

MAŁGORZATA BALIŃSKA, DOROTA JACEWICZ,
KATARZYNA KACZOROWSKA

Zakład Biochemii Komórki

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

BIOCHEMICZNE PODSTAWY CHEMIOTERAPII NOWOTWORÓW*

Obecny stan wiedzy pozwala na zwalczanie chorób nowotworowych w oparciu o trzy główne metody lecznicze — operacyjną, radioterapię i chemioterapię. Dwie pierwsze metody mają w pewien sposób ograniczony zasięg stosowania i nie mogą być stosowane w zwalczaniu niektórych nowotworów, jak na przykład białaczek. Chemioterapia może być stosowana w leczeniu większości nowotworów jako metoda samodzielna lub w połączeniu z innymi, szczególnie w połączeniu z metodami chirurgicznymi (HILL 1978).

Nowe, rozwijane w kilku ostatnich latach metody, takie jak molekularna immunoterapia (DIETRICH i współaut. 1993) czy terapia genowa (ENG i PONDER 1993, MCCABE 1993, ZAGOŹDŻON i GOŁĄB 1994) budzą ogromne zainteresowanie, jednak dotychczas ich zastosowanie ogranicza się do sporadycznych klinicznych doświadczeń. Żywiłowo rozwijająca się genetyka molekularna stara się zbadać i zrozumieć kaskadę zjawisk prowadzących do takich zmian regulacji procesów podziałowych komórki, w których prawidłowa komórka staje się komórką nowotworową, dzielącą się w sposób szybki i niepohamowany (SAGER 1989, HOLLINGSWORTH i LEE 1991). Dzisiejszy stan wiedzy w tej dziedzinie pozwala ustalić ryzyko zapadania na choroby nowotworowe i możliwość zapobiegania tym chorobom (MARX 1989, STEFFEN 1993), ale lepsze zrozumienie procesów prowadzących do powstania nowotworu zapewne pozwoli na znalezienie w ciągu kilku następnych lat nowych, bardziej skutecznych od dotychczas stosowanych metod terapeutycznych. Do tego czasu chemioterapia będzie metodą powszechnie stosowaną w leczeniu nowotworów, a współcześni badacze, lepiej rozumiejąc mechanizmy działania cytostatyków, będą syntetyzować skuteczniejsze leki.

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 6P20301807.

Podstawowym problemem w rozwoju współczesnej chemioterapii nowotworów jest niemożność znalezienia istotnej, wyraźnej różnicy w procesach biochemicznych pomiędzy komórką prawidłową, a powstającą z niej komórką nowotworową (HARTWELL i KASTAN 1994). Poszukuje się więc leków, które hamowałyby podstawowe procesy komórkowe, takie jak synteza DNA i białek, a także wpływały na regulację tych procesów. Proces poszukiwania, a w zasadzie projektowania (drug design) nowych tego typu leków, jest wysiłkiem zespołowym badaczy z kilku dziedzin: chemii medycznej, farmakologii biochemicznej, chemioterapii eksperymentalnej i klinicznej (MONTGOMERY 1983, PREJEAN i MONTGOMERY 1984).

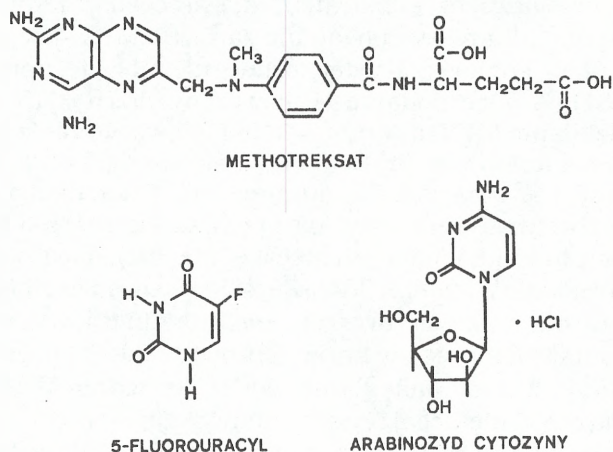
Stosowane w klinice leki przeciwnowotworowe wpływają w różny sposób na podziały komórkowe. Wszystkie leki cytostatyczne oddziałują na różne stadia procesu podziałowego komórki, i to zarówno komórki prawidłowej, jak i nowotworowej. Brak wybiórczego działania cytostatyków stanowi największy problem współczesnej chemioterapii. Rodzi się więc podstawowe pytanie, w jaki sposób zaplanować chemioterapię, aby cytostatyki działały głównie na komórki nowotworowe, a nie komórki prawidłowe (BERTINO 1979). Stąd też we współczesnej chemioterapii stosuje się różnego rodzaju modulacje biochemicznego działania cytostatyków, prowadzące do zwiększenia ich cytotoksycznego efektu w stosunku do komórek nowotworowych i ochronę komórek prawidłowych. Jest to jedno z głównych zadań eksperymentalnej chemioterapii, ponieważ tego typu modulacje danego cytostatyku zależą nie tylko od rodzaju nowotworu, ale jak się wydaje, także od indywidualnego stanu metabolizmu pacjenta. Przedstawienie tego zagadnienia będzie jednym z głównych zadań naszego artykułu. Przy projektowaniu i stosowaniu różnego rodzaju cytostatyków należy pamiętać, że mogą one powodować oporność wielolekową (HARRAP i JACKSON 1978, BECK 1987, RONINSON 1991, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995) i efekty uboczne, na przykład efekty wolnorodnikowe i karcynogenne (MALEC 1989). Trzeba również mieć na uwadze sposoby usuwania nadmiaru cytostatyku (REILLY i WORKMAN 1994) i pory jego podawania (chronofarmakologia) (BELANGER 1993).

