

Myocardial neovascularization in the Janus view

Neovaskularizácia myokardu z jánusovského pohľadu

Maruščáková L¹, Poljak Z², Bucová M¹, Hulín I²

¹Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Maruscakova L, Poljak Z, Bucova M, Hulin I. **Myocardial neovascularization in the Janus view.** Cardiology Lett 2014;23(5):353–358

Abstract. The cardiovascular system is developed in order to ensure an optimal supply of oxygen and nutrients to the cells. Neovascularization is the process of forming new blood vessels. Angiogenesis is a complex process of construction of vessels. Angiogenesis also takes place in the myocardium. This review illustrates the formation of new blood vessels in the myocardium at the cellular and molecular level. The authors emphasize the possible impact of treatment on this process. Fig. 4, Ref. 33, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: neovascularisation – myocardium – angiogenesis – hypoxia – HIF-1 – atherosclerosis

Maruščáková L, Poljak Z, Bucová M, Hulín I. **Neovaskularizácia myokardu z jánusovského pohľadu.** Cardiology Lett 2014;23(5):353–358

Abstrakt. Kardiovaskulárny systém sa vyvíja v súlade s potrebou zásobovať bunky kyslíkom a živinami. Neovaskularizácia, formácia novej cievnej siete v tkanivách prebieha aj v dospelom veku. Angiogenéza je komplikovaný proces, ktorý zahŕňa molekulárne a celulárne deje a zmeny prebiehajúce pri neovaskularizácii. Angiogenéza sa týka aj myokardu. Cieľom prehľadového článku je kritický pohľad na proces tvorby nových ciev v myokarde na bunkovej a molekulovej úrovni vo vzťahu k terapeutickým postupom. Obr. 4, Lit. 33, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: neovaskularizácia – myokard – angiogenéza – hypoxia – HIF-1 – ateroskleróza

Všetky bunky živých organizmov tvoria systém funkčnej harmónie. Každá bunka potrebuje prijímať kyslík a živiny a potrebuje eliminovať nepotrebné látky. Pri delení buniek difúzia nepostačuje pre potrebný príjem a výdaj látok. Preto sa v priebehu diferenciácie buniek iniciuje proces vaskulogenézy, pri ktorej krvné ostrovcy hemangioblastov (prekurzorov endotelových buniek) predstavujú základ pre výstavbu dokonalého systému ciev, ktorými prúdi krv poháňaná srdcom (1).

Neovaskularizácia je užitočný proces, ale nie vždy. Rešpektujeme pohľad rímskeho boha Jána ako pohľad z dvoch strán. Týka sa to aj procesu neovaskularizácie, ktorá môže byť vo svojej podstate vytvárania nových ciev žiaduca, teda ukazujúca nám svoju dobrú stránku. Ak sa však na ňu pozrieme aj

