

Pomen hipoksije pri obsevanju

Peter Korošec, Mitja Anžič, Monika Čejnjev, Gaber Plavc, Irena Oblak

Povzetek

Uspešnost zdravljenja z radioterapijo (RT) je odvisna od številnih dejavnikov, med katerimi je tudi oksigenacija tumorskih celic. Tumorske celice, ki so dobro preskrbljene s kisikom, so namreč na obsevanje tudi do 3-krat bolj občutljive kot hipoksične tumorske celice. Poleg tega deluje hipoksija v tumorjih kot selekcijski pritisk, zaradi katerega preživijo le bolj maligne celice, z manjšim apoptotskim potencialom. V prisotnosti hipoksije se povečata genomska nestabilnost in metastatski potencial tumorskih celic, zveča pa se tudi odpornost celic na kemoterapijo, kar vse vpliva na uspešnost zdravljenja z RT. Hipoksija je posledica neskladja med celičnim dihanjem, koncentracijo kisika v krvi in perfuzijo tumorja, pri čemer so najpogostejši patogenetski mehanizmi neustrezna ožiljenost, motena difuzija kisika ter anemija, ki je lahko posledica rakave bolezni ali zdravljenja. Z uporabo invazivnih in novjših neinvazivnih diagnostičnih metod lahko ocenimo delež hipoksičnih celic v tumorju in temu prilagodimo terapevtski pristop. Boljši učinek obsevanja slabše oksigeniranih tumorjev lahko dosežemo z uporabo radiosenzibilizatorjev, z izboljšanjem tumorske oksigenacije, s selektivnim uničenjem hipoksičnih celic s citotoksini ter z obsevanjem hipoksičnih predelov z višjimi obsevalnimi odmerki ob pomoči radioprotektorjev in z uporabo sodobnih obsevalnih tehnik.

Uvod

Odziv celic na obsevanje je zelo odvisen od prisotnosti kisika. To so potrdili že izsledki raziskav v začetku dvajsetega stoletja, ko so leta 1904 Hahn (1) in nato pet let kasneje še Schwarz (2) ter leta 1930 Crabtree in Cramer (3) poročali o slabši učinkovitosti radioterapije (RT) ob zmanjšani prekrvljenosti tumorjev. Področja akutne in kronične hipoksije so prisotna v praktično vseh solidnih tumorjih, ne glede na njihovo velikost, zato obstaja veliko zanimanje za razvoj oblik zdravljenja, ki bi učinkovito uničile radiorezistentne hipoksične celice (4). V prispevku predstavljamo pomen hipoksije pri zdravljenju z obsevanjem, diagnostične tehnike za oceno hipoksije in terapevtske pristope za izboljšanje uspešnosti RT pri zdravljenju hipoksičnih tumorjev.

Vpliv kisika na biološki učinek RT

Ionizirajoče sevanje povzroča obsevalne poškodbe, ki so posledica ekscitacije in ionizacije atomov ter molekul. Za biološko učinkovitost RT je najpomembnejša poškodba deoksiribonukleinske kisline (DNK), ki je lahko neposredna ali posredna. Pri prvi sevanje deluje na DNK neposredno, pri drugi pa pride do poškodbe posredno, prek reakcij, ki jih povzročajo visoko reaktivni, a kratko živeči (okoli 10^{-10} s) prosti radikali (5–7). Neposredne poškodbe so predvsem dvojni prelomi DNK, ki so težje popravljivi kot enojni prelomi DNK, ki so pogostejši pri posrednih poškodbah DNK. Pomemben delež z ionizirajočim sevanjem nizke gostote povzročenih poškodb DNK nastane posredno kot posledica delovanja hi-

droksilnih radikalov, ki nastanejo ob radiolizi vode (8). Obseg te posredne poškodbe je močno odvisen od prisotnosti kisika. Kisik se namreč najprej z visoko afiniteto veže s prostimi radikali in povzroči nastanek novih reaktivnih produktov, ki reagirajo z biološkimi molekulami, med katerimi je za učinek RT najpomembnejša DNK, nato pa kisik poškodbe DNK kemično stabilizira oziroma fiksira. Poškodbe tako postanejo nepopravljive, kar vodi v celično smrt (9, 10).

Za učinkovito zdravljenje z RT je torej potrebna prisotnost kisika neposredno med obsevanjem oziroma nekaj milisekund po tem, saj je v nasprotnem primeru zaradi odsotnosti učinka kisika na z ionizirajočim sevanjem povzročene poškodbe DNK za dosežek istega učinka potreben do 3-krat višji obsevalni odmerek kot ob primerni oksigenaciji tkiva (10–13). Radiosenzitivnost tumorskih celic se začne progresivno nižati pri vrednosti delnega tlaka kisika (pO_2) okoli 25 mmHg in se prepolovi pri vrednostih med približno 4 mmHg in 12 mmHg, pri čemer se te vrednosti med celičnimi linijami razlikujejo (14).

Razmerje med obsevalnim odmerkom v odsotnosti kisika in obsevalnim odmerkom v prisotnosti kisika, ki povzroči enako raven obsevalne poškodbe, se imenuje količnik povečanja občutljivosti zaradi kisika (*angl.* oxygen enhancement ratio, OER) (10).

$$OER = \frac{RT \text{ odmerek v odsotnosti kisika}}{RT \text{ odmerek ob prisotnosti kisika}}$$

Na OER vplivata:

- Linearni prenos energije (*angl.* linear energy transfer, LET) obsevalnih delcev: LET se med posameznimi vrstami obsevalnih delcev razlikuje. O visokem LET govorimo, ko je delež neposrednih poškodb DNK visok, delež posrednih poškodb DNK pa nizek. Zaradi tega je OER za obsevalne delce z nizkim LET (npr. žarki X, γ žarki) višji, za obsevalne delce z visokim LET (npr. nevtroni, delci α) pa nižji (15) in se približa vrednosti 0 pri vrednosti LET 200 keV/ μ m in več (14).
- Velikost obsevalnega odmerka: OER je najvišji ob enem velikem odmerku, s frakcionacijo pa se njegova vrednost postopoma znižuje. V primeru X in γ žarkov je tako OER največji pri odmerku, višjem od približno 3 Gy, in se pod to vrednostjo sorazmerno z odmerkom niža (14).

Mehanizem nastanka hipoksije v tumorjih

Hipoksija v tumorjih se pojavlja predvsem zaradi neustrezne in nezadostne ožiljenosti, kar je posledica hitre rasti tumorja, ob neustrezni angiogenezi, in jo na splošno razdelimo na z difuzijo omejeno (kronično) ter na s perfuzijo omejeno (akutno) hipoksijo, ki sta obe najizrazitejši na venskem koncu tumorskega mikrožilja (16).