Racjonalność w projektowaniu leków związanych z hamowaniem podziałów komórki najprościej można osiągnąć wykorzystując odpowiednie inhibitory enzymów biorących udział w tym procesie. W chwili obecnej jest znanych około 90 reakcji enzymatycznych zaangażowanych w syntezę *de novo* nukleotydów purynowych i pirymidynowych, ich interkonwersję i polimeryzację do kwasów nukleinowych, a także w reakcje tak zwanej drogi ratunkowej (salvage pathway). Z tej grupy enzymów tylko około 16 może być hamowanych przez metaboliczne analogi ich substratów albo produkty reakcji, uznane za związki o działaniu przeciwnowotworowym (anticancer activity) (MONTGOMERY 1983). Z wyjątkiem wczesnych etapów biosyntezy urydylanu, reakcje enzymatyczne prowadzące do powstania RNA lub DNA przebiegają przez kolejne etapy fosforylacji nukleozydów (HEIDELBERGER i współaut. 1983, SHUGAR 1991). Reszta fosforanowa tych związków odgrywa bardzo ważną rolę w ich wiązaniu do miejsc aktywnych enzymów i zmiana strukturalna w tej części cząsteczki powoduje często zahamowanie reakcji syntezy rybo- i dezoksyrybonukleotydów. Stąd też odpowiednie mono-, di- i trifosforany nukleozydów są najbardziej znanymi inhibitorami biosyntezy RNA i DNA. Jednakże związki te w warunkach *in vivo*, w obecności różnych

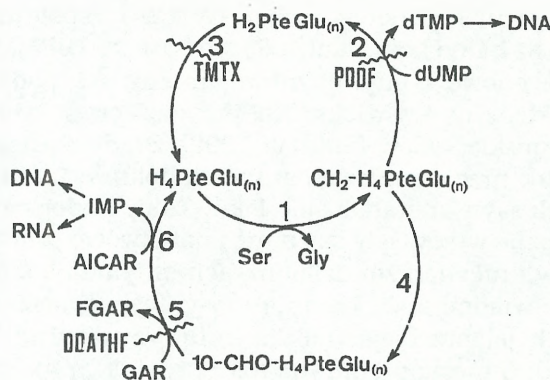
fosfataz, są nietrwałe (ulegają defosforylacji) (WEBER i współaut. 1994), a ponadto nie przechodzą przez błonę komórkową (MONTGOMERY 1983). Z tego też powodu antymetabolity purynowe i pirymidynowe muszą być podawane jako wolne zasady lub też nukleozydy i w większości przypadków są wewnątrzkomórkowo przekształcane do nukleotydów (SHUGAR 1992). Stąd też niezwykle jest istotna modyfikacja w strukturze chemicznej antymetabolitów, która powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowym metabolizmie leku. Takie podejście do chemioterapii jest możliwe wyłącznie wtedy, gdy są znane podstawowe prawidłowości metabolizmu nukleotydów i mechanizm działania ich antymetabolitów. Do antymetabolitów, o których wiadomo, że hamują biosyntezę kwasów nukleinowych na wczesnych etapach jej przebiegu należą: 5-fluorouracyl (5FU), ametopteryna (MTX, metotreksat), 6-merkaptopuryna (6MP) i 1- β -D-arabinozycytryna (araC).