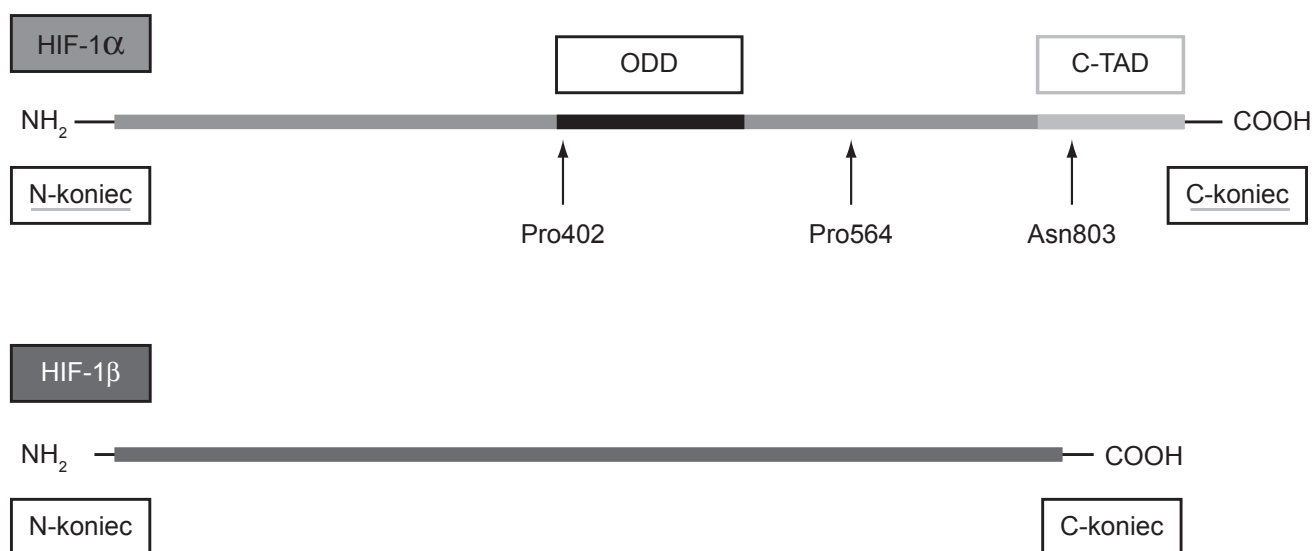
z druhej strany, nachádzame opak, negatívum a neželateľnosť tohto procesu pri patologických stavoch, pri ktorých proces tvorby nových ciev môže zhoršovať patologický stav.

Ak sa zníži prietok krvi lúmenom cievy, zníži sa perfúzia, „uplatňujú sa stimuly“ ktoré „produkuje“ hypoxia. Ak je dodávka kyslíka aj pri vazodilácii nedostatočná, môže sa iniciovať remodelácia v zmysle vytvorenia ekvilibria medzi energetickou dodávkou a lokálnymi potrebami tkaniva. Tkanivová hypoxia je definovaná ako miestny pokles koncentrácie alebo parciálneho tlaku kyslíka. Počas tkanivovej hypoxie sa hladina prítomného kyslíka zníži až na toľko, že nedokáže zabezpečiť potreby metabolizmu buniek a už nie je možné ani zvýšiť extrakciu kyslíka z krvi v tkanive (2). Odpoveďou organizmu na hypoxiu je reparačný mechaniz-

Z ¹Imunologického ústavu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a ²Oddelenia klinickej patofyziológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie prišlo dňa 16. septembra 2014; prijaté dňa 19. septembra 2014

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Lenka Maruščáková, Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, Bratislava, Slovenská republika, e-mail: lenka.maruscakova@fmed.uniba.sk



Obrázok 1 Zjednodušené schematické znázornenie štruktúry dvoch podjednotiek proteínu HIF-1

Figure 1 Simplified schematic illustration of the structure of the two subunits of the protein HIF-1

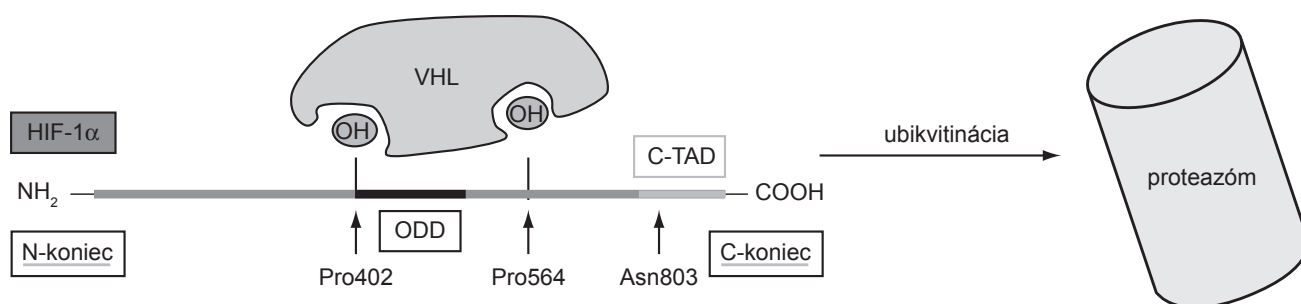
mus tzv. neovaskularizácia. Tá zahŕňa tri procesy: angiogenézu, arteriogenézu a vaskulogenézu. Angiogenéza je proces formácie nových tkanivových kapilár, ktorý je navodený za podmienok hypoxie (1).

