

Received: 2012.10.17  
Accepted: 2013.07.22  
Published: 2013.12.10

## Klasyczne oksazafosforinany – metabolizm i właściwości terapeutyczne – nowe implikacje

### Classical oxazaphosphorines – metabolism and therapeutic properties – new implications

Anna Sloderbach<sup>1</sup>, Agnieszka Górska<sup>1</sup>, Marta Sikorska<sup>1</sup>, Konrad Misiura<sup>2</sup>, Bogusław Hładon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

#### Streszczenie

Cyklofosfamid (CPA) i ifosfamid (IFO) należą do leków oksazafosforinowych i są od ponad kilkudziesięciu lat powszechnie stosowane w leczeniu zarówno guzów litych, jak i chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Oba leki są podawane w nieczynnej farmakologicznie postaci transportowej i wymagają metabolicznej aktywacji z udziałem cytochromu P-450 (CYP). Przemiany metaboliczne zachodzące z udziałem odpowiednich izoenzymów CYP prowadzą do powstania istotnych terapeutycznie metabolitów oraz związków toksycznych wpływających na jakość terapii. Pierwszy etap przemian jest związany z hydroksylacją atomu węgla w pierścieniu w pozycji C-4 i atomów węgla C-1 w dwóch 2-chloroetylowych łańcuchach bocznych. W wyniku hydroksylacji węgla C-4 powstają 4-hydroksypochodne (4-OH-CPA i 4-OH-IFO) pozostające w równowadze tautomerycznej z postaciami aldo, które w komórkach nowotworowych ulegają samorzutnemu rozpadowi do cytotoksycznych iperytów fosforoamidowych i urotoksycznej akroleiny. Natomiast powstałe w wyniku hydroksylacji łańcuchów bocznych związki hydroksychloroetylowe są nietrwale i rozpadają się wytwarzając m.in. nefro- i neurotoksyczny chloroacetaldehyd (CAA). Ze względu na pulę tworzących się metabolitów toksycznych konieczne jest stosowanie podczas terapii odpowiednich środków prewencyjnych np. mesny oraz badanej obecnie agmatyny. Mimo że CPA i IFO są lekami często wykorzystywanymi w leczeniu onkologicznym, to ich zastosowanie jest ograniczone nie tylko toksycznością, ale także występującą na nie opornością. Oporność na oksazafosforinany wynika m.in. ze zmian w ekspresji i aktywności enzymów CYP, dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) oraz ze zwiększonego poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) i S-transferazy glutationowej (GST). Obecnie badanych jest kilka sposobów zwalczania tej oporności, w tym stosowanie modulatorów metabolizmu, antysensowych oligonukleotydów wybiórczo hamujących ekspresję genów oraz wprowadzanie genów izoenzymów CYP do tkanki nowotworowej.

**Słowa kluczowe:** aktywność cytotoksyczna • leki alkilujące • oksazafosforinany • pochodne izofosforamidu iperytowego

#### Summary

Cyclophosphamide (CPA) and ifosfamide (IFO) belong to oxazaphosphorine drugs and for a few decades have been widely used for treatment of solid tumours and haematological malignancies. Both drugs are administered in pharmacologically inactive form and require metabolic activation by cytochrome P-450 (CYP). Metabolic transformations taking place under the action of specific CYP isoenzymes lead to the formation of therapeutically essential metabolites and some toxic compounds affecting quality of therapy. The first stage of these conversions is connected with hydroxylation reactions occurring on the C-4 carbon atom

within a ring and C-1 atoms of 2-chloroethyl chains. As a result of C-4 hydroxylation 4-hydroxy derivatives (4-OH-CPA and 4-OH-IFO) are formed and remain in tautomeric equilibrium with aldo compounds which in cancer cells spontaneously release cytotoxic phosphoramidate mustards and urotoxic acrolein. At the same time hydroxychloroethyl compounds formed during hydroxylation of side-chains are unstable and collapse with the release of inter alia nephro- and neurotoxic chloroacetaldehyde (CAA). Due to formation of toxic metabolites it is essential to use some preventive agents such as mesna and recently examined agmatine. Since CPA and IFO are widely used anticancer drugs, their efficacy is limited not only by their toxicity but also due to occurring resistance. This resistance seems to be a result of changes of expression and activity of enzymes such as CYP and aldehyde dehydrogenase (ALDH) and increase of intracellular levels of glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST). At present a few methods of overcoming this resistance are being examined including the use of metabolism modulators, antisense oligonucleotides selectively inhibiting gene expression, and introducing genes of some CYP isoenzymes to a cancer tissue.

**Keywords:** cytotoxic activity • alkylating drugs • oxazaphosphorines • isophosphoramidate mustard derivatives

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1079389>

**Word count:** 5833  
**Tables:** –  
**Figures:** 8  
**References:** 120

**Adres autorki:** dr n. farm. Anna Sloderbach, Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz; e-mail: as@cm.umk.pl

**Wykaz skrótów:** **A549** – linia komórek niedrobnokomórkowego raka płuc, **ADH** – dehydrogenaza alkoholowa, **AGM** – agmatyna, **ALDH** – dehydrogenaza aldehydowa, **AIF** – czynnik indukujący apoptozę, **AKR1** – aldo-keto reduktaza, **ANT** – translokaza nukleotydów adeninowych, **AP-1** – kompleks białkowy (activator protein 1), **AQDQ** – podjednostka kompleksu C-I, **BRP** – obwodowy receptor dla benzodiazepin, **BSO** – butioninosulfoksimina, **C-I** – kompleks I łańcucha oddechowego: oksydoreduktaza NADH:ubichinon, **C-II** – kompleks II łańcucha oddechowego: oksydoreduktaza bursztynian: ubichinon, **C-III** – kompleks III łańcucha oddechowego: oksydoreduktaza ubichinon:cytochrom c, **C-IV** – kompleks IV łańcucha oddechowego: oksydaza cytochromu c, **C-V** – kompleks V łańcucha oddechowego: syntaza ATP, **C16C2** – ester etylowy O-heksadecylo-γ-glutamyl-5-benzylcysteinylofenyloglicyny, **CAA** – aldehyd chlorooctowy, **CAR** – konstytutywny receptor androstanu, **CEPM** – iperyt O-karboksyetylocyklofosfamidu, **CoA** – koenzym A, **CPA** – cyklofosfamid, **CYP** – izoenzym cytochromu P450, **Cph.D** – cyklofilina D, **2-DCE** – 2-dechloroetylofosfamid, **3-DCE** – 3-dechloroetylofosfamid, **EMT-6** – myszy model z nowotworem piersi opornym na leki alkilujące, **Fas L9** – ligand dla receptora śmierci (Fas Ligand), **GR** – receptor glikokortykosteroidów, **GSH** – glutation, **GST** – transferaza S-glutationowa, **GSTP1** – inhibitor transferazy glutationowej, **HNF-4-α** – czynnik transkrypcyjny 4 (hepatic nuclear factor 4), **HuCC1** – linia komórek raka dróg żółciowych, **IFO** – ifosfamid, **IL-1β** – interleukina 1, **IAP** – białka z rodziny inhibitorów apoptozy, **iNOS** – indukowalna syntaza tlenu azotu, **iPAM** – iperyt izofosforoamidowy, **K562** – linia komórek białaczki, **9L** – linia komórek glejakomięsaka, **L1210** – linia komórek mysiej białaczki, **LLC-PK1** – linia komórek epitelialnych, **MAO** – monoaminooksydaza, **MCF-7** – linia komórek ludzkiego raka piersi, **MetXia** – rekombinowany retrowirusowy wektor kodujący ludzki gen CYP2B6, **MFO** – mafosfamid, **MGMT** – metylotransferaza metyloguaninowa, **MPTP** – kanał mitochondrialny (mitochondrial permeability transition pore), **MRP** – białka oporności wielolekowej, **NAD<sup>+</sup>** – dinukleotyd nikotynamidoadeniny, **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), **NK** – komórki układu odpornościowego (natural killer), **4-OH-CPA** – 4-hydroksycyklofosfamid, **4-OH-IFO** – 4-hydroksyifosfamid, **P388** – linia komórek białaczki, **P450** – cytochrom P-450, **PARP** – enzym naprawczy polimeraza poly(ADP-ribozy), **PAM** – iperyt fosforoamidowy, **PXR** – receptor X pregnanu, **R-CHOP** – rytuksymab – cyklofosfamid/doksorubicyna/winkrystyna/prednison, **ROS** – reaktywna forma tlenu, **SBF** – S-bromofosfamid, **SCMC** – S-karboksymetylocysteina, **TDGA** – kwas tioglikolowy, **TFO** – trofosfamid, **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor), **Treg** – limfocyty T-regulatorowe, **VDAC** – kanał anionowy zależny od napięcia (voltage dependent anion channel).

## WSTĘP

Cyklofosfamid (CPA), ifosfamid (IFO) oraz trofosfamid (TFO) są alkilującymi lekami przeciwnowotworowymi i należą do grupy oksazafosforinanów. Aktywność przeciwnowotworową CPA stwierdzono już w latach pięćdziesiątych ub.w. IFO zsyntetyzowano w połowie lat 60, a do praktyki klinicznej został wprowadzony w 1970 r. [57,120]. W tym samym czasie odkryto TFO, ale ze względu na jego lipofilowy charakter opracowano tylko postać do podawania doustnego, która wykorzystywana jest w leczeniu chorych paliatywnych w niektórych nowotworach [85]. Lekiem zakwalifikowanym do cytostatyków alkilujących z grupy oksazafosforinanów jest również sulfonian 4-tioetano-CPA – mafosfamid (MFO). MFO jest pochodną CPA niewymagającą wątrobowej aktywacji, bowiem jego cytotoksyczność jest konsekwencją spontanicznej hydrolizy w płynach ustrojowych i komórkach nowotworowych, która prowadzi do uwolnienia aktywnych metabolitów [57,120]. Ważnym wydarzeniem w historii polskiej syntezy środków leczniczych było otrzymanie w latach 70 XX w. w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi enancjomerów CPA, IFO i TFO, a w latach 80 analogów strukturalnych IFO zmodyfikowanych w podstawniku 2-chloroetylowym. Badania farmakologiczne stereoizomerów tych analogów doprowadziły do wyselekcjonowania najbardziej aktywnego związku (S)-(-)-3-(2-bromoetylo)-2-chloroetyloamino-1,3,2-oksazafosforinanu (S-bromofosfamid, SBF), który został zakwalifikowany do badań klinicznych [12,17,24,39,49,50,97,102,103], podsumowanych już wcześniej [68,69].

Mimo poszukiwania ciągle nowych analogów z tej grupy w praktyce klinicznej nadal wykorzystuje się przede wszystkim CPA i IFO. CPA stosowany jest w leczeniu nowotworów piersi, płuc, prostaty, macicy i jajnika [24,57,119]. Często wykorzystywany jest w połączeniu z metotreksatem, 5-fluorouracylem, docetakselem i epirubicyną w terapii adiuwantowej raka piersi [24,37,57,119]. Znalazł też zastosowanie w leczeniu chłoniaków, szpiczaka mnogiego i ostrej białaczki limfoblastycznej [24,57,119]. Stosowany jest również jako lek immunosupresyjny w niektórych chorobach autoimmunologicznych w tym w układowym toczniu rumieniowatym i reumatoidalnym zapaleniu stawów [40,41,57,73].

Z kolei IFO wykazuje aktywność przeciwnowotworową w leczeniu drobno- i niedrobnokomórkowego raka płuc, raka piersi, jajnika, pęcherza moczowego, szyjki macicy, kostniakomięsaka, nerwiaka, szpiczaka mnogiego, białaczek i chłoniaków. Stosowany jest zarówno w monoterapii jak i z cytostatykami z grupy antymetabolitów, taksanów, epipodofilotoksyny, antybiotyków antracyklinowych, pochodnych platyny i z L-asparaginazą [24,35,55,70,80,114,120]. Oba leki wymagają metabolicznej transformacji do cytotoksycznych iperytów odpowiedzialnych za efekt terapeutyczny z jednoczesnym formowaniem metabolitów wywierających działanie urotoksyczne, neurotoksyczne i nefrotoksyczne [24,57].

W pracy zanalizowano czynniki odpowiedzialne za mechanizmy toksyczności, które w sposób istotny wpływają na jakość leczenia i komfort pacjenta; również czynniki odpowiedzialne za powstawanie oporności na oksazafosforinany z możliwościami jej zmniejszenia. Omówiono również elementy mechanizmu apoptozy związane ze stosowaniem tych leków i ich efektywność.

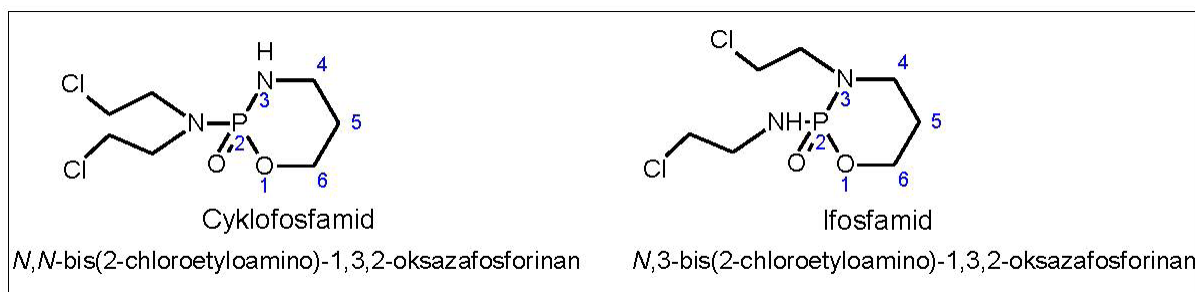
## KLASYCZNE OKSAZAFOSFORINANY

Do klasycznych, powszechnie klinicznie stosowanych oksazafosforinanów należą CPA i IFO (ryc. 1). Są one podawane w nieczynnej farmakologicznie postaci transportowej, która ulega aktywacji pod wpływem mikrosomalnych enzymów wątrobowych [57,120].