Tumorske celice, ki so od funkcionalnega žilja oddaljene

dlje kot je difuzijska razdalja kisika, so kronično hipoksične. Difuzijska razdalja kisika se zaradi razlik v metabolizmu celic, mimo katerih kisik difundira, med tumorji razlikuje in v povprečju znaša okoli 70 μm na arterijskem koncu kapilare in manj na venskem. Kronična hipoksija je pomembna, saj je določena populacija celic, ki leži med področjem z odlično oskrbo s kisikom (euoksičnim) in področjem, ki s kisikom ni oskrbljeno (anoksičnim), kljub hipoksiji še vedno viabilna ter hrkati prav zaradi hipoksije radiorezistentna (17, 18). Akutna oziroma s perfuzijo omejena hipoksija pa je posledica prehodne občasne zapore sicer funkcionalnega žilja. Jasnega vzroka zanjo ne poznamo, je pa najverjetneje posledica neprimerne tumorskega žilja. Akutna hipoksija je težko dokazljiva, a je potencialno pomembna, saj se s spreminjanjem oksigenacije celic spreminja tudi njihova radiosenzitivnost. Tako lahko tumorske celice, ki so prehodno hipoksične in zato radiorezistentne, obdržijo sposobnost proliferacije in ob tumorski reoksigenaciji predstavljajo klonogeno žarišče (19). Akutna in kronična hipoksija sta v tumorju prisotni hkrati, velja pa, da v večini primerov kronična prevladuje in ima večji vpliv na radiorezistenco (9, 13). Razlikovanje med obema vrstama hipoksije je za odpravljanje te pomembno, saj zvišanje vsebnosti kisika v krvi ni posebej učinkovito pri odpravi akutne hipoksije. Na drugi strani pa radiosenzibilizatorji difundirajo po celotni prostornini tumorja in bi morali v enaki meri senzibilizirati tako kronično kot tudi akutno hipoksične celice (20).

Delež radiorezistentnih celic, ki so med obsevanjem v tumorjih prisotne kot posledica obeh vrst hipoksije, se imenuje hipoksična frakcija. Ta delež se med tumorji razlikuje in raziskave kažejo, da je še posebej velik pri ploščatoceličnih karcinomih, kar se pripisuje njihovem izvoru v slabše prekrvljenih epitelijskih tkivih z visokim deležem na hipoksijo prilagojenih celic (13). Ocene velikosti hipoksičnih frakcij v tumorjih se med različnimi diagnostičnimi tehnikami razlikujejo, a vse kažejo na veliko heterogenost tudi med posameznimi tumorji iste vrste (21). Raziskave 42 vrst solidnih tumorjev glodalcev kažejo, da hipoksične frakcije obsegajo od 0 do 50 % tumorskih celic, s povprečno vrednostjo okoli 15 %, pri čemer so bile vrednosti določene z indirektnimi metodami, ki niso primerne za uporabo pri ljudeh (17, 22).

Ocena hipoksije v tumorju

Dobra ocena deleža in razporeditve hipoksičnih celic v tumorjih bi omogočila, da bi z ustreznimi ukrepi izboljšali učinkovitost zdravljenja z obsevanjem (13). Posredno oceno o oksigenaciji tumorja pridobimo z oceno ožiljenosti tumorja, pri čemer uporabljamo dinamično slikanje z magnetno resonanco s kontrastom (*angl.* dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI), ki omogoča prikaz prekrvljenosti tumorjev. Poznamo pa tudi več metod neposredne meritve oksigenacije tumorskih celic, ki jih v grobem razdelimo na invazivne in na neinvazivne oziroma slikovne metode (23).

Z invazivnimi tehnikami merimo oksigenacijo neposredno v tumorskem tkivu, zaradi česar so pogosto tehnično težko izvedljive oziroma neizvedljive. Ob tem tudi ne omogočajo prikaza velikosti in razporeditve hipoksičnih področij v celotni prostornini tumorja. Zlati standard je meritev hipoksije s polarografskimi kisikovimi elektrodami (12). Poleg že navedenih slabosti, ki so skupne vsem invazivnim metodam, je pri kisikovitih elektrodah težava tudi v nezanesljivosti meritev, ki se pojavljajo pri nizkih vrednostih pO_2 , pri premikih elektrode

v tkivu, pri krvavitvah v tumorjih, prav tako pa elektrode niso občutljive le za kisikove molekule in dajo lažne vrednosti ob prisotnosti melanina ter še nekaterih drugih molekul (24). Uporabnost te metode v kliniki je bila med drugim predstavljena v raziskavi zdravljenja napredovalih karcinomov materničnega vratu z RT, kjer je bila s polarografskimi kisikovimi elektrodami izmerjena tumorska hipoksija neodvisen napovedni dejavnik preživetja (25). Podobna tej je luminescenčna optična metoda OxyLite. Ta v nasprotju s kisikovimi elektrodami ne porablja kisika v elektrokemijski redukciji, kar sicer pri kisikovitih elektrodah povzroči postopno upadanje moči signala, zaradi česar lahko podcenimo hipoksijo, v izogib temu pa moramo kisikove elektrode stalno premikati. To pomeni, da lahko z luminescenčno optično metodo na enem mestu koncentracijo kisika merimo dlje. Druga prednost je natančnost luminescenčne optične metode pri nizkih koncentracijah kisika, kjer so kisikove elektrode nezanesljive. Izpostaviti velja tudi kompatibilnost sistema OxyLite z magnetno resonanco. Pomanjkljivosti sistema OxyLite sta predvsem dve, in sicer relativno velik premer sonde (okrog 200 μm v primerjavi s približno 12 μm premera kisikovih elektrod), kar pomeni večjo poškodbo tkiva pri uvajanju in posledičen potencialni vpliv poškodbe na meritve, ter dolg čas stabilizacije (1–2 min), ki je potreben pred vsako meritvijo, kar izrazito podaljša preiskavo. Zaenkrat je bil sistem OxyLite preizkušen le v predkliničnih raziskavah (26–28).

Pri izvedbi ostalih invazivnih metod je potrebna biopsija. Med te spada uporaba eksogenih markerjev, predvsem nitroimidazolov, ki se v hipoksičnih pogojih vežejo z makromolekulami in jih je nato v bioptičnih vzorcih moč označiti z imunohistokemičnimi tehnikami. Prednost te tehnike v primerjavi z uporabo polarografskih kisikovih elektrod je v tem, da označi le metabolno aktivne hipoksične celice in tako razlikuje med področji nekroze ter hipoksije. Tehnike, ki merijo hipoksijo v tumorjih s pomočjo endogenih markerjev, so v primerjavi s tehnikami, ki uporabljajo eksogene markerje, enostavnejše, saj ni potrebe po dragih intravenskih aplikacijah eksogenih markerjev, omogočajo pa tudi retrospektivno analizo tumorskih vzorcev. Kot endogene markerje uporabljamo s hipoksijo povezane gene in proteine (npr. GLUT-1 in HIF-1 α), ki jih določamo z imunohistokemičnimi, DNA, proteosomskimi in drugimi preiskavami. Omeniti velja še sicer nizkospecifične serološke markerje hipoksije, med katerimi je najbolj preiskovan osteopontin (23, 29).

Neinvazivne tehnike omogočajo slikovni prikaz stopnje oksigenacije v tumorju v realnem času in v celotni prostornini tumorja. Najpogosteje uporabljeno je slikanje s pozitronsko emisijsko tomografijo (*angl.* positron emission tomography, PET), ki omogoča prikaz razporeditve z radioizotopi označenih specifičnih hipoksičnih markerjev v tumorju. Uporablja se tudi enofotonska emisijska računalniška tomografija (*angl.* single photon emission computed tomography, SPECT). Prednosti teh metod so neinvazivnost, prikaz različno oksigeniranih predelov celotne prostornine tumorja in običajno kratka razpolovna doba uporabljenih radioizotopov. Omejitve je nizka prostorska ločljivost. V preliminarinih in pilotnih kliničnih raziskavah so bili kot hipoksični markerji preizkušeni mizonidazol, azomicin arabinozid, BMS181321 in HL-91. Šele večje raziskave bodo pokazale, če velikost hipoksične frakcije, ugotovljene s slikovnim prikazom razporeditve markerjev hipoksije, sovпада s tumorsko radiorezistenco (21, 29).

