ФАРМАЦИЯ
PHARMACIA

Том/Volume LVII **2010** **Книжка/Number 1-4**

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Адрес на редакицията
Фармацевтичен факултет
ул.. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4
Гл. редактор: ✆ (02) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board
Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4
Editor in Chief: ✆(+359 2) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Оригинални статии

Обзори

C O N T E N T S

Original articles

Reviews

ФАРМАЦИЯ 1-4/2010
ISSN 0428-0296 УДК 615

Организационен секретар *Св. Цветанова*
Стилова редакция *Св. Цветанова и д-р Б. Станчева (на англ. ез.)*
Корекция *Св. Цветанова*
Терминологичен и семантичен контрол *д-р Б. Станчева*
Форматиране *О. Маркова*

Подписана за печат на 11.02.2011 г.
Печатни коли 11.5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски" № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

BENDAMUSTINE, АЛКИЛИРАЩИ ЦИТОСТАТИЦИ И МОЛЕКУЛНИ МИШЕНИ

А. Костовски и М. Караиванова

Катедра ”Фармакология, фармакотерапия и токсикология”, Фармацевтичен факултет
Медицински университет – София

Резюме. Наред с развитието на медицината и увеличаване продължителността на живота на хората, злокачествените заболявания бележат тенденция към увеличаване на честотата и намаляване на възрастовата граница. Лечението им е комплексно, трудоемко и изисква високо подготвени кадри. Един от методите, които успешно се прилагат като част от комплексното лечение, е химиотерапията. Необходимо е тя да осигури максимален антинеопластичен ефект при възможно минимално засягане на бързо пролифериращите здрави тъкани. При алкилиращата цитостатична терапия се елиминират само част от туморните клетки, които са навлезли в клетъчния цикъл. И независимо от напредъка в лечението на туморите, на днешния етап може да се прецени, че с конвенционалната терапия не се постига задоволителен терапевтичен резултат и има болни, които не се повлияват въобще от стандартно възприетото лечение. Това определя необходимостта от търсене на нови лекарства с възможен друг механизъм на действие или ефект при неподдаващите се на стандартното лечение заболяваня.

Ключови думи: bendamustine, алкилиращи цитостатици, молекулярни мишени

BENDAMUSTINE, ALKYLATING ANTINEOPLASTIC DRUGS AND MOLECULAR TARGETS

A. Kostovski and M. Karaivanova

Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Faculty of Pharmacy,
Medical University – Sofia

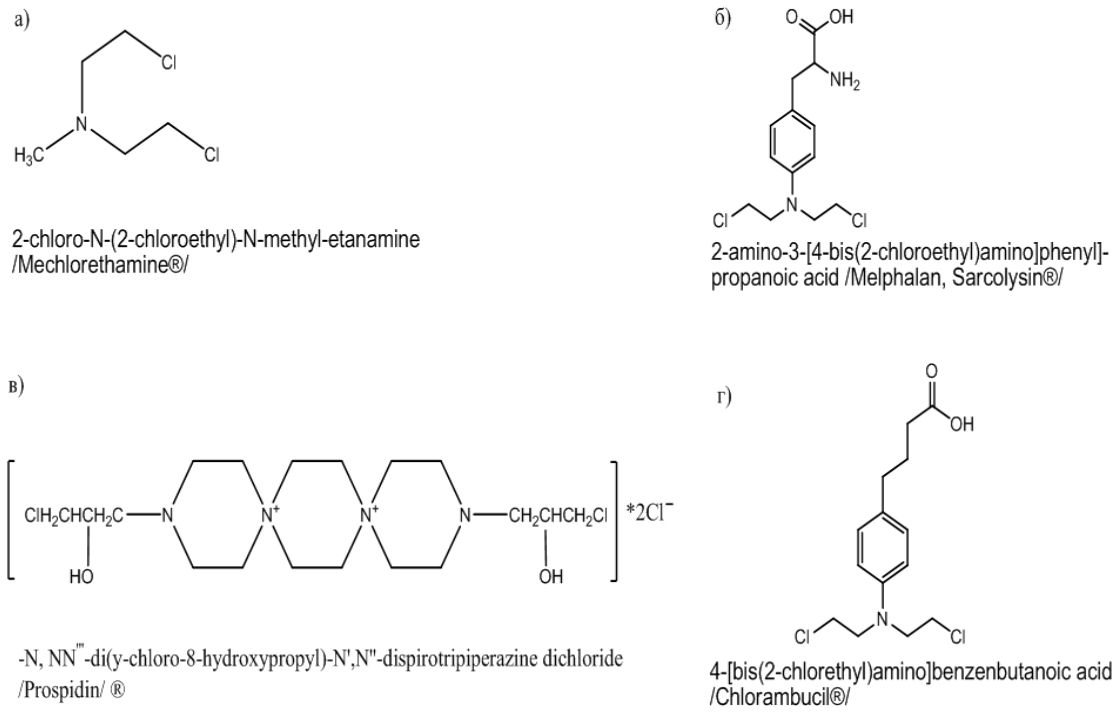
Summary. Along with the development of medicine and increasing life expectancy, malignant diseases show a trend for increasing the frequency and decreasing the age limit. Their treatment is complex, expensive and requires highly trained personnel. One of the methods which are successfully applied as part of complex treatment is chemotherapy. It is necessary to provide maximum possible antineoplastic effect and minimal adverse effect on rapidly proliferating normal tissues. The alkylating cytostatic chemotherapy is capable to eliminate only a fraction of tumor cells that have entered the cell cycle. And despite the progress in the treatment of tumors, at present can be considered that conventional therapy does not achieve satisfactory therapeutic results and there are patients who do not respond at all of the standard treatment. This determines the need to search for new drugs with another possible mechanism of action or effect in not suitable for standard treatment conditions.

