

Действие акадесина на клетки рака молочной железы в условиях гипоксии

А.М. Щербаков¹, Н.Э. Вавилов¹, О.Е. Андреева¹, **Б.В. Тяглов²**, А.С. Мионов²,
Р.С. Шакулов², К.В. Лобанов², С.В. Яроцкий², А.А. Штиль¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»;
Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Контакты: Александр Михайлович Щербаков alex.scherbakov@gmail.com

Производное рибозида акадесин (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) проходит клинические испытания как перспективный противоопухолевый препарат. Внутриклеточная мишень акадесина аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (АМПК, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) – важный регулятор энергетического метаболизма. Правомерно предположить, что акадесин окажется активен в условиях гипоксии опухолей. В нормоксии (инкубация клеток в атмосфере с 21 % кислорода) акадесин вызывал торможение пролиферации и гибель клеток аденокарциномы молочной железы, в том числе линии трижды негативного рака. При снижении парциального давления кислорода до 1 % (экспериментальная гипоксия) акадесин ингибировал активацию промотор-репортерной конструкции, обусловленную транскрипционным фактором HIF-1α (*hypoxia inducible factor 1 alpha*). Этот эффект наблюдали при действии акадесина в концентрациях, сопоставимых с цитотоксическими. Акадесин сохранял цитотоксичность в условиях гипоксии и снижал обусловленную гипоксией устойчивость клеток линии MDA-MB-231 к действию цисплатина. Эти результаты расширяют область применения акадесина и позволяют предположить его эффективность в комбинированных режимах лекарственной терапии рака молочной железы, в том числе для опухолей с низкой оксигенацией.

Ключевые слова: акадесин, рак молочной железы, линия клеток MCF-7, гипоксия, транскрипционные факторы

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-60-64

Effect of acadesine on breast cancer cells under hypoxia

A.M. Shcherbakov¹, N.E. Vavilov¹, O.E. Andreeva¹, **B.V. Tyaglov²**, A.S. Mironov²,
R.S. Shakulov², K.V. Lobanov², S.V. Yarotskiy², A.A. Shtil¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms; 1 1st Dorozhnyy Proezd, Moscow 117545, Russia

The riboside derivative acadesine (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside) is currently being tested in clinical trials as a promising anti-tumor drug. Intracellular target of acadesine is adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), an important regulatory molecule of energy metabolism. It is expected that acadesine would be active in tumors under hypoxia conditions. In normoxia (cells incubated in 21 % oxygen), acadesine inhibited proliferation and induced cell death of breast adenocarcinoma, including the triple negative breast cancer line. When oxygen partial pressure was decreased to 1 % (experimental hypoxia), acadesine inhibited activation of reporter construct responsive to HIF-1α (*hypoxia inducible factor 1 alpha*) transcription factor. This effect was observed for acadesine in concentrations close to cytotoxic. Acadesine retained cytotoxicity under hypoxia and decreased the survival of the MDA-MB-231 cell line when used in combination with cisplatin. These results considerably widen acadesine's field of application and allow to assume its efficacy in chemotherapy combination regimens for breast cancer, including the tumors with low oxygenation.

Key words: acadesine, breast cancer, MCF-7 cell line, hypoxia, transcription factors

Введение

Злокачественные новообразования молочной железы занимают лидирующее место среди онкологических заболеваний у женщин. Статистика, представленная Global Burden of Disease Cancer Collaboration, свидетельствует, что ежегодно регистрируется более 1,8 млн случаев впервые выявленного рака молочной железы (РМЖ) и отмечено более 13 млн случаев инвалидности и нетрудоспособности [1]. Ежегодно умирают более

460 тыс. больных [1]. Ограниченная эффективность гормоно- и химиотерапии и развитие лекарственной устойчивости остаются причинами столь неблагоприятного течения заболевания. Способность противоопухолевых препаратов снижать уровень пролиферации и вызывать гибель опухолевых клеток лимитируется и физиологическими условиями в опухоли, главным образом снижением парциального давления кислорода (гипоксия).

