EPIGENETSKI LIJEKOVI

Šimatović, Domagoj

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:593575

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Domagoj Šimatović

EPIGENETSKI LIJEKOVI

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju **Završni rad**
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

EPIGENETSKI LIJEKOVI

Domagoj Šimatović

Rad je izrađen: na Odjelu za biologiju
Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Sažetak: Epigenetika je znanost koji se bavi proučavanjem epigenoma, odnosno, proučava mehanime aktivacije i supresije određenih gena bez promjene na molekuli DNA. Mehanizmi epigenetike kojima se regulira ekspresija gena su metilacija DNA, sustav interferirajućih RNA i modifikacija histona. Istraživanjem navedenih mehanizama pojavili su se novi lijekovi koji djeluju na maligne poremećaje putem epigenetskih mehanizama. U ovom radu biti će opisani trenutno dopušteni lijekovi, njihovi mehanizmi djelovanja i konačni cilj djelovanja.

Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: epigenetika, metilacija, lijekovi, tumori, epigenetski lijekovi

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u ijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor's thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department od Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific area: Natural science
Scientific field: Biology

EPIGENETIC DRUGS

Domagoj Šimatović

Thesis performed at: Department of Biology
Supervisor: Ivna Štolfa Čamagajevac, Ph. D., assistant professor

Short abstract: Epigenetics is science that studies epigenoma, that is, studies the mechanisms of activation and suppression of certain genes without altering the DNA molecule. Mechanisms of epigenetics that regulate genes expression in the cell are methylation of DNA, system of RNA interfering and histone modification. Research of these epigenetic mechanisms leads to creation of new drugs that have possibilites to act on malignant disoreder. This paper will describe the currently permissible drugs, their mechanism of action and the ultimate goal in their use.

Original in: Croatian
Key words: epigenetics, methylation, drugs, epigenetic drugs, tumors

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Universityof J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. OSNOVNI DIO 2

2.2. DNA metilacija 2

2.3. Modifikacije histona 3

2.3.1. Acetilacija histona 4

2.4. RNA interferencija (RNAi) 5

3. ODOBRENI LIJEKOVI 7

3.1. Lijekovi odobreni od strane FDA 7

3.2 Decitabin 7

3.2 Vorinostat 8

3.3 Romidepsin 8

3.4 Ruxolitinib 9

3.5 Belinostat 9

3.6 Panobinostat 10

4. ZAKLJUČAK 11

5. LITERATURA 12

1. UVOD

Stanice u našem organizmu potekle su iz oplođene jajne stanice koja daje dvjestotinjak različitih tipova stanica. Iako sve stanice sadrže isti genom, zbog utjecaja različitih faktora rasta, hormona i signalnih molekula razne vrste one se diferenciraju u različite vrste tkiva. Različitim pakiranjem svojeg kromatina omogućuju različitu aktivnost gena u različitim stanicama.

Područja dostupna transkripciji unutar kromatina nazivaju se otvoreni ili eukromatin a ona koja nisu su zatvoreni ili heterokromatin. Različite informacije koje pristižu na istu DNA čine razliku između te dvije vrste kromatina. Informacije se upisuju na ili preko genetičkog materijala. Takav način upisivanja novih informacije je osnova pojma epigenetika. Pošto se genom ne smije mijenjati, on ne sudjeluje u staničnoj prilagodbi uvjetovane zahtjevima okruženja ili samog organizma. Epigenetičke modifikacije genoma imaju tu mogućnost te su one odgovorne za programiranu smrt, proliferaciju, diferencijaciju i akomodaciju na određene promijene (Barrero i sur. 2010).

2. OSNOVNI DIO

2.1. Epigenetika

Kako bi opisao interakciju gena i genskih produkata, 1942. Conrad Hal Waddington došao je do pojma "epigenetika". Prema definiciji, pojam epigenetika se odnosi na molekularne puteve koji čine ekspresiju genotipa u fenotip. Razvojem genetike definicija epigenetike tijekom vremena je doživljavala sitne preinake. Danas, epigenetika je definirana kao grana biologije koja se bavi proučavanjem mejotičkih i mitotičkih promjena u ekspresiji gena, koje na koncu ne uzrokuju promjenu u genotipu već samo u fenotipu. Sam pojam epigenetika nam sa svojim grčkim prefiskom "epi" (izvan ili preko) govori da se promjene događaju izvan DNA sekvence.

Epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, RNA interferencija te modifikacija histona koji zajednički djeluju kao jedinstveni sustav u regulaciji ekspresije gena (Barrero i sur., 2010).

2.2. DNA metilacija

Epigenetski mehanizam koji je najistraživaniji je proces DNA metilacije. Proces u kojem se s metil donora S-adenozil metionina (SAM), metilna skupina dodaje na 5' poziciju citozin CpG (citzoni-fosfat-gvanin) dinukleotid i nastaje 5-metilcitozin. Reakciju DNA metilacije katalizira DNA-metiltransferaza (DNMT). Dodavanjem metilne skupine mijenja se funkcija DNA. Ona je važna za normalan razvoj, te je povezana s mnogim ključnim procesima koji uključuju genomski utisak, represiju repetitivnih elemenata, kancerogenezu, starenje i inaktivaciju X kromosoma.

