

Mechanizmy działania cytostatycznego nowych analogów puryn

Anna Szmigielska-Kapłon, Tadeusz Robak

Tematem pracy są mechanizmy działania przeciwnowotworowego nowych leków z grupy analogów puryn: pentostatyny (deoksykoformycyny, DCF), kladrybiny (2-chlorodeoksyadenozyny, 2-CdA) i fludarabiny (FAMP). Pochodne purynowe należą do antymetabolitów. Leki te są wbudowywane w miejsce prawidłowych nukleotydów do łańcucha DNA, zaburzając w ten sposób jego syntezę w komórkach szybko dzielących się. Pentostatyna jest silnym inhibitorem deaminazy adenozynej, głównego enzymu metabolizującego puryny w ustroju. Kladrybina i fludarabina są odporne na działanie tego enzymu, dzięki czemu mogą osiągać wysokie stężenia w komórkach docelowych. Związki te należą do nielicznych leków przeciwnowotworowych, które działają nie tylko na komórki dzielące się, ale także na komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej. Nowe analogi puryn, zaburzając metabolizm komórek o niskiej aktywności mitotycznej, prowadzą do wyczerpania zapasów związków wysokoenergetycznych, co prowadzi do programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. Leki te indukują apoptozę w mechanizmie kontrolowanym przez białko p53 oraz rodzinę białek bcl-2. Fludarabina i kladrybina mają szczególne powinowactwo do komórek limfoidalnych ze względu na ich korzystną konstelację enzymatyczną, co decyduje o ich swoistym działaniu na te komórki i niskiej toksyczności w stosunku do innych tkanek.

Ze względu na swój mechanizm działania nowe analogi puryn znalazły zastosowanie w leczeniu przewlekłych chorób limfoproliferacyjnych, takich jak niezłośliwe chłoniaki o niskim stopniu złośliwości i przewlekła białaczka limfatyczna. Fludarabina i kladrybina zwiększają stężenie w komórkach blastycznych aktywnych metabolitów podstawowego leku stosowanego u chorych na ostrą białaczkę szpikową – arabinozydu cytozyny. Dzięki tej korzystnej interakcji nowe analogi puryn są z powodzeniem łączone z arabinozydem cytozyny u pacjentów z nawrotem białaczki, lub u chorych opornych na standardowo stosowane leczenie.

Mechanisms of cytostatic activity of new purine analogues

The article concerns mechanisms of cytostatic activity of new purine analogues: pentostatin (deoxycoformycin, DCF), cladribine (2-chlorodeoxyadenosine, 2-CdA) and fludarabine (FAMP). Purine analogues act as antymetabolites. The drugs are incorporated instead of natural nucleotides into DNA interfering with its synthesis in rapidly dividing cells. Pentostatin is a potent inhibitor of adenosine deaminase, a key enzyme in purine metabolism. Cladribine and fludarabine are resistant to this enzyme and thus can reach high concentrations in target cells. These drugs are unique chemotherapeutics: they are active not only against dividing cells, but also against resting ones. New purine analogues cause shortage of high-energy compounds that result in programmed cell death, called apoptosis, in cells with low mitotic activity by interfering with their metabolism. Apoptosis triggered by these drugs is controlled by p53 protein and bcl-2 protein family. Fludarabine and cladribine accumulate in lymphoid tissue because of specific enzymes present in lymphocytes. It explains high selectivity of these drugs for lymphocytes and low toxicity in other tissues.

Because of their mechanism of action, new purine analogues are used in treatment of chronic lymphoproliferative disorders, such as low-grade non-Hodgkin lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. Fludarabine and cladribine increase the concentration of active metabolites of basic compound applied in acute myeloblastic leukaemia – arabinoside cytosine – in blast cells. Due to this interaction new purine analogues are successfully combined with cytosine arabinoside in relapsed or refractory to standard chemotherapy patients with acute myeloblastic leukaemia.

