Terapijski potencijal epigenetički aktivnih tvari u liječenju neoplastičnih bolesti

Narančić, Marino

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:937469

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marino Narančić

Terapijski potencijal epigenetički aktivnih lijekova u liječenju neoplastičnih bolesti

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marino Narančić

Terapijski potencijal epigenetički aktivnih lijekova u liječenju neoplastičnih bolesti

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Nina Sinčića, dr. med i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

Popis i objašnjenje kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (eng. epidermal growth factor receptor)

EGF – epidermalni čimbenik rasta (eng. epidermal growth factor)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. ribonucleic acid)

CpG – citzin-gvanin dinukleotid

DNMT – DNA metiltransferaza

5mC – 5-metilcitozin

ncRNA – nekodirajuća RNA (eng. non-coding RNA)

mRNA – glasnička RNA (eng. messenger RNA)

siRNA – mala interferirajuća RNA (eng. small interfering RNA)

miRNA – mikroRNA (eng. microRNA)

dsRNA – dvolančana RNA (eng. double-stranded RNA)

RISC – RNA inducirani kompleks utišavanja (eng. RNA induced silencing complex)

FDA – Agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration)

5azaC – 5-azacitidin

tRNA – transportna RNA (eng. transfer RNA)

MDS – mijelodisplastični sindrom

HDAC – histonska deacetilaza

HAT – histonska acetiltransferaza

shRNA – kratka ukosnica RNA (eng. short hairpin RNA)

ECGC – epigalokatehin-3-galat (eng. epigallocatechin 3-gallate)

Sadržaj

1. SAŽETAK I

2. SUMMARY II

3. TUMORI 1

3.1. Incidencija 1

3.2. Etiologija 3

3.3. Terapija 4

3.4. Prognostika 6

4. EPIGENETIKA 7

4.1. Metilacija DNA 7

4.2. Histonske modifikacije 9

4.3. RNA interferncija 10

5. EPIGENETIKA U LIJEČENJU NEOPLASTIČNIH BOLESTI 13

5.1. Inhibitori DNA metiltransferaze 13

5.2. Inhibitori histonskih modifikacija 15

5.3. RNA interferencija u terapiji neoplazmi 18

5.4. Konvencionalni lijekovi s epigenetičkim učinkom 19

5.5. Antitumorske epigenetski aktivne tvari u prehrani 21

6. ZAKLJUČAK 23

7. ZAHVALE 24

8. LITERATURA 25

9. ŽIVOTOPIS 31

1. SAŽETAK

Terapijski potencijal epigenetički aktivnih tvari u liječenju neoplastičnih bolesti

Marino Narančić

Neoplastične bolesti drugi su najčešći uzrok smrti u svijetu, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti. Visoka smrtnost uvjetovana je, pored ostalog, nedovoljno uspješnom konvencionalnom antitumorskom terapijom. Stoga se i dalje ulažu veliki napori kako bi se pronašli novi terapijski pristupi, posebice u okviru kemoterapije.

Mnogi znanstvenici smatraju da su budućnost onkološke terapije lijekovi koji mogu modulirati ekspresiju gena poput epigenetički aktivnih tvari. Taj se novi pristup pokazao uspješnim u liječenju hematoloških zloćudnih bolesti, dočim rezultati niza istraživanja ukazuju na mogućnosti kliničke uporabe epigenetičke terapije u pacijenata sa solidnim tumorima, bilo samostalno bilo u kombinaciji s konvencionalnom terapijom.

Međutim, još uvijek postoje prepreke za široku primjenu epigenetičkih lijekova. Uglavnom su to potencijalne nuspojave posebice zloćudna transformacija *de novo*. Pored toga, za pojedine epigenetički aktivne tvari s poznatim terapijskim učinkom još uvijek postoji problem farmakološke formulacije lijeka koja bi im omogućila maksimalni terapijski potencijal.

Znanstvena istraživanja, pored otkrivanja novih lijekova, upozoravaju na sporedne epigenetičke učinke čitavog niza lijekova koji su odavno u primjeni. Iako ove spoznaje naglašavaju nepoznavanje ili čak ignoriranje sveobuhvatnog učinka pojedinih lijekova, također ukazuju na mogućnost alternativne primjene pojedinih lijekova u onkološkoj terapiji. Pored ispitivanja poznatih lijekova, izniman se napor

ulaže u identifikaciju epigenetički aktivnih tvari prisutnih u svakodnevnoj prehrani kao vrijednim izvorom prirodnih supstanci s potencijalnim protutumorskim djelovanjem i potencijalom primjene u onkološkoj prevenciji i terapiji budućnosti.

Ključne riječi: neoplastične bolesti, epigenetika, terapija

2. SUMMARY

Therapeutic potential of epigenetic active substances in neoplastic disease treatment

Marino Narančić

Neoplastic diseases are the second leading cause of death in the world, following cardiovascular diseases. A high mortality rate is the result of, among other things, insufficiently effective conventional cancer treatment. Therefore, great effort is still being put into finding new therapeutical approaches, especially in the domain of chemotherapy.

Many scientists regard drugs which can modulate gene expression, such as epigenetic active substances, as future of oncologic therapy. The new approach was found to be successful in treating hematological malignancies, while the results of numerous research point to the possibility of clinical application of epigenetic therapy, both inidividually and in combination with conventional therapy.

However, there are still obstacles to wide utilization of epigenetic drugs. Mostly, those are potential side effects of epigenetic drugs, especially *de novo* malignant tranformation. Furthermore, there are still difficulties with reaching pharmacological formulation of some epigenetic active substances with known therapeutic effect, which is vital in order for the drug to reach its full therapeutic potential.

In addition to discovering new medicines, scientific research often warn about the secondary epigenetic effects of a number of medicines that have long been in use. Although these insights emphasize the fact that the overall effect of some

medications is not known, or is sometimes even ignored, they also point to the possibility of an alternative application of some medicines in oncologic therapy. Along with testing new medicines, a significant effort is put into identifying epigenetic active substances present in daily diet as a significant source of natural substances with potential antitumor impact and a great potential for application in oncologic prevention and therapy of the future.

Key words: neoplasitic diseases, therapy, epigenetics

3. TUMORI

Iako se napretkom znanosti i tehnologije naše spoznaje o tumorima rapidno povećavaju, danas još uvijek koristimo definiciju tumora koju je predložio patolog Robert Willis ranih 50-ih godina prošlog stoljeća. Prema toj definiciji tumori su abnormalne nakupine tkiva, čiji rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon uklanjanja uzroka te promjene (Damjanov i sur. 2014).

Klinički, tumore možemo podijeliti na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Glavna razlika između njih je ta što se maligni tumori osim u okolno tkivo mogu širiti i u druge (udaljene) dijelove tijela, a takvo širenje zovemo metastaziranje. Zbog toga zloćudne novotvorine, koje još nazivamo i rak, imaju nepovoljniji klinički ishod, složeniji terapijski pristup i viši ukupni mortalitet. To je razlog zašto je u ovom radu fokus usmjeren na maligne tumore.

