

ТЕРАПИЈА ХИДРОКСИУРЕЈОМ: ОД ИНХИБИЦИЈЕ МИЈЕЛОПРОЛИФЕРАЦИЈЕ ДО ИНДУКЦИЈЕ ФЕТАЛНОГ ХЕМОГЛОБИНА

Владан П. Чокић

*Лабораторија за молекуларну онкологијуу, Институт за медицинска
истраживања,
Универзитет у Београду*

Сажетак

Код пацијената оболелих од српасте анемије, хидроксиуреја повећава фетални хемоглобин који смањује полимеризацију хемоглобина S и клиничке компликације. Показали смо да су азот моноксид (NO) и његов рецептор, солубилна гуанилат циклаза (sGC), укључени у стимулацију феталног хемоглобина код прогенитора еритропоезе. Хидроксиуреја може директно да реагује са деокси-хемом sGC, преко слободног радикала NO, стварајући гвожђе-нитрозилне деривате који активирају стварање cGMP у ћелијама еритропоезе. Хидроксиуреја повећава стварање NO код ендотелијалних ћелија и макрофага, показујући да је стимулација експресије гена гама-глобина посредована активацијом ензима NO синтазе (NOS) у ћелијама микросредине хематопоезе. Такође, показали смо да хидроксиуреја повећава стварање NO, како краткотрајно фосфорилацијом ендотелијалне изоформе NOS (eNOS), преко протеин киназе A, тако и дуготрајно посттранслационим повећањем количине eNOS протеина, преко инхибиције активности протеазома, у ендотелијалним ћелијама. Хидроксиуреја стимулише стварање cAMP, cGMP и унутарћелијског калцијума неопходног за активацију eNOS код ендотелијалних ћелија. Изнете студије представљају механизам којим краткотрајни и продужени ефекти хидроксиуреје могу утицати на NO у ћелијама код

мијелопролиферативних неоплазми (МПН). Експресија фактора ангиогенезе: хипоксија индуцибилног фактора (*HIF-1 α*), фактора раста васкуларног ендотелијума (*VEGF*) и *eNOS* протеина је повећана код циркулишућих гранулоцита и *CD34+* ћелија код оболелих од МПН, али је значајно смањена након терапије хидроксиурејом. Овим се успешност терапије хидроксиурејом може делимично приписати и регулацији фактора ангиогенезе код МПН. Заједничка и слична дејства хидроксиуреје и *NO* појашњавају цитостатску регулацију изражене пролиферације ћелија хематопоезе код МПН.

Кључне речи: хидроксиуреја, азот моноксид, српаста анемија, мијелопролиферативне неоплазме

Увод

Хидроксиуреја (*Hydroxyurea*), или *Hydroxycarbamide* (*HONHCONH₂*), је неалкилирајући, антипролиферативни и мијелосупресивни лек који се користи дуже од 40 година у терапији мијелопролиферативних неоплазми, псоријазе, метастатског меланома, резистентне хроничне мијелоидне леукемије и повратног, метастатског или неоперабилног карцинома оваријума. Исто тако је нашла своју примену у комбинацији са радијационом терапијом, у локалној контроли примарног сквамозног ћелијског карцинома главе и врата. Хидроксиуреја се користи као орална терапија која достиже максималну плазма концентрацију до 1,22 сата након примене [1]. Хидроксиуреја има релативно брзи клиренс са полуживотом од 2-4 сата, док је проценат излучене непромењене хидроксиуреје у урину око 36% [2]. Излучивање хидроксиуреје урином је скоро идентично после оралне и парентералне примене, као и акутни токсични ефекти [1]. Хидроксиуреја има минималну дифузију преко двоструке липидне мембране, али представља супстрат за пет различитих транспортера који припадају фамилијама органских катјон/карнитин транспортера и анјон транспортујућих полипептида, као и транспортерима уреје А и Б, експримираним у ћелијама еритропоезе где преносе хидроксиуреју бидирекционо преко олакшане дифузије [3].

Инхибиција рибонуклеотидне редуктазе са хидроксиурејом

Мања подјединица рибонуклеотидне редуктазе представља циљни ензим за хидроксиуреју [4]. Рибонуклеотидна редуктаза је ензим који претвара рибонуклеотиде у дезоксирибонуклеотиде и неопходан је у синтези ДНК. Краткотрајни азотмоноксиду (*NO*) - слични радикали из хидроксиуреје су по први пут пронађени у реакцији хидроксиуреје са *R2* протеином из *E. coli* и миша, показујући да пренос 1-електрона са хидроксиуреје на тирозилни радикал представља главни механизам у инхибицији рибонуклеотидне редуктазе [5]. И *NO* гас и *NO* произведен током активације лизата макрофага такође инхибирају рибонуклеотидну редуктазу туморских ћелија. *NO*-зависна цитостаза почиње са брзом и повратном инхибицијом рибонуклеотидне редуктазе, да би додатно била појачана дуготрајним антипролиферативним дејством [6, 7]. У *S* фази ћелијског циклуса, рибонуклеотидна редуктаза је састављена од две подјединице *R1* и *R2*, где мањи *R2* протеин користи диферични централни атом гвожђа за Fe^{2+} конверзију у Fe^{3+} ради стварања тирозилног слободног радикала неопходног за катализу. Хидроксиуреја и њена оксидована форма се везују за активни остатак *Tyr-176*, неопходан за стварање слободног радикала, спречавају стварање тирозилног радикала и последично инхибирају рибонуклеотидну редуктазу [8]. Хидроксиуреја у једнаком временском распону прекида везе атома гвожђа и радикала код мишјег протеина *R2*, што је пропраћено ослобађањем ферозне Fe^{2+} форме гвожђа из *R2* протеина [9]. *NO* такође доводи до отклањања тирозилног радикала на *R2* протеину, где је дејство слободног радикала *NO* реверзибилно и пропраћено је повећаним ослобађањем феричне Fe^{3+} форме гвожђа из мишјег *R2* протеина [6]. Оба јона гвожђа (Fe^{2+}) на позицији централна два атома гвожђа у *R2* протеину имају могућност везивања *NO* [10].