ANTYFOLIANY

MTX (4-amino-10-*N*-metylofolian), najbardziej znany metaboliczny analog folianu (ryc. 1), lek, którego wielokierunkowy mechanizm działania został dokładnie poznany w zasadzie w ostatnich latach, jest stosowany w klinice od prawie 45 lat, szczególnie przy leczeniu wielu typów białaczek i niektórych innych nowotworów (JOLIVET i współaut. 1983). Jest to inhibitor reduktazy dihydrofolianowej (E.C.1.5.1.3) (MATHERLY i współaut. 1983), a jego metabolity powstające wewnątrzkomórkowo (γ -glutamyłowe pochodne MTX) (BALIŃSKA i współaut. 1981), są inhibitorami syntazy tymidylanowej (E.C.2.1.1.45) (synteza tymidylanu) (ALLEGRA, CHABNER i współaut. 1985) i transformylaz rybonukleotydów glicynamidu i aminoimidazolokarboksyamidu (E.C. 2.1.1.21 i E.C. 2.1.1.22) (synteza puryn) (ALLEGRA, DRAKE i współaut. 1985) (ryc. 2). To wielokierunkowe działanie MTX powoduje, że jest to niezwykle silnie działający cytostatyk, hamujący podziały nie tylko szybko dzielących się komórek nowotworowych, ale również dzielących się komórek prawidłowych. Dlatego też od



Ryc. 1. Wzory strukturalne wybranych antymetabolitów.



Ryc. 2. Hamowanie przez antyfoliany aktywności cyklu metabolicznego prowadzącego do syntezy puryn i pirymidyn.

Enzymy: 1. hydroksymetylotransferaza serynowa; 2. syntaza tymidylanowa; 3. reduktaza dihydrofolianowa; 4. wielofunkcyjny enzym o właściwościach dehydrogenazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu, cyklohydrolazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu, syntetazy 10-formylotetrahydrofolianu; 5. formylotransferaza rybonukleotydu glicynamidu; 6. formylotransferaza rybonukleotydu aminoimidazolokarboksyamidu. Substraty i produkty reakcji: $H_2PteGlu_n$, dihydrofolian; $H_4PteGlu_n$, tetrahydrofolian; $CH_2H_4PteGlu_n$, 5,10-metylenotetrahydrofolian; 10-CHO- $H_4PteGlu_n$, 10-formylotetrahydrofolian; GAR, rybonukleotyd glicynamidu; AICAR, rybonukleotyd aminoimidazolokarboksyamidu; IMP, inozynomonofosforan; dUMP, dezoksyrydynomonofosforan; dTMP, dezoksytymidynomonofosforan. f — Oznacza pochodną formylową; glu_n — oznacza ilość reszt glutamylowych w cząsteczce folianu. Inhibitory: TMTX, trimetrexat; PDDF, 10-propargylo-5,8-di-deazaofolian; DDATHF, 5,10-dideazatetrahydrofolian.

wielu lat szuka się sposobów zmniejszenia jego cytotoksycznego działania. Jednym ze sposobów stosowanych od lat w klinice jest podawanie w odpowiednim czasie po MTX — leukoworyny — 5-formylotetrahydrofolianu, zredukowanej formy kwasu foliowego (MATHERLY i współaut. 1983, BOARMAN i współaut. 1990). Związek ten jest transportowany do komórki tą samą drogą co MTX, ulega też glutamylacji (HENDERSON i współaut. 1986), tak jak MTX, przy czym leukoworyna jest lepszym fizjologicznym substratem dla procesu glutamylacji (CICHOWICZ i SHANE 1987). Poliglutamylowe pochodne zarówno MTX, jak i leukoworyny są zatrzymywane przez komórkę i w tej formie nie mogą jej opuszczać (BALIŃSKA i współaut. 1981). A więc podanie leukoworyny przed MTX może zniweczyć cytostatyczne działanie MTX, a w odpowiedniej dawce i czasie po podaniu może zmniejszyć jego cytotoksyczność. Drugim sposobem jest taka modyfikacja cząsteczki MTX, aby nie ulegała ona glutamylacji. Taką modyfikacją może być zablokowanie γ -glutamylowej reszty (na przykład fluoroMTX) (GALIVAN i współaut. 1985) lub zamiana jej na cząsteczkę nie ulegającą γ -glutamylacji (na przykład trimetrexat) (WERBEL 1984). Związki te są dużo słabszymi cytostatykami ze względu na to, że nie tworząc poliglutaminianów nie pozostają długo w komórce, a co najważniejsze nie hamują innych reakcji enzymatycznych o tak kluczowym znaczeniu, tak jak glutamylowe pochodne MTX. Ponadto, przy stosowaniu związków nieulegających glutamylacji, a więc hamujących tylko reduktazę dihydrofolianu, można stosować terapię kilku leków w stężeniach mniej toksycznych niż przy stosowaniu tych leków osobno (BALIŃSKA 1993). I tak