### Metabolizm i mechanizm działania oksazafosforinanów

#### Metabolizm CPA

Oksazafosforinany są prolekami i do działania wymagają metabolicznej aktywacji z udziałem wątrobowego systemu cytochromu P450/CYP. Izoformy klasy CYP2B6, CYP3A4, CYP2C9, CYP2A6, CYP2C8 i CYP2C19 katalizują reakcję hydroksylacji CPA w pozycji 4 pierścienia. Prawie 45% transformacji CPA w pochodną 4-OH-CPA zachodzi z udziałem CYP2B6, a 25 i 12% odpowiednio z udziałem CYP3A4 i CYP2C9. Izoenzymy CYP2A6, CYP2C8 i CYP2C19 mają niewielki wpływ na przemianę CPA do jego 4-hydroksypochodnej [120]. Hydroksylacja atomu węgla w pierścieniu w pozycji C-4 CPA odbywa się głównie w wątrobie, w mniejszym stopniu w płucach, jelitach i nerkach. 4-OH-CPA i jego tautomer – aldofosfamid są transportowane



Ryc. 1. Struktura chemiczna cyklofosfamidu i ifosfamidu

przez erytrocyty do komórek nowotworowych. Aldosfamid natomiast poprzez spontaniczną  $\beta$ -eliminację ulega dekompozycji do ostatecznej cytotoksycznej postaci jaką jest iperyt fosforoamidowy (PAM) oraz w równomolowej ilości do produktu ubocznego - akroleiny. Iperyty fosforoamidowy reaguje z DNA, co prowadzi ostatecznie do apoptozy. Alternatywnie, aldofosfamid może być redukowany przez dehydrogenazę alkoholową (ADH) oraz aldo-keto reduktazę (AKR1) do alkofofosfamid [57,120]. W hepatocytach akroleina ulega detoksykacji w wyniku sprzęgania z glutationem z udziałem S-transferazy glutationowej, co może doprowadzić do wewnątrzkomórkowego wyczerpania glutationu i uszkodzenia hepatocytów. Aldofosfamid może być również utleniany przez dehydrogenazę aldehydową do nietoksycznego iperytu O-karboksyetylocyklofosforoamidowego (CEPM, karboksyfosfoamid). Karboksyfosfoamid powstaje głównie z udziałem dehydrogenazy aldehydowej ALDH1A1 i w mniejszym stopniu z udziałem ALDH3A1 i ALDH5A1. CEPM jest jednym z głównych, stabilnych chemicznie metabolitów CPA, które są łatwo wykrywane w moczu i osoczu pacjentów. Ponadto 4-OH-CPA jest także utleniany przez dehydrogenazę alkoholową (ADH) do nietoksycznego 4-ketocyklofosfamid (4-keto-CPA). Pula powstającego 4-keto-CPA jest znacznie mniejsza w porównaniu do puli CEPM [24]. CPA może być również metabolizowany za pośrednictwem N-dechloroetylacji z udziałem CYP3A4/3A5 i w zdecydowanie mniejszym stopniu przez CYP2B6. W wyniku N-dechloroetylacji powstają neurotoksyczny i nefrotoksyczny aldehyd chloroocetowy (CAA) oraz nieaktywny 3-dechloroetylofosfamid (3-DCE) [24,31,57,120]. Schemat metabolizmu cyklofosfamid przedstawiono na ryc. 2.

#### Metabolizm IFO

Metabolizm IFO jest podobny do CPA (ryc. 3). Istnieją jednak pewne różnice między tymi lekami dotyczące szlaków metabolicznych. Rozbieżności wynikają z różnic w położeniu grup chloroetylowych. CPA ma dwie grupy chloroetylowe podstawione przy pozapierścieniowym atomie azotu, natomiast w IFO tylko jedna z dwóch grup chloroetylowych połączona jest z atomem azotu cyklicznego pierścienia 1,3,2-oksazafosforinanowego [120]. Stąd w przypadku IFO metabolizm w wyniku N-dechloroetylacji zachodzi w około 50%, a w przypadku CPA tylko w 10% [54]. N-dechloroetylacja IFO odbywa się z udziałem CYP3A4/5, a także CYP2B6 i prowadzi do powstania 3- i 2-dechloroetylofosfamid (3-DCE, 2-DCE) oraz CAA [27]. Natomiast produktem  $\beta$ -eliminacji jest iperyt izofosforoamidowy (iPAM), który jest końcowym cytotoksycznym metabolitem i który może być dalej konwertowany do chloroetyloaminy i 1,3-oksazolin-2-onu [1,24,31,44,57,67,68,69,120].

#### Mechanizm działania oksazafosforinów

Oksazafosforinany pod względem ingerencji w proliferację komórek należą do leków specyficznych dla cyklu komórkowego. Po metabolicznej aktywacji z udziałem cytochromu wątrobowego P450 do 4-hydroksypochod-

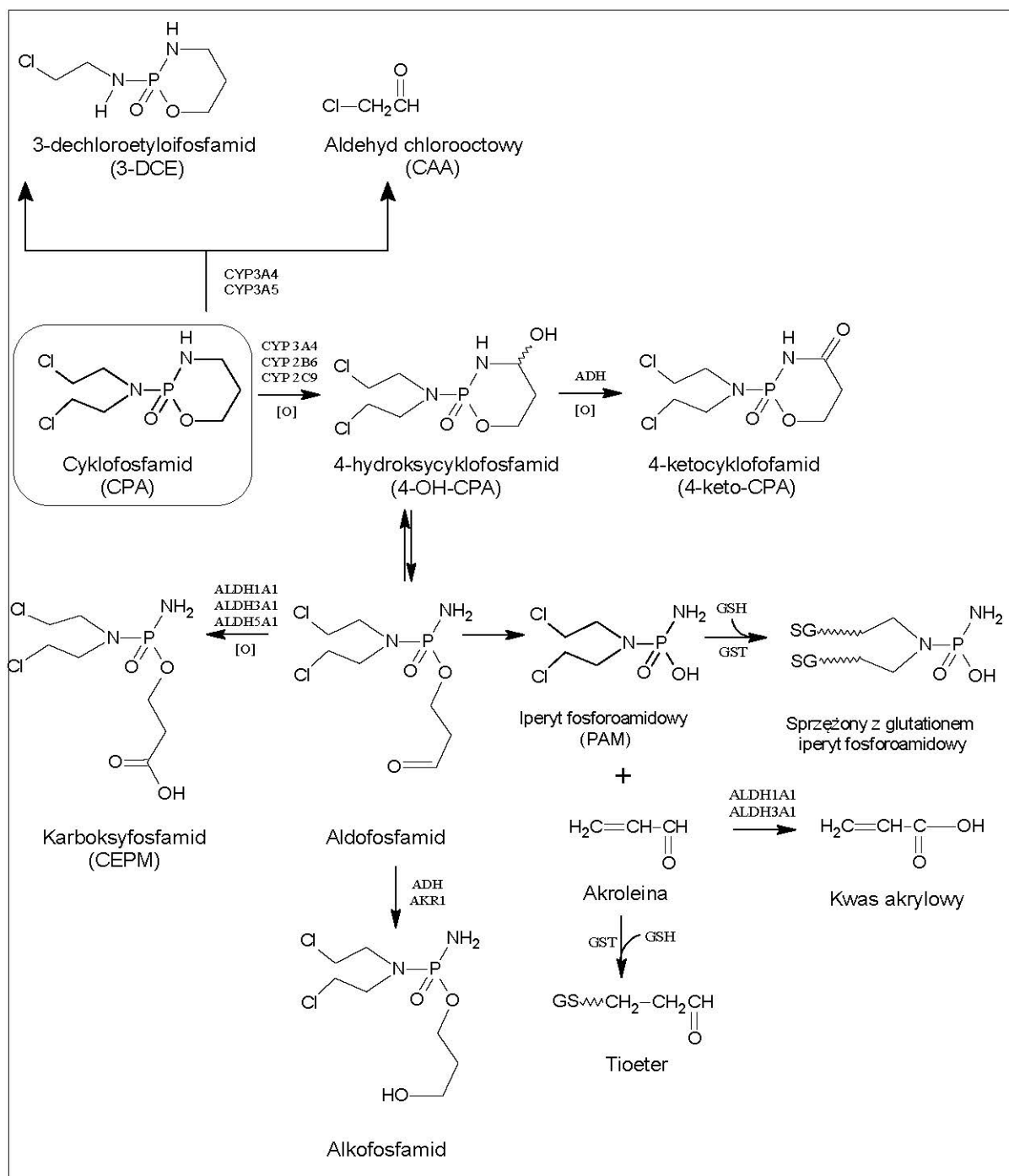
nych i dalszej przemianie do ostatecznej postaci cytotoksycznej – iperytu – oksazafosforinany działają jako dwufunkcyjne związki alkilujące (ryc. 4) [4,67]. Mechanizm działania oksazafosforinów zależy od ich zdolności do alkilowania DNA, a działanie to przypisuje się dwóm metabolitom, odpowiednio PAM i iPAM [24,57]. Oba iperyty mają charakter elektrofilowy i mogą reagować z wysoce reaktywnymi grupami nukleofilowymi kwasów nukleinowych tworząc trwałe wiązania kowalencyjne. PAM jest przekształcany w nietrwały jon azirydyniowy i następnie w reaktywny chemicznie karbokation [4,24,67]. Ten produkt pośredni reaguje z helisą DNA przez tworzenie wiązania kowalencyjnego z atomem azotu N7 guaniny. W mniejszym stopniu podatne na alkilację są atomy N1 i N3 adeniny, N3 cytozyny i O6 guaniny [57]. Prowadzi to do utworzenia wewnątrznicowych wiązań krzyżowych w DNA (intrastrand) oraz międzycieniowych wiązań krzyżowych w DNA (interstrand) – cross-link. Natomiast w przypadku iPAM w środowisku fizjologicznego pH odłącza się anion chlorkowy (Cl<sup>-</sup>) i w następstwie tego powstaje bardziej stabilny w porównaniu z jonem azirydyniowym, związek azirydyniowy o analogicznych zdolnościach alkilujących DNA. Utworzenie jonu z PAM i związku azirydyniowego z iPAM jest jedną z hipotez wykorzystywanych do wyjaśnienia istniejących różnic w zdolności alkilowania między tymi iperytami [24,67,100]. Wykazano też, że zróżnicowane wewnątrzcząsteczkowe odległości między grupami chloroetylowymi PAM i iPAM prowadzą do odmiennego zasięgu w procesie tworzenia wiązań krzyżowych.

Utworzone z PAM wiązanie krzyżowe między łańcuchami DNA jest nieco krótsze, obejmuje pięć atomów, podczas gdy iPAM daje wiązanie poprzez siedem atomów [4,28,67]. Konsekwencją utworzenia cross-link jest uruchomienie mechanizmów apoptotycznych doprowadzających do śmierci komórki [67].

Ponadto CPA wykazuje aktywność przeciwnowotworową przez zmniejszanie puli limfocytów T-regulatorowych (Treg) o fenotypie CD4<sup>+</sup>/CD25 i silnych właściwościach immunosupresyjnych oraz przez wpływ na wzrost liczby komórek pamięci immunologicznej [33,57]. Doustne podawanie cyklofosfamid w metronomicznym schemacie dawkowania pacjentom z zaawansowaną chorobą nowotworową selektywnie redukowało krążące limfocyty T-regulatorowe, co skutkowało supresją ich właściwości inhibicyjnych w stosunku do konwencjonalnych komórek T i NK [23].

#### Rola oksazafosforinów w indukcji apoptozy

Uruchomienie kaskady kaspaz inicjuje śmierć komórek nowotworowych w procesie apoptozy (ryc. 5). Skutkiem działania kaspaz są liczne zmiany biochemiczne i morfologiczne w komórkach nowotworowych [12,111]. Leki oksazafosforinowe indukują apoptozę w fazie wewnętrznej zależnej od mitochondrium [57,86,111]. W wyniku reakcji stresowej komórki na uszkodzenie DNA pod wpływem działania chemioterapeutyku

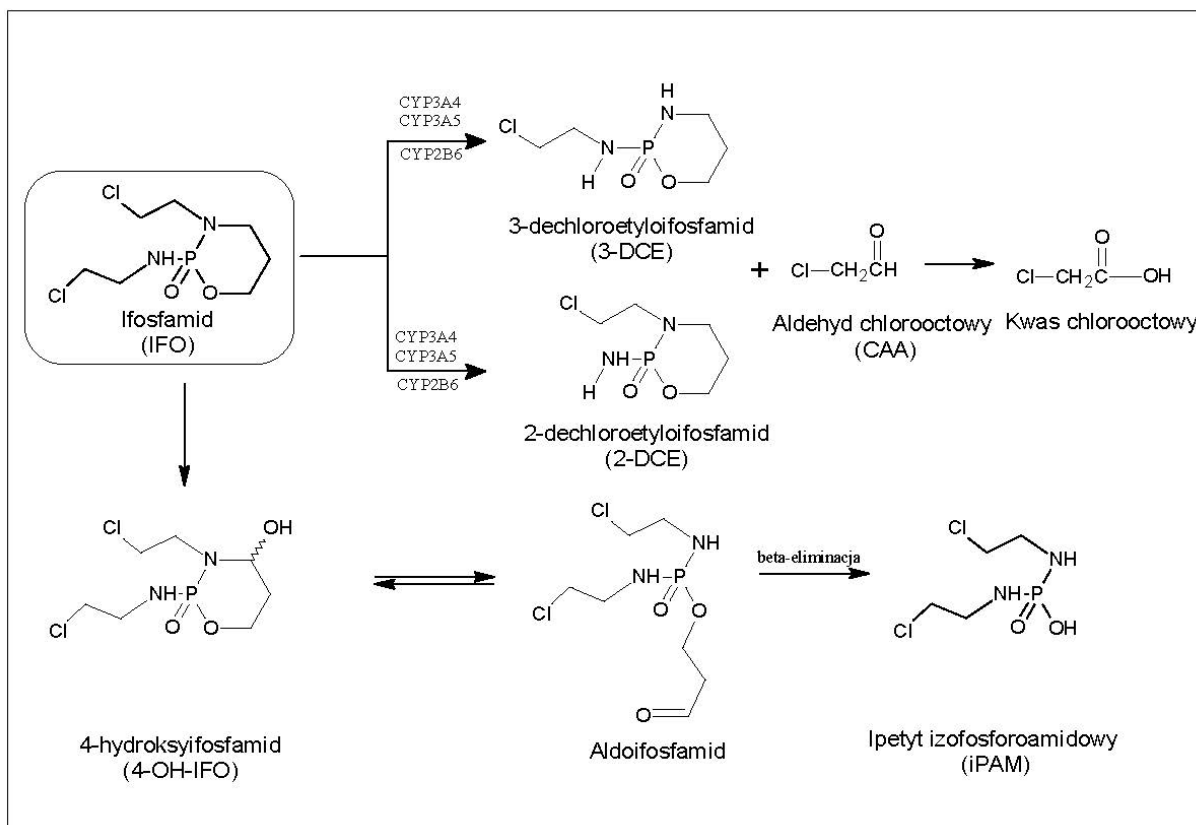


Ryc. 2. Schemat metabolizmu cyklofosfamid u ludzi

dochodzi do zmian w obrębie błony mitochondrialnej. Prowadzi to do zaburzenia potencjału błonowego mitochondriów, uwolnienia czynników apoptotycznych do cytosolu, aktywacji kaspazy 9, a następnie kaspaz efektorowych 3 i 7 [12,57].