Key words: bendamustine, alkylating agents, molecular targets

Развитие на химиотерапията

За първи път през 1942 г. успешно се прилага първият цитостатик Mechloretamine (Nitrogen Mustard) (фиг. 1а), с което се бележи началото на противотуморната химиотерапия. По-късно са създадени редица нови аналози, наричани азотни иприти. Създават се и нови групи алкилиращи цитостатици, като производните на нитрозоурея-та, платиновите комплекси и други. Основен недостатък на алкилиращите цитостатици е тяхната малка терапевтична ширина и цитотоксичността им, засягаща не само туморните клетки, но и всички бързопролифериращи нормални клетки.

По идея на Л. Ф. Ларионов през 60-те години на XX век са създадени аналози на Mechloretamine, съдържащи аминокиселини, различни метаболити и хетероциклични съединения-носители на хлоретиламиновите цитотоксични групи. Това са Melphalan (Sarcolysin) (фиг. 1б) (с носител L- или LD-фенилаланин), Prospidin (фиг. 1в). (с носител трициклична пиперазинова система) и Chlorambucil (фиг. 1г) (с носител фенил-маслена киселина).



Фиг. 1. *Химични структури на алкилиращи цитостатици*

Фиг. 2. *Химична структура на Bendamustine*

Развитието на химиотерапията и търсенето на нови по-безопасни и по-ефективни цитостатици води до синтезирането на Bendamustine (фиг. 2) от Ozegovski и сътр. [48] в Йена, Германия. В ГДР е бил известен още като Cytostasan® [57, 24]. От 1993 г. Bendamustine е на фармацевтичния пазар под търговската марка Ribomustin®, а от 2008 г. Treanda® [65] за Северна Америка. Представлява добре разтворима във вода, заместена бензимидазол-алканкарбоксилна киселина, действаща като двуфункционален алкилиращ цитостатик [47].

Механизмът на действие се състои в трансформация на азотипритната група до електрофилни алкилови групи, които ковалентно се свързват с нуклеофилните функционални групи на ДНК молекулата (едно- и двуверижни вшивания, cross-linking) и образуват по-стабилни комплекси в сравнение с другите алкилиращи цитостатици (Cyclophosphamide, Cisplatin, Carmustine) [64, 35].

Причиненото ДНК увреждане от страна на алкилиращи агенти е свързано с индукция на некротичен тип клетъчна смърт [70]. Анализът на научните данни показва, че при ковалентното свързване с ДНК молекулата, се засягат както пролифериращите, така и туморните клетки, намиращи се в покой (G_0) [35]. Bendamsutine самостоятелно [30, 60] или в комбинация с други цитостатици индуцира апоптоза [9], засяга ДНК възстановяването, специфично регулира транскрипцията и посттранскрипцията на гени, отговорни за апоптозата, и участва в митотичните

процеси [36]. Във връзка с тези стабилни комплекси се обяснява отсъствието на кръстосана резистентност спрямо другите алкилиращи съединения като Cyclophosphamide или Chlorambucil [28].

Вътреклетъчни мишени, протеини и ензимни системи

Leoni и сътр. (2008), използвайки тест-системата на Националния американски противораков институт (NIH, In Vitro Cell Line Screening Project, IVCLSP), провеждат *in vitro* изследване за степента на чувствителност на клетъчните тест-системи към Bendamsutine, Melphalan, Chlorambucil и към активния метаболит на Cyclophosphamide, Phosphoramide mustard и докладват за сходна чувствителност на туморноклетъчните тест-ситеми към Melphalan, Chlorambucil и Phosphoramide mustard [36]. Профилът на химиочувствителността на туморните клетъчни линии към Bendamustine не съвпада с този на типичните алкилиращи цитостатици. Досега не е изяснено дали наличието на бензимидазолов пръстен в молекулата на Bendamustine обуславя допълнителни антиметаболитни свойства като пуринов аналог. Leoni и сътр. (2008) докладват наличието на топоизомеразна ихибиция, подобна на тази на антрациклиновите противотуморни антибиотици, както и антиметаболитна активност, подобна на Ara-AC (Fazarabine). Изследвани са и редица други показатели, като ДНК увреждане и стрес [GO6974], клетъчна пролиферация [GO8283], регулация на биологични процеси [GO50789] и на клетъчни процеси [GO50794] [36].

