

Krzysztof Giannopoulos

Samodzielna Pracownia Hematoonkologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Epigenetyka w hematoonkologii

Epigenetics in hematooncology

Adres do korespondencji:

Dr hab. Krzysztof Giannopoulos
 Samodzielna Pracownia
 Hematoonkologii Doświadczalnej
 Uniwersytet Medyczny w Lublinie
 ul. Chodźki 6, 20-950 Lublin
 Tel.: (+48 81) 756 48 12
 Faks: (+48 81) 756 48 13
 e-mail: giannop@tlen.pl

STRESZCZENIE

Epigenetyka zajmuje się opisywaniem stałych, ale odwracalnych zmian, które skutkują zmianami ekspresji genów i ich funkcji bez odpowiadających im zmian w sekwencji DNA. W nowotworach paradoksalnie dochodzi do hipometylacji genomowego DNA, skutkującego aktywacją genów związanych na przykład z proliferacją oraz hipermetylacji, która dotyczy przede wszystkim wysp CpG rejonów promotorowych genów supresorowych lub miRNA kontrolujących geny odpowiedzialne za nowotworzenie. Ścisły związek regulacji epigenetycznej z nowotworzeniem oraz potencjalna odwracalność tych zmian spowodowały wielkie zainteresowanie regulacją epigenetyczną oraz leczeniem epigenetycznym w hematoonkologii. Najlepiej opisanymi zmianami epigenetycznymi są hipermetylacja DNA oraz deacetylacja histonów, stąd też pierwsze leki epigenetyczne można zaliczyć do preparatów hipometylujących lub hamujących deacetylację histonów. Obecnie trzy leki epigenetyczne zostały zaakceptowane przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), są to: azacytydyna, decytabina i vorinostat. Vorinostat zarejestrowano do leczenia skórnych chłoniaków T-komórkowych, jednak największe nadzieje wiąże się z wprowadzeniem nowych opcji terapeutycznych dla chorych z najczęściej występującymi rozrostowymi chorobami hematologicznymi. W niniejszej publikacji omówiono w szczególności regulację epigenetyczną i pierwsze wyniki badań klinicznych w ostrej białaczce szpikowej, zespołach mielodysplastycznych i przewlekłej białaczce limfocytowej.

Słowa kluczowe: epigenetyka, hematoonkologia

ABSTRACT

Epigenetical changes are reversible modifications of genomic DNA that result in changes in gene expression profile. In tumorigenesis common DNA hypomethylation leads to activation of genes connected with proliferation, that escape from the control of suppressor genes which are silenced due to CpG islands hypermethylation. The crucial role of epigenetic deregulation in tumor progression and reversible character of these modifications leads to the great interest of epigenetic therapies in hematooncology. The best characterized epigenetic changes are DNA hypermethylation and histone deacetylation, therefore first epigenetic drugs are hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors. Three epigenetic drugs are nowadays registered by FDA and EMEA for the therapy: azacitidine, decitabine and vorinostat. Vorinostat is effective in cutaneous T-cell lymphomas therapy while the greatest expectations are linked to drugs that might be effective in treatment of the most common hematological malignancies. In current review epigenetical regulation as well as results of the first clinical trials in acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and chronic lymphocytic leukemia were described.

Key words: epigenetics, hematooncology

Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 6: 333-342

Wstęp

Epigenetyka zajmuje się opisywaniem stałych, ale odwracalnych zmian, które skutkują zmianami ekspresji genów i ich funkcji bez odpowiadających im zmian w sekwencji DNA.

Niezwykle interesujące jest pochodzenie większości leków stosowanych w tak zwanej terapii epigenetycznej, wywodzące się z leków indukujących różnicowanie. Należą do nich antagoniści kwasu foliowego, antracykliny, kamptotecyna, retinoidy, estry forbolu, witaminy D3 i B12 oraz różne cytokiny. W latach 70. ubiegłego wieku Constantinides i wsp. [1] zwrócili uwagę na wpływ dodawania azacytydyny do hodowli mysich komórek embrionalnych na różnicowanie w kierunku chondroblastów, komórek tłuszczowych oraz mięśniowych. Na początku lat 80. przypisano ten efekt zmianom w metylacji DNA [2]. Hipometylacja DNA skutkowałą aktywacją genów indukujących różnicowanie. W tym czasie zwrócono również uwagę na maślan sodu, który powodował hiperacetylację histonów [3], indukował oraz powodował różnicowanie komórek linii komórkowej K562 [4]. Te obserwacje stanowiły przesłankę do klinicznego zastosowania leków indukujących różnicowanie w chorobach hematologicznych. Pierwsze doniesienia dotyczące klinicznego stosowania azacytydyny i maślanu sodu jako leków indukujących różnicowanie ukazały się w latach 1982–1983, czyli około 10 lat po pierwszych próbach klinicznego stosowania azacytydyny w leczeniu ostrych białaczek [5]. Co ciekawe, chociaż maślan sodu nigdy nie został zarejestrowany do terapii przeciwnowotworowej, badania nad nim doprowadziły do odkrycia kolejnych pochodnych kwasu masłowego między innymi worinostatu (obecnie zarejestrowanego do leczenia skórnych chłoniaków T-komórkowych), panobinostatu oraz belinostatu.