Słowa kluczowe: kladrybina, deoksykoformycyna, fludarabina, analogi puryn, mechanizm działania, apoptoza

Key words: cladribine, deoxycoformycin, fludarabine, purine analogues, mechanism of action, apoptosis

Wstęp

Po zaobserwowaniu dużej aktywności cytarabiny rozpoczęto badania nad innymi pochodnymi zawierającymi arabinozę. Arabinozyd adenozy (widarabina) okazał się jednak mało skuteczny [1], przede wszystkim z powodu szybkiej inaktywacji przez deaminazę adenozy (ADA). Jest to kluczowy enzym w szlaku metabolicznym puryn w ustroju. Wrodzony niedobór ADA jest związany z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID) u dzieci, przebiegającym z limfopenią i defektami odpowiedzi komórkowej i humoralnej [2]. ADA katalizuje deaminację adenozy do inozy i deoksyadenozy do deoksyinozy [3].

Wprowadzenie do cząsteczki nukleotydów adeninowych atomu fluorowca powoduje oporność leku na działanie tego enzymu. W ten sposób Montgomery i Hewson zsyntetyzowali 1-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadeninę (fludarabinę, FAMP) (4). Ze względu na lepszą rozpuszczalność lek jest stosowany w postaci 5' monofosforanu. Innym nukleotydem opornym na działanie ADA, jest kladrybina (2-chlorodeoksyadenozyna, 2-CdA), zawierająca atom chloru (5,6). Pentostatyna (deoksykoformycyna, DCF) różni się istotnie mechanizmem działania od FAMP i 2-CdA. Jest ona nieodwracalnym inhibitorem ADA. Początkowe próby kliniczne wykazywały aktywność przeciwnowotworową tego leku, lecz równocześnie dużą toksyczność zwłaszcza po podaniu w wysokich dawkach.

Budowa chemiczna

DCF jest strukturalnym analogiem deoksyadenozy produkowanym przez *Streptomyces antibioticus* i *Aspergillus nidulans*. FAMP jest pochodną adenozy, w której atom wodoru w pozycji 2 pierścienia purynowego zastąpiono atomem fluoru. Resztę cukrową tego nukleozydu stanowi arabinoza zamiast deoksyrybozy. 2-CdA jest analogiem deoksyadenozy, w którym atom wodoru w pozycji 2 pierścienia purynowego zastąpiono atomem chloru. Budowę chemiczną leków przedstawia Rycina 1.

Farmakokinetyka

Losy DCF w ustroju można opisać otwartym modelem dwukompartamentowym. $T_{1/2\alpha}$ wynosi ok. 9 minut, $t_{1/2\beta}$ – ok. 5 godzin. Średnią objętość dystrybucji obliczono na 23 l/m². Lek jest wydalany głównie z moczem, klirens nerkowy wynosi 57 ml/min/m² [7].

Farmakokinetykę FAMP badano po szybkiej infuzji dożylniej w dawce 80–260 mg/m². Losy leku można przedstawić otwartym modelem trójkompartamentowym. $T_{1/2\alpha}$ wynosi 5 min., $t_{1/2\beta}$ – 1,4 h, $t_{1/2\gamma}$ – 10,4h. Średnia objętość dystrybucji wynosi 44,2 l/m². FAMP łatwo przenika do tkanek i w małym stopniu kumuluje się w organizmie. Główną drogą wydalania są nerki, klirens wynosi średnio 67,9 ml/min./m² [8].

Losy 2-CdA opisuje otwarty model trójkompartamentowy. $T_{1/2\alpha}$ wynosi 8 minut, $t_{1/2\beta}$ – 1,2 h, a $t_{1/2\gamma}$ – 6,3h. Czas półtrwania leku w tkankach wynosi 23 h, a objętość

dystrybucji – 9,2 l/kg. Lek jest wydalany przede wszystkim przez nerki [9]. Parametry farmakokinetyczne leków przedstawia Tabela I.

Tab. I. Parametry farmakokinetyczne pentostatyny (DCF), fludarabiny (FAMP) i kladrybiny (2-CdA)

Parametr	DCF	F-ara-A	2-CdA
T _{1/2}	9 min	5 min	8 min
T _{1/2}	5,0 h	1,4 h	1,2 h
T _{1/2}	-	10,4 h	6,3 h
V _d	23 l/m ²	44,2 l/m ²	9,2 l/kg
Cl	57 ml/min/m ²	67,9 ml/min/m ²	-

V_d – średnia objętość dystrybucji

Cl – klirens

FAMP i 2-CdA mają dobrą dostępność po podaniu drogą doustną. Biodostępność 2-CdA wynosi 55% [9], a FAMP – 75% [10]. Stwarza to możliwości stosowania preparatów w bardziej wygodnej dla pacjentów postaci.