podanie trimetrexatu, hamującego reduktazę dihydrofolianową (ryc. 2), powoduje zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia metylenotetrahydrofolianu, substratu syntazy tymidylanowej (ryc. 2) (RHEE i współaut. 1990); a następnie podanie inhibitora syntazy tymidylanowej, takiego jak pochodna chinazolinowa (PDDF, 10-propargylo-5,8-dideazafolian), wymaga już tylko 6–8-krotnie niższego stężenia niż stosowane, gdy lek jest podany pojedynczo (GALIVAN i współaut. 1987). Efekt ten, nazywany synergizmem działania cytostatyków, jest ostatnio intensywnie badany. Wydaje się, że synergistyczne działanie antymetabolitów powoduje silniejsze działanie leków na szybko dzielące się komórki nowotworowe niż na dzielące się prawidłowe komórki organizmu. Lekami o synergistycznym działaniu są pochodne dideazafolianowe: inhibitor syntazy tymidylanowej — 10-propargylo-5,8-dideazafolian (PDDF) (JONES i współaut. 1981, JACKSON i współaut. 1983) oraz inhibitor transformylaz rybotydów glicynamidu i aminoimidazolokarboksyamidu — 5,10-dideazatetrahydrofolian (DDATHF), które przechodzą pierwsze próby kliniczne (BEARDSLEY i współaut. 1988, BOSCHELLI i współaut. 1988). Głównym więc zadaniem współczesnej eksperymentalnej chemioterapii jest ustalenie właściwej kolejności podawania leków, aby w niższych stężeniach działając synergistycznie powodowały wielokrotnie silniejszy efekt cytostatyczny dla szybko dzielących się komórek nowotworowych niż działając osobno.

FLUOROURACYL

Innym antymetabolitem stosowanym powszechnie w chemioterapii nowotworów jest fluorouracyl (rys. 1), który musi zostać przekształcony wewnątrzkomórkowo w odpowiedni trifosforan, aby osiągnąć swój efekt działania — włączenie do nukleotydu (HEIDELBERGER i współaut. 1983). FUTP może być włączany do RNA (PINEDO i PETERS 1988) — zmieniając jego strukturę wpływa na jego właściwości, między innymi na proces splicing'u (DOONG i DOLNICK 1988). Jako FdUMP jest inhibitorem syntazy tymidylanowej (DANENBERG 1977) i w konsekwencji również inhibitorem syntezy DNA (CANMAN i współaut. 1992, CANMAN i współaut. 1993). Ponadto wydaje się, że stosowanie fluorouracylu pojedynczo jest o wiele mniej korzystne niż w przypadku stosowania kilku leków. Jak było to wspomniane w rozdziale o antyfolianach, jednym z kandydatów do współdziałania z FU jest MTX lub inny inhibitor reduktazy dihydrofolianowej. Bardzo ważną rzeczą jest odpowiednia kolejność stosowania leków. Podanie FU przed MTX powoduje działanie antagonistyczne (BOWEN i współaut. 1978, ULLMAN i współaut. 1978), a podanie najpierw MTX a potem FU wywołuje efekt synergistyczny (CADMAN i współaut. 1981, CADMAN i współaut. 1979). Podobny efekt może wywołać *cis*-platyna (*cis*-diaminodichloroplatin), która zmienia wewnątrzkomórkowy poziom zredukowanych folianów, a więc i jednego z substratów enzymu docelowego — syntazy tymidylanowej (SCANLON i współaut. 1986). Podobne synergistyczne efekty uzyskano stosując FU i cyklofosfamid (silny czynnik alkilujący), choć mechanizm współdziałania jest zupełnie inny i polega prawdopodobnie na zwiększeniu inhibicji syntezy *de novo* lub syntezy reparycyjnej DNA powodując prawdopodobnie szybszą śmierć komórki niż leki stoso-