Интеракција хидроксиуреје са хемоглобином

Хидроксиуреа је фармаколошка супстанца која се биоактивацијом метаболише *in vivo* у слободни радикал *NO*. Стварање *NO in vivo* приликом реакције хидроксиуреје са

хемоглобином исувише је споро [11]. Показано је неколико механизма за стварање NO из хидроксиуреје:

- а) посредован каталазом,
- б) уреаза завистан,
- в) катализован пероксидазом рена [11–13].

Хидроксиуреја реагује *in vitro* са деоксихемоглобином српастих ћелија и прави метхемоглобин (*metHb*) и нитрозилни хемоглобин (*HbNO*). Хидроксиуреја реагује и са *metHb* и формира *HbNO* [14]. NO се такође везује за деоксихемоглобин са великим афинитетом [15]. Електронске парамагнетно резонантне (ЕПР) спектралне анализе су показале да петокоординисани *HbNO* комплекс потиче од NO везивања за деоксихемоглобин током интеракције са хидроксиурејом [16]. Хидроксиуреја реагује *in vitro* са *oxyHbA*, *deoxyHbA*, и *metHbA* да би директно пренела NO на атом гвожђа и наградила *HbNO* (2-6% укупних протеина) [17]. ЕПР спектроскопија је показала да стварање *HbNO* обухвата специфичан пренос NO из NHOH групе хидроксиуреје [18]. Афинитет деоксихемоглобина за NO је већи 10^6 -пута у односу на кисеониок и 10^3 -пута у односу на CO. Концентрација кисеоника је ниска у венској крви док је концентрација деоксихемоглобина релативно висока и створени *HbNO* је првенствено у петокоординисаној структури (деокси типа). Реакција хидроксиуреје са деоксихемоглобином се одиграва двоструко брже него са оксихемоглобином [14]. Хидроксиуреја реагује споро са оксихемоглобином и реактивни слободни радикали се стварају током продуженог временског периода, где је NO молекул оксидациони продукт спајања *metHb* и хидроксиуреје [19]. Реакције хемина и феричних форми *HbA*, хемоглобина S (*HbS*) и миоглобина са хидроксиурејом су такође довеле до стварања NO, чинећи хем одговорним за оксидацију хидроксиуреје. Све ово указује да сваки протеин који садржи хем може бити способан да оксидише хидроксиуреју и доведе до стварања NO [16]. Стварање NO из хидроксиуреје може бити молекуларна основа фармаколошке и антитуморске активности хидроксиуреје.

Терапија српасте анемије хидроксиурејом

Фетални хемоглобин (*HbF*) се може повећати код пацијената који су на хемиотерапији, што се може искористити код пацијената са симптоматским хемоглобинопатијама. *HbF* је испитиван код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама (МПН) третираних са хидроксиурејом. Пацијенти су показали повећање *HbF* од 1- 5% и више од 8% док су на хидроксиуреји, да би се са прекидом третмана вратили на мање од 1% *HbF* [20]. Хидроксиуреја такође повећава продукцију *HbF*, хемоглобина, еритроцита и инхибира *in vitro* раст еритроидних колонија из крви пацијената са српастом анемијом [21]. Хидроксиуреја смањује бол, величину слезине, пнеумонију и смртност код пацијената са српастом анемијом, као и број вазооклузивних криза, акутни синдром грудног коша, хоспитализацију и потребе за трансфузијама [22]. Болесници од српасте анемије који су на терапији хидроксиурејом дуже од 9 година имали су смањење смртности од 40% уз повећање *HbF* који спречава формирање српастих ћелија [23]. За високо ризичну децу са српастом анемијом, која су најмање једну годину на трансфузији и без озбиљних васкулопатија, терапија хидроксиурејом може заменити хроничне трансфузије ради одржавања брзине можданог протока крви и превенције можданог удара [24]. Хидроксиуреја смањује деформабилност српастих еритроцита у *in vitro* условима, што потенцијално смањује број истих у *in vivo* условима, не утичући на деформабилност нормалних еритроцита [25]. Стимулишући стварање *HbF* у еритроцитима, хидроксиуреја мења кинетику и термодинамику полимеризације *HbS*. Српасти *HbS* ствара дуге ланце полимера у еритроцитима који отпуштају кисеоник у крв повећавајући чврстину еритроцита. Чврсти српасти еритроцити затварају крвне судове изазивајући вазооклузију и болне епизоде својствене за српасту анемију [26]. Количина растворљивог адхезионог молекула васкуларних ћелија 1 (*VCAM-1*) је повећана код пацијената са српастом анемијом и значајно смањење је регистровано током терапије хидроксиурејом [27]. Утврђено је да и *NO* смањује експресију *VCAM-1* гена [28]. Поред стимулације *HbF*, хидроксиуреја може променити клиничку слику пацијената са српастом анемијом својим утицајем на ендотелијум крвних судова и последично на степен адхеренције различитих крвних ћелија.