W nowotworzeniu dochodzi do zaburzeń metylacji. Niektórzy badacze uznają ten proces za kluczowy w onkogenezie. Zaburzenia te charakteryzują się stopniową utratą metylacji DNA zarówno w miejscach niekodujących DNA, jak i kodujących, oraz hipermetylacją miejsc promotorowych bogatych w cytozynę i guaninę tak zwanych wysp CpG [6]. Metylacja dotyczy promotorów genów supresorowych, takich jak *retinoblastoma (Rb)*, *p21* oraz inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, takich jak *p15, p16, p18 i p19*. Mimo znacznego postępu w metodyce określania metylacji z użyciem platform chipów analizujących kilkadziesiąt tysięcy wysp CpG nie udało się wyjaśnić mechanizmu regulacji tylko określonych genów w nowotworzeniu oraz określić zdarzeń indukujących te zmiany. Jednak wiedza dotycząca klinicznego stosowania istotnie się pogłębiła. W badaniach przedklinicznych zarówno 5-azacytydyna, jak również 5-aza-2'-deoksycytydyna (decytabina) wykazywały efekt hipometylujący (obecnie główny efekt przypisywany

tym lekom polega na hamowaniu metylotransferazy DNA — inhibitor DNMT), jednak przydatność kliniczna była ograniczona zarówno w monoterapii, jak i terapii skojarzonej. Pierwszym błędem okazało się stosowanie zbyt wysokich dawek leków, które hamując syntezę DNA, pozbawiały efektu zahamowania metylotransferazy DNA, dla którego działania synteza DNA jest niezbędna. Pierwsze badania nad lekami powodującymi acetylację histonów przypisywały główny efekt przeciwnowotworowy acetylacji reszt lizynowych budujących część zrzębu oktamerów histonów w chromatinie. Obecnie leki tej grupy zalicza się do inhibitorów deacetylazy histonowej (inhibitory HDAC — *histone deacetylase*; HDI — *histone deacetylase inhibitors*), a ich mechanizm działania okazał się wielokierunkowy (tab. 1). Najlepiej opisanymi zmianami epigenetycznymi skutkującymi wyciszeniem funkcji genów są hipermetylacja DNA i histonów oraz deacetylacja histonów. Na rycinie 1 przedstawiono mechanizm powstawania nieaktywnej transkrypcyjnie struktury DNA, tak zwanej „zamkniętej struktury” — heterochromatyny oraz enzymy zaangażowane w jej powstawanie.

W nowotworach paradoksalnie dochodzi do hipometylacji genomowego DNA, skutkującego aktywacją genów związanych na przykład z proliferacją oraz hipermetylacji, które dotyczą przede wszystkim wysp CpG rejonów promotorowych genów supresorowych lub miRNA kontrolujących geny odpowiedzialne za nowotworzenie. Niezwykle interesujące jest również współdziałanie zmian genetycznych i epigenetycznych w patogenezie chorób rozrostowych. Bueno i wsp. [7] dokonali szczegółowej analizy miRNA regulujących onkogeny w *BCR-ABL* dodatnich mieloproliferacjach. Określili oni miRNA, których funkcja jest tracona wraz z utratą heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) w jednym allelu chromosomu 12. oraz metylacją CpG w drugim allelu. Jednym z miRNA regulowanych w ten sposób był *miRNA-203*, który reguluje ekspresję onkogenu *ABL1*. Terapia epigenetyczna przy użyciu azacytydyny doprowadzała do re-ekspresji *miRNA-203* oraz zmniejszenia transkryptu *BCR-ABL1*.

Obecnie Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zaakceptowała do terapii trzy leki epigenetyczne. Są to: azacytydyna (Vidaza, Celgene), decytabina (Dacogen, SuperGene) i worinostat (Zolinza, Merck). Kolejne leki są w różnych fazach zaawansowania badań klinicznych i przedklinicznych. Worinostat zarejestrowano do leczenia skórnych chłoniaków T-komórkowych [8], jednak największe nadzieje wiąże się z wprowadzeniem nowych opcji terapeutycznych dla chorych z najczęściej występującymi rozrostowymi chorobami hematologicznymi. W niniejszej publikacji szczegółowo omówiono regulację epigenetyczną w ostrej białaczce szpikowej,

Tabela 1. Mechanizmy działania inhibitorów dacylasy histonowej. Na podstawie Schrump i wsp. [45]

Table 1. Histone deacetylase inhibitors — mechanism of action. Based on Schrump et al. [45]

Mechanizm działania	Efekt komórkowy	Piśmiennictwo
Acetylacja histonów	Zmiany w ekspresji genów, aktywacja genów związanych z różnicowaniem, np. <i>p21</i> , <i>p27</i> zahamowanie genów związanych z proliferacją, np. cyklina D	Richon i wsp. [46], Sandor i wsp. [47]
Acetylacja białek niezwiązanych z histonami	Zahamowanie funkcji <i>p53</i> , <i>HIF-1α</i> , <i>pRb</i> , <i>STAT-3</i> , <i>RelA/p65</i>	Zhao i wsp. [48], Dai i wsp. [49]
Acetylacja Hsp90	Ubikwitynizacja białek ABL, EGFR, c-kit, FLT3 i degradacja w proteasomie	Wang i wsp. [50], Nishioka i wsp. [51]
Zmniejszenie przedmitotycznej fosforylacji histonu H3	Zahamowanie cyklu komórkowego	Robbins i wsp. [52]
Zmniejszenie stabilności HIF-1a	Zahamowanie angiogenezy	Kim i wsp. [53]
Zahamowanie inhibitorów apoptozy, m.in.: Bcl-2, aktywacja białek proapoptotycznych, takich jak BAX i BAK	Aktywacja apoptozy	Suzuki i wsp. [54]
Zwiększenie produkcji ROS	Indukcja apoptozy	Rosato i wsp. [55]
Acetylacja tubulin	Zaburzenie formowania agresomu, nieprawidłowa degradacja białek	Catley i wsp. [56]
Aktywacja TRAIL, zwiększenie ekspresji genów nowotworowych	Pobudzenie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej	Inoue i wsp. [57], Weiser i wsp. [58, 59]
Acetylacja Ku70, Ku86, BRCA1 i RAD1	Zahamowanie mechanizmów naprawy DNA	Munshi i wsp. [60]