Citozin i adenin su dva od četiri DNA nukleotida koja mogu biti metilirana. Kod prokariota pojavljuje se metilacija adenina. Stopa metilacije citozina ovisi od vrste u kojoj se događa. Primjer, kod vrste *Escherichia coli* događa se u 2,3%, 7,6% kod vrste *Mus musculus* (Capuano i sur., 2014). Metilacijom citozina nastaje 5-metilcitozin, odvija se na petom mjestu pirimidinskog prstena gdje se nalazi metilna skupina timina, tako ga odvajajući od analoga RNA baze uracila koji nema metilnu skupinu.

Iako se CpG dinukletiodi (nemetilirani i metilirani) nalaze u relativno niskom broju unutar ljudskog genoma, broj im znantno rase u kratkim odsječcima DNA nazvanima CpG otoci. Da bi kratki odjsečak dobio naziv CpG otok u duljini od 0,5 kb suma gvanina i citozina

mora iznositi više od 55% ukupnog broja baza. Unutar DNA kralježnjaka mogu se pronaći u područjima 5' kraja ljudskih gena, odnosno u područjima genskih promotora gdje u ovisnosti o njihovoj metiliranost imaju ulogu regulatora genske transkripcije. 60% ljudskih gena ima CpG otoke u području genskih promotora. Za razliku od većine CpG dinukletioda u normalnim ljudskim stanicama oni nisu metilirani (Takai i Jones, 2002).

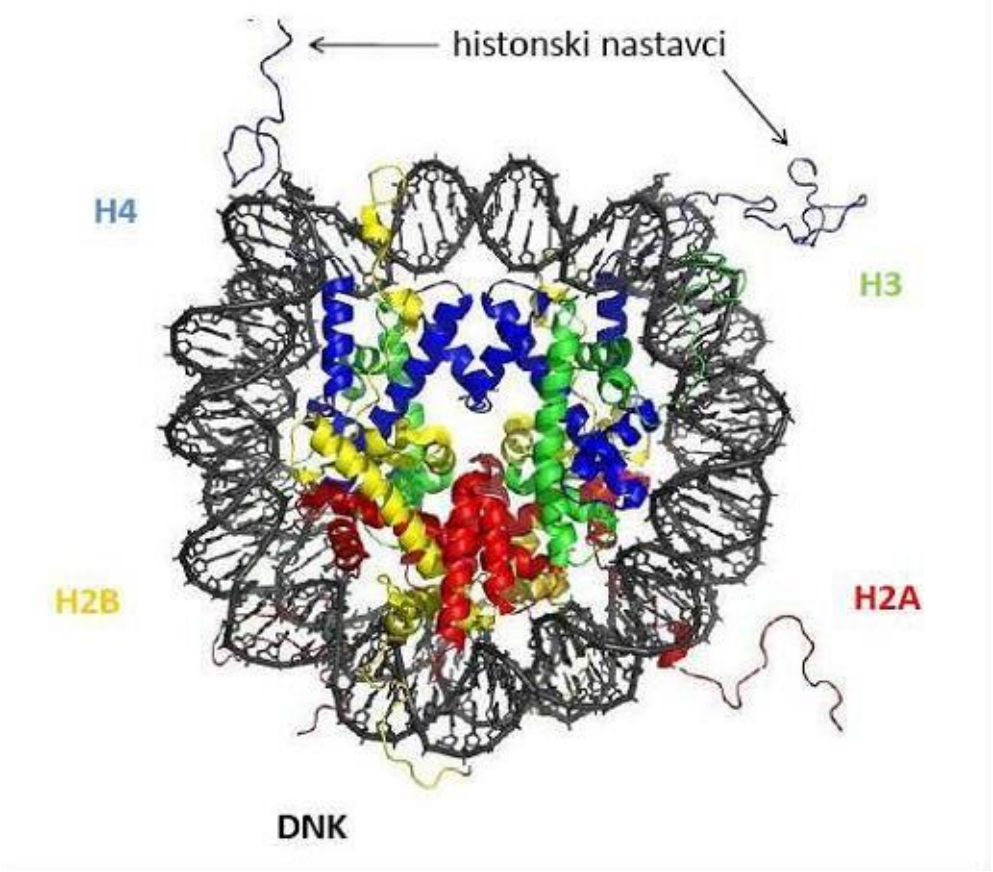
Represorski proteini poput, Cpg MBD (engl. *Methyl biding domain*) i MeCP2 (engl. *Methyl CpG-biding protein*) potiču vezanje histon-modificirajućeg kompleksa koji mijenjaju strukturu kromatina zbog čega on postaje zatvoren. Ovim vezanjem histon-modificirajućeg kompleksa sprječava se vezanje transkripcijskih faktora na molekulu DNA. Među ostalim ulogama, DNA metilacija sudjeluje u procesu diferencijacije tkiva. DNA metilacijom se mijenja ekspresija gena koja uzrokuje trajne, jednosmjerne promjene. Metilacijom se također postiže fenomen u epigenetici nazvan utiskivanje gena. Utisnuti gen je metiliran i nije aktivan. Na taj način jajna stanica i spermij imaju kromosome koji su na različiti način utisnuti. U gametogenezi stari utisak se briše, dok ovisno o spolu različiti geni se utiskuju (Rainier i sur., 1993).

