

Wraz z rozwojem guza nowotworowego jego komórki w odpowiedzi na hipoksję wytwarzają czynniki stymulujące angiogenezę. Jednak ten gwałtowny i niekontrolowany proces skutkuje nieprawidłową funkcją i budową naczyń, powodując utrzymywanie się niedotlenienia w obrębie guza, prowadząc do oporności na stosowaną radioterapię, chemioterapię oraz zwiększając ryzyko przerzutów. Wyodrębniono związki znacząco zwiększające stężenie w warunkach hipoksji, nazwane markerami niedotlenienia. Zalicza się do nich czynnik indukowany niedotlenieniem HIF-1 α , anhidrazę węglanową CA9 oraz transporter glukozy GLUT1. Udowodniono, że wśród pacjentek z rakiem szyjki macicy w takim samym stopniu zaawansowania klinicznego zarówno czas wolny od choroby, jak i czas przeżycia były znacznie krótsze w sytuacji, gdy wykazywały one wysoką ekspresję markerów niedotlenienia.

Podejmowane są próby wykorzystania hipoksji do terapii celowanej m.in. przez stosowanie zmodyfikowanych schematów radioterapii i chemioterapii, przeciwciał 2C3, blokujących VEGF, YC-1, unieczynnijającej HIF-1 α oraz bortezomibu, inhibitora proteasomów hamującego powstawanie naczyń i indukującego apoptozę. Można mieć nadzieję, że rutynowe badanie markerów niedotlenienia pozwoli na prowadzenie leczenia dostosowanego indywidualnie do każdej pacjentki.

Słowa kluczowe: rak szyjki macicy, markery niedotlenienia, hipoksja.

Niedotlenienie w raku szyjki macicy a odpowiedź na leczenie

Hypoxia in uterine cervical cancer: impact on treatment

Janina Markowska, Radosław Mądry, Jacek P. Grabowski, Karolina Jaszczyńska-Nowinka, Monika Szarszewska

Oddział Ginekologii, Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Nowotwory złośliwe charakteryzują się szybkim tempem wzrostu, co jest skutkiem intensywnych podziałów komórkowych. Jednak wraz z rozwojem guza komórki są coraz bardziej narażone na niedobór tlenu, spowodowany rozbieżnością pomiędzy wzrastającym na niego zapotrzebowaniem a niemożnością jego dostarczenia. Wynika to ze zbyt małej liczby naczyń krwionośnych zaopatrujących guz. Aby przezwyciężyć niekorzystne warunki dalszego rozwoju i zwiększyć dostęp do tlenu, komórki nowotworowe wytwarzają czynniki stymulujące rozwój nowych naczyń. Oprócz tego, aby utrzymać jak najwyższy poziom ATP (adenozynotrójfosforanu), adaptują się do nowych, niekorzystnych warunków poprzez zwiększenie transportu glukozy i glikolizy.

Metody badania niedotlenienia

Gwałtowna i niekontrolowana proliferacja nowych naczyń w obrębie guzów nowotworowych często skutkuje ich nieprawidłową funkcją i budową. Powstają naczynia patologiczne, ślepo zakończone lub o sinusoidalnym przebiegu, z licznymi anastomozami tętniczo-żylnymi. Nierzadko też obserwuje się naczynia o wzmożonej przepuszczalności, zbudowane jedynie z pojedynczej warstwy komórek śródbłonna, które pozbawione są towarzyszących im komórek mięśni gładkich i pericytów [1, 2]. Te nieprawidłowe naczynia nie są w stanie zapewnić odpowiedniego przepływu krwi w obrębie guza i mimo ich zwiększonej ilości, hipoksja utrzymuje się nadal.

Oporność na leczenie

Liczne badania potwierdziły, że niedotlenienie w obszarze guza nowotworowego prowadzi do oporności na radioterapię, chemioterapię oraz zwiększa ryzyko przerzutów [3]. Przyczyny tego zjawiska upatruje się m.in. w bezpośredniej oporności niedotlenionych komórek na leczenie napromienianiem lub cytostatykami z powodu braku dostępu tlenu, niezbędnego do utrwalenia uszkodzeń DNA. Ponadto komórki leżące w regionach o wysokim stopniu hipoksji nie proliferują (są zatem niewrażliwe na promieniowanie), a ograniczone i nieprawidłowe unaczynienie wywołuje mechaniczną blokadę w rozprzestrzenianiu się cytostatyku. Powoduje to, że tkanki nowotworowe nie mają wystarczającego stężenia leku pozwalającego na uzyskanie pożądanego skutku terapeutycznego. Następuje aktywacja telomerazy i selekcja komórek o bardzo agresywnym fenotypie, dającym szybko przerzuty [4, 5].