3.1. Incidencija

Novotvorine zauzimaju drugo mjesto vodećih uzroka smrti u Republici Hrvatskoj (RH) i svijetu, odmah poslije kardiovaskularnih bolesti. U RH je 2014. godine od novotvorina umrlo 14.206 osoba ili oko 28% svih umrlih. Tomu pridonosi i visoka incidencija. U 2013. godini stopa incidencije za maligne bolesti iznosila je 487,9/100.000; 538,9/100.000 za muškarce i 440,3/100.000 za žene. Pet najčešćih sijela raka za muškarce su: traheja, bronh i pluća (18%), prostata (15%), kolon (10%), mokraćni mjehur (7%) te rektum i rektosigma (7%). U žena su pet najčešćih sijela: dojka (26%), kolon (8%), traheja, bronh i pluća (7%), tijelo maternice (6%) te

rektum i rektosigma (5%) (Registar za rak Republike Hrvatske, 2015). Učestalost raka prema pojedinim sijelima razlikuje se s obzirom na dob i spol, što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Najčešća sijela tumora s obzirom na dob i spol

DOB	NAJČEŠĆA SIJELA	
	MUŠKARCI	ŽENE
0–9	mozak, leukemije	mozak, leukemije
10–19	mozak, kosti, zglobna hrskavica, leukemije	mozak, kosti, zglobna, hrskavica, leukemije
20–29	testis, mozak, Hodgkinova bolest	Hodgkinova bolest, mozak, štitnjača
30–39	testisi, mozak, pluća	dojka, maternični vrat, štitnjača
40–49	pluća, grkljan, rektum, rektosigma i anus	dojka, maternični vrat, jajnik, jajovod
50–59	pluća, grkljan, želudac	dojka, jajnik, jajovod, pluća
60–69	pluća, prostata, rektum, rektosigma i anus	dojka, maternični trup, kolon
70–79	pluća, prostata, kolon	dojka, kolon, želudac
80 i više	prostata, pluća, mokraćni mjehur	dojka, kolon, želudac

Izvor: Vrdoljak i sur. (2016) Klinička onkologija. Medicinska naklada, Zagreb

S obzirom na visoke vrijednosti mortaliteta i incidencije, ne čudi što su primarna i sekundarna prevencija te liječenje raka visoko na ljestvici prioriteta u biomedicinskim istraživanjima i aktivnostima javnog zdravstva.

3.2. Etiologija

Zloćudna pretvorba stanice objašnjava se postepenom akumulacijom oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA) odnosno gena kroz proces karcinogeneze. Za malignu transformaciju najznačajnija su oštećenja koja se događaju na protoonkogenima i genima supresorima tumora, genima koji sudjeluju u apoptozi i popravku DNA.

Produkti protoonkogena su bjelančevine koje su kao pozitivni regulatori staničnog rasta i diobe vrlo važni za proliferaciju i diferencijaciju stanica. Najčešće je riječ o čimbenicima rasta ili njihovim receptorima, ostalim molekulama uključenima u transdukciji signala te pozitivnim regulatorima staničnog ciklusa. Promjene na protoonkogenima, kao što su mutacije ili pojačana ekspresija, dovode do njihove konverzije u onkogene, čiji produkti (onkoproteini) uzrokuju nekontroliranu diobu stanice i razvoj tumora (Damjanov i sur. 2014). Tako se poremećaj onkogena *EGFR* može naći kod različitih tipova raka – kod glioblastoma gdje mutacija uzrokuje aktivnost EGFR (eng. *epidermal growth factor receptor*) i kad epidermalni čimbenik rasta (EGF) nije vezan za njega, primjerice. To dovodi do nekontroliranog staničnog ciklusa i diobe što rezultira razvojem tumora (Taylor et al. 2014.).

Geni supresori tumora (antionkogeni) kodiraju za proteine koji imaju funkciju negativnih regulatora staničnog ciklusa i koče „nesuvislu“ staničnu proliferaciju. Gubitak ili oštećenje funkcije tih gena, mutacijom ili potiskivanjem ekspresije, rezultirat će tumorskom transformacijom stanice. Jedan od najpoznatijih antionkogena je *P53* gen čiji produkt (P53 protein) spriječava ulazak stanice s oštećenom DNA u S fazu staničnog ciklusa. Osim zaustavljanja ciklusa, P53 ima značajnu ulogu u sustavu popravka DNA, a ukoliko do popravka ne dođe, šalje stanicu u apoptozu. Stoga i ne čudi činjenica da je upravo mutacija *P53* gena

najčešća genska mutacija u tumorima čovjeka (Vrdoljak i sur. 2013).

Maligna transformacija može biti posljedica i poremećene aktivnosti gena koji sudjeluju u procesu apoptoze. Kod folikularnog limfoma u 85% slučajeva nalazimo translokaciju t(14;18) koja dovodi do pretjerane ekspresije *BCL2* gena čiji je produkt inhibitor apoptoze, primjerice (Freedman 2014).

Poremećaje u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u sustavu popravka DNA također nalazimo u brojnim tumorima, a najistaknutiji primjer svakako su mutacije *BRCA1* i *BRCA2* gena, odgovornih za popravak dvolančanih lomova DNA, koje danas smatramo odgovornima za nasljedne tumore dojke i jajnika (Levanat & Cvok 2010).

3.3. Terapija

Tri su osnovna pristupa liječenju kojima se danas služimo u terapiji tumora: radioterapija, kemoterapija te kirurško liječenje.

Radioterapija je oblik lokalnog liječenja tumora, koje se provodi ionizirajućim zračenjem tumorske mase, uz što veću poštedu zdravog tkiva. Zračenje uništava tumorske stanice na isti način kao i normalne stanice, uzrokujući oštećenja DNA ponajviše putem slobodnih radikala. Ova vrsta liječenja može biti kurativna (samostalno ili u kombinaciji s drugim modalitetima liječenja) ili palijativna. Međutim, može izazvati brojne neželjene posljedice od kojih blaži oblik predstavljaju eritem, promjene pigmentacije i teleangiektazije na koži. Kod zračenja mozga nuspojave su vezane uz središnji živčani sustav, a mogu biti akutne (moždani edem), rane odgođene (mučnina, povraćanje, ataksije) te kasne odgođene (nekroza, atrofija mozga i glioza); dok pri zračenju probavnog sustava može doći do radijacijskog

ezofagitisa, akutnog i kroničnog radijacijskog enteritisa te brojnih drugih nuspojava (Vrdoljak i sur. 2014). Ipak, najozbiljniju nuspojavu radioterapije svakako predstavljaju tumori koji nastaju *de novo* zbog djelovanja ionizirajućeg zračenja na okolno zdravo tkivo tijekom same terapije.

Kemoterapija je oblik sistemske onkološke terapije, pri čemu se koriste citostatici koji uništavaju brzo proliferirajuće stanice ometanjem ili kočenjem sinteze DNA, ribonukleinskih kiselina (RNA) te proteina, ili onemogućavanjem formiranja diobenog vretena. Osim tumorskih, brza je proliferacija svojstvo i brojnih zdravih tkiva. Ta karakteristika platforma je za razvoj brojnih nuspojava pri primjeni citostatika. Neke od najvažnijih nuspojava su srčana, plućna, bubrežna te neurološka toksičnost, mučnina i povraćanje, proljev, alergijske reakcije, alopecija, supresija koštane srži, oštećenje funkcije spolnih žlijezda ali i indukcija iatrogenih tumora. Osim toga, nedostatak je kemoterapije i česta pojava rezistencije tumora na određene citostatike koja nastaje zbog genske nestabilnosti tumora (Katzung i sur. 2011).