W regulacji apoptozy uczestniczy rodzina białek regulatorowych Bcl-2. Do rodziny tej należą białka proapoptotyczne (Bax, Bad, Bak, Bid) oraz antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w i Mcl-1). Białka te oddziałują

między sobą łącząc się w homodimery np. Bcl-2/Bcl-2, Bax/Bax lub heterodimery np. Bcl-2/Bax. Czas życia komórki nowotworowej zależy od wzajemnych relacji ilościowych między białkami pro- i antyapoptotycznymi [106,107]. W zdrowych komórkach Bax jako monomer występuje w cytosolu lub luźno przylega do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Po indukcji apoptozy Bax zmienia konformację i w postaci oligomerycznej przemieszcza się i wbudowuje do zewnętrznej błony mitochondrialnej tworząc pory, przez które uwalniany jest



Rys. 3. Schemat metabolizmu IFO

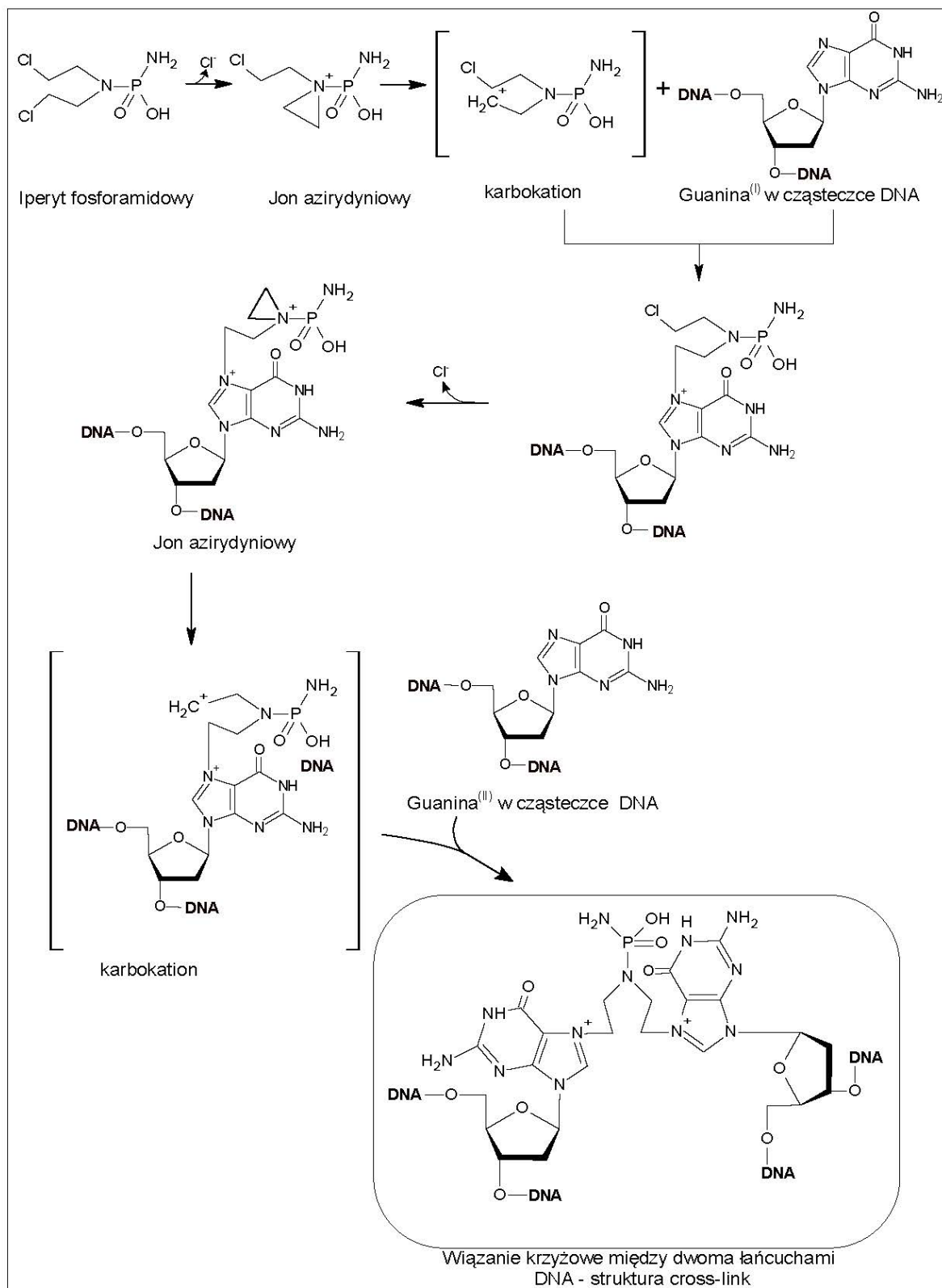
cytochrom c [45]. Zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej może być również warunkiem interakcji rodziny białek Bcl-2 z kanałami mitochondrialnymi (MPTP – mitochondrial permeability transition pore) w miejscu zetknięcia obu błon mitochondrialnych. Głównymi elementami struktury kanału są translokaza nukleotydów adeninowych (ANT) i cyklofilina D (Cph. D) umiejscowione w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a także kanał anionowy zależny od napięcia (VDAC) oraz obwodowy receptor dla benzodiazepin (BRP) w błonie zewnętrznej. Bax i Bak po przyłączeniu do VDAC tworzą kanały błonowe przepuszczalne dla cytochromu c. Białka Bcl-2 działają odwrotnie, tj. po przyłączeniu do VDAC zamykają jego światło, a tym samym prowadzą do zatrzymania cytochromu c wewnątrz mitochondrium [45,86,88,106,107]. Podczas utraty zdolności błony zewnętrznej mitochondriów do pełnienia bariery uwalniane są również inne białka, takie jak czynnik indukujący apoptozę (AIF), który indukuje kondensację chromatyny i fragmentację DNA oraz białko Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI), które jest antagonistą inhibitorów apoptozy tzn. IAP (inhibitors of apoptotic proteases). Wpływ cytochromu c z mitochondrium jest sygnałem do tworzenia apoptosomu, który jest oligomerycznym kompleksem białek aktywujących kaspazy efektorowe. Powstaje przez połączenia uwolnionego do cytoplazmy cytochromu c z białkiem adaptorowym Apaf-1 i z udziałem dATP zmienia

konformację ulegając oligomeryzacji, a następnie łączy się z prokaspazą 9. Prokaspaza 9 poprzez dimeryzację ulega aktywacji, co prowadzi do inicjacji kaskady kaspaz efektorowych [12,106,111]. Na podstawie badań *in vitro* na komórkach linii nowotworowej 9L glejakomieszaka wykazano, że poziom ekspresji białek z rodziny Bcl-2 znacząco wpływa na podatność komórek nowotworowych na CPA. Zaobserwowano, że nadekspresja anty-apoptotycznego białka Bcl-2 skutkowałam hamowaniem aktywności kaspazy 9 i cytotoksycznego działania CPA. Jednak, mimo że CPA w komórkach linii 9L z nadekspresją Bcl-2 bezpośrednio nie indukował apoptozy, to jednak zwiększał odpowiedź cytostatyczną przejawiającą się zmniejszeniem wzrostu komórek z zachowaniem ich żywotności [86].

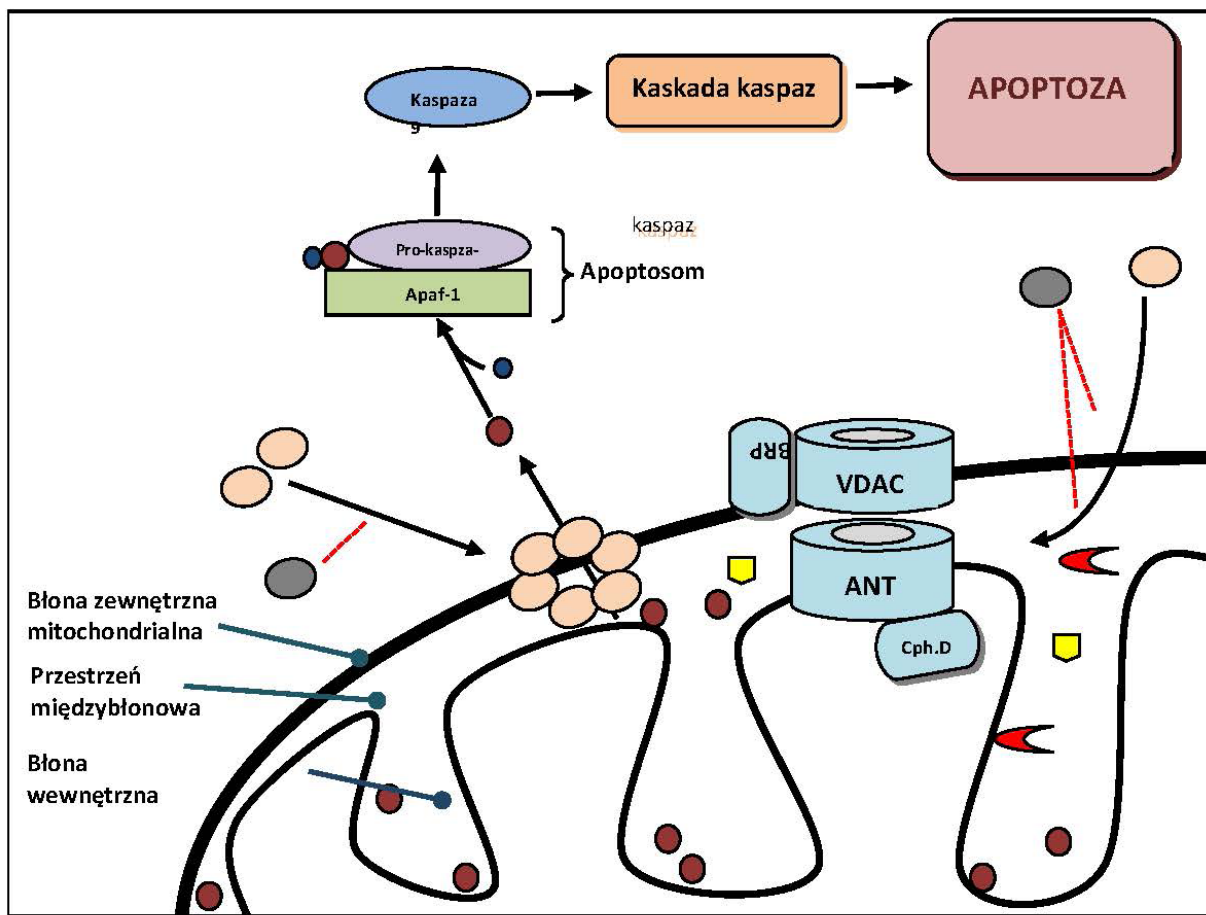
Z kolei wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* na linii komórkowej MCF-7 sugerują, że również system Fas L odgrywa istotną rolę w uruchamianiu apoptozy przez sam CPA jak i przez CPA w obecności resweratrolu [91].

#### Aspekty toksyczności oksazafosforinów







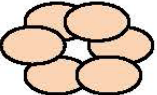




Stosowanie CPA i IFO powoduje wiele objawów toksycznych zależnych zarówno od częstotliwości podawania, jak i od łącznej dawki leku. Obserwowane różnice w profilach toksyczności między tymi lekami są wynikiem ilości powstających metabolitów: akroleiny, aldehydu chlorooctowego i pochodnych iperytu. Do ogólnych



Ryc. 4. Schemat alkilowania guaniny. Guanina(I) – pierwsza cząsteczka guaniny; guanina(II) – druga cząsteczka guaniny

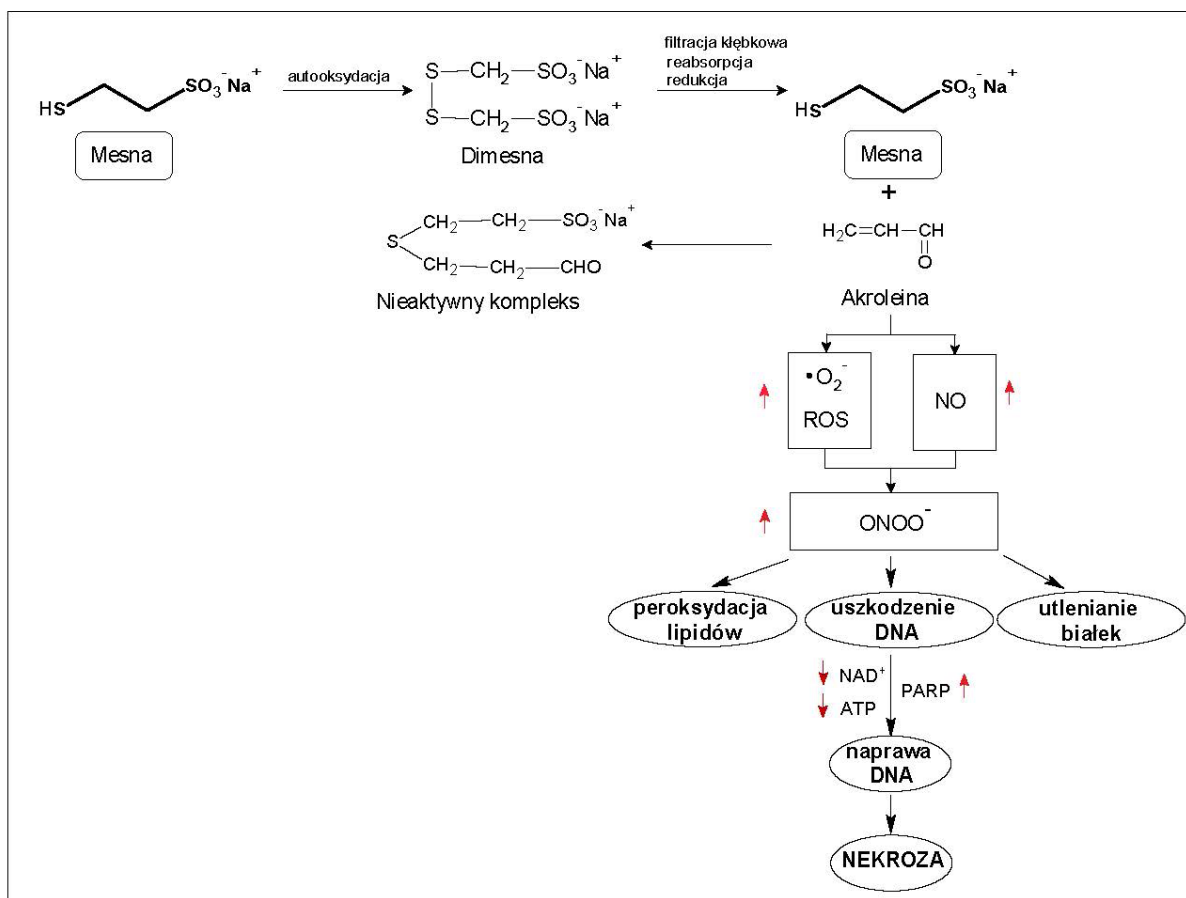


Objaśnienie skrótów użytych w schemacie:

- |   |                                     |   |                                     |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
|  | AIF – czynnik indukujący apoptozę   |  | dATP                                |
|  | Bax                                 |  | Bcl-2/Bcl-XL                        |
|  | cytochrom c                         |  | Smac/Diablo                         |
|  | por                                 |  | obwodowy receptor dla benzodiazepin |
|  | translokaza nukleotydów adeninowych |  | cyklofilina D                       |
|  | kanał anionowy zależny od napięcia  |   |                                     |

Ryc. 5. Schemat szlaku mitochondrialnego apoptozy





Ryc. 6. Mechanizm urotoksyczności indukowanej przez akroleinę i prewencyjne działanie mesny

objawów występujących po podaniu CPA i IFO zaliczane są: nudności, wymioty, łysienie, niepłodność, reakcje nadwrażliwości i hamowanie czynności szpiku kostnego [24,47,53,57,87]. Jednym z ciężkich powikłań występujących po podaniu tych leków jest krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego wywołane uwolnioną podczas biotransformacji urotoksyczną akroleiną [24,47,53]. Jest to proces zapalny, w patogenezie którego biorą udział cytokiny (TNF), czynnik transkrypcyjny (NF- $\kappa$ B) oraz kompleks białkowy AP-1. Akroleina jest wysoce reaktywnym  $\alpha$ ,  $\beta$ -nienasyconym aldehydem, który łatwo wiąże się z glutationem, białkami i DNA. Przyjmuje się, że za urotoksyczność towarzyszącą terapii oksazafosforinami odpowiedzialny jest kilkufazowy mechanizm (ryc. 6).

W pierwszej fazie akroleina szybko wnika do komórek nabłonkowych pęcherza moczowego i powoduje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) oraz stymuluje iNOS (indukowalna syntaza tlenu azotu), co prowadzi do nadmiernego wytwarzania NO. Dodatkowo akroleina indukuje czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B i kompleks białkowy AP-1, co w konsekwencji powoduje ekspresję genów dla cytokin TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , dalszą indukcję iNOS i wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Wzrost wytwarzania NO i ROS prowadzi do generowania cytotoksycznego anionu nadtlenuoazotynowego (ONOO<sup>-</sup>),

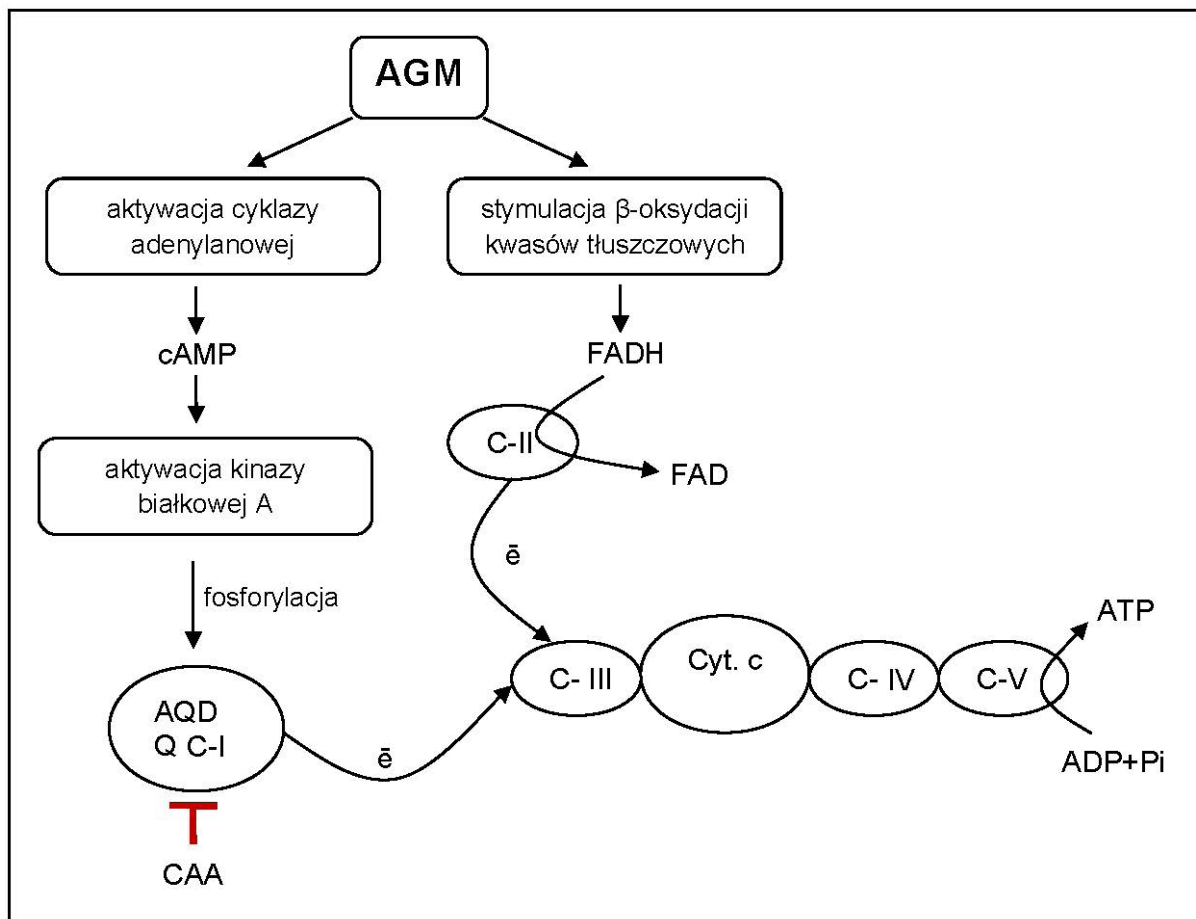
który powoduje peroksydację lipidów, utlenianie białek oraz powstawanie pęknięć w DNA. Powstałe uszkodzenie DNA stymuluje enzym naprawczy polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARP), którego wzmożona aktywność prowadzi do wyczerpania komórkowych zapasów NAD<sup>+</sup> i ATP, a następnie nekrozy komórki [24,47,51,93].

Ważnym niepożądanym następstwem stosowania ifosfamidu jest nefrotoksyczność. Jej bezpośrednią przyczyną jest CAA powstający podczas kaskady przemian metabolicznych obu leków [24,47,53,54,57,65,87]. Wyniki badań wskazały, iż w przypadku stosowania IFO notowano wielokrotnie wyższy poziom CAA w porównaniu do CPA. Różnice w przebiegu metabolizmu tych analogów są wynikiem różnic w ich budowie chemicznej. Jak podano wcześniej oddalenie od siebie grup chloroetylowych w strukturze IFO spowalnia 4-hydroksylację, co ogranicza ilość powstających aktywnych metabolitów. Rezultatem tego jest wzmożone utlenianie łańcuchów bocznych i powstawanie większych ilości 2- i 3-DCE oraz CAA [24,27,69,112]. Ponadto po podaniu IFO, CAA jest generowany lokalnie w komórkach nerek, co prawdopodobnie wzmacnia jego działanie nefrotoksyczne [1,67,112]. Metabolizm nerkowy IFO przebiega z udziałem tych samych izoenzymów CYP, które metabolizują lek w wątrobie. Izoenzymy CYP: 3A4 i 3A5 zidentyfiko-

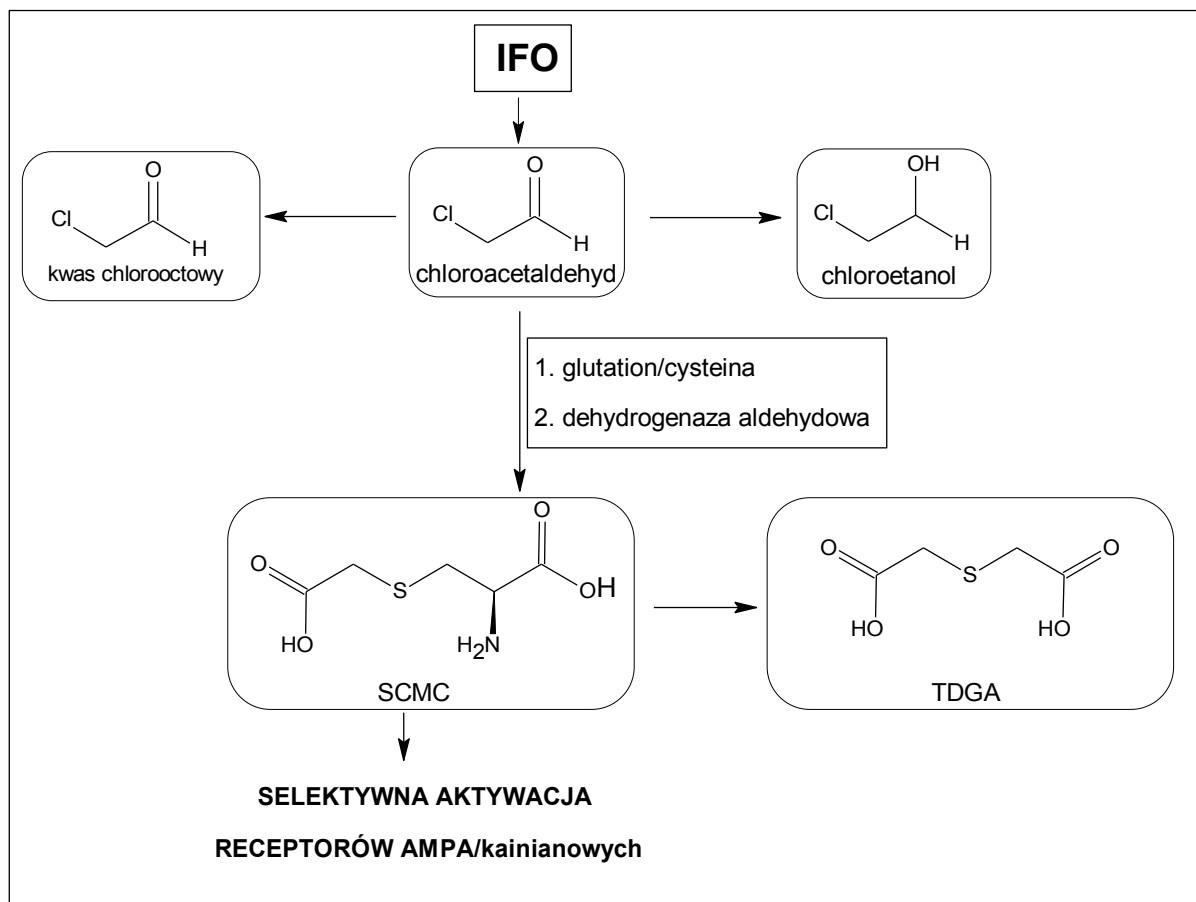
wano w nerkach płodów ludzkich oraz nerkach dzieci i dorosłych, w tym w moczowodach, kanaliku zbiorczym i kanaliku bliższym. CYP3A5 dodatkowo zlokalizowano w pętli Henlego. Aktywność CYP2B6 istotna dla metabolizmu IFO była jednak znacznie niższa w mikrosomach nerkowych niż w mikrosomach wątrobowych, a całkowita zawartość izoenzymów CYP w nerkach była około 6-krotnie niższa niż w wątrobie [1]. Przeprowadzone badania metabolizmu IFO *in vitro* z wykorzystaniem mikrosomów nerkowych wyizolowanych ze świńskich i ludzkich nerek wykazały ich zdolność do biotransformacji IFO do stabilnych N-dechloroetylowych pochodnych [112]. Natomiast badania nad stereoselektywnością metabolizmu IFO *in vitro* pod wpływem ludzkich mikrosomów nerkowych wykazały, że są one zdolne do enancjoselektywnego metabolizmu IFO. Enancjomer R-IFO ulegał biotransformacji do R-2-DCE i S-3-DCE, a enancjomer S-IFO do S-2-DCE i R-3-DCE przy niewielkich ilościowych różnicach w metabolizmie. Większe różnice odnotowano w ilościach formowanych dechloroetylowych pochodnych powstałych z przemiany S-IFO [1]. Badania metabolizmu IFO z uwzględnieniem genotypu CYP3A5 przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów nerkowych pochodzących od dawców homozygotycznych z allelem CYP3A5\*3/\*3 oraz od dawców heterozygotycznych z allelem CYP3A5\*1. Zna-

mienną N-dechloroetylację IFO zaobserwowano tylko u osób z allelem CYP3A5\*1 [67]. Metabolizm w wyniku N-dechloroetylacji prowadzący do powstania stabilnych 2- i 3-DCE powoduje powstawanie równoważnych ilości niestabilnego CAA. Wykazano, że powstające z IFO 2-DCE i 3-DCE pozostają w stosunku 1:1, a ich suma jest równa ilości CAA. Toksyczność CAA wynika z ingerencji w procesy biochemiczne nefronu i zaburzenia jego homeostazy. CAA obniża w komórce poziom glutationu, CoA, acetyloCoA i ATP oraz kumuluje pirogromian, a także wpływa na aktywność niektórych enzymów. Wykazano, że hamuje on dehydrogenazę gliceroaldehydrofosforanową, bisfosfatazę fruktozową i glukozy-6-fosfatazę, co skutkuje zahamowaniem glukoneogenezy. Wykazano również, że klinicznie obserwowane stężenia CAA hamują komórkową V-ATP-azę, co prawdopodobnie prowadzi do spadku reabsorpcji białek, która występuje w zespole Fanconiego [17,24,48,115]. Główny mechanizm nefrotoksycznego działania CAA polega prawdopodobnie na blokowaniu kompleksu C-I (oksydoreduktaza NADH:ubichinon), wchodzącego w skład mitochondrialnego łańcucha oddechowego (ryc. 7).