Regulácia exprese génov hypoxiou je sprostredkovaná najmä cez transkripčný faktor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), ktorý je hlavným regulátorom transkripčnej odpovede bunky na kyslíkovú depriváciu a kyslíkovej homeostázy pri normálnych a patologických podmienkach (3, 4). Prvýkrát ho izoloval z jadrového extraktu hypoxických buniek a charakterizoval Semenza a jeho spolupracovníci v 90. rokoch minulého storočia (5).

Proteín HIF-1 vzniká dimerizáciou dvoch podjednotiek znázornených na **obrázku 1**, v ktorom sú na oboch proteínových podjednotkách naznačené N- (amínový) a C- (karboxylový) koniec. Podjednotka HIF-1beta je konštitučnou

súčasťou (v dolnej časti obrázku 1). Exprimuje sa nezávisle od kyslíka. Podjednotka HIF-1alfa (v hornej časti obrázku 1) podlieha prísnej regulácii kyslíkom (6), čo je schematicky znázornené na **obrázku 2**.

Kyslík reguluje stabilitu HIF-1alfa cez jej proteínovú oblasť – kyslík-dependentnú degradačnú doménu (oxygen-dependent degradation domain – ODD) (7) (**obrázok 1**). Za podmienok normoxie sa degradačná doména viaže s produktom (onkológom dobre známeho) tumor supresorového génu von Hippel-Lindau (VHL), ktorý funguje ako viacpodjednotková ubiquitín-proteínová ligáza. Tento enzým viaže ubiquitín na ODD a takto „odošle“ HIF-1alfa nenávratne na degradáciu do proteazómu (8). Ubikvitinácia znamená označenie molekuly pre jej nasledujúcu degradáciu v proteazóme. Proteazóm je cytoplazmatická štruktúra valcovitého tvaru s centrálnou dutinou, kde dochádza k rozkladaniu bielkovinových molekúl,



Obrázok 2 Regulácia HIF-1alfa pri normoxii

Figure 2 Regulation of HIF-1alpha in conditions of normoxia

ktoré už bunka nepotrebuje (**obrázok 2**). Interakcia medzi VHL a HIF-1alfa závisí okrem iného najmä od predchádzajúcej hydroxylačnej úpravy molekuly HIF-1alfa v mieste dvoch prolínových zvyškov, Pro 402 a Pro 564 (**obrázky 1 a 2**). Na **obrázku 1** sú šípkami naznačené pozície aminokyselinových zvyškov – Pro-prolínový zvyšok s daným poradovým číslom aminokyseliny počítaným od N- (amínového) konca molekuly. Túto hydroxyláciu zabezpečujú enzýmy HIF prolyl-hydroxylázy, čo má za následok degradáciu podjednotky HIF-1alfa. Uvedená hydroxylačná úprava HIF-1alfa je inhibovaná hypoxiou. To pri hypoxii vedie k hromadeniu HIF-1 alfa (9). Keďže kyslík ovplyvňuje aktivitu prolyl-hydroxyláz, tieto hydroxylačné enzýmy pokladáme za „kyslíkové senzory“.

