

Epigenetski lijekovi

Greguraš, Stjepan

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:392445>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Stjepan Greguraš

Epigenetski lijekovi

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Stjepan Greguraš

Epigenetski lijekovi

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Maje Vlahović i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

Popis kratica

5mC	5-metilcitozin
AML	akutna mijeloična leukemija
CML	kronična mijeloična leukemija
CpG	citozin-gvanin
CTCL	kutani T-stanični limfom (eng. cutaneous T-cell lymphoma)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Dnmt1	DNA metiltransferaza 1
dsRNA	dvolančana RNA (eng. double-stranded RNA)
FDA	Agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drugs Administration)
HAT	histon acetiltransferaza
HbF	fetalni hemoglobin
HbS	hemoglobin S
HDAC	histonska deacetilaza (eng. hystone deacetylase)
HMBP	vezujući protein histonske modifikacije (eng. histone modification binding protein)
IgG	imunoglobulin G
IPSS	međunarodni prognostički scoring sustav (eng. international prognostic scoring system)
JAK	Janus kinaza
KMML	kronična mijelomonocitna leukemija
MDS	mijelodisplastični sindrom
MM	multipli mijelom

mRNA	glasnička RNA (eng. messenger RNA)
miRNA	mikro RNA (eng. micro RNA)
ncRNA	nekodirajuća RNA (eng. non-protein-coding RNA)
PTCL	periferni T-stanični limfom (eng. peripheral T-cell lymphoma)
RISC	RNA inducirani utišavajući kompleks (eng. RNA-induced silencing complex)
RNA	ribonukleinska kiselina
RNAi	RNA interferencija (eng. RNA interference)
siRNA	mala interferirajuća RNA (eng. short interfering RNA)
SSD	anemija srpastih stanica (eng. sickle cell disease)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)

Sadržaj

Sažetak

Summary

1. Uvod	1
2. Epigenetički Mehanizmi	3
2.1. Metilacija DNA	3
2.2. Histonske modifikacije	4
2.3. RNA interferencija	6
3. Uloga epigenetskog poremećaja u razvoju neoplazmi	8
4. Lijekovi odobreni od strane FDA	9
4.1. 5-azacitidin	9
4.2. Decitabin	11
4.3. Vorinostat	13
4.4. Romidepsin	15
4.5. Ruxolitinib	16
4.6. Belinostat	17
4.7. Panobinostat	18
5. Zaključak	20
6. Zahvale	21
7. Literatura	22
8. Životopis	30

Sažetak

Epigenetski lijekovi

Stjepan Greguraš

U svakoj stanici u našem organizmu zapisan je isti genetski kod. Što onda utječe na to koja će stanica postati moždana, a koja mišićna? Koja će postati dio kostura, a koja dio probavnog sustava? Odgovore na ta pitanja nudi epigenetika. Epigenetika je uzbudljiv dio znanosti koji se bavi proučavanjem epigenoma. Proučava mehanizme aktivacije i supresije gena bez promjene same molekule DNA. Epigenetički mehanizmi regulacije gena u stanici su metilacija DNA, modifikacija histona i sustav interferirajućih RNA. Međutim, u malignim stanicama taj je sustav regulacije poremećen i zato su one izvan kontrole. U novije vrijeme pojavili su se novi lijekovi koji djeluju na maligne stanice upravo preko epigenetskih mehanizama kontrole i pokušavaju „zauzdati podivljale“ maligne stanice i vratiti ih pod kontrolu organizma te time liječiti i izliječiti malignu bolest. Cilj ovog rada jest omogućiti pregled trenutno dostupnih epigenetskih lijekova i opisati njihove mehanizme djelovanja i ciljeve njihove primjene. Odabir lijekova koji su opisani u ovom radu temeljio se na tome jesu li odobreni od strane američke Agencije za hranu i lijekove.

Ključne riječi: epigenetika, epigenetski lijekovi, azacitidin, belinostat, vorinostat, panobinostat, decitabin, ruxolitinib, romidepsin

Summary

Epigenetic drugs

Stjepan Greguraš

In each and every cell of our body there is the same genetic code. What is it then that makes one cell a brain cell and another one a muscle cell? Which cell will become a part of the skeletal system and which one will be a part of the digestive system? Epigenetics offers the answers. Epigenetics is an exciting part of science that studies the epigenome. It studies the mechanisms of gene activation and gene suppression without changing the DNA molecule itself. DNA methylation, histone modification and system of interfering RNA molecules are cellular mechanisms of epigenetic regulation. However, malignant cells have a dysfunctional regulatory epigenetic system and that is the reason why they are out of control. New drugs that aim to use these regulatory mechanisms and in that way bring the „unrestrained“ malignant cells under the control of the organism have emerged recently. Therefore, treating and curing the malignant disease from different perspective is achieved. Aim of this thesis is to provide an overview of epigenetic drugs available nowadays as well as to describe mechanisms of their action and targets of their application. Drugs described in this thesis were selected based on their US Food and Drug Administration approval.

Keywords: epigenetics, epigenetic drugs, azacitidine, belinostat, vorinostat, panobinostat, decitabin, ruxolitinibe, romidepsine

1. Uvod

Sve stanice našeg organizma potječu od jedne oplodene jajne stanice koja daje dvjestotinjak različitih tipova stanica. Sve te stanice i dalje sadrže isti genom, ali su se tijekom razvoja zbog utjecaja različitih faktora rasta, raznih signalnih molekula te hormona, diferencirale u stanice različitih vrsta tkiva. Da bi postale različite morale su na drugačiji način pakirati svoj kromatin i tako omogućiti aktivnost različitih gena u različitim stanicama. Navedeno opisuje hipoteza diferencijalne aktivnosti gena.

Kromatin je pakiran u područja koja su dostupna transkripciji (otvoreni ili eukromatin) i ona koja to nisu (zatvoreni ili heterokromatin). Razlika između te dvije vrste kromatina ostvarena je različitim informacijama koje stižu na istu DNA u različitim stanicama. Te se informacije upisuju „na“ ili „preko“ genetičkog materijala odnosno sekvence DNA. Nastali upis osnova je pojava „epi“genetika (epi = grč. na ili preko). Sveukupna sekvenca DNA, genom, koja je po svojoj funkciji „biblioteka naslijeđenih svojstava“, mora ostati nepromijenjena tijekom čitavog života stanice i organizma. Genom se ne smije mijenjati na zahtjeve ni okoliša niti stanice kako stanica sama ne bi degradirala naslijeđena svojstva kodirana u DNA sekvenci. Dakle, genom nije taj koji stanici može osigurati adaptabilnost na zahtjeve okruženja ili organizma. S druge strane, epigenetičke modifikacije genoma uvjetuju ekspresiju pojedinog i inaktivnost preostalog dijela genoma te omogućuju rast, ali i programiranu smrt, proliferaciju, kao i mirovanje, diferencijaciju te akomodaciju na eventualne promijene (*Barrero 2010*).

Kako stanica kontinuirano komunicira s okolišem (stanicama istog organizma kao i s okruženjem samog organizma) tako prima informacije o potrebama organizma i zahtjevima okoliša te određuje vlastite potrebe. Element epigenetičkoga puta koji nosi tu informaciju naziva se epigenator. Epigenator je faktor iz okoliša organizma (egzogeni faktor), samog organizma (endogeni faktor), ali i iz citoplazme koji sadrži informaciju o promjeni u samoj stanici. On ima sposobnost prijenosa informacije epigenetičkim inicijatorima, elementima epigenetičkoga puta koji određuju dijelove genoma čijom se reorganizacijom ekspresije omogućuje najbolji stanični odgovor na dobivenu informaciju. Elementi koji prevode zahtjeve epigenetičkih inicijatora u epigenetički kod odnosno epigenom nazivaju se epigenetički održivači i predstavljaju krajnji segment epigenetičkoga puta. Epigenetički održivači nisu sposobni samostalno započeti reorganizaciju, ali aktivno reorganiziraju epigenom. Bez nove indukcije epigenetičkim inicijatorima, održivači osiguravaju stabilnost uspostavljenog epigenoma tijekom života stanice te predstavljaju molekularni mehanizam staničnog

pamćenja koji se prenosi na stanice potomke staničnom diobom. Time se stanicama kćerima osigurava fenotip koji najbolje odgovara organizmu, iako one same nisu nikad primile zahtjev epigenatora koji je potaknuo organizaciju dotičnog epigenoma odnosno formiranje njihova fenotipa. Upravo je to svojstvo epigenetičkih održivača platforma epigenetičkog nasljeđivanja. Epigenetički održivači naziv je kojim označavamo epigenetičke modifikacije, procese koji određuju status i funkciju kromatina bez zadiranja u DNA sekvencu odnosno genom (*Vlahović i Sinčić 2012*).