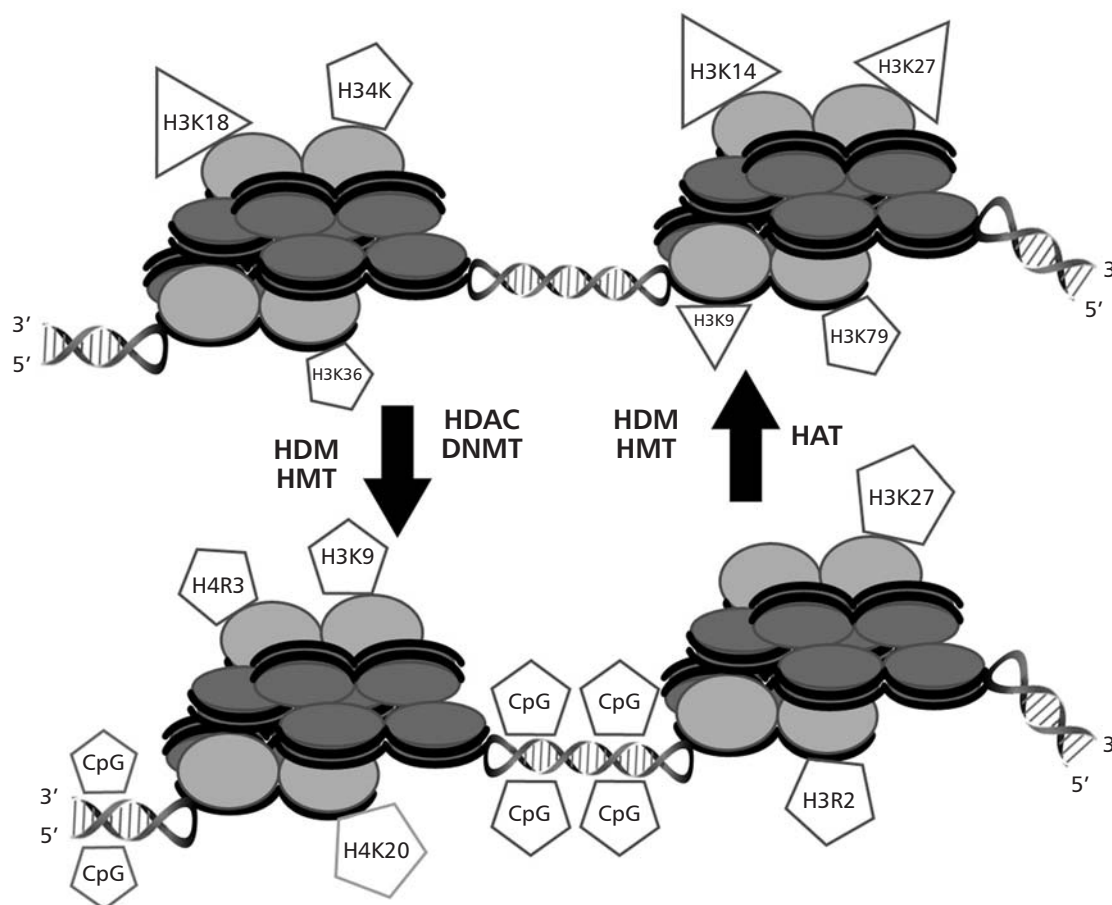
zespołach mielodysplastycznych i przewlekłej białaczce limfocytowej.

Zespoły mielodysplastyczne

Zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndrome*) obejmują wiele schorzeń charakteryzujących się nieprawidłową hematopoezą skutkującą zwiększoną częstością występowania infekcji, krwawieniami, osłabieniem oraz progresją do ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myelogenous leukemia*) [9]. Wraz z lepszym zrozumieniem mechanizmów odpowiedzialnych za patogenezę i progresję tej choroby zwrócono uwagę na liczne zaburzenia w regulacji epigenetycznej, którą wielu badaczy uważa za najważniejszą zmianę odpowiedzialną za patogenezę tej choroby. Zwrócono uwagę na metylację promotorów genów *p15*, *FHIT* (*fragile histidine triad gene*), genu kalcytoniny (*calcitonine*) oraz *DAPK* [10]. Quesnel i wsp. [11] opisywali hypermetylację *p15* u 38% chorych na MDS (20 spośród

53 badanych). Inaktywacja *p15* była częstsza u chorych, u których odsetek blastów wynosił > 10% oraz u tych, u których następowała transformacja do AML. Ostatnio Kim i wsp. [12], wyliczając poziom metylacji, wykazali nie tylko korelację stopnia metylacji z liczbą blastów, ale również z nasileniem małopłytkowości i rokowaniem. Kolejnym genem regulowanym epigenetycznie jest *DAPK*. Hypometylacja tego genu mającego funkcję supresorową występuje u około 50% chorych na MDS [13]. Badacze zwrócili uwagę na częstszą inaktywację *DAPK* we wtórnej postaci AML i MDS niż w pierwotnej AML, co może wskazywać na istotny udział *DAPK* już na wczesnym etapie progresji do AML. Unieczynnienie *FHIT*, którego funkcja supresorowa wiąże się z białkiem szoku cieplnego 60 (*Hsp60*, *heat shock protein 60*), produkcją reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) i skutkuje indukcją apoptozy, jest również częste w MDS (55%) [14].