Повећана адхезија српастих еритроцита за ендотелијум се сматра за рани корак у вазооклузији, једној од основних обележја српасте анемије [29]. Хидроксиуреја је такође смањила пријањање еритроцита за ендотелијалне ћелије крвних судова у експериментима са *HbA* или *HbS* еритроцитима [30]. Такође, ендогени и екзогени *NO* инхибира пријањање нормалних и српастих еритроцита за ендотелијум [31]. Количине л-аргинина, субстрата за стварање *NO*, су смањене у акутним вазооклузивним кризама код одраслих пацијената са српастом анемијом [32]. Такође и количина издахнутог *NO* је смањена код одраслих са српастом анемијом [33]. Док сам л-аргинин не повећава продукцију серумских метаболита *NO* у стању мировања код пацијената са српастом анемијом, он то чини када се користи заједно са хидроксиурејом [34].

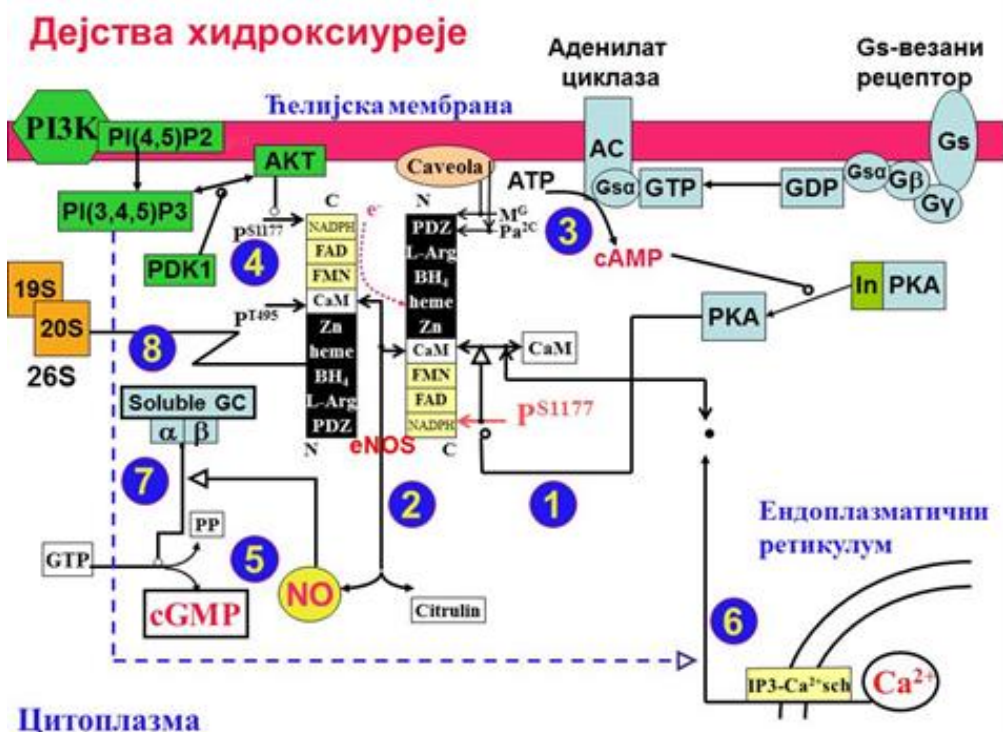


Схема 1. Евалуација дејства хидроксиуреје на нивоу ендотелијалних ћелија.

1. Хидроксиуреја је дозно и временски-зависно индуковала брзу и пролазну фосфорилацију eNOS-а на Ser-1177 у ендотелијалним ћелијама, на превасходно РКА-зависан начин, као и стимулација продукције NO-а.
2. Хидроксиуреја је изазвала eNOS зависно повећање продукције NO-а у ендотелијалним ћелијама.
3. Хидроксиуреја је повећала нивое cAMP у ендотелијалним ћелијама.
4. Стимулација продукције NO-а хидроксиурејом је регулисана механизмом зависним и од АКТ-а.
5. Хидроксиуреја може и директно реаговати са деокси-хемом sGC, правећи комплекс нитрозилованог гвожђа (HbNO), и последично активирајући продукцију cGMP-ја.
6. Повећање унутаћелијске концентрације Ca²⁺ индуковано хидроксиурејом је последица повећаног отпуштања калцијума из ендоплазматичног ретикулума.
7. Хидроксиуреја је повећала нивое cGMP у ендотелијалним ћелијама.
8. Хидроксиуреја повећава нивое протеина eNOS у ендотелијалним ћелијама, тако што спречава његову деградацију инхибицијом активности протеазома 20S.