Mechanizm działania

Nieodwracalne zahamowanie ADA przez DCF powoduje nadmierne gromadzenie jednego z substratów tego enzymu – 2'deoksyadenozy. Związek ten wchodzi na inny szlak metaboliczny – jest fosforylowany przez kinazę deoksyadenozy do trójfosforanu (dATP). Synteza deoksynukleotydów, substratów niezbędnych do powstania DNA, odbywa się dzięki reduktazie rybonukleotydowej. Nadmiar któregośkolwiek produktu zmniejsza aktywność tego enzymu i hamuje powstawanie wszystkich deoksynukleotydów. Nadmiar dATP, powodowany przez zahamowanie ADA, zmniejsza aktywność reduktazy rybonukleotydowej i w konsekwencji wywołuje niedobór substratów niezbędnych do syntezy DNA. Akumulacja dATP powoduje również zmniejszenie zawartości nukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) w komórce. W wyniku niedoboru NAD dochodzi do zahamowania syntezy ATP, a zmniejszenie jego stężenia powoduje śmierć proliferujących i spoczynkowych limfocytów [11].

2-CdA i FAMP, dzięki wprowadzeniu atomu fluorowca do cząsteczki, są odporne na działanie ADA. Leki te nie są tak szybko jak inne analogi puryn rozkładane przez ten enzym i mogą osiągać wysokie stężenia w komórkach przez długi czas w porównaniu z innymi antymetabolitami. 2-CdA i FAMP ulegają w organizmie przekształceniu do aktywnych metabolitów – 5'trójfosforanów. Oba leki mają szczególne powinowactwo do komórek limfoidalnych, które charakteryzują się dużą aktywnością kinazy cytydylanowej, odpowiedzialnej za ich fosforylację i małą aktywnością 5'nukleotydu [12]. Warunkuje to częściową selektywność obu leków – silne działanie na komórki limfoidalne i stosunkowo niską toksyczność w stosunku do innych tkanek.

Nowe analogi puryn działają cytotoksycznie zarówno na komórki dzielące się, jak i na komórki pozostające w fazie spoczynku. 2-CdA i FAMP, zaburzając równowagę deoksynukleotydów w komórkach oraz obniżając aktyw-

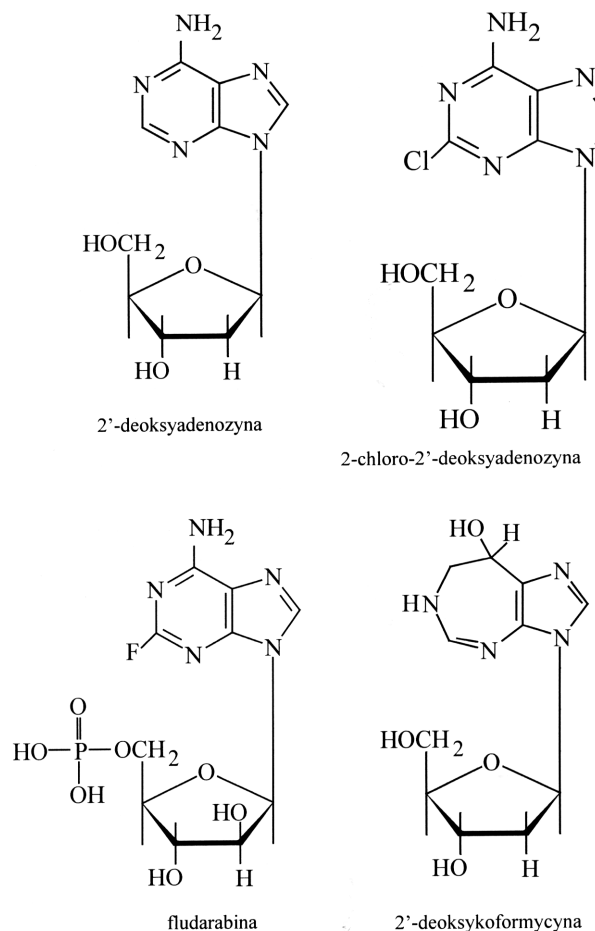
ność reduktazy nukleotydu, hamują syntezę DNA. Nowe analogi puryn są także inhibitorami polimerazy DNA, powodując zmniejszenie wierności replikacji informacji genetycznej. Wbudowywanie obu związków do łańcucha DNA w miejsce prawidłowych nukleotydów powoduje powstawanie błędów w informacji genetycznej, a także jest często sygnałem do zakończenia replikacji. FAMP jest wprowadzana nie tylko do łańcucha DNA, ale także do RNA, hamując jego syntezę [8]. FAMP zaburza procesy replikacji poprzez hamowanie aktywności primazy i ligazy DNA.

