

# Hipoksija u regulaciji upale i rasta tumora

---

**Marohnić, Marko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:443027>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**HIPOKSIJA U REGULACIJI UPALE I RASTA TUMORA**

**HYPOXIA IN REGULATION OF INFLAMMATION AND TUMOR GROWTH**

**SEMINARSKI RAD**

Marko Marohnić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2021.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. HIF-1 ČIMBENIK.....	4
3. HIPOKSIJA U RASTU I RAZVOJU TUMORA.....	7
3.1. Angiogeneza.....	7
3.2. Metastaziranje.....	8
3.3. Warburg efekt.....	10
4. UPALA.....	12
5. IMUNOSUPRESIJA I IZBJEGAVANJE IMUNOSNOG ODGOVORA.....	14
5.1. Molekule kontrolnih točaka (engl. <i>Checkpoint molecules</i> ) ili „ <i>Checkpoint</i> “ molekule.....	14
5.2. Imunosupresivne molekule.....	15
5.3. Predočavanje antigena.....	18
5.4. Proteini za prepoznavanje površine stanice (engl. <i>Cell surface recognition proteins</i> ).....	18
5.5. Autofagija.....	19
5.6. Egzosomi.....	19
5.7. „Fatalni kvintet“.....	19
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. LITERATURA.....	23
8. SAŽETAK.....	26
9. SUMMARY.....	27

## 1. UVOD

Tumori (ili neoplazme) su nakupine tkiva koje su nastale nekontroliranim dijeljenjem stanica. Ovisno o tome šire li se u susjedna i udaljena tkiva, tumore dijelimo na benigne i maligne. Također, tumori se međusobno znatno razlikuju veličinom i oblikom, ovisno o tome na kojem mjestu u organizmu rastu. Hanahan i Weinberg su 2000. godine kao karakteristična obilježja tumora naznačili: neprekidnu signalizaciju za dijeljenje tumorskih stanica, izbjegavanje supresora rasta, rezistenciju na apoptozu, replikacijsku besmrtnost, aktivaciju invazivnosti u druga tkiva, metastaziranje i poticanje angiogeneze. Isti autori su 2011. godine na postojeća karakteristična obilježja koja definiraju tumore nadodali i: dereguliranu staničnu energetiku, genomsku nestabilnost i mutacije, upalne procese potaknute tumorima i izbjegavanje uništenja tumorskih stanica od strane imunskog sustava (Multhoff i Vaupel, 2020). U trenutku kada tumor dosegne veličinu od 1-2 mm<sup>3</sup>, difuzija kisika iz kapilara u tumorsko tkivo postane ograničena zbog strukturalnih i funkcionalnih abnormalnosti krvnih žila koje to tkivo okružuju (Liu i sur., 2015). Krvne žile tumorskog okoliša su rastegnute i fenestrirane, karakterizira ih curenje i trom tok krvi, zbog toga je dostava kisika u tumorska tkiva prilično ograničena. Ograničene količine kisika, uz povećanu stopu trošenja kiska uslijed pretjeranog dijeljenja tumorskih stanica, dovode do neravnoteže u njegovoj dostavi i potrošnji, što konačno dovodi dijelove ili čitava tumorska tkiva u stanje hipoksije (Rankin i Giaccia, 2016). Oko 60% solidnih tumora sadrži hipoksične regije u kojima parcijalni tlak O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) iznosi manje od 10 mm, dok u tkivima s normalnim fiziološkim uvjetima iznosi ~40-65 mm. Hipoksija je najznačajnije obilježje tumorskog mikrookoliša koje doprinosi agresivnosti i širenju tumora (Balamurugan, 2015). Također, u kliničkom smislu, hipoksija je povezana s aktivacijom HIF čimbenika, metastaziranjem i otpornošću na kemoterapije i radioterapije, lošom ishodišnom prognozom pacijenata; sve navedeno ukazuje na to da je hipoksija povezana s napretkom rasta i razvoja tumora, ali i otpornošću na terapije (Rankin i Giaccia, 2016). Hipoksija posredno preko HIF-1 čimbenika regulira procese koji su zaslužni za rast, razvoj i daljnji napredak tumora, od poticanja angiogeneze kao procesa koji u konačnici opskrbljuje tumorsko tkivo hranjivim tvarima i potiče metastaziranje tumorskih stanica u udaljenija tkiva kako bi se dalje širio, preko promjene metaboličkog puta u tzv. Warburg efektu, do kontroliranja upalnih procesa i suzbijanja imunskog odgovora i ometanja djelovanja stanica imunskog sustava koje bi u protivnom obustavile rast tumora. Stanice imunskog sustava na

razne načine nadziru i djeluju u smjeru sprječavanja rasta i razvoja tumora, stoga je njihova inaktivacija i bijeg od imunosnog odgovora nužan kako bi razvoj tumora mogao napredovati (You i sur., 2021). Nekoliko je mehanizama kojima tumori ostvaruju imunosupresivni učinak, a biti će pojašnjeni u nadolazećim naslovima i podnaslovima.