Ostatnio powstało wiele metod dążących do pokonania niskiego utlenowania raka lub, wprost przeciwnie, próbujących go wykorzystywać. Stosowano zwiększone dawki promieniowania na niedotlenione miejsca [6], wykorzystywano cytotoksyny swoiste dla niedotlenienia, m.in. tirazapaminę [7], korygowano niedokrwistość [8], a także próbowano wpływać na DNA za pomocą bakterii anaerobowych zmodyfikowanych genetycznie [9]. Niestety, żadna z tych metod nie znalazła zastosowania w codziennej praktyce i niezbędne są kolejne badania, aby określić ich prawdziwą skuteczność.

Rapid proliferation of tumour results in production of pro-angiogenic factors due to tissue hypoxia. However, the new abnormal blood supply cannot provide correct oxygenation, so low oxygen tension remains, causing resistance to radio-/chemotherapy and increasing the risk of metastases. There are known substances, hypoxia markers, whose level significantly increases in oxygen deficiency. They are: HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 α), CA9 (carboanhydrase 9) and GLUT1 (glucose transporter 1). It is proved that among patients at the same stage of cervical cancer, women with high hypoxia markers' expression have shorter disease-free survival and overall survival time. Many attempts have been made to use hypoxia in target therapy by introducing modified radio-/chemotherapy schemes, 2C3 antibodies, which block VEGF, YC-1 inactivating HIF-1 α and bortezomib, a proteasome inhibitor responsible for blocking angiogenesis and apoptosis promotion. It is believed that routine examination of hypoxia markers may allow in future the planning of treatment adjusted individually to every patient.

Key words: cervical cancer, hypoxia markers, hypoxia.

Markery niedotlenienia

Niedotlenienie jest specyficznym czynnikiem aktywującym określone geny. Są to przede wszystkim czynniki transkrypcyjne, czynniki wzrostu, onkoproteiny i enzymy glikolityczne. Produkty białkowe tych genów są odpowiedzialne za przeciwdziałanie niekorzystnym dla guza efektom hipoksji. Do produktów tych zalicza się czynniki wzrostowe śródbłonna (w tym VEGF) stymulujące powstawanie nowych naczyń, transportery glukozy i enzymy glikolityczne umożliwiające przestawienie metabolizmu komórek nowotworowych na bardziej efektywny oraz onkoproteiny pozwalające na bardziej intensywny wzrost guza. Odkryto ostatnio cząsteczki, które ściśle powiązane są z procesami opisanymi powyżej. Nazwano je markerami niedotlenienia. Należy do nich czynnik indukowany niedotlenieniem HIF-1 α (ang. *hypoxia inducible factor 1 α*), anhidraza węglanowa CA9 (ang. *carboanhydrase 9*) oraz transporter glukozy GLUT1 (ang. *glucose transporter 1*) [10–12].

Istnieje kilka metod wykrywania niedotlenienia w tkankach rakowych, jednak w przypadku raka szyjki macicy i innych nowotworów łatwo dostępnym badaniu, sonda Eppendorfa wydaje się być najlepsza. Hipoksję można również oznaczyć na materiale z szyjki macicy, pooperacyjnym czy w postaci biopsji, stosując techniki immunohistochemiczne.

