

Diyabetik Kardiyomiopati ve Prolil Hidroksilazlar

Diabetic Cardiomyopathy and Prolyl Hydroxylases

Fırat Akat¹, Hakan Fıçıcılar¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Diyabetik kardiyomiopati (DKMP), diyabet hastalarında koroner arter hastalığı ve hipertansiyondan bağımsız olarak gelişen ventriküler disfonksiyon olarak ifade edilmektedir. Kalp dokusunda görülen, intersitisyel fibrozis, miyosit hipertrofisi ve artmış kontraktıl protein glikozilasyonu DKMP'de görülen kardiyak patolojilere örnek teşkil eder. Sistolik disfonksiyon DKMP'de genellikle geç ve belirgin diastolik disfonksiyonu olan hastalarda görülen bir bulgudur.

DKMP'nin birçok başlıktan oluşan oldukça karmaşık bir patofizyolojisi vardır. Bu derlemede prolil hidroksilazların da içerisinde bulunduğu HIF-VEGF-anjiyogenez aksındaki bozulmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Diyabette hipoksiye verilen HIF yanıtının bozulduğu ve bu değişimin DKMP'nin patogenezinde önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir.

Prolil hidroksilazlar (PHD'ler), moleküler oksijeni kofaktör olarak kullanan, oksijen varlığında HIF- α (hipoksi ile indüklenen faktör- α) altbirimini degrade eden enzim yapılı moleküllerdir. Hücrel oksijen homeostazında ve hipoksiye verilen HIF cevabında önemli bir yere sahiptirler. Hipoksik koşullarda PHD enzimi inaktif hale gelir ve degradasyondan kurtulan HIF-1 α , β alt birimi ile birleşerek HIF-1 molekülünü oluşturur. Bu olaya "HIF stabilizasyonu" adı verilir. Stabilize olan HIF-1 molekülü hücredeki birçok proteinin transkripsiyonunu modifiye eder. HIF'in alt hedeflerinin aktivasyonu hücrenin enerji ve oksijen tüketimini azaltır ve hücreye oksijen arzını artırır, böylece hipoksik sürecin en az hasarla atlatılması sağlanır.

HIF aktivasyonu sonucu açığa çıkan genomik profilin DKMP'de koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. HIF sistemini aktive etmek için HIF overekspresyonu yapılan genetik modeller, hipoksi uygulaması, PHD inhibitörleri ve PHD geninin susturulması gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Literatürde diyabetin PHDlere olan etkisi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Diyabette PHD merkezli araştırmaların artması diyabette önleyici ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi açısından önemli bilgiler üretilmesine açık bir alandır.

Anahtar Sözcükler: *Diyabetik Kardiyomiopati, Prolil hidroksilazlar, Hipoksi, HIF*

Diabetic cardiomyopathy (DCMP) is described as ventricular dysfunction seen in diabetic patients which manifests itself without any coronary artery disease and hypertension. One may observe interstitial fibrosis, myocyte hypertrophy and contractile protein glycation in DCMP. Diastolic dysfunction is the earliest and most of the time only symptom of DCMP. Generally systolic dysfunction is a late symptom which is seen in patients who have significant diastolic dysfunction.

DCMP has a very complex pathophysiology which can be indexed in many titles. We focused on HIF-VEGF-Angiogenesis axis which contains prolyl hydroxylases. In diabetes HIF response to hypoxia is blunted and it is known that this alteration is an important contributor to DCMP prognosis.

Prolyl hydroxylases are enzymatic molecules (PHDs) which, uses molecular oxygen as cofactor and if oxygen is abundant they degrade HIF- α (hypoxia induced factor- α) subunit. They have an important role in cellular oxygen homeostasis and HIF response to hypoxia. In hypoxic conditions, PHD becomes inactive that saves HIF-1 α from degradation and HIF-1 α unites with β subunit to form HIF-1 molecule. This phenomenon is named as "HIF stabilisation". Stabilised HIF-1 molecule modifies lots of protein's transcription rate in the cell. Activation of HIF's downstream targets, lowers the energy and oxygen consumption and increases the delivery of oxygen to the cell which protects the cell from hypoxic damage.

The genomic profile generated with HIF activation has cardioprotective effect in DCMP. HIF overexpressing genetic models, hypoxia application, PHD inhibitors and PHD silencing methods is used to activate HIF system.

There are limited number of studies in literature about the effect of diabetes on PHDs. Increment of PHD-based research in diabetes may help the production of valuable knowledge about preventive and therapeutical strategies in diabetes.