Klinicznie wyniki leczenia chorych na MDS są niezadowolające, co zmusza naukowców do poszukiwania nowych form terapeutycznych i biorąc pod uwagę udział



Rycina 1. Enzymy zaangażowane w regulację epigenetyczną. Metylacja i acetylacja histonów i DNA odpowiada za regulację epigenetyczną. Górna część ryciny przedstawia „otwartą” strukturę DNA — euchromatynę, która jest aktywna transkrypcyjnie. Enzymy HDM, HMT, HDAC i DNMT zaangażowane w regulację epigenetyczną mogą doprowadzać do powstania tzw. „zamkniętej” struktury DNA — heterochromatyny, która jest nieaktywna transkrypcyjnie. Ten efekt jest jednak odwracalny przez działanie enzymów HDM, HMT i HAT. Poza regulacją w postaci acetylacji i metylacji istotne znaczenie ma miejsce tych modyfikacji zarówno w DNA, jak i histonach. HDM — demetylaza histonów; HMT — metylotransferaza histonów; HDAC — deacetylaza histonów; DNMT — demetylotransferaza DNA; HAT — acetylotransferaza histonów

Figure 1. Enzymes involved in epigenetic regulation. Methylation as well as acetylation of histones and DNA regulate gene expression reversibly. The upper part of the figure displays open DNA structure which is transcriptionally active, while the lower part displays closed DNA structure which is transcriptionally inactive. HDM, HMT, HDAC and DNMT enzymes are involved in epigenetic regulation, that leads to closed DNA structure. These changes might be reversed as a result of action of HDM, HMT and HAT enzymes

regulacji epigenetycznej w MDS, zrozumiałe wydaje się, że w ostatnich latach największym zainteresowaniem cieszy się leczenie epigenetyczne MDS.

W badaniach fazy II przeprowadzonych przez *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) wykazano skuteczność kliniczną azacytydyny początkowo w postaci dożylniej [15], a następnie w formie podskórnej [16]. W badaniu III fazy chorych na MDS losowo przydzielano do grupy leczonej azacytydynam podawaną podskórnie przez 7 dni 28-dniowych cykli lub do grupy, w której stosowano najlepsze leczenie wspomagające (*best supportive care*).

Odpowiedź na leczenie uzyskano u 60% chorych otrzymujących azacytydynam [odpowiedź całkowitą (CR, *complete response*) odnotowano u 7% badanych, częściową (PR, *partial response*) u 16%, poprawę hematologiczną (HI, *hematologic improvement*) — u 37% chorych], natomiast u chorych leczonych wspomagająco poprawę hematologiczną obserwowano u 5% chorych [17]. Leczenie azacytydynam spowalniało również progresję do AML (21 vs. 12 miesięcy, odpowiednio w grupach).

W 2006 roku Silverman i wsp. [18] przeanalizowali przypadki kolejnych chorych leczonych w ramach

CALGB przy użyciu doprecyzowanych kryteriów diagnozy MDS według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [19] i odpowiedzi na leczenie według *International Working Group* (IWG) [20]. W wyniku analizy u 103 chorych zdiagnozowano AML i wyłączono ich z dalszej analizy. Odsetki CR wynosiły 10–17%, PR stwierdzano rzadko, a HI obserwowano u 23–36% chorych na MDS leczonych azacytydyną. Kolejnym badaniem III fazy, w którym porównywano skuteczność azacytydyny z trzema innymi schematami leczenia, czyli najlepszym leczeniem wspomagającym, cytarabiną w niskich dawkach oraz chemioterapią, było badanie Fenaux i wsp. [21] obejmujące 358 chorych na MDS z grupy wysokiego ryzyka. Odsetek CR wynosił 17%, PR — 12%, a HI obserwowano u 42–49% wśród 179 chorych na MDS leczonych azacytydyną. Korzyść wyrażona jako wydłużenie przeżycia całkowitego i czasu do progresji do AML u chorych leczonych azacytydyną była widoczna w porównaniu z każdym rodzajem terapii. Leczenie azacytydyną spowalniało również progresję do AML (24,5 vs. 15 miesięcy, odpowiednio w grupach). W metaanalizie opublikowanej przez Gurion i wsp. [22] zestawiono wyniki 4 badań III fazy dotyczące leczenia lekami hipometylującymi chorych na MDS. Wykazano, że leczenie zarówno azacytydyną, jak i decytabiną zwiększa odsetek CR i PR oraz HI u chorych leczonych lekami hipometylującymi. W wielu przypadkach leczenie wiązało się jednak z wysoką toksycznością. Badając prawie 1000 chorych leczonych lekami epigenetycznymi, wykazano istotne różnice w skuteczności obu leków. Chociaż decytabina jako deoksy-pochodna azacytydyny ma ponad 10-krotnie silniejsze działanie hipometylujące, w ocenie klinicznej zastosowanie decytabiny wiązało się z gorszymi wynikami. Przyczyną mógł być czas trwania leczenia decytabiną, który był istotnie krótszy niż w przypadku azacytydyny (mediana 3–4 cykle vs. 9 cykli dla azacytydyny). Stosowanie obu leków wydłużało przeżycie w łącznej analizie, jednak analizując leki pojedynczo, tylko leczenie azacytydyną było korzystne (HR: 0,59; n = 549 vs. HR: 0,88; n = 233) [22].

We wcześniejszych badaniach Wijermans i wsp. [23] wykazali istotną skuteczność decytabiny w analizie 3 europejskich badań II fazy w grupie 177 chorych z MDS, uzyskując odpowiedź u prawie połowy leczonych. Kantarjian i wsp. [24] w badaniu III fazy losowo przydzielali chorych na MDS do grupy otrzymującej decytabinę (15 mg/m² i.v. przez 3 godziny co 8 godzin przez 3 dni) lub do grupy otrzymującej najlepsze leczenie podtrzymujące. Odpowiedź na leczenie decytabiną odnotowano u 17% chorych, w tym u 9% wykazano odpowiedź całkowitą. Odnotowano jedynie trend do dłuższego przeżycia w czasie do progresji do AML i pod względem przeżycia całkowitego u chorych leczonych