Okrem stability HIF-1alfa proteínu aj jej aktivita závisí od koncentrácie kyslíka. Normoxia jej aktivitu potláča. Hypoxia ju naopak indukuje. Mechanizmus inhibície aktivity normoxiou je zložitý. Hydroxylácia asparagínového zvyšku Asn803 v C-terminálnej transaktivačnej doméne (C-TAD) sa realizuje v molekule HIF-1-alfa (**obrázok 1**, šípkou znázornený Asn – asparagínový zvyšok). Po hydroxylácii na C-TAD molekula HIF-1 nemôže vytvoriť väzbu s transkripčnými koaktivátormi (p300 a CBPK, C-TAD binding protein) a takto je blokováná transkripčná funkcia HIF-1 (6). Hydroxylačná modifikácia tohto asparagínového zvyšku je zamedzená hypoxiou. Niektoré tkanivá pri hypoxii exprimujú alternatívny variant HIF-3alfa, tzv. IPAS (Inhibitory Per/Arnt/Sim), ktorý je hlavným negatívnym regulátorom HIF -1alfa (10). HIF-3alfa teda zohráva úlohu v autoregulačnom mechanizme spätnej väzby závislej od kyslíkovej koncentrácie (11).

Z uvedeného vyplýva, že pri fyziologických podmienkach je HIF-1alfa hydroxylovaná na prolínových zvyškoch, čo výrazne znižuje jej polčas rozpadu a na asparagínovom zvyšku, čo znižuje jej aktivitu ako transkripčného faktora. Jej polčas rozpadu je v tomto prípade menej ako päť minút (12). Naproti tomu sa tento polčas pri hypoxických podmienkach výrazne predlži až na 30 – 60 minút. Hypoxia ju teda stabilizuje (13). Ďalšie kroky podjednotky HIF-1alfa v hypoxických podmienkach smerujú do priestoru bunkového jadra, kde dimerizuje s HIF-1beta. Vzniknutý heterodimér HIF-1 sa viaže na špecifické oblasti DNA, tzv. hypoxia responsive elements (HREs), v promotórovej a enhancérovej oblasti cieľových génov a aktivuje ich transkripciu. Jadro HRE obsahuje rozpoznávaciu sekvenciu 5' – G/ACGTG-3' (14).

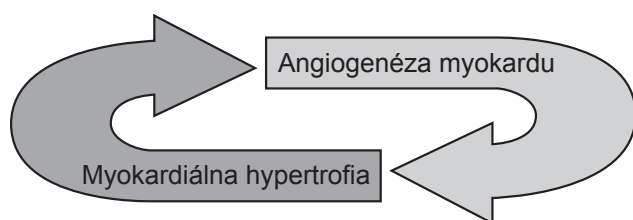
Počet génov, o ktorých sa v súčasnosti vie, že ich priamo reguluje HIF-1, je väčší ako 800, to je najmenej jeden na každých 30 ľudských génov. K tomuto zisteniu viedli analýzy genom-wide chromatin imunoprecipitácia kombinovaná s DNA sekvenovaním alebo mRNA microarrays (15, 16). Medzi nimi je aj veľa génov s dôležitou úlohou v procese angiogenézy, tvorby nových ciev. Teda stav hypoxie navodzuje neovaskularizáciu, proces formácie nového krvného riečiska.

V procese angiogenézy je zahrnutých mnoho génov, ktoré sa ukázali byť závislé od hypoxie. Medzi ne patrí VEGF

(vascular endothelial growth factor), placentárny rastový faktor, angiopoetín-2, fibroblastový rastový faktor (FGF), ako aj ich receptory, transformujúci rastový faktor beta 1 (TGFβ1), od doštičiek odvodený rastový faktor (PDGF), gény spojené s extracelulárnym matrixovým metabolizmom zahrňujúc matrixové metaloproteinázy (MMPs) spolu s ich inhibítormi, receptormi, inhibítormi aktivátora plazminogénu (17). Z vymenovaných je VEGF najúčinnnejší vo verbovaní endotelových buniek v hypoxickom a vaskulárnom prostredí a ako ich špecifický mitogén stimuluje ich proliferáciu (18).