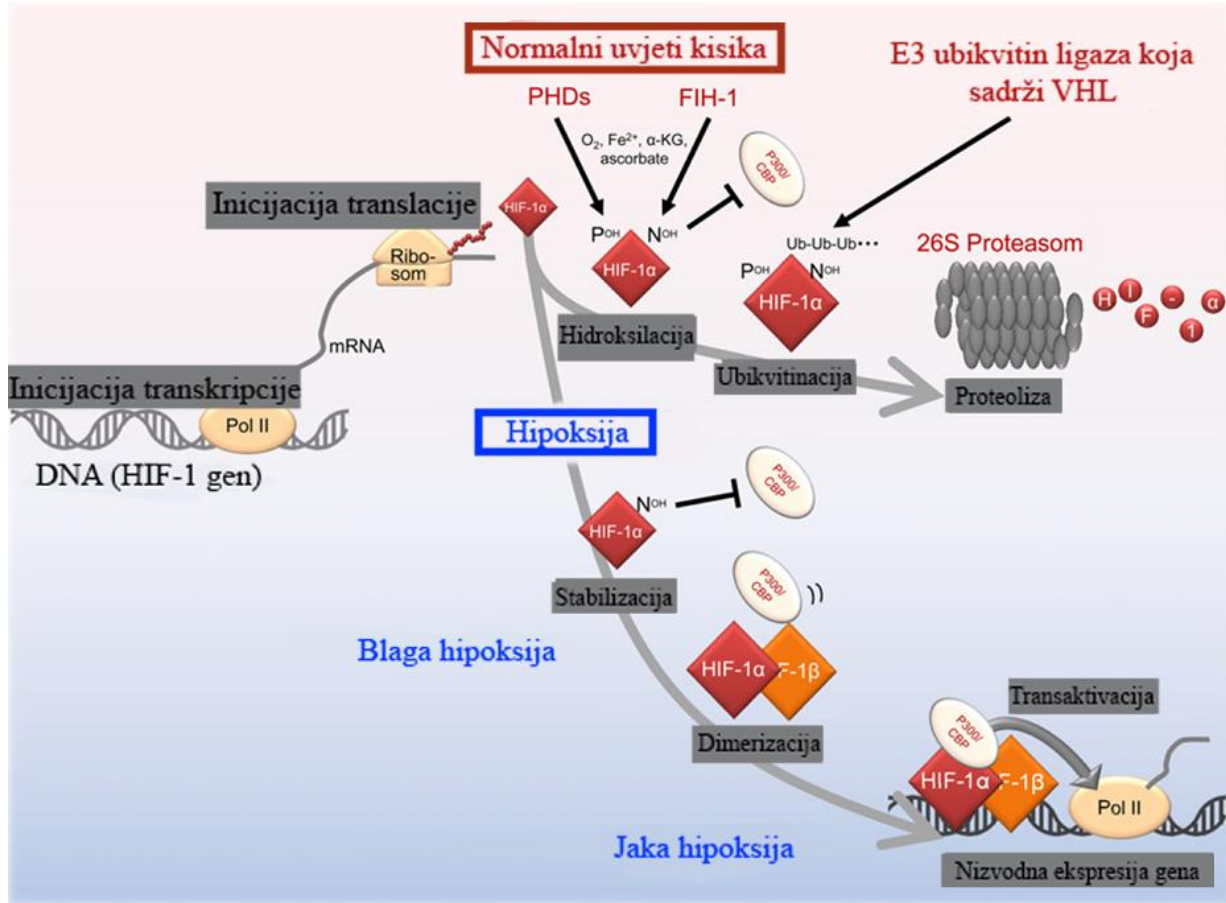
## 2. HIF-1 ČIMBENIK

Čimbenik induciran hipoksijom 1 (engl. *Hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1) je transkripcijski čimbenik koji regulira aktivaciju različitih gena koji sudjeluju u staničnom odgovoru na hipoksiju (Koyasu i sur., 2018). HIF-1 je posrednik u razvojnim i fiziološkim putevima koji osiguravaju dostavu O<sub>2</sub> ili omogućavaju stanicama da prežive nedostatak O<sub>2</sub> u hipoksičnim tkivima (Semenza, 2007). HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od dva proteina, HIF-1 $\alpha$  (120-kDa) i HIF-1 $\beta$  (90-kDa), koji moraju stupiti u međureakciju kako bi HIF-1 postao aktivan (Koyasu i sur., 2018). U fiziološkim uvjetima parcijalnog tlaka O<sub>2</sub>, HIF-1 $\alpha$  se kontinuirano sintetizira i razgrađuje, dok je HIF-1 $\beta$  konstitutivno eksprimiran (Semenza, 2007). Regulatorni mehanizmi koji imaju najveći učinak na aktivaciju HIF-1 $\alpha$  podjedinice su posttranslacijske modifikacije samog proteina povezane sa dostupnošću O<sub>2</sub>, iako postoje ostali regulatorni mehanizmi regulirani transkripcijom i translacijom, formiranjem heterodimera, translokacijom u jezgru i transaktivacijom (oni ne ovise o dostupnom O<sub>2</sub>) (Koyasu i sur., 2018).

HIF-1 $\alpha$  sadrži razgradnu domenu ovisnu o kisiku (engl. *oxygen-dependent degradation*, ODD) i dvije transaktivacijske domene, N-TAD i C-TAD. U uvjetima kada je kisik dostupan, dva prolinska ostatka u ODD domeni, Pro<sup>402</sup> i Pro<sup>564</sup>, hidroksiliraju se uz pomoć enzima prolin hidroksilazne domene (engl. *prolyl hydroxylase domain proteins*, PHDs) (Liu i sur., 2015). PHD proteini su dioksigenaze koje kao supstrat koriste O<sub>2</sub> i  $\alpha$ -ketoglutarat, pri čemu kao nusprodukt proizvode CO<sub>2</sub> i sukcinat. U uvjetima hipoksije, funkcija PHD proteina inhibirana je nedostatkom supstrata i inhibicijom katalitičkog centra (Semenza, 2007). Hidroksilacija navedenih prolinskih ostataka je nužna u normalnim uvjetima kisika kako bi HIF-1 $\alpha$  mogao stupiti u međureakciju s von Hippel-Lindau proteinom (VHL). VHL je podjedinica za prepoznavanje na enzimu E3 ubikvitin ligazi, enzimu koji dodaje poliubikvitinski lanac na HIF-1 $\alpha$  podjedinicu i na taj način ju označava za razgradnju proteasomima (Slika 1.) (Liu i sur., 2015). Uz hidroksilaciju prolinskih ostataka, čimbenik inhibicije HIF-1 (engl. *factor inhibiting HIF-1*, FIH), koji je također jedan od  $\alpha$ -ketoglutarat ovisnih dioksigenaza, provodi hidroksilaciju asparaginskog ostatka Asn<sup>803</sup> i na taj način onemogućava međureakciju HIF-1 $\alpha$  s njegovim koaktivatorima, p300 i proteinom koji veže CREB (engl. *CREB binding protein*, CBP) (Semenza, 2007). U hipoksičnim uvjetima dolazi do inhibicije hidroksilacije prolinskih i asparaginskih ostataka što dovodi do stabilizacije HIF-1 $\alpha$  podjedinice i povećane međureakcije s njenim koaktivatorima (Liu i sur., 2015).

Inhibicija razgradnje HIF-1 $\alpha$  podjedinice dovodi do njenog nakupljanja i translokacije iz citosola u jezgru preko međureakcije s mikrotubulima (Koyasu i sur., 2018). Jednom kada je u jezgri, HIF-1 $\alpha$  podjedinica stupa u međureakciju s HIF-1 $\beta$  podjedinicom pri čemu formiraju heterodimer HIF-1. HIF-1 veže se na konsenzus sekvencu 5'-RCGTG-3' unutar regije elementa hipoksijskog odgovora (engl. *Hypoxia response element*, HRE) koja se nalazi unutar promotora HIF-1 reguliranog gena i time potiče njegovu transkripciju (Liu i sur., 2015). Na ovaj način HIF-1 sudjeluje u aktivaciji mnogih gena koji služe kao odgovor na hipoksiju i u poticanju rasta i razvoja tumora.

S obzirom na važnost i uključenost HIF-1 čimbenika u kontrolu i aktivaciju gena zaslužnih za odgovor na hipoksiju i rast i razvoj tumora (geni aktivni u angiogenezi, metastaziranju, izbjegavanju imunskog odgovora), ciljanje inhibicije HIF-1 je poželjno u pronalasku novih lijekova u liječenju tumora. Iako službeno u kliničkoj upotrebi ne postoje inhibitori HIF-1, poznate su određene molekule koje mogu poslužiti kao potencijalni HIF-1 inhibitori (Bhattarai i sur., 2018). Npr. GN26361 je inhibitor baziran na elementu boru i u istraživanjima koja su provedena na njemu pokazao je da inhibira nakupljanje HIF-1 $\alpha$  podjedinice supresijom ekspresije VEGF mRNA bez direktnog utjecaja na ekspresiju HIF-1 $\alpha$  mRNA (Bhattarai i sur., 2018).



**Slika 1.** Shematski prikaz regulatornog mehanizma aktivnosti HIF-1 $\alpha$  podjedinice ovisnog o kisiku i aktivnosti dioksigenaza. HIF-1 $\alpha$ , čimbenik induciran hipoksijom 1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) (Preuzeto i prilagođeno prema Koyasu i sur., 2018)



### 3. HIPOKSIJA U RASTU I RAZVOJU TUMORA

#### 3.1. Angiogeneza

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila (kapilara) tijekom rasta tumora, potaknuta je lokaliziranom hipoksijom unutar tumorskog tkiva, s konačnim ciljem dovođenja kisika i hranjivih tvari rastućem tumorskom tkivu. S obzirom na to da igra ulogu u opskrbi tumorskog tkiva hranjivim tvarima i odvođenju produkata katabolizma, angiogeneza je ograničavajući proces stope rasta tumora (Ferrara, 2009). Hipoksija pokreće proces angiogeneze stabilizacijom transkripcijskih čimbenika HIF-1 i HIF-2 (engl. *hypoxia-inducible factor-1* i *hypoxia-inducible factor-2*) i njihovim vezanjem za gene aktivne u angiogenezi (Befani i Liakos, 2018). Navedeni čimbenici naziru dostupnu količinu kisika potrebnog za stanično disanje i ostale biokemijske procese unutar eukariotske stanice i u skladu s njegovom dostupnošću reguliraju transkripciju gena uključenih u prilagodbu organizma na hipoksične uvjete, pa tako i gena aktivnih u angiogenezi (Befani i Liakos, 2018).