Kirurški zahvat se kao primarna terapija koristi kod lokalnih i lokoregionalnih tumora, pri čemu se otklanja tumor ali i okolno tkivo te eventualno regionalni limfni čvorovi. Vrlo često se kombinira s drugim pristupima liječenja (kemoterapija i radioterapija) koji se primjenjuju prije ili poslije operacije. Kod diseminiranih malignoma kirurško liječenje nije terapija izbora iako se, u određenim situacijama, mogu operirati i metastaze. Osim u kurativne, kirurški se pristup liječenju primjenjuje i u palijativne svrhe u cilju poboljšanja kvalitete života neizlječivih bolesnika (Vrdoljak i sur. 2014).

3.4. Prognostika

Prognoza malignih bolesti izražava se statističkom kategorijom – preživljenjem, koje predstavlja vrijeme od postavljanja dijagnoze do smrti pacijenta uzrokovane rakom. Najčešće se mjeri kao postotak bolesnika koji prežive pet godina ili deset godina, a mjera se naziva petogodišnje, odnosno desetogodišnje preživljenje. Preživljenje se obično izražava za svaku vrstu tumora posebno, i shodno tomu ono se razlikuje ovisno o biološkim i kliničkim karakteristikama malignoma. Zorni prikaz razvoja onkologije dalo nam je istraživanje preživljenja koje je uzelo u obzir sve oboljele od malignoma starije od 15 godina u Engleskoj i Walesu od 1971. do 2011. Prema tom istraživanju očekivano jednogodišnje preživljenje onkoloških pacijenata prije 40 godina iznosilo je 50% koliko je očekivano desetogodišnje preživljenje za osobe kojima je rak dijagnosticiran 2010. i 2011. godine što pokazuje znatan napredak u dijagnostici i terapiji malignih bolesti. Zanimljivo je i podatak da, od početka praćenja i analize podataka do danas, žene imaju oko 10% veće 10-ogodišnje preživljenje od muškaraca, što se objašnjava većom zastupljenosti prognostički povoljnijih tumora u žena. Osim toga, zabilježeno je veće preživljenje kod mlađih pacijenata (15-44 godine) u odnosu na starije (75-99 godina) (Quaresma et al. 2015).

Unatoč znatnom poboljšanju u odnosu na 70te godine prošlog stoljeća, desetogodišnje preživljenje od 50% još uvijek je relativno nezadovoljavajuće. Iako navedeni terapijski pristupi čine temelj onkološke terapije, poznati nedostaci i ograničenja te suvremene spoznaje u okviru bazičnih bioloških istraživanja zahtijevaju razvoj novih pristupa koji bi konvencionalne primarno nadopunili, a sve u cilju produljenja života pacijenta, podizanja kvalitete života te smanjenja mortaliteta uopće.

4. EPIGENETIKA

Epigenetika je znanstvena disciplina koja proučava mehanizme kontrole strukture kromatina, ekspresije gena i regulaciju ispoljavanja određenog fenotipa tijekom života stanice odnosno organizma uopće. Osim toga epigenetika se bavi i pitanjem transgeneracijskog učinka naslijeđenih obrazaca ekspresije gena, koji roditelji putem spolnih stanica predaju potomcima (Deans & Maggert 2015).

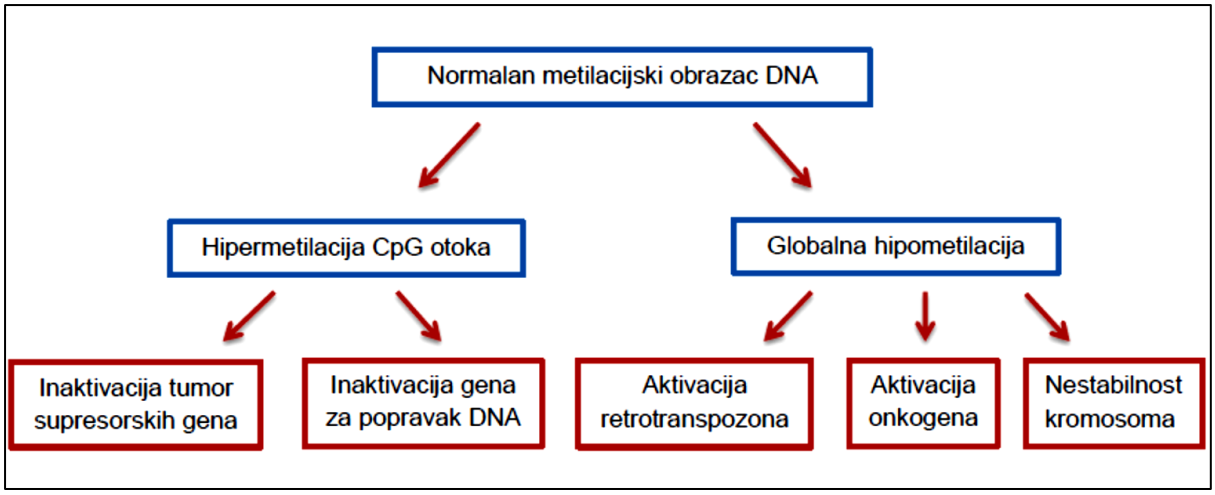
Regulacija ekspresije gena evolucijski je iznimno zahvalan mehanizam prilagodbe stanica na promjene u okolišu jer ne dolazi do gubitaka ili promjena u DNA sekvenci (Herceg & Vaissière 2011). U tom procesu sudjeluje nekoliko elemenata epigenetičkog puta. Prvi u tom putu su epigenatori – faktori okoliša koji pokreću mehanizme prilagodbe stanice. Mogu biti egzogeni ili endogeni, odnosno mogu dolaziti iz organizma ili iz njegovog okoliša. Djeluju na epigenetičke inicijatore koji određuju koji će dio genoma biti utišan ili aktiviran a da bi prilagodba bila najprimjerenija. Ta promjena u obrascu ekspresije gena izvršava se putem epigentičkih održivača koji će takav obrazac nadalje održavati stabilnim i omogućiti njegov prijenos na stanice kćeri, pa i na naredne generacije ako se promjena dogodila u spolnim stanicama (Vlahović & Sinčić 2012). Epigenetičke održivače predstavljaju mehanizmi kontrole strukture kromatina i ekspresije gena; metilacija DNA, posttranslacijske modifikacije histona i RNA interferncija.

4.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA označava adiciju metilne skupine na peti atom ugljika citozina primarno u dinukleotidnoj citozin-gvanin sekvenci (CpG), a reakcija se odvija uz pomoć enzima DNA metiltransferaze (DNMT). Takav citozin nazivamo 5-metilcitozin

(5mC) koji ima snažan utjecaj na aktivnost gena u čijoj se sekvenci nalazi. Naime, metilirani CpG dinukleotidi, koji se vrlo često nalaze unutar promotora, dovode to zatvorene konformacije kromatina (heterokromatina) i na taj način onemogućuju pristup transkripcijskim faktorima da se vežu na promotor što rezultira izostankom transkripcije i inaktivacijom gena. Stoga možemo reći da su nemetilirani geni aktivni, a metilirani inaktivni. Metilacija CpG dinukleotida dakle uvjetuje kompaktan heterokromatin i nije isključivo svojstvo kodirajućeg dijela genoma. Naime, u normalnim stanicama, 70-80% CpG dinukleotida je metilirano i locirano u CpG bogatim regijama repetativnih sekvenci. To je vrlo bitno jer upravo njihova metilacija osigurava stabilnost genoma koja bi mogla biti narušena njihovim izrezivanjem i premještanjem unutar genoma (Arand et al. 2012). Ostale CpG bogate regije nazivamo CpG otocima, a nalaze se u promotorskim regijama više od polovice ljudskih gena čija je aktivnost ali i regulacija ekspresije nužna za normalno funkcioniranje stanice i organizma u cijelosti (Vlahović & Sinčić 2012).