Stimulácia rastu ciev alebo remodelácie sa ukazuje ako nová terapeutická možnosť u pacientov s ischemickou chorobou myokardu. Veľa postupov terapeutической revaskularizácie, založenej na podaní rastových faktorov, rôznych proteínov s vnútornou proangiogénnou aktivitou, kmeňových/progenitorových buniek a farmakologických molekúl sa navrhuje v terapeutickom procese a vykazujú rôznu účinnosť. Momentálne sa klinicky skúšali tie, ktoré sú založené na rastových faktoroch a kmeňových/ progenitorových bunkách z rôznych zdrojov (2). Jedným z hlavných cieľov v liečbe zlyhávania srdca ischemického pôvodu je snaha zlepšiť perfúziu v oblastiach ischémie, čo umožňuje zachovať susedné funkčné tkanivá. Sú dôkazy o možnosti dosiahnutia terapeutической revaskularizácie *in vivo*, a to prenosom génov pre rastové faktory, medzi nimi aj VEGF alebo FGF. Cieľom bunkovej liečby srdca je obnoviť funkciu naplno alebo čiastočne v oblastiach s infarktovou nekrózou. Medzi tri hlavné indikácie pre tento druh liečebného postupu patria infarkt myokardu, refraktérna angína pectoris a zlyhávanie srdca. Od roku 2005 sa vykonalo mnoho štúdií so zreteľom na túto problematiku bunkovej terapie pri infarkte myokardu, prvotne len s malým počtom pacientov. Spôsoby podania buniek zahrňujú intravenózne infúzie, intrakoronárne infúzie a transepikardiálne alebo transendokardiálne cesty podania. V predchádzajúcich skúšaní sa najviac používalo podanie prostredníctvom intrakoronárných infúzií. Bunky sa aplikujú do oblasti infarktu počas tranzitórnych balónových infúzií, pričom sa zabráňuje spätnému toku buniek a zvýšenej expozícii buniek mikrocirkuláciou a myokardom (2). Kmeňové bunky sa ukázali byť priťahované proteínom HMGB1 (high mobility group box 1), ktorý takto prispieva k reparácii a regenerácii tkaniva. Zistila sa tiež schopnosť HMGB1 zvýšiť myogenézu a angiogenézu v kostrovom svalu (19, 20). Dovoľujeme si vysloviť predpoklad, že by podobnú úlohu mohol tento so zápalom spojený proteín zohrávať aj v myokarde pri jeho ischémii a infarkte.

Intenzívne úsilie pre pochopenie procesu nádorovej angiogenézy pomohlo identifikovať vhodné ciele terapeutической angiogenézy. Avšak angiogenéza nie je nevyhnutne identická pri nádoroch a kardiovaskulárnych chorobách. Úspešný ďalší rozvoj takýchto prístupov predstavuje hlbšie pochopenie molekulárnych a celulárnych mechanizmov zahrnutých v post-ischemickej angiogenéze a zdôrazňuje významnosť a vzťahy medzi uvedenými procesmi vaskulogenézy, angiogenézy



Obrázok 3 Vzájomná indukcia angiogenézy a hypertrofie myokardu

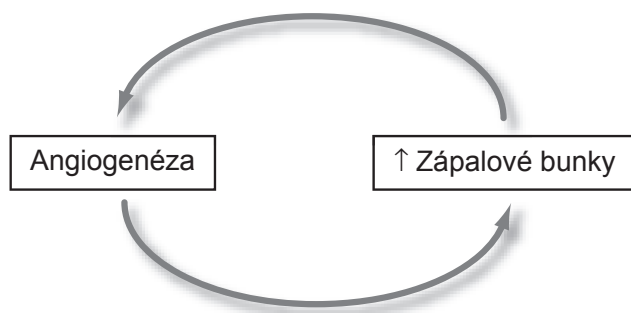
Figure 3 Mutual induction of angiogenesis and hypertrophy of the myocardium

a arteriogenézy a rozvoja kolaterál, ktoré sa zúčastňujú na obnove tkanivovej perfúzie.