HIF-1

HIF-1 (czynnik indukowany hipoksją) jest heterodimerem składającym się z 2 podjednostek – HIF-1 α i HIF-1 β , należących do grupy czynników transkrypcyjnych. Udowodniono, że podjednostka 1 β jest tlenowo niezależna i jej poziom nie zmienia się w zależności od stężenia tlenu w organizmie. Natomiast poziom HIF-1 α związany jest ściśle ze stopniem utleniania tkanek i w przypadku hipoksji gwałtownie wzrasta. Wynika to z tego, iż w normalnych warunkach HIF-1 α zawdzięcza niski poziom procesowi ubikwitylizacji i następczej degradacji w proteasomach. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa prolyl hydroksylaza, która modyfikując enzymatycznie cząsteczkę HIF-1 α , umożliwia przyłączenie do niej białka VHL (ang. *von Hippel–Lindau tumor suppressor protein*), rozpoznawalnego przez ligazy ubikwityny E3, dzięki czemu możliwa jest degradacja proteasomalna. Aktywność hydrolazy zależy ściśle od obecności tlenu, dlatego przy jego niskim stężeniu cały proces zostaje zahamowany, powodując podwyższenie poziomu HIF-1 α [13]. Skumulowana w jądrze HIF-1 α łączy się z podjednostką HIF-1 α , tworząc heterodimer, który po połączeniu z genami regulowanymi niedotlenieniem (ang. *hypoxia-responsive elements* – HRE_s) wpływa na ich ekspresję.

HIF-1 α bierze udział w regulacji ponad 30 genów, m.in. kodujących białka odpowiedzialne za progresję guzów nowotworowych. Aktywuje transkrypcję VEGF (kluczowego czynnika stymulującego angiogenezę), dehydrogenazy mleczanowej A (LDH-A), wpływa na ekspresję genów kodujących erytropoetynę (EPO), enzymy glikolityczne oraz transportery glukozy GLUT1 i 3, a także syntazę tlenu azotu i insulinopodobny czynnik wzrostu IGF2, który jest odpowiedzialny za proliferację komórek nowotworowych [14].

VEGF

Jak już wspomniano, niezbędnym warunkiem wzrostu nowotworu jest równoczesne powstawanie w jego obrębie nowych naczyń krwionośnych. Uważa się, iż dalszy wzrost guza powyżej 10⁶ komórek jest niemożliwy bez angiogenezy. Przez wiele lat poszukiwano białka odpowiedzialnego za ten proces. W końcu dwie niezależne grupy badaczy, Ferrara i Henzel [15] oraz Plouet i wsp. [16], udowodniły, że jest nim VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu. Cząsteczka ta jest czynnikiem mitogennym dla komórek śródbłonna, pobudzającym je do proliferacji. Ekspresja VEGF jest zwiększona w czasie niedotlenienia, kiedy to wzrasta stężenie HIF-1 α , mającego powinowactwo do promotora tego genu. W obrębie komórek śródbłonna istnieją receptory specyficzne dla VEGF, są to VEGF1 i VEGF2, przy czym VEGF2 wydaje się mieć dominujące znaczenie [17].

CA9

Anhidraza węglanowa 9 jest kolejnym genem regulowanym przez HIF-1 α . Zaobserwowano, że jej podwyższone stężenie występuje zarówno na powierzchni komórek niektórych zdrowych tkanek (pęcherzyk żółciowy, śluzówka żołądka i jelit), jak i w wielu rodzajach nowotworów w okolicach martwiczo zmienionych. Podstawowym zadaniem CA9 jest utrzymywanie odpowiedniego pH zewnątrzkomórkowego, pozwalającego na wzrost komórek, a w przypadku komórek rakowych również na powstawanie przerzutów. Anhidraza węglanowa występuje w 99% raków szyjki macicy. W badaniu przeprowadzonym na 130 pacjentkach chorujących na ten nowotwór w stopniu Ib–IVa wykazano, że nadmierna ekspresja CA9 związana jest z niekorzystnym rokowaniem [18, 19].

GLUT1

Regulacja ekspresji transportera glukozy 1 jest dwutorowa. Po pierwsze, podobnie jak CA9 podlega on kontroli HIF-1 α ; po drugie, jego aktywność jest ściśle związana z fosforylacją tlenowozależną. Badania wskazują na to, że ekspresja GLUT1 koreluje bardziej z przewlekłym niedotlenieniem tkanek, łącznie z ograniczonym dostępem do glukozy niż z chwilową hipoksją. Udowodniono również, iż wysoki poziom tego transportera koreluje z krótszym czasem wolnym od przerzutów i gorszym całkowitym przeżyciem pacjentek [20].

