia on keskeinen osa kasvainten mikroympäristöä ja sillä on jo pitkään tiedetty olevan vaikutus syövän kehittymiseen, aggressiivisuuteen sekä hoitoresistenssiin. Kasvaimen hapenpuute johtaa moniin solutason muutoksiin, jotka mahdollistavat syöpäsolujen selviytymisen ja kontrolloimattoman kasvun muuntuneista olosuhteista huolimatta. Keskeisessä asemassa ovat HIF-transkriptiotekijät, jotka säätelevät useita hypoksiavasteita, kuten epätavallista angiogeneesiä sekä aineenvaihdunnan siirtymistä aerobiseen glykolyysiin, josta käytetään myös termiä Warburg-efekti. HIF-proteiinien lisäksi PIM-kinaasien merkitys on todettu tärkeäksi osaksi kasvainhypoksian vasteiden säätelyä. Näiden vasteiden ansiosta syöpäsolut kykenevät vastustamaan säde- ja lääkehoitoja sekä immunoterapiaa, mikä vaikeuttaa syövän hoitoa.

Hypoksian määrittäminen on monesti haasteellista, mutta sen tarkempi tunnistaminen on keskeistä hoitovasteen parantamiseksi. Käytössä on suoria menetelmiä, kuten hapensaturaation mittaukset elektrodeilla, fysiologisia menetelmiä, kuten PET-kuvantaminen, sekä endogeenisiä merkkiaineita hyödyntäviä menetelmiä, kuten HIF-1:n ja GLUT1-proteiinin ilmentymisen arviointi. Hypoksiatilaa määrittäminen mahdollistaa entistä yksilöllisemmät ja kohdennetummat hoitostrategiat. Hypoksian aiheuttaman terapiaresistenssin torjumiseksi on lisäksi kehitetty erilaisia estäjiä, jotka pyrkivät estämään hypoksiavälitteisiä signaalireittejä ja parantamaan syöpähoitojen tehoa. Myös suuremmat menetelmät kuten hapen määrän lisääminen kasvaimiin, solujen hapen käyttöön liittyvät muokkaukset sekä sädehoitoa tehostavat sädeherkistäjät ovat tärkeä osa hoitoresistenssiä.

Tutkimuksessa tulisi pyrkiä entistä tarkempaan hypoksiatyypien erotteluun sekä yksilölliseen hoitoon. Akuutin ja kroonisen hypoksian vaikutukset eroavat paljon toisistaan, ja niiden tarkempi ymmärtäminen voisi mahdollistaa tehokkaamman hoidon suunnittelun. Lisäksi hypoksiamarkkereiden sekä kuvantamismenetelmien kehitystyöllä on mahdollista tehostaa kasvainhypoksian diagnosointia ja sitä kautta syöpähoitojen onnistumista. Kaikkiaan syvällisempi ymmärrys hypoksian mekanismeista syövässä on tärkeää ja pitkällä aikavälillä sillä on mahdollisuus vähentää syövän aiheuttamaa kuolleisuutta.

## LÄHTEET

- Adams, G. E. (1973). Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *British Medical Bulletin*, 29(1), 48–53. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a070956>
- Alqawi, O., Wang, H. P., Espiritu, M., & Singh, G. (2007). Chronic hypoxia promotes an aggressive phenotype in rat prostate cancer cells. *Free Radical Research*, 41(7), 788–797. <https://doi.org/10.1080/10715760701361531>
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Bartoszewski, R., Moszyńska, A., Serocki, M., Cabaj, A., Polten, A., Ochocka, R., Dell'Italia, L., Bartoszewska, S., Króliczewski, J., Dąbrowski, M., & Collawn, J. F. (2019). Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(7), 7929–7941. <https://doi.org/10.1096/fj.201802650RR>
- Batchelder, R., Wilson, W., Hay, M., & Denny, W. (1996). Oxygen dependence of the cytotoxicity of the enediyne anti-tumour antibiotic esperamicin A. *British Journal of Cancer*, 74, 52–56.
- Bayer, C., & Vaupel, P. (2012). Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data concerning time frames and biological consequences. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 188(7), 616–627. <https://doi.org/10.1007/s00066-012-0085-4>
- Bouleftour, W., Rowinski, E., Louati, S., Sotton, S., Wozny, A.-S., Moreno-Acosta, P., Mery, B., Rodriguez-Lafrasse, C., & Magne, N. (2021). A Review of the Role of Hypoxia in Radiore-sistance in Cancer Therapy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 27, e934116. <https://doi.org/10.12659/MSM.934116>
- Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrc1367>