Tabela 1. Ključne diagnostične metode za določanje hipoksije v tumorjih in njihove glavne pomanjkljivosti

Metode	Glavne pomanjkljivosti
Posredne	
- DCE-MRI*	Oceni le perfuzijo, ki vedno ne korelira s stopnjo tumorske hipoksije (23).
Neposredne	
Invazivne	Ne omogočajo hkratne ocene hipoksije v celotni prostornini tumorja.
- Polarografske kisikove elektrode	Nezanesljivost meritev pri nizkih vrednostih pO_2 in potreba po stalnem premikanju elektrode v tkivu (24).
- Luminiscenčna optična metoda	Večje poškodbe tkiva zaradi relativno velikega premera sonde in dolgotrajnost meritev zaradi časovno zamudne stabilizacije sonde (26–28).
- Uporaba eksogenih markerjev hipoksije	Potreba po biopsiji in visoka cena markerjev (29).
- Določanje endogenih markerjev hipoksije	Potreba po biopsiji in velika heterogenost v korelaciji različnih endogenih markerjev s stopnjo hipoksije (74).
Neinvazivne	V primerjavi z invazivnimi imajo nižjo prostorsko ločljivost.
- PET+ z radioizotopi označenimi markerji hipoksije	Omejena občutljivost in specifičnost znanih markerjev hipoksije ter posledično nizko razmerje med signalom hipoksičnega predela in ozadja intrinzične omejitve ločljivosti PET+, zaradi naključnega gibanja pozitronov (73).

*Dinamično slikanje z magnetno resonanco s kontrastom (angl. *dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI*), + pozitronska emisijska tomografija (angl. *positron emission tomography, PET*).

Terapevtski pristopi k odpravi hipoksije v tumorjih

Nekatere raziskave so dokazale vpliv modifikacije oksigenacije tumorjev na lokalno in lokoregionalno kontrolo, na preživetje brez ponovitve bolezni in na celokupno preživetje bolnikov (12, 13, 30, 31). V številnih predkliničnih in kliničnih raziskavah so za izboljšanje učinka zdravljenja z RT uporabili različne terapevtske pristope, ki jih lahko razdelimo v štiri osnovne skupine (4, 13):

- izboljšanje tumorske oksigenacije;
- dvig radiosenzitivnosti hipoksičnih celic;
- uporaba hipoksičnih citotoksinov;
- zvišanje obsevalnih odmerkov ob pomoči radioprotektorjev in z uporabo sodobnih obsevalnih tehnik.

Izboljšanje tumorske oksigenacije

Tumorsko oksigenacijo lahko izboljšamo z vdihavanjem normo- ali hiperbaričnega kisika, z vdihavanjem mešanice 95- do 98-odstotnega kisika in 2- do 5-odstotnega ogljikovega dioksida, ki ji pravimo karbogen, z zvišanjem koncentracije hemoglobina (Hb) v krvi, z uporabo nikotinamida, z zmerno področno hipertermijo, z zdravljenjem, ki vplivajo na ožiljenost tumorja, z omejitvijo kajenja ter s kombinacijami posameznih pristopov (13, 32, 33).

Vdihavanje 100-odstotnega kisika ali karboga pred ali med RT zviša koncentracijo kisika v krvi in posledično razpoložljivost kisika v tumorskem tkivu, kar z zvečanjem difuzijske razdalje kisika zniža kronično hipoksijo (4, 13, 34, 35). Eden najenostavnejših načinov za izboljšanje tumorske oksigenacije je vdihavanje 100-odstotnega kisika v normobaričnih pogojih, tik pred oziroma med obsevanjem. Izboljšanja lokalne kontrole in preživetja pri tej terapiji niso dokazali, kar pripisujejo predvsem premajhnemu povečanju vsebnosti kisika v krvi, saj se zasičenost Hb s kisikom približa platoju že pri vdihavanju zraka (21-odstotnega kisika), ter s kisikom povzročeni vazokonstrikciji (4). Vdihavanje karboga v normobaričnih pogojih naj bi bilo zaradi manjšega vazokon-

striksijskega učinka ter posledično daljše difuzijske razdalje kisika učinkovitejše, vendar kljub temu pri bolnikih, ki so bili deležni RT ob sočasni modifikaciji hipoksije s karbogenom, izboljšanja lokalne kontrole in celokupnega preživetja niso dokazali (4).

Vdihavanje 100-odstotnega kisika v hiperbaričnih pogojih (angl. *hyperbaric oxygen, HBO*), običajno pri 2 do 3 atm, zviša koncentracijo kisika v krvi na račun raztopljenega kisika v plazmi, kar posledično zviša tumorsko oksigenacijo v času izpostavitve HBO in še nekaj minut za tem (36). Takšen način modifikacije tumorske hipoksije med obsevanjem je zaradi tehnične zahtevnosti zamuden, nenatančen in v nekaterih raziskavah povezan s pogostejšim pojavom neželenih učinkov, predvsem radionekroz (36). Metaanaliza 26 kliničnih raziskav, v katerih so bili bolniki deležni RT ob sočasni modifikaciji hipoksije le s HBO, je dokazala statistično pomembno izboljšanje lokoregionalne kontrole in celokupnega preživetja bolnikov s tumorji različnih lokacij v primerjavi z RT brez HBO (13). RT ob sočasni modifikaciji hipoksije s HBO je učinkovita le pri tumorjih z visokim deležem hipoksičnih celic, kar zahteva predhodno oceno deleža hipoksije v tumorju. Težavo pri uvajanju RT s sočasno modifikacijo hipoksije s HBO v vsakdanjo klinično prakso predstavljajo tudi tehnični vidiki tovrstnega zdravljenja, saj mora biti RT izvedena sočasno ali najkasneje nekaj minut po izpostavitvi HBO. Poleg tega pa modifikacija hipoksije s HBO poveča produkcijo žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (angl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*) prek aktivacije HIF-1 α senzorja za hipoksijo v celicah in posledično povzroči vaskularizacijo tumorja. Vpliv na učinkovitost RT še ni pojasnjen (36). Boljšo tumorsko oksigenacijo lahko dosežemo tudi z dvigom koncentracije Hb v krvi. Anemija je pred in med zdravljenjem z RT prisotna pri 40 do 75 % bolnikov z rakom, vzroki zanjo pa se med bolniki razlikujejo (30, 37). Matematičen model je pokazal, da bi lahko 20-odstotno zvišanje koncentracije Hb teoretično znižalo delež hipoksičnih celic v tumorju za 30 % (38). Koncentracija Hb med RT, pri kateri bi bila oksigenacija

Tabela 2. Terapevtski pristopi k modifikaciji hipoksije v tumorjih, mehanizmi delovanja in njihove ključne pomanjkljivosti