Key Words: *Diabetic Cardiomyopathy, Prolyl hydroxylases, Hypoxia, HIF*

Geliş Tarihi : 06.02.2017 • Kabul Tarihi: 20.03.2017

İletişim

Dr.Bio.Fırat Akat

E-posta: akatfirat@gmail.com

Tel: 0 312 595 82 72

Faks:0312 310 63 70

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara

Diabetes mellitus kalıtsal ve çevresel etkenlerin bileşimi ile insülin eksikliği ve/veya insülinin periferik dokularda etkinliğinin bozulması sonucu oluşan, kan glukoz düzeyinin yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabet hastalığı tip I (insüline bağımlı) ve tip II (insülin bağımsız) olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır (1). Tip I diyabet, pankreatik beta hücrelerinin harabiyet sonucu insülin üretmemesi ile ortaya çıkan ve sonuçta tam insülin yetersizliğinin oluşması ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetli hastalar arasında tip I diyabetlilerin oranı %10 olarak belirtilmektedir (2). Tip II diyabet ise insülinin etkisine karşı direnç gelişmesi ile karakterize ve sonuçta insülin sentezi ve salgılanmasının azalması ya da tamamen ortadan kalkmasına yol açabilen bir hastalıktır. Dünyada 2015 yılı itibari ile diyabetli birey sayısı 415 milyon iken bu sayının 2040 yılında bu sayının 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun raporuna göre dünyada her 11 yetişkinden birisi diyabetlidir, diyabet ve diyabete bağlı hastalıklar dünya sağlık harcamalarının %12'sini oluşturmaktadır (3).

Diyabetik kardiyomyopati (DKMP) diyabetin neden olduğu kalp damar bozukluklarından bağımsız bir patolojidir. Diyabetik kardiyomyopati diyabet hastalığının miyokarda "hücre saldı" olarak nitelendirilmekte ve ayrı bir hastalık olarak kabul edilmektedir (4). İlk kez 1972 yılında Rubler ve ark. (5) tarafından tanımlanan DKMP, diyabet hastalarında koroner arter hastalığı ve hipertansiyondan bağımsız olarak gelişen ventriküler disfonksiyon olarak ifade edilmektedir. Diyabetli bireylerde kardiyomyosit hasarına neden olan üç temel metabolik bozukluk hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperinsülinemidir. Bu koşulların kalpte meydana getirdiği yapısal ve fonksiyonel değişimler aşağıda özetlenmiştir:

1.1. Yapısal Değişimler

Çok sayıda katılımcı ile yapılan Strong Heart Study'de diyabetik bireyler ile sağlıklı kontroller karşılaştırılmış ve diyabetiklerde sağlıklılara kıyasla sol ventrikül kütlelerinin, duvar kalınlığının ve arteriyel sertliğin vücut kütle indeksi ve kan basıncı parametrelerinden bağımsız olarak artmış olduğu tespit edilmiştir (6). Yine Framingham Heart Study çalışmasında, sol ventrikül kütlelerinin ve duvar kalınlığının diyabetli bireylerdeki artışı gösterilmiş, kadınlarda bu artışın daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. Ek olarak bu değişimlerin glukoz intoleransı ve obezitenin derecesi ile orantılı olduğu belirtilmiştir (7). Diyabetik bireylerden alınan biyopsi materyallerinin incelenmesi sonucunda kalp dokusunda intersitisyel fibrozis, miyosit hipertrofisi ve artmış kontraktıl protein glikozilasyonu gösterilmiştir. Bu değişikliklerin diyabetiklerde görülen azalmış diastolik kompliyans ve ventriküler hipertrofi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir (8-10).

1.2. Fonksiyonel Değişimler

Diyastolik disfonksiyon diyabetik kardiyomyopatinin en erken fonksiyonel bulgusudur. Diyastolik disfonksiyon, kalp döngüsünün diastol periyodunda gerçekleşen olayların yavaşlaması ve diastolik sürecin uzaması olarak tanımlanabilir. Sol ventrikül gevşeme hızındaki azalma standart ekokardiyografi ve Doppler ekokardiyografi yöntemi kullanılarak gösterilebilmektedir. Ancak diyastolik disfonksiyon sadece aktif gevşeme süreçlerinde meydana gelen bozulmadan değil aynı zamanda sol ventrikülün pasif sertliğinin artışından da kaynaklanır. Sistolik disfonksiyon diyabetik kardiyomyopatide genellikle geç ve belirgin diyastolik disfonksiyonu olan hastalarda görülen bir bulgudur. Sistolik disfonksiyon kalbin kanı fırlatma yeteneğinde meydana gelen azalmayı tanımlar. Temel bulgusu sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonundaki azalmadır (11).

Diyabetik kalpte sol ventrikül diastolik disfonksiyonu ilk kez Regan ve

ark.(12)'nin kardiyak kateterizasyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir. Araştırmacılar; koroner arter hastalığı olmayan, normotansif ve herhangi başka bir kalp hastalığı geçirmemiş diyabetik hastalarda sol ventrikül diastol sonu basıncında artış ve diastol sonu hacminde azalma bulmuşlardır. Diyabetik bireylerde aynı zamanda kardiyak rezerv azalması da gözlemlenir. Bu durum egzersize verilen sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu yanıtında azalma ile karakterizedir (13).

1.3. Patofizyoloji

Her ne kadar diyabetik kardiyomyopatinin patofizyolojik mekanizmaları tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamış ise de, meydana gelen kardiyak değişikliklerin nedenlerine ilişkin çok sayıda faktör önerilmektedir. Sinerjik bir şekilde çalışarak diyabetik kardiyomyopatiye neden olan bu faktörler: a) Artmış reaktif oksijen türevleri ve ileri glikozilasyon son ürünleri b) Değişen substrat kullanımı ve miyokardiyal lipotoksiste c) Renin-anjiyotensin-aldosteron aksındaki bozulmalar d) Bakır metabolizmasında meydana gelen değişimler e) Kardiyak otonomik nöropati f) Protein Kinaz C (PKC) yolunda meydana gelen değişimler g) Endotelial hücre disfonksiyonu h) Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF)-Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)-anjiyogenez aksındaki bozulmalar şeklinde sıralanabilir. Bu derlemede proliil hidrosilazların da içerisinde bulunduğu HIF-VEGF-anjiyogenez aksındaki bozulmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (14-16).