Przyjmuje się, że dezaktywacja C-I może być konsekwencją defosforylacji jego podjednostki A/QDQ, co skutkuje zmianami wewnątrzkomórkowego poziomu ATP. Kom-



Ryc. 7. Mechanizm nefrotoksyczności indukowany IFO i prewencyjne działanie agmatyny (AGM)



**Ryc. 8.** Biochemiczne implikacje neurotoksyczności ifosfamidu

pleks C-I bierze udział w tworzeniu gradientu protonowego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej i przekazywaniu elektronów z NADH na cząsteczkę ubichinonu, co generuje siłę napędową do syntezy ATP. U szczurów, którym podawano IFO zaobserwowano wzrost NADH w korze nerkowej, pozwala to wnioskować, że brak funkcji C-I nie jest wynikiem wyczerpywania się mitochondrialnych zasobów NADH [17,48,77,78,115].

Innym istotnym klinicznie niepożądanym działaniem ifosfamidu jest jego potencjalna neurotoksyczność [2,13,30,34,36,47,60,89,104]. Przyjmuje się, że odpowiedzialny jest CAA gromadzący się w OUN, a jego toksyczny wpływ na układ nerwowy może być związany z procesem detoksykacji CAA jest jego sprzężanie z endogennym glutationem i/lub cysteiną, prowadzące do powstania S-karboksymetylocysteiny (SCMC). SCMC podlega dalej metabolizmowi do kwasu tiodiglikolowego (TDGA), którego obecność wykrywana jest w moczu pacjentów objętych terapią IFO. SCMC selektywnie aktywuje receptory AMPA/kainianowe, co prawdopodobnie wynika z jej analogii strukturalnej do kwasu glutaminowego (ryc. 8). Zakłada się, że SCMC powstaje *in situ* w mózgu, gdyż nie przenika ona bariery krew-mózg [10,56,79]. TDGA może także uczestniczyć w indukcji encefalopatii przez wywołanie wewnątrzneuronalnego „zakwaszenia” [10,56].

Poza tym neurotoksyczność CAA może też być związana ze zmniejszaniem puli glutationu w OUN i inhibicją oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach, co skutkuje zaburzeniem metabolizmu kwasów tłuszczowych [24,89].

CPA i IFO wykazują także działanie kardiotoxyczne, jednak w standardowych dawkach są one niewielkiego stopnia. W dużych dawkach, stosowanych do ablacji szpiku kostnego, leki te mogą powodować zapalenie mięśnia sercowego, wysiękowe zapalenie osierdzia, zawał serca, zaburzenia rytmu serca i zastoinową niewydolność serca. Całkowita dawka IFO, powodująca uszkodzenie mięśnia sercowego jest zwykle znacznie większa niż 1,0 g/m<sup>2</sup>, a efekt kardiotoxyczny pojawia się u pacjentów w ciągu dwóch tygodni od podania leku. Zastoinowa niewydolność serca po IFO jest często odwracalna. Krwotoczne zapalenie mięśnia sercowego występuje głównie przy stosowaniu wysokich dawek CPA [47,82].

#### Prewencja toksyczności

W celu zabezpieczenia przed urotoksycznymi efektami w terapii oksazafosforinami w standardowym leczeniu klinicznym stosuje się prewencyjne podawanie mesny. W badaniach klinicznych wykazano dużą skuteczność mesny zarówno po podaniu dożylnym jak i doustnym,

a także w schematach leczenia łącznego z obu dróg podania [42,51,53,55,93,99]. W przypadku podania *i.v.* stosowana dawka mesny stanowi 60% całkowitej dawki IFO podzielonej na trzy równe części, przy czym pierwsza część dawki aplikowana jest zaraz po podaniu IFO, a dwie kolejne odpowiednio po 4 i 8 godzinach od podania IFO [93]. Uroprotektoryjne działanie mesny wynika z jej struktury chemicznej i właściwości farmakologicznych. Mesna, sól sodowa kwasu 2-merkaptotano-sulfonowego jest związkiem tiolowym łatwo wiążącym akroleinę oraz 4-OH-metabolity CPA i IFO. W komórkach mesna występuje w postaci zredukowanej, natomiast w osoczu ulega szybkiej autooksydacji do nieaktywnej disulfidowej – dimesny. Zarówno mesna, jak i dimesna są szybko filtrowane w kłębuszkach nerkowych, a następnie dimesna ulega częściowej resorpcji zwrotnej do kanalików nefronu i w komórkach nabłonkowych kanalików jest częściowo zredukowana z udziałem reduktazy glutationowej do farmakologicznie czynnej postaci tiolowej. Do moczu jest wydalana zarówno mesna jak i dimesna. W obrębie pęcherza moczowego mesna łączy się poprzez grupy sulfhydrylowe z akroleiną tworząc stabilny, nietoksyczny kompleks [51,93,99] (ryc. 6). Stosowanie mesny zmniejsza objawy zapalenia pęcherza moczowego, częstość występowania dysurii oraz epizodów mikro- i makrokrwiomoczu. Stosowanie mesny u dzieci nie jest skuteczne, co jest prawdopodobnie wynikiem braku możliwości wytwarzania przez ich organizm wystarczającej ilości utlenionej mesny. Hipotezę tę oparto na wynikach badań prowadzonych *in vitro* na linii komórek epitelialnych LLC-PK1, które nie mają zdolności zredukowania dimesny do mesny [24,47,67,87].

Prewencja z kolei toksycznego wpływu CAA na komórki nerek powinna polegać, jak się sugeruje, na stosowaniu środków zwiększających aktywność kompleksu C-I oraz pozwalających zachować integralność łańcucha oddechowego [17,24,48,53,77,78,115]. Takim środkiem wydaje się agmatyna (AGM) [77]. AGM powstaje w wyniku dekarboksylacji argininy z udziałem mitochondrialnej dekarboksylazy argininy i pełni istotne funkcje biologiczne zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych [76]. Na podstawie badań z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, uważa się że agmatyna zwiększa poziom cAMP, który aktywuje cAMP-zależną kinazę białkową odpowiedzialną za fosforylację podjednostki AQP2 kompleksu C-I [6,78]. Poza tym mechanizm prewencyjnego działania AGM tłumaczy się pobudzeniem  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, która zachodzi z udziałem kompleksu C-II i pozwala zrekompensować brak aktywności kompleksu C-I. Dodatkowo postuluje się, że pobudzona przez AGM  $\beta$ -oksydacja może być również uwarunkowana poziomem cAMP (ryc. 7) [77].

Z kolei błąkiet metylenowy, według niektórych danych, może być środkiem zapobiegającym występowaniu objawów neurotoksycznych związanych z terapią IFO. Prewencyjne właściwości błąkietu metylenowego wynikają z hamowania aktywności monoaminooksydazy (MAO), a w konsekwencji ze wzrostu stężenia serotoniny

w OUN modulującej wpływ SCMC na receptory AMPA/kainianowe [24,56,58,79]. Dodatkowo błąkiet metylenowy zmienia przepuszczalność błony mitochondrialnej dla długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i indukuje ich oksydację [24,89]. Wydaje się, że również tiamina może być skuteczna w encefalopatii wywołanej ifosfamidem [34].

### Oporność na oksazafosforinany, implikacje genetyczne

W praktyce klinicznej obserwuje się zróżnicowaną skuteczność chemioterapii lekami alkilującymi z grupy oksazafosforinów w stosunku do różnych typów nowotworów, co tłumaczy się występowaniem oporności wrodzonej i nabytej na te cytostatyki. Wrodzona oporność na oksazafosforinany jest związana ze zmianami molekularnymi i biochemicznymi występującymi w komórkach nowotworowych, a nabyta jest konsekwencją ekspozycji tych komórek na wyżej wymienione leki [118,120]. Jak już przedstawiono we wcześniejszej części pracy szeroka i różnorodna pula enzymów bierze udział w biotransformacji cyklofosfamidu i ifosfamidu (ryc. 2,3). Analiza tych enzymów, zwłaszcza izoform cytochromu P450/CYP: 2B6, 2C9, 2C19, 3A4 oraz izoform dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), aldo-keto reduktazy (AKR) i transferazy glutationowej (GST) pozwala na wyciągnięcie wniosku, że zmiany w aktywności tych białek wynikające z obecności induktorów lub inhibitorów oraz polimorfizmu genetycznego mogą wpływać na pulę aktywnych terapeutycznie metabolitów i predysponować do powstania oporności [118,120]. W przeprowadzonych badaniach 29 chorych z hematologicznymi zmianami nowotworowymi mających na celu ocenę wpływu polimorfizmu CYP: 2B6 (G516T), 2C9\*3, 2C19\*2 i 2C19\*3 na farmakokinetykę CPA i 4-OH-CPA wykazano, że obecność allelu G516T genu CYP2B6 powodowała wzrost szybkości tworzenia 4-OH-CPA i intensywniej wpływała na klirens nerkowy w porównaniu do typu dzikiego, natomiast genotypy izoform CYP2C9 i CYP2C19 nie decydowały o klirensie CPA [113,120]. Wykazano również, że zmutowane izoenzymy CYP: 2B6 i 2C19 wpływają na skuteczność terapii i przeżywalność pacjentów z rozrostowym toczniowym zapaleniem nerek leczonych CPA podawanym dożylnie w postaci „pulsów” z/bez metyloprednizolonu [105,120]. U pacjentów będących homozygotami dla CYP2B6\*5 i CYP2C19\*2 zaobserwowano znacznie mniejsze prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi całkowitej ze strony nerek. W tych samych badaniach wykazano także, że u pacjentek będących homozygotami lub heterozygotami w stosunku do CYP2C19\*2 ryzyko przedwczesnego rozwoju niewydolności jajników było znacznie mniejsze w porównaniu do posiadaczek allelu dzikiego CYP2C19\*1 i wynosiło odpowiednio 35 i 80% [105,120]. Wydaje się, że zarówno wpływ na funkcjonowanie nerek, jak i toksyczność w odniesieniu do jajników u pacjentek leczonych CPA wynika z tego, że geny CYP2B6\*5 i CYP2C19\*2 wytwarzają białka o mniejszej aktywności enzymatycznej, co może prowadzić do zmniejszenia metabolicznej aktywacji CPA, a w konsekwencji pogorszenia funkcji nerek przy

zachowaniu małej toksyczności gonadalnej [105]. Nie zaobserwowano związku między klinicznymi zmianami w nerkach, a polimorfizmem allelu CYP2C9 i CYP3A4. Wyniki te potwierdziły znaczącą rolę CYP2B6 i CYP2C19 w aktywacji CPA, podczas gdy udział CYP2C9 i CYP3A4 okazał się mniej istotny [118].

Jak wiadomo droga indukcji izoenzymów cytochromu P450 przebiega przez receptory jądrowe należące do superrodziny receptorów steroidowych [110,118]. Na podstawie badań *in vitro* na modelu ludzkich hepatocytów wykazano, że do indukcji przez CPA izoenzymów cytochromu P450, w tym CYP2B6, CYP3A4 i CYP2C9 wymagana jest aktywacja receptora pregnanu X (PXR), dla którego wykazano istnienie polimorfizmów genetycznych mogących mieć wpływ na metabolizm i aktywność oksazafosforinów [32,59]. Wydaje się także, że inne receptory jądrowe, takie jak konstytutywny receptor androstanu (CAR), receptor dla glikokortykosteroidów (GR) i czynnik transkrypcyjny 4 (HNF4- $\alpha$ , hepatic nuclear factor 4) są istotne w procesie indukcji CYP3A4 i CYP2B6 przez oksazafosforiny [118].

Oceniano również wpływ dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) na występowanie oporności na oksazafosforiny. Dotychczas w nadrodzinie ALDH zidentyfikowano 17 izoenzymów kodowanych przez różne *loci* genowe [98,108,118]. Izoenzymy ALDH: 1A1, 3A1 i 5A1 uczestniczą w detoksykacji 4-OH-CPA i 4-OH-IFO przez tworzenie odpowiednio iperytów karboksyetylo-CPA i karboksyetylo-IFO oraz związków 4-keto-CPA i 4-keto-IFO, a zatem zwiększenie aktywności ALDH przez indukcję lub transfer genu prowadzi do wytworzenia oporności na CPA [24,57,94,118,120]. Stwierdzono, że powstawanie CEPM z CPA z udziałem ALDH1A1 skutkuje powstawaniem oporności komórek białaczek L1210 i P388 na CPA i 4-OH-CPA. Ponadto w badaniach *in vitro* na różnych liniach komórkowych z nadekspresją ALDH3A1 zaobserwowano również występowanie znacznej oporności zarówno na CPA, jak i mafosfamid (MFO) [101,118]. Przeprowadzono wstępną ocenę kliniczną zależności między poziomem ekspresji ALDH a skutecznością chemioterapii z udziałem oksazafosforinów. Wyniki badań sugerują, że poziom ekspresji ALDH1A1 w raku piersi może być czynnikiem predykcyjnym pozwalającym na przewidywanie odpowiedzi na leczenie CPA [44,120].

Kolejnymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm oksazafosforinów są aldo-keto reduktazy (AKR), a zwłaszcza AKR1 powodująca konwersję aldoifosfamidów do alkoifosfamidów. Jak dotąd nie ma doniesień opisujących zależność między poziomem ekspresji AKR1 a odpowiedzią na leczenie oksazafosforinami, mimo że w niektórych typach nowotworów stwierdzono jego nadekspresję [118].

W indukowaniu oporności na oksazafosforiny ważną rolę spełnia również zredukowana postać glutationu (GSH, tripeptyd  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyny), którego aktywną grupą jest reszta sulfhydrylowa -SH cysteiny.

Dysocjacja kwasowa grupy -SH prowadzi do powstania nukleofilowego anionu tiolanowego, który ulega sprzężeniu z metabolitami CPA i IFO z udziałem S-transferazy glutationowej, a następnie usuwa je z komórek nowotworowych za pomocą transporterów MRP [2,118,120]. W badaniach *in vitro* wykazano, że glutation zapobiega tworzeniu się wiązań krzyżowych w niciach DNA z udziałem iperytów, a tym samym zmniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na CPA [8,21,84]. Z kolei w badaniach na mysim modelu z nowotworem piersi EMT-6 opornym na leki alkilujące zaobserwowano znaczny wzrost komórkowego GSH, reduktazy i peroksydazy glutationowej [11,118]. Podobne wyniki otrzymano w badaniach na „nagich” myszach z ludzkimi przeszczepami ksenogenicznymi różnych typów nowotworów [14]. Dodatkowo, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* na zwierzętach oraz w badaniach klinicznych u pacjentów zaobserwowano, że oksazafosforiny powodowały znaczny spadek wewnątrzkomórkowego GSH, co wyraźnie wskazuje, że jest on eksploatowany w procesach detoksykacyjnych tej grupy leków [64]. Zaobserwowano też, że IFO nasila przeciwnowotworowe działanie wielu cytostatyków, w tym cisplatyny i paklitakselu, co tłumaczy się nie tylko jego cytotoksycznym mechanizmem działania, ale także możliwościami zmniejszania wewnątrzkomórkowego poziomu GSH [64,118]. Wyniki te dowodzą, że wewnątrzkomórkowy poziom GSH może być wyznacznikiem stopnia wrażliwości komórek na leki alkilujące, a jego obniżenie w komórkach nowotworowych byłoby korzystne, bo zwiększające skuteczność chemioterapii IFO i CPA [118].