Terapevtski pristop	Mehanizem delovanja	Ključne pomanjkljivosti
Izboljšanje tumorske oksigenacije		
Normobarični 100-odstotni O ₂	Zveča zasičenost Hb z O ₂ in zveča količino raztopljenega O ₂ v plazmi.	Majhno zvečanje vsebnosti O ₂ v krvi in z O ₂ povzročena vazokonstrikcija (4).
Karbogen	CO ₂ v mešanici zmanjša vazokonstrikcijo v tkivih.	Vpliva predvsem na z difuzijo omejeno hipoksijo (50).
Hiperbarični 100-odstotni O ₂	Zelo poveča količino raztopljenega O ₂ v plazmi.	Tehnična zahtevnost izvedbe (36).
Transfuzija koncentriranih eritrocitov	Zvišanje koncentracije Hb poveča oksiformno kapaciteto krvi.	Večja viskoznost krvi ima neugoden vpliv na perfuzijo tumorskih celic (39).
Eritropoetin	Zvišanje koncentracije Hb poveča oksiformno kapaciteto krvi.	Poleg povečanja viskoznosti krvi je bilo predlagano tudi njegovo pospeševanje angiogeneze in antiapoptotično delovanje (47).
Molekule z veliko kapaciteto za prenos O ₂	Povečajo kapaciteto krvi za O ₂ in imajo v primerjavi z nativnim Hb ugodnejše lastnosti prenosa ter oddaje O ₂ .	Za uporabo ob RT so potrebne številne aplikacije visokih odmerkov teh učinkovin, kar lahko vodi v toksičnost (4).
Zmanjšanje afinitete Hb za O ₂	Z alosterično spremembo strukture Hb povečamo razpoložljivost O ₂ v hipoksičnih tkivih.	Lahko povzroči hipoksemijo (75).
Nikotinamid	Zmanjša s perfuzijo omejeno hipoksijo.	Vpliva predvsem na s perfuzijo omejeno hipoksijo (9).
Blaga področna hipertermija (39–42°C)	Izboljšana tumorska oksigenacija je verjetno posledica manjše porabe O ₂ in boljše perfuzije tumorja, natančen mehanizem ni znan.	Tehnično zahtevno je doseči uniformno hipertermijo v tumorju in jo potrditi z neinvazivno termometrijo (76).
Inhibicija angiogeneze	Zavira nastanek morfološko nefunkcionalnega žilja in s tem normalizira tumorsko žilje.	Dolgotrajnejša uporaba lahko poslabša tumorsko hipoksijo (55).
Žilno razdrilna zdravila	Z uničenjem tumorskega žilja spremenijo hipoksične predele v ishemične.	Lahko povzročijo nastanek novih hipoksičnih predelov (56).
Opustitev kajenja	Zmanjšanje koncentracije CO v krvi zveča razpoložljivost O ₂ v hipoksičnih tkivih.	Pogosto težka ocena kadilskega statusa zaradi nezanesljivega samoporočanja bolnikov (33).
Dvig radiosenzitivnosti hipoksičnih celic		
Radiosenzibilizatorji	Stabilizirajo z obsevanjem povzročene poškodbe DNK.	Ozko terapevtsko okno pri nekaterih učinkovinah (63).
Uničenje hipoksičnih celic		
Hipoksični citotoksini	Selektivna aktivacija in posledična citotoksičnost pretežno le v hipoksičnih tkivih.	Potreba po identifikaciji tumorjev z visoko koncentracijo citotoksine aktivirajočih encimov (66).
Področna hipertermija (42–45°C)	Hipoksične celice so občutljivejšje na citotoksičen učinek hipertermije, ob tem pa hipertermija tudi inhibira popravilne mehanizme DNK.	Tehnično zahtevno je doseči uniformno tumorsko hipertermijo in jo potrditi z neinvazivno termometrijo (76).
Zvišanje obsevalnih odmerkov		
Radioprotektorji	Kot lovilci prostih radikalov ali kot donorji vodikovega atoma ščitijo zdrava tkiva pred učinki RT.	Ozko terapevtsko okno (70).
Sodobne obsevalne tehnike	S konformnejšo prostorsko porazdelitvijo obsevalnega odmerka omogočajo obsevanje z višjimi odmerki ob enaki poškodbi zdravih tkiv.	Strm padec doze na robovih tarče lahko vodi v poddoziranje, uporaba je povezana z višjimi stroški in višjimi celokupnimi doznimi obremenitvami (9).

tumorja optimalna in posledično učinek RT najboljši, naj bi bila pri moških med 130 in 150 g/l, pri ženskah pa med 120 in 140 g/l (31, 39).

Vpliv koncentracije Hb v krvi, kot neodvisnega dejavnika na učinek RT, je težko oceniti. Anemija je namreč pogostejša pri agresivnejših oblikah raka in pri bolnikih s slabšim stanjem zmogljivosti, kar sta že sama po sebi slaba prognostična dejavnika (31, 40).

Negativen vpliv nizkih vrednosti Hb na izid zdravljenja z RT so raziskave pokazale pri raku glave in vratu (40), anusa (41), materničnega vratu (31, 42), mehurja (43) in pljuč (44). Sicer so nizke vrednosti Hb že same po sebi neodvisen napovedni dejavnik preživetja bolnikov in imajo negativen vpliv na kakovost življenja (45).

Zvišanje koncentracije Hb lahko dosežemo s transfuzijo koncentriranih eritrocitov (KE) ali z uporabo eritropoetina (EPO) (39). Transfuzija omogoča hiter dvig koncentracije Hb v krvi, večina kliničnih raziskav, v katerih so anemijo med RT zdravili

s transfuzijo KE, pa zaenkrat ni pokazala pomembnega izboljšanja lokalne kontrole in preživetja bolnikov (30). Nekateri raziskovalci so dokazali celo nasproten učinek, saj so imeli bolniki, ki so prejeli transfuzijo KE, slabšo lokalno kontrolo in preživetje v primerjavi z bolniki, ki transfuzije KE niso prejeli (39). Vzrok naj bi bil prekomeren dvig koncentracije Hb in posledično zmanjšanje prekrvavitve zaradi zvečanja viskoznosti krvi ter pojav trombemboličnih dogodkov (4, 33, 39). Poleg tega kot posledico transfuzije KE opisujejo imunosupresijo, ki bi lahko celo pospešila tumorsko rast (30). Uporaba EPO povzroči postopnejše zvišanje koncentracije Hb v krvi. Prospektivna nerandomizirana raziskava, v kateri so anemijo pri bolnikih z rakom požiralnika med zdravljenjem z radiokemoterapijo zdravili z EPO, do koncentracij Hb okoli 140 g/l, je pokazala izboljšanje tako lokalne kontrole kot preživetja bolnikov (46). Druge raziskave teh izsledkov ne podpirajo in ugotavljajo celo neugoden vpliv uporabe EPO na izid zdravljenja (33, 39). EPO naj bi namreč prek celičnih

receptorjev v tumorjih zavrl apoptozo in spodbudil angiogenezo ter s tem pospešil tumorsko rast (30, 47). Povezava med nizko koncentracijo Hb v krvi, hipoksijo tumorja in radiorezistenco je kompleksne narave ter zaenkrat v kliničnih raziskavah še ni bilo jasno potrjenega pozitivnega vpliva zvišanja Hb na lokalno kontrolo in preživetje bolnikov z rakom (4, 47). Dejstvo pa je, da zvišanje Hb pri simptomatskih pacientih med zdravljenjem pomembno vpliva na izboljšanje psihofizičnega počutja (30). Oblak in sod. priporočajo, da se v času standardnega zdravljenja z radioterapijo vzdržuje koncentracija Hb nad 120 g/l (40).

Večjo razpoložljivost kisika v tumorskem tkivu lahko dosežemo tudi z uporabo molekul, ki imajo v primerjavi z nativnim Hb višjo kapaciteto za prenos kisika, in z uporabo molekul, ki z zmanjšanjem afinitete Hb za kisik zvečajo razpoložljivost kisika v tumorju (4). Prve razdelimo na hemoglobine in na perfluorokarbone. Z modifikacijo živalskih in človeških hemoglobinov ter z vključitvijo teh v umetne rdeče krvne celice lahko namreč ustvarimo Hb, ki ima v smislu oksigenacije tumorjev ugodnejše lastnosti v primerjavi z nativnim Hb (4). Emulzije perfluorokarbonov so tekoče perfluorokemikalije, stabilizirane z lipidnim ovojem, ki imajo veliko sposobnost raztapljanja kisika, ki ga nato oddajo v hipoksičnih tkivih. Med molekulami, ki z zmanjšanjem afinitete Hb za kisik zvečajo razpoložljivost kisika v tumorju, pa je najbolj preiskovan efaproxiral. Ta z vezavo na Hb povzroči alosterično spremembo strukture Hb in tako premakne disociacijsko krivuljo Hb za kisik v desno. Predklinične in klinične raziskave, kjer so za modifikacijo hipoksije uporabili te pristope, niso pokazale povsem enoznačnega vpliva na učinkovitost RT (4, 33, 48, 49).