Ustanovljeno je da se u tumorskim stanicama nalaze značajna odstupanja u metilacijskom obrascu u odnosu na normalne stanice, kao što su globalna hipometilacija DNA i hipermetilacija promotorskih regija gena, posebice CpG otoka. Globalna hipometilacija može rezultirati aktivacijom dijelova genoma koji su inače suprimirani, kao što su određeni onkogeni i repetativni elementi, te dovesti do maligne transformacije stanice. Globalna razina metilacije DNA može biti koristan biomarker rizika od razvoja određenog tipa tumora te na taj način biti upotrebljena u testiranju rizika i molekularnoj epidemiologiji (Sinčić & Herceg 2011).



Slika 4.1. Promjene ekspresije gena u zloćudnim stanicama uzokovane poremećenim metilacijskim obrascem

Hipermetilacija CpG otoka odnosno promotora gena supresora tumora ili gena za popravak DNA također može biti inicijator tumorogeneze. Stanice kolorektalnog karcinoma pokazuju inhibiciju ekspresije posredovanu hipermetilacijom niza gena, primjerice: *MLH1*, *RB*, *P16*, *RARB* i *SFRP* (Hammoud et al. 2013).

Ukratko, danas je prihvaćena činjenica, potvrđena nizom istraživanja, da ne postoji maligni tumor u čijim se stanicama ne može pronaći čitav niz epimutacija, posebice hipermetilacije specifičnih gena (Sinčić & Herceg 2011).

4.2. Histonske modifikacije

Posttranslacijske modifikacije histona drugi su epigenetički sustav koji uvjetuje strukturu kromatina i transkripcijsku aktivnost gena, a odnosi se na adiciju ili eliminaciju određenih kemijskih skupina na aminokiseline polipeptidnog lanca histonskog repa. Na taj se način primarno mijenjaju fizikalna svojstva histona što

dovodi do otvorene ili zatvorene strukture kromatina kojom se regulira dostupnost gena transkripcijskoj mašineriji. Ovisno o kemijskoj skupini koja se veže na histone, histonske modifikacije uključuju acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju, sumoilaciju i ubikvinaciju. Općenito se smatra da acetilacija i fosforilacija histona opuštaju strukturu kromatina i omogućuju transkripciju gena, dok sumoilacija uzrokuje čvršću vezanost molekule DNA za histone i inhibira transkripciju gena. Metilacija i ubikvinacija mogu i aktivirati i inhibirati ekspresiju gena, ovisno o mjestu i zahvaćenom histonu (Vlahović & Sinčić 2011). Tako metilacija H3K9, H3K27 i H4K20 rezultira ekspresijom gena, dok suprotni efekt ima metilacija H3K4, H3K26 i H3K79 (Murnyak et al. 2015).

U tumorskim se stanicama, uz poremećen obrazac metilacije DNA, nalaze i epimutacije (poremećaji) histonskih modifikacija. Štoviše, neke od njih mogu biti upravo i kritični događaj koji dovodi do tumorogeneze (Sawan & Herceg 2010). Brojna istraživanja pokazala su da histonske deacetilaze uzrokuju inhibiciju ekspresije tumor supresorskih gena, primjerice. Nadalje, u stanicama raka dojke utvrđeno je da se tijekom procesa maligne transformacije stanica postupno smanjuju razine metilacije H3K9me2 i H3K9me3. Upravo se izmijenjeni metilacijski obrazac histona danas smatra kao potencijalni biomarker fenotipa tumora te prognoze ishoda bolesti (Zhao et al. 2016).

4.3. RNA interferncija

RNA interferencija (RNAi) je treći epigenetički sustav koji sudjeluje primarno u kontroli ekspresije gena, a temelji se na RNA molekulama koje se ne prevode do proteina, već se posredno vežu na mRNA (eng. *messenger RNA*) čime

onemogućuju njenu translaciju i sintezu proteina. RNA molekule koje ne kodiraju proteine nazivamo nekodirajuće RNA (eng. *non-coding RNAs*, ncRNAs), a gotovo 25% nekodirajućeg dijela genoma se prepisuje upravo u takve molekule. Nekodirajuće RNA koje sudjeluju u procesu inhibicije ekspresije gena na razina mRNA su: male interferirajuće RNA (eng. *small interfering RNAs*, siRNAs) i mikro RNA (eng. *microRNAs*, miRNAs). SiRNA molekule uvijek su dvolančane i mogu biti i endogenog i egzogenog porijekla, dok su miRNA jednolančane. Zbog komplementarnih dijelova koji se međusobno sparuju, miRNA ima specifičnu konformaciju dvolančane ukosnice, te je isključivo endogenog porijekla (Vlahović & Sinčić 2012). Obje vrste tih molekula vežu se na o ATP-u ovisnu RNAazu III zvanu Dicer koja ih cijepa na dsRNA (eng*. double-stranded RNA*) veličine 22 nukleotida. Uz pomoć Dicera, izrezana dsRNA se veže na protein Argonaut kao dijela RNA induciranog kompleksa utišavanja (eng. *RNA induced silencing* complex, RISC), koji odmotava dsRNA i pritom jedan lanac otpušta kao višak, a drugi ostaje u kompleksu i traži komplementarnu mRNA na koju će se vezati. Ukoliko se za mRNA veže proteinski kompleks s inkorporiranim dijelom miRNA doći će do inhibicije translacije, a ukoliko se za mRNA veže proteinski kompleks s inkorporiranim dijelom siRNA doći će do njene razgradnje (Rao et al. 2013).

Deregulacija sustava RNAi može imati važnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti, pa i u malignoj transformaciji stanice, djelujući na ekspresiju gena čija poremećena aktivnost može dovesti do promjena u proliferaciji, diferencijaciji ili apoptozi. S obzirom na ulogu koju imaju u karcinogenezi, razlikujemo dvije osnovne vrste miRNA: onkogene miRNA koje inhibiraju ekspresiju gena supresora tumora, te tumor supresivne miRNA koje inhibiraju translaciju proteina koji dovode do nekontrolirane diobe stanica i pojave tumora (Guo & Yan 2015).

Budući da su epimutacije RNAi pronađene u nizu malignih tumora, poremećaji ovog epigenetičkog sustava u središtu su bazičnih istraživanja indukcije i progresije tumora, ali i translacijskih istraživanja novih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera onkoloških bolesti, kao i novih antitumorskih lijekova (Murnyak et al. 2015, Wang & Luo 2015).