2.3. Modifikacije histona

Modifikacije histona su epigenetički mehanizmi kojima je također moguća regulacija genske ekspresije. One svojim posttranslacijskim djelovanjem na modifikacije N-terminalnih krajeva histona mijenjaju strukturu kromatina i time dolazi do aktivacije ili utišavanje gena. Modifikacije koja se događaju, a to su acetilacija, metilacija, ubikvitinacija, sumoilacija i fosforilacija su reverzibilne. Njihovom kombinacijom se dobiva "histonski kod", a njih izvode dvije skupine enzima. Jedna skupina stavlja, dok druga uklanja određenu skupinu s N-terminalnog kraja histona. Ova reakcija dovodi do dva osnovna efekta. Cis-efekt, kojim postiže smanjeno vezanje DNA za histone, netraliziranjem pozitivnog naboja. Drugi efekt, transf-efekt, koji regrutira druge proteina, poput HMBP (engl. *Histone Modification Binding Proteins*).

Histoni su bazični proteini stanica eukariota koji s molekulom DNA čine kromatin. Nukleosom je osnovna građevna jedinica kromatina. Izgrađen od histonskog oktamera, kojeg čine histoni H2A, H2B, H3 i H4 oko kojih se omata DNA. Osim navedenih, u smatanju DNA molekule sudjeluju histoni H1 i H5 koji sudjeluju kao vezujući proteini. Histoni imaju veliku ulogu u transkripcijskoj aktivnosti, oni sudjeluju u regulaciji pakiranja DNA što direktno

utječe na transkripciju. Kromatin tijkom interfaze u jezgri ima dva stanja. Prvo stanje je eukromatina, odnosno područje akitvnog prepisivanja gena i heterokromatin, odnosno područje inaktiviranih gena. Epigenetički mehanizmi upravljaju organizacijom kromatina u različitim stanicama i stadijima staničnog ciklusa (Murray i sur., 2009).



Slika 5. Trodimenzionalni prikaz nukleosoma: oko oktamera histonskih proteina (po par H2A, H2B, H3 i H4) omotano je oko 150 parova baza DNA, tvoreći osnovnu građevnu jedinicu kromatina – nukleosom. Iz nukleosoma se projiciraju histonski nastavci s lizinskim aminokiselinskim ostatcima podložnim posttranslacijskim enzimatskim promjenama (Kalac, 2010).

2.3.1. Acetilacija histona

Enzimatskim dodavanjem acetilne skupine s acetil-koenzima A dolazi do acetilacije histona. Acetilacija histona usko je vezana za regulaciju mnogih staničnih procesa među kojima su transkripcija i dinamika kromatina, utišavanje gena, apoptoza, diferencijacija, DNA

replikacija, DNA popravak, import u jezgru i neuronsku represiju. Histon acetil-transferaze (HAT) su enzimi uključeni u acetilaciju te igraju važnu ulogu u kontroli acetilacije H3 i H4 histona. Postoji više od 20 acetil-transferaza. Jačina acetilacije H3 histona se može povećati povećanjem inhibicije deacetilacije histona pomoću histon-deacetilaza (HDAC) i smanjenjem inhibicije histon acetil-trasnferaze (Kuo i Allis, 1998). Neuravnotežena acetilacija histona usko je povezana s tumorogenezom i samim napretkom razvoja tumora. Daljnja istraživanja epigenetske regulacije dovest će do boljeg razumijevanja same regulacije te razvoja lijekova koji ciljano djeluju na acetil-transferaze (Dokmanović i sur., 2007).

U ljudskom se organzimu HAT enzimi dijele prema svojoj rasprostanjenosti po tkivima i specifičnosti za proteinski supstrat.

Ukupno je otkriveno 18 različitih HDAC enzima unutar ljudskih stanica. Oni su podjeljeni u 4 razreda prema homologiji s HDAC enzimima kvasca, odnosno, onih organizama u kojima su prvi puta pronađeni. Razlike među razredima su bitne s farmakološkog stajališta jer otvaraju put sintetiziranju specifičnih molekula za njihovu inhibiciju (Cole, 2008).

2.4. RNA interferencija (RNAi)

U nekodirajućem dijelu genoma nalazi se 25% sekvenci koje se prepisuju u RNA kao krajnji produkt. Takve RNA nazivamo nekodirajuće RNA (ncRNAs, engl. *non-protein-coding RNAs*) jer se ne prevode do proteina. Prema današnjim sponzajama one sudjeluju u svim najvažnijim staničnim procesima poput transkripcijske i posttranskripcijske regulacije ekspresije gena, inaktivacije X kromosoma (Kanduri i sur., 2009), suprimiranja transpozona te poticanja inhibicije i degradacije viralnih genoma (Zabolotnevai sur., 2010). ncRNA sudjeluju u mehanizimima regulacije ekspresije gena te pripadaju epigenetičkom sustavu RNA intereferecije. Uz njih, tu još pripadaju male intereferirajuće RNA (siRNAs, engl. *Short interfering RNAs*) i mikro RNA (miRNA) (Carthew i Sontheimer, 2009; Taft i sur., 2010). Obje djeluju unutar citoplazme stranice onemogućavajući translaciju mRNA i sintezu proteina te sudjelujući u reguliranju ekspresije gena.

miRNA je jednolančana RNA molekula s komplementarnim dijelovima koji se sparuju i tvore naizgled dvolančanu molekulu s petljom na jednom kraju, dok je siRNA dvolančana. Postoji još jedna razlika, miRNA je endogenog porijekla, odnosno, stanica je sama prepisuje, obrađuje i šalje u citoplazmu, dok s druge strane siRNA nastaje na dva načina. Prvi način je abnormalnom transkripcijom koja se odvija istovremeno s oba komplementarna lanca DNA.