Postoje dva različita mehanizma angiogeneze kojima nastaju nove krvne žile (kapilare), neključajuća (engl. *Nonsprouting*) i ključajuća (engl. *Sprouting*) angiogeneza, od kojih je ključajuća angiogeneza osnovni mehanizam nastanka novih kapilara (Carmeliet, 2003). U neključajućoj angiogenezi nove kapilare nastaju cijepanjem starih na način da se stijenka kapilara pruži u vlastiti lumen i podijeli se na više novih kapilara (Carmeliet i Jain, 2011). Ključajuća angiogeneza uključuje nastanak novih izdanaka kapilara sastavljenih od endotelnih stanica koje rastu prema angiogenom podražaju (Befani i Liakos, 2018).

Kao odgovor na hipoksiju tumorske stanice krenu otpuštati angiogene čimbenike rasta, od kojih je čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) ključan za proces angiogeneze. VEGF je mitogen vaskularnih endotelnih stanica, tj. potiče stanice tog tipa na mitozu (Ferrara, 1999). Vezanjem HIF-1-a na sekvencu od 28 baza unutar promotorske regije VEGF gena dolazi do njegove ekspresije (Ferrara, 1999). VEGF se veže na dvije vrste tirozin kinaznih receptora, VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR/Flk-1) koji se nalaze na endotelnim stanicama (Ferrara, 2009). VEGF povećava vaskularnu permeabilnost i na taj način potiče izlazak proteina plazme (fibrinogen i fibronektin) u vanstanični matriks, time se vanstanični matriks

remodelira i omogućava se migracija endotelnih stanica (Befani i Liakos, 2018).

U stvaranju izdanaka tijekom klijuće angiogeneze sudjeluju dvije vrste endotelnih stanica, vršne stanice (engl. *Tip cells*) i stanice snopa (engl. *Stalk cells*) (Befani i Liakos, 2018). Vodeća, vršna stanica posjeduje filopodije koji joj omogućavaju migraciju niz VEGF gradijent, nju prate stanice snopa koje se dijele (vezanjem VEGF-a za VEGFR-1/2 receptore) i izdužuju, stvarajući lumen nove kapilare (Befani i Liakos, 2018).

Zbog toga što je angiogeneza proces koji pospešuje i ubrzava rast tumora zanimljiva je u istraživanjima koja se bave pronalaženjem novih terapijskih metoda za liječenje tumora. Jedno od takvih istraživanja proveli su He i sur. 2016. godine na galnoj kiselini i njenom učinku na rast tumora. Jedan od zaključaka istraživanja je to da galna kiselina inhibira rast tumorskih stanica obustavom angiogeneze. Galna kiselina sprječava fosforilaciju AKT-a, onkogeni zaduženog za ekspresiju HIF-1 $\alpha$  koji je sastavni dio HIF-1, transkripcijskog čimbenika VEGF gena. Dakle do obustave angiogeneze konačno dolazi zbog odsutnosti ključnog čimbenika angiogeneze, VEGF-a, stoga bi se istraživanja vezana za inhibiciju VEGF-a i njenih učinaka trebala provoditi dalje.

### 3.2. Metastaziranje

Metastaziranje je također jedan od procesa koje hipoksija potiče, a značajan je za rast i daljnji razvoj, širenje i napredak tumora u druge dijelove organizma. U suštini to je proces odvajanja tumorskih stanica od izvornog tkiva i migracija odvojenih stanica u strana, udaljenija tkiva kako bi se tumor proširio. Kao i u ostalim procesima reguliranim hipoksijom, aktivnost gena koji sudjeluju u metastaziranju tumora regulirana je HIF čimbenicima (Rankin i Giaccia, 2016). Sintezom i stabilizacijom HIF-1 $\alpha$  uslijed hipoksije dolazi do inicijacije procesa metastaziranja.

Jedan od najvažnijih koraka u metastaziranju je proces preobrazbe epitela u mezenhim (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), proces koji je direktno i indirektno reguliran HIF čimbenikom. HIF-1 čimbenik potiče EMT transkripcijskom kontrolom E-kadherina, SNAIL-a, ZEB-1-a, TWIST-a i TCF3-a (Liu i sur., 2015). SNAIL je transkripcijski čimbenik s motivom cinkovog prsta (engl. *zinc-finger protein*), transkripcijski represor koji sa svojom SNAG domenom na N-terminalnom kraju stupa u međureakciju s određenim korepresorima i kompleksima za

epigenetičko remodeliranje koji ciljano i represivno djeluju na određene gene, između ostalog na gen za E-kadherin (CDH1) (Wang i sur., 2013). EMT karakteriziraju promjene u morfologiji stanica, ali i gubitak adhezije među tumorskim stanicama uslijed nedostatka E-kadherina što dovodi do njihovog međusobnog odvajanja. Na taj način odvojene tumorske stanice putuju prema kardiovaskularnom ili limfatičkom sustavu kojim će migrirati u druga tkiva (Rankin i Giaccia, 2016).

Kako bi tumorske stanice invadirale u okolna tkiva potrebno je prvo razgraditi okolnu bazalnu membranu (engl. *basement membrane*, BM) i prepreke u vanstaničnom matriksu (Liu i sur., 2015). U tom procesu razgradnje značajne su metalne proteaze matriksa (engl. *matrix-metalloproteinases*, MMPs). MMP-2 i MMP-9 razgrađuju tip IV kolagena koji je sastavni dio BM, ekspresiju gena i aktivnost samih enzima potiče HIF-1 čimbenik (Liu i sur., 2015). Ekstravazacija tumorskih stanica iz optjecajnog sustava u tkiva gdje tumorske stanice mogu preživjeti ograničavajući je korak u metastaziranju. Ako je riječ na primjer o metastaziranju tumorskih stanica iz dojke u pluća, kako bi ekstravazirale, tumorske stanice prvo moraju prionuti na endotelne stanice krvnih kapilara u plućima u procesu koji se naziva marginacija (Liu i sur., 2015). Pod utjecajem HIF-1 čimbenika, tumorske stanice kreću lučiti angiopietinu sličan čimbenik 4 (engl. *Angiopoietin-like 4*, ANGPTL4), čija je funkcija raskidanje spojeva među endotelnim stanicama, što je nužno kako bi tumorske stanice napustile kapilaru nakon. Raskidanje veza među endotelnim stanicama dovodi do povećane permeabilnosti plućnih kapilara, pa tako i olakšane ekstravazacije tumorskih stanica iz njih (Liu i sur., 2015).