decytabiną. W kolejnym badaniu porównano różne sposoby podawania decytabiny: 2 schematy dożylnie (5- i 10-dniowy) i jeden podskórny, wykazując największą skuteczność 5-dniowej iniekcji dożylnej (CR wynosiły odpowiednio 39%, 21% i 24%) [25]. Wszystkie 3 schematy skutecznie zmniejszały metylację mierzoną jako globalną metylację przy użyciu testu LINE, jednak tylko u chorych, u których uzyskano odpowiedź na leczenie, obserwowano zwiększenie ekspresji regulowanego epigenetycznie genu *p15*. Badacze z *MD Anderson Cancer Center* dokonali również oceny działania decytabiny w odniesieniu do historycznych grup leczonych chemioterapią [26]. Odsetek CR ocenianych przy użyciu kryteriów odpowiedzi na leczenie dla AML wynosił 43% u chorych leczonych decytabiną vs. 46% u chorych otrzymujących chemioterapię, jednak tylko 7% pacjentów leczonych decytabiną zmarło w trakcie pierwszych 3 miesięcy leczenia w porównaniu z 23% chorych w przypadku leczenia chemioterapią. W analizie wieloparametrycznej leczenie decytabiną było niezależnym, korzystnym czynnikiem prognostycznym (HR: 0,74).

Być może na skuteczność leczenia decytabiną ma wpływ sposób dawkowania. Dawkowanie rejestracyjne, czyli przez 3 dni wlewy 3-godzinne w odstępach 8-godzinnych, wiązało się z obowiązkową hospitalizacją chorego oraz istotną toksycznością. Steensma i wsp. [27] w niedawno opublikowanym doniesieniu podawali decytabinę przez 5 dni w dawce 20 mg/m² co 4 tygodnie. Przy tolerowanej toksyczności leczenia u 32% spośród 99 chorych leczonych ambulatoryjnie uzyskano CR, a HI obserwowano u kolejnych 18% badanych, niezależnie od typu według klasyfikacji francusko-amerykańsko-brytyjskiej (FAB) i wyniku międzynarodowego wskaźnika prognostycznego (IPSS, *International Prognostic Scoring System*). Publikacja tych zachęcających wyników spowodowała dopuszczenie przez FDA schematu 5-dniowego stosowania decytabiny u chorych na MDS.

Ostra białaczka szpikowa

U chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML) obserwowano liczne zmiany w metylacji rejonów promotorów różnych genów. Galm i wsp. [28] odnotowali metylację co najmniej jednego z 11 genów związanych z nowotworzeniem u ponad 70% chorych na AML. Najczęstsze zmiany dotyczące metylacji dotyczyły genu *SOCS* (*suppressor of cytokine signaling*), obserwowano je u 45% chorych. Kolejno, często występowały inaktywacje *p15* u 20%, *RARβ2* (*retinoic acid receptor beta2*) u 31,7% oraz *p73* i genu E-kadheryny (*E-cadherin*) u 13,3%. Autorzy zwrócili uwagę na trend do częstszego występowania metylacji u chorych z niekorzystnymi cytogenetycznymi czynnikami prognostycznymi [8].

Ostatnio Figueroa i wsp. [29] określili globalną metylację u 344 chorych na AML. Na podstawie wyników analizy chorych zgrupowano w 16 klastrow. Profile metylacji oddzielały chorych z aberracjami *CEBPA* od pozostałych grup chorych. Cztery kolejne grupy identyfikowały chorych z mutacjami *NPM1* oraz występowaniem aberracji *AML1-ETO*, *CBFb-MYH11* i *PML-RARA*, wskazując na swoistą regulację epigenetyczną wśród chorych na AML, u których występowały różnice molekularne oraz pod względem rokowania. Również określono panel 15 genów ulegających metylacji, których analiza ma istotne znaczenie prognostyczne [29].

Inaktywacja genów hamujących cyklinozależne kinazy (CDK, *cyklin dependent kinases*) jest częstym zdarzeniem w nowotworzeniu. Również w nowotworach hematologicznych obserwowano inaktywację *p16* i *p15*, przy czym w AML i zespole mielodysplastycznym dotyczyły one głównie *p15*, powodując wyciszenie u 88% chorych na AML [30]. W AML hipermetylacja supresorowego genu *p15* wiązała się również z gorszym rokowaniem [31]. Wpływ na rokowanie miała również metylacja promotorów genu receptora estrogenowego (ER, *estrogen receptor*), jednak w tym przypadku inaktywacja genu wiązała się z lepszym rokowaniem [32].

Leczenie skojarzone przy użyciu kwasu walproinowego (VPA, *valpronic acid*) jako HDAC z kwasem retinowym (ATRA, *all trans retinoic acid*) u 26 chorych na AML z grupy wysokiego ryzyka nie przyniosło oczekiwanych wyników, autorzy obserwowali tylko przejściową stabilizację choroby u kilku z nich [33]. Również Kuendgen i wsp. [34] stosowali VPA początkowo w monoterapii, po czym do schematu terapeutycznego dołączano ATRA u 75 chorych na AML lub MDS. Poprawę hematologiczną (HI) obserwowano u 18 chorych (24%), lecz odpowiedź określana zgodnie z kryteriami IWG wynosiła tylko 5%.

W 2006 roku Silverman i wsp. [18] w zawiązku z doprecyzowaniem kryteriów diagnozy MDS według WHO [19] wydzielił z analizy grupę 103 chorych leczonych azacytydyną jako AML. U 35–48% leczonych

azacytydyną obserwowano poprawę hematologiczną, a przeżycie w grupie 52 chorych na AML wynosiło 19,3 vs. 12,9 miesiąca na korzyść azacytydyny [18].

Przewlekła białaczka limfocytowa

Regulacja epigenetyczna odgrywa istotną rolę w patogenezie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*). We wcześniejszych pracach autorzy zwracali uwagę na nieprawidłową metylację promotorów *ZAP70* [35] i *TWIST2* [36] oraz czynnika transkrypcyjnego *HOXA4* [37].