5. EPIGENETIKA U LIJEČENJU NEOPLASTIČNIH BOLESTI

Cilj istraživanja epigenetički aktivnih antitumorskih lijekova jest proizvesti lijekove koji će biti selektiviji i učinkovitiji u ubijaju ili „liječenju“ tumorskih stanica od konvencionalne terapije, a da pritom imaju što manje neželjenih učinaka za pacijente. Nakon brojnih otkrića na polju epigenetike, mnogi istraživači polažu nadu upravo u epigenetički aktivne lijekove, čiji bi se biološki učinak temeljio na ponovnoj uspostavi fiziološkog epigenetičkog obrasca te konverziji tumorskog u diferencirano tkivo odnosno ponovnoj uspostavi fiziološkog fenotipa maligno transformirane stanice. Iako epigenetički aktivne tvari pokazuju direktnu citotoksičnost u višim dozama, epigenetička terapija također je usmjerena ka promjenama genske ekspresije u cilju podizanja osjetljivosti tumorskog tkiva na djelovanje tradicionalnih citotoksičnih lijekova (Sarkar et al. 2013a). Najmanji efekt epigenetičkih lijekova očekuje se na zdrava tkiva, iako postoji opasnost od indukcije zloćudne pretvorbe *de novo* zbog zadiranja epigenetičkih lijekova u fiziološke mehanizme regulacije gena i održavanja stabilnost genoma. To je posebno izraženo kod onih epigenetičkih lijekova koji nisu specifični za mjesto djelovanja unutar genoma kao što su modulatori metilacije DNA i histonskih modikacija.

5.1. Inhibitori DNA metiltransferaze

Prva vrsta epigenetički aktivnih lijekova koje je Američka agencija za hranu i lijekove FDA (eng. *Food and Drug Administration*) odobrila za liječenje malignih bolesti upravo su inhibitori DNA metiltransferaze. Iz te skupine najstariji i najistraživaniji lijek je analog citozina 5-azacitidin (5azaC), čiji je citotoksični učinak na tumorske stanice uočen još početkom druge polovice 20.stoljeća, ali je

mehanizam njegova djelovanja ostao još dugo nepoznat. Danas se zna da je to snažna demetilacijska tvar, koja je našla svoju primjenu u liječenju prvenstveno hematoloških onkoloških bolesti (Vlahović & Sinčić 2012).

Kemijska struktura 5azaC se razlikuje od strukture citozina po atomu dušika na petom mjestu namjesto atoma ugljika. Kada dospije u stanicu, 5azaC se fosforilira i ugrađuje u molekulu DNA tijekom replikacije. Kao analog citozina prepoznat je od strane enzima DNMT koji se ireverzibilno veže na 5azaC što dovodi do degradacije enzima i onemogućavanja prepisivanja metilacijskog obrasca s lanca kalupa (Heerboth et al. 2014). Osim u DNA, 5azaC se ugrađuje u mRNA i tRNA te tako utječe na predtranslacijske i translacijske procese ekspresije gena. (Vlahović & Sinčić 2012).

Uz 5azaC, i decitabin (5-aza-2'deoksicitidin) je odobren od strane FDA u liječenju mijelodisplastičnog sindroma (MDS). Njihov mehanizam inhibicije DNMT je praktički jednak, a oba lijeka suprimiraju rast tumora, ometaju stanični ciklus, potiču apoptozu i diferencijaciju te uklanjaju mehanizme izbjegavanja imunološkog odgovora (Yan et al. 2016). Osim izravnog citotoksičnog efekta, povećavaju osjetljivost tumorskih stanica na konvencionalnu kemoterapiju te se ponekad koriste u kombinaciji s konvencionalnim citotoksičnim lijekovima posebice u slučajevima pojave rezistencije tumorskih stanica. Istraživanje na pacijentima s rakom jajnika otpornog na platinsku terapiju pokazalo je reverziju rezistencije kad se lijek primjenjivao u kombinaciji s 5azaC i decitabinom (Oronsky et al. 2014). Iako su se oba pokazala korisnim u liječenjima, kako hematoloških, tako i solidnih neoplazija, ne smiju se zanemariti neželjene pojave do kojih njihova uporaba može dovesti. Najznačajnija nuspojava je indukcija tumora *de novo* kao rezultat DNA hipometilacije i oštećenja DNA koji ovi lijekovi mogu izazvati. Od kratkoročnih nuspojava ističe se

mijelosupresija koja se uglavnom očituje kao privremena neutropenija i trombocitopenija (Nakamura et al. 2015).

Zebularin je DNMT inhibitor druge generacije, koji je još u fazi intenzivnog ispitivanja te nije odobren od FDA. I on je analog citozina, ali pokazuje brojne prednosti pred svojim prethodnicima: veća stabilnost u vodenim otopinama i oralna bioraspoloživost te selektivnije ciljanje tumorskih stanica. Istraživanja na miševima ukazuju i na manju toksičnost zebularina, čak i nakon dugotrajne uporabe (Nakamura et al. 2015).

Iako ne spadaju u epigenetički aktivne tvari, „antisense“ oligonukleotidi koji inhibiraju DNA metilaciju tako da se vežu na *DNMT1* gen imaju posebno mjesto u skupini inhibitora metilacije DNMT. Naime, onemogućuju transkripciju *DNMT1* gena a time mijenjaju sustav metilacije DNA u stanici. Istraživanja na životinjskim modelima su dokazala da primjena MG98, najpoznatijeg predstavnika ove skupine, dovodi do ponovne ekspresije tumor supresor gena *p16*. Prema kliničkim istraživanjima MG98 pokazuje uspjeh u liječenju proširenih tumora bubrega, posebno u kombinaciji s Roferonom-A. Uz usporavanje napretka tumora, ističe se i minimalnom toksičnošću. Osim MG98 istražuje se i RG108, koja direktno inhibira aktivno mjesto DNMT1 enzima i koja zbog visoke specifičnosti i niske toksičnosti predstavlja, čini se, učinkovito sredstvo u borbi protiv neoplastičnih bolesti (Heerboth et al. 2014).

5.2. Inhibitori histonskih modifikacija

Ovi lijekovi inhibtori su enzima koji kataliziraju histonske modifikacije. Najpoznatiji među njima inhibitori su histonke deacetilaze (HDAC). Tumori se