Aktywność kinazy deoksycytydylanowej jest regulowana przez poziom deoksynukleotydów, szczególnie dCTP (deoksycytydynotrójfosforan). Obniżenie stężenia dCTP przez inkubację *in vitro* komórek białaczkowych z FAMP zwiększa aktywność tego enzymu. Przyspiesza to fosforylację FAMP i innych substratów kinazy cytydylanowej, np. 2-CdA i arabinozydu cytozyny (Ara-C).

FAMP jest wbudowywany do DNA zamiast dATP. Hamowanie przez fludarabinę reduktazy rybonukleotydu zmniejsza stężenie dATP (deoksadenozynotrójfosforan), z którym FAMP konkuruje o włączenie do DNA. Powoduje to zwiększenie wbudowywania fosforanu fludarabiny do łańcucha DNA [8]. Kladrybina i fludarabina nasilają cytostatyczne działanie cytarabiny. Badania na komórkach białaczki mieloblastycznej wykazały, że zmniejszenie stężenia deoksynukleotydów, spowodowane zahamowaniem działania reduktazy rybonukleotydu przez FAMP, jest związane ze zwiększeniem szybkości fosforylacji Ara-C przez kinazę deoksycytydynową [13]. FAMP podawana przed Ara-C zwiększa akumulację komórkową trójfosforanu arabinozydu cytozyny (Ara-CTP), który jest aktywnym metabolitem [13]. Istnieje związek między zdolnością blastów białaczkowych do magazynowania Ara-CTP, a odpowiedzią na cytarabinę. Wykazano, że podanie FAMP przed Ara-C zwiększa szybkość syntezy Ara-CTP w krążących komórkach białaczkowych.

Nowe analogi puryn, jako jedne z niewielu leków przeciwnowotworowych, działają na komórki pozostające w stanie spoczynku. Dlatego leki te znajdują zastosowanie w przewlekłych chorobach limfoproliferacyjnych, takich jak chłoniaki o niskim stopniu złośliwości oraz przewlekła białaczka limfatyczna (PBL) [15-24]. W nowotworach tych dochodzi do akumulacji dojrzałych komórek limfoidalnych o niskim potencjale proliferacyjnym. W komórkach spoczynkowych analogi puryn indukują proces apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Na skutek zaburzenia równowagi deoksynukleotydów oba leki powodują aktywację endonukleaz i powstawanie licznych pęknięć podwójnej nici DNA. Prowadzi to do nasilenia intensywności procesów naprawczych, wymagających dużej ilości NAD. Wyczerpanie się zapasów tego związku, stanowiącego główną rezerwę energetyczną komórki, prowadzi w efekcie do jej śmierci [25-27].

Apoptoza, którą wywołują analogi puryn, jest indukowana przez układ białka p53, a także białka rodziny bcl-2 [28,29]. P53 jest genem supresorowym, który pełni kluczową rolę w kontrolowaniu apoptozy oraz cyklu komórkowego [30]. Produkt genu p53 – białko p53 oddziałuje