Drugi način je egzogeni način, gdje su RNA molekule najčešće virusnog podrijetla. Pošto obje RNA imaju dvolančanu konformaciju, vrlo brzo su prepoznate od strane proteina Dicer koji ima endoribonukleaznu aktivnost, te izraziti afinitet prema dvolančanoj DNA. Dvolančana RNA koja je vezana za Dicer PAZ domenom dolazi u kontakt s RNAazaIII domenom koja cijepa omotani fragment u dsRNA (engl. *double-stranded RNA*) različitih veličina. Taj dvolančani fragment prepoznaje RNA kompleks utišavanja RISC (engl. *RNA – induced silencing complex*). RISC veže dsRNA fragment preko proteina Argonauta koji odmata dalje dsRNA, te integrira jedan od lanaca u kompleks. Lanac se naziva vodećim lancom te određuje selektivnost procesa RNA interferencije, dok se komplementarni lanac otpušta od kompleksa i ne sudjeluje dalje u aktivnostima (Meister i Tuschl, 2004; Mello i Conte, 2004; Tomari i Zamore, 2005; Carthew i Sontheimer 2009). Uspostavom stabilnog kompleksa RISC/ssRNA, jednolančani RNA lanac spreman je vezati se za bilo koju komplementarnu RNA molekulu koja se nalazi u blizini RISC-a, u većini slučajeva je to mRNA. miRNA onemogućuje translaciju mRNA, dok siRNA vezana za mRNA uzrokuje njegovu razgradnju (Liu i sur., 2004; Carthew i Sontheimer, 2009). Cilj djelovanja miRNA i siRNA je identičan, uzrokuje supresiju translacije, odnosno supresiju ekspresije gena.

Otkriće mehanizama djelovanja RNA interferencija, dovodi do mogućnosti konstrukcije siRNA komplementarnih pojedinim mRNA. Ciljanom konstrukcijom može se djelovati na određene mRNA koje uzrokuju problem. Odnosno, može se spriječiti ekspresija mutiranog gena i tako ublažiti kliničku sliku bolesti. Primjerice, kod Huntingtonove bolesti dolazi do nakupljanja mutiranog huntigtina u agregate, koji aktiviraju apoptozu te uzrokuju odumiranje živčanih stanica. Supresijom sinteze tog mutiranog proteina pomoću konstruirane RNAi, simptomi bolesti se mogu ublažiti. Kod osoba oboljelih od AIDS-a, može se djelovati na identičan način (Anderson i Akkina, 2005). Najveći problem kod ovih mehanizma liječenja je dopremanje nestabilne ncRNA do ciljanog izmijenjenog tkiva, odnosno stanice.

3. ODOBRENI LIJEKOVI

3.1. Lijekovi odobreni od strane FDA

FDA (American food and drugs administration) ima trenutno sedam odobrenih lijekova koji se temelje na epigenetičkim mehanizmima. Uglavnom ti lijekovi liječe određene poremećaje hematološkog ili hematopoetskog podrijetla. Prema godini dobivanja dozvole to su lijekovi Azacitidin (Vidaza, 2004), Decitabin (Dacogen, 2006), Vorinostat (Zolinza, 200), Romidepsin (Istodax, 2009), ruxolitinib (Jakafi, 2011), Beinostat (Beleodaq, 2014), Panobinostat (Farydak, 2015). Mnogi lijekovi koji su trenutno u prvoj ili drugoj fazi kliničkog ispitivanja dobili su naziv orphan drug, što znači da nisu u potpunosti odobreni od strane FDA no koriste se u terapiji rijetke bolesti kada drugog izbora nema.

3.2 Decitabin

5-aza-2-deoksicitidin, odnosno Decitabin je analogan prirodnom nukleozidu, citozinu. Svoje odobrenje dobio je 2006. godine. On je hipometilacijski agens s mehanizmom djelovanja 5-azacitidina. Nakon njegove fosforilacije, dolazi do jezgre i inhibira DNA metilazu 1 (Dnmt1), što dovodi do hipometilacije DNA uzrokujući diferencijaciju stanice ili njezinu apoptozu. Decitabin pokazao je svoju djelotvornost pri širokoj paleti hematoloških poremećaja poput kronične mijeloične leukemije te srpaste anemije (Lubbert i sur., 2001; Saunthararajah i sur., 2003; Issa i sur., 2004).