Поиск новых возможностей индукции гибели опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых проводится в химических классах так называемых метаболических регуляторов. В последние годы исследованы противоопухолевые эффекты бигуанидов (высокоспецифичные агонисты аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) и регуляторы митохондриального метаболизма), дихлорацетата (модулятор митохондриального метаболизма), FK866 (регулятор обмена никотинамидадениндинуклеотида), аргининдеиминазы (регулятор биодоступности аргинина) и других препаратов нового поколения [2–5]. Для отдельных метаболических регуляторов успешно завершены I и II фазы клинических исследований.

Ранее нами установлена способность акадезина (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) – агониста AMPK – вызывать неапоптотическую гибель опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых [6]. Действие акадезина показано на различных моделях: он подавлял пролиферацию клеток ретинобластомы [7], нейробластомы [8], рака поджелудочной железы [9], гепатомы [10], меланомы [11], В-лимфоцитарного лейкоза [12] и РМЖ [13]. Акадезин вызывал торможение роста трансплантатов ретинобластомы у бестимусных мышей на ~ 50 % [14]. O.S. El-Masry и соавт. обнаружили, что чувствительность клеток РМЖ к акадезину зависит от гистологической принадлежности. Так, в клетках линии T47D акадезин вызывает задержку клеточного цикла, а в клетках линий MCF-7 и MDA-MB-231 наблюдаются признаки апоптоза [13].

Акадезин активирует AMPK – основной внутриклеточный метаболический сенсор. Для AMPK-зависимой гибели необходима LKB-1 (liver kinase B1) – серин-треониновая протеинкиназа, фосфорилирующая AMPK [15]. В неопухолевых клетках основная роль AMPK заключается в перестройке метаболизма на время накопления аденозинмонофосфата (АМФ)/дефицита аденозинтрифосфата (АТФ), в частности усиливаются окисление жирных кислот и гликолиз. Одновременно с этими процессами низкое содержание АТФ вызывает замедление пролиферации до восстановления энергетического пула. Несколько сложнее устроена регуляция AMPK в опухолевой клетке. С одной стороны, дефицит АТФ «переключает» клетку на режим голодания (усиление гликолиза, блокирование mTOR-сигнального пути и т.д.), с другой, вследствие злокачественной трансформации не происходит остановки пролиферации, и это определяет возможность апоптоза после истощения запаса питательных веществ. Акадезин, являющийся миметиком АМФ, приводит опухолевую клетку в состояние «мнимого» голодания, которое заканчивается различными формами клеточной гибели (в зависимости от гистологического типа опухоли) [6, 13]. В качестве объяснения AMPK-индуцированной гибели

опухолевых клеток часто рассматривают участие этой киназы в p53-опосредованных каскадах. AMPK фосфорилирует p53 по серину 15, что, в свою очередь, приводит к стабилизации белка и его накоплению в митохондриях [16–18]. Фосфорилированный p53 индуцирует высвобождение проапоптотического белка BAK из комплекса с Bcl-xL с последующим усилением апоптоза и, соответственно, чувствительности клетки к химиотерапевтическим агентам [19, 20].

Среди белков-партнеров AMPK, регулирующих выживаемость опухолевых клеток при действии противоопухолевых препаратов, важную роль играет транскрипционный фактор, опосредующий эффекты гипоксии (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1α) [21, 22]. На линии рака предстательной железы DU145 показано, что AMPK участвует в регуляции HIF-1α-зависимых процессов [21]. В. Faubert и соавт. обнаружили значительное снижение экспрессии HIF-1α в клетках с подавленной экспрессией AMPK [23], однако данные о действии агонистов AMPK (метформин, акадезин) на активность HIF-1α отсутствуют. Мы предположили, что акадезин влияет на активность HIF-1α в клетках РМЖ и регулирует их выживаемость.