Raval i wsp. [38] opisywali zmniejszoną ekspresję *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*), genu, który w odpowiedzi na różne bodźce może indukować apoptozę. W rodzinnym przypadku CLL wykazano, że zmniejszona ekspresja wiąże się ze zmianami genetycznymi w postaci polimorfizmu czynnika transkrypcyjnego *HOXB7* regulującego *DAPK1* oraz z regulacją epigenetyczną promotorów *DAPK1*. Odnosząc uzyskane wyniki do sporadycznej postaci CLL, wykazano predyspozycję epigenetyczną jako główną przyczynę zmniejszonej ekspresji *DAPK1*. Niezwykle interesujące jest to, że zarówno predyspozycje genetyczne, jak i regulacja epigenetyczna skutkują utratą funkcji przez te same geny. Ten fenomen nie jest jednak ograniczony tylko do CLL, Esteller [39] w 2002 roku zwracała uwagę, że regulacji epigenetycznej podlegają geny, których utratę obserwowano w rodzinnym występowaniu nowotworów (takie jak *MLH*, *BRCA 1*, *p16*).

W CLL delecja części ramienia długiego chromosomu 13. występuje u ponad połowy chorych [40]. Inaktywacja niektórych genów supresorowych w CLL związanych z tą najczęstszą aberracją cytogenetyczną może być skutkiem utraty funkcji przez monoalleliczną delecję (*del13q14.3*) połączoną z wyciszeniem poprzez regulację epigenetyczną genów drugiego chromosomu. Jednak Mertens i wsp. [41] wykazali, że utrata funkcji genów supresorowych nie wiąże się z metylacją regionów

Tabela 2. Geny regulowane epigenetycznie w hematoonkologii

Table 2. Epigenetically regulated genes in hematooncology

Choroba	Geny
Ostra białaczka szpikowa	<i>p15</i> , <i>E-cadherin</i> , <i>SOCS-1</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i> , <i>HIC1</i> , <i>RARβ2</i> , <i>ER</i>
Zespoły mielodysplastyczne	<i>p15</i> , <i>E-cadherin</i> , <i>calcitonin</i> , <i>HIC1</i> , <i>ER</i>
Przewlekła białaczka limfocytowa	<i>DAPK1</i> , <i>ZAP-70</i> , <i>TWIST2</i> , <i>HOXA4</i> , <i>MLH</i> , <i>BRCA 1</i> , <i>p16</i>
Ostra białaczka limfoblastyczna	<i>E-cadherin</i> , <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i> , <i>MGMT</i>
Chłoniaki	<i>DAPK1</i> , <i>p16</i> , <i>p73</i> , <i>MGMT</i> , <i>GSTP1</i> , <i>RARβ2</i> , <i>CRBP1</i>
Szpiczak mnogi	<i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>SOCS-1</i> , <i>E-cadherin</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i> , <i>PF4</i>

Tabela 3. Wyniki wybranych badań klinicznych z zastosowaniem leków epigenetycznych w hematologii
Table 3. Clinical trial results of epigenetic drugs in hematology

Lek/Leki	Choroba	Faza badania (n) [#]	Wyniki	Piśmiennictwo
Worinostat	CTCL	IIb (n = 74)	CR = 16% PR = 67% SD = 16%	Olsen i wsp. [61]
Worinostat	MM	I (n = 13)	Brak odpowiedzi	Richardson i wsp. [62]
Worinostat	DLBCL	II (n = 18)	CR = 5,5% SD = 5,5%	Crump i wsp. [63]
Worinostat	MDS, AML	I (n = 41)	CR, PR, HI = 17%	Garcia-Manero i wsp. [64]
Worinostat + beksaroten	CTCL	I (n = 19)	CR = 5% PR = 15% SD = 63%	Dummer i wsp. [65]
Worinostat + brotezomib	MM	I (n = 23)	ORR = 42% PR = 13% (u chorych opornych na bortezomib)	Badros i wsp. [66]
PBA (maślan fenylu) + azacytydyna	AML, MDS	II (n = 10)	ORR = 50%	Maslak i wsp. [67]
VPA (kwas walproinowy) + ATRA (kwas all trans retinowy)	AML	II (n = 58)	ORR = 5%	Kuendgen i wsp. [68]
Azacytydyna	MDS	III (n = 99)	ORR = 60% CR = 7% PR = 16% HI = 37%	Silverman i wsp. [17]
Azacytydyna	MDS	III (n = 209)	CR = 10–17% HI = 23–36%	Silverman i wsp. [18]
Azacytydyna	MDS	III (n = 179)	CR = 17% PR = 12% HI = 42–49%	Fenaux i wsp. [21]
Decytabina	MDS	II (n = 177)	ORR = 49%	Wijermans i wsp. [23]
Decytabina	MDS	III (n = 85)	ORR = 30% CR = 9% HI = 13%	Kantarjian i wsp. [24]
Decytabina	MDS	II (n = 99)	ORR = 51% CR = 32% HI = 18%	Steensma i wsp. [27]
Decytabina	CLL + NHL	I (n = 20)	SD = 40%	Blum i wsp. [44]

[#]w przypadku badań III fazy liczba chorych otrzymujących badany lek; MM (*multiple myeloma*) — szpiczak mnogiej; CTCL (*cutaneous T-cell lymphoma*) — skórny chłoniak T-komórkowy; DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) — rozlany chłoniak z dużych komórek B; MDS (*myelodysplastic syndrome*) — zespół mielodysplastyczny; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa, CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) — przewlekła białaczka limfocytowa; NHL (*non Hodgkin lymphoma*) — chłoniak nieziarniczny; CR (*complete response*) — odpowiedź całkowita; PR (*partial response*) — odpowiedź częściowa; SD (*stable disease*) — stabilizacja choroby; HI (*hematologic improvement*) — poprawa hematologiczna; ORR (*overall response rate*) — ogólny odsetek odpowiedzi

promotorowych, ale raczej jest wynikiem haploinsuficjencji.