No, glavna indikacija za primjernu decitabina je mijelodisplastični sindrom (MDS), gdje pokazuje najbolje rezultate. Svi ispitanici koji su primili terapiju decitabinom nisu više bili ovisni o transfuziji te im je značajno smanjena i potreba za derivatima eritorica. Također, terapija decitabinom uvelike poboljšava kvalitetu života pacijenta (Kantarjian i sur., 2006).

Decitabin u usporedbi s 5-azacitidinom pokazuje čak 10 puta veću potentnost. Zanimljiva je primjena decitabina u liječenju anemije srpastih stanica. U bolesti anemije srpastih stanica dolazi do poremećene strukture hemoglobina što dovodi do eritrocita koji nemaju pravilan oblik, već imaju oblik srpa. Primjenom decitabina želi se postići demetilacija gena za γ-globin (HbF) te tako potaknuti produkciju fetalnog hemoglobina koji smanjuje polimerizaciju defektnog hemoglobina te time poboljšava kliničku sliku pacijenta. Iako djelovanje decitabina uvelike poboljštava kvalitetu života pacijenta kao i njegovu kliničku sliku, dovodi se u pitanje njegova genotoksičnost. Pošto se on ugrađuje u DNA, moguće je da

destabilizira genom i ima potencijalno mutageni efekt. Iako takav učinak nije zamijećen, nije moguće isključiti tu mogućnost (Saunthararajah i sur., 2003).

3.2 Vorinostat

Vorinostat pripada skupini inhibitora histonske deacetilaze. 2006. godine odobren je kao sredstvo za liječenje akutnog oblika T-staničnog limfoma. Sama acetilacija i deacetilacija histona ovise od aktivnosti histonske acetiltransferaze (HAT) i histonske deacetilaze (HDAC). Općenito, acetiliranost histona povezana je s povećanom transkripcijskom aktivnosti, dok je deacetiliranost povezana s represijom genske aktivnosti (Wade, 2001). HDAC se povezuju s brojnim onkogenima i tumor-supresorskim genima te mogu biti aberantno eksprimirane ili nepravilno aktivirane u tumorskim stanicama (Halkidou i sur., 2004; Choi i sur., 2001). Inhibitori HDAC tu pronalaze svoje djelovanje. Povećavanjem razine acetilacije unutar stanice, regulira se ekspresija gena te inhibira rast neoplazmi (Glozak i sur., 2005).

Vorinostat svojom inhibicijom HDAC-a smanjuje produkciju acetiliranih histona i nehistonskih proteina. Takav način djelovanja omogućuje mu širok opseg djelovanja te posljedično raznolik učinak na stanice tumora. Njegov način djelovanja je uzrokovanje stanične apoptoze čime utječe na stanični ciklus (Mitsiades i sur., 2002; Kawamata i sur., 2007). Također, jedan od djelovanja vorinostata je sprječavanje angiogeneze.

U kliničkim studijima pacijenata oboljelih od akutnog T-staničnog limfoma (CTCL) došlo je do poboljšanja kliničke slike i odgode daljnje progresije bolesti (Sato 2012). Vorinostat se primjenjuje i kod solidnih tumora, no bez značajne djelotvornosti, osim ako nije bio u kombinaciji s kemoterapijom. U kombinaciji s kemoterapijom došlo je do smanjene rezistencije tumorskih stanica na lijekove te kvalitetnije terapije (Munster i sur., 2011).

3.3 Romidepsin

Romidepsin je selektivni inhibitor klase I HDAC-a izoliran iz vrste *Chromobacterium violaceum* (Ueda i sur., 1994), te je odobren 2009. godine od strane FDA za liječenje CTCL-a i perifernog T-staničnog limfoma (PTCL). PTCL je heterogena skupina rijetkih, agresivnih non-Hodginkovih limfoma koji su različiti u morfologiji, biologiji i prognozi. Za PTCL nema standardne terapije, te je prva linija obrane indukcijska kemoterapija. To je većinom terapija sa ciklofosfamidom, vinkristinom i prednizonom. Veći dio pacijenata reagira pozitivno na terapiju, no taj učinak je vrlo kratak i ubrzo dolazi do povratka bolesti, te ovakav način liječenja postaje neefektivan (Horwitz, 2007; Foss i sur., 2011). Petogodišnje preživljavanje je

manje od 50% za većinu podtipova ove bolesti (Vose i sur., 2008). Romidepsin tu dolazi sa svojim odličnim rezultatima u kojima 38% pacijenata reagira pozitivno i medijan odgovora je 9 mjeseci (Piekarz i sur. 2009). Kod polovice pacijenata koji su primali terapiju romidepsinom do kompletnog odgovora je došlo nakon duže od godinu dana (Coiffier i sur., 2012). Nuspojave su mučnina, slabost, umor i trombocitopenija (Piekarz i Bates, 2004).

Romidepsin sa svojim dugotrajnim učinkom prema većini podtipova PTCL-a omogućuje novu liniju terapije koja bi se mogla pokazati vrlo efikasnom, te samim tim podići petogodišnje preživljavanje na više razine.