Материалы и методы

Линии клеток и культивирование. Клетки РМЖ человека линий MCF-7, HCC1395 и MDA-MB-231 получены из American Type Culture Collection (США) и хранились в криобанке РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (GORDIZ, Россия). Линии MCF-7, HCC1395 и MDA-MB-231 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, ПанЭко, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США), пируват натрия (0,11 мг/мл) (ПанЭко, Россия) и 50 ед./мл гентамицина (ПанЭко, Россия), при температуре 37 °С в 5 % CO₂ при относительной влажности 80–85 %. В экспериментах использовали культуры в логарифмической стадии.

Оценка цитотоксичности. Этот показатель определяли в МТТ-тесте, основанном на восстановлении жизнеспособными клетками 3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромидом [24]. Значение IC₅₀ (концентрация препарата, при которой выживает 50 % клеток) вычисляли в GraphPad Prism методами нелинейной регрессии. Исследования влияния гипоксии на клетки РМЖ проводили в двухгазовом инкубаторе Binder (Германия) с возможностью снижения парциального давления кислорода до 1 %.

Оценка HIF-1α-зависимой трансактивации гена-репортера. Для определения транскрипционной активности HIF-1α клетки линии MCF-7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем респонсивного элемента, активируемого гипоксией (hypoxia response element,

HRE-LUC). Плазмида HRE-LUC была предоставлена G. Melillo [25]. Для трансфекции использовали Metafectene PRO (Biontex Laboratories, Германия). Для котрансфекции использовали плазмиду, содержащую ген β -галактозидазы под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV- β -gal). Активность этого промотора не регулируется гипоксией. Определение активности люциферазы проводили на планшетном люминометре TECAN Infinite M200Pro (Promega, США) согласно рекомендациям производителя; уровень β -галактозидазы определяли по стандартному протоколу на анализаторе MultiScanFC (ThermoScientific, США). HIF-1 α -зависимую трансактивацию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Каждый опыт воспроизводили не менее 3 раз. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ DATAPLOT и GraphPad Prism.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга клетки на стадии 80 % монослоя лизировали в 150 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетата, 1 мМ дитиотрейтола, по 1 мкг/мл апротинина, леупептина и пепстатина, по 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия. Образцы инкубировали на льду 20 мин, затем центрифугировали (10000g, 10 мин, при температуре 4 °C), проводили электрофорез в 10 % полиакриламидном геле, перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и иммуноблоттинг. Содержание общего и фосфорилированного AMPK и mTOR определяли с помощью антител Cell Signaling Technology (США). Детекцию выполняли с вторичными антителами к иммуноглобулину кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США) в системе для анализа LAS 4000 (GE HealthCare, США).

Результаты и обсуждение

Цитотоксическое действие акадезина на клетки РМЖ. Акадезин получали микробиологическим способом с использованием оригинального рекомбинантного штамма [26]. Цитотоксическое действие акадезина анализировали на 3 линиях РМЖ: клетки гормонозависимого рака MCF-7, трижды негативного рака MDA-MB-231 и HCC1395. МТТ-тест, проведенный после 72-часовой инкубации клеток, показал, что IC₅₀ акадезина для клеток MCF-7 (люминальный А подтип рака) составляет 0,28 мМ. Клетки трижды негативного рака MDA-MB-231 также чувствительны к акадезину: для этой линии значение IC₅₀ составило 0,05 мМ, для другой линии трижды негативного РМЖ HCC1395 – 0,86 мМ (средние величины по результатам 3 независимых экспериментов). Таким образом, акадезин демонстрирует достаточно высокую активность в отношении РМЖ различных молекулярных подтипов.

Акадезин, АМРК и гипоксия. В клетках акадезин превращается в фосфорилированный метаболит, ZMP (5-амино-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид-монофосфат). Накопление ZMP приводит к индукции АМРК – сенсора изменений соотношения АМФ:АТФ. Ранее показано непосредственное участие АМРК в ответе клеток на гипоксию [21]. Мы предположили, что гипоксия может модулировать действие акадезина на АМРК-контролируемые процессы в клетках РМЖ.