Równie ważny zdaje się wpływ S-transferaz glutationowych (GST) na wyniki leczenia cytostatykami. GST stanowią rodzinę wielofunkcyjnych białek, których działanie detoksykacyjne polega głównie na katalizowaniu reakcji sprzężenia endogennego glutationu z elektrofilowymi metabolitami powstającymi w I fazie biotransformacji [52,118,120]. Wyróżnia się 3 główne grupy GST: cytosolowe, mitochondrialne i mikrosomalne [52]. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasów wyodrębniono kilka cytosolowych klas tych enzymów, w tym:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\omega$  i  $\theta$ , z których wiele uczestniczy w tworzeniu S-koniugatów metabolitów IFO i CPA z GSH, a polimorfizm w obrębie klas  $\alpha$ ,  $\pi$  i  $\theta$  przyczynia się do wystąpienia osobniczych różnic w odpowiedzi na chemioterapię, również na leczenie oksazafosforinami [29,52,118]. Analiza skuteczności leczenia cyklofosfamidem u dzieci z zespołem nerczycowym dowiodła, że polimorfizm GSTM1 i GSTP1 miał znaczący wpływ na wystąpienie długotrwałej remisji. Typ GSTM1 „null” zwiększał skuteczność terapii CPA, podczas gdy typ GSTP1 „null” zwiększał podatność na nawrót choroby [109,118].

Jak już wcześniej podawano, mechanizm działania oksazafosforinów jest związany z zahamowaniem replikacji DNA i uruchomieniem mechanizmów apoptozy zależnych od poziomu białek pro- i antyapoptotycznych [118,119,120]. Badania prowadzone zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że wzmożona ekspresja bia-

łek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL chroni komórki przed apoptozą, a tym samym zwiększa ich oporność na działanie oksazafosforinów [118,119,120]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że komórki neuroblastoma stransfekowane białkiem Bcl-XL wykazywały mniejszą zdolność indukowania apoptozy, a z kolei badania przeprowadzone na transgenicznym myszku z nadekspresją Bcl-2 wykazały znaczną oporność komórek hematopoetycznych na różne cytostatyki w tym na CPA [15,16,118,120]. Natomiast poziom ekspresji białka Bax dobrze korelował z wrażliwością komórek przewlekłej białaczki limfocytarnej na działanie różnych cytostatyków, w tym dokсорubicyny, chlorambucilu i CPA [5,119]. Jednak ze względu na skomplikowane interakcje między białkami z rodziny Bcl-2 regulującymi apoptozę trudno jest ustalić czy nadekspresja pojedynczego genu w komórkach nowotworowych może być czynnikiem prognostycznym w powstawaniu oporności i zależnej od niej skuteczności terapeutycznej [118]. Kolejnym czynnikiem generującym oporność na alkilujące leki przeciwnowotworowe, w tym CPA i IFO są zdolności naprawcze komórki nowotworowej w stosunku do uszkodzonego DNA [19,20,21,63,74]. Wykazano, że poziom metylotransferazy metyloguaninowej (MGMT) w komórkach nowotworowych decyduje o wrażliwości tych komórek na chemioterapię CPA [20,66,81]. W badaniach *in vivo* na modelu ksenogenicznego przeszczepu ludzkiego nowotworu płuc wykazano, że aktywność enzymu MGMT koreluje z wrażliwością komórek nowotworowych na terapię CPA i cisplatyny [66]. Natomiast ocena ekspresji białka MGMT u pacjentek z nowotworem piersi okazała się niedostatecznym czynnikiem predykcyjnym co do skuteczności terapii CPA [9]. Poza tym wykazano, że białkowe produkty ekspresji genów *ERCC1* i *ERCC4* są także istotne w naprawie uszkodzeń DNA wywołanych przez 4-OH-CPA i mogą decydować o skuteczności terapii [3].

### Drogi redukcji oporności na oksazafosforinany

Ze względu na szerokie zastosowanie oksazafosforinów w chemioterapii nowotworów ważne staje się znalezienie potencjalnych i praktycznych rozwiązań problemu oporności na te leki [118,120].

#### Modulatory metabolizmu

Jak wiadomo do osiągnięcia aktywności oksazafosforinów konieczna jest biotransformacja prowadząca do hydroksylacji pierścienia z udziałem odpowiednich izoenzymów cytochromu P-450. Stąd wydawało się, że modulowanie aktywności białek CYP może być właściwym sposobem zredukowania oporności na te leki z jednoczesnym podniesieniem skuteczności terapii. W czasie leczenia pacjentów cyklofosfamidem dobrą indukcję metabolizmu CPA uzyskano przez dodatkowe stosowanie deksametazonu lub fenytoiny, przy czym fenytoina indukowała znacząco także N-dechloroetylację obu enantiomerów leku [96,117]. Wśród leczonych pacjentów ifosfamidem również zaobserwowano wzrost aktywności i dechloroetylacji tego leku w przypadku jednocze-

snego stosowania fenytoiny jako induktora CYP3A4 [18]. Natomiast podawanie jednoczesne IFO i fenobarbitalu nie prowadziło do zwiększenia metabolizmu ifosfamidu, co tłumaczy się tym, że indukcja wywołwana barbituranami rozwija się stopniowo i wymaga kilkudniowego ich podawania [6,61]. Przeprowadzono także kliniczne badania mające na celu określenie wpływu rifampicy jako induktora CYP3A4/CYP2B6 i ketokonazolu jako inhibitora CYP3A4 na metabolizm IFO [43]. Na podstawie wyników badań wykazano, że stosowanie rifampicy z IFO powodowało wzrost puli dechloroetylowych metabolitów z jednoczesnym zmniejszeniem ekspozycji pacjentów na te metabolity wynikającym ze zwiększonej ich eliminacji oraz nie powodowało istotnych zmian w narażeniu tych pacjentów na 4-OH-IFO [44]. Z kolei podawanie ketokonazolu znacząco redukowało stężenie 4-OH-IFO w osoczu pacjentów przy jednoczesnym nieznacznym wpływie na ekspozycję pacjentów na dechloroetylowe pochodne IFO [44].

Kolejnym ważnym białkiem enzymatycznym decydującym o wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapię oksazafosforinami jest ALDH. Różnorodne badania prowadzone *in vitro* z zastosowaniem inhibitorów ALDH, takich jak: disulfiram, dietylotiotiokarbaminian lub cyjanamid wykazały, że częściowo przywracały one wrażliwość komórek nowotworowych na CPA, 4-OH-CPA i inne oksazafosforinany [95]. Przeprowadzono także badania *in vitro* na różnych liniach raka płuc, w tym na linii niedrobnokomórkowego raka płuc A-549 mające na celu ocenę wpływu wewnątrzkomórkowego poziomu kwasu retinowego na supresję ekspresji ALDH [71]. Wyniki tych badań sugerują, że retinoidy wpływają poprzez mechanizm *down-regulation* na potranslacyjną ekspresję ALDH, co w rezultacie prowadzi do wzrostu cytotoksyczności 4-hydroperoksyklofosfamidu. Stwierdzono również, że hamowanie aktywności ALDH3A1 przez analogi chlorpropamidu: dimetyloetyloester kwasu (acetylooksy)[(4-chlorofenyl)sulfonyl]karbamidowego i 4-chloro-N-metoksy - N-[(propylamino)karbonyl]benzenosulfonamid powoduje uwrażliwienie komórek ludzkiego gruczolaka piersi MCF-7 na działanie oksazafosforinów [83].

Istotne znaczenie w zwiększaniu wrażliwości komórek nowotworowych na działanie CPA w badaniach *in vitro* i *in vivo* miało łączne stosowanie syntetycznych inhibitorów transferazy glutationowej GSTP1 [75]. Spośród sześciu zsyntetyzowanych inhibitorów GSTP1-1 skuteczny okazał się etyloester O-heksadecylo- $\gamma$ -glutamyl-S-benzylcysteinyllofenyloglicyny (C16C2), który powodował wzrost cytotoksyczności 4-hydroperoksyklofosfamidu w stosunku do linii komórek cholangiocarcinoma HuCCT1 [75]. Z kolei w badaniach *in vivo* na mysim modelu z przeszczepem ksenogenicznym wykazano wzrost skuteczności przeciwnowotworowej zarówno adriamycyny, jak i cyklofosfamidu w przypadku łącznego podawania tych leków ze związkiem C16C2 [75]. Zaobserwowano także, że działania mające na celu obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GSH

mogą prowadzić do zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na leki alkilujące i poprawę skuteczności chemioterapii [118]. Wykazano, że zastosowanie butioninosulfoksiminy (BSO) będącej inhibitorem syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej zaangażowanej w syntezę GSH zwiększało cytotoksyczność CPA i 4-OH-CPA w stosunku do komórek nowotworowych różnych linii komórkowych oraz zwiększało działanie przeciwnowotworowe w badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych [62,92]. Pozytywne i obiecujące wyniki z zastosowaniem BSO doprowadziły do klinicznych prób łącznej aplikacji BSO z przeciwnowotworowymi lekami alkilującymi [118,120]. Uzyskane obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GSH powodowało wzrost cytotoksyczności leków alkilujących, przy czym efekt ten nie był specyficzny tylko w stosunku do komórek nowotworowych, ale równocześnie ze wzrostem efektywności przeciwnowotworowej wzrosła toksyczność objawiająca się m.in. leukopenią i trombocytopenią [118].

#### Antysensowne oligonukleotydy

Strategia antysensownych oligonukleotydów w leczeniu chorych nowotworowo zakłada wybiórcze hamowanie ekspresji genów za pośrednictwem antysensownej degradacji wybranych mRNA i pozwala na zwiększenie skuteczności konwencjonalnych chemioterapeutyków przez zmniejszenie na nie oporności [118,120].

Stwierdzono, że transfer antysensownych oligonukleotydów do linii komórkowej HuCCT1 znacznie obniżał poziom wewnątrzkomórkowego GSTP1 oraz zwiększał wrażliwość tych komórek na działanie leków alkilujących [75].

Wprowadzenie do komórek białaczki K562 i komórek raka płuc A549 antysensownych oligonukleotydów anty-ALDH1 skutkowało zahamowaniem mRNA dla ALDH-1 oraz wzrostem wrażliwości komórek nowotworowych na 4-hydroperoksyklofosfamid i inne leki alkilujące [72].

Zastosowanie antysensownych oligonukleotydów do modyfikacji ekspresji genu *Bcl-2* również okazało się korzystne w regulowaniu oporności na oksazafosforinany. Przykładem obrazującym efektywność działania antysensownych oligonukleotydów modyfikujących poziom antyapoptotycznych białek są badania *in vitro* przeprowadzone na linii komórkowej MCF-7 z zastosowaniem podwójnie swoistego antysensownego oligonukleotydu *Bcl-2/Bcl-XL*. Na podstawie tych badań wykazano, że stosowanie CPA, doksorubicyny i paklitakselu z tym oligonukleotydem powodowało wzrost cytotoksyczności wymienionych leków [90]. Kolejnym interesującym przykładem zastosowania antysensownego oligonukleotydu jest oblimersen sodu, który jest komplementarny do pierwszych sześciu kodonów *bcl-2* mRNA i powoduje obniżenie translacji dla białka *Bcl-2* [46]. Na podstawie badań *in vitro* wykazano, że oblimersen sodu zwiększa apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfatycznej w odpowiedzi na fludarabinę, alemtuzumab i rytuksymab [46]. W badaniach *in vivo*

zaobserwowano, że skojarzenie oblimersenu sodu z CPA wydłużało czas przeżycia myszy z heteroprzeszczepem w porównaniu do monoterapii cyklofosfamidem. Wykazano również, że zwiększał on cytotoksyczność innych leków, takich jak etopozyd, rytuksymab i alemtuzumab stosowanych w leczeniu chłoniaków nieziarniczych [46,118]. Przeprowadzono też wiele badań klinicznych z wykorzystaniem oblimersenu sodu, w tym z udziałem pacjentów z rozpoznaną zaawansowaną przewlekłą białaczką limfocytarną leczonych fludarabiną i cyklofosfamidem oraz pacjentów z rozpoznanymi chłoniakami nieziarniczymi leczonych w schemacie: rytuksymab – cyklofosfamid/doksorubicyna/winkrystyna/prednison [26,46]. Kliniczne badania porównawcze wskazują, że włączenie oligonukleotydów antysensownych do terapii z wykorzystaniem tradycyjnych cytostatyków, w tym cyklofosfamidu może prowadzić do wzrostu ich efektywności z jednoczesną możliwością redukcji dawki, a w konsekwencji do zmniejszenia ich toksyczności [26].

#### Transfer genu cytochromu P450 do tkanki nowotworowej

W wielu typach nowotworów wykryto obecność różnych izoform CYP, w tym: 1A1, 2A6, 2B6, 2C8/9 i 3A4, przy czym ich poziom w tkankach nowotworowych okazał się niższy niż w tkankach prawidłowych [116,118]. Podjęto zatem próby zwiększenia poziomu CYP w tkankach nowotworowych za pomocą transferu odpowiednich genów CYP z użyciem wektorów wirusowych [38,118].

Stworzono defektywny replikacyjny wektor adenowirusowy mający delecję w regionach E1 i E3 (AdenoP450) i wykazujący ekspresję CYP2B6. AdenoP450 znacząco indukował wewnątrzkomórkową hydroksylację CPA i prowokował wzrost jego cytotoksyczności w stosunku do różnych typów nowotworowych linii komórkowych [38]. Znaczący wzrost wrażliwości komórek nowotworowych na CPA uzyskano przez transdukcję ich AdenoP450 w połączeniu z adenowirusem Onyx-017, który wykazywał selektywną replikację w komórkach z niedoborem genu p53. Kombinacja tych adenowirusów spowodowała istotny wzrost transferu genów do ludzkich nowotworowych linii komórkowych i odpowiednio wygenerowała wzrost chemiowrażliwości ludzkich nowotworów w badaniach *in vivo* na zwierzęcych modelach przeszczepów ksenogenicznych [38].