2. Epigenetički Mehanizmi

U epigenetičke modifikacije ubrajaju se metilacija DNA, sustav nekodirajućih RNA molekula i postranslacijske modifikacije histona (*Jaenisch 2003; Herceg 2007; Berger 2009; Blomen 2011; Sinčić 2011a*). Navedeni mehanizmi modifikacije međusobno intenzivno interagiraju i djeluju kao jedinstven nedjeljiv sustav kojim zajednički ostvaruju ulogu regulacije ekspresije gena. Poremećaj samo jednog dijela sustava odražava se na ostale dijelove epigenoma koji tada vlastitom reorganizacijom pokušavaju kompenzirati prisutnu aberaciju. Ukoliko kompenzacijski mehanizmi zakažu, izvjesno je formiranje novih staničnih fenotipova koji mogu biti osnova za razvoj patoloških stanja u organizmu, primjerice neoplastičnog procesa (*Vlahović i Sinčić 2012*).

2. 1. Metilacija DNA

Metilacija DNA je prva opisana i zasad najistraženija epigenetička modifikacija. Sastoji se od adicije metilne skupine na citozin u dinukleotidnoj sekvenci citozin-gvanin (CpG) koji se tada pretvara u 5-metilcitozin (5mC) te postaje „nova“ peta baza eukariotske DNA (*Lister 2009*). Metilacija citozina je ograničena na citozine unutar dinukleotida CpG, no naravno nisu svi CpG dinukleotidi unutar genoma metilirani.

Metilirani CpG dinukleotidi unutar promotora gena pokreću sustav ostalih epigenetičkih modifikacija koje posljedično dovode do zatvorene strukture kromatina. Takva formacija onemogućava pristupanje transkripcijskih faktora molekuli DNA pa nema stvaranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa ni sinteze mRNA. Takav slijed dovodi do inaktivnosti tog gena. S druge strane, demetilirani promotori se nalaze u otvorenoj, rahloj strukturi kromatina koja omogućava pristup transkripcijskim faktorima i inicijatorima transkripcije (*Vlahović i Sinčić 2012*).

Epigenetska informacija se prenosi diobom na stanice kćeri postreplikacijskim mehanizmom uz pomoć enzima DNA metiltransferaza 1 (Dnmt1). Neposredno nakon replikacije Dnmt1 kopira raspored 5mC sa starog lanca na novi.

Preko 70% CpG dinukleotida našeg genoma je metilirano, a ostatak je grupiran u tzv. CpG otoke koji predstavljaju regije u genomu bogate CpG dinukleotidima koji iznimno rijetko prihvaćaju metilaciju (*Ehrlich 1982*). Te regije zauzimaju tek 1% humanog genoma i nalaze se u promotorskim područjima u preko polovice humanih gena, što se uglavnom odnosi na „housekeeping“ gene, tj. gene koji su neophodni u aktivnoj formi u svakoj stanici

(Jones 2009). Stanice različitih tkiva imaju različite metilacijske obrasce koji su temelj njihova fenotipa. Osim u promotorima, regije bogate CpG-ovima, nalaze se pretežno u repetitivnim i centromeričnim ponavljanjima te retroviralnim i satelitskim sekvencama (Sinčić 2011).

Najveći dio genoma, oko 45%, čine transpozoni, odsječci DNA koji se mogu sami kopirati, izrezivati te premještati unutar samoga genoma. Takvim ponašanjem doprinose nestabilnosti genoma, a mogu i umetanjem u funkcionalni gen izazvati i mutacije. Da bi se stanica obranila od takvog kaotičnog i krajnje nepoželjnog ponašanja, stanica metilira te sekvence DNA i osigurava njihovu neaktivnost. To možemo zaključiti na temelju činjenica da u endogenim retroviralnim sekvencama postoji velika količina CpG sekvenci te da je većina tih CpG-a metilirana. Time je osigurana inaktivnost transpozona, odnosno, metilacijom transpozona je osigurana stabilnost kromosoma. Stoga ne čudi da poremećaji metilacijskog statusa ovih područja pokreću lavinu nestabilnosti u genomu i nerijetko dolazi do maligne transformacije stanice. (Vlahović i Sinčić 2012).

2. 2. Histonske modifikacije

Histoni su proteini koji se nalaze u nukleoplazmi jezgre eukariota oko kojih je omotana molekula DNA. Oni su temelj strukture kromatinskog kompleksa i omogućuju regulaciju ekspresije gena adicijom ili eliminacijom acetilne i metilne skupine, tj. posttranslacijske modifikacije histona u kromatinskom kompleksu s DNA koreliraju s transkripcijskom aktivnošću gena (Allfrey 1964). Danas znamo da osim acetilacije i metilacije u modifikacije histona spadaju i fosforilacija, sumoilacija i ubikvinacija.

Histonske modifikacije prvenstveno označavaju adiciju i eliminaciju specifičnih skupina na aminokiselinama polipeptidnog lanca histona i uglavnom se odvijaju na repovima histona. Modifikacijama podliježu svi histoni (H2A, H2B, H3 i H4) nukleosoma, ali i H1 histon.

Poznajemo tri principa modifikacija kojima se mijenja struktura kromatina i regulira ekspresija gena. Cis-efekt, trans-efekt i aktivna zamjena kanonskog histona unutar nukleosoma alternativnim varijantama.

Cis-efekt se postiže posredovanjem specifičnih enzima koji mijenjaju fizikalna svojstva histonskog repa, tj. njegov naboj ili trodimenzionalnu strukturu. Primjerice, naboj nukleosoma, koji je pozitivan, se neutralizira adicijom acetilne skupine koja je negativnog naboja, što smanjuje njegovo međusobno privlačenje s negativno nabijenom molekulom

DNA. Posljedično, kromatin je rahliji i molekula DNA dostupnija transkripcijskom aparatu te je i dokazano da je acetilacija histona opći propagator ekspresije gena u svim do danas istraženim organizmima.

Trans-efekt se nadovezuje na cis-efekt i omogućuje drastičnije promjene organizacije kromatina od samog cis-efekta. Nakon cis-efekta, tj. adicije ili eliminacije specifičnih skupina na aminokiseline repa histona, modifikacije trans-efekta mijenjaju afinitet histona prema širokoj paleti vezujućih proteina (eng. *histone modification binding protein*, HMBP). Ti proteini prepoznaju određenu modifikaciju i vežu se na rep te sami dalje služe kao dokovi za sidrenje većih proteinskih kompleksa. Tijekom elongacije transkripcije histon acetiltransferaze (HAT) acetiliraju histone ispred RNA polimeraze kako se ona pomiče nizvodno po genu. Time slabi prijanjanje DNA za nukleosom neposredno ispred transkripcijskog kompleksa i omogućava glatko pomicanje RNA polimeraze po lancu DNA i čitanje sekvence gena. Prolaskom transkripcijskog kompleksa, iza njega ostaje rahla struktura pogodna za patološku inicijaciju transkripcije. Kako bi se spriječila takva aberantna transkripcija, svaki transkripcijski kompleks na svome kraju nosi histonsku metiltransferazu Set2 koja hvata repove histona iza transkripcijskog kompleksa te katalizira adiciju tri metilne skupine na njih. Takva struktura privlači komplekse histon modificirajućih vezujućih proteina koji tada deacetiliraju histone i time ih vraćaju u prvotno stanje pozitivnog naboja i tijesnije povezanosti s molekulom DNA. Gušći kromatin, koji nastaje tim procesom, nije sposoban primiti novi transkripcijski kompleks i spriječeno je patološko prepisivanje mRNA (Farrona 2008).