NO

Tlenek azotu jest fizjologicznym neurotransmitterem i powszechnie znanym wazodylatatorem. Poprzez cGMP działa rozkurczająco na mięśniówkę gładką naczyń oraz hamuje agregację trombocytów do śródbłotka. Liczne badania potwierdzają fakt, iż w wielu rodzajach nowotworów stężenie tlenu azotu wzrasta i jest on w dużej mierze odpowiedzialny za przepływ krwi w tych tkankach. Udowodniono, że NO promuje wzrost guza. W badaniach przeprowadzonych na eksperymentalnych guzach nowotworowych, zahamowanie syntazy NO (NOS) spowodowało spowolnienie ich wzrostu [21]. Przeciwnie, transfekując komórki nowotworowe tym enzymem zauważono, że proces angiogenezy zachodzi zdecydowanie szybciej w porównaniu z guzami, do których NOS nie wprowadzono [22]. Sugeruje się, że NO oddziałuje wzajemnie z VEGF, obustronnie zwiększając ekspresję i aktywność [23, 24]. Z kolei inne badania wykazały, że NO wpływa również na powstawanie przerzutów m.in. poprzez zwiększenie stężenia metaloproteinaz [22] oraz wpływ na adhezję międzykomórkową [25].

Telomeraza

Chromosomy w organizmie ludzkim mają na swych końcach telomery, które przy każdym podziale komórkowym skracają długość. Spowodowane jest to niepełną replikacją nici DNA przy końcu 5'. Telomery są czynnikiem ograniczającym zdolność komórek do dzielenia się. W prawidłowych warunkach komórki somatyczne mają ściśle określoną liczbę możliwych podziałów (60–70), po przekroczeniu której wchodzi w stan spoczynku lub ulegają apoptozie. Komórki nowotworowe cechujące się nieograniczoną zdolnością do wzrostu mają telomerazę, która, odbudowując telomery, daje

im nieśmiertelność. Zaobserwowano, że w przypadku tkanekowej hipoksji w raku szyjki macicy gen hTERT (ang. *human telomerase reverse transcriptase gene*) kodujący telomerazę ulega nadekspresji. Yatabe i wsp. [4], mierząc stężenie telomerazy w komórkach rakowych poddanych niedotlenieniu, wykazali, że maksymalny wzrost tego enzymu występuje w ciągu 24–48 godz., natomiast maksimum hTERT mRNA osiągany jest już po 6–12 godz. Jednocześnie oznaczyli oni poziom HIF-1 α i stwierdzili jego zwiększoną, maksymalną ilość w 6. godz. Następnym punktem ich badań było udowodnienie wpływu HIF-1 α na ekspresję hTERT. Wykazano, że HIF-1 α ma powinowactwo do promotora hTERT i razem z hipoksją odpowiedzialne są za podwyższoną aktywność tego genu. W konsekwencji, produkcja telomerazy wzrasta, a co za tym idzie, następuje szybszy podział komórek, bardziej agresywny fenotyp nowotworu i gorsze rokowanie.

Czynniki niedotlenienia jako markery raka szyjki macicy. Czy możliwa jest terapia celowana?

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że HIF-1 α bierze udział w progresji raka szyjki macicy i powstawaniu przerzutów. W prawidłowych komórkach nabłonka szyjki macicy nadekspresja HIF-1 α nie występuje. Z kolei badając immunohistochemicznie komórki nowotworowe, różnego stopnia nadekspresję tego genu obserwuje się aż w 81,3% przypadków raka szyjki macicy. Birner i wsp. [26] określili poziom HIF-1 α u 91 pacjentek z rakiem szyjki macicy w stadium Ib. Chore wykazujące jego nadmiar zostały podzielone wg otrzymanych wartości na grupy o niskiej, średniej i wysokiej ekspresji. Stwierdzono, że nie ma wśród ww. grup znaczącej różnicy w przypadku zajęcia węzłów chłonnych, wieku pacjentek, stopnia złośliwości histologicznej, a także rozmiarów guza. Porównując jednak całkowite 5-letnie przeżycia kobiet (ang. *overall survival* – OS), jak i 5-letni czas wolny od choroby (ang. *disease-free survival time* – DFS) zauważono, że kobiety z wysoką ekspresją HIF-1 mają wyraźnie gorsze wyniki w porównaniu z kobietami o ekspresji w stopniu średnim lub niskim (5-letnie OS 75 vs 83%, 5-letnie DFS 34 vs 80%).

Knocke i wsp. [27] badali ogólny stopień niedotlenienia zaawansowanych raków szyjki macicy wśród 51 pacjentek. W przypadku, gdy raki były nasycone tlenem, 3-letnie przeżycie sięgało 66%, a tylko 36%, gdy wykrywano znacznego stopnia hipoksję.