V literatúre nachádzame aj informácie o vzťahu angiogenézy a srdcovej hypertrofie. Hypertrofia srdca predstavuje adaptačnú reakciu na fyziologické aj patologické preťaženie. Riešením tohto stavu vývoja hypoxie a následného udržania kontrakčnej funkcie je stimulácia neovaskularizácie. Len nedávno sa urobili značné pokroky v pochopení molekulárnych mechanizmov v medzibunkových interakciách, ktoré koordinujú rast myokardu a neovaskularizáciu (21). Po narodení sa vaskulárna sieť myokardu zväčšuje fyziologickou neovaskularizáciou, v ktorej sú zahrnuté endoteliálne progenitorové bunky (22). Zaznamenala sa vzájomná indukcia myokardiálnej angiogenézy a hypertrofie myokardu prostredníctvom viacerých molekulárnych mechanizmov, v ktorých majú významnú úlohu faktory HIF-1 a VEGF (21) (**obrázok 3**). Kapilárna mikrovaskulúra a myocyty rastú proporčne k zväčšovaniu srdcovej masy, čo naznačuje, že disproporcia týchto procesov môže spôsobiť ischemiu pri patologickej hypertrofii myokardu. Patologická hypertrofia je spojená so štrukturálnou remodeláciou a myokardiálnou fibrózou a postupne vedie ku kongestívnemu zlyhávaniu

srdca, vzniku arytmií a potenciálne aj k náhlej smrti (23). Supresia angiogenézy v myokarde sa pozorovala pri procese prechodu zo stavu kompenzovanej hypertrofie ku dekompenzovanému srdcovému zlyhaniu. Pri prolongovanej patologickej hypertrofii boli faktory HIF-1 a VEGF regulované v zmysle utlmenia ich funkcie, aj keď hypoxia v myokarde pretrvávala. Táto dysregulácia HIF-1 je jedným z kritických mechanizmov, ktoré urýchľujú poškodenie a dysfunkciu myokardu. V tejto paradoxnej tlmivo pôsobiacej regulácii faktoru HIF-1 je významným činiteľom známy tumor-supresorový proteín p53, ktorý sa akumuluje v myocytoch zlyhávajúceho srdca pôsobením rôznych mechanizmov. Proteín p53 inhibuje transkripčnú aktivitu faktora HIF-1 a tak podporuje progresiu zlyhávania srdca (21, 24). Experimentálne sa dokázal stabilizačný účinok kobaltu na HIF-1 alfa (25), ktorý je závislý od prítomnosti ďalšieho ťažkého kovu, medi (26). Indukcia angiogenézy v myokarde sa v experimente dokázala aj účinkom pitavastatinu (27) a blokátor kalciových kanálov, benidipín dokázal zvýšiť hustotu cievnych kapilár (28). Pozitívne dôsledky skúšanej neovaskularizácie infarktového ložiska myokardu ako už vytvorenej postinfarktovej jazvy, ktorá vlastne predstavuje výsledok fibrotizačného procesu by potenciálne mohlo spochybniť paradoxnú podporu fibrotizačného procesu práve vytváraním nových ciev.

Pozitívny vplyv neovaskularizácie myokardu je nespochybniteľná. Avšak nezabúdame, že pri jánusovskom pohľade existuje aj druhá, odvrátená tvár neovaskularizácie. Neovaskularizácia myokardu je mnohokrát potenciálne nežiaduca alebo sa reálne aktívne podieľa na zhoršovaní patologických procesov. Tvorba nových ciev je súčasťou patogenézy aterosklerózy. Ateroskleróza je charakterizovaná prichytením – adherenciou monocytov na cievny endotel, ich migráciou do arteriálnej steny a akumuláciou lipidov. Prvým prejavom aterosklerotických zmien je patologické zhrubnutie intimy. Zväčšovanie aterosklerotického plaku vedie k vytvoreniu hypoxických podmienok v jeho vnútri, čo má za následok lokálnu neovaskularizáciu. Patologická neovaskularizácia prebieha nielen v týchto skorých štádiách procesu aterosklerózy, ale je jeho stálou súčasťou. Iniciáciu intraartiálnej neovaskularizácie ovplyvňujú dva hlavné faktory. Sú to lokálna ischemia a prítomnosť zápalového procesu. Patologické zhrubnutie intimy viac ako 100 µm zväčšuje vzdialenosť medzi lúmenom a vnútornými vrstvami cievnej steny, teda predstavuje bariéru pre prívod kyslíka a živín. Úlohu hypoxie v iniciácii angiogenézy dokazuje prítomná nameraná hladina transkripčného faktora HIF-1, ktorý vedie k zvýšeniu produkcie VEGF (29). VEGF následne vytvára lokálne pro-angiogénne mikroprostredie tým, že mobilizuje endoteliálne progenitorové bunky (1). Veľmi zaujímavé sú výsledky experimentálnych štúdií hypercholesterolémie, kde neovaskularizácia prebiehala vo vonkajšej vrstve arteriálnej steny, adventícii, koronárnych artérií, a to dokonca ešte pred