Стимулација солубилне форме гуанилат циклазе хидроксиурејом

Солубилна гуанилат циклаза (sGC) је хетеродимер и хемопротенин састављен од α и β подјединице са хем групом везаном за остатак хистидина на β 1 подјединици, слично хемоглобину [35]. sGC је рецептор за NO (превасходно слободни радикал NO•) који омогућава NO да се веже директно за феро форму деоксихема (Fe²⁺) и активира ензим [36]. Хидроксиуреја значајно повећава NOx (NO метаболите нитрите и нитрате) и циклични гуанозин монофосфат (cGMP) у плазми пацијената са српастом анемијом, док активацијом sGC и cGMP-зависне протеин киназе стимулише испољавање γ -глобинског гена у ћелијама еритропоезе, на супрот контроли од стране цикличног аденозин монофосфата (cAMP)-зависног сигналног пута [37–40]. Количина cGMP је значајно повећана у

еритроцитима пацијената са српастом анемијом у поређењу са еритроцитима нормалних особа и додатно се повећава током терапије хидроксиурејом [38]. Хидроксиуреја може активирати *sGC* помоћу три независна механизма: сопственом деградацијом у *NO*, стимулацијом активности азот моноксид синтазе (*nitricoxidesynthase - NOS*), или директном интеракцијом са *sGC*. У светлу тих могућности, показали смо да хидроксиуреја може директно да реагује са деокси хемом у центру *sGC* правећи *HbNO* и започне стварање *cGMP* [41]. Такође смо утврдили да хидроксиуреја доводи до повећања *cGMP* и *cAMP* у ендотелијалним ћелијама и прогениторима еритропоезе, као и унутарћелијског калцијума неопходног за активацију ендотелне изоформе *NOS* (*eNOS*), што је илустровано у схеми 1 [41, 42]. Проширили смо испитивања на прогениторе еритропоезе и показали да *NO* доводи до великог повећања унутар ћелијског *cGMP* активацијом *sGC*, али смањује *cAMP* [41]. Деградација *cAMP* је регулисана фосфодиестеразом 3 (*PDE3*) код ћелија еритропоезе, чија активност је инхибирана активацијом *sGC* [43]. Наша даља истраживања су показала да хидроксиуреја, слично *NO*-донорима, повећава количину *cGMP* у ћелијама еритропоезе човека, док су инхибитори *sGC* спречили повећање γ -глобинског гена током стимулације хидроксиурејом и *NO*-донорима, чиме смо представили да је сигнализација преко *NO* укључена у стварање *HbF* [44]. Хидроксиуреја *in vitro* повећава ниво γ -глобина утичући како на ране прогениторе, тако и непосредно на касне прекурсоре еритропоезе већ ангажоване у продукцији хемоглобина [45, 46]. Током стимулације експресије гама глобина хидроксиурејом, одредили смо да су нуклеотид гуанин везујући протеин (*G* протеин)-везани рецептори (*GPCR*) и *GPCR*-стимулисани гени активирани преко *cAMP*/протеин киназе А (*PKA*) и *NO/cGMP* сигналних путева, за које смо претходно показали да су стимулирани током третмана хидроксиурејом, односно током активације *sGC* и *eNOS*, као ензима одговорног за стварање *NO* [47].

Стимулација ензима синтазе азот монооксида хидроксиурејом

Терапија хидроксиурејом је повезана са производњом *NO* унутар крвних судова и еритроцита [27]. Хидроксиурејом стимулисано

стварање *NO* спречено је инхибицијом *NOS*. Показали смо да хидроксиуреја повећава стварање *NO* и *cGMP* преко протеин киназе *A* стимулисаног *eNOS* у ендотелијалним ћелијама [42]. У поменутиим нашим огледима, хидроксиуреја је краткотрајно фосфорилисала *eNOS* протеин за неколико минута, док се стварање *NO* одржавало сатима. Утврдили смо да су протеазоми примарни деградациони процес за *eNOS*, као и да инхибиција протеазома доводи до пролонгиране стимулације *NO* у ендотелијалним ћелијама [48]. Ову посттранскрипциону контролу прати повећан ниво *eNOS* протеина након продуженог третмана ендотелијалних ћелија хидроксиурејом и инхибиторима протеазома, док хидроксиуреја инхибира активност протеазома. Стога се да извести закључак да хидроксиуреја дуготрајно стимулише *NO* преко инхибиције протеазомалне деградације *eNOS* ензима [48]. Након ове наше демонстрације, откривена је нова структура названа *H*-хидроксиуреја мотив који је реверзибилни, нековалентни инхибитор специфичан за активно језгро протеазома [49]. Тако да хидроксиуреја доводи како до краткотрајне активације тако и до продужене акумулације *eNOS* ензима. Паракрини ефекат *NO* стимулисаног хидроксиурејом, пореклом из ендотелијалних ћелија микросредине хематопоезе, на ћелије еритропоезе може имати већи физиолошки значај на стимулацију *sGC* него интеракција хидроксиуреје са деокси хемом код *sGC* у ћелијама еритропоезе. Сходно томе, наша истраживања су открила да хидроксиуреја стимулише стварање *NO* преко *NOS* ензима код хуманих макрофага и ендотелијалних ћелија костне сржи, као ћелија микросредине хематопоезе, које у заједничким културама са прогениторима еритропоезе доводе до стимулације генске експресије гама глобина [50]. Међутим, наша паралелна контролна испитивања са брадикинином, као добро познатим стимулатором *NO*, указала су да не може да повећа генску експресију гама глобина како појединачно код прогенитора еритропоезе тако и у њиховим заједничким културама са ендотелијалним ћелијама. Ово указује да краткотрајна и ниска продукција *NO*, индукована брадикином, није довољна за стимулацију експресије гама глобина [51].