Сравнението между Bendamustine и Chlorambucil показва сходство само в два биологични процеса: при регулация на биологичните процеси [GO50789] и на клетъчните процеси [GO50794] [37]. Bendamustine участва по различен начин и при процесите на регулация на апоптозните пътища, в сравнение с класическите алкилиращи цитостатици. Голяма част от про-апоптозните гени притежават p53 протеин регулиращ участък, който се индуцира от Benamustine. За сравнение Chlorambucil-индуцираната експресия на p53 е сравнително малка, а при Phosphoramide mustard напълно отсъства [36].

p53 протеин

През 1979 г. група вирусолози откриват ядрения фосфопротеин p53 при изследване на CB40-вирус трансформирани клетки на хамстер [8, 31, 34, 38]. Reich и Levine през 1984 г. доказват зависимост и участие на протеина в клетъчния цикъл в прехода от G1/S фазата [42, 53]. През 1986 г. Calabretta и сътр. наблюдават постоянни нива на p53 mRNA, с което се потвърждава участието и регулацията на p53 в клетъчния цикъл [6].

Локализацията на протеина при различните биологични видове е в различни хромозоми. При хората е локализиран в късото рамо на 17-а хромозома [44]. В нормалните соматични клетки нивото на експресия на протеин p53 е ниско. Увреждането на ДНК или други стресови сигнали (хипоксия, хипероксия, термични нарушения) покачва нивото на експресия, фосфорилира се протеинът [2], при което се реализират три основни ефекта: спиране на клетъчния растеж, ДНК възстановяване или апоптоза.

Фунции на p53 и значението за клетъчните процеси

Спирането на клетъчния растеж има значение за възстановяването на вече увредената ДНК молекула. По време на „задържането на растежа" p53 с помощта на циклин-зависимия киназен инхибитор $p21^{waf-1}$ CDK може да активира транскрипционни протеини с цел възстановяване на ДНК увреждането [2, 41, 29, 33]. Ако увреждането е необратимо, се отключва апоптозния каскаден път с участието на bax, DR5, p53AIP, PIDD, NOXA, PUMA, Fas/APO-1, [2, 45, 46, 49, 26]. Механизмите, с които p53 селективно инхибира и активира определен път, са обект на интензивни проучвания [2, 61]. Клетъчното ниво на p53 се поддържа в динамично равновесие между различните транскрипционни фактори и регулаторни протеини [2]. Свръхекспресията може да отключи процеси на клетъчно стареене и усилена апоптоза. Основен регулатор е Mdm2 (убиквитин лигаза) човешки прото-онкоген [2], който активира разрушаването на p53 чрез блокиране на транскрипционната му активност и цитоплазмено разграждане на протеина чрез убиквитиновата система [17].

Регулациа на p53

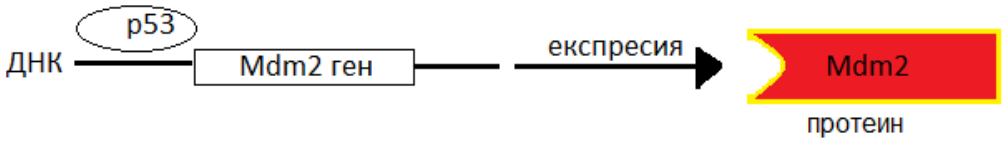
p53 е основно регулиран от Mdm2 и ATM, схематично представени на фигурите: 3-6.

За преминаването на клетката към S-фазата на клетъчния цикъл е необходим ензимът Cdk2 (циклин-зависима киназа) [66], който може да бъде инхибиран от p21-циклин-зависим киназен инхибитор [18]. В процеса на прогресията на клетъчния цикъл в M фаза, ензимът Cdk2 може да бъде инхибиран освен чрез p21 и чрез

GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage) [15], или от функционално различни сигнални протеини, кинази, фосфатази и трансмембранни рецептори [43]. p53 регулира експресията на тези инхибиращи протеини и предизвиква инхибиране на клетъчния цикъл (Фиг. 8).

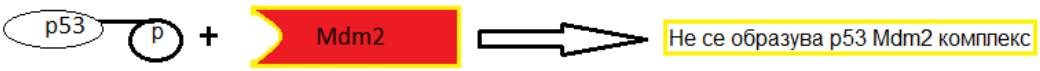
Апоптоза може да бъде предизвикана и чрез свързване на каспаза 9 с цитохром С и Apaf1 (Apoptotic peptidase activator factor 1), (Фиг. 9) [67]. p53 може да активира и експресията на Apaf1 и Bax (проапоптозни фактори) и с това да активира митохондриалния апоптозен път [67].

Схема на регулацията на p53 по данни на Dania Alarcon-Vargas и Ze'ev Ronai [2, 69]

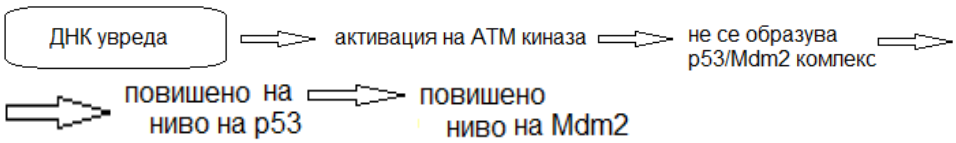


Фиг. 3. *Експресията на Mdm2, причинена от p53*

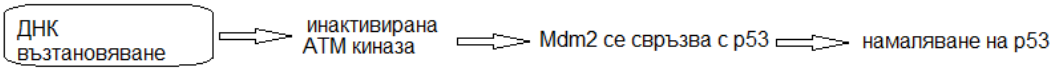
Фиг. 4. *Образуваният комплекс между p53 и Mdm2 активира убиквитиновата система, водеща до разграждане на p53*