- Casillas, A. L., Toth, R. K., Sainz, A. G., Singh, N., Desai, A. A., Kraft, A. S., & Warfel, N. A. (2018). Hypoxia-Inducible PIM Kinase Expression Promotes Resistance to Antiangiogenic Agents. *Clinical Cancer Research*, *24*(1), 169–180. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1318>
- Chaplin, D. J., Olive, P. L., & Durand, R. E. (1987). Intermittent Blood Flow in a Murine Tumor: Radiobiological Effects. *Cancer Research*, *47*(2), 597–601.
- Cibull, T. L., Jones, T. D., Li, L., Eble, J. N., Ann Baldrige, L., Malott, S. R., Luo, Y., & Cheng, L. (2006). Overexpression of Pim-1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, *59*(3), 285–288. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.027672>
- Downes, N. L., Laham-Karam, N., Kaikkonen, M. U., & Ylä-Herttuala, S. (2018). Differential but Complementary HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  Transcriptional Regulation. *Molecular Therapy*, *26*(7), 1735–1745. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.004>
- Durand, R. E., & Lepard, N. E. (1995). Contribution of Transient Blood Flow to Tumour Hypoxia in Mice. *Acta Oncologica*, *34*(3), 317–323. <https://doi.org/10.3109/02841869509093982>
- Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: Similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(14), 6496–6500. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6496>
- Fleming, I. N., Manavaki, R., Blower, P. J., West, C., Williams, K. J., Harris, A. L., Domarkas, J., Lord, S., Baldry, C., & Gilbert, F. J. (2015). Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. *British Journal of Cancer*, *112*(2), 238–250. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.610>
- Flügel, D., Görlach, A., & Kietzmann, T. (2012). GSK-3 $\beta$  regulates cell growth, migration, and angiogenesis via Fbw7 and USP28-dependent degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Blood*, *119*(5), 1292–1301. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375014>
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, *285*(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>

- Gatenby, R. A., Kessler, H. B., Rosenblum, J. S., Coia, L. R., Moldofsky, P. J., Hartz, W. H., & Broder, G. J. (1988). Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, *14*(5), 831–838. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(88\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(88)90002-8)
- Govaert, K. M., Emmink, B. L., Nijkamp, M. W., Cheung, Z. J., Steller, E. J. A., Fatrai, S., De Bruijn, M. T., Kranenburg, O., & Borel Rinkes, I. H. M. (2014). Hypoxia After Liver Surgery Imposes an Aggressive Cancer Stem Cell Phenotype on Residual Tumor Cells. *Annals of Surgery*, *259*(4), 750–759. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318295c160>
- Grogan, M., Thomas, G. M., Melamed, I., Wong, F. L. W., Pearcey, R. G., Joseph, P. K., Portelance, L., Crook, J., & Jones, K. D. (1999). The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer*, *86*(8), 1528–1536. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19991015\)86:8<1528::AID-CNCR20>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19991015)86:8<1528::AID-CNCR20>3.0.CO;2-E)
- Hoefflin, R., Harlander, S., Schäfer, S., Metzger, P., Kuo, F., Schönenberger, D., Adlesic, M., Peighambari, A., Seidel, P., Chen, C.-Y., Consenza-Contreras, M., Jud, A., Lahrmann, B., Grabe, N., Heide, D., Uhl, F. M., Chan, T. A., Duyster, J., Zeiser, R., ... Frew, I. J. (2020). HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Communications*, *11*(1), 4111. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17873-3>
- Horsman, M. R., Sørensen, B. S., Busk, M., & Siemann, D. W. (2021). Therapeutic Modification of Hypoxia. *Clinical Oncology*, *33*(11), e492–e509. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.08.014>
- Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhauser, M. L., Manalis, S. R., & Vander Heiden, M. G. (2016). Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Developmental Cell*, *36*(5), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.012>
- Huang, Z., & Bao, S.-D. (2004). Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, *10*(4), 463–470. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i4.463>

- Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., & Poellinger, L. (1999). Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 $\alpha$  by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6519–6525. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6519>
- Kim, D., Khin, P. P., Lim, O. K., & Jun, H.-S. (2022). LPA/LPAR1 signaling induces PGAM1 expression via AKT/mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway and increases aerobic glycolysis, contributing to keratinocyte proliferation. *Life Sciences*, 311, 121201. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121201>
- Kim, J., Roh, M., & Abdulkadir, S. A. (2010). Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*, 10(1), 248. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-248>
- Kopecka, J., Salaroglio, I. C., Perez-Ruiz, E., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Saponara, S., De Las Rivas, J., & Riganti, C. (2021). Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy. *Drug Resistance Updates*, 59, 100787. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100787>
- Le, Q.-T., Kovacs, M. S., Dorie, M. J., Koong, A., Terris, D. J., Pinto, H. A., Goffinet, D. R., Nowels, K., Bloch, D., & Brown, J. M. (2003). Comparison of the comet assay and the oxygen microelectrode for measuring tumor oxygenation in head-and-neck cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology*, 56(2), 375–383. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)04503-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)04503-0)
- Lee, C.-G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., Park, K. R., Ferrara, N., Jain, R. K., Suit, H. D., & Boucher, Y. (2000). Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Augments Tumor Radiation Response under Normoxic or Hypoxic Conditions. *Cancer Research*, 60, 5565–5570.
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Liu, J., Qu, R., Ogura, M., Shibata, T., Harada, H., & Hiraoka, M. (2005). Real-time Imaging of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity in Tumor Xenografts. *Journal of Radiation Research*, 46(1), 93–102. <https://doi.org/10.1269/jrr.46.93>

- Liu, Q., Liu, N., Van Der Noord, V., Van Der Stel, W., Van De Water, B., Danen, E. H. J., & Le Dévédec, S. E. (2023). Differential response of luminal and basal breast cancer cells to acute and chronic hypoxia. *Breast Cancer Research and Treatment*, *198*(3), 583–596.  
<https://doi.org/10.1007/s10549-023-06863-w>
- Luo, Y., He, D., Ning, L., Shen, S.-I., Li, L., & Li, X. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer cells: *Chinese Medical Journal*, *119*(9), 713–718. <https://doi.org/10.1097/00029330-200605010-00002>
- Mellanen, P., Minn, H., Grénman, R., & Härkönen, P. (1994). Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *International Journal of Cancer*, *56*(5), 622–629.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910560503>
- Nagy, J. A., Chang, S.-H., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer*, *100*(6), 865–869.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604929>
- Nobre, A. R., Entenberg, D., Wang, Y., Condeelis, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2018). The Different Routes to Metastasis via Hypoxia-Regulated Programs. *Trends in Cell Biology*, *28*(11), 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.008>
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T.-Y., Huang, L. E., Chau, V., & Kaelin, W. G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta\beta\beta$ -domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nature Cell Biology*, *2*, 423–427.
- Overgaard, J. (2011). Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck – A systematic review and meta-analysis. *Radiotherapy and Oncology*, *100*(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.03.004>
- Paredes, F., Williams, H. C., & San Martin, A. (2021). Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Cancer Letters*, *502*, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.020>
- Perez, R. C., Kim, D., Maxwell, A. W. P., & Camacho, J. C. (2023). Functional Imaging of Hypoxia: PET and MRI. *Cancers*, *15*(13), 3336. <https://doi.org/10.3390/cancers15133336>