Методом иммуноблоттинга установлено, что в нормоксии акадезин вызывает незначительное накопление фосфорилированной (активированной) формы АМРК в клетках линии MCF-7 (рис. 1). В условиях гипоксии акадезин – более сильный активатор АМРК. При действии акадезина не выявлено изменений активности протеинкиназы mTOR (mammalian target of rapamycin), одного из возможных эффекторов АМРК. Это может свидетельствовать об активации других сигнальных путей в клетках РМЖ в обход mTOR.

Влияние акадезина на HIF-1 α -зависимую трансактивацию. Активация транскрипционного фактора HIF-1 α – важнейший механизм адаптации опухоли к гипоксии [27, 28]. HIF-1 α -зависимые сигналы опосредуют выживание опухоли в гипоксии. В частности, HIF-1 α регулирует накопление фактора роста эндотелия сосудов в опухоли и стимуляцию неоангиогенеза [29]. Оценку влияния акадезина на HIF-1 α -зависимую транскрипцию проводили с помощью репортерного анализа. Клетки линии MCF-7 трансфецировали плазмидой, несущей ген люциферазы под контролем HIF-1 α -чувствительного промотора. Через 24 ч после трансфекции клетки помещали в инкубатор с содержанием 1 % кислорода. Через 8 ч измеряли активность люциферазы (см. Материалы и методы). На рис. 2 показано, что акадезин в относительно низких концентрациях (начиная с 0,12 мМ) снижает HIF-1 α -опосредованную трансактивацию. С увеличением концентрации акадезина падение активности HIF-1 α нарастает; при 2 мМ акадезина трансактивирующая

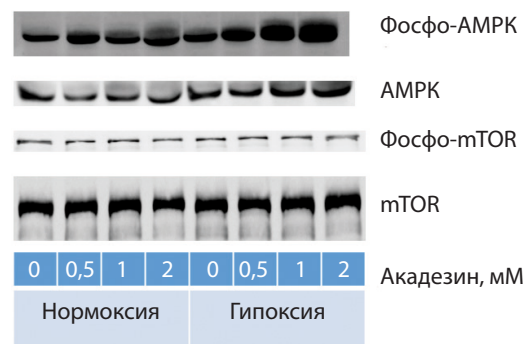


Рис. 1. Гипоксическая активация АМРК – основной мишени акадезина. Клетки линии MCF-7 инкубировали с указанными дозами акадезина в нормоксии или гипоксии (1 % кислорода) в течение 24 ч. Экспрессию белков определяли методом иммуноблоттинга. АМРК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (adenosine monophosphate-activated protein kinase)

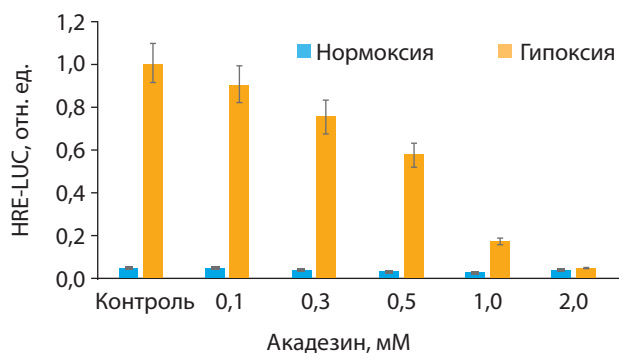


Рис. 2. Ингибирование акадезином индуцированной активности HIF-1 α . Клетки MCF-7 трансфицировали плазмидой, несущей ген-репортер (люциферазу) под контролем HIF-1 α -чувствительного промотора. Для контроля изменений генной транскрипции, независимых от гипоксии, использовали котрансфекцию клеток плазмидой pCMV- β -gal (см. Материалы и методы). HIF-1 α активировали 8-часовой инкубацией клеток в атмосфере с 1 % кислорода. HIF-1 α -зависимую транскрипцию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы в лизатах клеток

способность HIF-1 α не отличается от таковой в нормоксии (отсутствие гипоксической индукции). Таким образом, акадезин эффективно ингибирует сигналинг, опосредованный HIF-1 α , — механизм, важный для выживаемости опухолевых клеток при пониженном содержании кислорода.