Kolejnym skonstruowanym nośnikiem jest rekombinowany retrowirusowy wektor MetXia-P450, kodujący także gen *CYP2B6* [7,118]. Na podstawie wstępnych badań klinicznych przeprowadzonych z udziałem pacjentów chorych na czerniaka i raka piersi, którzy otrzymywali MetXia-P450 w trzech dawkach łącznie z CPA wykazano, że nośnik ten jest bezpieczny i dobrze tolerowany [7].

#### PODSUMOWANIE

Oksazafosforinany są szeroko stosowaną klinicznie grupą leków przeciwnowotworowych. Do wywołania efektu farmakologicznego wymagają metabolicznej bio-

transformacji, która prowadzi do powstania cytotoksycznych iperytów oraz puli metabolitów toksycznych, w tym urotoksycznej akroleiny oraz nefro- i neurotoksycznego chloroacetaldehydu (CAA). Zatem ważne jest nie tylko poznanie samych związków odpowiedzialnych za toksyczność, ale także mechanizmów tej toksyczności, co może w konsekwencji poprawić skuteczną prewencję. Problem ten jest szczególnie istotny w przypadku pacjentów leczonych wysokimi dawkami CPA lub IFO.

Aktualne wyniki badań wskazują, iż urotoksyczne działanie akroleiny jest związane z wielofazowym mechanizmem prowadzącym do wygenerowania reaktywnych form tlenu (ROS), nadmiernego wytwarzania NO, ekspresji genów dla cytokin TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  oraz powstania wybitnie cytotoksycznego anionu nadtlenuazotynowego (ONOO<sup>-</sup>), odpowiedzialnego m.in. za powstanie pęknięć nici DNA. Uszkodzenia DNA stymulują polimerazę poli-(ADP-rybozy) (PARP) i powodują wyczerpywanie komórkowych zapasów NAD<sup>+</sup> i ATP. Klinicznie najefektywniej i najszerzej wykorzystywanym obecnie lekiem uroprotektynym jest mesna – tiolowy związek wiążący akroleinę.

Z kolei za nefrotoksyczne działanie oksazafosforinianów odpowiedzialny jest chloroacetaldehyd, który blokuje kompleks C-I (oksydoreduktaza NADH:ubichinon) wchodzący w skład mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Zakłada się, że środkiem prewencyjnym pozwalającym na zachowanie integralności łańcucha oddechowego mogłaby być agmatyna (AGM) będąca produktem dekarboksylacji argininy.

CAA jest również odpowiedzialny za neurotoksyczność leków oksazafosforinianowych. W wyniku detoksykacji

CAA powstaje S-karboksymetylocysteina (SCMC), która wchodzi w interakcję z receptorami AMPA/kainianowymi. Jako środek neuroprotektynny proponowany jest błękit metylenowy.

Wydaje się, że oprócz stosowania omówionych klasycznych środków prewencyjnych zabezpieczających pacjenta przed działaniami toksycznymi, ważne byłoby opracowanie schematów leczenia z wykorzystaniem odpowiednich modulatorów metabolizmu CPA i IFO zwłaszcza enzymów układu cytochromu P450/CYP, które prowadziłyby do wzrostu puli metabolitów aktywnych cytotoksycznie i redukcji formowania metabolitów wywołujących działania niepożądane – intoksykacyjnych. Postępy badań stwarzają szansę na dalszą farmakologiczną optymalizację leczenia pacjentów z zastosowaniem leków oksazafosforinianowych.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na jakość i skuteczność terapii oksazafosforinianami jest pojawiająca się na nie oporność. Jej przyczyną może być polimorfizm genowy występujący w obrębie genów cytochromu P450, dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) i S-transferazy glutationowej (GST). Oporność może też być konsekwencją zwiększonej ilości wewnątrzkomórkowego glutationu i białek antyapoptotycznych oraz zdolności naprawczych komórek nowotworowych w stosunku do uszkodzonego DNA. Redukcja oporności może polegać na rozpoznaniu fenotypu metabolizmu indywidualnego pacjenta, na zastosowaniu modulatorów metabolizmu, antysensowych nukleotydów i transdukcji tkanki nowotworowej genem cytochromu P450, w ramach już stosowanych paradigmatów terapeutycznych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Aleksa K., Matsell D., Krausz K., Gelboin H., Ito S., Koren G.: Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr. Nephrol.*, 2005; 20: 872-885
- [2] Ames B., Lewis L.D., Chaffee S., Kim J., Morse R.: Ifosfamide-induced encephalopathy and movement disorder. *Pediatr. Blood Cancer*, 2010; 54: 624-626
- [3] Andersson B.S., Sadeghi T., Siciliano M.J., Legerski R., Murray D.: Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1996; 38: 406-416
- [4] Boddy A.V., Yule S.M.: Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin. Pharmacokinet.*, 2000; 38: 291-304
- [5] Bosanquet A.G., Sturm I., Wieder T., Essmann F., Bosanquet M.I., Head D.J., Dörken B., Daniel P.T.: Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2002; 16: 1035-1044
- [6] Brain E.G., Yu L.J., Gustafsson K., Drewes P., Waxman D.J.: Modulation of P450-dependent ifosfamide pharmacokinetics: a better understanding of drug activation in vivo. *Br. J. Cancer*, 1998; 77: 1768-1776
- [7] Braybrooke J.P., Slade A., Deplanque G., Harrop R., Madhusudan S., Forster M.D., Gibson R., Makris A., Talbot D.C., Steiner J., White L., Kan O., Naylor S., Carroll M.W., Kingsman S.M., Harris A.L.: Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1512-1520
- [8] Bunting K.D., Townsend A.J.: Dependence of aldehyde dehydrogenase-mediated oxazaphosphorine resistance on soluble thiols: importance of thiol interactions with the secondary metabolite acrolein. *Biochem. Pharmacol.*, 1998; 56: 31-39
- [9] Cayre A., Penault-Llorca F., De Latour M., Rolhion C., Feille V., Ferriere J.P., Kwiatkowski F., Finat-Duclos F., Verrelle P.: O(6)-methylguanine-DNA methyl transferase gene expression and prognosis in breast carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2002; 21: 1125-1131
- [10] Chatton J.Y., Idle J.R., Vagbo C.B., Magistretti P.J.: Insights into the mechanisms of ifosfamide encephalopathy: drug metabolites have agonistic effects on  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainate receptors and induce cellular acidification in mouse cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 299: 1161-1168
- [11] Chen G., Teicher B.A., Frei E.3rd: Biochemical characterization of in vivo alkylating agent resistance of a murine EMT-6 mammary carcinoma. Implication for systemic involvement in the resistance phenotype. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1998; 16: 139-155
- [12] Debatin K.M.: Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004; 53: 153-159



- [13] Di Cataldo A., Astuto M., Rizzo G., Bertuna G., Russo G., Incorpora G.: Neurotoxicity during ifosfamide treatment in children. *Med. Sci. Monit.*, 2009; 15: CS22-CS25
- [14] D'Incalci M., Bonfanti M., Pifferi A., Mascellani E., Tagliabue G., Berger D., Fiebig H.H.: The antitumour activity of alkylating agents is not correlated with the levels of glutathione, glutathione transferase and O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase of human tumour xenografts. EORTC SPG and PAMM Groups. *Eur. J. Cancer*, 1998; 34: 1749-1755
- [15] Dole M.G., Jasty R., Cooper M.J., Thompson C.B., Nunez G., Castle V.P.: Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 1995; 55: 2576-2582
- [16] Domen J., Weissman I.L.: Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2. *Exp. Hematol.*, 2003; 31: 631-639
- [17] Dubourg L., Michoudet C., Cochat P., Baverel G.: Human kidney tubules detoxify chloroacetaldehyde, a presumed nephrotoxic metabolite of ifosfamide. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001; 12: 1615-1623
- [18] Ducharme M.P., Bernstein M.L., Granvil C.P., Gehrcke B., Wainer I.W.: Phenytoin-induced alteration in the N-dechloroethylation of ifosfamide stereoisomers. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997; 40: 531-533
- [19] Friedman H.S., Johnson S.P., Colvin O.M.: Cellular mechanisms of cyclophosphamide resistance: model studies in human medulloblastoma cell lines. *Cancer Treat. Res.*, 2002; 112: 199-209
- [20] Friedman H.S., Pegg A.E., Johnson S.P., Loktionova N.A., Dolan M.E., Modrich P., Moschel R.C., Struck R., Brent T.P., Ludeman S., Bullock N., Kilborn C., Keir S., Dong Q., Bigner D.D., Colvin O.M.: Modulation of cyclophosphamide activity by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999; 43: 80-85
- [21] Furlanut M., Franceschi L.: Pharmacology of ifosfamide. *Oncology*, 2003; 65 (Suppl. 2): 2-6
- [22] Gamcsik M.P., Dolan M.E., Andersson B.S., Murray D.: Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Des.*, 1999; 5: 587-605
- [23] Ghiringhelli F., Menard C., Puig P.E., Ladoire S., Roux S., Martin F., Solary E., Le Cesne A., Zitvogel L., Chauffert B.: Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007; 56: 641-648
- [24] Giraud B., Hebert G., Deroussent A., Veal G.J., Vassal G., Paci A.: Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2010; 6: 919-938
- [25] Glazman-Kuśnierczyk H., Matuszyk J., Radzikowski C.: Antitumor activity evaluation of bromine-substituted analogues of ifosfamide. I. Stereodifferentiation of biological effects and selection of the most potent compounds. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1992; 14: 883-911
- [26] Gleave M.E., Monia B.P.: Antisense therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 468-479
- [27] Granvil C.P., Madan A., Sharkawi M., Parkinson A., Wainer I.W.: Role of CYP2B6 and CYP3A4 in the in vitro N-dechloroethylation of (R)- and (S)-ifosfamide in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 1999; 27: 533-541
- [28] Hansen R.J., Ludeman S.M., Paikoff S.J., Pegg A.E., Dolan M.E.: Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. *DNA Repair*, 2007; 6: 1145-1154
- [29] Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005; 45: 51-88
- [30] Howell J.E., Szabatura A.H., Seung A.H., Nesbit S.A.: Characterization of the occurrence of ifosfamide-induced neurotoxicity with concomitant aprepitant. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, 2008; 14: 157-162
- [31] Huang Z., Roy P., Waxman D.J.: Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 59: 961-972
- [32] Hustert E., Zibat A., Presecan-Siedel E., Eiselt R., Mueller R., Fuss C., Brehm I., Brinkmann U., Eichelbaum M., Wojnowski L., Burk O.: Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; 29: 1454-1459
- [33] Ikezawa Y., Nakazawa M., Tamura C., Takahashi K., Minami M., Ikezawa Z.: Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *J. Dermatol. Sci.*, 2005; 39: 105-112
- [34] Imtiaz S., Muzaffar N.: Ifosfamide neurotoxicity in a young female with a remarkable response to thiamine. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2010; 60: 867-869
- [35] Jacot W., Pujol J.L., Chakra M., Molinier O., Bozonnat M.C., Gervais R., Quantin X.: Epirubicin and ifosfamide in relapsed or refractory small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2012; 75: 213-216
- [36] Jarkowski A.3rd: Possible contribution of aprepitant to ifosfamide-induced neurotoxicity. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2008; 65: 2229-2231
- [37] Joensuu H., Kellokumpu-Lehtinen P.L., Huovinen R., Jukkola-Vuorinen A., Tanner M., Kokko R., Ahlgren J., Auvinen P., Pajja O., Helle L., Villman K., Nyandoto P., Nilsson G., Pajunen M., Asola R. i wsp.: Adjuvant capecitabine, docetaxel, cyclophosphamide, and epirubicin for early breast cancer: final analysis of the randomized FinXX trial. *J. Clin. Oncol.*, 2012; 30: 11-18
- [38] Jounaidi Y., Waxman D.J.: Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy. *Cancer Res.*, 2004; 64: 292-303
- [39] Juszkiewicz M., Kleinrok Z., Sawiniec Z.: Pharmacological properties of racemic chlorobromofosfamide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1994; 42: 405-413
- [40] Kameda H.: Treatment of rheumatic diseases: current status and future prospective. Topics: II. Immunosuppressant/antirheumatic drugs; 3. Cyclophosphamide for systemic rheumatic diseases. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 2011; 100: 2918-2923
- [41] Karras A.: Renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Presse Med.*, 2012; 41: 260-266
- [42] Katz A., Epelman S., Anelli A., Gorender E.F., Cruz S.M., Oliveira R.M., Marques L.A.: A prospective randomized evaluation of three schedules of mesna administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1995; 121: 128-131
- [43] Kerbusch T., Jansen R.L., Mathot R.A., Huitema A.D., Jansen M., van Rijswijk R.E., Beijnen J.H.: Modulation of the cytochrome P450-mediated metabolism of ifosfamide by ketoconazole and rifampin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2001; 70: 132-141
- [44] Kerbusch T., de Kraker J., Keizer H.J., van Putten J.W., Groen H.J., Jansen R.L., Schellens J.H., Beijnen J.H.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. *Clin. Pharmacokinet.*, 2001; 40: 41-62
- [45] Kirkin V., Joos S., Zörnig M.: The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1644: 229-249
- [46] Klasa R.J.: Targeting the proapoptotic factor Bcl-2 in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology*, 2004; 18 (Suppl. 13): 25-31
- [47] Klastersky J.: Side effects of ifosfamide. *Oncology*, 2003; 65 (Suppl. 2): 7-10
- [48] Knouzy B., Dubourg L., Baverel G., Michoudet C.: Targets of chloroacetaldehyde-induced nephrotoxicity. *Toxicol. In Vitro*, 2010; 24: 99-107