W pierwszym badaniu globalnym Rush i wsp. [42] przeanalizowali stan metylacji 3000 wysp CpG, znajdując 193 metylowane sekwencje między innymi dla genu *GRM7*, który hamuje przekazywanie sygnału cAMP w indukcji apoptozy. Kanduri i wsp. [43] dokonali oceny globalnego stanu metylacji przy użyciu macierzy umożliwiającej ocenę 27 578 regionów CpG w regionach promocyjnych 14 495 genów. Wykazali ogólną hipometylację genomu z rejonami hipermetylacji w miejscach promotorowych genów supresorowych. Porównując grupy o chorych o różnym rokowaniu na podstawie genów *IgVH*: zmutowanych — jako dobrze rokujących vs. niezmutowanych i *IGVH3-21* jako związanych ze złym rokowaniem wykazano metylację grup genów związanych z proliferacją (*ADORA3*, *AIRE*, *CARD15*, *FABP7*, *LOC340061*, *PRF1*, *UNC5CL*) i antyapoptotycznych (*BCL2*) u chorych z dobrym rokowaniem oraz metylację genów supresorowych (*ABI3*, *SCGB2A1*, *VHL*) u chorych ze złym rokowaniem [43].

Znaczenie regulacji epigenetycznej w patogenezie CLL zainspirowało badaczy do przeprowadzenia pierwszych prób klinicznych. W badaniu I fazy 20 badanych (16 chorych na CLL i 4 pacjentów z chłoniakiem niezłaziernym) otrzymywało w leczeniu decytabinę. Przy akceptowalnej toksyczności obserwowano niewielką korzyść kliniczną gdyż u 8 chorych uzyskano stabilizację choroby [44].

W tabelach 2 i 3 zestawiono geny regulowane epigenetycznie w rozrostowych chorobach hematologicznych oraz kliniczne wyniki stosowania terapii epigenetycznej.

Podsumowanie

W ostatnich latach zrozumienie mechanizmów epigenetycznych doprowadziło do istotnego pogłębienia wiedzy dotyczącej biologii chorób rozrostowych. Określono pojedyncze geny regulowane epigenetycznie, których utrata funkcji doprowadzała do progresji choroby. W badaniach globalnych określono grupy genów ulegające regulacji epigenetycznej. Potencjalna odwracalność tych zmian zainspirowała liczne grupy badawcze do przeprowadzenia prób klinicznych leczenia przy użyciu leków epigenetycznych. Zachęcające wyniki badań III fazy doprowadziły do wprowadzenia dwóch leków hipometylujących: azacytydyny oraz decytabiny do leczenia chorych z zespołami mielodysplastycznymi. Również lek acetylujący — vorinostat — zaakceptowano do leczenia chorych z chłoniakiem T-komórkowym. Liczne kolejne leki odwracające zmiany epigenetyczne są w różnych fazach badań klinicznych i w niedługim czasie można się spodziewać kolejnych rejestracji.

Piśmiennictwo

1. Constantinides P.G., Jones P.A., Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 1977; 267: 364–366.
2. Jones P.A., Taylor S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20: 85–93.
3. Sealy L., Chalkley R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 1978; 14: 115–121.
4. Lozzio C.B., Lozzio B.B., Machado E.A., Fuhr J.E., Lair S.V., Bamberger E.G. Effects of sodium butyrate on human chronic myelogenous leukaemia cell line K562. *Nature* 1979; 281: 709–710.
5. Karon M., Sieger L., Leimbrock S., Finklestein J.Z., Nesbit M.E., Swaney J.J. 5-Azacytidine: a new active agent for the treatment of acute leukemia. *Blood* 1973; 42: 359–365.
6. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 1148–1159.
7. Bueno M.J., Perez de Castro I., Gomez de Cedron M. i wsp. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008; 13: 496–506.
8. Mann B.S., Johnson J.R., Cohen M.H., Justice R., Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 2007; 12: 1247–1252.
9. Musolino C., Sant'antonio E., Penna G. i wsp. Epigenetic therapy in myelodysplastic syndromes. *Eur. J. Haematol.* 2010; 84: 463–473.
10. Boultonwood J., Wainscoat J.S. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2007; 138: 3–11.
11. Quesnel B., Guillermin G., Vereecque R. i wsp. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998; 91: 2985–2990.
12. Kim M., Oh B., Kim S.Y. i wsp. p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. *Leuk. Res.* 2010; 34: 718–722.
13. Cohen O., Kimchi A. DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell. Death Differ.* 2001; 8: 6–15.
14. Iwai M., Kiyoi H., Ozeki K. i wsp. Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2005; 19: 1367–1375.
15. Silverman L.R., Holland J.F., Weinberg R.S. i wsp. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1993; (7 suppl. 1): 21–29.
16. Silverman L.R., Holland J.F., Demakos E.P. Azacytidine (Aza C) in myelodysplastic syndrome (MDS), CALGB studies 8421 and 8921. *Ann. Hematol.* 1994; 68: A12.
17. Silverman L.R., Demakos E.P., Peterson B.L. i wsp. Randomized controlled trial of azacytidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2429–2440.
18. Silverman L.R., McKenzie D.R., Peterson B.L. i wsp. Further analysis of trials with azacytidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3895–3903.
19. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J. i wsp. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 3835–3849.
20. Cheson B.D., Bennett J.M., Kantarjian H. i wsp. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 3671–3674.
21. Fenaux P., Mufti G.J., Hellstrom-Lindberg E. i wsp. Efficacy of azacytidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 223–232.
22. Gurion R., Vidal L., Gafter-Gvili A. i wsp. 5-azacytidine prolongs overall survival in patients with myelodysplastic syndrome — a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 2010; 95: 303–310.