wane pojedynczo (FERNANDES i KLUBES 1979). Ponadto wydaje się, że podobnie jak przy stosowaniu MTX, działanie FU może być modulowane przez podanie leukoworyny (KEYOMARSI i MORAN 1988, GREM i współaut. 1987, WRIGHT i współaut. 1989). Jednakże mechanizm jest tu inny, ponieważ nadmiar zredukowanych pochodnych folianowych (w tym substratu syntazy tymidylanowej), pochodzący z leukoworyny, tworzy w obecności FdUMP (pochodnej FU) stabilny kompleks trójcząsteczkowy z syntazą tymidylanową— enzym-substrat-inhibitor — powodując zwiększenie inhibicji enzymu o około 30%. Stąd też leukoworynę podaje się jednocześnie z FU, lub też natychmiast po podaniu FU.

AraC (9- β -ARABINOFURANOSYLCYTOZYNA)

AraC jest to analog pirymidyny (rys. 1), który, występując w komórce w formie aktywnej jako araCTP, powoduje inhibicję reduktazy dwufosfonukleozydów i jest włączany do DNA. Na tym, jak wydaje się, polega jego główne działanie (WHITE i współaut. 1987). Ponadto może on być w komórce dezaminowany do araU, co powoduje inaktywację jego własności cytostatycznych (CHOU i współaut., 1975). Stąd też poszukuje się odpowiednich modyfikacji cząsteczki araC, tak, aby nie ulegała ona dezaminacji. Najbardziej obiecującym jest 2'2'-dwufluorodezoksy-cytydina (gemcibina) — związek stabilny i mający już swoje kliniczne zastosowanie (HERTEL i współaut. 1990).

6-MERKAPTOPURYNA (GMP)

6-Merkaptopuryna jest związkiem stosowanym w klinice od 1953 roku. Mechanizm jego działania polega na blokowaniu biosyntezy rybonukleotydów i włączaniu się do DNA (LENNARD 1992). Związek ten jest stosowany ostatnio z 6-tioguanidyną, która nie tylko włącza się do DNA (hamując proces replikacji), ale prawdopodobnie blokuje też syntezę tRNA (MORGAN i współaut. 1994). Związek ten stosowany wraz z MTX daje efekt synergistyczny poprzez zwielokrotniony efekt zahamowania syntezy puryn (BÖKKERINK i współaut. 1986). Stosuje się również pochodne adenozyne, których działanie jest oparte na inhibicji reduktazy nukleotydów, polimerazy DNA lub też włączaniu do DNA (CHESON 1992). W aktywacji proleku wewnątrz komórki bierze także udział kinaza dezoksyicykliny.

Opisane powyżej antymetabolity nie mają prawdopodobnie efektów karcynogennych w przeciwieństwie do związków alkilujących. Dlatego związki te i ich biochemicznie zmodyfikowane analogi budzą szerokie zainteresowanie.

Oprócz dotychczas omówionych związków stosuje się również interferon w połączeniu z FU i MTX. Przypuszczalnie może on działać jako związek wzmacniający inhibicję syntazy tymidylanowej lub też, co jest bardziej prawdopodobne, jako inhibitor dehydrogenazy dihydropirymidynowej w jednojądrowych komórkach krwi obwodowej hamując w ten sposób uwalnianie FU z komórek (YEE i współaut. 1992). Innym związkiem jest dwupyridamol, który hamuje transport nukleozydów i ich inhibitorów, powodując w wielu przypad-

kach (MTX, FU, araC) (NELSON i DRAKE 1984, GREM i FISHER 1989, CHAN 1989) zahamowanie transportu nukleotydów potrzebnych do uruchomienia drogi ratunkowej.

Poszukuje się nowych antymetabolitów, które poprzez specjalne podawanie z różnymi związkami, w różnym reżimie terapeutycznym, mogą powodować efekty synergistyczne. Wydaje się, że to działanie będzie główną strategią chemioterapii w przyszłości. Klinicyści muszą jednak pamiętać, że dawki leków należy podawać pacjentom w sposób indywidualny w zależności od rodzaju nowotworu, poziomu określonego metabolitu w tkankach pacjenta i efektów ubocznych spowodowanych stosowaniem tych cytostatyków.