3.4 Ruksolitinib

Ruksolitinib je inhibitor Janus kinaze s podtipovima 1 i 2 (JAK 1 i 2), koji je odobren 2011. godine za liječenje mijelofibroze i policitemije vere koja ne reagira na terapiju hidroksiureom. Mijelofibroza je mijeloproliferativna neoplazma koja se pokazuje kao abnormalnost u krvnoj slici, primjerice, anemijom, trombocitpenijom, leukocitopenijom. Uz pokazatelje ovakve krvne slike dolazi do pojave simptomi poput umora, abdominalnih bolova, noćnog znojenja, bolova u kostima. Nastaju zbog zajedničkog djelovanja splenomegalije i povišenih razina proinflamatornih citokina. Alogenom trasnplantacijom koštane srži bolest je izlječiva, no vrlo rijetki pacijenti dobiju tu mogućnost (Abdel-wahab i Levine, 2009). Diregulacija Janus kinaze i signalnog puta Jak-STAT je središnji patofiziološki moment u mijelofibrozi, a nastaje zbog mutacije gena koji kodira JAK 2 ili aktivacijom JAK-STAT puta (Vainchenker i sur., 2008). Pacijenti su praćeni kroz tri godine te su i dalje bili vidljivi pozitivni rezultati terapije u velikoj većini pacijenata. Nakon takvih rezultata, postalo je evidentno da ruksolitinib ima pozitivan učinak na pacijente, imali oni mutaciju JAK 2 ili nemaju (Harrison, 2015).

3.5 Belinostat

Belinostat je derivat hidroksamične kiseline, koji djeluje kao neselektivni inhibitor HDAC. Svoje odobrenje od strane FDA dobio je 2014. godine kod terapije oboljih od PTCL-a i onih pacijenata kod kojih sva ostala terapija nema odgovora na PTCL. Kao što je navedeno u tekstu iznad, preživljavanje oboljih je minimalno, svega 30%, zbog toga je istraživanje ovakvih lijekova neophodno. Prvotna terapija imala je cilj izlječenja PTCL-a, no nakon prestanka djelovanja lijeka, primjena lijeka postaje palijativne prirode (Bodiford i sur., 2014). U određenim tipovima tumora postoji hiperekspresija HDAC-ova, te postoji mogućnost da

baš on ima ključnu ulogu u rastu tumora supresijom tumor-supresorskih gena. HDAC1 je više eksprimiran u PTCL-u nego u B-staničnim limfomima, dok sa druge strane HDAC 2 je pojačano eksprimiran u CTCL-u, što predstavlja potencijalni mehanizam na kojega je moguće djelovati supresijski (Marquard i sur., 2009).

Belinostat je uveden kao druga linija terapije kod pacijenata s povratkom PTCL-a odmah nakon šta je ušao u drugu fazu kliničkog testiranja. Pokazao je djelotvornost u zaustavljanju progresije bolesti te smanjenju simptoma. U 25% pacijenata uzrokuje terapijski odgovor, 15% djelomičan odgovor, dok u 10% kompletan odgovor. Od nuspojava tu su mučnina, letargičnost, umor, opstipacija, crvenilo i proljev. Postoje i teže nuspojave, poput dispneje, pneumonije i oštećenja jetre (Pohlman i sur., 2009).

Primjena belinostata pokazuje obećavajuće rezultate, te se nalazi u brojnim istraživanjima kao terapijska opcija pri liječenju raznih neoplazmi.

3.6 Panobinostat

Panobinostat (Farydak) je derivat hidroksamične kiseline. 2015. godine dobiva odobrenje FDA za liječenje pacijenata oboljelih od multiplog mijeloma koji su prošli najmanje dva ciklusa liječenja. Njegova je sposobnost u inhibiciji izoforme HDAC klase I, II i IV već pri vrlo niskim nanomolarnim koncentracijama.

Multipli mijelom (MM) je rak plazma stanica uslijed kojeg dolazi do nakupljanja abnormalnih plazma stanica unutar koštane srži šta dovodi do ometanja produkcije normalnih krvnih stanica. Osim što ometaju normalnu produkciju krvnih stanica, patološki proizvode klon IgG protutijela koji se na elektroforezi serumskih proteina prezentira u obliku monoklonalnog pika unutar IgG frakcije. Simptomi su anemija, krvarenje, infekcije, bolovi u kostima, patološke frakture kostiju i hiperkalcijemija zbog oštećenja kostiju od strane plazmacitoma. Ova bolest je neizlječiva te je petogodišnje preživljavanje oko 45%. U pretkliničkim studijama panobinostat je uz bortezomib pokazao citotoksičnu aktivnost prema stanicama MM-a (Catley i sur. 2006). Unutar studije PANORAMA 1 uspoređivala se učinkovitost zajedničkog tretmana panobinostatom, bortezomibom i deksametazonom u odnosu na placebo, bortezomibom i deksametazonom. Mjerilo njihove učinkovitosti gledano je kao medijan preživljavanja bez napredovanja bolesti. Kod pacijenata gdje nije primjenjivan placebo bio je vidljiv značajan napredak u liječenju. Nuspojave tijekom studije bile su proljev, umor, mučnina, periferni edemi, smanjen apetit. Rjeđe su se pojavljivali promjene u EKG-u, te poremećaji srčanog ritma (San-Miguel i sur., 2014). Na osnovi ovih rezultata, panobinostat

je dobio odobrenje za kliničku primjenu. Najveći problem u terapiji MM-a je razvoj rezistencije na lijekove, te je nakon PANORAMA 1 istraživanja, provedeno i PANORAMA 2 istraživanje u kojoj su izabrani identični lijekovi, no pacijenti su bili oni s povratkom bolesti te pacijenti s rezistencijom na bortezomib. U trećini pacijenata ova terapija postigla je zadovoljavajući odgovor uz podnošljive nuspojave. Pojavljuje se trombocitopenija koja se pojavljuje kao nuspojava inhibitora HDACa, tu je jos periferna neuropatija kao uobičajena nuspojava kod primjene bortezomiba (Richardson i sur., 2013).