Anjiyogenez, endotelial hücre migrasyon ve proliferasyonu, ekstrasellüler matris yıkımı, perisit ve makrofajların birikimi, düz kas proliferasyon ve migrasyonu ve yeni damar oluşumu aşamalarını içerir (17). Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi birçok büyüme faktörü iskemiye verilen anjiyogenik cevapta rol alırlar (18).

Diyabette neovaskülarizasyonda görülen bozulma; retina (retinopati) ve glomerüllerde aşırı artmış anjiyogenez şeklinde gerçekleşebildiği gibi, yara iyileşme bozukluğunda olduğu gibi azalmış anjiyogenez şeklinde de gerçekleşebilir. Diyabette kemik iliğinden endotelial progenitör hücrelerin salınımında azalma ve hücrelerin fonksiyonel açıdan defektli olması yanında, miyokartta azalmış VEGF ve VEGF reseptörü düzeylerinin varlığı diyabetik kalpteki damarlanma bozukluğunun altında yatan başlıca unsurlar olarak görülmektedir (19). Diyabetik hayvanlarda miyokardiyal VEGF ve her iki VEGF reseptörünün (VEGFR-1 ve VEGFR-2) mRNA'sının %40-70 oranında azaldığı gösterilmiştir (20). Bu bilgiye paralel olarak, sağlıklı bireylerin ventriküllerinde VEGF ve VEGFR-2 ekspresyonunun diyabetik hastalardan iki kat fazla olduğu bildirilmiştir. VEGF ve reseptörlerinin azalışı diyabetik koşullarda miyokardiyumdaki yetersiz kollateral oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (21). Ayrıca diyabetik hayvanlarda miyokardiyumun aksine, retina ve glomerüllerde VEGF ve reseptörlerinde gösterilen artış bu dokulardaki kapiller geçirgenlik artışını ve artmış neovaskülarizasyonu açıklamaktadır (22).

VEGF ve anjiyogenezin temel düzenleyicisi HIF (Hipoksi ile indüklenen faktör) molekülüdür. Literatürde HIF molekülünün diyabette azaldığı, diyabetik dokuda hipoksiye verilen HIF yanıtının bozulduğu ve bu değişimlerin diyabetik kardiyomyopatinin patogenezinde önemli bir yer tuttuğuna dair çok sayıda yayına rastlamak mümkündür (23-25). Diyabetlilerde hipoksiye bağlı HIF cevabındaki azalma ile ilgili çeşitli moleküler mekanizmalar önerilse de bu konu henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Diyabette miktarı ve etkinliği artan metilglioksalın HIF-1 α 'yı modifiye ederek heterodimer oluşumunu azalttığını ortaya konulmuştur (26). Aynı çalışma grubu daha yakın tarihli çalışmalarında metilglioksalın p300 molekülünü de modifiye ederek HIF ile olan etkileşimini bozduğunu göstermişlerdir (27). Bento ve ark. metilglioksalın HIF yolağına olan etkisini metilglioksalın HSP40 ve HSP70 proteinleri ile HIF-1 α arasındaki bağlanmayı arttırmak

suretiyle gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir (28). HIF cevabındaki azalmayı açıklamak için, reaktif oksijen türevleri (ROS) ile HIF yolağı arasında ilişki kuran çalışmalara da rastlamak mümkündür. Aşırı ROS üretimi durumunda moleküler oksijenin nitrik oksit ile etkileşime girmesi sonucunda oluşan peroksinitrit, Elektron Transport Zinciri (ETZ) kompleks I aktivitesini tamamen baskılar ve demir ve 2-oksoglutaratın sitosole çıkışına neden olur. Prolin hidrosilazların aktivitesini arttıran bu etkinin HIF-1 α yıkımını arttırdığı bildirilmiştir (29). Hipergliseminin HIF yolağına bir diğer etkisi de von Hippel Lindau proteini (pVHL) üzerinden olmaktadır. Botusan ve ark (30), hiperglisemik koşullarda VHL stabilitesinin bozulduğunu ortaya koymuşlardır.

2. Hüresel Oksijen Homeostazı ve Prolin Hidrosilazlar

Oksidatif fosforilasyon yapan canlılar için kesintisiz oksijen desteği oldukça yaşamsaldır. Bu nedenle organizma, hipoksi koşulu için hüresel düzeyde çeşitli adaptasyon stratejilerine sahiptir.

2.1. Hüresel Oksijen Homeostazı

Hipoksinin hüresel düzeydeki etkilerinin açığa çıkmasındaki temel aracı molekül HIF (Hypoxia Inducible Factor) molekülüdür. İlk kez Semenza ve Wang'ın 1992 yılında yaptığı öncü çalışma ile Hep38 insan hepatoma hücrelerinin nükleuslarında keşfedilmiştir (31). Keşfedilen molekülün hipoksi ile düzeyinin arttığı ve eritropoietin'in gen bölgesini aktive ettiği gösterilmiş, "Hypoxia-induced-enhancer" olarak isimlendirilmiştir. Aynı araştırmacıların takip eden yayınlarında Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF) olarak adlandırılmıştır (32).