Nikotinamid, vodotopen vitamin kompleksa B, vpliva na prehodne spremembe pretoka krvi in s tem zmanjša s perfuzijo omejeno (akutno) hipoksijo (9, 10). Pogosto se uporablja v kombinaciji s terapevtskimi pristopi, ki zmanjšajo kronično hipoksijo (13).

Enega izmed takšnih kombiniranih pristopov zdravljenja imenujemo ARCON (*angl.* Accelerated Radiotherapy + CarbOgen + Nicotinamid, ARCON). Sestavlja ga vdihavanje karbogena, ki zniža kronično hipoksijo, uporaba nikotinamida, ki vpliva na znižanje akutne hipoksije, ter hiperfrakcionacija obsevanja z namenom zmanjšanja repopulacije celic med posameznimi frakcijami (50). Klinične raziskave so dokazale tako izboljšanje lokalne kontrole kot daljše preživetje, brez ponovitve bolezni pri anemičnih bolnikih z napredovalo obliko raka grla (cT2-4), ki so bili zdravljeni z metodo ARCON (50).

Boljšo prekrvavitev tumorja in s tem boljšo oksigenacijo lahko dosežemo tudi z uporabo blage področne hipertermije (39–42°C), z uporabo področne hipertermije višjih temperatur (42–45°C) pa inhibiramo popravilne mehanizme DNK (32, 51, 52). Metaanaliza več kliničnih raziskav je pokazala, da je uporaba področne hipertermije tik pred oziroma neposredno med RT povezana z izboljšanjem lokalne kontrole. Zaenkrat velja za enega najvarnejših načinov zvečanja učinka RT, vendar je bila v zadnjih letih redko uporabljena (53). Vpliv lokalne hipertermije na učinek RT pa se med tumorji razlikuje in je odvisen od intrinzične senzitivnosti tumorja na hipertermijo (54).

Glede na to, da je eden izmed glavnih dejavnikov v razvoju hipoksije v tumorju neustrezna ožiljenost, je tumorsko žilje privlačna tarča za modifikacijo hipoksije. Poznamo dva osnovna tovrstna terapevtska pristopa, in sicer uporabljamo zdravila, ki zavirajo nastanek novega žilja, in zdravila, ki spe-

cifično poškodujejo že razvito žilje (54). Med prvimi so najpogostejše uporabljani zaviralci žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (*angl.* anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF), s katerimi preprečimo nastanek morfološko nefunkcionalnega žilja, ki nastane v tumorjih v procesu neustrezno regulirane angiogeneze. Z uporabo žilno razdiralnih zdravil (*angl.* vascular disrupting agent, VDA), ki delujejo predvsem prek vezave na mikrotubule endotelijskih celic, pa dosežemo uničenje že prisotnega tumorskega žilja. S tem spremenimo hipoksične predele tumorja v ishemične in zmanjšamo delež radiorezistentnih hipoksičnih celic v tumorju (54–56). Časovna komponenta v odmerjanju teh zdravil je ključna. Pri kratkotrajnem odmerjanju zaviralcev angiogeneze je lahko normalizacija tumorskega žilja le prehodna, pri predolgem pa lahko še poslabšamo hipoksijo. Pri žilno razdiralnih zdravilih pa lahko z RT časovno neusklajeno odmerjanje povzroči, da nekaj predhodno hipoksičnih celic zaradi na novo povzročene ishemije umre, a hkrati to isto uničenje žilja povzroči nastanek novih področij hipoksije in posledičnih radiorezistentnih fokusov (56). V predkliničnih raziskavah je bilo dokazano izboljšanje učinka RT ob uporabi obeh skupin zdravil, ki delujeta na tumorsko žilje (57). V kliničnih raziskavah so potrdili potencialne koristi kombinacije RT in anti-VEGF pri zdravljenju karcinomov rektuma ter sarkomov. V klinični raziskavi faze I/II s 35 bolniki z napredovalim rektalnim karcinomom, predoperativno zdravljenih z bevacizumabom v kombinaciji s standardno kemoradioterapijo, so ugotovili obetavne rezultate zdravljenja (100-odstotna 5-letna lokalna kontrola in celokupno preživetje ter 75-odstotno 5-letno preživetje brez ponovitve bolezni) ob ugodnem varnostnem profilu (58). V klinični raziskavi faze II z 20 bolniki z mehkokivnimi sarkomi različnih lokalizacij, predoperativno zdravljenih z bevacizumabom v kombinaciji z RT, so poročali o dvakrat večjem obsegu tumorske nekroze (≥ 80 % nekroze v 45 % tumorjev) v primerjavi z obsegom tumorske nekroze po sami RT, pri čemer so bili neželeni učinki zdravljenja obvladljivi (59). Skrb vzbujajoči pa so bili neželeni učinki pri uporabi tovrstne terapevtske kombinacije v nekaterih drugih raziskavah. O teh so, na primer, pri zdravljenju raka glave in vratu poročali Salama in sod. (60) ter pri zdravljenju raka pljuč Sandler in sod. (61) ter Spigel in sod. (62). Opustitev kajenja je naslednji dejavnik, ki lahko pomembno vpliva na izboljšanje učinkovitosti obsevanja. Ogjikov monoksid v cigarettnem dimu se veže s Hb in povzroči nastanek karboksi-hemoglobina, ki pomakne disociacijsko krivuljo Hb za kisik v levo, kar povzroči do 30-odstotno znižanje razpoložljivosti kisika v tkivih, kar zmanjša učinek RT. Poleg tega pa nikotin v cigarettnem dimu deluje vazokonstriksijsko, kar dodatno zmanjša oksigenacijo tumorjev (33). Raziskave kažejo, da kajenje pred in med zdravljenjem z RT zmanjša lokoregionalno kontrolo kot tudi celokupno preživetje (39). Pred pričetkom zdravljenja z RT je zato vsaj za čas zdravljenja priporočljiva popolna opustitev kajenja (33).

Dvig radiosenzitivnosti hipoksičnih celic

Izboljšanje občutljivosti tumorskih celic na obsevanje lahko dosežemo tudi z uporabo hipoksičnih radiosenzibilizatorjev. Podobno kot kisik imajo visoko afiniteto do prostih radikalov in povzročijo stabilizacijo poškodbe DNK (31). V primerjavi s kisikom se v celicah počasneje metabolizirajo in tako difundirajo v področja, ki jih kisik ne doseže (9, 31). V prisotnosti radiosenzibilizatorja je za enako raven obsevalne poškodbe potreben nižji obsevalni odmerek. Razmerje med

obsevalnim odmerkom v odsotnosti in v prisotnosti radiosenzibilizatorja imenujemo količnik povečanja občutljivosti zaradi radiosenzibilizatorja (ang. sensitization enhancement ratio, SER), ki je analogen prej omenjenemu OER (10).

$$SER = \frac{RT \text{ odmerek brez radiosenzibilizatorja}}{RT \text{ odmerek z radiosenzibilizatorjem}}$$

Da bi imel radiosenzibilizator kar največji učinek na izid zdravljenja z RT, mora biti kemično ter metabolno stabilen, visoko topen v vodi in lipidih, učinkovit skozi celoten celični cikel, selektiven za hipoksične celice ter učinkovit ob običajnih nizkih dozah RT (63).