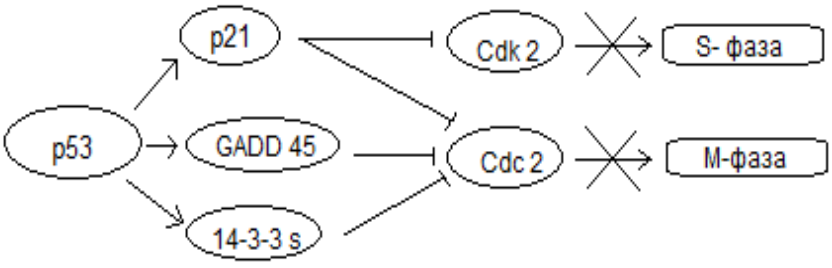
Фиг. 5. Фосфорилирането на p53 на позиция серин 15, треонин 18 и серин 20 нарушава свързването с Mdm2. В нормалните клетки трите аминокиселинни остатъка не са фосфорилирани и нивото на p53 протеин остава ниско, съответно на ниското ниво на Mdm2



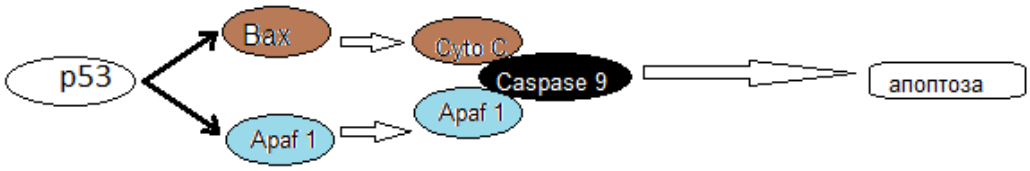
Фиг. 6. *ДНК увреждането може да активира протеинкинази (ATM, DNA-PK или CHK2), които да фосфорилират трите аминокиселинни остатъка на протеин p53 и да повишат нивото му. Повишеното ниво на p53 повишава нивото на Mdm2, но не настъпва разграждане на p53, защото протеинът е фосфорилиран*



Фиг. 7. *След възстановяване на ДНК увредата, ATM киназите са неактивни, p53 се дефосфорилира и взаимодейства с Mdm2, поради което нивото на p53 е по-ниско*



Фиг. 8. *Инхибиращи прототеини на клетъчния цикъл*



Фиг. 9. *Механизъм за апоптоза с участието на цитохром С и Apaf 1*

АТ мутация и регулацията на p53

ATM, Ataxia telangiectasia (AT-Mutation) е рядко, наследствено (автозомно-рецесивно), невродегенеративно хронично заболяване, увреждащо мозъчните мотоневрони и центъра на говора. Като термин е съвкупност от две основни заболявания – атаксия (затруднено движение и координация) и телеангиектазии (разширени кръвоносни съдове). Проявява се в ранна детска възраст и заболелите умират в пубертета или в ранна младост. Характерна е чувствителността на болните към йонизиращо лъчение, рентгенови лъчи и склонността да развиват малигнени заболявания.

През 1995 г. K. Savitsky и сътр. [55] изолират гена, отговорен за заболяването. Мутацията, предизвикваща заболяването, се намира в дългото рамо на 11-а хромозома от 11q22-23 [5]. Структурно ATM принадлежи към семейството фосфатидилинозитол-3 кинази, участващи в процеса на възстановяване на ДНК, като фосфорилират различни протеини, между които и свързващия p53 (53BP1) и по този начин участват в контрола на клетъчния цикъл [68]. Една от основните функции е подпомагане на клетъчните системи в разпознаване на увреждането на веригите на ДНК, с което се създават условия за апоптоза. ATM делеции или инактивиране са намерени в B-клетките на болни с ХЛЛ и те се възприемат като причина за неуспеха на химиотерапията и кратката преживяемост на болните [11, 12, 51, 62, 63, 68].

Bendamustine се отличава от останалите алкилиращи цитостатици и по влиянието си върху процеса на ДНК възстановяването, определено при клетъчна линия с произход от неходжкинов лимфом.

Генът *exonuclease-1* (EXO1), който е намерен при анализа на гени GO3, е индуциран 2,5 пъти по-силно в сравнение с Phosphoramide mustard (1,5 пъти) и Chlorambucil (1,8 пъти). Репаративните ДНК процеси несъмнено имат важно значение за чувствителността/резистентността на ДНК молекулата към алкилиране. Тези данни дават съществена информация за разликите в ефектите на Bendamustine спрямо Chlorambucil и Phosphoramide mustard по отношение на ДНК възстановяването [36].