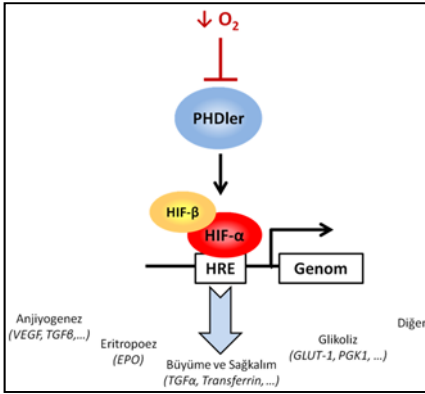
HIF molekülü α (O_2 labil, O_2 sensitif) ve β (O_2 bağımsız) altbirimlerinden oluşan heterodimer yapısında bir transkripsiyon faktörüdür. HIF α 'nın üç adet izoformu vardır. Bunlar HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α 'dır. HIF-1 β , hücrede hipoksiden bağımsız ve yoğun olarak

eksprese edilirken HIF-1 α oksijen varlığında PHD'ler tarafından hızla degrade edilir, bu nedenle HIF molekülünün oluşumunda HIF-1 α miktarı hız kısıtlayıcı basamaktır (33).

Normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın üzerinde bulunan oksijen-bağımlı degradasyon (ODD) bölümündeki iki spesifik prolin rezidüsü PHD'ler tarafından hidrosilleştir. Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geninin ürünü (pVHL) isimli protein bu hidrosiprolin rezidülerine bağlanır (34-36). Bu bağlanma asetil transferaz enzimini etkileyerek aynı bölgenin lizin rezidülerinin asetillenmesine yol açar (37). pVHL-ODD bağlanması ve takip eden modifikasyonlar molekülün ubiquitin-ligaz kompleksi ile ilişki kurarak ubiquitinlenmesine yol açar. Çoklu ubiquitinlenme 26S ribozomlar için bir etiket oluşturarak HIF- α 'nın proteozomal degradasyonuna neden olur (38,39).

Hipoksik koşullarda oksijeni bir kofaktör olarak kullanan PHD enzimi inaktif hale gelir ve degradasyondan kurtulan HIF-1 α , β alt birimi ile birleşerek HIF-1 molekülünü oluşturur. Bu olaya "HIF stabilizasyonu" adı verilir. Stabilize olan HIF-1 molekülü genomda bulunan HRE (hypoxia response element) bölgeleri üzerinde etkili olarak hücredeki birçok proteinin transkripsiyonunu modifiye eder (40). HIF- α tek başına memeli hücrelerindeki proteinlerin %2'sinden fazlasını kontrol eder. HIF'in alt hedeflerinin aktivasyonu hücrenin enerji ve oksijen tüketimini azaltır ve hücreye oksijen arzını artırır, böylece hipoksik sürecin en az hasarla atlatılması sağlanır (Şekil 1).

HIF-1 α ile oksijen konsantrasyonu arasındaki ilişki birçok deneysel çalışma ile incelenmiştir. Semenza ve ark. (41)'nin yaptıkları çalışmada oksijen konsantrasyonunun %20'den %0,5'e düşmesinin HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimlerinin bağlanma hızını üstel olarak arttırdığı ortaya konulmuştur. Aktivitesi oksijen basıncı ile düzenlenen PHD enzimi, bu özelliği sayesinde hücrede adeta bir "oksijen sensörü" olarak görev yapmaktadır



Şekil 1: PHD'lerin hüresel oksijen homeostazındaki yeri

2.2. Prolil Hidroksilazlar

Prolil hidroksilazlar (PHD'ler), demir ve 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenazlar grubunda yer alan, moleküler oksijeni kofaktör olarak kullanan, oksijen varlığında HIF- α (hipoksi ile indüklenen faktör- α) altbirimini degrade eden enzim yapılı moleküllerdir. Hüresel oksijen homeostazında ve hipoksiye verilen HIF cevabında önemli bir yere sahiptirler (42).

Prolil-4 hidroksilaz (PHD) içeren enzimler, ilk kez *Caenorhabditis elegans* adlı canlıdan 2001 yılında izole edilmiş ve egg-laying abnormal 9 (EGL-9) olarak isimlendirilmiştir (43). Prolil hidroksilazların, insanda üç adet izoformu bulunur. Karmaşık isimlendirme sistemleri olmakla birlikte genellikle PHD1, PHD2 ve PHD3 olarak isimlendirilirler (Bkz Tablo 1). Dördüncü PHD izoformu olarak PHD ile ilişkili protein (PH-4) tanımlanmış olmakla birlikte fonksiyonu ile ilgili bilgiler henüz çok yeterli değildir (44).

Tablo 1: Prolil hidroksilaz izoformlarının değişik isimlendirme sistemlerindeki karşılıkları

PHD (Prolil-4 Hidroksilaz Domain)	EGLN (egl Nine Homolog)	HPH (HIF Prolil Hidroksilaz)
PHD1	EGLN2	HPH3
PHD2	EGLN1	HPH2
PHD3	EGLN3	HPH1

PHD1, PHD2 ve PHD3 değişik düzeylerde olmakla beraber tüm dokularda bulunur (42). Willam ve ark. (45)'nin çalışması ile kalpte her üç izoformun da varlığı gösterilmiştir.