Терапија мијелопролиферативних неоплазми хидроксиурејом

Хидроксиуреја је хемиотерапеутски лек који се од 1980-их користи у лечењу МПН укључујући хроничну мијелоидну леукемију, полицитемију веру (ПВ), примарну мијелофиброзу (ПМФ) и есенцијалну тромбоцитемију (ЕТ) [52]. Примена хидроксиуреје смањује раст еритроидних претходника и *CD34+* код ПВ и ЕТ [53]. Деривати *NO* (нитрити и нитрати) су значајно повишени код пацијената оболелих од ЕТ након третмана хидроксиурејом у поређењу са контролама и пацијентима без терапије хидроксиурејом [54]. *NO* инхибира агрегацију тромбоцита преко *sGC* и продукције *cGMP*, док хидроксиуреја такође смањује агрегацију преко *sGC* код пацијената оболелих од хроничне мијелоидне леукемије [55]. *NO* је повећан у плазми пацијената оболелих од ПВ и ЕТ четири сата након почетка терапије хидроксиурејом [56]. Такође је утврђено да *eNOS* има кључну улогу у развоју ангиогенезе изазване са васкуларним ендотелним фактором раста (*VEGF*) [57]. Показали смо да су код МПН повећани фактори ангиогенезе: *eNOS*, *VEGF* и фактор индукције хипоксије (*HIF-1 α*) у гранулоцитима, да би након терапије хидроксиурејом били изразито смањени, што поспешује њен терапијски значај сходно томе да ангиогенеза доприноси развоју мијелофиброзе као крајњег неповољног стадијума болести [58, 59]. Хидроксиуреја смањује број леукоцита и тромбоцита код пацијената оболелих од ПВ, као и број тромбоцита код *JAK2V617F* позитивних пацијената са ЕТ [60]. Међутим хидроксиуреја не може да буде замена за флеботомију где одмах долази до смањења хипервискозности. Хидроксиуреја смањује тромбозу и пруритус код пацијената оболелих од МПН, док је смањење слезине нестабилно, а код ЕТ спречава пролазни исхемијски напад. Показано је да хидроксиуреја смањује присуство *JAK2V617F* мутације код ПВ и ЕТ пацијената само током третмана, али не и након прекида терапије [61–63]. Међутим, друга студија није показала значајно смањење оптерећења *JAK2V617F* мутацијом током третмана хидроксиурејом [64]. Оптерећење *JAK2V617F* мутацијом је повезано са развојем мијелофиброзе код ПВ, али не и са појавом акутне мијелоидне леукемије (АМЛ) [65, 66]. На основу препоруке за 2017. годину, сви пацијенти са ПВ захтевају флеботомију ради одржавања

хематокрита испод 45% и аспирин. Пацијенти са ПВ и високим ризиком захтевају циторедуктивну терапију. Пацијенти са ЕТ и изразито нискима ризиком могу бити без терапије, док они са ЕТ и ниским ризиком захтевају једнодневну терапију аспирином. Циторедуктивна терапија је препоручљива за ЕТ пацијенте са високим ризиком али није обавезна за оне са средњим ризиком. Лек избора у циторедуктивној терапији код ЕТ и ПВ је хидроксиуреја, а као лекови другог реда су интерферон алфа и бусулфан. Не препоручује се терапија руксолитинибом или другим ЈАК2 инхибиторима код ПВ и ЕТ, изузев у присуству јаког и продуженог пруритуса или изражене спленомегалије који не реагују на претходно поменути терапију [67]. Према *RESPONSE* клиничкој студији *Janus kinase 1/Janus kinase 2* инхибитор руксолитиниб је успешна дуготрајна терапија код пацијената са ПВ који показују резистенцију или интолеранцију на хидроксиуреју [68]. Пацијенти оболели од ПВ на терапији хидроксиурејом имају укупну стопу одговора од приближно 90% (24% комплетан одговори 66% делимичан одговор, по критеријумима *European Leukemia Net*) са мање тромбоемболија [69]. Међутим, приближно 24% пацијената развиће резистенцију (11%) или интолеранцију (13%) на хидроксиуреју током времена [70]. Резистенција на хидроксиуреју доводи до агресивног тока болести код пацијената са ПВ: 5-6 пута повећану смртност и 6,8 пута повећан ризик за трансформацију у мијелофиброзу или АМЛ [70].