Treća modifikacija, izmjena histona, je dramatičniji oblik reorganizacije kromatina aktivnom zamjenom pojedinog kanonskog histona ili čitavih blokova unutar nukleosoma alternativnim varijantama. Pored gena za kanonske histone, stanica posjeduje gene za niz varijanti histona. Zamjenom s alternativnim varijantama mijenja se struktura kromatina i odnos stanice prema vlastitom genetičkom materijalu. Ova modifikacija uključena je u regulaciju staničnog ciklusa, apoptoze, popravka oštećenja DNA i otpornost genoma na kromosomske aberacije. Primjerice, ionizirajuće zračenje i egzogene genotoksične tvari, ali i normalna replikacija DNA, mejoza ili uobičajeno prekranje genoma, dovodi do pucanja lanca molekule DNA. Moguća letalnost i mutagenost uzrokovana lomovima DNA zahtjeva od stanice trenutačno pokretanje mehanizama popravka, dijagnostiku težine oštećenja, zaustavljanje staničnog ciklusa i konačno odluku o budućnosti oštećene stanice. Unutar jedne minute od pucanja lanca DNA različiti enzimi na mjestu pucanja lanca fosforiliraju rep

najbližeg histona H2AX, koji je varijanta histona H2A i nalazi se nasumično postavljen u čitavom zdravom genomu eukariotske stanice. Fosforilacija se eksplozivno širi na susjedne H2AX u oba smjera lanca DNA i time se stvara mali dio visoko fosforilirane DNA u čijem se središtu nalazi oštećen genetički materijal. Taj dio trans-efektom pojačava signal oštećenja i privlači mašineriju popravka DNA. Fosforilacijom histona ujedno se ostvaruje i cis-efekt te DNA postaje dostupnija mehanizmima popravka. Fosforilirani H2AX aktivira i p21 put kojim stanica zaustavlja stanični ciklus dok ne završi popravak. Ukoliko je oštećenje preveliko i ne uspije se sanirati, pokreće se apoptoza najvjerojatnije aktivacijom p53 puta, dok se u slučaju uspješnog popravka nastavlja normalan stanični ciklus. Prepreka nastavku normalnog ciklusa jest postojanje fosforiliranih H2AX i najjednostavnije rješenje je histonska modifikacija zamjene histona. Iako sam proces nije razjašnjen u potpunosti, predloženo je da se nakon popravka DNA, SWR1 veže za fosforilirani H2AX i acetilira cjelokupni nukleosom. Intenzivna acetilacija destabilizira nukleosom te se zamijene fosforilirani H2AX s ne modificiranom varijantom. Zamjenom svih fosforiliranih H2AX-a u tom dijelu DNA, stanica se rješava „stop“ signala i nastavlja s normalnim staničnim ciklusom (*Stiff 2004; Jin 2005; Henikoff 2008*).

2. 3. RNA interferencija

Unutar nekodirajućeg dijela genoma nalazi se gotovo 25% sekvenci koje se prepisuju u RNA kao krajnji produkt. Te RNA se nazivaju nekodirajuće RNA (eng. *non-protein-coding RNAs*, ncRNAs) jer se ne prevode do proteina. Prema dosadašnjim spoznajama one sudjeluju u svim najvažnijim staničnim procesima poput transkripcijske i posttranskripcijske regulacije ekspresije gena, inaktivacije X kromosoma (*Kanduri 2009*), suprimiranja transpozona te poticanja inhibicije i degradacije viralnih genoma (*Zabolotneva 2010*). Molekule ncRNA sudjeluju u mehanizmima regulacije ekspresije gena te su ubrojene u epigenetički sustav pod nazivom RNA interferencija (eng. *RNA interference*, RNAi). U taj sustav pripadaju male interferirajuće RNA (eng. *short interfering RNAs*, siRNAs) i mikro RNA (eng. *microRNAs*, miRNAs) (*Carthew 2009; Taft 2010*). Obje djeluju u citoplazmi stanice na nivou mRNA i, onemogućujući njegovu translaciju i proizvodnju proteina, reguliraju ekspresiju gena.

Obje vrlo sličnim mehanizmima onemogućuju translaciju mRNA do proteina, međutim postoji nekoliko razlika. Mikro RNA je jednolančana molekula s komplementarnim dijelovima koji se sparuju i tvore naizgled dvolančanu molekulu s petljom na jednom kraju, a

siRNA je beziznimno dvolančana. Još jedna razlika je i u tome što je miRNA endogenog porijekla, tj. stanica je sama prepisuje, obrađuje i šalje u citoplazmu, dok siRNA nastaje ili abnormalnom transkripcijom koja se odvija istovremeno s oba komplementarna lanca DNA ili može biti egzogenog, najčešće virusnog porijekla. Budući da obje RNA imaju dvolančanu konformaciju, budu vrlo brzo prepoznate od proteina *Dicer* koji ima endoribonukleaznu aktivnost i izraziti afinitet prema dvolančanoj DNA. Dvolančana RNA vezana za *Dicer* PAZ domenom i omotana oko tijela enzima dolazi u kontakt s RNAazaIII domenom koja cijepa omotani fragment u dsRNA (eng. *double-stranded* RNA) različitih veličina. Dvolančani fragment prepoznaje RNA inducirani kompleks utišavanja (RISC) (eng. *RNA-induced silencing complex*, RISC). RISC veže dsRNA fragment preko proteina Argonaut. Argonaut dalje odmata dsRNA i integrira jedan od lanaca u kompleks. Taj se lanac naziva vodećim i određuje selektivnost daljnjeg procesa RNA interferencije, dok se komplementarni lanac otpušta od kompleksa i ne sudjeluje dalje u aktivnostima (*Meister 2004; Mello 2004; Tomari 2005; Carthew 2009*). Nakon uspostave stabilnog kompleksa RISC/ssRNA, izloženi jednolančani RNA lanac u kompleksu spreman je vezati se za bilo koju komplementarnu RNA molekulu u blizini RISC-a, a najčešće je to mRNA. Mikro RNA onemogućuje translaciju mRNA, dok siRNA vezana na mRNA uzrokuje njegovu razgradnju (*Liu 2004; Carthew 2009*). Krajnji ishod je isti, dolazi do supresije translacije odnosno supresije ekspresije gena.

Otkrićem mehanizma djelovanja RNA interferencije otvara se mogućnost konstrukcije siRNA komplementarnih pojedinim mRNA čiju bi se translaciju tako ciljano mogli spriječiti. Drugim riječima mogli bismo spriječiti ekspresiju mutiranog proteina i tako ublažiti kliničku sliku bolesti. Primjerice Huntingtonova bolest kod koje se nakuplja mutirani huntigtin u agregate, aktivira apoptozu i uzrokuje odumiranje živčanih stanica. Supresijom sinteze mutiranog proteina pomoću RNAi moglo bi doći do regresije bolesti. Takva terapija bi, naravno, bila doživotna. Na isti način moglo bi se pomoći i osobama oboljelima od AIDS-a, suprimirajući ekspresiju mRNA HIV-a (*Anderson 2005*). Ovaj vid liječenja istražuje se i u autosomno dominantnih bolesti u heterozigota npr. Epidermolysis bullosa. Heterozigoti, iako ispoljavaju bolest, imaju jedan zdravi alel te bi se, supresijom mutiranog dominantnog alela pomoću RNAi, recisivni divlji tip alela eksprimirao što bi dovelo do potpunog nestanka simptoma (*Atkinson 2011*). Ključna prepreka primjeni ovog čudesnog mehanizma se nalazi u tome što još uvijek ne postoji način kako dopremiti nestabilnu ncRNA do ciljanog, patološki izmijenjenog tkiva i stanica.