Kalpte en yoğun bulunan izoform PHD2'dir, onu sırayla PHD3 ve PHD1 izler. Yapılan çalışmalar PHD1'in büyük oranda nükleusta PHD2'nin ise sitoplazmada bulunduğunu göstermekte, ayrıca sitoplazma nükleus arasında geçişin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. PHD3'ün sitoplazma ve nükleusa dağılımının eşit olduğu kabul edilmektedir (46). PHD'ler hem nükleusta hem de sitoplazmada katalitik aktivite gösterebilirler (47).

PHD izoformları C-terminal katalitik uçlarında yüksek bir homoloji göstermekle birlikte N-terminal ucundaki farklılıklar sayesinde özgünlük kazanırlar. Bu özgünlükler Tablo 2'de özetlenmiştir (48).

PHD1, hücrede sürekli ve yoğun olarak eksprese edilir ve diğer iki formun aksine hipoksi ile indüklenmez. En yoğun testiste bulunan PHD1'in iki adet alternatif transkripsiyon varyantı bulunmaktadır (49). PHD1, hücre siklusunu regülörlerinden birisi olan Siklin D1 isimli proteini degrade edebilme özelliği sayesinde hücre proliferasyonunda da etkilidir (50).

Hem PHD2, hem de PHD3 hipoksi ile indüklenebilir özelliktedir (51,52). PHD2, çoğu hücre tipinde hem ekspresyon hem de katalitik aktivite açısından ana izoformdur (46). Özellikle normoksida çok düşük seviyelerde eksprese edilen PHD3'ün, hipoksi ile birlikte ifadesi katlanarak artmaktadır (53). PHD3'ün de iki adet alternatif transkripsiyon varyantı bulunmaktadır (54). PHD3'ün nöral gelişim, bağışıklık, hücre migrasyonu ve apoptoziste de etkili olduğu ve kas dokusu dışındaki aktin moleküllerinin prolin rezidülerini hidroksillemek suretiyle filamentöz aktin oluşumunu artırarak hücre motilitesini etkilediği bilinmektedir (55,56). Hidroksilaz aktivitesinin yanı sıra, PHD3 birçok sinyal yolağında iskele proteini (scaffolding protein) olarak görev yapmaktadır (57,58).

PHD enzimlerinin substratı, HIF molekülünün alfa alt birimidir. PHD2 diğer izoformlara göre çok yüksek katalitik aktiviteye sahiptir, onu PHD3 ve

PHD1 izler. Ancak bazı çalışmalar PHD2 ve PHD3'ün eşit düzeyde aktiviteye sahip olduğunu PHD1'in ise bu iki izoforma göre düşük aktivite gösterdiğini bildirmektedir (59,60).

PHD'ler HIF molekülünün HIF-1 α ve HIF-2 α altbirimlerine değişen düzeyde affinite gösterir. PHD1 her iki izoforma eşit düzeyde affinite gösterirken, PHD2, HIF-1 α 'ya, PHD3'ün ise HIF-2 α 'ya daha yüksek affinite gösterdiği olarak PHD3'ün HIF-1 α 'yı, PHD2 ve PHD1'den farklı bir sekanstan hidroksilediği bilinmektedir (Bkz. Tablo 2) (53,61)

Tablo 2: PHD izoformlarının çeşitli özellikleri (Katschinski ve ark.'dan değiştirilerek alınmıştır) (49)

	PHD1	PHD2	PHD3
Moleküler ağırlık (kDa)	44	46	27
Alternatif transkripsiyon varyantı	Var (40kDa ve 43kDa)	Yok	Var (17kDa ve 24kDa)
Hipoksi ile indüklenebilirlik	Hayır	Evet	Evet
Ağırlıklı olarak tercih ettiği HIF izoformu	Eşit	HIF-1 α	HIF-2 α
Kesim (Splicing) varyantı	Var	Yok	Var

3. PHD-HIF Yolağının Kalpte Koruyucu Etkisi

HIF aktivasyonu sonucu açığa çıkan genomik profilin kalbi koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle HIF sisteminin hipoksi veya hipoksi dışı yollarla aktive edilmesi bir kalp koruma stratejisi olarak kabul edilmektedir (62).