Obrázok 4 Angiogenéza a zápalové bunky vytvárajú circulus vitiosus pri ateroskleróze

Figure 4 Angiogenesis and inflammatory cells create a vicious circle in atherosclerosis

tým, ako sa vyvinul aterosklerotický plak prominujúci do lúmenu artérie (30). Okrem stimulačného vplyvu hypoxie, zápalový proces prítomný pri ateroskleróze sám indukuje proces angiogenézy, čo vyvoláva záujem imunológov o aterosklerotický proces. Hustota ciev vo vnútri plakov súvisí s lokálnou akumuláciou zápalových buniek. Takto sa vytvára patologický bludný kruh, pretože angiogenéza umožňuje prírlev zápalových buniek a tie znova stimulujú angiogenézu (**obrázok 4**). Treba určite zdôrazniť, že inhibícia neovaskularizácie v aterosklerotickom plaku redukuje akumuláciu makrofágov a tým progresiu pokročilej aterosklerózy (31). Je teda možné, že toto vzájomné podporovanie medzi akumuláciou zápalových buniek a angiogenezou zohráva významnú úlohu v podporovaní progresie rastu plaku a súvisiaceho zápalového procesu a jeho následnej nebezpečnej destabilizácie. Na to poukazujú aj dôležité zistenia zvýšenej expresie adhezívnych molekúl leukocytov na intimálnej strane endotelových buniek (v porovnaní s ich druhou stranou, ktorá nelemuje cievny lúmen). Teda formácia nových ciev umožňuje zároveň aj zvýšenú akumuláciu leukocytov (32). K rozvoju aterosklerózy okrem iných so zápalom spojených molekúl a cytokínov prispieva aj už uvedený HMGB-1 (19). Preskúmanie významu angiogenézy v aterosklerotickom procese vyvolalo vznik mnohých štúdií zameraných na vývoj nových terapeutických postupov pri kardiovaskulárnych chorobách s aterosklerotickým procesom. Inhibícia procesu neovaskularizácie sa ukazuje ako možnosť spomaliť progresiu týchto chorôb (1).

Okrem negatívnej stránky účasti neovaskularizácie v procese aterosklerózy v literatúre nájdeme aj snahy o potlačenie procesu angiogenézy v terapeutických prístupoch chorôb, ktorých patologickým základom je fibrotický proces. V týchto terapeutických postupoch sa využíva aj rozvoj nanotechnológií a nanomedicíny. Prostredníctvom špeciálne pripravených nanočastíc sa zaciľuje proti molekulám významným pri neovaskularizácii. Základom takýchto postupov je uvažovanie o neovaskularizácii ako o tvorbe novej prístupovej cesty pre prekursorov fibrocytov a okrem toho v literatúre nájdeme aj dôkazy o transdiferenciálnej premene endotelových buniek a perycytov na fibrocyty (33). Fibróza tkaniva prebieha nežiaduco častokrát aj v myokarde, okrem iného aj pri tvorbe poinfarktovej jazvy. Problémom sa stáva neovaskularizácia pri poinfarktovej ložiskovej fibrotizácii myokardu.