EXPERIMENTAL BASIS OF CANCER CHEMOTHERAPY

Summary

The use of anticancer drugs interacting with synthesis of RNA, DNA and protein precursors is briefly discussed. The selectivity of these drugs can be enhanced by biochemical modulations involving pharmacological manipulation of intracellular drug metabolism pathways. This rational approach to cancer chemotherapy has been made possible thanks to the knowledge of normal nucleotide metabolism and mechanisms of action of anticancer drugs, including: 5-fluorouracil, methotrexate, 6-mercaptopurine and 1 β -arabinofuranosylcytosine.

LITERATURA

- ALLEGRA C. J., CHABNER B. A., DRAKE J. C., LUTZ R., ROBBARD D., JOLIVET J., 1985. *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J. Biol. Chem. 260, 9720-9726.
- ALLEGRA C. J., DRAKE J. C., JOLIVET J., CHABNER B. A., 1985. *Inhibition of phosphoribozyl-aminoimidazol-carboxyimide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4881-4885.
- BALIŃSKA M., 1993. *Synergistic cell growth inhibition by combination of antifolates*. Acta Biochim. Polon. 40, 369-373.
- BALIŃSKA M., GALIVAN J., COWARD J. K., 1981. *Efflux of methotrexate and its polyglutamates from hepatic cells in vitro*. Cancer Res. 41, 2751-2756.
- BEARDSLEY G. P., MOROSON B. A., TAYLOR E. C., MORAN R. G., 1988. *A new folate antimetabolite 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate is a potent inhibitor of de novo purine biosynthesis*. J. Biol. Chem. 264, 328-333.
- BECK W. T., 1987. *The Biology of multiple drug resistance*. Biochem. Pharmacol. 36, 2879-2887.
- BELANGER P. M., 1993. *Chronopharmacology in drug research and therapy*. Adv. Drug Res. 24, 1-80.
- BERTINO J. R., 1979. *Toward improved selectivity in cancer chemotherapy: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture*. Cancer Res. 39, 293-304.
- BOARMAN D. M., BARAM J., ALLEGRA C. J., 1990. *Mechanism of leucovorin reversal of methotrexate cytotoxicity in human MCF-7 breast cancer cells*. Biochem. Pharmacol. 40, 2651-2660.
- BÖKKERINK J. P. M., BAKKER M. A. H., HULSCHER T. W., i inni, 1986. *Sequence-, time and dose-dependent synergism of methotrexate and 6-mercaptopurine in malignant human T-lymphoblasts*. Biochem. Pharmacol. 35, 3549-3555.
- BOSCHELLI D. H., WEBBER S., WHITELEY J. M., ORONSKY A. L., KERWAR S. S., 1988. *Synthesis and biological properties of 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid*. Arch. Biochem. Biophys. 265, 43-49.
- BOWEN D., WHITE C. J., GOLDMAN J. D., 1978. *A Basis of fluoropyrimidine induced antagonism to methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro*. Cancer Res. 38, 219-222.
- CADMAN E., BENZ C., HEIMER R., O'SHAUGHNESSY J., 1981. *Effect of de novo purine synthesis inhibitors on 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity*. 30, 2469-2472.
- CADMAN E., HEIMER R., DAVIS L., 1979. *Enhanced 5-fluorouracil nucleotide formation after methotrexate administration: explanation for drug synergism*. Science 205, 1135-1137.