HIF-1 molekülünün kalbi koruyucu etkisi ilk kez 2003 yılında Cai ve ark. (63,64) tarafından gösterilmiştir. Cai ve ark. (63,64) çalışmalarında aralıklı olarak uygulanan hipoksinin iskemi/reperfüzyon sonrası toparlanma cevabında artışa neden olduğunu göstermiş ve HIF-KO (HIF-Knock Out) ratlarda bu etkinin görülmemesinden yola çıkarak hipoksinin kalbi koruyucu etkisinin HIF molekülü üzerinden gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmadan hareketle kalpte HIF stabilizasyonunun artırılması önemli bir koruyucu strateji olarak görülmeye başlanmıştır.

tır. HIF stabilizasyonu için kullanılan yöntemleri iki başlıkta incelemek mümkündür: HIF overekspresyonu yapılan genetik modeller ve PHD merkezli stratejiler. HIF overekspresyonu ile yapılan çalışmalara Kido ve ark. (65)'nin 2005 yılında transgenik fareler ile yaptıkları çalışma örnek verilebilir. Araştırmacılar HIF-1 α overekspresyonu olan grupta MI (miyokard infarktüsü) sonrası infarkt alanın kontrol grubuna göre önemli ölçüde küçüldüğünü, MI'yı takip eden 4. haftada kalp fonksiyonlarının kontrole göre önemli düzeyde iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Date ve ark. (66) adenovirus üzerinden HIF-1 α overekspresyonu yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında, kardiyomyosit kültür hücrelerine iskemi reperfüzyon protokolü uygulamışlar HIF-1 α overekspresyonu yapılan grupta hasanın daha az olduğunu göstermişlerdir.

PHD merkezli stratejilerden ilki hipoksi uygulamasıdır. İlk kez Shizukuda ve ark. (67) köpek kalbini hipoksik kan ile perfüze ederek hipoksik önkoşullama yapmış, bu sayede iskemi/reperfüzyona karşı koruyucu etki elde etmişlerdir. Hipoksik önkoşullamanın iskemik atakta meydana getirdiği koruyucu etki takip eden birçok hayvan çalışması ile gösterilmiş ve hipoksik önkoşullamanın potansiyel bir non-farmakolojik tedavi yöntemi olduğu ileri sürülmüştür (68). PHD'nin kofaktörü olan moleküler oksijenin ortamdan uzaklaştırılması prensibine dayanan hipoksi uygulaması hem düşük maliyetli olması hem de HIF yolğunun doğal uyararı olması nedeniyle araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Literatürde çok sayıda farklı hipoksi protokolünün varlığına karşın kalbi koruma amaçlı olarak genellikle aralıklı hipoksi protokolleri tercih edilmektedir (62).

Literatürde diyabetik kalpte aralıklı hipoksi uygulamasının koruyucu etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Diyabetik sıçanlara aralıklı hipoksi uygulaması yapılan Faramoushi ve ark. (69)'na ait çalışmada, diyabetik sıçanlar 8 hafta boyunca, 3400 metre yükseltiyeye karşılık gelen hipoksiye ma-

ruz bırakılmış, diyabetin yol açtığı kardiyak fibrozisin aralıklı hipoksi uygulaması ile azaldığı rapor edilmiştir. Diyabetik kalpte aralıklı hipoksi uygulaması yapan bir diğer çalışmada diyabetik hayvanlara uygulanan ılımlı şiddetteki aralıklı hipoksinin kalp fonksiyonlarında diyabetin yol açtığı bozulmayı engellediği saptanmıştır (70).

HIF stabilizasyonunu arttırmayı hedefleyen PHD merkezli bir diğer strateji PHD'lerin inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu süreçte 2-oksoglutarat analogları, demir şelatörleri (deferroksamin gibi), kobalt klorür (CoCl₂), dimetilglioksal (DMOG), GSK360A gibi farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır. Xi ve ark. (71) iskemi/reperfüzyon uygulamasını takiben miyokardiyal infarkt alanının CoCl₂ uygulanan grupta küçüldüğünü ancak post-iskemik kardiyak fonksiyonunun değişmediğini bildirmişlerdir. Ockaili ve ark. (72) DMOG uygulamasıyla yaptıkları PHD inhibisyonu ile miyokardiyal infarkt alanında küçülme ve antiinflamatuvar etki göstermişlerdir. Bao ve ark. (73) GSK360A isimli PHD inhibitörünün iskemi/reperfüzyon sonrasındaki toparlanma cevabında iyileşmeye neden olduğunu, infarkt alanını küçülttüğünü ve infarkt alanındaki damarlanmayı arttırdığını göstermişlerdir. Tan ve ark. (74) demir şelatörü deferroksamin uygulaması ile PHD inhibisyonu sağladıkları çalışmalarında HIF-1 α 'nın upregülasyonu ile birlikte, iskemi reperfüzyona maruz kalan kardiyomyositlerin pozitif inotropik ajanlara verdikleri kasılma cevabının arttığını, kalsiyum homeostazının iyileştiğini bildirmişlerdir. PHD inhibisyonu sağlayan bir diğer yöntem PHD gen ifadesinin susturulmasıdır. Prolin hidroksilaz genlerinin susturulmasının (siRNA ile) HIF-1 stabilizasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Natarajan ve ark. siRNA kullanarak PHD2 geninin ifadesini baskılayıp HIF-1 stabilizasyonu sağladıkları çalışmalarında HIF-1 stabilizasyonunun iNOS mRNA ekspresyonunu arttırdığını göstermişler ve PHD susturma işlemi yapılan kalplerin kontrole göre iskemi reperfüzyon hasarına daha dayanıklı olduğunu da ortaya koymuşlardır (75)