3. Uloga epigenetskog poremećaja u razvoju neoplazmi

Epigenetski sustavi pokreću i upravljaju razvojnim procesima, od zigote do terminalno diferenciranih stanica odraslog organizma. Patološki izmijenjen epigenetički sustav vodi stanicu u stanje patološki promijenjene diferencijacije, potentnosti, apoptotičke aktivnosti, proliferacije ili nestabilnosti kromatina. I zaista se pokazalo da u svim tumorima postoji izmijenjena epigenetička aktivnost (*Rodriguez-Paredes 2011; Sinčić 2011*). Dokazi o promjeni epigenoma u vrlo ranoj fazi razvoja tumora govore u prilog teoriji da su upravo epigenetski poremećaji u stanicama inicijatori maligne alteracije. (*Sharma 2010*).

Poremećaji epigenoma mogu biti primarni i sekundarni. Primarni poremećaji mogu pokrenuti kancerogenezu bez poremećaja u sekvenci genoma (*Horsthemke 2006; Hughes 2009*) te označavaju neprimjereni odgovor stanice na zahtjeve okruženja (*Hernandez-Vargas 2009; Teschendorff 2010; Tsai 2011*). Sekundarni poremećaji su oni koji nastaju na osnovu mutacije koja izravno mijenja epigenetički sustav i time onemogućuje normalnu regulaciju staničnih procesa, npr. delecija gena za DNA metiltransferazu čiji nedostatak potiče daljnju kancerogenezu (*Horsthemke 2006*). Ranu pojavu poremećaja epigenoma tijekom faze nastanka i napredovanja tumora pokušava se iskoristiti za otkrivanje epigenetičkih obrazaca koji su specifični za određeni tumor. Biomarkeri epigenetskih mutacija pokazali su se uspješnima i vrijednima u otkrivanju rizičnih populacija (*Moore 2008*), dijagnostici pretkliničkih onkoloških stanja (*Worthley 2010*), dijagnostici i tipizaciji tumora (*Lima 2010; Khandige 2011; Figueroa 2010; Hawes 2010*), prognozi odgovora na terapiju (*Wermann 2010*) te prognozi onkološke bolesti (*Hernandez-Vargas 2010; Lima 2010*).

Težnja liječenja epigenetskim lijekovima jest spriječiti stvaranje novih poremećaja epigenoma te ponovno uspostaviti fiziološki epigenom u stanicama tumora umjesto ubijanja stanica klasičnim protutumorskim protokolima (*Yang 2010; Boumber 2011*). Ona se zasniva na modulaciji metilacije DNA, acetilacije i deacetilacije histona i pokušaju da se uspostavi fiziološki stanični životni put proliferacije, diferencijacije i konačno apoptoze. Cilj je neoplastično tkivo pretvoriti u normalno, diferencirano tkivo. Nedostatak protutumorske terapije jest činjenica da i konvencionalni kemoterapeutici, degeneracijom sekvence DNA, i modulatori metilacije DNA, zbog svoje neselektivnosti, mogu i sami uzrokovati nastanak neoplazmi.

4. Lijekovi odobreni od strane FDA

Američka Agencija za hranu i lijekove odobrila je sedam epigenetskih lijekova za primjenu u liječenju uglavnom hematoloških poremećaja i hematopoetskih maligniteta. Kronološki redoslijedom dobivanja odobrenja to su Azacitidin (Vidaza, 2004.), Decitabin (Dacogen, 2006.), Vorinostat (Zolinza, 2006.), Romidepsin (Istodax, 2009.), Ruxolitinib (Jakafi, 2011.), Belinostat (Beleodaq, 2014.), Panobinostat (Farydak, 2015.). Osim navedenih lijekova koji su odobreni, postoji još nekoliko lijekova koji su u prvoj i drugoj fazi kliničkog istraživanja te bi uskoro mogli i oni biti u primjeni. Predstavnici te skupine su Entinostat, Pracinostat, Givinostat, Phenelzin sulfat te Valproat, kojem se, premda je registriran za upotrebu kao antikonvulziv i stabilizator raspoloženja, istražuje i djelovanje na epigenetskoj razini u liječenju raka dojke.

4.1. 5-azacitidin

Azacitidin (5-azacitidin, Vidaza) je u svibnju 2004. godine odobren za liječenje mijelodisplastičnog sindroma (MDS), akutne mijeloične leukemije (AML) i kronične mijelomonocitne leukemije (KMML). Mijelodisplastični sindrom je skup poremećaja obilježenih perifernom citopenijom, displastičnim hematopoetskim prekursorima, hipercelularnom koštanom srži i visokim rizikom pretvorbe u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML). Spada i u skupinu „lijekova siročadi“ (eng. *orphan drug*), što znači da se koristi u terapiji rijetke bolesti, tj. „bolesti siročeta“ (eng. *orphan disease*). Iako nema globalno prihvaćene definicije, rijetkim bolestima se općenito smatraju one čija je prevalencija u populaciji manja od 1: 1 500 ili 1: 2 000. Takav status omogućuje pristup sredstvima za razvoj lijeka i olakšava i ubrzava proces odobrenja lijeka s ciljem boljeg i efikasnijeg liječenja i olakšavanja života ljudi oboljelih od rijetkih bolesti.

5-azacitidin je analog pirimidinske baze citozina. Njegov antineoplastički učinak temelji se na dva mehanizma, citotoksičnost do koje dolazi zbog ugradnje u molekule RNA i DNA te hipometilacije DNA, koja ponovo uspostavlja normalni stanični ciklus i diferencijaciju u hematopoetskih stanica (Jones 1983).

Nakon unosa u stanicu 5-azacitidin se fosforilira i nakon interakcije sa staničnim enzimima ugrađuje u molekule RNA i DNA te posljedično dolazi do inhibicije sinteze DNA . Učinak 5-azacitidina je najsnažiji prilikom djelovanja u S fazi staničnog ciklusa zbog njegove

masovne ugradnje u novonastale lance DNA (*Li 1970, Vesely 1985*) . Inhibira metilaciju replicirajuće DNA vežući se za Dnmt1 što rezultira hipometilacijom DNA. To je temelj terapijskog učinka 5-azacitidina kod AML-a i MDS-a, jer je u tim bolestima opisana hipermetilacija CpG otoka (*Uchida 1997, Christiansen 2003*).

Meta-analiza i sistematski pregled iz 2010. godine (*Gurion 2010*) su pokazali da hipometilirajući agensi, posebice 5-azacitidin, poboljšavaju preživljenje i druge ishode bolesnika koji boluju od MDS-a u usporedbi sa konvencionalnom suportivnom terapijom, ali su također i povezani sa značajnim nuspojavama. Terapija 5-azacitidinom dovela je do produženog vremena transformacije MDS-a u AML i produženog vremena do smrti, hematološkog poboljšanja te poboljšanog ukupnog odgovora na terapiju. Nije bilo razlike u ranoj smrtnosti u prva tri mjeseca ili količini transfuzija u uspoređivanim skupinama. Značajna je bila i pojavnost nuspojava u gotovo svih ispitanika (*Kaminskas 2005b*). Najčešće nuspojave su bile one gastrointestinalnog porijekla (mučnina, povraćanje, proljev, opstipacija te anoreksija), hematološkog porijekla (neutropenija, vrućica, ukočenost, ekhimoze i petehije) te povezane s mjestom uboda, slabost, insomnija i dr. Od uzroka hospitalizacije to su bili trombocitopenija, febrilna neutropenija, vrućica te pneumonija, međutim nijedan smrtni slučaj nije pripisan upotrebi 5-azacitidina. Pojava nuspojava je smanjena usporednom primjenom odgovarajućih dodatnih terapeutika.

Zaključno, većina osoba koja boluje od MDS-a umire od krvarenja, infekcija ili progresije u AML. Prije pojave 5-azacitidina i njegova odobrenja od strane FDA, nije bilo niti jednog agensa za liječenje tog poremećaja. Glavnina terapije bila je suportivna, odnosno simptomatska terapija, tj. transfuzije trombocita i eritrocita te primjena hematopoetskih faktora rasta. Primjenom 5-azacitidina dolazi do pozitivnog odgovora u dijela ispitanika te oni imaju kliničke koristi u odnosu na skupine koje su liječene isključivo potpornim metodama. Premda brojne i česte, nuspojave koje on uzrokuje moguće je sanirati dodatnom terapijom. Odobrenje za upotrebu je dobio jer do tada nije bilo učinkovita agensa u terapiji MDS-a, a klinička poboljšanja koja donosi su veća od rizika koji su zasada evidentirani (*Kaminskas 2005b*).