Ovakvim rezultatima panobinostat koristan je dodatak terapiji u borbi s MM. Uz blage nuspojave omogućuje dodatnu liniju obrane kod pacijenata s povratkom bolesti.

4. ZAKLJUČAK

Mutacije unutar epigenetičkih mehanizama smatraju se ključnim poremećajima koji dovode do malignih promjena na stanicama. Mogućnost djelovanja na određeni dio mehanizma daje zanimljiv koncept u liječenju malignih bolesti. Teoretski gledano, epigenetskih lijekovi imaju vrlo visoku mogućnost liječenja pa i izlječenja određenih bolesti. No, i dalje ostaje problem precizne dostave lijeka te ciljanog djelovanja samo na patogene stanice.

Iako lijekovi opisani u ovom radu imaju različite mehanizme djelovanja, svima njima je cilj identičan. Zaustaviti rast malignih stanica, njihovo umnožavanje te u potpunosti zaustaviti malignu transkripciju alterirane DNA. Lijekovi u svojim pretkliničkim i kliničkim testiranjima pokazuju izvanredne rezultate kako kao samostalan lijek, tako i u kombinaciji s već poznatim citostatičkim lijekovima.

Stoga, budućnost izlječenja mnogih malignih oboljenja se nalazi u razvoju epigenetičkih lijekova. Epigenetički modeli u svrhu liječenja malignih bolesti ima ogroman prostor za napredak te samim tim i napredak kroz godine može biti samo bolji.

5. LITERATURA

Abdel-Wahab, O.I., Levine, R.L. (2009) Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. Annual Review of medicine 60:233-245.

Anderson, J. Akkina, R. (2005) HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. AIDS Research Therapy 2(1): 1.

Barrero, M.J., Boue, S., Belmonte, J.C.I. (2010) Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. Cell Stem Cell 7(5): 565-570.

Bodiford, A., Bodge, M., Talbott, M.S., Reddy, N.M. (2014) Profile of belinostat for the treatment of relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. OncoTargets and Theraphy 7: 1971-7.

Capuano, F., Műlleder, M., Kok, R., Blom, H. J., Rasler, M. (2014) Cytosine DNA methylation is found in Drosophila melanogaster but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, Schizosaccharomycer pombe, and other yeast species. Analytical Chemistry 86: 3697-3702.

Carthew, R.W., Sontheimer, E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136(4): 642-655.

Catley, L., Weisberg, E., Kiziltepe, T., Tai, Y.T., Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Atadja, P., Chauhan, D., Munshi, N.C., Anderson, K.C. (2006) Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. Blood 108(10): 3441- 3449.

Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., Joo, H.J., Kim, D.Y. (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. Japanese Journal of Cancer Research 92: 1300-1304.

Coiffier, B., Pro, B., Prince, H.M., Foss, F., Sokol, L., Greenwood, M., Caballero, D., Borchmann, P., Morschhauser, F., Wilhelm, M., Pinter-Brown, L., Padmanabhan, S., Shustov, A., Nichols, J., Carroll, S., Balser, J., Balser, J., Horwitz, S. (2012) Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. Journal of Clinical Oncology 30(6): 631-636.

Cole, P.A. (2008) Chemical probes for histone-modifying enzymes. Nature Chemical Biology 4: 590-7.

Dokmanović, M., Clarke, C., Marks, P. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. Molecular Cancer Research 5: 981-9.

Foss, F.M., Zinzani, P.L., Vose, J.M., Gascoyne, R.D., Rosen, S.T., Tobinai, K. (2011) Peripheral T-cell lymphoma. Blood 117(25): 6756-6767.

Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E. (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene 363: 15-23.

Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., Robson, C.N. (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. Prostate 59: 177-189.

Harrison, C. (2015) JAK inhibitors and myelofibrosis, Einstein and ruxolitinib. Haematologica 100(4):409-11.

Horwitz, S.M. (2007) Management of peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. Current Opinion in Oncology 19(5):438–443

Issa, J.-P.J., Garcia-Manero, G., Giles, F.J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C.S., Cortes, J., Kantarjian, H.M. (2004) Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2′-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. Blood 103: 1635-1640.

Kalac, M. (2010) Uloga epigenetske usmjerene terapije u liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma. Medicinski fakultet, Zagreb. str.1-9.

Kanduri, C., Whitehead, J., Mohammad, F. (2009) The long and the short of it: RNA-directed chromatin asymmetry in mammalian Xchromosome inactivation. FEBS Letters 583(5): 857-864.