4. PHD'ler ve Diyabetik Kardiyomiyopati

Literatürde diyabetik kalpte PHD düzeylerini inceleyen 2 çalışmaya rastlanmıştır. Thirunavukkarasu ve ark. (76) tarafından ratlarda Tip I diyabette PHD düzeylerinin incelendiği ve PHD protein düzeylerinin MI uygulamasından sonra gruplar arasında karşılaştırıldığı çalışmada bazal PHD değerlerine dair bir veri bulunmamaktadır. MI (daha önce açık yazılmıştır) protokolü sonrasında diyabetik hayvanların PHD düzeylerinin non-diyabetiklere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Xia ve ark. 4 haftalık yüksek yağlı diyetin ardından düşük doz STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları tip II diyabetin zararlı etkilerini PHD3 geninin susturulması (silencing) yoluyla önlemeye çalıştıkları araştırmada, diyabetik ratlarda sol ventrikül PHD3 düzeylerinin kontrole göre önemli düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmada 12 haftalık diyabetin kalp fonksiyonlarında bozulmaya, apoptozis ve fibroziste artışa neden olduğu; PHD3'ün susturulmasının diyabetin neden olduğu tüm bu bozukluklarda restorasyona yol açtığı görülmüştür. Sonuçlar PHD3 inhibisyonunun kalbi koruyucu etkisine işaret etmektedir. Ek olarak, H9c2 kardiyomiyoblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada kültür ortamının hiperglisemik hale getirilmesinin reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimini ve PHD3 ekspresyonunu arttırdığını; antioksidan etkinliği bilinen N-Asetilsistein maddesinin kültür ortamına eklenmesi ile birlikte hem ROS üretimi hem de PHD3 ekspresyonunda azalma gerçekleştiği bildirilmiştir (77).

5. Sonuç

Damarlanma bozukluğu diyabetik kalpteki yapısal ve fonksiyonel bozukluklardan en azından kısmen sorumludur. DKMP'de hipoksiye verilen HIF cevabının bozulması ile ilgili çok sayıda araştırma olmakla birlikte altta yatan moleküler mekanizma tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Önerilen moleküler mekanizmalar içinde PHD'nin önemli bir role sahip olduğu anlaşılmaktadır. Diyabette PHD merkezli araştırmaların artması diyabette önleyici ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi açısından önemli bilgiler üretilmesine açık bir alandır.

KAYNAKLAR

1. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, et al. William's Textbook of Endocrinology, 13th edition., Philadelphia: Elsevier/Saunders. 2016; 1371–1435.
2. Lambert P, Bingley PJ. What is Type 1 Diabetes? *Medicine* 2002; 30: 1–5.
3. IDF (International Diabetes Federation). International Diabetes Atlas 2015; ISBN: 978-2-930229-81-2.
4. Murarka S, Mohaved MR. Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 2010; 16(12): 971-979.
5. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30(6): 595-602.
6. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the Strong Heart Study. *Circulation* 2000; 101: 2271-2276.
7. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974; 34: 29-34.
8. Das AK, Das JP, Chandrasekar S. Specific heart muscle disease in diabetes mellitus functional structural correlation. *Int J Cardiol* 1987; 17: 299-302.
9. Nunoda S, Genda A, Sugihara N, et al. Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels* 1985; 1: 43-47.
10. Syrový I, Hodný Z. Nonenzymatic glycosylation of myosin: effects of diabetes and ageing. *Gen Physiol Biophys* 1992; 11: 301-307.
11. Hayat SA, Patel B, Khattar RS, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms diagnosis and treatment. *Clinical Science* 2004; 107: 539-557.
12. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1977; 60: 884-899.
13. Mildenerberger RR Bar-Shlomo B, Druck MN, et al. Clinically unrecognized dysfunction in young diabetic patients. *J Am Coll Cardiol* 1984; 4: 234-238.
14. Yılmaz S, Canpolat U, Aydoğdu S, et al. Diabetic Cardiomyopathy; Summary of 41 Years. *Korean Circ J* 2015; 45(4):266-272.
15. Trachanas K, Sideris S, Aggeli C, et al. Diabetic Cardiomyopathy: From Pathophysiology to Treatment. *Hellenic J Cardiol* 2014; 55: 411-421.
16. Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 142: 375–415.
17. Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin-dependent diabetic rat. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 2111-2119.
18. Kanagy NL. Vascular effects of intermittent hypoxia. *ILAR J* 2009; 50(3): 282-288.
19. Hoit BD, Castro C, Bultron G, et al. Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail* 1999; 5: 324-333.
20. Lahaye SLD, Delamarche AG, Malardé L, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2010; 9: 72-81.
21. Yu J, Fei J, Azad J, et al. Myocardial Protection by *Salvia miltiorrhiza* Injection in Streptozotocin induced Diabetic Rats through Attenuation of Expression of Thrombospondin-1 and Transforming Growth Factor- β 1. *The Journal Of International Medical Research* 2012; 40: 1016-1024.
22. Cao J, Vecoli C, Neglia D, et al. Cobalt-Protoporphyrin Improves Heart Function by Blunting Oxidative Stress and Restoring NO Synthase Equilibrium in an Animal Model of Experimental Diabetes. *Front Physiol* 2012; 3: 1-9.
23. Bento CF, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia* 2011; 54: 1946–1956.
24. Catrina SB. Impaired hypoxia-inducible factor (HIF) regulation by hyperglycemia. *J Mol Med* 2014; 92: 1025–1034.
25. Xiao H, Gu Z, Wang G, et al. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *Int J Med Sci* 2013; 10: 1412-1421.
26. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH et al. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 2008; 283:10930–10938.
27. Thangarajah H, Yao D, Chang EI et al. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:13505–13510.
28. Bento CF, Fernandes R, Ramalho J et al. The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. *PLoS ONE* 2010; 5:e15062
29. Kozhukhar AV, Yasinska IM, Sumbayev VV. Nitric oxide inhibits HIF-1 alpha protein accumulation under hypoxic conditions: implication of 2-oxoglutarate and iron. *Biochimie* 2006; 88: 411–418.
30. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, et al. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:19426-19431.
31. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447–5454.
32. Semenza GL, Wang GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268(29): 21513-8.
33. Jiang Bh, Semenza GI, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271: 1172–1180.
34. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464–468.

35. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468–472.
36. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642–22647.
37. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709–720.
38. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, et al. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; 19: 4298–4309.
39. Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 25733–25741.
40. Rabinowitz MH. Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain Oxygen Sensors: Tricking the Body into Mounting Orchestrated Survival and Repair Responses. *J Med Chem* 2013; 56: 9369–9402.
41. Semenza GL, Agani F, Booth G, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 1997; 51: 553–555.
42. Berra E, Ginouvès A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Reports* 2006; 7(1): 41–45.
43. 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.
44. Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, et al. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 343–349.
45. Willam C, Maxwell PH, Nichols L, et al. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 68–77.
46. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003; 22: 4082–4090.
47. Berra E, Roux D, Richard DE, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Reports* 2001; 2(7): 615–620.
48. Katschinski DM. In vivo functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. *Acta Physiol* 2009; 195: 407–414.
49. Tian YM, Mole DR, Ratcliffe PJ, et al. Characterization of different isoforms of the HIF prolyl hydroxylase PHD1 generated by alternative initiation. *Biochem J* 2006; 397: 179–186.
50. Zhang Q, Gu J, Li L, et al. Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2009; 16: 413–424.
51. Metzén E, Stiehl DP, Doege K, et al. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J* 2005; 387: 711–717.
52. Stiehl DP, Wirthner R, Kôditz J, et al. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 2006; 281: 23482–23491.
53. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 38458–38465.
54. Cervera AM, Apostolova N, Luna-Crespo F, et al. An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity. *Cancer Lett* 2006; 233: 131–138.
55. Place TL, Domann FE. Prolyl-hydroxylase 3: Evolving roles for an ancient signaling protein. *Hypoxia* 2013; 2013: 13–17.
56. Luo W, Lin B, Wang Y, et al. PHD3-mediated prolyl hydroxylation of nonmuscle actin impairs polymerization and cell motility. *Mol. Biol. Cell* 2014; 25: 2788–2796.
57. Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 145: 732–744.
58. Garvalov BK, Foss F, Henze AT, et al. PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. *Nat Commun* 2014; 5: 5577.
59. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, et al. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 2002; 277: 39792–39800.
60. Tuckerman JR, Zhao Y, Hewitson KS, et al. Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett* 2004; 576(1-2): 145–150.
61. Chan DA, Sutphin PD, Yen SE et al. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6415–6426.
62. Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. 2010; *Acta Pharmacologica Sinica* 31: 1085–1094.
63. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 79–85.
64. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res* 2008; 77(3): 463–470.
65. Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1- α Reduces Infarction and Attenuates Progression of Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction in the Mouse. *JACC* 2005; 46(11): 2116–2124.
66. Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 α protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 314–20.

67. Shizukuda Y, Mallet Rt, Lee SC, et al. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res* 1992; 26(5): 534–542.
68. Verges S, Chacaroun S, Ribout-Godin D, et al. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Front Pediatr* 2015; 3(58): 1-14.
69. Faramoushi M, Sasan RA, Sarraf VS, et al. Cardiac fibrosis and down regulation of GLUT4 in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by chronic exposures to intermittent altitude. *J Cardiovasc Thorac Res* 2016; 8(1): 26-33.
70. Akat F. Deneysel Tıp I Diyabette Aralıklı Hipoksinin Sol Ventrikül Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Danışman: Prof.Dr. Hakan FIÇICILAR. 2016; 10132926 nolu Fizyoloji Doktora Tezi.
71. Xi L, Taher M, Yin C, et al. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1alpha and AP-1 and iNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 2369–2375.
72. Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 542–548.
73. Bao W, Qin P, Needle S, et al. Chronic inhibition of hypoxia-inducible factor (hif) prolyl 4-hydroxylase improves ventricular performance, remodeling and vascularity following myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56(2): 147-155.
74. Tan T, Luciano JA, Scholz PM, et al. Hypoxia inducible factor-1 improves the actions of positive inotropic agents in stunned cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 904–11.
75. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, et al. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res* 2006; 98: 133–40.
76. Thirunavukkarasu M, Selvaraju V, Dunna NR, et al. Simvastatin treatment inhibits hypoxia inducible factor 1-alpha-(HIF-1alpha)-prolyl-4- hydroxylase 3 (PHD-3) and increases angiogenesis after myocardial infarction in streptozotocin-induced diabetic rat. *International Journal of Cardiology* 2013; 168: 2474–2480.
77. Xia Y, Gong L, Liu H, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase 3 ameliorates cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 403: 21–29.