4.2. Decitabin

Decitabin (5-aza-2-deoksicitidin, Dacogen) je, analog prirodnog nukleozida citozina, koji je svoje odobrenje dobio 2006. godine. To je hipometilacijski agens s mehanizmom djelovanja poput 5-azacitidina. Nakon fosforilacije u stanici dolazi do inkorporacije u DNA i inhibicije Dnmt1 uzrokujući hipometilaciju DNA i diferencijaciju stanice ili njezinu apoptozu. Aberantno suprimirani geni, uključujući i tumor supresorske gene, mogu se reaktivirati i eksprimirati. Decitabin je pokazao djelotvornost u širokoj paleti hematoloških poremećaja od MDS-a, AML-a, kronične mijeloične leukemije (CML) te anemije srpastih stanica (*Lubbert 2001, Sauntharajah 2003, Issa 2004*)

Glavna indikacija za koju je odobren decitabin jest MDS pri čijem liječenju on pokazuje ohrabrujuće rezultate. Svi ispitanici koji su reagirali na decitabin nisu više bili ovisni o transfuziji, značajno je smanjena i potreba za derivatima eritrocita, te ne smijemo zanemariti činjenicu da je pacijentima u kojih je primijenjen decitabin značajno poboljšana kvaliteta života u odnosu na kontrolnu skupinu koja je primala samo suportivnu terapiju (*Kantarjian 2006*). Ishod pacijenata s MDS-om je izrazito varijabilan te postoji nekoliko klasifikacija koje dijele pacijente prema prognostičkom riziku na temelju različitih kliničkih i laboratorijskih parametara. Jedna od tih klasifikacija jest Međunarodni prognostički scoring sustav (IPSS). Zanimljivo je da je utjecaj decitabina na produženje vremena do transformacije u AML ili do smrti, značajan u skupinama sa srednjim do visokim rizikom po IPSS-u, tj. onima koji imaju najlošiju prognozu. Optimalna upotreba hipometilirajućih agensa zahtijeva primjenu kroz duže vrijeme kako bi postigla maksimalnu korisnost te to isto treba uzeti u obzir prilikom usporedbe rezultata studija koje ih uspoređuju.

Decitabin je, u usporedbi s 5-azacitidinom, u pretkliničkim modelima pokazivao približno 10 puta veću potentnost, jer se samo 10% primjenjena 5-azacitidina metabolizira u njegov aktivni metabolit (*Creusot 1982*). U kliničkim studijama oba lijeka su pokazala prilično slične rezultate, poboljšanje u odnosu na suportivnu terapiju, međutim 5-azacitidin ipak malo bolji u izazivanju kompletne remisije, što doduše možda i nije stvaran odraz efikasnosti decitabina jer je primjena tijekom istraživanja bila prekratka da bi on ostvario svoj puni potencijal (*Kaminskas 2005a*). Naime, u studijama u drugoj fazi kliničkog istraživanja u kojima je primjenjivan kroz duže vrijeme postizao je klinički značajnija poboljšanja u pacijenata. (*Wijermans 2000, Lubbert 2001*)

Zanimljiva je i primjena decitabina u liječenju anemije srpastih stanica (SSD) (eng. sickle cell disease). U toj bolesti je poremećena struktura hemoglobina što posljedično dovodi do

deformacije eritrocita koji zauzimaju srpasti oblik po čemu je bolest i dobila ime. Vodeća ideja pri primjeni decitabina jest demetilacijom gena za γ -globin (HbF) aktivirati produkciju fetalnog hemoglobina koji smanjuje polimerizaciju defektnog hemoglobina (HbS) i time poboljšava kliničku sliku u pacijenata i smanjuje učestalost vazookluzivnih kriza, adhezije crvenih krvnih stanica te oštećenja endotela. Studija je provedena na 8 pacijenata refrakternih na uobičajenu terapiju hidroksiurejom. Decitabin je u svih ispitanika povišio razinu HbF-a i smanjio simptome bolesti. Međutim, nije isključeno i da je nuspojava primjene decitabina, neutropenija, također jedan od mehanizama koji u ovoj bolesti zapravo djeluje pozitivno na kliničku sliku jer smanjeni broj neutrofila koji se aktiviraju zbog oštećenja endotela rezultira i manjom vazookluzivnom patologijom. Iako studija sugerira da mehanizam kojim se postižu više razine HbF-a nije citotoksičan, ostaje mogućnost da je decitabin genotoksičan. Budući da se ugrađuje u DNA moguće je da destabilizira genom i ima potencijalno mutageni efekt. Iako nije do sada zamijećen takav učinak, nemoguće je isključiti tu mogućnost bez praćenja kroz duže razdoblje (*Saunthararajah 2003*).

4.3. Vorinostat

Vorinostat (Suberoilanolid-hidroksamična kiselina, Zolinza), je odobren 2006. godine kao sredstvo za liječenje kutanog T-staničnog limfoma (eng. cutaneous T-cell lymphoma, CTCL). Pripada skupini inhibitora histonske deacetilaze (eng. histone deacetylase, HDAC). Acetilacija i deacetilacija histona, a samim time i transkripcijska aktivnost unutar stanice ovisi o aktivnosti histonske acetiltransferaze i histonske deacetilaze. Općenito, acetiliranost histona je povezana s povećanom transkripcijskom aktivnosti dok je deacetiliranost povezana s represijom genske aktivnosti (*Wade 2001*). U ljudi je identificirano 18 HDAC enzima, HDAC 1, 2, 3 i 8 pripadaju u klasu I HDAC, dok su HDAC 4, 5, 6, 7, 9 i 10 pripadnici klase II HDAC (*Marks 2005*). U klasu IV pripada HDAC 11, dok u klasu III pripadaju sirtuini koji se razlikuju od klase I i I po tome što su to proteinske acetilaze ovisne o nikotinamid adenin dinukleotidu (*Blander 2004*). HDAC se povezuje s brojnim onkogenima i tumor-supresorskim genima i može biti ili aberantno eksprimirana ili nepravilno aktivirana u tumorskih stanica (*Halkidou 2004, Choi 2001*). Svoje mjesto djelovanja, stoga tu pronalaze HDAC inhibitori. Povećavajući razinu acetilacije unutar stanice, ne samo histona već i nehistonskih proteina, poput transkripcijskih faktora, regulatora transkripcije te enzima za popravak DNA (*Glozak 2005*), reguliraju ekspresiju gena i inhibiraju rast neoplazme.

Vorinostat inhibicijom HDAC-ova inducira akumulaciju acetiliranih histona i nehistonskih proteina, što mu omogućuje poprilično širok opseg epigenetičkog djelovanja te posljedično raznolik učinak na stanice raka. Inducira apoptozu, i utječe na stanični ciklus supresijom ekspresije i funkcije proteina povezanih sa staničnim ciklusom (*Mitsiades 2002, Kawamata 2007*). Sprječavanje angiogeneze je još jedan od utjecaja vorinostata, naime smanjenjem ekspresije receptora za vaskularni endotelijalni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF) inhibira VEGF-om induciranu angiogenezu (*Deroanne 2002*).