Z kolei z dotychczasowych wielośrodkowych badań Markowskiej i wsp. [28], oceniających korelację między stopniem zróżnicowania komórek rakowych w przebiegu nowotworu szyjki macicy a markerami niedotlenienia (GLUT1, VEGF i HIF-1), wynika, że dla stopnia G2 i G3 intensywność ekspresji ww. markerów była wyższa w porównaniu ze stopniem G1 ($p < 0,05$). Takiej korelacji nie znaleziono pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego (FIGO) a intensywnością ekspresji markerów niedotlenienia. Potwierdzono również tezę, że w przypadku pacjentek w takim samym stopniu zaawansowania klinicznego przeżycie było znacznie gorsze w sytuacji, gdy wykazywały one wysoką intensywność ekspresji markerów niedotlenienia. Podobne wyniki dotyczące HIF-1 α podaje Burri i wsp. [29]. Co ciekawe, zależność taką zaobserwowano jedynie wśród kobiet w wyższym stopniu zaawansowania wg FIGO. Powyższe dane mogą sugerować,

że niedotlenienie jest bardzo ważnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentek w stopniu zaawansowania wg FIGO powyżej IIA, czyli tych, które nie mając korzyści z leczenia chirurgicznego, mogą być beneficjentami terapii wykorzystujących poziom utlenowania komórek do ograniczania procesu nowotworowego i przerzutów (radioterapia, radiochemioterapia) [30–32]. Można więc mieć nadzieję, że rutynowe badanie markerów niedotlenienia pozwoli na wprowadzenie leczenia z użyciem radioterapii i chemioterapii w sposób indywidualny, dostosowany do każdej pacjentki.

Chociaż hipoksja w raku szyjki macicy jest czynnikiem niekorzystnym, może być wykorzystana do terapii celowanej. Znając już mechanizmy powstawania nowych naczyń w guzach nowotworowych, naukowcy zwrócili uwagę na możliwości hamowania tego procesu. Powstało wiele rodzajów przeciwciał skierowanych przeciwko VEGF, jego receptorom, całym kompleksom VEGF-VEGFR, jednak największe zainteresowanie skupia się na przeciwciałach 2C3, które wiążą się specyficznym z nowotworowym VEGF. Dowiedziano, że 2C3 nie tylko hamuje dalszy rozwój guza, ale zmniejsza jego wielkość nawet do 35%. Wyniki te sugerują, że VEGF wpływa nie tylko na proliferację komórek endothelium. Zauważono, że guzy nowotworowe zawierają często naczynia *nagie*, tj. komórki śródbłonna całkowicie pozbawione komórek podporowych, których funkcjonowanie uzależnione jest jedynie od obecności VEGF, dlatego jego unieczynnienie prowadzi do apoptozy niedojrzałych naczyń i ograniczenia dostępności do tlenu i składników odżywczych w tkankach nowotworowych [33]. Wydaje się zatem, że przeciwciała 2C3 mogłyby dawać pozytywny efekt terapeutyczny w leczeniu wielu nowotworów, szczególnie w zestawieniu z cytostatykami.

Innym lekiem, z którym wiązane są duże nadzieje, jest YC-1 (pochodna benzylidalozu), hamujący agregację płytek krwi i skurcz naczyń. Umieszczając komórki nowotworowe linii Hep3B w środowisku ubogim w tlen, a następnie podając YC-1, Chun i wsp. [34] wykazali, że związek ten ma zdolność do inhibicji zakumulowanego czynnika HIF-1 α . W rezultacie w tkankach nowotworowych spada produkcja EPO i VEGF, a co za tym idzie, zmniejsza się ilość nowo powstałych naczyń.