Poznamo več različnih vrst radiosenzibilizatorjev, večina jih spada v skupino nitroimidazolov (31). Med prvimi in najpogostejše preiskovanimi je misonidazol (29). Misonidazol v večini raziskav, med drugim tudi v raziskavi DAHANCA II (64), ni pomembno izboljšal lokalne kontrole ali preživetja. Zaradi visoke nevrotoksičnosti misonidazola, ki povzroči pojav periferne nevropatije že pri koncentracijah, nižjih od terapevtskega odmerka, namreč ni bilo mogoče doseči dovolj velikih odmerkov RT (63). Analog misonidazola, etanidazol, je zaradi krajše razpolovne dobe sicer manj toksičen, vendar v dveh večjih raziskavah ni bilo dokazanega pozitivnega vpliva na izid zdravljenja (63). Drugi analog, nimorazol, ima sicer manjšo učinkovitost, vendar tudi dosti manjšo toksičnost, zaradi česa so mogoče aplikacije visokih odmerkov. Danska raziskava bolnikov z rakom glave in vratu, DAHANCA 5-85, je dokazala pomemben vpliv nimorazola na zvišanje lokalne kontrole ter preživetja z RT zdravljenih bolnikov (65) in danes se nimorazol na Danskem uporablja v standardnem režimu zdravljenja bolnikov z rakom glave ter vratu z radioterapijo v vseh ustanovah (53). Metaanaliza 18 kliničnih raziskav z okoli 3.400 bolniki s ploščatoceličnim rakom glave in vratu, pri katerih so preiskovali učinek hipoksičnih radiosenzibilizatorjev na zdravljenje z RT, je prav tako pokazala izboljšanje lokalne kontrole in preživetja bolnikov, kar kaže na to, da je tovrstno modifikacijo hipoksije smiselno vključiti v zdravljenje izbranih rakov (34).

Uporaba hipoksičnih citotoksinov

Tretji pristop k zvišanju učinkovitosti obsevanja je uničenje hipoksičnih celic s hipoksičnimi citotoksini. Gre za toksine, ki se ob prisotnosti kisika nahajajo v izhodiščni neaktivni obliki, endogene celične oksidoreduktaze pa jih reducirajo v citotoksične metabolite. Oksidoreduktaze razdelimo na tiste, ki povzročijo eno-elektronsko redukcijo, in na tiste, ki povzročijo dvo-elektronsko redukcijo. Eno-elektronske oksidoreduktaze katalizirajo na kisik občutljivo aktivacijo toksinov, kar pomeni, da pride v prisotnosti kisika do reoksidacije, s čimer je zagotovljeno, da je aktivacija toksinov omejena na hipoksično tumorsko tkivo in na redka fiziološko hipoksična zdrava tkiva. Kataliza aktivacije hipoksičnih citotoksinov s strani dvo-elektronskih oksidoreduktaz pa lahko poteka tudi v prisotnosti kisika in se pojavlja tudi v zdravih tkivih. Slednje reakcije so sicer redkeje in v nekaterih primerih vodijo do neaktivnih metabolitov (9, 66).

V osnovi hipoksične citotoksine razdelimo v štiri večje skupine: dušikove heterociklične spojine, N-oksido, kinone in kovinske komplekse (56, 66). Tirapazamin (TPZ) iz skupine aromatskih N-oksidov spada med najpogostejše preučevane

hipoksične citotoksine. Ugodna naj bi bila njegova uporaba v kombinaciji s cisplatinom (67). Kljub njegovemu selektivnemu delovanju na hipoksične celice in obetavnim rezultatom predkliničnih raziskav ter kliničnih raziskav faze II pa večje učinkovitosti kombinacije TPZ, RT in cisplatina v primerjavi s samo RT ter cisplatinom klinična raziskava faze III ni dokazala (68). Eno izmed potencialnih ovir pri izboljšanju rezultatov RT ob uporabi TPZ predstavlja visok metabolizem TPZ v ekstravaskularnem prostoru, drugo pa težavna izbira bolnikov s pretežno hipoksičnimi tumorji, ki bi imeli od tovrstnega zdravljenja največ koristi (66).

V kinonski skupini hipoksičnih citotoksinov je najbolj znan mitomicin C (MMC), ki se sicer že leta uspešno uporablja kot radio-kemosenzibilizator, kasneje pa se je izkazalo, da deluje predvsem v hipoksičnem okolju (56). Prospektivne randomizirane klinične raziskave kažejo statistično pomembno izboljšanje lokalne kontrole in preživetja brez ponovitve bolezni, ob dodatku MMC k obsevanju pri karcinomih analnega kanala, karcinomih glave in vratu ter karcinomih materničnega vratu, ob tem, da so pri RT slednjih rezultati primerljivi s kombinacijo RT in cisplatina, a z manj resnimi neželenimi učinki, kar pa ne velja pri karcinomih analnega kanala. Težavo pri vrednotenju hipoksično-citotoksične učinkovitosti MMC predstavlja njegova nizka in spremenljiva specifičnost za hipoksične celice (4).

V zadnjih 30 letih je bilo odkritih in preiskovanih veliko različnih citotoksinov, vendar navkljub obetavnim rezultatom predkliničnih raziskav klinične raziskave pomembnega izboljšanja učinka RT niso dokazale. Znanje, pridobljeno pri dosedanjih predkliničnih in kliničnih raziskavah, bo pomagalo pri razvoju selektivnejših, varnejših ter učinkovitejših hipoksičnih citotoksinov. Njihova uspešna uporaba bo odvisna od slikovnih diagnostičnih metod, ki bi omogočile izbiro bolnikov s pretežno hipoksičnimi tumorji, in od možnosti določitve vrst tumorjev, ki močno izražajo prej omenjene citotoksine aktivirajoče oksidoreduktaze (66).

Zvišanje obsevalnih odmerkov ob pomoči radioprotektorjev in z uporabo sodobnih obsevalnih tehnik

Izboljšanje učinkovitosti zdravljenja slabše oksigeniranih tumorjev z RT je mogoče doseči tudi z zvišanjem obsevalnih odmerkov, kar omogoča uporaba radioprotektorjev in sodobnih obsevalnih tehnik.

Radioprotektorji so učinkovine, ki delujejo kot lovci prostih radikalov, s čimer zmanjšajo od kisika odvisen učinek RT, ali pa kot donatorji vodikovega atoma, s čimer pomagajo pri neposredni kemični popravilu poškodb DNK. Med zdravljenjem z RT tako znižajo tveganje za pojav neželenih učinkov obsevanja (69). Najpogostejše uporabljen radioprotektor je amifostin, ki je bil sprva razvit v ameriškem vojaškem programu kot zaščita pred ionizirajočim sevanjem (70). Amifostin je v osnovi neaktivna učinkovina, ki težko prehaja v celice. Njegova selektivna zaščita normalnih tkiv je posledica večjih koncentracij alkalne fosfataze v zdravih tkivih in kapilarah, ki defosforilira amifostin v aktiven metabolit WR-1065.

Ta metabolit lažje prehaja v celice, kjer deluje kot lovilc prostih radikalov, s čimer varuje celične membrane in DNK pred poškodbami. Nekatere raziskave pa kažejo, da deluje radioprotektivno tudi tako, da inducira prehodno celično anoksijo in s tem zaščiti zdrava tkiva pred ionizirajočim sevanjem (70). S svojim delovanjem bi lahko radioprotektorji ob neupoštevanju terapevtskega okna pred učinkom RT zaščitili tudi tumorske celice, kar bi zmanjšalo njihovo uporabnost.