Ензимът APE *(apurinic/apyrimidinic endonuclease)* е основният ензим, заменящ увредените ДНК бази [13]. За доизясняване на този механизъм Lorenzo Leoni и сътр. (2008) изследват Bendamustine и останалите алкилиращи цитостатици в присъствие на Methoxyamine-специфичен инхибитор на ДНК репарацията [36]. Methoxyamine се свързва специфично на мястото на увредения участък и инхибира APE активноста над 300 пъти [25]. В присъствие на Methoxyamine върху клетъчна линия Raji (с произход от лимфом на Бъркит) и SU-DHL-1 (човешки анапластичен едроклетъчен лимфом) Leoni и сътр. установяват около 6 пъти по-малка стойност на IC_{50} при Raji клетки и 4 пъти по-малка стойност при SU-DHL-1 клетките след добавяне на Methoxyamine. За сравнение стойностите на IC_{50} на Phosphoramid mustard не се променят. Тези данни за първи път показват, че Bendamustine повлиява по различен от останалите алкилиращи цитостатици начин репарацията на увредения участък [36].

ДНК репариращият ензим *O^6-alkylguanine-DNK alkyl transferase* е основен протеин, който протектира клетките от токсичните ефекти на алкилиращи цитостатиците. Leoni и сътр. (2008) изследват цитотоксичната активност на Phosphoramid mustard и Bendamustine върху клетъчни линии SU-DHL-1 и Raji в присъствие на алкилгуанил трансферазния инхибитор *O^6-benzylguanine*, при което цитотоксичноста на Phosphoramid mustard се увеличава при двете клетъчни линии, докато при Bendamustine не се наблюдава усилване на цитотоксичността. Тези данни позволяват на авторите да направят заключението, че Bendamustine за разлика от останалите алкилиращи цитостатици не реализира алкилтрансферазен механизъм на ДНК репарация [36]. Bendamustine при SU-DHL-1 клетките предизвиква потискане на иРНК за гените на Aurora Kinase A и Cyclin B1 (есенциално важни за регулация на митозата) [3, 10, 20, 37, 39, 40,

56] в рамките на 60-80%, докато Chlorambucil и Phosphoramid mustard я засягат в малка степен [36]. Leoni и сътр. [36] докладват, че Bendamustine предизвиква както апоптоза, така и митотична „катастрофа" в присъствие на zWAD-fmk (пан-каспазен инхибитор) върху клетъчната линия MCF-7/ADR (мултирезистентна клетъчна линия с произход от карцином на млечната жлеза) и при RKO-E6 (p53 дефицитна клетъчна линия с произход от карцином на дебелото черво). С активирането на алтернативни клетъчни „смъртни" сигнални пътища заедно със силната индукция на апоптоза се обяснява ефективността на Bendamustine при лекарственорезистентните клетъчни линии [37] и при пациентите с лекарственорезистентен лимфом [16]. Редица автори описват митотичната „катастрофа" като процес на некротична клетъчна смърт, настъпваща по време на метафазата от клетъчното делене. Микроскопски след оцветяване с флуоресцентното багрило 4',6-diamidino-2-phenylindole са наблюдавани хроматинова кондензация (натрупване на хромозоми или хромозомни фрагменти, които не са преразпределени към новото ядро) или присъствие на повече ядра с подобна или различна големина [32]. Предполага се, че липсата на функциониращ p53 протеин или наличието на блокирана каспаза-зависима апоптоза са причините за митотична „катастрофа" [7].

Клинично приложение

Schnabel и сътр. (1967) показват, че Bendamustine има сравнима с тази на Cyclophosphamide активност при мишите туморни модели: левкемия LAJ1, сарком 180 и асцитен тумор на Ehrlich [57]. Stumberg и сътр. (1996) установяват и наличието на непълна кръстосана резистентност с други алкилиращи цитостатици, като Cyclophosphamide, Melphalane и Carmustine [64]. Schwaenen и сътр. са изследвали in vitro индуцирането на апоптоза от Bendamustine и Fludarabine самостоятелно и в комбинация при B-клетъчни линии от CLL. Авторите доказват и наличието на синергизъм по отношение на индуцирането на програмирана клетъчна смърт на комбинацията Bendamustine с Fludarabine в сравнение със самостоятелното им приложение [59]. Първите клинични проучвания показват, че Bendamustine е поне толкова ефективен, колкото Cyclophosphamide [23]. Друго клинично проучване при пациенти с болест на Hodgkin установява, че комбинираната терапия с Bendamustine е еквиефективна в сравнение със схемата CVPP (Cyclophosphamide + Vinblastine + Procarbazine + Prednisolone), но по-добре поносима [22]. Алопеция се наблюдава сравнително рядко при провеждане на монотерапия. Комбиниран с други цитостатици, Bendamustine показва сравнително добра поносимост, което е необходимо за повишаване качеството на живот на болния [54]. Установенни са данни за обратима лимфо- и гранулоцитопения. Тромбоцитопения се наблюдава често дори и при монотерапия с Bendamustine. Времето за регенерация на костния мозък е средно между 3-5 седмици след химиотерапията. Имуносупресираните пациенти е възможно да проявят и опортюнистични инфекции, особено с Herpes zoster. Статистически значимо и често срещано е и понижаването на хемоглобина и проявата на анемия при болния. Наблюдавани са и хемолитични анемии в отделни случаи [54]. Клиничните проучвания при пациенти с химиорезистентни неходжкинови лимфоми определят ролята на Bendamustine като втора/трета линия терапевтично средство [4, 21, 19]. Kahl и сътр. (2010) установяват чрез многоцентрово клинично проучване, че Bendamustine успешно повлиява Rituximab-резистентни неходжкинови лимфоми [27].