Утицај хидроксиуреје на прогресију мијелопролиферативних неоплазми

Стопа трансформације у акутну леукемију после 20 година процењена је на < 10% за ПВ и 5% за ЕТ, док је фиброзна трансформација нешто чешћа. Циљ терапије код ПВ и ЕТ је смањити васкуларне компликације, а на дуготрајном плану предупредити развој мијелофиброзе, АМЛ и мијелодиспластичног синдрома (МДС). Прве студије нису нашле повећан ризик за МПН трансформацију у АМЛ или МДС након терапије са хидроксиурејом (64 пацијената, 3 године праћења) [71, 72]. Слично је показано и у већим студијама са 231 и 604 пацијента оболелих од ЕТ

[73, 74], као и код 1545 и 1638 пацијената оболелих од ПВ, када је у питању трансформација у леукемију [75, 76]. Две студије мањег обима су показале леукемогену природу хидроксиуреје код МПН, са инциденцом МДС од 14% (35 пацијената, 7,8 година праћења) и АМЛ од 10,5% (50 пацијената, дуготрајна проспективна студија) [77, 78]. У студији са 459 пацијената оболелих од ПВ, показано је да хидроксиуреја нема значајног утицаја на развој мијелофиброзе [79]. Међутим, у једној дуготрајној студији (16,3 године у просеку) са 94 ПВ пацијента на терапији само хидроксиурејом показана је кумулативна инциденца трансформације у АМЛ/МДС од 7,3%, 10,7% и 16,6% након 10, 15 и 20 година праћења, док је кумулативна инциденца трансформације у мијелофиброзу била 15,4%, 24,3% и 31,6% након 10, 15 и 20 година праћења. Ова дуготрајна проспективна рандомизирана студија показала је већи степен трансформације ПВ у АМЛ током терапије хидроксиурејом али без доказа да је ризик за настанак леукемије повезан са хидроксиурејом у контексту еволутивне природе ПВ-а у АМЛ [80]. У клиничкој студији са 311 пацијената оболелих од ПМФ, утврђено је да хидроксиуреја не доводи до леукемичне трансформације болести [81], а у студији од 340 пацијената са ПМФ показано је да хидроксиуреја не доприноси значајно развоју мијелофиброзе, већ је последица тока саме болести [82].

Закључак

У приложеним резултатима изнели смо паралелан механизам дејства хидроксиуреје и *NO* на стимулацију *HbF*, неопходног за замену мутираног *HbA* (*HbS*) код српасте анемије, као и стимулацију *NO/cGMP* сигналног пута од стране хидроксиуреје како у микросредини хематопоезе тако и у прогениторима еритропоезе. Појаснили смо и хемијску природу интеракције хидроксиуреје и *sGC*, која се одвија преко молекула *NO*. Значај терапије хидроксиурејом код МПН је приказан кроз инхибицију ангиогенезе као предуслова за развој мијелофиброзе, док су претходне клиничке студије изнеле да хидроксиуреја нема утицаја на мијелофиброзу или је развој мијелофиброзе комбинација дејства хидроксиуреје и природног тока болести. Занимљиво је да и поред интензивних

клинички студија за циљану терапију ЈАК2 инхибиторима, цитостатик хидроксиуреја представља терапију избора код МПН.

Литература

1. Rodriguez GI, Kuhn JG, Weiss GR, Hilsenbeck SG, Eckardt JR, Thurman A, et al. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood* 1998;91(5):1533–41.
2. Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, He J, Smeltzer MP, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood* 2011;118(18):4985–91.
3. Walker AL, Franke RM, Sparreboom A, Ware RE. Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carrier transporters. *Exp Hematol* 2011;39(4):446–56.
4. Krakoff IH, Brown NC, Reichard P. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res* 1968;28:1559–65.
5. Lassmann G, Thelander L, Graslund A. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:879–87.
6. Lepoivre M, Flaman JM, Bobe P, Lemaire G, Henry Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:21891–7.
7. Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991;174:761–7.
8. Iman M, Khansefid Z, Davood A. Modeling and Proposed Molecular Mechanism of Hydroxyurea Through Docking and Molecular Dynamic Simulation to Curtail the Action of Ribonucleotide Reductase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2016;11(4):461–8.
9. Nyholm S, Thelander L, Gräslund A. Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry* 1993;32(43):11569–74.
10. Haskin CJ, Ravi N, Lynch JB, Münck E, Que L Jr. Reaction of NO with the reduced R2 protein of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1995;34(35):11090–8.
11. Lockamy VL, Huang J, Shields H, Ballas SK, King SB, Kim-Shapiro DB. Urease enhances the formation of iron nitrosyl hemoglobin in the presence of hydroxyurea. *Biochim Biophys Acta* 2003;1622:109–16.
12. Huang J, Kim-Shapiro DB, King SB. Catalase mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *J Med Chem* 2004;47:3495–501.

13. Huang J, Sommers EM, Kim-Shapiro DB, King SB. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J Am Chem Soc* 2002;124:3473–80.
14. Kim-Shapiro DB, King SB, Shields H, Kolibash CP, Gravatt WL, Ballas SK. The reaction of deoxy-sickle cell hemoglobin with hydroxyurea. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428:381–7.
15. Westenberger U, Thanner S, Ruf HH, Gersonde K, Sutter G, Trentz O. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Radic Res Commun* 1990;11:167–78.
16. Glover RE, Ivy ED, Orringer EP, Maeda H, Mason RP. Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. *Mol Pharmacol* 1999;55:1006–10.
17. Huang J, Hadimani SB, Rupon JW, Ballas SK, Kim-Shapiro DB, King SB. Iron nitrosyl hemoglobin formation from the reactions of hemoglobin and hydroxyurea. *Biochemistry* 2002;41:2466–74.
18. Sakano K, Oikawa S, Hasegawa K, Kawanishi S. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1166–74.
19. Stolze K, Nohl H. EPR studies on the oxidation of hydroxyurea to paramagnetic compounds by oxyhemoglobin. *Biochem Pharmacol* 1990;40:799–802.
20. Alter BP, Gilbert HS. The effect of hydroxyurea on hemoglobin F in patients with myeloproliferative syndromes. *Blood* 1985;66:373–9.
21. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1984;74:652–6.
22. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995;322:1317–22.
23. Davies SC, Gilmore A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood Rev* 2003;17:99–109.
24. Ware RE, Davis BR, Schultz WH, Brown RC, Aygun B, Sarnaik S, et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* 2016;387(10019):661–70.
25. Huang Z, Louderback JG, King SB, Ballas SK, Kim-Shapiro DB. In vitro exposure to hydroxyurea reduces sickle red blood cell deformability. *Am J Hematol* 2001;67:151–6.
26. Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 2001;8:123–30.
27. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2002;116:436–44.

28. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9114–9.
29. Heibel RP, Boogaerts MA, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med* 1980;302:992–5.
30. Adragna NC, Fonseca P, Lauf PK. Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. *Blood* 1994;83:553–60.
31. Space SL, Lane PA, Pickett CK, Weil JV. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. *Am J Hematol* 2000;63:200–4.
32. Lopez BL, Kreshak AA, Morris CR, Davis-Moon L, Ballas SK, Ma XL. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. *Br J Haematol* 2003;120:532–4.
33. Girgis RE, Qureshi MA, Abrams J, Swerdlow P. Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: relationship with chronic lung involvement. *Am J Hematol* 2003;72:177–84.
34. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:629–34.
35. Čokić VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype. *Curr Top Dev Biol* 2008;82:169–215.
36. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:334–50.
37. Nahavandi M, Tavakkoli F, Wyche MQ, Perlin E, Winter WP, Castro O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br J Haematol* 2002;119:855–7.
38. Conran N, Oresco-Santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol* 2004;124:547–54.
39. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1847–52.
40. Inoue A, Kuroyanagi Y, Terui K, Moi P, Ikuta T. Negative regulation of gamma-globin gene expression by cyclic AMP-dependent pathway in erythroid cells. *Exp Hematol* 2004;32:244–53.
41. Čokić VP, Andrić SA, Stojilković SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Blood* 2008;111(3):1117–23.
42. Čokić VP, Beleslin-Čokić BB, Tomić M, Stojilković SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. *Blood* 2006;108(1):184–91.

43. Baumann R, Blass C, Götz R, Dragon S. Ontogeny of catecholamine and adenosine receptor-mediated cAMP signaling of embryonic red blood cells: role of cGMP-inhibited phosphodiesterase 3 and hemoglobin. *Blood* 1999;94(15):4314–20.
44. Čokić VP, Smith RD, Beleslin-Čokić BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 2003;111:231–9.
45. Stoeckert CJ Jr, Green MB. Erythropoietin and hydroxyurea can act on early erythroid progenitors from adult human peripheral blood to modulate fetal globin mRNA levels. *Exp Hematol* 1994; 22:278–82.
46. Fibach E, Burke KP, Schechter AN, Noguchi CT, Rodgers GP. Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultured erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or beta-thalassemia. *Blood* 1993;81:1630–5.
47. Čokić VP, Smith RD, Biancotto A, Noguchi CT, Puri RK, Schechter AN. Globin gene expression in correlation with G protein-related genes during erythroid differentiation. *BMC Genomics* 2013;14:116.
48. Čokić VP, Beleslin-Čokić BB, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity. *Nitric Oxide* 2007;16(3):371–8.
49. Gallastegui N, Beck P, Arciniega M, Huber R, Hillebrand S, Groll M. Hydroxyureas as noncovalent proteasome inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51:247–9.
50. Čokić VP, Beleslin-Čokić BB, Smith RD, Economou AP, Wahl LM, Noguchi CT, et al. Stimulated stromal cells induce gamma-globin gene expression in erythroid cells via nitric oxide production. *Exp Hematol* 2009;37(10):1230–7.
51. Čokić VP, Subotički T, Beleslin-Čokić B, Diklić M, Milenković P, Jovčić G. Bradykinin stimulation of nitric oxide production is not sufficient for gamma-globin induction. *Srp Arh Celok Lek* 2014;142(3-4):189–96.
52. Lofvenberg E, Wahlin A. Management of polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and myelofibrosis with hydroxyurea. *Eur J Haematol* 1988;41:375–81.
53. Andreasson B, Swolin B, Kutti J. Hydroxyurea treatment reduces haematopoietic progenitor growth and CD34 positive cells in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2000;64:188–93.
54. Cella G, Marchetti M, Vianello F, Panova-Noeva M, Vignoli A, Russo L, et al. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost* 2010;104(1):151–6.
55. Lahiri P, Chaudhuri U, Chattopadhyay A, Dasgupta AK. Platelet aggregation profile as a marker of hydroxyurea bioavailability through nitric oxide generation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006;47(4):741–6.