Kako bi izvorne tumorske stanice mogle opstati i umnožiti se u stranom tkivu, kako bi mogle formirati sekundarne tumore, potrebna je uspostava premetastatske niše. Sama uspostava premetastatske niše nužna je za ekstravazaciju tumorskih stanica iz krvnih žila u ciljanom tkivu (Rankin i Giaccia, 2016). Utjecajem HIF-1 čimbenika u primarnom tumorskom tkivu dolazi do lučenja lizil oksidaze (engl. *Lysyl oxidase*, LOX) i lizil oksidazi sličnih proteina (LOXL2 i LOXL4), ovi proteini optjecajnim sustavom stižu u udaljena tkiva u kojima uzrokuju umrežavanje vlakana kolagena. Umrežavanje vlakana kolagena potiče regrutaciju stanica porijeklom iz koštane srži (engl. *bone marrow-derived cells*, BMDCs) (Liu i sur., 2015). Mijeloidne stanice CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>med</sup>/Ly6G<sup>+</sup> i NK stanice ubojice CD3<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup> su dvije linije BMDC stanica koje potiču metastaziranje (Liu i sur., 2015). BMDC stanice, poput ovih dviju linija, potiču

metastaziranje proizvodnjom kemokina (engl. *chemokines*), koji stimuliraju ekstravazaciju tumorskih stanica (Rankin i Giaccia, 2016).

Kako bi kolonizacija tumorskih stanica u udaljenom tkivu bila uspješna potrebna je prilagodba na mikrokoliš tog tkiva. Određene tumorske stanice s ciljem prilagodbe reprogramiraju svoj metabolički put. Jedan takav primjer su stanice tumora dojke koje invadiraju jetru, organ u čijem tkivu prevladava glikolitički metabolički put. Piruvat dehidrogenaza kinaza 1 (engl. *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*, PDK1), čiji se gen za ekspresiju aktivira ciljano HIF-1 čimbenikom, zaslužna je za metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica dospjelih iz dojki u jetru. PDK1 utišava funkciju mitohondrija na način da antagonizira funkciju piruvat dehidrogenaze (engl. *Pyruvate dehydrogenase*, PDH) (Rankin i Giaccia, 2016).

### 3.3. Warburg efekt

Uslijed hipoksije, zbog nedostatka terminalnog akceptora elektrona u procesu staničnog disanja (kisika), tumorske stanice primorane su promijeniti svoj metabolički put glukoze na manje učinkovit glikolitički put (Masoud i Li, 2015). U toj promjeni glavni posrednik je HIF-1 čimbenik koji potiče ekspresiju izoformi glikolitičkih enzima koje su nužne za ostvarenje Warburg efekta, izoformi koje u protivnom ne bi bile aktivne u normalnim fiziološkim uvjetima. Primjer toga je ekspresija M2 izoforme piruvat kinaze (PKM2) umjesto uobičajene M1 izoforme (PKM1), zbog toga što je M2 ta koja stupa u međureakciju s HIF-1 čimbenikom (Balamurugan, 2015).

Glikolitički put glukoze je brži (10-100 puta) od puta oksidativne fosforilacije, ali daje značajno manji prinos energije u obliku ATP-a, stoga tumorske stanice za to kompenziraju na način da unose i troše više glukoze (Liberti i Locasale, 2016). Povećan unos glukoze moguć je zbog prekomjerne ekspresije transportera glukoze, GLUT1 i GLUT3, pod utjecajem HIF-1 čimbenika (Balamurugan, 2015).

Uočljiva posljedica prijelaza na ovakav način metabolizma je zakiseljavanje, tj. acidoza tumorskog mikrokoliša uslijed aktivnog izbacivanja laktata i H<sup>+</sup> iona iz tumorskih stanica pomoću pH-regulirajućih proteina poput MCT1, MCT4 i Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmjenjivača 1 (NHE1) (Balamurugan, 2015). Acidozu potiče hipoksija posredno preko HIF-1 čimbenika koji potiče ekspresiju gena navedenih proteina zaduženih za transport laktata i H<sup>+</sup> iona. Nakon što se puferski

kapacitet unutarstaničnih proteina istroši, NHE1 transportira višak slobodnih  $H^+$  iona u vanstanični prostor, dok MCT1 i MCT4 tumorsku stanicu oslobađaju viška laktata (Balamurugan, 2015). Zakiseljavanje tumorskog okoliša igra ulogu u odgovoru na upalne procese i imunosupresiji.

S obzirom na to da tumorske stanice ekstenzivno koriste glikolitički put u metabolizmu glukoze, inhibicija glikolize mogla bi poslužiti u terapijske svrhe kao metoda preferencijalnog ubijanja tumorskih stanica (Chen i sur., 2007). Glikolitička inhibicija u terapijske svrhe mogla bi se izvršiti na nekoliko razina, s obzirom na to da glikolitički put uključuje brojne enzime i enzimatske komplekse koji sudjeluju u pretvorbi glukoze u laktat. Na primjer, heksokinaza koja prevodi glukozu u glukozu-6-fosfat postoji u četiri različite izoforme (I-IV) (Chen i sur., 2007). Heksokinaza II prekomjerno je izražena i zastupljena izoforma u različitim tumorskim stanicama, zbog toga što HIF-1 i mutanta p53 potiču njenu ekspresiju. Inhibicijom ove izoforme heksokinaze može se obustaviti glikoliza u tumorskim stanicama što u konačnici može dovesti do smrti tumorske stanice. Neki od poznatih inhibitora ovog enzima su 2-deoksiglukoz, 3-brompiruvat, 5-tioglukoz i manoheptuloza (Chen i sur., 2007).

## 4. UPALA

Upala je fiziološki proces koji služi kao odgovor na oštećenja tkiva uzrokovana infekcijom određenim patogenom, kemijskom iritacijom ili ranjavanjem (Lu i sur., 2006). Napretkom upale različiti tipovi leukocita, limfocita i upalnih stanica kreću se prema mjestu gdje se ona nalazi. Na mjesto upale usmjeravaju ih signalni putevi koji uključuju različit broj čimbenika rasta, citokina i kemokina (Lu i sur., 2006). Zadaća stanica koje stignu na mjesto upale je poticanje apoptoze, provođenje fagocitoze oštećenog tkiva i borba protiv infekcije (npr. bakterijske). S obzirom na to da makrofazi izlučuju velike količine čimbenika rasta, citokina, reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koji mogu uzrokovati oštećenja DNA molekula, uzastopna aktivacija i mobilizacija makrofaga može dovesti do trajnih oštećenja tkiva koja mogu prijeći u kroničan oblik upale (Lu i sur., 2006). Kronične upale potencijalno mogu potaknuti pojavu i razvoj tumora, npr. kronična upala probavnog sustava bakterijom *Helicobacter pylori* može dovesti do pojave adenokarcinoma tj. tumora koji se počinju razvijati u egzokrinim žlijezdama za izlučivanje (Lu i sur., 2006).

Određene imunosne stanice mogu djelovati pozitivno na rast i razvoj tumora koji su povezani s upalnim procesima, takvi tumori luče citokine i kemokine koji privlače stanice poput makrofaga povezanih s tumorima (engl. *Tumor-associated macrophages*, TAMs; ili M2 makrofazi). M2 makrofazi potiču razvoj tumora kroz nekoliko mehanizama, npr. lučenjem interleukina 10 (engl. *Interleukin 10*, IL-10) i prostaglandina E<sub>2</sub> koji suzbijaju antitumorski imunosni odgovor (Lu i sur., 2006). Isto tako M2 makrofazi potiču razvoj tumora oslobađanjem angiogenih čimbenika, poput mitogena VEGF-a (Lu i sur., 2006).