Според проучванията на Anger и сътр. при пациенти с CLL се установяват занчими предимства на Bendamustine в сравнение с Cyclophosphamide по отношение на терапевтичния отговор [1]. По-добър терапевтичен ефект се постига с Bendamustine и при пациенти с мултиплен миелом в сравнение със стандартната терапия с мелфалан [50]. Bendamustine е ефективно средство в комбинираната терапия и на карцином на млечната жлеза, като увеличава процента на ремисиите и тяхната продължителност [14]. Провеждат се клинични проучвания и при пациенти с бронхиални и гастроинтестинални тумори [52, 58].

Обобщение на литературни данни

Цитостатиците с алкилиращ механизъм на действие от типа на бис-2-хлоретиламините унищожават само част от бързо пролиферащите малигнени клетки и не са в състояние да инхибират вътреклетъчните биохимични пътища и предаването на патологичната информация за злокачествен растеж. В този смисъл цитостатици, които индуцират апоптоза, представляват

ценни терапевтични средства и специално в случаите на лимфопролиферативните заболявания, където фракцията на неделящи се клетки е помалка. Проучванията върху апоптозните механизми на алкилиращи цитостатици изясняват в значителна степен предимствата на някои от тях чрез стимулация на молекули на апоптозните сигнални пътища. В това отношение Bendamustine е описан с уникален и различен от класическите цитостатици механизъм на действие. Намерени са важни разлики във връзка с влиянието му върху митохондриалния апоптозен път по отношение на ДНК възтановителните процеси и спрямо клетъчната митоза. И макар че дефинитивно няма категорични заключения за фармакодинамиката на Bendamustine, наличните научни данни позволяват да се приеме, че лекарството постига по-изразена цитотоксичност и инхибира резистентни туморноклетъчни популации благодарение на влиянието си върху вътреклетъчните сигнални пътища. От предклиничните и клиничните проучвания се потвърждават данните за по-изразен противотуморен ефект на Bendamustine при лимфопролиферативни заболявания и множествен миелом в сравнение с Cyclophosphamide. Неговата ефективност при резистентни туморни модели дава основание да се комбинира с различни цитостатици, малки молекули или хормони. Разрешаването на Bendamustine за клинични поручвания се базира върху данните за уникалния механизъм на действие и инхибицията на резистентни към химиотерапия модели. Тепърва предстои да бъде преценен неговият спектър на действие при тумори с различен произход. Предстои да бъде оценен терапевтичният ефект на различни комбинации с компонент Bendamustine в по-дългорочен план. И макар че внедряването на лекарството в клиничната практика има сравнително дълга история на химични и експериментални изследвания, днес се очертава перспективността на нови алкилиращи молекули, които благодарение на модифицираната структура не само увреждат ДНК молекулата, но и оказват коригиращо влияние върху биомолекулите на вътреклетъчните сигнални пътища. Функцията на p53 е важна за регулацията на клетъчния растеж. При редица тумори е доказано наличие на дефектен ген 53. Търсят се възможности за повлияване на инхибиращите протеини с цел индукция на апоптоза.

Библиография

1. Agner, G. et al. Vergleichsuntersuchungen zwischen Cytostasan und Cyclophosphamid bei der chronischen Lymphadenose, dem Plasmozytom, der Lymphomagranulomatose und dem Bronchialkarzinom. – Dtsch. Gesundheitswesen, **30/27**, 1975, 1280-1285.
2. Alarcon-Vargas, D. et Z. Ronai. p53-Mdm2-the affair that never end. – Carcinogenesis, **23**, 2002, № 4, 541-547.
3. Blagden, S. et J. de Bono. Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. – Curr. Drug Targets, **6,** 2005, 325-335.
4. Bremer, K. High rates of long-lasting remissions after 5-day bendamustine chemotherapy cycles in pre-treated low-grade non-Hodgkin's-lymphomas. – J. Cancer Res. Clin. Oncol., **128**, 2002, № 11, 603-609.
5. Bullrich. F. et al. ATM Mutation in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. – Cancer Res., **59**, 1999, № 1, 24-27.
6. Calabretta, B. et al. Growth-dependent expression of human Mr 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells. – Cancer Res., **46**, 1986, № 11, 5738-5742.
7. Castedo, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. – Oncogene, **23**, 2004, 2825-2837.
8. Chang, C. et al. Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. – J. Virol., **31**, 1979, № 2, 463-471.
9. Chow, K. U. et al. Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in lymphoma cells are associated with down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), prostate-apoptosis-response-gene 4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation. – Biochem. Pharmacol., **66**, 2003, № 5, 711-724.
10. Cogswell, J. P. et al. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. – Cell Growth Differ., **11**, 2000, 615-623.
11. Döhner, H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. – N. Engl. J. Med., **343**, 2000, № 26, 1910-1916.
12. Doëhner, H. et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. – Blood, **85**, 1995, № 6, 1580-1589.
13. Evans, A. R., M. Limp-Foster et M. R. Kelley. Going APE over ref-1. – Mutant Res., **461**, 2000, 83-108.
14. Fichtner, I., D. Arndt, et R. Reszka. Antineoplastic activity and toxicity of some alkylating cytostatics (cyclophosphamide, CCNU, cytostasan) encapsulated in liposomes in different murine tumour models. – J. Microencapsul., **3**, 1986, № 2, 77-87.
15. Fornace, A. J. Jr., I. Alamo Jr. et M. C. Hollander. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. – Proc. Natl. Acad Sci. USA, **85**, 1988, № 23, 8800-8804.
16. Friedberg, J. W. et al. Bendamustine in patients with rituximab-refractory indolent and transformed non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter, single-agent study. – J. Clin. Oncol., **26**, 2008, № 2, 204-210. Erratum In: – J. Clin. Oncol., **26**, 2008, № 11, 1911.
17. Glikman, H. M. et A. Ciechanover. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. – Physiol. Rev., **82**, 2002, № 2, 373-428.
18. Harper, J. W. et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. – Cell, **75**, 1993, № 4, 805-816.