Ryc. 1. Struktura chemiczna 2'-deoksadenozyny, 2-CdA, FAMP i DCF

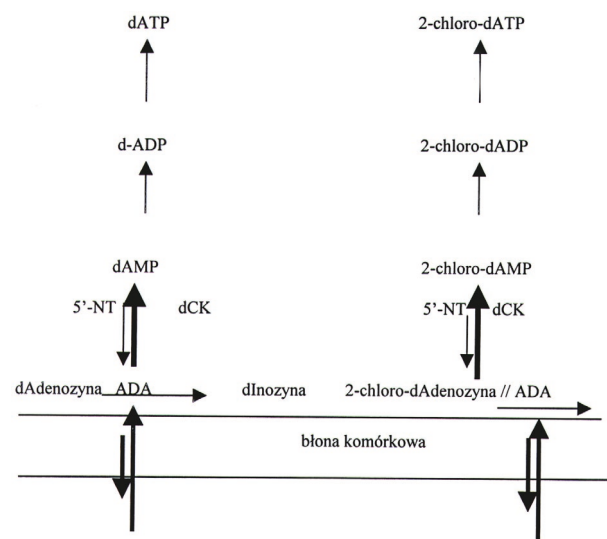
wuje odmiennie na komórki zdrowe i nowotworowe. W komórkach prawidłowych powoduje zablokowanie podziałów komórkowych, a w komórkach nowotworowych indukuje apoptozę. Różne efekty działania białka p53 na komórki prawidłowe i patologiczne warunkują częściową specyficzność wielu leków cytostatycznych. Wzrost poziomu białka p53 wywołuje nasilenie transkrypcji mdm-2 mRNA. Białko mdm-2 łączy się z białkiem p53 i inaktywując je, zmniejsza nasilenie apoptozy. Mechanizm ten stanowi sprzężenie zwrotne kontrolujące proces programowanej śmierci komórki. Podwyższony poziom mdm-2 świadczy o aktywności białka p53 w komórce, nie zaobserwowano natomiast, sugerowanej przez niektórych autorów, oporności na leczenie analogami puryn w przypadkach nadmiernej ekspresji mdm-2 [28].

Mutacje genu p53, częste w nowotworach litych, występują również, choć rzadziej, w nowotworowych chorobach układu krwiotwórczego i wiąże się z dynamicznym przebiegiem choroby, złym rokowaniem i znaczną opornością na leczenie cytostatykami, w tym również analogami puryn [31-34]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że dysfunkcja genu p53 zmniejsza nasilenie apoptozy wywołanej przez analogi puryn, jednak nie hamuje tego procesu całkowicie [35, 36]. Programowana śmierć komórki prawdopodobnie zachodzi przy udziale białka p53, jak również na drodze od niego niezależnej. Pettitt i wsp. [36] sugerują, że oporność na nowe pochodne purynowe

u chorych na PBL, u których występują mutacje genu *p53*, jest związana z powstawaniem klonu lekoopornego na skutek niestabilności genomu, wynikającej z nieprawidłowej funkcji białka *p53*. Uzasadnione jest więc wczesne i intensywne leczenie tych pacjentów nowymi lekami z grupy analogów puryn, aby kontrolować chorobę, zanim rozwinię się lekooporność [36].

Białko *p53* wywołuje apoptozę poprzez wpływ na układ białek rodziny *bcl-2*. *Bcl-2* jest białkiem związanym z błoną komórkową, które poprzez zdolność inaktywacji wolnych rodników oraz wpływ na dystrybucję jonów wapnia, chroni komórki przed śmiercią w procesie apoptozy. Poznano wiele białek podobnych strukturalnie do *bcl-2*. Białka *bcl-xl*, *A1*, *mcl-1* mają regiony BH1-BH4 homologiczne do *bcl-2* i podobnie jak *bcl-2* wydłużają czas przeżycia komórek. Białka *bax*, *bcl-xs*, *bak*, *bok/mtd*, zawierają tylko 2 lub 3 domeny BH i mają działanie proapoptyczne. Białko *bax* ma postać błonową, a także dwie formy cytoplazmatyczne. Tworzy ono z białkiem *bcl-2* połączenia, najprawdopodobniej w formie heterodimerów, lub większych konglomeratów. Stąd ważniejszy jest wzajemny stosunek zawartości *bax* i *bcl-2*, niż bezwzględne wartości stężeń każdego z tych białek w komórce. Jonhston i wsp. [28] nie zaobserwowali zmian aktywności *bax* i *bcl-2* w limfocytach pochodzących od chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną, wrażliwych i opornych na działanie FAMP. Obecność licznych kompleksów *bax* zaobserwowali natomiast Thomas i wsp. [36] u chorych na PBL, leczonych tym środkiem. *Bax* jest odpowiedzialny za wywoływanie typowych dla apoptozy zmian w mitochondriach, np. utraty gradientu elektrochemicznego przez błonę wewnętrzną, co powoduje produkcję wolnych rodników nadtlenkowych [38]. Innym efektem działania *bax* jest wydzielanie cytochromu *c* oraz jonów wapnia z matrix mitochondrialnego do cytozolu. Cytochrom *c* obecny w cytoplazmie powoduje aktywację procesów proteolitycznych i aktywację kaspaz [39].