Ono što povezuje upalne procese s hipoksijom je jezgri čimbenik kapa B (engl. *nuclear factor-kappa B*, NF-κB) koji kao odgovor na upalu (lučenje citokina) disocira od sebe inhibirajuće IκB proteine (kada su zajedno u kompleksu NF-κB-IκB, NF-κB je inaktivan) i translocira se u jezgru. Jednom kada je u jezgri, kao transkripcijski čimbenik, NF-κB veže se za promotore gena koji potiču razvoj tumora i zajedno s HIF-1 čimbenikom koordinira njihovu aktivaciju. Neki od tih gena su: geni za interleukin-6 (engl. *Interleukin 6*, IL-6), ciklooksigenazu 2 (engl. *Cyclooxygenase-2*, COX-2), inducibilnu sintazu dušikovog monoksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, NOS2), molekulu adhezije pločastih stanica endotela 1 (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1) i metaloproteazu matriksa 9 (engl. *matrix metalloproteinase*

9, MMP-9) (Balamurugan, 2015).

Uz NF- $\kappa$ B, pretvornik signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) također zajedno s HIF-1 čimbenikom sudjeluje u upalnoj signalizaciji povezanoj s tumorima (Balamurugan, 2015). Nakon aktivacije fosforilacijom uz Janus kinaze (engl. *Janus kinases*, JAKs), STAT3 se translocira u jezgru i aktivira transkripciju gena zaslužnih za preživljavanje (npr. *survivin mcl-1*), dijeljenje tumorskih stanica (npr. *cyclin D1*), invaziju (MMP2) i angiogenezu (VEGF) (Balamurugan, 2015). U regulaciji navedenih gena STAT3 djeluje zajedno s HIF-1 i NF- $\kappa$ B, i uz to STAT3 fizički stupa u međureakciju s HIF-1 čimbenikom, što je nužno za aktivaciju određenih gena (Balamurugan, 2015).

## 5. IMUNOSUPRESIJA I IZBJEGAVANJE IMUNOSNOG ODGOVORA

### 5.1. Molekule kontrolnih točaka (engl. *Checkpoint molecules*) ili „*Checkpoint*“ molekule

Molekule kontrolnih točaka (engl. *Checkpoint molecules*) su inhibirajuće, regulatorne molekule imunskog sustava. Aktivacijom ovih molekula dolazi do inhibicije djelovanja stanica imunskog sustava i samim time do njihove nemogućnosti da daju antitumorski odgovor (You i sur., 2021).

Jedna od takvih molekula je ligand programirane smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*, PD-L1) čiju ekspresiju potiče HIF-1 $\alpha$  direktnim vezanjem na element hipoksijskog odgovora 4 (engl. *Hypoxia response element 4*, HRE4) na PD-L1 promotoru. PD-L1, koji se nalazi na površini tumorskih stanica, stupa u međureakciju sa svojim receptorom programirane smrti 1 (engl. *programmed death-1*, PD-1) koji se nalazi na stanicama imunskog sustava (You i sur., 2021). Vezanjem PD-L1 na PD-1 dolazi do inaktivacije stanica T, ali inhibicijom PD-L1 u hipoksičnim uvjetima ne dolazi do potpunog povratka funkcije stanica T, što znači da druge molekule, uz PD-L1, sudjeluju u imunosupresivnim procesima koji tumorskim stanicama omogućavaju bijeg od odgovora imunskog sustava (You i sur., 2021).

HLA-G je također jedna od „*checkpoint*“ molekula, njenu ekspresiju također potiče HIF-1 čimbenik vezanjem na HLA-G HRE. HLA-G se veže na transkript nalik imunoglobulinu 2 (engl. *Immunoglobulin-like transcript 2*, ILT2) koji se nalazi na stanicama imunskog sustava, a njegovim vezanjem inhibira se citotoksičnost limfocita T i učinak NK stanica ubojica promjenom načina sekrecije citokina (You i sur., 2021).

CD137 se nalazi na stanicama T i u međureakciji sa svojim ligandom, CD137L-om, potiče aktivnost dentritičnih stanica, stanica B i makrofaga da prepoznaju i unište tumorske stanice. HIF-1 $\alpha$  potiče ekspresiju gena topivog oblika CD137 (engl. *soluble CD137*, sCD137), a vezanjem CD137L na sCD137 onemogućava se međureakcija između CD137 i CD137L i time se omogućava bijeg tumorskih stanica od imunskog odgovora (You i sur., 2021).