19. Hartmann, J. T. et al. German sarcoma group. Bendamustine hydrochloride in patients with refractory soft tissue sarcoma: a noncomparative multicenter phase 2 study of the German sarcoma group (AIO-001). – Cancer, **110**, 2007, № 4, 861-866.
20. Hauf, S. et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. – J. Cell Biol., **161**, 2003, 281-294.
21. Heider, A. et N. Niederle. Efficacy and toxicity of bendamustine in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphomas. – Anticancer Drugs, **12**, 2001, № 9, 725-729.
22. Herold, M. et al. Preliminary results of cyclically alternating chemotherapy (CVPP/DBVCy) in advanced Hodgkin's disease. – Med. Klin. (Munich), **82**, 1987, № 10, 345-349.
23. Herold, M. et al. For the East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO). Bendamustine, vincristine and prednisone (BOP) versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone (COP) in advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma: results of a randomised phase III trial (OSHO# 19). – J. Cancer Res. Clin. Oncol., **132**, 2006, № 2, 105-112. Epub 2005, Aug 9.
24. Hesse, P., E. Jaschke et G. Anger. Clinical report on the cytostatic agent cytostasan. – Dtsch. Gesundheitsw, **27**, 1972, № 43, 2058-2064.
25. Horton, J. K. et al. Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase β-dependent long patch base excision repair. – J. Biol. Chem., **275**, 2000, 2211-2218.
26. Jayaraman, L. et al. Identification of redox/repair protein Ref-1 as an activator of p53. – Genes Dev., **11**, 1997, № 5, 558-570.
27. Kahl, B. S. et al. Bendamustine is effective therapy in patients with rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma: results from a Multicenter Study. – Cancer, **16**, 2010, № 1, 106-114.
28. Kalaycio, M. Bendamustine: a new look at an old drug. – Cancer, **115**, 2009, № 3, 473-479.
29. Kastan, M. B. et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. – Cancer Res., **51**, 1991, (23 Pt 1), 6304-6311.
30. Konstantinov, S. M. et al. Cytotoxic efficacy of bendamustine in human leukemia and brest cancer cell lines. – J. Cancer Res. Clin. Oncol., **128**, 2002, № 5, 271-278.
31. Kress, M. et al. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. – J. Virol., **31**, 1979, № 2, 472-483.
32. Kroemer, G. et al. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recomandations on the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. – Cell Death. Differ., **16**, 2009, № 1, 3-11. Epub 2008, Oct 10.
33. Kuerbitz, S. J. et al. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 1992, № 16, 7491-7495.
34. Lane, D. P. et L. V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. – Nature, **278**, 1979, № 5701, 261-263.
35. Leong, H. et M. E. Bonk. Bendamsutine (Treanda) For Chronic Lymphocytic Leukemia. – Drug Forecast., **34**, 2009, № 2.
36. Leoni, L. M. et al. Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. – Clin. Cancer Res., **14**, 2008, № 1, 309-317.
37. Leoni, M. L. et al. In vitro and ex vivo activity of SDX-105 (bendamustine) in drug resistant lymphoma cells [abstract 1215]. – Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **45**, 2004, 278.
38. Linzer, D. I. et A. L. Levine. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen resent in SV40-transformed cells and in infected embryonal carcinoma cells. – Cell, **17**, 1979, № 1, 43-52.
39. Liu, X. et R. L. Erikson. Polo-like kinase 1 in the life and death of cancer cells. – Cell Cycle, **2**, 2003, 425-425.
40. Marumoto, T. et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. – J. Biol. Chem., **278**, 2003, 51786-51795.
41. McKay, B.C., M. Ljungman et A. J. Tainbow. Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. – Carcinogenesis, **20**, 1999, № 8, 1389-1396.
42. Melero, J. A. et al. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in simian virus 40-infected and transformed cells. – Virology, **93**, 1979, № 2, 466-480.
43. Mhawech, P. 14-3-3 proteins-an update. – Cell Res., **15**, 2005, № 4, 228-236.
44. Miller, C. et al. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. – Nature, **319**, 1986, Feb 27-Mar 5, № 6056, 783-784.
45. Miyashita, T. et J. C. Reed. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. – Cell, **80**, 1995, № 2, 293-299.
46. Owen-Shaub, L. B. et al. Wild-type human p53 and temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. – Mol. Cell. Biol., **15**, 1995, № 6, 3032-3040.
47. Ozegowski, W. et D. Krebs IMET 3393, γ-[1-Methyl-5-bis-(β-chloräthyl)-aminobenzimidazolyl-(2)]-buttersäure-hydrochlorid, ein neues Zytostaticum aus der Reihe der Benzimidazol-Loste-IMET 3393, γ-[1-methyl-5-bis-(β-chlorethyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-butyric acid hydrochloride, a new cytostatic agent from the benzimidazole mustard series. – vZbl. Pharm., **110**, 1971, № 10, 1013-1019.
48. Ozegowski, W. et D. Krebs. w-[Bis-(β-chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion-bzw. Buttersäuren als potentielle Cytostatika-w-bis-[β-chlorethyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propionic or butyric acids potential cytostatic agents. – J. Prakt. Chem., **20**, 1963, № 3-4, 178-186.
49. Polyak, K. et al. A model for p53-induced apoptosis. – Nature, **389**, 1997, № 6648, 300-305.
50. Pönisch, W. D. Niederwieser. Bendamustine in the treatment of multiple myeloma: results and future perspectives. – Semin. Oncol., **29**, 2002, № 4, (Suppl. 13), 23-26.
51. Prives, C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. – Cell, **95**, 1998, № 1, 5-8.
52. Reck, M. et al. Chemotherapy of advanced non-small-cell and small-cell bronchial carcinoma with bendamustine a phase II study. – Pneumologie, **52**, 1998, № 10, 570-573.
53. Reich, N.C. et A. J. Levine. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in non transformed cells. – Nature, **308**, 1984, Mar 8-14, № 5955, 199-201.
54. Ribomustin® (Bendamustine) product monograph. Ribosephrm GmbH, Berg-am-Laim-Straβe 127, D-81673 München, Germany.