najčešće povezuju s pretjeranom ekspresijom HDAC i posljedičnom hipoacetilacijom histona, pa se ovim lijekovima nastoji vratiti ravnoteža u histonskoj acetilaciji i ekspresiji gena (Huang et al. 2011). Razvoj ovih lijekova otežava činjenica da postoji najmanje 6 HDAC enzima, ukriženost molekularnih putova na koje djeluju te nedovoljno istraženi biološki učinci (Oronsky et al. 2014). Međutim na polju liječenja raka izazivaju puno pažnje jer je utvrđeno da ubijaju stanice raka inducirajući apoptozu, autofagiju, staničnu nekrozu, stvaranje kisikovih radikala te zaustavljaju stanični ciklus, potiskuju tumorsku angiogenezu i potiču imunološki odgovor na tumorske stanice. S obzirom da i HDAC inhibitori djeluju prilično neselektivno, očekivana je opasnost od neželjene indukcije iatrogene maligne transformacije zdravih stanice. Ipak, pokazalo se da HDAC inhibitori rijetko pridonose tumorigenezi *de novo* te primarno usmjeruju stanice ka diferencijaciji (Ansari et al. 2016). Također, HDAC inhibitori povećavaju osjetljivost tumora na citostatike, što ih čini pogodnim za uporabu u kombinaciji epigenetičke i konvencionalne terapije (Heerboth et al. 2014). Tako je primjerice uporaba kombinacije vorinostatina (HDAC inhibitor) i kalpeptina uspješnija u inhibiciji proliferacije stanica raka dojke nego učinak svakog lijeka ponaosob (Mataga et al. 2012). Zanimljivo, HDAC inhibitori mogu utišati i DNMT1 te na taj način inducirati demetilaciju utišanih tumor supresorskih gena. Upravo kombinacija HDAC inhibitora i 5azaC u mnogim istraživanjima postiže izniman sinergistički demetilirajući učinak i ponovnu ekspresiju gena supresora tumora (Sarkar at al. 2013b). Ohrabrujuće rezultate u primjeni ovakve kombinirane terapije donosi istraživanje koje pokazuje da azacitidin i entinostat (HDAC inhibitor) imaju izniman terapijski učinak i dobru podnošljivost kod pacijenata s metastatskim tumorom pluća (Juergens et al. 2011). Za sad su od FDA odobreni sljedeći HDAC inhibitori: vorinostat (2006.) i romidepsin (2009.) za liječenje kožnog T-staničnog

limfoma, belinostat (2014.) za terapiju perifernog T-staničnog limfoma i panobinostat (2015.) za multipli mijelom (Ansari et al. 2016). Ostali lijekovi ove skupine u različitim su fazama kliničkih ispitivanja a najnoviji još uvijek u okviru bazičnih istraživanja.

Osim inhibitora HDACa, istražuju se lijekovi koji inhibiraju histonsku acetilaciju, tj. enzim histonsku acetiltransferazu (HAT). U tumorima ovi enzimi a mogu inhibirati ali i stimulirati rast tumorskih tkiva i razvoj bolesti. Uloga HAT enzima u neoplastičnim bolestima je još uvijek kontroverzna i nedovoljno razjašnjena. Posljednjih godina razvoj HAT inhibitora intenzivirao se iako rezultati nisu ni jednoznačni ni zadovoljavajući. Glavni nedostatci tih lijekova su nestabilnost u staničnom okruženju, niska biološka potentnost te niska selektivnost među različitim podtipovima enzima HAT. Unatoč tomu, smatra se da će u budućnosti bolje razumijevanje mehanizma u kojima sudjeluje HAT te napretkom u proizvodnji lijekova, HAT inhibitori naći svoje mjesto u terapiji malignih bolesti (Wapenaar & Dekker 2016).

U tumorima su prisutne i specifične promjene metilacije histona, što je usmjerilo razvoj epigenetičke terapije na lijekove koji moduliraju abnormalne obrasce histonske metilacije. Iako još nijedan nije odobren od strane FDA, mnoge tvari koje ciljaju histonsku metilaciju nalaze se u fazi kliničkih ispitivanja. Istraživanja pokazuju da najveći translacijski potencijal imaju inhibitori histonskih metiltransferaza DOT1L i EZH2, te demetilaza LSD1. Zasad su pokazali obećavajuće rezultate u liječenju različitih onkoloških bolesti, kao samostalna terapija ili u kombinaciji s drugim epigentskim ili konvencionalnim antitumorskim lijekovima (Morera et al. 2016).

5.3. RNA interferencija u terapiji neoplazmi

I RNAi sustav pokušava se iatrogeno modulirati u okviru antitumorske terapije. Naime, dokazano je da *in vitro* sintetizirane miRNA, siRNA i shRNA (eng. *short hairpin RNA*) molekule, ukoliko specifično sintetizirane, koče translaciju specifičnih mRNA odnosno inhibiraju ekspresiju specifičnog gena od interesa.

Uz kliničku upotrebu modulatora RNAi veže se tzv. fenomen onkogene ovisnosti odnosno znanstvena hipoteza koja tvrdi da unatoč abnormalnostima brojnih gena, tumor preživljava i napreduje zahvaljujući jednom jedinom ili svega nekolicini transkripcijski aktivnih gena (Pagliarini et al. 2015). Stoga je prednost lijekova iz ove skupine što mogu specifično ciljati i inhibirti ekspresiju gena odgovoranog za progresiju tumora, ukoliko je poznat. Poznato je da RNAi aktivne tvari zaustavljaju stanični ciklus i induciraju apoptozu tumorskih stanica. Brojne pretkliničke studije potvrdile su uspjeh ovih lijekova u utišavanju gena ključnih za rast, metastaziranje, angiogenezu i rezistenciju tumorskih stanica na konvencionalnu antitumorsku terapiju. Selektivnost ovih lijekova iznimna je u usporedbi s ostalim epigenetičkim i konvencionalnim onkološkim lijekovima, zbog čega su pojave neželjenih učinaka kod pacijenata rijetke (Phalon et al. 2010).

Unatoč visokoj selektivnosti, niskom riziku od nuspojava te relativno niskoj cijeni proizvodnje, postoje barijere koje priječe široku uporabu RNAi lijekova. Svakako jedna od najvećih prepreka je dostava lijeka do ciljnih stanica i tkiva. Naime, nakon uvođenja u organizam, serumske nukleaze vrlo brzo razgrađuju i uništavaju ove male RNA molekule. Pored navedenog, kada i stignu do ciljnih tkiva, RNAi molekule vrlo teško prolaze kroz staničnu membranu zbog svoje relativno velike molekularne mase i negativnog naboja. Ovi problemi pokušavaju se zaobići konjugiranjem ovih molekula s raznim nosačima što bi ih učinilo stabilnijima, dovelo

do tumorskog tkiva u terapijskoj koncentraciji i omogućilo njihov prodor u stanicu. Smatra se da bi nanotehnologija mogla ponuditi najprihvatljivija rješenja transporta RNAi lijekova te se trenutno uistinu mnogo ulaže u nanotehnološka rješenja u okviru RNAi terapije poput razvoja nanogelova.

Poseban problem kod primjene RNAi terapije je imunološki odgovor organizma. Naime, aktivacija interferonskog sustava putem RNA molekula otežava određivanje optimalne doze RNAi lijekova, doze koja bi balansirala između terapijskog učinka i podnošljivosti za pacijenta. Upravo su određivanje terapijske doze i podnošljivosti glavni ciljevi kliničkih studija koja se provode. Za sada, istraživanja pokazuju dobru podnošljivost i niski stupanj toksičnosti ovih lijekova, stoga se može očekivati kako će liječenje posredovano RNAi molekulama biti nezaobilazna antitumorska terapija budućnosti (Schultheis et al. 2014, Rao et al. 2013).

5.4. Konvencionalni lijekovi s epigenetičkim učinkom

Mnogi se lijekovi koriste u svakodnevnoj uporabi za liječenje raznih bolesti, a čija je epigenetička aktivnost otkrivena tek nedavno. Možda je najpoznatiji primjer Valproat, antiepileptik i stabilizator raspoloženja sa snažnim djelovanjem na epigenetički sustav posttranslacijskih modifikacija histona. Naime, valproat je nespecifični inhibitor nekoliko tipova HDAC enzima i kao takav potiče ekspresiju utišanih gena. Upravo se na tomu temelji njegova antitumorska aktivnost u brojnim istraživanjima. Posebno su optimistični rezultati ranih faza kliničkih ispitivanja učinaka valproata, samostalno ili u kombinaciji s citotoksičnim lijekovima, u terapiji akutne mijeloične leukemije (Fredly et al. 2013). Ipak, navedeno upozorava i na

nesporni neželjeni učinak valproata na epigenom pacijenata nakon dugotrajne primjene u liječenju epilepsije, učinak koji do danas nije sustavno istražen.