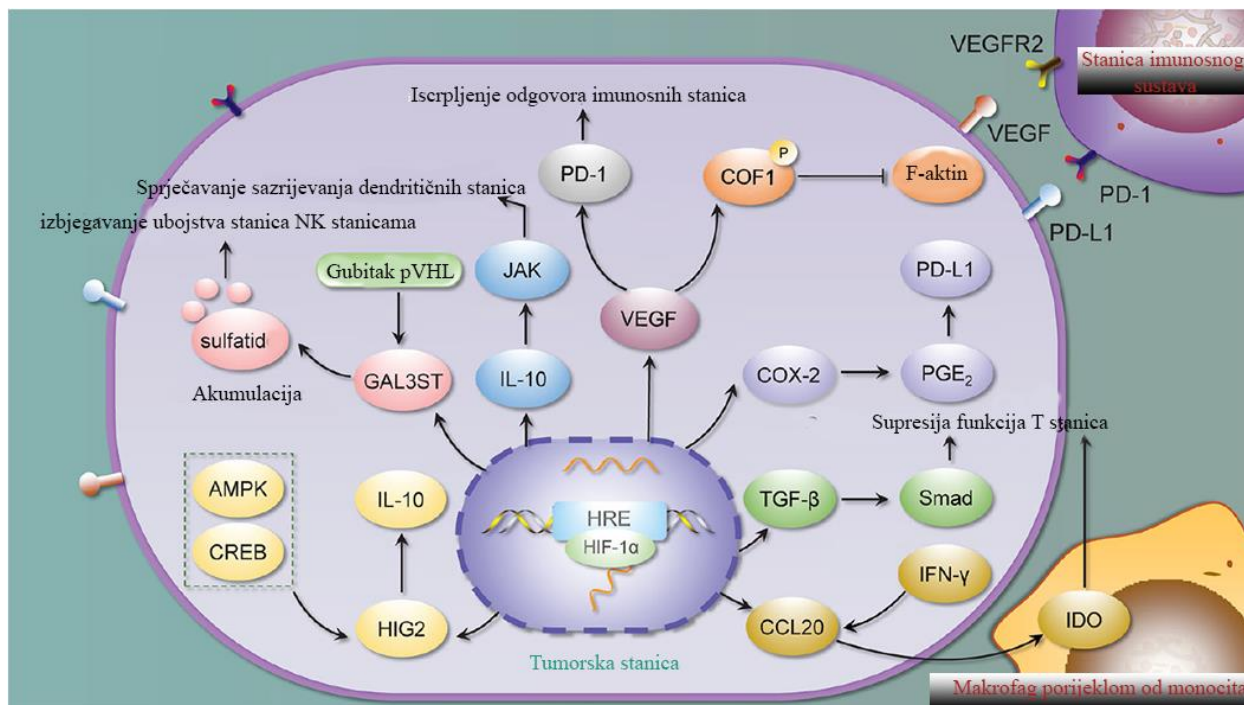
## 5.2. Imunosupresivne molekule

Usljed hipoksije, HIF-1 $\alpha$  potiče otpuštanje nekoliko vrsta imunosupresivnih molekula čijim se djelovanjem obustavlja funkcija imunskog sustava i omogućava se rast i daljnji razvoj tumora. Jedna od takvih imunosupresivnih molekula koje se luče pod utjecajem HIF-1 $\alpha$  je i VEGF, mitogen ključan u angiogenezi, procesu u kojem nastaju novi ogranci kapilara radi bolje opskrbe tumorskog tkiva kisikom i hranjivim tvarima (proces angiogeneze opisan je ranije u potpoglavlju 3.1). Uz ulogu koju vrši u angiogenezi, VEGF stupa u međureakciju s VEGFR2 receptorom koji se nalazi na membranama dendritičnih stanica, čime potiče ekspresiju gena za kofilin 1 (engl. *Cofilin-1*, COF1). COF1 se veže na filamentarni aktin i depolimerizira ga, što zauzvrat negativno utječe na pokretnost i diferencijaciju dendritičnih stanica, a samim time i na njihovu funkciju predočavanja antigena stanicama T. Također, VEGF/VEGFR2 međureakcija potiče ekspresiju „*checkpoint*“ molekule PD-L1 u citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T stanicama (You i sur., 2021). U konačnici, zbog utjecaja koji VEGF ima na povećanu ekspresiju COF1 i PD-L1, dolazi do smanjene funkcije dendritičnih i T stanica, odnosno suzbijanja imunskog odgovora.

Tumorske stanice luče interleukin-10 (IL-10) i čimbenik rasta i preobrazbe  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) u vlastiti mikrookoliš. Njihovu transkripciju potiče HIF-1 $\alpha$  vezanjem na odgovarajuće HRE regije unutar promotora odgovarajućih gena (You i sur., 2021). IL-10 je protuupalni (engl. *Antiinflammatory*) citokin koji svojom aktivnošću regulira upalne procese i održava homeostazu tkiva kako se ne bi oštetila prejakim upalnim odgovorom na određenu vrstu infekcije ili autoimune bolesti (Iyer i Cheng, 2012). IL-10 djeluje na način da obustavlja proizvodnju citokina koji potiču upalu (engl. *pro-inflammatory cytokines*) i samim time odgađa odgovor imunskog sustava na određenu bolest, pa tako i razvoj tumora (Iyer i Cheng, 2012). TGF- $\beta$  je citokin koji ima ulogu u obustavi dijeljenja određenih vrsta stanica, poticanju stvaranja vanstaničnog matriksa i u kontekstu tumora najvažniju ulogu u imunosupresiji (Pasche, 2001). Promjene u signalnom putu TGF- $\beta$  uzrokovane rastom tumora doprinose njegovom razvoju i rastu, ali i izbjegavanju imunskog odgovora (Pasche, 2001). IL-10 i TGF- $\beta$  stupaju u međureakciju s odgovarajućim receptorima na površini dendritičnih stanica čime se aktiviraju određeni signalni putevi i obustavlja se proizvodnja CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T stanica (You i sur., 2021).

HIF-1 veže se na promotor COX-2 u HRE3 regiji, čime potiče ekspresiju COX-2 i proizvodnju prostaglandina E<sub>2</sub> (engl. *Prostaglandin E<sub>2</sub>*, PGE<sub>2</sub>). COX-2 je enzim koji uz

mikrosomalnu PGE<sub>2</sub> sintazu 1 sudjeluje u sintezi PGE<sub>2</sub>, ali uz to ova dva enzima potiču ekspresiju gena za PD-L1 (You i sur., 2021). 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza (engl. *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*) je enzim koji sudjeluje u razgradnji PGE<sub>2</sub> i uz to smanjuje ekspresiju gena za PD-L1 (You i sur., 2021). PGE<sub>2</sub> između ostalog suzbija sazrijevanje dendritičnih stanica koje su zaslužne za pokretanje stečenog imunskog odgovora i predočavanje antigena imunskom sustavu.



**Slika 2.** Shematski prikaz regulatornih mehanizama imunosupresivnih molekula i ciljanih gena potaknutih HIF-1 čimbenikom. VEGF stupa u međureakciju s VEGFR2 i potiče stvaranje COF1 i PD-1. Fosforilacija COF1 dovodi do disfunkcije F-aktina što zauzvrat negativno utječe na imunostnu funkciju dendritičnih stanica. HIF-1 $\alpha$  potiče transkripciju IL-10 i TGF- $\beta$  što potiče JAK signalizaciju. HIF-1 potiče ekspresiju COX-2 i stvaranje PGE<sub>2</sub>. Izlučeni PGE<sub>2</sub> aktivira ekspresiju PD-L1 i suzbija sazrijevanje dendritičnih stanica.

Kratice: HIF-1, čimbenik induciran hipoksijom 1 (engl. *Hypoxia-inducible factor 1*); VEGF, čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular endothelial growth factor*); VEGFR2, receptor čimbenika rasta vaskularnog endotela 2 (engl. *Vascular endothelial growth factor receptor*); COF1, kofilin 1 (engl. *Cofilin-1*); PD-1, receptor programirane smrti 1 (engl. *Programmed death-1*); HIF-1 $\alpha$ , čimbenik induciran hipoksijom 1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ); IL-10, interleukin 10 (engl. *Interleukin 10*); TGF- $\beta$ , čimbenik rasta i preobrazbe  $\beta$  (engl. *Transforming growth factor  $\beta$* ); JAK, Janus kinaze (engl. *Janus kinases*); COX-2, ciklooksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase-2*); PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> (engl. *Prostaglandin E<sub>2</sub>*); PD-L1, ligand programirane smrti 1 (engl. *Programmed death-ligand 1*) (Preuzeto i prilagođeno prema You i sur., 2021)

### 5.3. Predočavanje antigena

Molekule 1. razreda lančano povezanog, glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *Major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related*, MIC) igraju važnu ulogu u predočavanju antigena. U međureakciji s članom D skupine 2 prirodnih ubojica (engl. *Natural killer group 2 member D*, NKG2D), receptorom na NK stanicama, MIC molekule aktiviraju NK i T stanice (You i sur., 2021). Hipoksija posredno preko HIF čimbenika smanjuje ekspresiju MIC molekula i samim time tumoru omogućava bijeg od imunskog sustava zbog nemogućnosti raspoznavanja antigena koji se nalaze na površini tumorskih stanica (You i sur., 2021). Uz to što smanjuje ekspresiju MIC molekula, HIF-1 $\alpha$  također uzrokuje i odbacivanje MIC molekula s površine tumorskih stanica što je nužno za djelovanje A dizintegrina i metaloproteaza 10 (engl. *A disintegrin and metalloproteinase 10*, ADAM10) (You i sur., 2021). Iako HIF-1 $\alpha$  oslabljuje ekspresiju membranske MICA (engl. *Membrane MICA*, mMICA), pojačava ekspresiju topljive MICA (engl. *Soluble MICA*, sMICA), molekule koja stupanjem u međureakciju s NKG2D potiče njegovu razgradnju, pa samim time ima i negativan utjecaj na funkciju NK stanica koje bez NKG2D receptora ne mogu raspoznavati antigene i djelovati na način na koji bi trebale. Funkcija ADAM10-a kao transmembranske metaloproteaze je pretvorba mMICA u sMICA i djelovanje u smjeru izbjegavanja imunskog odgovora. Nedostatak ovog istraživanja, što su naveli i sami autori (You i sur., 2021), je izostanak *in vivo* modela kojim bi dobiveni rezultati i zaključci bili potpuniji.