23. Wijermans P.W., Lubbert M., Verhoef G., Klimek V., Bosly A. An epigenetic approach to the treatment of advanced MDS; the experience with the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in 177 patients. *Ann Hematol.* 2005; 84 (supl. 1): 9–17.
24. Kantarjian H., Issa J.P., Rosenfeld C.S. i wsp. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794–1803.
25. Kantarjian H., Oki Y., Garcia-Manero G. i wsp. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52–57.
26. Kantarjian H.M., O'Brien S., Shan J. i wsp. Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer* 2007; 109: 265–273.
27. Steensma D.P., Baer M.R., Slack J.L. i wsp. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 3842–3848.
28. Galm O., Wilop S., Luders C. i wsp. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Ann. Hematol.* 2005; 84 (supl. 1): 39–46.
29. Figueroa M.E., Lugthart S., Li Y. i wsp. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*; 17: 13–27.
30. Herman J.G., Civin C.I., Issa J.P., Collector M.I., Sharkis S.J., Baylin S.B. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res.* 1997; 57: 837–841.
31. Wong I.H., Ng M.H., Huang D.P., Lee J.C. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 2000; 95: 1942–1949.
32. Li Q., Kopecky K.J., Mohan A. i wsp. Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 1077–1084.
33. Bug G., Ritter M., Wassmann B. i wsp. Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer* 2005; 104: 2717–2725.
34. Kuendgen A., Knipp S., Fox F. i wsp. Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 2005; 84 (supl. 1): 61–66.
35. Corcoran M., Parker A., Orchard J. i wsp. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2005; 90: 1078–1088.
36. Raval A., Lucas D.M., Matkovic J.J. i wsp. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 3877–3885.
37. Strathdee G., Sim A., Parker A., Oscier D., Brown R. Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* 2006; 20: 1326–1329.
38. Raval A., Tanner S.M., Byrd J.C. i wsp. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2007; 129: 879–890.
39. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427–5440.
40. Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A. i wsp. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1910–1916.
41. Mertens D., Wolf S., Schroeter P. i wsp. Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 4116–4121.
42. Rush L.J., Raval A., Funchain P. i wsp. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res.* 2004; 64: 2424–2433.
43. Kanduri M., Cahill N., Goransson H. i wsp. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115: 296–305.
44. Blum KA, Liu Z, Lucas DM i wsp. Phase I trial of low dose decitabine targeting DNA hypermethylation in patients with chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma: dose-limiting myelosuppression without evidence of DNA hypomethylation. *Br. J. Haematol.* 2010; 150: 189–195.
45. Schrupp D.S. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 3947–3957.
46. Richon V.M., Sandhoff T.W., Rifkind R.A., Marks P.A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10014–10019.
47. Sandor V., Senderowicz A., Mertins S. i wsp. P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br. J. Cancer* 2000; 83: 817–825.
48. Zhao Y., Lu S., Wu L. i wsp. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 2782–2790.
49. Dai Y., Rahmani M., Dent P., Grant S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 5429–5444.
50. Wang Y., Wang S.Y., Zhang X.H. i wsp. FK228 inhibits Hsp90 chaperone function in K562 cells via hyperacetylation of Hsp70. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 356: 998–1003.
51. Nishioka C., Ikezoe T., Yang J., Takeuchi S., Koeffler H.P., Yokoyama A. MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. *Leuk Res.* 2008; 32: 1382–1392.
52. Robbins A.R., Jablonski S.A., Yen T.J. i wsp. Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle.* 2005; 4: 717–726.
53. Kim S.H., Jeong J.W., Park J.A. i wsp. Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases. *Oncol. Rep.* 2007; 17: 647–651.
54. Suzuki T., Yokozaki H., Kuniyasu H. i wsp. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 2000; 88: 992–997.
55. Rosato R.R., Almenara J.A., Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res.* 2003; 63: 3637–3645.
56. Catley L., Weisberg E., Kiziltepe T. i wsp. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* 2006; 108: 3441–3449.
57. Inoue H., Shiraki K., Ohmori S. i wsp. Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis. *Int. J. Mol. Med.* 2002; 9: 521–525.
58. Weiser T.S., Ohnmacht G.A., Guo Z.S. i wsp. Induction of MAGE-3 expression in lung and esophageal cancer cells. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 71: 295–301; Discussion: 301–292.
59. Weiser T.S., Guo Z.S., Ohnmacht G.A. i wsp. Sequential 5-Aza-2 deoxycytidine-depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1. *J. Immunother.* 2001; 24: 151–161.
60. Munshi A., Kurland J.F., Nishikawa T. i wsp. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4912–4922.
61. Olsen E.A., Kim Y.H., Kuzel T.M. i wsp. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 3109–3115.
62. Richardson P., Mitsiades C., Colson K. i wsp. Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 502–507.

63. Crump M., Coiffier B., Jacobsen E.D. i wsp. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 2008; 19: 964–969.
64. Garcia-Manero G., Yang H., Bueso-Ramos C. i wsp. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008; 111: 1060–1066.
65. Dummer R., Hymes K., Sterry W., Steinhoff M., Assaf C., Kerl H., Ahern J., Rizvi S., Ricker J.L., Whittaker S. Vorinostat in combination with bexarotene in advanced cutaneous T-cell lymphoma: A phase I study. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27 (supl.): abstr 8572.
66. Badros A., Burger A.M., Philip S. i wsp. Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 5250–5257.
67. Maslak P., Chanel S., Camacho L.H. i wsp. Pilot study of combination transcriptional modulation therapy with sodium phenylbutyrate and 5-azacytidine in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006; 20: 212–217.
68. Kuendgen A., Schmid M., Schlenk R. i wsp. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006; 106: 112–119.