Pojedini anestetici također su pokazali epigenetičku aktivnost. Lidokain demetilira DNA u stanicama raka dojke. Istraživanja su utvrdila da kombinacija lidokaidna s decitabinom rezultira aditivnim demetilacijski učinkom. Osim lidokaina, i ropivakain smanjuje razinu metilacije DNA u specifičnim tumorskim stanicama. Ispitani su i epigenetički učinci bupivakaina, međutim nije detektirana nikakva epigenetička aktivnost u stanicama raka dojke. Smatra se da bi demetilirajući učinci lidokaina i ropivakaina u perioperativnom razdoblju mogli imati terapijski potencijal, što još treba dodatno istražiti (Lirk et al. 2014). Pokazalo se, također, da lidokain povećava osjetljivost stanica raka dojke na terapiju cisplatinom (Li et al. 2014).

Nedavno istraživanje je utvrdilo da salicilat i diflunisal (derivat salicilne kiseline) inhibiraju CBP i p300 lizin acetiltransferazu i posljedično acetilaciju lizina na histonskim i nehistonskim proteinima u stanicama. Štoviše, na taj način su potisnuli ekspresiju AML1-ETO fuzijskog preoteina, koji se nalazi u leukemijskim stanicama s translokacijom t(8;21), inducirajući apoptozu. Diflunisal je značajno reducirao volumen tumora u tretiranih miševa nakon samo 3 tjedna. Istraživanja se provode i na drugim nesteroidnim protuupalnim lijekovima, uključujući acetaminofen i indometacin koji čini se ne inhibiraju p300 acetiltransferazu (Shirakawa et al. 2016).

Istraživanja modulacije epigenetičkih sustava s protutumorskim učinkom lijekova koji se već primjenjuju u kliničkoj praksi od iznimne su važnosti kako za razumijevanje njihova učinka u pacijenata kod kojih se koriste zbog svog primarnog učinka, tako i za otkrivanje potencijala njihove alternativne primjene u onkologiji.

5.5. Antitumorske epigenetski aktivne tvari u prehrani

Važnost prehrane za ljudsko zdravlje nije novost, ali svakako jest spoznaja da brojne namirnice sadrže epigenetički aktivne tvari. Nakon rasvjetljavanja uloge epigenetike u karcinogenezi te njenog terapijskog potencijala, postavlja se pitanje mogu li se takve namirnice koristiti kao kemoprevencija ili čak dio terapije za maligne bolesti. Epidemiološka i predklinička istraživanja sugeriraju takvu mogućnost (Kotecha et al. 2016, Lee & Herceg 2014.).

Među najpoznatijim epigenetički aktivnim tvarima s protutumorskim učinkom, a prisutnim u svakodnevnoj prehrani ističe se kurkumin, polifenol prisutan u indijskom začinu kurkumi. Kurkumin je ujedno i najbolje istražena epigenetički aktivna tvar u namirnicama. Dokazano je da smanjuje ekspresiju DNMT1 u stanicama akutne mijeloične leukemije, te DNMT1, 3A i 3B u stanicama raka dojke. Također je utvrđeno da utječe na modifikaciju histona H3, H4 i H2A u stanicama raka regulirajući HAT i HDAC (Boyanapalli & Tony Kong 2015). Unatoč njegovoj uporabi i učinkovitosti u kliničkim istraživanjima raka, genotoksičnost, slaba topljivost u vodi te brzi metabolizam u tankom crijevu i jetri, ograničavaju kliničku uporabu kurkumina. Iako se u literaturi često navodi činjenica da je kurkumin siguran za uporabu, to ne treba uzeti zdravo za gotovo jer se ta spoznaja temelji na kratkoročnim ispitivanjima. Štoviše mnoge studije su pokazale da ovaj polifenol uzrokuje oštećenja DNA u sličnim koncentracijama u kojima pokazuje i terapijske učinke (Tuorkey 2014).

Nadalje, epidemiološka istraživanja su pokazala negativnu korelaciju između različitih vrsta tumora i redovitog unosa epigalokatehin-3-galata (EGCG), polifenola iz zelenog čaja. Osim antioksidativne, ECGC ima i epigenetičke učinke. Na stanicama adenokarcinoma gušterače utvrdilo se da ECGC ukida njihovu

invazivnost induciranjem ekspresije inhibitora Raf kinaze putem inhibicije aktivnosti HDAC (Kim & Kim 2013), dok u stanicama raka kože, redukcijom DNA metilacije i povećanom acetilacijom histona reaktivira utišane gene supresore tumora (Nandakumar et al. 2011). Osim kurkumina i ECGC, i neki drugi polifenoli poput genisteina, kafeinske kiseline i resveratrola pokazuju epigenetičku aktivnost i protutumorski učinak na različitim stanicama raka (Bishop & Ferguson 2015).

Međutim nisu samo polifenoli epigenetički aktivne tvari prisutne u namirnicama. Selen i izotiocijanati također imaju modulacijski učinak na epigenom s antitumorskim efektom. Epidemiološke studije njihovu redovnu konzumaciju povezuju sa smanjenim rizikom od pojave različitih tipova tumora (Barrera et al. 2012). Istraživanja epigenetički aktivnih tvari s protutumorskim učinkom, a prisutnih u prehrani mogla bi objasniti i neke epidemiološke nepravilnosti odnosno specifičnosti pojedinih populacija.

6. ZAKLJUČAK

Iako danas skromno zastupljena u kliničkoj praksi, uspjesi epigenetičke terapije u liječenju hematoloških bolesti kao i brojna istraživanja epigenetički aktivnih tvari, podržavaju predviđanja da će epigenetička terapija u budućnosti biti nezaobilazna u borbi protiv zloćudnih bolesti.

Ipak, neophodna su daljnja istraživanja epigenetičkih sustava i uloge koju imaju u biologiji tumora kako bi se identificirale potentnije mete epigenetičke terapije te razvili lijekovi koji specifično moduliraju i kompenziraju epimutacije.

Epigenetički koncept onkološke terapije u koraku je s konceptom personalizirane medicine ne samo u okviru liječenja neoplastičnih bolesti, te se od oba očekuje znatan doprinos medicini budućnosti.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Ninu Sinčiću na uloženom trudu, savjetima i vodstvu u izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju kroz sve godine mog školovanja.