Metaanaliza 14 randomiziranih kliničnih raziskav, v katere je bilo vključenih 1.451 bolnikov, ki so primerjale učinek RT z učinkom RT ob uporabi amifostina, je pokazala, da amifostin pomembno zmanjša pojav stranskih učinkov RT in hkrati zviša delež popolnih odgovorov na RT (71). Uporaba sodobnih obsevalnih tehnik, kot je intenziteto modulirajoče obsevanje (*angl.* Intensity Modulated RadioTherapy, IMRT), pa zmanjšuje vlogo radioprotektorjev, saj so v primerjavi z ne-IMRT tehnikami zadnje bolj konformne, kar pomeni, da so zdrava tkiva deležna nižjih odmerkov sevanja (9, 72). V povezavi s slikovnimi preiskavami, kot sta PET-slikanje, ob aplikaciji z radioizotopi označenih specifičnih hipoksičnih markerjev, in DCE-MRI, bi sodobne visoko konformne obsevalne tehnike omogočale natančno obsevanje hipoksičnih predelov tumorjev z višjimi obsevalnimi odmerki (73). Težavo pri tem pristopu lahko predstavlja spremenljiva narava prekrvavljenosti tumorjev.

Zaključek

Oksigenacija tumorskih celic pomembno vpliva na uspešnost zdravljenja z RT, saj so s kisikom dobro preskrbljene celice na obsevanje tudi do 3-krat bolj občutljive kot hipoksične celice. Poleg tega ima hipoksija v tumorjih tudi druge učinke, ki pomembno vplivajo na zdravljenje, kot so selekcijski pritisk, zaradi katerega preživijo le celice z manjšim apoptotskim potencialom, povečanje genomske nestabilnosti in metastatskega potenciala tumorskih celic ter zvečanje odpornosti celic na kemoterapijo. Uporaba invazivnih in novejših neinvazivnih diagnostičnih metod za oceno deleža hipoksičnih celic v tumorju nam omogoča prilagoditev terapevtskega pristopa, s katerim dosežemo boljši učinek obsevanja slabše oksigeniranih tumorjev. Uporaba radiosenzibilizatorjev, izboljšanje tumorske oksigenacije, selektivno uničenje hipoksičnih celic s citotoksini ter obsevanje hipoksičnih predelov z višjimi obsevalnimi odmerki ob pomoči radioprotektorjev in z uporabo sodobnih obsevalnih tehnik so načini, s katerimi lahko pri zdravljenju zmanjšamo ali obidemo radioprotektiven učinek hipoksije. Kljub temu, da izsledki nekaterih raziskav dokazujejo koristnost terapevtskih pristopov, s katerimi bi ob RT zmanjšali ali obšli hipoksijo, pa v klinični praksi ti (še) niso splošno uveljavljeni.

Literatura:

1. Hahn R. A contribution to radiotherapy. Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed 1904; 8: 120–1.
2. Schwarz G. Ueber Desensibilisierung gegen rontgen- und radiumstrahlen. Münch Med Wochenschr 1909; 24: 1–2.
3. Crabtree HG, Cramer W. The Action of Radium on Cancer Cells. II.--Some Factors Determining the Susceptibility of Cancer Cells to Radium. Proc R Soc Lond 1933; 113: 238–50.
4. Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. Curr Mol Med 2009; 9: 442–58.
5. Hall EJ, Giaccia AJ. Physics and Chemistry of Radiation Absorption. In: Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2011: 3–12.
6. Hall EJ, Giaccia AJ. Molecular Mechanisms of DNA and Chromosome Damage and Repair. In: Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2011: 12–35.
7. Wouters BC, Begg AC. Irradiation-induced damage and the DNA damage response. In: Joiner M, Kogel A. Basic Clinical Radiobiology. London: Edward Arnold, 2009: 11–27.
8. Wallace SS. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. Radiat Res 1998; 150(5 Suppl): S60–79.
9. Strojani P. Novosti v radioterapiji tumorjev glave in vratu. Zdrav Vestn 2010; 79: 339–53.
10. Horsman MR, Wouters BC, Joiner MC, Overgaard J. The oxygen effect and fractionated radiotherapy. In: Joiner M, Kogel A. Basic Clinical Radiobiology. London: Edward Arnold, 2009: 207–17.
11. Kumar P. Tumor hypoxia and anemia: Impact on the efficacy of radiation therapy. Semin Hematol 2000; 37: 4–8.
12. Hoeckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. J Natl Cancer Inst 2001; 93(4): 266–76.
13. Overgaard J. Hypoxic Radiosensitization: Adored and Ignored. J Clin Oncol 2007; 25: 4066–74.
14. Hill RP, Bristow RG. Tumor and normal tissue response to radiotherapy. In: Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L. The basic science of oncology. International Edition: McGraw-Hill, 2013: 357–93.
15. Bassler N, Toftegaard J, Luehr A, Singers BS, Scifoni S, Kraemer M, Jaekel O, Mortensen LS, Overgaard J, Petersen JB. LET-painting increases tumour control probability in hypoxic tumours. Acta Oncol 2014; 53: 25–32.
16. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res 1989; 49: 6449–65.
17. Hall EJ, Giaccia AJ. Oxygen Effect and Reoxygenation. In: Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2011: 86–104.
18. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. Med Oncol 2001; 18: 243–59.
19. Bennewith KL, Durand RE. Quantifying transient hypoxia in human tumor xenografts by flow cytometry. Cancer Res 2004; 64: 6183–9.
20. Chaplin DJ, Durand RE, Olive PL. Acute hypoxia in tumors: Implications for modifiers of radiation effects. Int J Radiat Biol Phys 1986; 12: 1279–82.
21. Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, Hanks GE. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. Radiother Oncol 1998; 46: 229–37.
22. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1984; 10(5): 695–712.
23. Hammond EM, Asselin MC, Forster D, O'Connor JP, Senra JM, Williams KJ. The Meaning, Measurement and Modification of Hypoxia in the Laboratory and the Clinic. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2014; 26: 277–88.
24. Lyng H, Sundfor K, Rofstad EK. Oxygen tension in human tumours measured with polarographic needle electrodes and its relationship to vascular density, necrosis and hypoxia. Radiother Oncol 1997; 44: 163–9.

25. Hoeckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993; 26: 45–50.
26. Griffiths JR, Robinson SP. The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *Br J Radiol* 1999; 72: 627–30.
27. Jarm T, Lešničar H, Serša G, Miklavčič D. First experience with a novel luminescence-based optical sensor for measurement of oxygenation in tumors. *Radiol Oncol* 2001; 35(4): 277–91.
28. Wen B, Urano M, Humm JL, Seshan VE, Li GC, Ling CC. Comparison of Helzel and OxyLite systems in the measurements of tumor partial oxygen pressure (PO₂). *Radiat Res* 2008; 169: 67–75.
29. Hoogsteen IJ, Marres HA, van der Kogel AJ, Kaanders JH. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19(6): 385–96.
30. Varlotto J, Stevenson MA. Anemia, tumor hypoxemia and the cancer patient. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 25–36.
31. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist* 2002; 7: 492–508.
32. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Dodge RK, Charles HC, et al. Radiation therapy and hyperthermia improve the oxygenation of human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1996; 56(23): 5347–50.
33. Hoff CM. Importance of hemoglobin concentration and its modification for the outcome of head and neck cancers patients treated with radiotherapy. *Acta Oncol* 2012; 51: 419–32.
34. Overgaard J. Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck—a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2011; 100(1): 22–32.
35. Fischer JJ, Rockwell S, Martin DE. Perfluorochemicals and hyperbaric oxygen in radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12(1): 95–102.
36. Ogawa K, Kohsi K, Ishiuchi S, Matsushita M, Yoshimi N, Murayama S. Old but new methods in radiation oncology: hyperbaric oxygen therapy. *Int J Clin Oncol* 2013; 18: 364–70.
37. Khan FA, Shukla AN, Joshi SC. Anaemia and cancer treatment: a conceptual change. *Singapore Med J* 2008; 49(10): 759–64.
38. Degner FL, Sutherland RM. Mathematical modelling of oxygen supply and oxygenation in tumor tissues: prognostic, therapeutic, and experimental implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 15: 391–7.
39. Rades D, Schild SE. Challenges of anemia correction during radiotherapy and chemoradiation. *Memo* 2012; 5: 35–8.
40. Oblak I, Strojani P, Zakotnik B, Budihna M, Smid L. Hemoglobin as a factor influencing the outcome in inoperable oropharyngeal carcinoma treated by concomitant radiochemotherapy. *Neoplasma* 2003; 50: 452–8.
41. Oblak I, Petric P, Anderluh F, Velenik V, Fras PA. Long term outcome after combined modality treatment for anal cancer. *Radiol Oncol* 2012; 46: 145–52.
42. Dunst J, Kuhnt T, Strauss HC, Krause U, Pelz T, Koelbl H, et al. Anemia in cervical cancers: impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 778–87.
43. Gospodarowicz MK, Hawkins NV, Rawlings GA. Radical radiotherapy for muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder: Failure analysis. *J Urol* 1989; 142: 1448–53.
44. Takigawa N, Segawa Y, Okahara M, Maeda Y, Takata I, Kataoka M, Fujii M. Prognostic factors for patients with advanced non-small cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation. *Lung Cancer* 1996; 15: 67.
45. Velenik V, Oblak I, Kodre V. Managing anemia with epoetin alfa in patients with rectal cancer. *Radiol Oncol* 2005; 39: 133–40.
46. Rades D, Tribius S, Yekebas EF, Bahrehmand R, Wildfang I, Kilic E, et al. Epoetin alfa improves survival after chemoradiation for stage III esophageal cancer: Final results of a prospective observational study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 459–65.
47. Walter CJ, Bell LT, Parsons SR, Jackson C, Borley NR, Wheeler JM. Prevalence and significance of anemia in patients receiving long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2013; 15: 52–6.
48. Suh J. Results of the phase III ENRICH (RT-016) study of efaproxiral administered concurrent with whole brain radiation therapy (WBRT) in women with brain metastases from breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(1 Suppl): S50–1.
49. Stea B, Shaw E, Pinter T, Hackman J, Craig M, May J, et al. Efaproxiral red blood cell concentration predicts efficacy in patients with brain metastases. *Br J Cancer* 2006; 94(12): 1777–84.
50. Janssens GO, Rademakers SE, Terhaard CH, Doornaert PA, Bijl HP, van den Ende P, et al. Improved Recurrence-Free Survival with ARCON for Anemic Patients with Laryngeal Cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 1345–54.
51. Karner KB, Lesnicar H, Cemazar M, Sersa G. Antitumour Effectiveness of Hyperthermia is Potentiated by Local Application of Electric Pulses to LPB Tumours in Mice. *Anticancer Res* 2004; 24: 2343–8.
52. Raaphorst GP, Ng CE, Yang DP. Thermal radiosensitization and repair inhibition in human melanoma cells: a comparison of survival and DNA double strand breaks. *Int J Hyperthermia* 1999; 15: 17–27.
53. Busk M, Horsman MR. Relevance of hypoxia in radiation oncology: pathophysiology, tumor biology and implications for treatment. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 57: 219–34.
54. Ariffin AB, Forde PF, Jahangeer S, Soden DM, Hinchion J. Releasing pressure in tumors: What do we know so far and where do we go from here? *Cancer Res* 2014; 74: 2655–62.
55. Ward C, Langdon SP, Mullen P, Harris AL, Harrison DJ, Supuran CT, et al. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 171–9.
56. Horsman MR, van der Kogel AJ. Therapeutic approaches to tumour hypoxia. In: Joiner M, Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology*. London: Edward Arnold, 2009: 233–46.
57. Coleman CN, Bernhard EJ, Capala J, Vikram B, Deye JA. Smart Radiotherapy. In: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. *Perez and Brady's Principles of Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2013: 116–30.
58. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; 27: 3020–6.
59. Yoon SS, Duda DG, Karl DL, Kim TM, Kambadakone AR, Chen YL, et al. Phase II study of neoadjuvant bevacizumab and radiotherapy for resectable soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(4): 1081–90.
60. Salama JK, Haraf DJ, Stenson KM, Blair EA, Witt ME, Williams R, et al. A randomized phase II study of 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy compared with bevacizumab plus 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy for intermediate-stage and T4N0-1 head and neck cancers. *Ann Oncol* 2011; 22(10): 2304–9.

61. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2542–50.
62. Spigel DR, Hainsworth JD, Yardley DA. Tracheoesophageal fistula formation in patients with lung cancer treated with chemoradiation and bevacizumab. *J Clin Oncol* 2010; 28: 43–8.
63. Hall EJ, Giaccia AJ. The biology and exploitation of tumor hypoxia. In: Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*. Philadelphia: Lipponcott, Williams & Wilkins, 2011: 432–48.
64. Overgaard J, Hansen HS, Andersen AP, Hjelm-Hansen M, Jørgensen K, Sandberg E, et al. Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx: report from the DAHANCA 2 study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 1065–8.
65. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Bastholt L, Berthelsen A, Specht L, et al. A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol* 1998; 46: 135–46.
66. Guise CP, Mowday AM, Ashoorzadeh A, Yuan R, Lin WH, Wu DH, et al. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chin J Cancer* 2014; 33: 80–6. Ch
67. Dorie MJ, Brown JM. Tumor-specific, schedule-dependent interaction between tirapazamine (SR 4233) and CIS. *Cancer Res* 1993; 53: 4633–6.
68. Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, Giral J, Fisher R, Yuen K, et al. Tirapazamine, cisplatin and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): A phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2989–95.
69. Hall EJ, Giaccia AJ. Radioprotectors. In: Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*. Philadelphia: Lipponcott, Williams & Wilkins, 2011: 129–35.
70. Kouvaris JR, Kouloulas VE, Vlahos LJ. Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector. *Oncologist* 2007; 12: 738–47.
71. Sasse AD, Clark LG, Sasse EC, Clark OA. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 784–91.
72. Yoo DS, Brizel DM. Chemical Modifiers of Radiation Response. In: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. *Perez and Brady's Principles of Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: Lipponcott, Williams & Wilkins, 2013: 559–68.
73. Geets X, Grégoire V, Lee JA. Implementation of hypoxia PET imaging in radiation therapy planning. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 57: 271–82.
74. Nordsmark M, Eriksen JG, Gebiski V, Alsner J, Horsman MR, Overgaard J. Differential risk assessments from five hypoxia specific assays: the basis for biologically adapted individualized radiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *Radiother Oncol* 2007; 83: 389–97.
75. Suh JH, Stea B, Nabid A, Kresl JJ, Fortin A, Mercier JP, et al. Phase III study of efaproxiral as an adjunct to whole-brain radiation therapy for brain metastases. *J Clin Oncol* 2006; 24(1): 106–14.
76. Dewhirst MW, Stauffer P, Vujaskovic Z, Landon CD, Prosnitz LR. Hyperthermia as a Treatment Modality. In: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. *Perez and Brady's Principles of Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: Lipponcott, Williams & Wilkins, 2013: 590–604.