- CANMAN C. E., LAWRENCE T. S., SHEWACH D. S., TANG H. -Y., MAYBAUM J., 1993. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res*, 53, 5219-5224.
- CANMAN C. E., TANG H.-Y., NORMOLLE D. P., LAWRENCE T. S., MAYBAUM J., 1992. Variation in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine — implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10474-10478.
- CHAN T. C. K., 1989. Augmentation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine cytotoxicity in human tumor cells by inhibiting drug efflux. *Cancer Res.* 49, 2656-2660.
- CHESON B. D., 1992. The purine analogs — a therapeutic beauty contest. *J. Clin. Oncol.* 10, 352-355.
- CHOU T. C., HUTCHINSON D. J., SCHMID F. A., 1975. Metabolism and selective effects of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in L1210 and host tissues *in vitro*. *Cancer Res.* 35, 225-236.
- CICHOWICZ D. J., SHANE B., 1987. Mammalian folylpoly- γ -glutamate synthetase. Substrate specificity and kinetic properties. *Biochemistry* 26, 513-521.
- DANENBERG P. V., 1977. Thymidylate synthetase — a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 473, 73-93.
- DIETRICH P. Y., FARACE F., CAIGNARD A., ESCUDIER B., TRIEBEL F., 1993. Immunotherapy of cancer — current developments and future strategies. *Bull. Cancer* 80, 584-600.
- DOONG S.-L., DOLNICK B. J., 1988. 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 263, 4467-4473.
- ENG C., PONDER B. A. J., 1993. The role of gene mutation in the genesis of familial cancers. *FASEB J.* 7, 910-919.
- FERNANDES D. J., KLUBES P., 1979. A Biochemical and pharmacological study of therapeutic synergism with 5-fluorouracil plus cyclophosphamide in murine L1210 leukemia. *Cancer Res.* 39, 1396-1404.
- GALIVAN J., INGLESE J., MCGUIRE J. J., NIMEC Z., COWARD J. K., 1985. γ Fluoromethotrexate: synthesis and biological activity of a potent inhibitor of dihydrofolate reductase with greatly diminished ability to form poly- γ glutamates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2598-2602.
- GALIVAN J., NIMEC Z., RHEE M., 1987. Synergistic growth inhibition of rat hepatoma cells exposed *in vitro* to N10-propargyl-5,8-dideazafolate with methotrexate and the lipophilic antifolates trimetrexate or metoprin. *Cancer Res.* 47, 5256-5260.
- GREM J. L., FISHER P. H., 1989. Enhancement of 5-fluorouracil anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol. Therapeut.* 40, 349-371.
- GREM J. L., HOTH O. F., HAMILTON J. M., KING S. A., LEYLAND-JONES B., 1987. Overview of current status and future direction of clinical trials with 5-fluorouracil with combination with folinic acid. *Cancer Treat. Rep.* 71, 1249-1264.
- HARRAP K. R., JACKSON R. C., 1978. Biochemical mechanisms of resistance to antimetabolites. [W:] *Antibiotics and Chemotherapy*, (red.) SCHÖNFELD, H., KRAGEN S., Basel, 228-237.
- HARTWELL L. H., KASTAN M. B., 1994. Cell cycle control and cancer. *Science*, 260, 1821-1827.
- HEILDELBERGER C., DANENBERG P. V., MORAN R. G., 1983. Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. *Adv. Enzymol.*, 54, 57-119.
- HENDERSON G. B., SURESH M. R., VITOLS K. S., HUNNEKENS F. M., 1986. Transport of folate compounds in L1210: kinetic evidence that folate influx proceeds via high-affinity transport system for 5-methyltetrahydrofolate and methotrexate. *Cancer Res.* 46, 1639-1643.
- HERTEL L. W., BODER G. B., KROIN J. S., RINZEL S. M., POORE G. A., TODD G. C., GRINDEY G. B., 1990. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* 50, 4417-4422.
- HILL B. T., 1978. The relevance of certain concepts of cell cycle kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 389-417.
- HOLLINGSWORTH R. E., LEE W. H., 1991. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 91-96.
- JACKSON R. C., JACKMAN A. L., CALVERT A. H., 1983. Biochemical effects of quinazoline inhibitor of thymidylate synthase, N-(4N-((2-amino-4-hydroxy-6-quinazolinyl)methyl)prop-2-ynylamino)benzoyl-L-glutamic acid (CB37-17) on human lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.* 24, 3783-3790.
- JOLIVET J., COWAN K. H., CURT G. A., CLENDENIN N. J., CHABNER B. A., 1983. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 292, 1094-1104.