Neovaskularizácia je proces v istých podmienkach výhodný a nevyhnutný, a naopak, pri iných podmienkach nežiaduci. Terapeutické postupy sa snažia o stimuláciu angiogenézy a revaskularizáciu tkaniva, no zároveň na druhej strane aj o jej potlačenie prostredníctvom blokovania cieľových molekúl. Tu sa na záver vrátíme k nášmu stvárneniu starorímskeho boha Jána, ktorý nám ukazuje raz jednu, inokedy svoju druhú tvár, záleží na tom ako sa k jeho umeleckému stvárneniu, soche, postavíme. Pritom, ak ho budeme mať možnosť obchádzať, môžeme sa zastaviť aj v takej pozícii,

kedy vidíme naraz obe jeho tváre z bočnej strany. Aj na takúto možnosť netreba zabúdať, kde jedna skutočnosť, alebo proces, v našom prípade neovaskularizácia, môže byť, ako sme v našom článku hypotetizovali, paradoxne súčasne žiaduca aj nežiaduca. Tu potom možno uvažovať o citlivom ekvilibriu, ktoré bude optimálnejšie ako „vhodné riešenia“ bez jánusovského pohľadu.

Literatúra

- Jaipersad AS, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(1):1-11.
- Silvestre JS, Smajda DM, Levy BI. Postischemic revascularization: From cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiological Reviews*. 2013;93(4):1743-1802.
- Semenza GL. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 2007;26(2):223-224.
- Manalo DJ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-669.
- Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268(29):21513-21518.
- Hu Y, Liu J, Huang H. Recent agents targeting HIF-1 α for cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(3):498-509.
- Huang LE, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(14):7987-7992.
- Tanimoto K, et al. Mechanism of regulation of the HIF-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The EMBO Journal* 2000;19(16):4298-4309.
- Ivan M, et al. HIF- α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292(5516):464-468.
- Makino Y, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550-554.
- Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Current Opinion in Genetics and Development* 2004;14(1):81-85.
- Berra E, et al. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Letters* 2001;491(1-2):85-90.
- Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Molecular Biology of the Cell*. 2002;13(5):1792-1801.
- Semenza GL. Hypoxia and human disease and the Journal of Molecular Medicine. *Journal of Molecular Medicine*. 2007;85(12):1293-1294.
- Schoedel J, et al. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):207-217.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012;33(4):207-214.

17. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2006;59(1):15–26.
18. Goltasova T, Denko NC. Hypoxia-Inducible factor 1 (HIF-1) Mediated Adaptive Responses in the Solid Tumor. In: Siemann DW. *Tumor Microenvironment* 2011;271–290.
19. Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy* 2012;113(3):163–171.
20. De MR, et al. Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2377–2383.
21. Oka T, et al. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res* 2014;114(3):565–571.
22. Riley PR, Smart N. Vascularizing the heart. *Cardiovasc Res* 2011;91:260–268.
23. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 2009;105:1164–1176.
24. Sano M, Minamino T, Toko H, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007;446:444–448.
25. Endoh H. Improved cardiac contractile functions in hypoxia-reoxygenation in rats treated with low concentration Co(2+). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2713–719.
26. Feng W. Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Pharmacol*. 2009;75:174–182.
27. Kameda Y, et al. Effects of pitavastatin on pressure overload-induced heart failure in mice. *Circ J*. 2012;76:1159–1168.
28. Nishizawa T, et al. Ca(2+) channel blocker benidipine promotes coronary angiogenesis and reduces both left-ventricular diastolic stiffness and mortality in hypertensive rats. *J Hypertens*. 2010;28:1515–1526.
29. Bjornheden T, et al. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:870–876.
30. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1998;101:1551–1556.
31. Moulton KS, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4736–4741.
32. O'Brien KD. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996;93:672–682.
33. Pu KM, Sava P, Gonzalez AL. Microvascular targets for anti-fibrotic therapeutics. *Yale J Biol Med*. 2013;86(4):537–554.