Olbrzymim przełomem w leczeniu szpiczaka mnogiego było wynalezienie bortezomibu, pierwszego inhibitora proteasomów. Proteasom jest wewnątrzkomórkowym kompleksem enzymatycznym, którego podstawowym zadaniem jest degradacja białek. Lista tych białek jest długa, natomiast na szczególną uwagę zasługują związki regulujące cykl komórkowy, procesy angiogenezy i apoptozę. Poprzez zablokowanie proteasomu następuje kumulacja inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, p53, białka proapoptotycznego Bax, co przyczynia się do zachwiania homeostazy komórki, rozregulowania cyklu komórkowego i promocji apoptozy [35]. W wyniku nagromadzenia inhibitora I- κ B, zahamowany zostaje jądrowy czynnik NK- κ B (ang. *nuclear transcription factor*), pełniący kluczową funkcję w aktywacji genów odpowiedzialnych za wzrost nowotworu [36]. Bortezomib blokuje również syntezę VEGF i IL-6, tym samym zmniejsza tempo powstawania nowych naczyń. Znakomite wyniki leczenia pacjentów z nawrotową lub lekooporną postacią szpiczaka zachęciły do prowadzenia badań nad skutecznością tego leku w przypadku innych nowotworów.

Podsumowanie

Hipoksja w raku szyjki macicy jest czynnikiem niekorzystnym, który nie tylko predysponuje do bardziej agresywnego przebiegu choroby i szybszego powstawania przerzutów, ale też do oporności pacjentek na standardowe schematy leczenia. Skutkuje to krótszym czasem przeżycia chorych. Istnieje jednak nadzieja, że wyodrębniając grupę kobiet wysokiego ryzyka poprzez oznaczanie markerów niedotlenienia, będziemy w stanie zaproponować im skuteczną terapię opartą na nowoczesnych metodach terapeutycznych, dobieranych indywidualnie do każdej pacjentki.

Piśmiennictwo

- Dworak HF. How tumours make body blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162: 1747-57.
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours – what is it not for. *J Pathol* 2003; 201: 173-80.
- Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 2000; 6: 157-62.
- Yatabe N, Kyo S, Mayda Y, et al. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 3708-15.
- Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 516-25.
- Popple RA, Ove R, Shen S. Tumor control probability for selective boosting of hypoxic subvolumes, including the effect of reoxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 921-7.
- Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 2000; 6: 157-62.
- Vaupel P, Thews O, Mayer A, Höckel S, Höckel M. Oxygenation status of gynecologic tumors: what is the optimal hemoglobin level? *Strahlenther Onkol* 2002; 178: 727-31.
- Liu SC, Minton NP, Giaccia AJ, Brown JM. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther* 2002; 9: 291-6.
- Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, Hill RP. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 680-7.
- Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 2003; 179: 801-11.
- Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 9038-44.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43-54.
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: 62-7.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-8.
- Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by A1T-20 cells. *EMBO J* 1989; 8: 3801-6.
- Brekken RA, Thorpe PE. VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium. *J Control Release* 2001; 74: 173-81.
- Lancaster JA, Harris AL, Davidson SE, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; 61: 6394-9.
- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158: 905-19.
- Airley R, Lancaster J, Davidson S, et al. Glucose transporter GLUT-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-

- free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 928-34.
21. Orucevic A, Lala PK. NG-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice. *Br J Cancer* 1996; 73: 189-96.
 22. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumour growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4392-6.
 23. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 3131-9.
 24. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res* 1999; 85: 247-56.
 25. Rocha M, Krüger A, Van Rooijen N, Schirmacher V, Umansky V. Liver endothelial cells participate in T-cell-dependent host resistance to lymphoma metastasis by production of nitric oxide in vivo. *Int J Cancer* 1995; 63: 405-11.
 26. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenegger G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4693-6.
 27. Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, Selzer E, Pötter R. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1999; 53: 99-104.
 28. Markowska J, Grabowski JP, Tomaszewska K, et al. Significance of hypoxia in uterine cervical cancer. Multicentre study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 386-8.
 29. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1 α with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 494-501.
 30. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 2001; 8: 638-45.
 31. Yokoi A, McCrudden KW, Huang J, et al. Blockade of her2/neu decreases VEGF expression but does not alter HIF-1 distribution in experimental Wilms tumor. *Oncol Rep* 2003; 10: 1271-4.
 32. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60: 513-21.
 33. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor antibody withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103: 159-65.
 34. Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CM, Bae JM, Kim MS, Park JW. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem Pharm* 2001; 61: 947-54.
 35. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6316-25.
 36. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16: 433-43.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. med. **Janina Markowska**
Klinika Onkologii UM w Poznaniu
Oddział Ginekologii
ul. Łąkowa 1/2
61-878 Poznań
tel. +48 61 854 90 16
faks +48 61 851 04 90
e-mail: janina.markowska@oncology.am.poznan.pl