Dijagnoza CTCL-a sadržava heterogenu skupinu limfoproliferativnih poremećaja karakteriziranih kožnim lezijama koje se sastoje od malignih klonalnih T limfocita (*Keehn 2007*). Postoje brojne terapijske mogućnosti, međutim nijedna se nije pokazala kurativnom (*Akilov i Geskin 2011*). U kliničkim studijama primjene vorinostata u pacijenata koji boluju od uznapredovalog oblika CTCL-a došlo je do objektivnog odgovora u otprilike trećine pacijenata, poboljšanja kliničke slike i odgode progresije bolesti. Najčešće nuspojave su bile blažeg karaktera, uglavnom proljev, umor, mučnina i anoreksija, iako je bilo u manjem broju slučajeva i težih nuspojava poput plućne embolije i trombocitopenije. Na temelju tih podataka

možemo zaključiti da se radi o sigurnom, djelotvornom i tolerabilnom agensu za terapiju CTCL-a (*Sato 2012*). Istraživana je primjena i u solidnih tumora, međutim bez značajne djelotvornosti. Ohrabrujući su zato rezultati istraživanja u kojima je vorinostat primjenjivan u kombinaciji s ostalim kemoterapeuticima, njegova funkcija je u tom slučaju pogotovo u smanjenju rezistencije tumora na lijekove koji se primjenjuju uz vorinostat. Primjenjivan uz tamoksifen dao je odlične rezultate uz kliničko poboljšanje od 40% (*Munster 2011*). Stoga možemo zaključiti da vorinostat, uz svoju osnovnu ulogu u monoterapiji CTCL-a, zbog svojih brojnih mehanizama djelovanja, ima zasigurno još prostora za primjenu samo treba pronaći pravu kombinaciju u kojoj će polučiti najbolji učinak.

4.4. Romidepsin

Romidepsin (Istodax) je selektivni inhibitor klase I HDAC-a izoliran iz *Chromobacterium violaceum* (Ueda 1994), i odobren 2009. godine od strane FDA za liječenje osoba koje boluju od kutanog (CTCL) i perifernog T-staničnog limfoma (PTCL), a prethodno su primile jednu ili više neuspješnih terapija. PTCL je heterogena skupina agresivnih, rijetkih oblika non-Hodgkinova limfoma koja varira u svojoj morfologiji, biologiji i prognozi, koja je ipak uglavnom loša. Trenutno nema standardne terapije za većinu subtipova PTCL-a niti ima lijekova koji su odobreni kao prva linija terapije. U prvom krugu terapije pacijenti uglavnom dobivaju neke od induksijskih kemoterapijskih protokola koji su nastali na temelju studija terapije B-staničnih limfoma. To su najčešće protokoli poput CHOP-a, koji sadrži ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon. Iako veći dio pacijenata pozitivno reagira, blagotvorni učinak je kratak te pacijenti ubrzo dožive relaps ili postanu refrakterni na tu vrstu terapije (Horwitz 2007, Foss 2012.). Uobičajeno petogodišnje preživljenje pacijenata s ovim oboljenjem je manje od 50% za većinu podtipova, a preživljenje u najčešćih podtipova je čak i manje od 32% (Vose 2008). Stoga je romidepsin svoje odobrenje zaslužio nakon izvrsnih rezultata studija u kojima je čak 38% ispitanika reagiralo na terapiju njime i medijan odgovora je bio 9 mjeseci (Piekarz 2009). Ohrabrujuća je i dugotrajnost pozitivnih rezultata u značajnog broja pacijenata. Više od polovice ispitanika s refrakternim PTCL-om u kojih je došlo do kompletnog odgovora na terapiju, je taj odgovor trajao duže od godine dana (Coiffier 2012). Nuspojave koje su opažene pri primjeni uključuju mučninu, slabost, umor, prolaznu neutropeniju i trombocitopeniju. Čini se kako su prilično standardne nuspojave kod primjene HDAC inhibitora (Piekarz 2004). Postojala je bojazan kako bi romidepsin mogao imati kardiotoksičan učinak ili učinak na poremećaj srčanog ritma, zbog nekoliko smrtnih slučajeva u fazi ispitivanja lijeka. Međutim, pokazalo se da su ti pacijenti imali predležće srčane probleme i u daljnjem istraživanju nije pronađena povezanost romidepsina i povećanja vjerojatnosti smrtnog slučaja zbog oštećenja srca ili srčanog ritma (Cabell 2009).

Stoga možemo zaključiti da romidepsin sa svojim dugotrajnim učinkom, prema sva tri najčešća podtipa PTCL-a, te prema refrakternim oblicima PTCL-a i uznapredovalom obliku bolesti, omogućuje novu liniju terapije koja bi se mogla pokazati vrlo efikasnom i podići petogodišnje preživljenje u oboljelih iznad sadašnje poprilično niske razine.

4.5. Ruxolitinib

Ruxolitinib (Jakafi) je inhibitor Janus kinaze podtipova 1 i 2 (JAK 1 i 2), odobren 2011. godine za liječenje oboljelih od srednje i visokorizične mijelofibroze i policitemije vere koja ne reagira na terapiju hidroksiurejom. Mijelofibroza je mijeloproliferativna neoplazma koja se prezentira abnormalnostima u krvnoj slici, npr. anemijom, trombocitozom ili trombocitopenijom te leukocitozom ili leukocitopenijom. Uz to pridruženi su i simptomi poput umora, slabosti, abdominalnih bolova, kaheksije, noćnog znojenja ili bolova u kostima, koji najvjerojatnije nastaju zbog zajedničkog utjecaja splenomegalije i povišene razine proinflammatoryh citokina. Tradicionalne terapijske mogućnosti ne daju zadovoljavajuće rezultate, a iako se alogenom transplantacijom koštane srži ova bolest može izliječiti, rijetki su kandidati u kojih se ona može provesti (*Abdel-Wahab i Levine 2009*). Disregulacija Janus kinaze i signalnog puta JAK-STAT između nje i STAT proteina (eng. signal transducer and activator of transcription) smatra se središnjim patofiziološkim momentom u mijelofibrozi, bilo da do nje dolazi mutacijom samog gena koji kodira JAK 2 koji je prisutan u otprilike 50% pacijenata s primarnom mijelofibrozom, bilo drugim indirektnim putem aktivacije JAK-STAT puta (*Vainchenker 2008*).

U smislu ciljane terapije i inhibicije JAK 1 i 2, ruxolitinib je bio prvi lijek primijenjen u mijeloproliferativnih neoplazmi. U ranijim fazama istraživanja pokazao je izniman utjecaj na smanjenje simptoma bolesti i smanjenja slezene (*Verstovsek 2010*). To je bio temelj za daljnja istraživanja koja su polučila značajne pozitivne rezultate pri liječenju ruxolitinibom u odnosu na placebo. U 40% pacijenata došlo je do smanjenja slezene za trećinu, smanjenja simptoma, u smislu manje abdominalne boli, boli pod lijevim rebrenim lukom, noćnog znojenja, pruritusa te mišićne i koštane boli, za ogromnih 50%. U gotovo 68% pacijenata koji su reagirali, ovakvo poboljšanje je bilo prisutno i nakon 48 tjedana kontinuirane primjene terapije. Od nuspojava, anemija i trombocitopenija su se pojavljivale češće u osoba liječenih ruxolitinibom, ali nije bilo značajnih problema u zbrinjavanju ovih poremećaja. Trombocitopenija je uglavnom uzrokovala pojavu modrica te nije bilo krvarenja, dok je pojavnost anemije doživljavala svoj vrhunac nakon 8 do 12 tjedana terapije da bi kasnije pala na jednaku razinu kao i pojavnost u pacijenata liječenih placebo. Nakon prekida primjene ruxolitiniba, razina simptoma se vratila u početno stanje koje je bilo prisutno prije primjene terapije (*Verstovsek 2012*). Pacijenti su nastavljani pratiti i iduće tri godine te je i dalje bio prisutan pozitivan odgovor na terapiju u većeg dijela pacijenata, bez povećanja broja nuspojava. Postalo je evidentno da će ruxolitinib imati pozitivan učinak u pacijenata

neovisno o tome imaju li mutaciju JAK 2 ili nemaju, te će biti i od koristi pacijentima koji pripadaju u skupinu s visokorizičnim molekularnim profilom (*Harrison 2015*).