- [49] Kobylińska K., Kobylińska M., Sobik B.: Pharmacokinetics of (-)-S)-bromofosfamide after intravenous and oral administration in mice. *Arzneimittelforschung*, 2001; 51: 596-599
- [50] Kobylińska K., Koralewski P., Sobik B., Gasiorek M., Kobylińska M.: Pharmacokinetics and toxicity of oral (-)-S)-bromofosfamide in lung cancer patients. *Arzneimittelforschung*, 2001; 51: 600-603
- [51] Korkmaz A., Topal T., Oter S.: Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.*, 2007; 23: 303-312
- [52] Krajka-Kuźniak V.: Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 627-638
- [53] Lawson M., Vasilaras A., De Vries A., Mactaggart P., Nicol D.: Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 2008; 42: 309-317
- [54] Lee B.S., Lee J.H., Kang H.G., Hahn H., Lee J.H., Shin H.Y., Ha I.S., Cheong H.I., Ahn H.S., Choi Y.: Ifosfamide nephrotoxicity in pediatric cancer patients. *Pediatr. Nephrol.*, 2001; 16: 796-799
- [55] Lee K.W., Kim Y.J., Kim J.H., Bang S.M., Chung J.H., Lee J.S.: Two consecutive cases of platinum-refractory pulmonary pleomorphic carcinoma that showed dramatic responses to MAID (mesna, doxorubicin, ifosfamide and dacarbazine) chemotherapy. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2011; 41: 430-433
- [56] Lerch S., Küpfer A., Idle J.R., Lauterburg B.H.: Cerebral formation in situ of S-carboxymethylcysteine after ifosfamide administration to mice: a further clue to the mechanism of ifosfamide encephalopathy. *Toxicol. Lett.*, 2006; 161: 188-194
- [57] Liang J., Huang M., Duan W., Yu X.Q., Zhou S.: Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.*, 2007; 13: 963-978
- [58] Licata F., Li Volsi G., Ciranna L., Maugeri G., Santangelo F.: 5-Hydroxytryptamine modifies neuronal responses to glutamate in the red nucleus of the rat. *Exp. Brain Res.*, 1998; 118: 61-70
- [59] Lim Y.P., Liu C.H., Shyu L.J., Huang J.D.: Functional characterization of a novel polymorphism of pregnane X receptor, Q158K, in Chinese subjects. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005; 15: 337-341
- [60] Lokiec F.: Ifosfamide: pharmacokinetic properties for central nervous system metastasis prevention. *Ann. Oncol.*, 2006; 17 (Suppl. 4): iv33-iv36
- [61] Lokiec F., Santoni J., Weill S., Tubiana-Hulin M.: Phenobarbital administration does not affect high-dose ifosfamide pharmacokinetics in humans. *Anticancer Drugs*, 1996; 7: 893-896
- [62] Lopez S.G., Luderer U.: Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1366-1377
- [63] Ludeman S.M., Gamcsik M.P.: Mechanisms of resistance against cyclophosphamide and ifosfamide: can they be overcome without sacrificing selectivity? *Cancer Treat. Res.*, 2002; 112: 177-197
- [64] Malik I.A., Mehboobali N., Iqbal M.P.: Effect of ifosfamide on intracellular glutathione levels in peripheral blood lymphocytes and its correlation with therapeutic response in patients with advanced ovarian cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997; 39: 561-565
- [65] Mashhadi M.A., Sanadgol H., Keikhaei M.: Ifosfamide nephropathy in patients with sarcoma. *Iran J. Kidney Dis.*, 2011; 5: 238-241
- [66] Mattern J., Eichhorn U., Kaina B., Volm M.: O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity to cyclophosphamide and cisplatin in human lung tumor xenografts. *Int. J. Cancer*, 1998; 77: 919-922
- [67] McCune J.S., Risler L.J., Phillips B.R., Thummel K.E., Blough D., Shen D.D.: Contribution of CYP3A5 to hepatic and renal ifosfamide N-dechloroethylation. *Drug Metab. Dispos.*, 2005; 33: 1074-1081
- [68] Misiura K.: Ifosfamide. Metabolic studies, new therapeutic approaches and new analogs. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2006; 6: 395-400
- [69] Misiura K.: Leki oksazafosforinowe. Poszukiwanie nowych pochodnych, badania metabolizmu i stosowanie nowych strategii terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 463-471
- [70] Moon Y.W., Sohn J.H., Choi H.J., Chang H., Park B.W., Kim S.I., Park S., Koo J.S., Kim Y.T., Roh J.K., Chung H.C., Kim J.H.: Paclitaxel combined with ifosfamide in anthracycline- and docetaxel-pretreated metastatic breast cancer: activity independence of prior docetaxel resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010; 66: 425-431
- [71] Moreb J.S., Gabr A., Vartikar G.R., Gowda S., Zucali J.R., Mohuczy D.: Retinoic acid down-regulates aldehyde dehydrogenase and increases cytotoxicity of 4-hydroperoxycyclophosphamide and acetaldehyde. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005; 312: 339-345
- [72] Moreb J.S., Maccow C., Schweder M., Hecomovich J.: Expression of antisense RNA to aldehyde dehydrogenase class-1 sensitizes tumor cells to 4-hydroperoxycyclophosphamide in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000; 293: 390-396
- [73] Mori M., Murata T., Takei S., Imagawa T., Yokota S.: Acquisition of expanded indications for intravenous cyclophosphamide in the management of childhood rheumatic disease in general. *Mod. Rheumatol.*, 2011; 21: 449-457
- [74] Müller M.R., Buschfort C., Thomale J., Lensing C., Rajewsky M.F., Seeber S.: DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 1997; 3: 2055-2061
- [75] Nakajima T., Takayama T., Miyaniishi K., Nobuoka A., Hayashi T., Abe T., Kato J., Sakon K., Naniwa Y., Tanabe H., Niitsu Y.: Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase- $\pi$ -specific inhibitor O1-hexadecyl- $\gamma$ -glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003; 306: 861-869
- [76] Nissim I., Horyn O., Daikhin Y., Nissim I., Lazarow A., Yudkoff M.: Regulation of urea synthesis by agmatine in the perfused liver: studies with 15N. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2002; 283: 1123-1134
- [77] Nissim I., Horyn O., Daikhin Y., Nissim I., Luhovyy B., Phillips P.C., Yudkoff M.: Ifosfamide-induced nephrotoxicity: mechanism and prevention. *Cancer Res.*, 2006; 66: 7824-7831
- [78] Papa S., Scacco S., Sardanelli A.M., Petruzzella V., Vergari R., Signorile A., Technikova-Dobrova Z.: Complex I and the cAMP cascade in human physiopathology. *Biosci. Rep.*, 2002; 22: 3-16
- [79] Pelgrims J., De Vos F., Van den Brande J., Schrijvers D., Prové A., Vermorken J.B.: Methylene blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature. *Br. J. Cancer*, 2000; 82: 291-294
- [80] Polyzos A., Tsavaris N., Gogas H., Lagadas A., Polyzos K., Gianakopoulos K., Felekouras E., Tsigris C., Karatzas T., Papadopoulos O., Giannopoulos A.: Cisplatin-ifosfamide-gemcitabine as salvage chemotherapy in ovarian cancer patients pretreated with platinum compounds and paclitaxel. *Anticancer Res.*, 2009; 29: 2681-2686
- [81] Preuss I., Thust R., Kaina B.: Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer*, 1996; 65: 506-512
- [82] Quezado Z.M., Wilson W.H., Cunnion R.E., Parker M.M., Reda D., Bryant G., Ognibene F.P.: High-dose ifosfamide is associated with severe, reversible cardiac dysfunction. *Ann. Intern. Med.*, 1993; 118: 31-36
- [83] Rekha G.K., Devaraj V.R., Sreerama L., Lee M.J., Nagasawa H.T., Sladek N.E.: Inhibition of human class 3 aldehyde dehydrogenase, and sensitization of tumor cells that express significant amounts of this enzyme to oxazaphosphorines, by chlorpropamide analogues. *Biochem. Pharmacol.*, 1998; 55: 465-474
- [84] Richardson M.E., Siemann D.W.: DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res.*, 1995; 55: 1691-1695

- [85] Salminen E.K., Sundström J., Nikkanen V.: Palliative chemotherapy with ifosfamide in advanced prostate cancer. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 539-542
- [86] Schwartz P.S., Waxman D.J.: Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60: 1268-1279
- [87] Schwerdt G., Gordjani N., Benesic A., Freudinger R., Wollny B., Kirchhoff A., Gekle M.: Chloroacetaldehyde- and acrolein-induced death of human proximal tubule cells. *Pediatr. Nephrol.*, 2006; 21: 60-67
- [88] Sharpe J.C., Arnoult D., Youle R.J.: Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1644: 107-113
- [89] Shin Y.J., Kim J.Y., Moon J.W., You R.M., Park J.Y., Nam J.H.: Fatal ifosfamide-induced metabolic encephalopathy in patients with recurrent epithelial ovarian cancer: report of two cases. *Cancer Res. Treat.*, 2011; 43: 260-263
- [90] Simoes-Wüst A.P., Schurpf T., Hall J., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U.: Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002; 76: 157-166
- [91] Singh N., Nigam M., Ranjan V., Sharma R., Balapure A.K., Rath S.K.: Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 2009; 109: 473-485
- [92] Sipos E.P., Witham T.F., Ratan R., Burger P.C., Baraban J., Li K.W., Piantadosi S., Brem H.: L-buthionine sulfoximine potentiates the antitumor effect of 4-hydroperoxycyclophosphamide when administered locally in a rat glioma model. *Neurosurgery*, 2001; 48: 392-400
- [93] Siu L.L., Moore M.J.: Use of mesna to prevent ifosfamide-induced urotoxicity. *Support. Care Cancer*, 1998; 6: 144-154
- [94] Sladek N.E., Kollander R., Sreerama L., Kiang D.T.: Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002; 49: 309-321
- [95] Sladek N.E., Landkamer G.J.: Restoration of sensitivity to oxazaphosphorines by inhibitors of aldehyde dehydrogenase activity in cultured oxazaphosphorine-resistant L1210 and cross-linking agent-resistant P388 cell lines. *Cancer Res.*, 1985; 45: 1549-1555
- [96] Slattery J.T., Kalthorn T.F., McDonald G.B., Lambert K., Buckner C.D., Binsinger W.I., Anasetti C., Appelbaum F.R.: Conditioning regimen-dependent disposition of cyclophosphamide and hydroxycyclophosphamide in human marrow transplantation patients. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14: 1484-1494
- [97] Sloderbach A., Hładoń B., Sochacki M., Kinas R., Kuśnierczyk H., Laskowska H.: Pharmacokinetic-stereoselective differentiation of some isomeric analogues of ifosfamide. *Pol. J. Pharmacol.*, 1997; 49: 463-469
- [98] Sophos N.A., Vasiliou V.: Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.*, 2003; 143-144: 5-22
- [99] Springate J., Taub M.: Ifosfamide toxicity in cultured proximal renal tubule cells. *Pediatr. Nephrol.*, 2007; 22: 358-365
- [100] Springer J.B., Colvin M.E., Colvin O.M., Ludeman S.M.: Isophosphoramidate mustard and its mechanism of bisalkylation. *J. Org. Chem.*, 1998; 63: 7218-7222
- [101] Sreerama L., Rekha G.K., Sladek N.E.: Phenolic antioxidant-induced overexpression of class-3 aldehyde dehydrogenase and oxazaphosphorine-specific resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 1995; 49: 669-675
- [102] Stec W.J., Radzikowski C., Szelejowski W., Kinas R., Misiura K., Gryniewicz G., Grodner J., Kuśnierczyk H., Kutner A., Pilichowska S.: Sposób wytwarzania N-acylowych pochodnych 1,3,2- oksazafosforinanu. Patent RP 149593
- [103] Stec W.J., Radzikowski C., Szelejowski W., Kinas R., Misiura K., Gryniewicz G., Grodner J., Kuśnierczyk H., Kutner A., Pilichowska S.: Sposób wytwarzania pochodnych 1,3,2- oksazafosforinanu. Patent RP 150330
- [104] Sweiss K.I., Beri R., Shord S.S.: Encephalopathy after high-dose ifosfamide: a retrospective cohort study and review of the literature. *Drug Saf.*, 2008; 31: 989-996
- [105] Takada K., Arefayene M., Desta Z., Yarboro C.H., Boumpas D.T., Balow J.E., Flockhart D.A., Illei G.G.: Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 2202-2210
- [106] Thress K., Kornbluth S., Smith J.J.: Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1999; 31: 321-326
- [107] Tsujimoto Y., Shimizu S.: Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.*, 2000; 466: 6-10
- [108] Vasiliou V., Pappa A.: Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology*, 2000; 61: 192-198
- [109] Vester U., Kranz B., Zimmermann S., Büscher R., Hoyer P.F.: The response to cyclophosphamide in steroid-sensitive nephrotic syndrome is influenced by polymorphic expression of glutathione-S-transferases-M1 and -P1. *Pediatr. Nephrol.*, 2005; 20: 478-481
- [110] Wang H., Faucette S., Sueyoshi T., Moore R., Ferguson S., Negishi M., LeCluyse E.L.: A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 14146-14152
- [111] Waxman D.J., Schwartz P.S.: Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy. *Cancer Res.*, 2003; 63: 8563-8572
- [112] Woodland C., Ito S., Granvil C.P., Wainer I.W., Klein J., Koren G.: Evidence of renal metabolism of ifosfamide to nephrotoxic metabolites. *Life Sci.*, 2000; 68: 109-117
- [113] Xie H., Griskevicius L., Stahle L., Hassan Z., Yasar U., Rane A., Broberg U., Kimby E., Hassan M.: Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006; 27: 54-61
- [114] Yamaguchi M., Suzuki R., Kwong Y.L., Kim W.S., Hasegawa Y., Izutsu K., Suzumiya J., Okamura T., Nakamura S., Kawa K., Oshimi K.: Phase I study of dexamethasone, methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide (SMILE) chemotherapy for advanced-stage, relapsed or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma and leukemia. *Cancer Sci.*, 2008; 99: 1016-1020
- [115] Yaseen Z., Michoudet C., Baverel G., Dubourg L.: Mechanisms of the ifosfamide-induced inhibition of endocytosis in the rat proximal kidney tubule. *Arch. Toxicol.*, 2008; 82: 607-614
- [116] Yu L.J., Matias J., Scudiero D.A., Hite K.M., Monks A., Sausville E.A., Waxman D.J.: P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; 29: 304-312
- [117] Yule S.M., Boddy A.V., Cole M., Price L., Wyllie R., Tasso M.J., Pearson A.D., Idle J.R.: Cyclophosphamide metabolism in children. *Cancer Res.*, 1995; 55: 803-809
- [118] Zhang J., Tian Q., Chan S.Y., Duan W., Zhou S.: Insights into oxazaphosphorine resistance and possible approaches to its circumvention. *Drug Resist. Updat.*, 2005; 8: 271-297
- [119] Zhang J., Tian Q., Zhou S.F.: Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Curr. Drug Ther.*, 2006; 1: 55-84
- [120] Zhang J., Tian Q., Zhu Y.Z., Xu A.L., Zhou S.F.: Reversal of resistance to oxazaphosphorines. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006; 6: 385-407

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.