Główny mechanizm efektorowy apoptozy tworzą specyficzne asparaginazy serynowe – kaspazy. Enzymy te



Ryc. 2. Wewnątrzkomórkowy metabolizm adenozyiny i 2-chlorodeoksyadenozyiny wg Beutlera [2]

zawierają serynę w centrum katalitycznym i powodują proteolizę w miejscu aminokwasu asparaginy. Kaspazy są obecne w komórkach w formie nieczynnych zymogenów, aktywowanych na drodze proteolizy. Część z nich to enzymy o właściwościach autokatalitycznych, np. kaspaza 8 i 9. Są to tzw kaspazy inicjujące, które mają zdolność aktywacji kaspaz efektorowych, odpowiedzialnych za bezpośrednie działania toksyczne w stosunku do organelli komórkowych. Kaspazy efektorowe aktywują również inne enzymy np. czynnik fragmentujący DNA, zwany również DNAzą, aktywowaną przez kaspazy [30].

Białka rodziny *bcl-2*, hamujące apoptozę, uniemożliwiają białku *apaf-1* aktywację kaspazy 9. Śmierć komórki jest indukowana wówczas, gdy białka proapoptyczne np. *bax* łączą się z antyapoptycznymi np. *bcl-2*, zwiększając stężenie wolnego białka *apaf-1*, które może aktywować układ kaspaz [30].

Innym mechanizmem indukcji apoptozy jest zwiększenie ekspresji antygeny CD95, należącego do rodziny receptorów dla czynnika martwicy nowotworów (TNF-R) [39, 40]. Pobudzenie receptora CD95, wywołuje w efekcie autokatalityczną aktywację kaspazy 8. Ta droga indukcji apoptozy, niezależna od białek rodziny *bcl-2*, stanowi jeden z mechanizmów cytotoksycznego działania cytarabiny [40]; jej udział w wywoływaniu procesu apoptozy przez nowe analogi puryn wymaga dalszych badań.

Prof. dr hab. med. Tadeusz Robak

Klinika Hematologii Akademii Medycznej w Łodzi
93-513 Łódź, ul Pabianicka 62
e-mail: robaktad@psk2.am.lodz.pl.

Piśmiennictwo

1. Le Page G A, Khaliq A, Gottlieb J A. Studies of 9D-arabinofuranosyladenine in man. *Drug Metab Dispos* 1973; 1: 756-759.
2. Gibblet E R, Anderson J E, Cohen F i wsp. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *The Lancet* 1972; 2: 1067
3. Van der Weyden M B i Kelley W N. Human adenosine deaminase, distribution and properties. *J Biol Chem* 1976; 251: 5448-5452.
4. Montgomery J A, Hewson K. Nucleosides of 2-fluoroadenine. *J Med Chem* 1969; 12: 498-504.
5. Beutler E. Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *The Lancet* 1992; 340: 952-956.
6. Piro L. 2-Chlorodeoxyadenosine: drug development priorities. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1507-1510.
7. Drzewoski J, Robak T. Farmakologia kliniczna leków przeciwnowotworowych. Warszawa: Nauka; 1991.
8. Plunkett W, Gandhi V, Huang P i wsp. Fludarabine: pharmacokinetics, mechanisms of action and rationales for combination therapies. *Semin Oncol* 1993; 20: 2-12
9. Liliemark J, Juliusson G. On the pharmacokinetics of 2-chlorodeoxyadenosine in humans. *Cancer Res* 1991; 51: 5570-5575.
10. Kemena A, Keating M J, Plunkett W. Plasma and cellular bioavailability of oral fludarabine. *Blood* 1991; 78 (suppl): 52a.
11. Riscoe M K, Brouns M C, Fitch J H. Purine metabolism as a target for leukemia chemotherapy. *Blood rev* 1989; 3: 162-173.
12. Kawasaki H, Carrera C J, Piro L D i wsp. Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 1993; 81: 597-601.