8. LITERATURA

- Ansari J, Shackelford RE, El-Osta H (2016) Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. Transl Lung Cancer Res. 5(2):155-71
- Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, Jenuwein T, Xu G, Leonhardt H, Wolf V, Walter J (2012) In Vivo Control of CpG and non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. PLos Genet. 8(6):e 1002750
- Barrera LN, Cassidy A, Hohnson IT, Bao Y, Belshaw NJ (2012) Epigentic and antioxidant effects of dietary isothiocyanates and selenium: potential implications for cancer chemoprevention. Proc Nutr Soc. 71(2): 237-45
- Bishop KS, Ferguson LR (2015) The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. Nutrients 7(2):922-947
- Boyanapalli SS, Tony King AN (2015) "Curcumin, the King of the Spices": Epigenetic Regulatory Mechanisms in the Prevention of Cancer, Neurological, and Inflammatory Diseases. Curr Pharmacol Rep.1(2):129-139
- Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M (2014) Patologija. Medicinska naklada, Zagreb
- Deans C, Maggert KA (2015) What do you mean, "Epigenetic"?. Genetics 199(4):887-96
- Fredly H, Gjertsen BT, Bruserund O (2013) Histone deacetylase inhibition in the treatment of acute myeliod leukemia: the effects of valproic acid on leukemic cells. And the clinical and experimental evidence for combining valproic acid with other antileukemic agents. Clin Epigenetics 5:12

- Freedman A (2014) Folicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and menagment. Am J Hematol. 89(4):429-36
- Guo M, Yan W (2015) Epigenetics of gastric cancer. Methods Mol Biol. 1238:783-99
- Hammoud SS, Cairns BR, Jones DA (2013) Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. Curr Opin Cell Biol. 25(2):177-183
- Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S (2014) Use of Epigenetic Drugs in Disease: An Overview. Genet Epigenet. 6:9-19
- Herceg Z, Vaissière T (2011) Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. Epigenetics. 6(7):804-19
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2015) Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo
- Huang J, Plass C, Gerhauser C (2011) Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. Curr Drug Targets 12(13):1925-56
- Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N (2011) Combination epigenetic therapy has efficacy in patient with refractory advanced non.small cell lung cancer. Cancer Discov. 1:598-607
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2011) Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada, Zagreb
- Kim SO, Kim MR (2013) Epigallocatechin 3-gallate inhibits invasion by inducing the expression of Raf kinase inhibitor protein in AsPC1 human

pancreatic adenocarcinoma cells trought the modulation of histone deacetilase activity. Int J Oncol. 42:349-358

- Kotecha R, Takami A, Espinoza JL (2016) Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. Oncotarget. doi: 10.18632/oncotarget.9593
- Lee HS, Herceg Z (2014) The epigenome and cancer prevention: A complex story of dietary supplementation. Cancer Lett. 342(2):275-84
- Levanat S, Cvok ML (2010) Molecular basis of breast cancer related to BRCA1 and BRCA2 genes: characteristics and targeting therapy. Lijec Vjesn. 132(1-2):34-7
- Li K, Yang J, Han X (2014) Lidocaine sensitizes the cytotoxicity of cisplatin in breast cancer cells via up-regulatio of RARβ2 and RASSF1A demethylation. Int J Mol Sci. 15(12):23519-36
- Lirk P, Hollmann MW, Fleisher M, Weber NC, Fiegl H (2014) Lidocaine and ropivacaine, but not bupivacaine, demethylate deoxyribonucleic acid in breast cancer cells in vitro. Br J Anaesth. 113 Suppl 1:i32-8
- Mataga MA, Rosenthal S, Heerboth S, Devalapalli A, Kokolus S, Evans LR, Longacre M, Housman G, Sarkar S (2012) Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitor. Anticancer Res. 32(7):2532-9
- Morera L, Lubbert M, Jung M (2016) Targeting histone methyltranferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. Clin Epigenetics. 8:57
- Murnyak B, Bognar L, Klekner A, Hortobagyi T (2015) Epigenetics of Meningeomas. Biomed Res Int. 2015:31 doi:10-1155/2015/532451.

- Nakamura K, Nakabayashi K, Aizawa K, Hori N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A (2015) DNA methyltransferase inhibitor zebularin induces human cholangiocarcinoma cell death trough alteration of DNA methylation status. PloS One. 10(3):e0120545
- Nandakumar V, Vaid M, Katiyan SK (2011) Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppresor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. Cancerogenesis 42:537-544
- Oronsky B, Oronsky N, Scicinski J, Fanger G, Lybeck M, Reid T (2014) Rewriting the Epigenetic Code for Tumor Resensitization: A Review. Transl Oncol. 7(5):626-631
- Pagliarini R, Shao W, Sellers WR (2015) Oncogene addiction: Pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. EMBO Rep. 16(3):280-96
- Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J (2010) Potential use of RNA interference in cancer therapy. Expert Rev Mol Med 12:e26
- Quaresma M, Coleman MP, Rachet B (2015) 40-years trends in an index of survival for all cancers combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971-2011: a population-based study. Lancet 385(9974):1206-18
- Rao DD, Wang Z, Senzer N, Nemunaitis J (2013) RNA interference and personalized cancer therapy. Discov Med. 15(81):101-10
- Sarkar S, Goldgar S, Byler S, Rosenthal S, Heerboth S (2013b) Demethylation and reexpression of epigenetically silenced tumor supressor

genes: sensatisation of cancer cells by combination therapy. Epigenomics 5:87-94

- Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, Longacre M (2013a) Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. Int J Mol Sci. 14(10):21087-21113
- Sawan C, Herceg Z (2010) Histone modifications and cancer. Adv Genet. 70:57-85
- Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gabhardt F, Keil O, Lange C, Giese K, Kaufmann J, Khan M, Drevs J (2014) First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 32(8):4141-8
- Shirakawa K, Wang L, Man N, Maksimoska J, Sorum AW, Lim HW, Lee IS, Shimazu T, Newman JC, Schröder S, Ott M, Marmorstein R, Meier J, Nimer S, Verdin E (2016) Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity. Elife. doi:10.7554/eLife.11156
- Sinčić N, Herceg Z (2011) DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. Curr Opin Oncol 23(1):69-76
- Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK (2012) Targeting EGFR for Treatment of Glioblastoma: Molecular Basis to Overcome Resistance. Curr Cancer Drug Targets 12(3):197-202.
- Tuorkey MJ (2014) Curcumin a potent cancer preventive agent: Mechanisms of cancer cell killing. Interv Med Appl Sci.6(4):139-146
- Vlahovic M, Sincic N (2012). Epigenetika: Mehanizmi genetske kontrole. Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu. Zavod za biologiju.

Medicinski fakultet Zagreb

- Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z (2013) Klinička onkologija. Medicinska naklada, Zagreb
- Wang W, Luo Y (2015) MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. J Zhejiang Univ Sci B. 16(1):18-31
- Wapenaar H, Dekker FJ (2016) Histone acetyltransferases: chalenges in targeting bi-supstrat enzymes. Clin Epigenetics 8:59
- Yan W, Herman JG, Gou M (2016) Epigenome-based personalized medicine in human cancer. Epigenomics 8(1):119-33
- Zhao QY, Lei PJ, Zhang, X, Zheng JY, Wang HY, Zhao J, Li YM, Ye M, Li L, Wei G, Wu M (2016) Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. Clin Epigenetics 8:34 doi:10.1186/s13148-016-0201-x

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marino Narančić

Datum rođenja: 20. studeni 1991.

Mjesto rođenja: Zadar, Republika Hrvatska

OBRAZOVANJE

Osnovna škola Bartula Kašića, Zadar (1998.-2000.)

Osnovna škola Stanovi, Zadar (2000.-2006.)

Gimnazija Jurja Barakovića, Zadar (2006.-2010.)

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (od 2010.)

POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Strani jezici: aktivno služenje engleskim i njemačkim jezikom