4.6. Belinostat

Belinostat (Beleodaq) je derivat hidroksamične kiseline, koji ostvaruje svoje djelovanje kao neselektivni inhibitor HDAC, koji je odobren 2014. godine od strane FDA za terapiju kod relapsa u oboljelih od PTCL-a i u onih kod kojih je PTCL refrakteran na primjenjivanu terapiju. Kao što je već spomenuto ranije, za PTCL ne postoji djelotvorna terapija te je dugoročno preživljenje mizernih 20-30%, tako da se intenzivno istražuju svi terapijski postupci koji bi mogli dovesti do poboljšanja ishoda u tih pacijenata. Cilj inicijalne terapije PTCL-a je obično kurativan, dok je tretman relapsa ili refrakterne bolesti često samo palijativne prirode (*Bodiford 2014*). U određenih tipova tumora postoji hiperekspresija HDAC-ova i moguće je da imaju ključnu ulogu u rastu tumora supresijom tumor-supresivnih gena. HDAC1 je znatno više eksprimiran u PTCL-u nego u B-staničnim limfomima, te su HDAC 1 i 2 pojačano eksprimirani u CTCL-u što sugerira potencijalni mehanizam preko kojega je moguće djelovati supresijski na tumor (*Marquard 2009*).

Belinostat je uključen u terapijske smjernice kao druga linija terapije kod pacijenata s relapsom PTCL-a nakon što je dobio odobrenje na temelju kliničkih istraživanja druge faze. U njima je pokazao djelotvornost u zaustavljanju progresije bolesti te smanjenja simptoma u dijela bolesnika. U 25% pacijenata izazvao je terapijski odgovor, u 10% kompletan, a u 15% parcijalni odgovor. Medijan trajanja ove reakcije bio je 159 dana. Trenutno se još istražuje njegov terapijski utjecaj na solidne tumore, kod refrakterne AML, mijelodisplastičnog sindroma i ne-sitnostaničnog raka pluća. Najčešće nuspojave koje se pojavljuju pri njegovoj primjeni su mučnina, povraćanje, letargičnost, umor, opstipacija, crvenilo i proljev. Teže hematološke nuspojave nisu bile prisutne, iako su se pojavile neutropenija i trombocitopenija u 13 % pacijenata. Moguće su pojava dispneje, pneumonije, oštećenja jetrenih funkcija te sindroma lize tumora (*Pohlman 2009*).

Rezultati primjene belinostata su zasada obećavajući, nalazi se u brojnim istraživanjima kao moguća nova terapijska opcija u liječenju raznih neoplazmi bilo kao monoterapija bilo kao dio većeg terapijskog tretmana i definitivno je potrebno duže praćenje učinaka ovog lijeka budući da je trenutno ipak ograničena dostupnost znanja i informacija o njemu.

4.7. Panobinostat

Panobinostat (Farydak) je derivat hidroksamične kiseline, odobren od FDA 2015. godine za liječenje pacijenata oboljelih od multiplog mijeloma, a koji su već prošli najmanje dva režima liječenja. Ima sposobnost inhibicije izoformi HDAC klase I, II i IV već pri niskim, nanomolarnim koncentracijama.

Multipli mijelom (MM), odnosno plazmacitom, jest rak plazma stanica. U oboljelih dolazi do nakupljanja abnormalnih plazma stanica u koštanoj srži gdje ometaju produkciju normalnih krvnih stanica. Uz to, aberantne plazma stanice patološki proizvode jedan klon IgG protutijela te se prezentiraju na elektroforezi serumskih proteina u obliku monoklalnog pika unutar IgG frakcije. Osim simptoma uzrokovanih supresijom proliferacije normalnih stanica koštane srži poput anemije, krvarenja te infekcija, pojavljuju se još i bol u kostima, patološke frakture kostiju i hiperkalcijemija koje su uzrokovane oštećenjem kostiju od strane plazmacitoma, te ozljeda bubrežne funkcije zbog oštećenja nefrona nakupljanjem protutijela koja proizvodi tumor. Iako su se u novije vrijeme pojavili inhibitori proteasoma i imunomodulacijski lijekovi koji pokazuju prilično dobru djelotvornost u oboljelih od MM-a, ova bolest je i dalje uglavnom neizlječiva te gotovo svi pacijenti dožive relaps, a petogodišnje preživljenje je oko 45%. Ti poražavajući podaci potiču istraživanja drugih monoterapijskih ili kombiniranih tretmana. Panobinostat je u pretkliničkim studijama pokazao sinergističku citotoksičnu aktivnost s bortezomibom prema stanicama MM-a (*Catley 2006*). U studiji PANORAMA 1 se uspoređivala učinkovitost zajedničkog tretmana panobinostatom, deksametazonom i bortezomibom u odnosu na tretman placebom, deksametazonom i bortezomibom. Mjerilo učinkovitosti je bio medijan preživljenja bez napredovanja bolesti koji je bio značajno bolji u skupine liječene panobinostatom u odnosu na onu placebom, također je proporcija pacijenata s kompletnim i gotovo kompletnim odgovorom bila dvostruko veća u skupini na tretmanu panobinostatom. Najčešće nuspojave zabilježene tijekom te studije bili su proljev, umor, mučnina, periferni edemi, smanjen apetit te vrućica, dok su se od hematoloških pojavile trombocitopenija i neutropenija. Rjeđe su se pojavile, ali ih valja spomenuti, promjene u EKG-u, promjene T vala i depresije ST segmenta, te poremećaji srčanog ritma (*San-Miguel 2014*). Na osnovi vrlo pozitivnih rezultata ove studije panobinostat je zaslužio odobrenje za kliničku primjenu. Kako je u terapiji MM-a izrazit problem razvoj rezistencije na lijekove, potaknuti rezultatima PANORAMA 1, provedena je i studija PANORAMA 2 u kojoj je ispitivana ista kombinacija lijekova kao i u prethodnoj studiji, međutim kao ispitanici su odabrani pacijenti s relapsom MM-a koji su rezistentni na bortezomib. Ova kombinirana

terapija postigla je ukupni odgovor u 34.5% ispitanika, dakle u trećine pacijenata prethodno rezistentnih na terapiju postignuto je kliničko poboljšanje ovim pristupom uz podnošljive nuspojave. Uz trombocitopeniju koja se pojavljuje kao nuspojava inhibitora HDAC, treba izdvojiti i perifernu neuropatiju koja je uobičajena nuspojava primjene bortezomiba te se nije pojavljivala češće ili u težem obliku u ovoj kombiniranoj terapiji (*Richardson 2013*).

Vodeći se ovim podacima možemo zaključiti da je panobinostat prilično koristan dodatak terapijskom arsenalu u borbi s multiplim mijelomom. Uz relativno siguran i poznat profil nuspojave omogućava dodatnu terapijsku opciju u pacijenata koji dožive relaps ili razviju rezistenciju na prethodno primijenjene lijekove.

5. Zaključak

Mutacije epigenoma smatraju se ključnim poremećajima u kaskadi događaja koji dovode do maligne alteracije stanica. Djelovanje na takav poremećeni epigenetski regulacijski sustav je zanimljiv koncept liječenja malignih bolesti. Iako je teoretski potencijal epigenetskih lijekova u liječenju malignih i određenih genetskih bolesti zaista izvanredan, ostaje problem dostave lijeka ciljano u stanice kojima je potreban i pronalazak pravog puta primjene koji će omogućiti prisutnost djelotvorne koncentracije lijeka uz minimalnu toksičnost.

Lijekovi opisani u ovom radu imaju različite mehanizme djelovanja, neki su analozi nukleozida koji se ugrađuju u molekulu DNA i na taj način sprječavaju metilaciju DNA te ometaju njezinu sintezu, dok su drugi inhibitori HDAC te, povećavajući razinu acetilacije u stanici, reguliraju ekspresiju gena. Zajednički cilj ovih lijekova jest utjecajem na epigenetske mehanizme, zaustaviti rast malignih stanica, zaustaviti transkripciju maligno alterirane DNA i prekinuti umnožavanje stanica malignih tumora. Velik dio tih lijekova je pokazao obećavajuće rezultate u pretkliničkim te kliničkim istraživanjima i na temelju njih su dobili ubrzanim postupcima odobrenja za upotrebu, budući da su namijenjeni liječenju bolesti koje zasada ili nemaju učinkovite terapije ili značajan dio pacijenata ne reagira na postojeće terapijske protokole. Dodatkom tih lijekova među terapijske opcije omogućavamo pacijentima više šansi za pozitivan odgovor na terapiju i poboljšavamo im izgleda za preživljenje. Otegotna okolnost koju se mora spomenuti jest nedostatak vremena provedenog u istraživanju te posljedično nepoznavanje potencijalnih dugoročnih štetnih učinaka ovih lijekova, mada isto tako ne poznajemo u potpunosti niti njihov dugoročni pozitivni potencijal.