55. Savitsky, K. et al. A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase. – Science **268**, 1995, Jun 23, № 5218, 1749-1753.
56. Scaife, R. M. G2 cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoproetin inhibitor diphenyleneiodonium. – Mol. Cancer Therapy, **3**, 2004, 1229-1237.
57. Schnabel, R. et al. Vergleichende Unterschungen uber die zytostatiche Wirkung des neuen N-Lost-Derivats "IMET 3393"und Endoxan® an drei experimentellen Mäusetumoren (Ehrilich-Aszites-Karzinom, Sarkom 180 solid, Leukämie LAJ I)-Comparative Studies on the Cytostatic Activity of the New Nitrogen Mustard Derivtive"IMET 3393"and Endoxan® in Three Experimental Mouse Tumors (Ehlich-Ascites-Carcinoma, Sarcoma 180 Solid, Leukaemia LAJ I). – Acta Biol. Med. German, **19**, 1967, 543-558.
58. Schrijvers, D. et J. B.Vermorken. Phase I studies with bendamustine: an update. – Semin Oncol., **29**, 2002, № 4, (Suppl. 13), 15-18.
59. Schwaenen, C., T. Karakas et M. Schrader. Bendamustin in introduction of apoptosis in B-cell chronic limphocytic Leukaemia. – Annals Oncol., **10**, 1999, (Suppl. 3), 132.
60. Schwänen, C. et al. In vitro evaluation of bendamustine induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia. – Leukemia, **16**, 2002, 2096-2105.
61. Sionov, R. V. et Y. Haupt. The cellular response to p53: the decision between life and death. – Oncogene, **18**, 1999, № 45, 6145-6157.
62. Stankovic, T. et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. – Lancet, **353**, 1999, № 9146, 26-29.
63. Starostik, P. et al. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. – Cancer Res., **58**, 1998, 4552-4557.
64. Strumberg, D. et al. Bendamustin hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines. – Anti-Cancer Drugs, **7**, 1996, 415-421.
65. Traynor, K. Treanda approved for chronic lymphocytic leukemia. – Am. J. Health Syst. Pharm., **65**, 2008, № 9, 793.
66. Tsai, L. H., E. Harlow et M. Meyerson. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A and adenovirus E1A-assosiated p33 kinase. – Nature, **353**, 1991, № 6340, 174-177.
67. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. – Genes Dev., **15**, 2001, № 22, 2922-2933.
68. White, D. E. et al. KAP 1, a novel Substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA Lesions. – Cancer Res., **66**, 2006, № 24, 11594-11599.
69. www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4Hp53.htm
70. Zong, W. X. et al. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. – Genes. Dev., **18**, 2004, 1272-1282.

Адрес за кореспонденция:
А. Костовски
Катедра "Фармакология, фармакотерапия и токсикология"
Фармацевтичен факултет
Медицински университет
ул. „Дунав" № 2
1000 София

Address for correspondence:
A. Kostovski
Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology
Faculty of Pharmacy
Medical University
2 Dunav str.
1000 Sofia