56. Gumiero D, Di Gennaro L, Nicolazzi MA, Landolfi R. Hydroxyurea-mediated release of nitric oxide in myeloproliferative neoplasms patients: Effects on platelet-leukocyte interaction. *J Clin Pharmacol* 2015;55(10):1125–30.
57. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2604–9.
58. Subotički T, Mitrović Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, Nienhold R, Diklić M, Djikić D, et al. Angiogenic factors are increased in circulating granulocytes and CD34+ cells of myeloproliferative neoplasms. *Mol Carcinog* 2017;56(2):567–79.
59. Lekovic D, Gotic M, Skoda R, Beleslin-Cokic B, Milic N, Mitrovic-Ajtic O, et al. Bone marrow microvessel density and plasma angiogenic factors in myeloproliferative neoplasms: clinicopathological and molecular correlations. *Ann Hematol* 2017;96(3):393–404.
60. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366(9501):1945–53.
61. Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Santos FD, et al. Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. *Haematologica* 2008;93(11):1723–7.
62. Ricksten A, Palmqvist L, Johansson P, Andreasson B. Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93(8):1260–1.
63. Besses C, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Mojal S, Longaron R, Salar A, et al. Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol* 2011;152(4):413–9.
64. Larsen TS, Pallisgaard N, de Stricker K, Moller MB, Hasselbalch HC. Limited efficacy of hydroxyurea in lowering of the JAK2 V617F allele burden. *Hematology* 2009;14(1):11–5.
65. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 2010;24(9):1574–9.
66. Koren-Michowitz M, Landman J, Cohen Y, Rahimi-Levene N, Salomon O. JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 2012;53(11):2210–3.
67. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2017;92(1):94–108.
68. Verstovsek S, Vannucchi AM, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with

- polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. *Haematologica* 2016;101(7):821-9.
69. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2011;29:761-70.
70. Alvarez-Larran A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response: resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood* 2012;119:1363-9.
71. Nand S, Stock W, Godwin J, Fisher SG. Leukemogenic risk of hydroxyurea therapy in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Am J Hematol* 1996;52(1):42-6.
72. Björkholm M, Derolf AR, Hultcrantz M, Kristinsson SY, Ekstrand C, Goldin LR, et al. Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. *J Clin Oncol* 2011;29(17):2410-5.
73. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93(11):1645-51.
74. Chim CS, Kwong YL, Lie AK, Ma SK, Chan CC, Wong LG, et al. Long-term outcome of 231 patients with essential thrombocythemia: prognostic factors for thrombosis, bleeding, myelofibrosis, and leukemia. *Arch Intern Med* 2005;165(22):2651-8.
75. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27(9):1874-81.
76. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 2005;105(7):2664-70.
77. Nielsen I, Hasselbalch HC. Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan. *Am J Hematol* 2003;74:26-31.
78. Weinfeld A1, Swolin B, Westin J. Acute leukaemia after hydroxyurea therapy in polycythaemia vera and allied disorders: prospective study of efficacy and leukaemogenicity with therapeutic implications. *Eur J Haematol* 1994;52(3):134-9.
79. Gangat N, Strand J, Li CY, Wu W, Pardanani A, Tefferi A. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2007;138(3):354-8.
80. Kiladjian JJ1, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain JD. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol* 2011;29(29):3907-13.

81. Huang J, Li CY, Mesa RA, Wu W, Hanson CA, Pardanani A, et al. Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. *Cancer* 2008;112(12):2726–32.
82. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Gräff A, Hülsemann R, Diehl V. Therapy-related changes of the bone marrow in chronic idiopathic myelofibrosis. *Histol Histopathol* 2004;19(1):239–50.

HYDROXYUREA TREATMENT: FROM INHIBITION IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS TO FETAL HEMOGLOBIN INDUCTION

Vladan P. Čokić

*Laboratory for Molecular Oncology, Institute for Medical Investigations,
University of Belgrade*

Hydroxyurea treatment of patients with sickle-cell disease increases fetal hemoglobin (HbF) that reduces hemoglobin S polymerization and clinical complications. We have shown that nitric oxide (NO) and its receptor soluble guanylate cyclase (sGC) are involved in hydroxyurea induction of HbF levels in erythroid progenitors. Hydroxyurea can directly interact with the deoxy-heme of sGC, via free-radical NO, producing iron-nitrosyl derivatives to activate cGMP production in erythroid cells. Hydroxyurea increases NO production in endothelial cells and macrophages, demonstrating that stimulation of gamma-globin gene expression is also mediated by NO synthase (NOS) induction in stromal cells of the hematopoietic microenvironment. We have demonstrated that hydroxyurea increased NO production in endothelial cells through phosphorylation of endothelial NOS (eNOS) in protein kinase A-dependent manner as a short-term effect and by long term posttranslational augmentation in eNOS protein levels via inhibition of the proteasome activity. Hydroxyurea increased cAMP, cGMP and intracellular calcium levels in endothelial cells, responsible for eNOS activation. These studies established an additional mechanism by which rapid and sustained effects of hydroxyurea may affect cellular NO levels in myeloproliferative neoplasm (MPN). The angiogenic HIF-1 α , VEGF and eNOS protein expression were increased in circulating granulocytes and CD34+ cells of MPN patients, but largely reduced after hydroxyurea therapy. Thus, it appears that the benefit of hydroxyurea therapy can be related to angiogenic factors control in MPN. Overlapping with NO effects supports hydroxyurea cytostatic regulation of prominent hematopoietic cell proliferation in MPN.

Keywords: hydroxyurea, nitric oxide, sickle-cell disease, myeloproliferative neoplasm

Др Владан Чокић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања
Универзитет у Београду
Др Суботића 4
11129 Београд
vl@imi.bg.ac.rs