Устойчивость клеток РМЖ к действию цисплатина в гипоксии. Снижение оксигенации приводит к значительным метаболическим изменениям в опухолевой клетке: активируются гипоксические сигнальные пути (HIF-1 α , VEGF/VEGFRs, FGF, PDGF), усиливаются гликолиз и активность транспортеров глюкозы [29–31]. Вследствие этих изменений при гипоксии может снижаться чувствительность опухоли к химиопрепаратам. На рис. 3 показано, что инкубация клеток линии MDA-MB-231 в атмосфере с 1 % кислорода снижает цитотоксичность цисплатина. Учитывая высокую активность акадезина как индуктора AMPK и ингибитора HIF-1 α в гипоксии, мы предположили, что с его помощью возможно повысить чувствительность клеток к цисплатину. Комбинация цисплатина с акадезином была эффективна и в нормоксии, и в гипоксии: после 72 ч инкубации выжило менее 30 % клеток. При этом

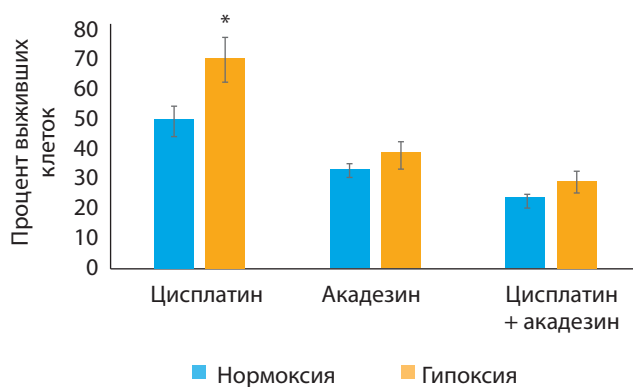


Рис. 3. Эффекты акадезина на выживаемость клеток рака молочной железы в гипоксии и в присутствии цисплатина. Данные МТТ-теста через 72 ч инкубации клеток линии MDA-MB-231 в нормоксии (21 % кислорода) или гипоксии (1 % кислорода); цисплатин (15 мкМ), акадезин (0,25 мМ); * $p < 0,05$ по сравнению с действием цисплатина в нормоксии

акадезин повышает цитотоксичность цисплатина в гипоксии практически до соответствующего показателя в нормоксии, т. е. отменяет вызванное гипоксией повышение выживаемости клеток с цисплатином.

Заключение

В целом представленные данные свидетельствуют о том, что акадезин участвует в регуляции сигнальных путей AMPK/HIF-1 α , поддерживающих выживание клеток РМЖ в гипоксии. Комбинирование с акадезином позволяет повысить цитотоксичность цисплатина. Этот результат особенно важен, так как при гипоксии эффективность цисплатина ограничена. Таким образом, обоснована перспективность использования акадезина для снижения выживаемости клеток РМЖ в условиях гипоксии. Один из механизмов такой сенситизации — блокирование акадезином HIF-1 α -зависимых молекулярных каскадов. С учетом значительной роли HIF-1 α в усилении экспрессии VEGF-A соответственно, в развитии и поддержании сети внутриопухолевых сосудистых капилляров [32] высокую эффективность может показать комбинация антиангиогенной терапии и акадезина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fitzmaurice C., Dicker D., Pain A. et al. The Global Burden of Cancer 2013. JAMA Oncol 2015;1(4): 505–27.
- Liu H.Y., Li Q.R., Cheng X.F. et al. NAMPT inhibition synergizes with NQO1-targeting agents in inducing apoptotic cell death in non-small cell lung cancer cells. Chin J Nat Med 2016;14(8):582–9.
- Szlosarek P.W., Steele J.P., Nolan L. et al. Arginine deprivation with pegylated arginine deiminase in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient malignant pleural mesothelioma: a randomized clinical trial. JAMA Oncol 2016;3(1):58–66.
- Miraki-Moud F., Ghazaly E., Ariza-McNaughton L. et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells *in vivo*. Blood 2015;125(26):4060–8.
- Khan A., Andrews D., Blackburn A.C. Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. World J Clin Cases 2016;4(10):336–43.
- Glazunova V.A., Lobanov K.V., Shakulov R.S. et al. Acadesine triggers non-apoptotic death in tumor cells. Acta Naturae 2013;5(3):74–8.
- Theodoropoulou S., Kolovou P.E., Morizane Y. et al. Retinoblastoma cells are inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. FASEB J 2010;24(8):2620–30.