- Pires, I. M., Bencokova, Z., Milani, M., Folkes, L. K., Li, J.-L., Stratford, M. R., Harris, A. L., & Hammond, E. M. (2010). Effects of Acute versus Chronic Hypoxia on DNA Damage Responses and Genomic Instability. *Cancer Research*, *70*(3), 925–935.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2715>
- Qannita, R. A., Alalami, A. I., Harb, A. A., Aleidi, S. M., Taneera, J., Abu-Gharbieh, E., El-Huneidi, W., Saleh, M. A., Alzoubi, K. H., Semreen, M. H., Hudaib, M., & Bustanji, Y. (2024). Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in Cancer: Emerging Therapeutic Strategies and Pathway Regulation. *Pharmaceuticals*, *17*(2), 195. <https://doi.org/10.3390/ph17020195>
- Rademakers, S. E., Lok, J., Van Der Kogel, A. J., Bussink, J., & Kaanders, J. H. (2011). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer*, *11*(1), 167.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-167>
- Raleigh, J. A., Dewhirst, M. W., & Thrall, D. E. (1996). Measuring tumor hypoxia. *Seminars in Radiation Oncology*, *6*(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(96\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S1053-4296(96)80034-8)
- Secomb, T. W., Hsu, R., Ong, E. T., Gross, J. F., & Dewhirst, M. W. (1995). Analysis of the Effects of Oxygen Supply and Demand on Hypoxic Fraction in Tumors. *Acta Oncologica*, *34*(3), 313–316. <https://doi.org/10.3109/02841869509093981>
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes & Development*, *14*(16), 1983–1991. <https://doi.org/10.1101/gad.14.16.1983>
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (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. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(12), 5447–5454.
- Siemann, D. W. (2011). The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treatment Reviews*, *37*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.05.001>
- Suit, H. D., Marshall, N., & Woerner, D. (1972). Oxygen, oxygen plus carbon dioxide, and radiation therapy of a mouse mammary carcinoma. *Cancer*, *30*(5), 1154–1158.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197211\)30:5<1154::AID-CNCR2820300503>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197211)30:5<1154::AID-CNCR2820300503>3.0.CO;2-5)

- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H.-P., Ferrara, N., & Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1 $\alpha$  in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.026>
- Thews, O., Wolloscheck, T., Dillenburg, W., Kraus, S., Kelleher, D. K., Konerding, M. A., & Vaupel, P. (2004). Microenvironmental adaptation of experimental tumours to chronic vs acute hypoxia. *British Journal of Cancer*, 91(6), 1181–1189. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602066>
- Thomlinson, R. H., & Gray, L. H. (1955). The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 9(4), 539–549. <https://doi.org/10.1038/bjc.1955.55>
- Toth, R. K., Solomon, R., & Warfel, N. A. (2022). Stabilization of PIM Kinases in Hypoxia Is Mediated by the Deubiquitinase USP28. *Cells*, 11(6), 1006. <https://doi.org/10.3390/cells11061006>
- Vaupel, P., Höckel, M., & Mayer, A. (2007). Detection and Characterization of Tumor Hypoxia Using pO<sub>2</sub> Histography. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(8), 1221–1236. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1628>
- Walsh, J. C., Lebedev, A., Aten, E., Madsen, K., Marciano, L., & Kolb, H. C. (2014). The Clinical Importance of Assessing Tumor Hypoxia: Relationship of Tumor Hypoxia to Prognosis and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(10), 1516–1554. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5378>
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5510–5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), 4304–4308. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4304>
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>

- Warfel, N. A., Sainz, A. G., Song, J. H., & Kraft, A. S. (2016). PIM Kinase Inhibitors Kill Hypoxic Tumor Cells by Reducing Nrf2 Signaling and Increasing Reactive Oxygen Species. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(7), 1637–1647. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-1018>
- Wartenberg, M., Ling, F. C., Müschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Pütz, V., Hescheler, J., & Sauer, H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor-1 and reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, *17*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0358fje>
- Wasserman, T. H., Phillips, T. L., Van Raalte, G., Urtasun, R., Partington, J., Koziol, D., Schwade, J. G., Gangji, D., & Strong, J. M. (1980). The neurotoxicity of misonidazole: Potential modifying role of phenytoin sodium and dexamethasone. *The British Journal of Radiology*, *53*(626), 172–173. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-53-626-172>
- Wise, D. R., Ward, P. S., Shay, J. E. S., Cross, J. R., Gruber, J. J., Sachdeva, U. M., Platt, J. M., DeMatteo, R. G., Simon, M. C., & Thompson, C. B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(49), 19611–19616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117773108>
- Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T., & Imura, H. (1990). Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *170*(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)91263-R](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)91263-R)
- Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T. W., & Elledge, S. J. (2006). A Role for the Deubiquitinating Enzyme USP28 in Control of the DNA-Damage Response. *Cell*, *126*(3), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.039>
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., & Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Research*, *59*(22), 5830–5835.