### 5.4. Proteini za prepoznavanje površine stanice (engl. *Cell surface recognition proteins*)

CD47 je protein koji se nalazi na samoj površini tumorskih stanica, omogućava bijeg tumorima od urođenog imunskog sustava, a njegovu ekspresiju potiče HIF-1 (You i sur., 2021). CD47 stupa u međureakciju s makrofazima preko svog receptora, signalnog regulatornog proteina  $\alpha$  (engl. *signal regulatory protein  $\alpha$* , SIRP $\alpha$ ), koji se nalazi na njihovoj površini i na taj način sprječava fagocitozu tumorskih stanica (You i sur., 2021).

CD39 i CD73 su proteini čiju ekspresiju na supresorskim stanicama porijeklom od mijeloidnih stanica (engl. *Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) potiče HIF-1 čimbenik. CD39 pretvara vanstanični ATP u AMP, a CD73 pretvara AMP u vanstanični adenzin koji

naposljetku negativno utječe na funkciju antitumorske imunosti od strane NK i stanica T (You i sur., 2021).

## 5.5. Autofagija

Autofagija je proces u kojem se stanični sadržaj, proteini i organeli, razgrađuju uz pomoć lizosoma. Tijekom razvoja tumora autofagija služi kao mehanizam za preživljavanje koji je potaknut različitim stresorima, između ostalog i hipoksijom (You i sur., 2021). Autofagija je u tumorima pokrenuta pomoću proteina 3 od 19 kDa koji stupa u međureakciju s adenovirusima E1B (engl. *adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3*, BNIP3) koji je pod direktnom transkripcijskom kontrolom HIF-1 čimbenika. U hipoksičnom mikrookolišu aktivacija autofagije doprinosi izbjegavanju urođenog imunskog sustava na način da se smanjuje količina izlučenog granzima B od strane NK stanica, proteaze koja potiče apoptozu ciljanih stanica, između ostalog i tumorskih.

## 5.6. Egzosomi

Egzosomi su nanovezikule koje pupaju u unutarstanični prostor i u sebi prenose različite vrste bioloških molekula, poput mRNA, miRNA i lipida. U hipoksičnom okolišu tumora potiču rast i razvoj tumora, angiogenezu, imunosupresiju i metastaziranje stimulirajući molekule za predočavanje antigena i prenošenjem površinskih receptora do stanica (You i sur., 2021).

## 5.7. „Fatalni kvintet“

Tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME) karakteriziran je hipoksijom koju prate acidoza vanstaničnog prostora, povišena koncentracije laktata i adenzina i nedostatak hranjivih tvari (Vaupel i Multhoff, 2018). Navedeni čimbenici, uz povećanu ekspresiju VEGF-a i VEGFR-a i premještanje fosfatidilserina na vanjsku stranu fosfolipidnog dvosloja membrane tumorskih stanica i egzosoma, igraju ulogu u imunosupresiji i suzbijanju antitumorskog imunskog odgovora. Na taj način ovih pet čimbenika potiče rast i daljnji razvoj tumora, i upravo iz tog razloga nazivaju se „fatalnim kvintetom“.

Uslijed hipoksije, adenzin (engl. *Adenosine*, ADO), koji je metabolit ATP-a nakuplja se u vanstaničnom prostoru tumora. Tumorske stanice otpuštaju ATP<sup>4-</sup> preko paneksin 1 kanala (engl. *pannexin-1*, PANX-1). Kao što je već spomenuto prije, CD39 i CD73 nužni su za pretvorbu ATP-a u ADO. CD39 i CD73 dva su membranski vezana (na površini tumorskih stanica i T regulativnih stanica), HIF-1 osjetljiva enzima koji djeluju u tandemu. CD39 pretvara vanstanični ATP u AMP, a CD73 pretvara AMP u ADO. Akumulacija vanstaničnog ADO je dalje podržana inhibicijom ADO transportera ENT-1 koji ga vraća u stanicu, ali i inaktivacijom pretvorbe adenzina u inozin (Vaupel i Multhoff, 2018). Imunosupresivni učinak ADO se očituje u međureakciji ADO-a s njegovim receptorom, A2A, na tumorskim i stanicama imunskog sustava. A2A u kaskadi s G proteinom aktivira adenilil ciklazu i povećava koncentraciju unutarstaničnog cAMP-a koji djeluje imunosupresivno i obustavlja funkciju NK, NKT, i CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T stanica (Vaupel i Multhoff, 2020). Također, ADO negativno utječe na funkciju predočavanja antigena M1 i dendritičnih stanica (Multhoff i Vaupel, 2020).

Povišena koncentracija vanstaničnog laktata, koji djeluje kao glavni onkometabolit, povezana je s prijelazom tumorskih stanica na glikolitički put kako bi se katabolizirala glukoza zbog manjka kisika, ta pojava opisana je ranije i naziva se „Warburg efekt“. Laktat se u vanstanični prostor prenosi preko MCT1 i MCT4 transportera, a svoj imunosupresivni učinak ostvaruje na nekoliko načina. Mehanizmom vezanja na receptor 81 sparnog s G proteinom (engl. *G protein coupled receptor 81*, GPCR81) inhibira citotoksičnu aktivnost NK i CD8<sup>+</sup> stanica smanjenjem količine izlučenog granzima B, povećava broj MDSC stanica, potiče rast imunosupresivnih M2 makrofaga i T regulatornih stanica i uz to potiče stvaranje „*checkpoint*“ molekula (Multhoff i Vaupel, 2020).

Vanstanična acidoza, kao i povećana koncentracija vanstaničnog laktata, posljedica je „Warburg efekta“. Vanstanični okoliš tumora karakterizira pH < 6.8, a za njegovo zakiseljavanje zaslužan je izlazak H<sup>+</sup> iona iz stanice preko NHE1 transportera. Nizak pH između ostalog negativno djeluje na citotoksičnost NK i CD8<sup>+</sup> stanica i proizvodnju citokina. Također, nizak pH odgađa apoptozu koju provode neutrofili (Multhoff i Vaupel, 2020). Neki od mehanizama kojima stanice imunskog sustava osjete zakiseljavanje su pomoću: receptora sparnih s G proteinom (engl. *G protein coupled receptors*, GPCRs), kanala koji osjete kiselost (engl. *acid-sensing channels*, ASICs) koji se nalaze na makrofazima i dendritičnim stanicama i kanala prolaznog

receptorskog potencijala vaniloidne potporodice 1 (engl. *transient receptor potential channel vanilloid subfamily 1*, TRPV1) čijom se aktivacijom potiče influks  $\text{Ca}^{2+}$  iona (Multhoff i Vaupel, 2020).

Imunosupresivni učinak VEGF čimbenika spomenut je ranije. No, osim preko COF1 i PD-L1, VEGF potiče oslobađanje i drugih imunosupresivnih i angiogenih čimbenika, poput CSF-1, MCP-1, SDF1, CXCL2 koji potiču rast tumora i metastaziranje. Izlučivanjem navedenih molekula novače imunosupresivne MDSC stanice i M2 makrofage u TM (Multhoff i Vaupel, 2020).

U fiziološkim uvjetima, negativno nabijeni fosfatidilserin (engl. *Phosphatidylserine*, PS) nalazi se na unutrašnjoj strani fosfolipidnog dvosloja stanične membrane. No, uslijed stresa uzrokovanog hipoksijom, PS se uz aktivnost ATP i  $\text{Ca}^{2+}$  ovisne fosfolipidne skramblaze premješta na vanjski dio stanične membrane (Multhoff i Vaupel, 2020). Vežanjem PS izloženog na vanjskoj strani membrane za PS receptore, Mertk i Axl, na makrofazima, dolazi do pojačanog lučenja citokina TGF- $\beta$  i IL-10, čime se odgađa antitumorski odgovor NK i  $\text{CD8}^+$  stanica (Multhoff i Vaupel, 2020).