- JONES T. R., CALVERT A. H., JACKMAN A. L., BROWN S. J., HARRAP K. R., 1981. *A potent antitumor quinazoline inhibitor of thymidylate synthase: synthesis, biological properties and therapeutic results in mice.* Eur. J. Cancer 17, 11-19.
- KEYOMARSI K., MORAN R. G., 1988. *Mechanism of the cytotoxic synergism of fluoropyrimidines and folinic acid in mouse leukemic cells.* J. Biol. Chem. 263, 14402-14409.
- LENNARD L., 1992. *The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine.* Eur. J. Clin. Pharmacol. 43, 329-339.
- MALEC J., 1989. *Role rodników tlenowych i antyoksydantów w ubocznej toksyczności chemioterapii nowotworowej oraz próby jej zapobiegania.* Wiad. Lekarskie 42, 19-21.
- MARX J., 1989. *Many gene changes found in cancer.* Science 246, 1386-1388.
- MATHERLY L. H., TRY D. G., GOLDMAN I. D., 1983. *Role of MTX polyglutamation and cellular metabolism in inhibition of methotrexate binding to dihydrofolate reductase by 5-formyltetrahydrofolate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro.* Cancer Res. 43, 2694-2699.
- MCCABE E. R. B., 1993. *Clinical application of gene therapy: emerging opportunities and current limitation.* Biochem. Med. Metabol. Biol. 50, 241-253.
- MONTGOMERY J. A., 1983. *Introduction: cancer chemotherapy and the medicinal chemist.* [W:] *Development of Target-Oriented Anticancer Drugs*, (red.) CHENG Y. -C. i inni, Raven Press, New York.
- MORGAN C. J., CHAWDRY R. N., SMITH A. R., SIRAVO-SAGRAVES G., TREWYN R. W., 1994. *6-Thioguanine-induced growth arrest in 6-mercaptopurine-resistant human leukemia cells.* Cancer Res. 54, 5387-5393.
- NELSON J. A., DRAKE S., 1984. *Potentiation of methotrexate toxicity by dipyridamole.* Cancer Res. 44, 2493-2496.
- PINEDO H. M., PETERS G. J., 1988. *5-Fluorouracil: biochemistry and pharmacology.* J. Clin. Oncol. 6, 1653-1664.
- PREJEAN J. D., MONTGOMERY J. A., 1984. *Structure-activity relationships in the carcinogenicity of anticancer agents.* Drug Metabolism Rev. 15, 619-646.
- REILLY J. J., WORKMAN P., 1994. *Is body composition an important variable in the pharmacokinetics of anticancer drug?* Cancer Chemother. Pharmacol. 34, 3-13.
- RHEE M. S., BALIŃSKA M., BUNNI M., PRIEST D. G., MALEY G. F., MALEY F., GALIVAN J., 1990. *Role of substrate depletion in the inhibition of thymidylate biosynthesis by dihydrofolate reductase inhibitor trimetrexate in cultured hepatoma cells.* Cancer Res. 50, 3979-3984.
- RONINSON I. B., 1991. *P-Glycoprotein-mediated drug resistance: puzzles and perspectives.* [W:] *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, (red.) RONINSON I. B., Plenum Publ. Co, New York, 395-402.
- SAGER R., 1989. *Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise.* Science 246, 1406-1412.
- SCANLON K. J., NEWMAN E. M., LU Y., PRIEST D. G., 1986. *Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 8923-8925.
- SHUGAR D., 1992. *Phosphorylating enzymes involved in activation of chemotherapeutic nucleosides and nucleotides.* [W:] *Molecular Aspects of Chemotherapy, Proceedings of the Third International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy*, (red.) D. SHUGAR, W. RODE, E. BOROWSKI, Springer-Verlag-PWN, 239-270.
- STEFFEN J., 1993. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych.* Nowotwory 43, 279-297.
- ULLMAN B., LEE M., MARTIN D. W., SANTI D. V., 1978. *Cytotoxicity of 5-fluoro-2-deoxyuridine: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 980-983.
- WEBER G., HATA Y., PRAJDAN., 1994. *Role of differentiation induction in action of purine antimetabolites.* Pharmacology World Sci. 16, 77-87.
- WERBEL L., 1984. *Design and synthesis of lipophilic antifolates as cancer agents.* W: *Folate Antagonists as Therapeutic Agents*, (red.) SIROTNIAK F. M., BURCHALL, J. J., ENSMINGER W. B., MONTGOMERY J. A., tom 1, Academic Press, Orlando, Florida, 261-290.
- WHITE J. C., RATHMEL J. M., CAPIZZI R. L., 1987. *Membrane transport influences of rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells.* J. Clin. Invest. 79, 380-387.
- WRIGHT J. E., DREYFUSS A., EL-MAGHARBEL I., TRITES D., JONES S. M., HOLDEN S. A., ROSOWSKY A., FREI III E., 1989. *Selective expansion of 5,10-methylenetetrahydrofolate pools and modulation of 5-fluorouracil antitumor activity by leucovorin in vivo.* Cancer Res. 49, 2592-2596.

- YEE L. K., ALLEGRA C. J., STEINBERG S. M., GREM J. L., 1992. *Decreased catabolism of fluorouracil in peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with fluorouracil, leukovorin, and interferon alpha-2a*. J. Natl. Cancer Inst. 84, 1820-1825.
- ZAGOŹDŻON R., GOŁĄB J., 1994. *Terapia genowa w leczeniu nowotworów*. Post. Biochem. Kom. 21, 409-429.