8. Garcia-Gil M., Pesi R., Perna S. et al. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* 2003;117(4):811–20.
9. Kefas B.A., Heimberg H., Vaulont S. et al. AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 2003;46(2):250–4.
10. Meisse D., van de Castele M., Beauloye C. et al. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett* 2002;526(1–3):38–42.
11. Woodard J., Platanius L.C. AMP-activated kinase (AMPK)-generated signals in malignant melanoma cell growth and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398(1):135–9.
12. Campas C., Lopez J.M., Santidrian A.F. et al. Acaesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 2003;101(9):3674–80.
13. El-Masry O.S., Brown B.L., Dobson P.R. Effects of activation of AMPK on human breast cancer cell lines with different genetic backgrounds. *Oncol Lett* 2012;3(1):224–8.
14. Theodoropoulou S., Brodowska K., Kayama M. et al. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits the growth of retinoblastoma *in vivo* by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis. *PLoS One* 2013;8(1):e52852.
15. Song X., Huang D., Liu Y. et al. AMP-activated protein kinase is required for cell survival and growth in HeLa-S3 cells *in vivo*. *IUBMB Life* 2014;66(6):415–23.
16. Nieminen A.I., Eskelinen V.M., Haikala H.M. et al. Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(20):E1839–48.
17. Wang Z., Wang N., Liu P. et al. AMPK and Cancer. *EXS* 2016;107:203–26.
18. Sun Y., Tao C., Huang X. et al. Metformin induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating an AMPK/p53/miR-23a/FOXO1 pathway. *Oncotargets Ther* 2016;9:2845–53.
19. Neise D., Graupner V., Gillissen B.F. et al. Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of Bak. *Oncogene* 2008;27(10):1387–96.
20. Dai H., Ding H., Meng X.W. et al. Constitutive Bak activation as a determinant of drug sensitivity in malignant lymphohematopoietic cells. *Genes Dev* 2015;29(20):2140–52.
21. Lee M., Hwang J.T., Lee H.J. et al. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem* 2003;278(41):39653–61.
22. Liao D., Johnson R.S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):281–90.
23. Faubert B., Boily G., Izreig S. et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*. *Cell Metab* 2013;17(1):113–24.
24. Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity. *Arzneimittelforschung* 1989;39(7):747–9.
25. Rapisarda A., Uranchimeg B., Sordet O. et al. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 2004;64(4):1475–82.
26. Lobanov K.V., Errais Lopes L., Korol'kova N.V. et al. Reconstruction of purine metabolism in bacillus subtilis to obtain the strain producer of AICAR: a new drug with a wide range of therapeutic applications. *Acta Naturae* 2011;3(2):79–89.
27. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70(5):1469–80.
28. Kimbro K.S., Simons J.W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(3):739–49.
29. Schneider B.P., Miller K.D. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(8):1782–90.
30. Dimova I., Popivanov G., Djonov V. Angiogenesis in cancer – general pathways and their therapeutic implications. *J BUON* 2014;19(1):15–21.
31. Mittal K., Ebos J., Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Semin Oncol* 2014;41(2):235–51.
32. Subhani S., Vavilala D.T., Mukherji M. HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. *Angiogenesis* 2016;19(3):257–73.