## 6. ZAKLJUČAK

Hipoksija kao čimbenik daje neizmjereno važan doprinos rastu i razvoju tumora. Svoj učinak u većini slučajeva ostvaruje posredno preko HIF-1 čimbenika koji igra ulogu u pokretanju mnogih procesa zaslužnih za razvoj tumora. Kao što je opisano prije, hipoksija daje doprinos u pokretanju angiogeneze, metastaziranja, ostvarenju „Warburg efekta“, upali, imunosupresiji i izbjegavanju antitumorskog imunogenog odgovora. Kombinacija svih ovih procesa i čimbenika, u kontekstu hipoksije, značajno pogoduje napredovanju rasta tumora, stoga je proučavanje tih procesa, ali i samog HIF-1 transkripcijskog čimbenika, idealno u pronalaženju potencijalne terapijske metode koja se uz kemo i radioterapiju može koristiti u liječenju tumora. Kao što je već navedeno ranije, inhibitori HIF-1 čimbenika koji bi se mogli koristiti u terapijske svrhe nisu dostupni u kliničkoj upotrebi. No, određeni procesi koje HIF-1 čimbenik regulira mogu se kontrolirati u terapijske svrhe. Primjer toga je spomenuto istraživanje provedeno na galnoj kiselini koja putem posrednika obustavlja proces angiogeneze i na taj način otežava transport kisika i hranjivih tvari tumorskom tkivu. Također, inaktivacijom izoformi enzima koji sudjeluju u glikolitičkom putu glukoze, poput heksokinaze II, može se postići izgladnjivanje tumora koji uglavnom koriste glikolizu za dobivanje energije. Sve u svemu, daljnja istraživanja mehanizama hipoksije i djelovanja HIF-1 čimbenika od velike su važnosti kako bi u budućnosti čovječanstvo napokon ostvarilo prednost u borbi protiv malignih bolesti.



## 7. LITERATURA

- Koyasu, S., Kobayashi, M., Goto, Y., Hiraoka, M. i Harada, H. (2018). Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer science*, 109(3), 560-571.
- He, Z., Chen, A. Y., Rojanasakul, Y., Rankin, G. O. i Chen, Y. C. (2016). Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncology reports*, 35(1), 291-297.
- Befani, C. i Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9087-9098.
- Semenza, G. L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) Pathway. *Science STKE*.
- Vaupel, P. i Multhoff, G. (2018). Hypoxia-/HIF-1 $\alpha$ -Driven Factors of the Tumor Microenvironment Impeding Antitumor Immune Responses and Promoting Malignant Progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1072, 171-175 .
- Rankin, E. B. i Giaccia, A. J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science*, 352(6282), 175-180.
- Vaupel, P. i Multhoff, G. (2020). Fatal alliance of Hypoxia-/HIF-1 $\alpha$ -Driven Microenvironmental Traits Promoting Cancer Progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1232, 169-176.
- Balamurugan, K. (2015). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation and cancer. *International Journal of Cancer*, 138, 1058-1066.
- Masoud, G. N. i Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.
- Liu, Z., Semenza, G. L. i Zhang, H. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(1), 32-43.
- Multhoff, G. i Vaupel, P. (2020). Hypoxia Compromises Anti-Cancer Immune Responses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1232, 131-143.

You, L., Wu, W., Wang, X. i sur (2021). The role of hypoxia-inducible factor 1 in tumor immune evasion. *Medicinal Research Reviews*, 41(3), 1622-1643.

Bhattacharai, D., Xu, X. i Lee, K. (2018). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) inhibitors from the last decade (2007 to 2016): A „structure-activity relationship“ perspective. *Medicinal Resarch Reviews*, 38(4), 1404-1442.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual reviews*, 57, 1-18.

Iyer, S. S. i Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *National institute of health*, 32(1), 23-63.

Pasche, B. (2001). Role of Transforming Growth Factor Beta in Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 186(2), 153-168.

Lu, H., Ouyang, W., i Huang, C. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research*, 4(4), 221-233.

Ferrara, N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine*, 77, 527-543.

Ferrara, N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21, 21-26.

Ferrara, N. (2009). Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of the American Heart Association*, 29, 789-791.

Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., Huang, P. (2007). The Warburg effect and its cancer thrapeutic implications. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 267-274.

Liberti, M. V. i Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical sciences*, 41(3), 211-218.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653-660.

Carmeliet, P. i Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307

Wang, Y., Shi, J., Chai, K. i sur (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9), 963-972.

## 8. SAŽETAK

Nedostatak kisika, tj. hipoksija, značajan je čimbenik tumorskog mikrookoliša koji promovira rast, razvoj i napredak tumora posredno preko HIF-1 transkripcijskog čimbenika. HIF-1 je značajan u poticanju angiogeneze ekspresijom gena za određene angiogene čimbenike, poput VEGF-a koji potiče grananje i stvaranje novih ogranaka krvnih žila. HIF-1 ima ulogu u poticanju metastaziranja koje tumoru omogućava invaziju u udaljena tkiva i na taj način njegov daljnji napredak. Kako bi tumorske stanice dobivale dovoljno energije za rast i dijeljenje uslijed nedostatka terminalnog akceptora elektrona nužna je promjena metaboličkog puta oksidativne fosforilacije na glikolitički put u procesu koji se naziva Warburg efekt, a potiče ga HIF-1. Određeni čimbenici upalnih procesa djeluju u suradnji s HIF-1 čimbenikom kako bi osigurali rast i razvoj tumora. Pomoću nekoliko mehanizama tumorske stanice posredno preko HIF-1 čimbenika izbjegavaju i suzbijaju imunski odgovor i potiču imunosupresiju kako stanice imunskog sustava ne bi obustavile njihov daljnji rast i širenje. Različite imunosupresivne molekule, ali i sam mikrookoliš tumora reguliraju funkciju stanica imunskog sustava. Uz povišene koncentracije laktata i  $H^+$  iona, koji su direktna posljedica izmjenjenog metabolizma tumora, adozin, VEGF i pozicioniranje fosfatidilserina na vanjskoj strani stanične membrane potiču imunosupresiju.

## 9. SUMMARY

Lack of oxygen (hypoxia) is an important factor in tumor microenvironment (TME) that promotes HIF-1 mediated growth and progression of tumors. HIF-1 factor's role is significant in inducing angiogenesis by expressing genes for angiogenic factors active in this process, such as VEGF which promotes branching and generation of new blood vessels. HIF-1 also has a role in inducing metastasis, a process that enables tumor invasion in distant tissues and promotes their further progression. In order for tumor cells to obtain enough energy for proliferation and growth while the terminal electron acceptor is absent, tumor cells undergo a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis in a process called the Warburg effect induced by HIF-1. Certain inflammation factors cooperate with HIF-1 in order to ensure tumor growth and development. HIF-1 mediates a number of mechanisms that are used by tumor cells to evade immune response and promote immunosuppression in order to stop immune cells from inhibiting tumor growth and spread. Various immunosuppressive molecules and TME regulate immune cell function. High lactate and  $H^+$  ion concentrations (which is a direct result of a tumor cell metabolic switch to glycolysis via Warburg effect) together with adenosine, VEGF and phosphatidylserine positioning on outer membrane leaflet promote immunosuppression.