13. Gandhi V, Huang P, Plunkett W. Fludarabine inhibits DNA replication: a rationale for its use in the treatment of acute leukemias. *Leuk Lymph* 1994; 14: 3-9.
14. Gandhi V, Estey E, Keating M J i wsp. Chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in patients with acute myelogenous leukemia: pharmacokinetic, pharmacodynamic and molecular interactions. *Blood* 1996; 87: 256-264.
15. Bergmann L. Present status of purine analogs in the therapy of chronic lymphocytic leukemias. *Leukemia* 1997; 11(suppl2): S29-S34.
16. Robak T, Błoński J Z, Kasznicki M i wsp. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first line therapy in chronic lymphocytic leukemia – report of prospective randomized multicenter trial. *Blood* 2000; 96 (in press).
17. Robak T, Błasińska-Morawiec M, Błoński J Z i wsp. 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) in the treatment of hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant: 7 year experience in Poland. *Eur J Haematol* 1998; 61: 1-8.
18. Robak T, Błoński J Z, Kasznicki M i wsp. Cladribine with or without prednisone in the treatment of previously treated and untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia – updated results of the multicentre study of 378 patients. *Br J Haematol* 2000; 108: 357-368.
19. Kay A C, Saven A, Carrera C J i wsp. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment of low-grade lymphomas. *J Clin Oncol* 1992; 10: 371-377.
20. Keating M J, Kantarjian H, O'Brien S i wsp. Fludarabine: a new agent with marked cytoreductive activity in untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1991; 9: 44-49.
21. Keating M J, O'Brien S, Lerner S i wsp. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; 92 (4): 1165-1171.
22. Hochster H S, Kim K, Green M D i wsp. Activity of fludarabine in previously treated nonHodgkin's low-grade lymphoma: results of an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 28-32.
23. Mercieca J, Matutes E, Dearden C i wsp. The role of pentostatin in the treatment of T-cell malignancies: analysis of response rate in 145 patients according to disease subtype. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2588-2593.
24. Juliusson G i Liliemark J. High complete remission rate from 2-chlorodeoxyadenosine in previously treated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia; response predicted by rapid decrease of blood lymphocyte count. *J Clin Oncol* 1993; 11: 679-689.
25. Robertson L E, Chubb S, Meyn R E i wsp. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chlorodeoxyadenosine and 9D arabinosylfluoroadenine. *Blood* 1993; 81: 143-150.
26. Robertson L E i Plunkett W. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 1993; 11 suppl 12: 71-74.
27. Zinzani P L, Tosi P, Visani G i wsp. Apoptosis induction with three nucleoside analogs on freshly isolated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Am J Haematol* 1994; 47: 301-306.
28. Johnston J B, Daeninck P, Verburg L i wsp. P53,mdm-2,bax and bcl-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 1997; 26: 425-449.
29. Gartenhaus R B, Wang P, Hoffman M i wsp. The induction of p53 and WAF1/CIP1 in chronic lymphocytic leukemia cells treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *J Mol Med* 1996; 74: 143-147.
30. Strasser A. Dr. Josef Steiner cancer research prize lecture: The role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti-cancer therapy. *Int J Cancer* 1999; 81: 505-511.
31. Dohner H, Fischer K, Bentz M i wsp. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-1589.
32. El Rouby S, Thomas A, Costin D i wsp. P53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82: 3452-3459.
33. Lens D, Dyer M J S, Garcia-Marco J M i wsp. P53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997; 99: 848-857.
34. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B i wsp. P53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 3148-3157.
35. Pettitt A R, Sherrington P D i Cawley J C. The effect of p53 dysfunction on purine analogue cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999; 106: 1049-1051.
36. Pettitt A R, Clarke A R, Cawley J C i wsp. Purine analogues kill resting lymphocytes by p53-dependent and -independent mechanisms. *Br J Haematol* 1999; 105: 986-988.
37. Thomas A, El Rouby S, Reed J i wsp. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 mutation and bcl-2 / bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996; 12: 1055-1062.
38. Decaudin D, Geley S, Hirsch T i wsp. Bcl-2 and bcl-xl antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1997; 57: 62-67.
39. Jurgensmeier J M, Xie Z, Deveraux Q i wsp. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4997-5002.
40. Friesen C, Fulda S i K-M Debatin Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 1997; 11: 1833-1841.

Otrzymano: 10 sierpnia 2000 r.

Przyjęto do druku: 18 września 2000 r.