Zaključno, smatram da je zaista svijetla budućnost pred epigenetskom terapijom, da su mogućnosti takve vrste liječenja neizmjerne te da je prostor za napredak ogroman.

6. Zahvale

Htio bih zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Vlahović na strpljenju i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i tebi, Mia, što ste mi pomagali i podupirali me kad mi je bio potreban savjet i potpora, i isto tako što ste me kritizirali i spuštali na zemlju kad bih se previše umislio i tako me poticali da budem još bolja osoba.

P. S. Audaces fortuna iuvat.

7. Literatura

Abdel-Wahab OI, Levine RL. Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. *Annu Rev Med* 2009;60:233-245.

Akilov OE, Geskin L. Therapeutic advances in cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett.* 2011;16:1–5.

Allfrey VG, Faulkner R, et al. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51: 786-794.

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

Atkinson SD, McGilligan VE, et al. Development of allele-specific therapeutic siRNA for keratin 5 mutations in epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol* 2005;131(10): 2079-2086.

Barrero MJ, Boue S, et al. Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. *Cell Stem Cell* 2010;7(5): 565-570.

Berger SL, Kouzarides T, et al. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009;23(7): 781-783.

Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:417–435.

Blomen VA and Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(1): 27-44.

Bodiford A, Bodge M, Talbott MS, Reddy NM. Profile of belinostat for the treatment of relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Onco Targets Ther.* 2014 Oct 24;7:1971-7.

Boumber Y and Issa JP. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park)* 2011;25(3): 220-226, 228.

Cabell C, Bates S, Piekarcz R, et al. Systematic assessment of potential cardiac effects of the novel histone deacetylase (HDAC) inhibitor romidepsin. *Blood.* 2009;114(22):1428–1429.

Carthew RW and Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136(4): 642-655.

Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T, et al. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* 2006; 108(10): 3441- 3449.

Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, et al. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:1300–1304.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15^{INK4B} is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:1813–1819.

Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, Caballero D, Borchmann P, Morschhauser F, Wilhelm M. et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. *J Clin Oncol.* 2012;30(6):631–636.

Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem.* 1982; 257: 2041–2048.

Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene.* 2002;21:427–436.

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982;10(8):2709-2721.

Farrona S, Coupland G, et al. The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(6): 560-573.

Figuroa ME, Lugthart S, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010;17(1): 13-27.

Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. Peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 2011;117(25):6756–6767.

Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005;363:15–23.

Gurion R, Vidal L, Gafter-Gvili A, Belnik Y, Yeshurun M, Raanani P, Shpilberg O. 5-azacitidine prolongs overall survival in patients with myelodysplastic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 2010; 95(2): 303-310.

Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2004;59:177–189.

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

Hawes SE, Stern JE, et al. DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer* 2010;69(2): 172-179.

Henikoff S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 2008;9(1): 15-26.

Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 2007;22(2): 91-103.

Hernandez-Vargas H, Sincic N, et al. Epigenetic signatures in stem cells and cancer stem cells. *Epigenomics* 2009;1(2): 261-280.

Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310: 45-59.

Horwitz SM. Management of peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(5):438–443.

Hughes LA, van den Brandt PA, et al. Early life exposure to famine and colorectal cancer risk: a role for epigenetic mechanisms. *PLoS One* 2009;4(11): e7951.

Issa J-PJ, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004; 103: 1635–1640.

Jaenisch R and Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl: 245-254.

Jin J, Cai Y, et al. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 2005;30(12): 680-687.

Jones PA and Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 2009;10(11):805-811.

Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res* 1983;84:202–211

Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control*. 2007;14:102–111.

Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res*. 2005(a) 11: 3604–3608

Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension, *Oncologist*. 2005(b) Mar;10(3):176-82.

Kanduri C, Whitehead J, et al. The long and the short of it: RNA-directed chromatin asymmetry in mammalian Xchromosome inactivation. *FEBS Lett* 2009;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. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 2006;106:1794–1803.

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

Khandige S, Shanbhogue VV, et al. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward. *Oncol Res* 2011;19(3-4): 105-110.

Lima SC, Hernandez-Vargas H, et al. Epigenetic signatures in cancer: Implications for the control of cancer in the clinic. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12(3): 316-324.

Lister R and Ecker JR. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 2009;19(6): 959-966.

Li LH, Olin EJ, Fraser TJ et al. Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Res* 1970;30:2770–2775.

Liu J, Carmell MA, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305(5689): 1437-1441.

Lubbert M, Wijermans P, Kunzmann R, et al. Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br J Haematol.* 2001; 114: 349–357.

Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;14:1497–1511.

Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, et al. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. *Histopathology.* 2009;54(6):688–698.

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

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

Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. 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.* 2002;21:5673–5683.

Moore LE, Pfeiffer RM, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a casecontrol study. *Lancet Oncol* 2008;9(4): 359-366.

Munster PN, Thurn KT, Thomas S, et al. A Phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:1828–1835.

Piekarz R, Bates S. A review of depsipeptide and other histone deacetylase inhibitors in clinical trials. *Curr Pharm Des.* 2004;10(19):2289–2298.

Piekarz RL, Frye R, Turner M, et al. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(32):5410–5417.

Pohlman B, Advani R, Duvic M, et al. Final results of a Phase II trial of belinostat (PXD101) in patients with recurrent or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma [abstract] *Blood*. 2009;114(22):S379.

Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, Weber DM, Coutre SE, Gasparetto C, Mukhopadhyay S, Ondovik MS, Khan M, Paley CS, Lonial S. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2331-7.

Rodriguez-Paredes M and Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17(3): 330-339.

San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS et al. 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 Oncol*. 2014 Oct;15(11):1195-206.

Sato A. Vorinostat approved in Japan for treatment of cutaneous T-cell lymphomas: status and prospects. *Onco Targets Ther*. 2012;5:67-76.

Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, et al. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2003; 102: 3865–3870.

Sharma S, Kelly TK, et al. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31(1): 27-36.

Sincic N and Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 2011;23(1): 69-76.

Stiff T, O'Driscoll M, et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 2004;64(7): 2390-2396.

Taft RJ, Pang KC, et al. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010;220(2): 126-139.

Teschendorff AE, Menon U, et al. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res* 2010;20(4): 440-446.

Tomari Y and Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005;19(5): 517-529.

Tsai HC and Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 2011;21(3): 502-517.

Uchida T, Kinoshita T, Nagai H et al. Hypermethylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;90:1403–1409.

Ueda H, Nakajima H, Hori Y et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1994; 47: 301–310.

Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:385-393.

Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1117–1127.

Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799–807.

Vesely J. Mode of action and effects of 5-azacytidine and of its derivatives in eukaryotic cells. *Pharmacol Ther* 1985;28:227–235.

Vlahović M i Sinčić N 2012. Epigenetika, mehanizmi genetske kontrole. Skripta

Vose JM, Neumann M, Harris ME, Int TCLP. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124–4130.

Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*. 2001;10:693–698.

Wermann H, Stoop H, et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 2010;221(4): 433-442.

Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 956–962.

Worthley DL, Whitehall VL, et al. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 2010;29(11): 1653-1662.

Yang X, Lay F, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31(11): 536-546.

Zabolotneva A, Tkachev V, et al. How many antiviral small interfering RNAs may be encoded by the mammalian genomes? *Biol Direct* 2010;5: 62.

8. Životopis

Rođen sam 19. 8. 1990. u Zadru. Pohađao sam Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Zagrebu te maturirao 2009. godine s odličnim uspjehom. Iste godine sam upisao studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija bio sam član košarkaške sekcije Medicinskog fakulteta te iako nismo ostvarili značajne uspjehe na Sveučilišnom prvenstvu grada Zagreba, ponosan sam na trud i rezultate koje smo postigli.

Osim hrvatskog, aktivno se služim engleskim, talijanskim i francuskim jezikom, a pasivno njemačkim, slovenskim, latinskim i starogrčkim.