Kantarjian, H., Issa, J.-P. J., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., Shen, L., Nimer, S. D., Leavitt, R., Raza, A. and Saba, H. (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. Cancer 106: 1794-1803.

Kawamata, N., Chen, J., Koeffler, H.P. (2007) Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) suppresses translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells. Blood 110: 2667-2673.

Kuo, M. H., Allis, C. D. (1998) Roles od histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays 20: 615-26.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 305(5689): 1437-1441.

Lubbert, M., Wijermans, P., Kunzmann, R., Verhoes, G., Bosly, A., Ravoet, C.,

Andre, M., Ferrant, A. (2001) Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2′-deoxycytidine. British Journal of Haematology 114: 349-357.

Marquard, L., Poulsen, C.B., Gjerdrum, L.M., de Nully Brown, P., Christensen, I.J., Jensen, P.B., Sehested, M., Johansen, P., Ralfkiaer, E., (2009) Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. Histopathology 54(6): 688-698.

Meister, G., Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431(7006): 343-349.

Mello, C.C., Conte, D., Jr. (2004) Revealing the world of RNA interference. Nature 431(7006): 338-342.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C. (2002) Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. Oncogene 21: 5673-5683.

Murray, J., Farrington, D., Sekol, I., Olsen, R.F. (2009) Effects of parental imprisonment on child antisocial behaviour and mental health: a systematic review. Campbell Systematic Reviews 4: 1-105.

Munster, P.N., Thurn, K.T., Thomas, S., Raha, P., Lacevic, M., Miller, A., Melisko, M., Ismail-Khan, R., Rugo, H., Moasser, M., Minton, S.E. (2011) A Phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapyresistant breast cancer. British Journal of Cancer 104: 1828-1835.

Piekarz, R., Bates, S. (2004) A review of depsipeptide and other histone deacetylase inhibitors in clinical trials. Current Pharmaceutical Design 10(19): 2289-2298.

Piekarz, R.L., Frye, R., Turner, M., Wright, J.J., Allen, S.L., Kirschbaum, M.H., Zain, J., Prince, H.M., Leonard, J.P., Geskin, L.J., Reeder, C., Joske, D., Figg, W.D., Gardner, E.R., Steinberg, S.M., Jaffe, E.S., Stetler-Stevenson, M., Lade, S., Fojo, A.T., Bates, S.E. (2009) Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. Journal of Clinical Oncology 27(32): 5410-5417.

Pohlman, B., Advani, R., Duvic, M., Fooss, F., Hymes, K.B., Intragumtornchai, T., Lekhakula, A., Shpilberg, O., Lerner, A., Belt, R.J., Jacobsen, E.D., Laurent G., Ben-Yehuda, D., Beylot-Barry, M., Hillen, U., Knoblauch, P., Bhat, G., Chawla, S., Allen, L.F. (2009)

Final results of a Phase II trial of belinostat (PXD101) in patients with recurrent or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma Blood 114(22): S379.

Rainier, S., Johnson, L.A., Dobry, C.J., Ping, A.J., Grundy, P,E., Feinberg, A.P. (1993) Relaxation of imprinted genes in human cancer. Nature 362: 747-9.

Richardson, P.G., Schlossman, R.L., Alsina, M., Weber, D.M., Coutre, S.E., Gasparetto, C., Mukhopadhyay, S., Ondovik, M.S., Khan, M., Paley, C.S., Lonial, S. (2013) PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomibrefractory myeloma. Blood 122(14): 2331-7.

San-Miguel, J.F., Hungria, V.T., Yoon, S.S. (2014) Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. Lancet Oncology 15(11): 1195-206.

Sato, A. (2012) Vorinostat approved in Japan for treatment of cutaneous T-cell lymphomas: status and prospects. OncoTargets and Therapy 5: 67-76.

Saunthararajah, Y., Hillery, C.A., Lavelle, D., Molokie, R., Dorn, L., Bressier, L., Gavazova S., Chen, Y.H., Hoffman, R., DeSimone, J. (2003) Effects of 5-aza-2′-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. Blood 102: 3865-3870.

Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S. (2010) Non-coding RNAs: regulators of disease. The Journal of Pathology 220(2): 126-139.

Takai, D., Jones, P.A. (2002) Comprehensive analys of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. National Academy of Science USA 99: 3740-3745.

Tomari, Y., Zamore, P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi. Genes & Development 19(5): 517-529.

Ueda, H., Nakajima, H., Hori, Y., Fujita, T., Nishimura, M., Goto, T., Okuhara, M. (1994) FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. The Journal of Antibiotics (Tokyo) 47: 301-310.

Vainchenker, W., Dusa, A., Constantinescu, S.N. (2008) JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. Seminars in Cell and Developmental Biology 19: 385-393.

Vose, J.M., Neumann, M., Harris, M.E., Int TCLP. (2008) International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes.

Journal of Clinical Oncology 26(25): 4124-4130.

Wade, P.A. (2006) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. Human Molecualar Genetics 10:693-698.

Zabolotneva, A., Tkachev, V., Filatov, F., Buzdin, A. (2010) How many antiviral small interfering RNAs may be encoded by the mammalian genomes? Biology Direct 5: 62.