

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2013
SUPPLEMENT 13**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Barbara Teresa Drogoszevska

**Stężenie związków azotowych we krwi chorych
z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi**

*Blood concentration of nitrogen compounds in
patients with head and neck squamous cell carcinoma*

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Stomatologicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. Adam Włodarkiewicz

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowrya
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Dariusz Kozłowski, Anna Grygorowicz,
Andrzej Hellmann, Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmiec, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Szczególne podziękowania składam

*Panu Profesorowi Adamowi Włodarkiewiczowi za inspirację i wsparcie,
oraz Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
za nieocenioną pomoc w trakcie realizacji pracy*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Epidemiologia i etiologia raka płaskonabłonkowego głowy i szyi	11
1.2. Klasyfikacje kliniczne oceny zaawansowania raka płaskonabłonkowego głowy i szyi	13
1.3. Markery nowotworowe	17
1.3.1. Markery nowotworowe u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi	19
1.4. Nikotynamid i jego metabolity	23
1.4.1. Metabolizm nikotynamidu	23
1.4.2. Rola i znaczenie nikotynamidu i jego metabolitów	24
1.5. Aminokwasy	26
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. Materiał	30
3.1.1. Charakterystyka badanej grupy	30
3.1.2. Lokalizacja nowotworu	30
3.1.3. Klasyfikacja pTNM raka głowy i szyi	32
3.1.4. Ocena stopnia złośliwości nowotworu według Brodersa.	33
3.1.5. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu	34
3.1.6. Przebieg leczenia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi	35
3.1.7. Dane etiologiczne	36
3.2. Metody	36
3.2.1. Materiał do badań	36
3.2.2. Przygotowanie materiału do badań	37
3.2.3. Ekstrakcja erytrocytów	37
3.2.4. Ekstrakcja osocza	37
3.2.5. Analiza stężeń nukleotydów w ekstraktach erytrocytów, stężeń nikotynamidu i jego metabolitów oraz aminokwasów w osoczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej	38
3.3. Analiza statystyczna	39
4. WYNIKI	40
4.1. Stężenia nukleotydów adeninowych i guaninowych oraz NAD i NADP w ekstraktach erytrocytów u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych	40
4.2. Stężenia metabolitów nikotynamidu we krwi u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych	42

4.2.1. Stężenia nikotynamidu i produktów jego degradacji w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych	42
4.2.2. Stężenie 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych	45
4.2.3. Stężenia pochodnych nukleotydowych 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) w erytrocytach u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych	46
4.3. Stężenia aminokwasów w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych.....	47
4.4. Stężenie nikotynamidu i jego pochodnych we krwi a zaawansowanie anatomiczne i stopień złośliwości histologicznej raka płaskonabłonkowego głowy i szyi.....	53
4.4.1. Zależność pomiędzy stężeniem metabolitów nikotynamidu w osoczu oraz nukleotydowych pochodnych 4PYR w erytrocytach u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a stopniem złośliwości histologicznej nowotworu	53
4.4.2. Zależność pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu	57
4.4.3. Zależność pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a klasyfikacją kliniczną TNM.....	59
5. DYSKUSJA	62
6. WNIOSKI.....	70
7. PIŚMIENNICTWO	71
8. STRESZCZENIE	89
9. SUMMARY	90

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 4PYDP** – *4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D-ribonucleoside diphosphate* / dwufosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu
- 4PYMP** – *4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D-ribonucleoside monophosphate* / monofosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu
- 4PYR** – *4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D-ribonucleoside* / 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamid
- 4PYRAD** – *NAD analogy 4-pyridone-3-carboxamide-adenine dinucleotide* / analog NAD dinukleotyd 4-pirydono-3-karboksymido-adeninowy
- 4PYTP** – *4-pyridone-3-carboxamide-1-β-D – triphosphate* / trójfosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu
- ACTH** – *adrenocorticotropic hormone* / hormon adrenokortykotropowy
- ADH** – *antidiuretic hormone* / hormon antydiuretyczny
- AFP** – *alfa fetoprotein* / alfa fetoproteina
- Ala** – *alanine* / alanina
- ALP** – *alkaline phosphatase* / fosfataza alkaliczna
- Apc** – *adenomatous polyposis coli gene* / gen gruczolakowatego polipa okrężnicy
- Arg** – *arginine* / arginina
- Asn** – *asparagines* / asparagina
- Asp** – *asparaginic acid* / kwas asparaginowy
- Brca 1 i Brca 2** – *breast cancer gene 1 and 2* / geny raka piersi 1 i 2
- CEA** – *carcinoembryonic antygen* / antygen rakowo-płodowy
- Cys** – *cysteine* / cysteina
- EBV** – *Epstein-Barr Virus* / wirus Epstein-Barr
- EGFR** – *epidermal growth factor receptor* / receptor nabłonkowego czynnika wzrostu /
- Glu** – *glutamic acid* / kwas glutaminowy
- Hcy** – *homocysteine* / homocysteina
- Her-2** – *human epidermal growth factor receptor* / ludzki nabłonkowy receptor wzrostu
- His** – *histidine* / histydyna
- HNSCC** – *head and neck squamous cell carcinoma* / rak płaskonabłonkowy głowy i szyi
- HPV** – *human papilloma virus* / wirus brodawczaka ludzkiego
- HSV** – *herpes simplex virus* / wirus opryszczki pospolitej

Ile – *isoleucine* / izoleucyna
Leu – *leucine* / leucyna
Met – *methionine* / metionina
Met2PY – *N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide* / N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid
Met4PY – *N-methyl-4-pyridone-3-carboxamide* / N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid
MNA – *N-methyl nicotinamide* / N-metylonikotynamidu
NA – *nicotinamide* / nikotynamid
NAD – *nicotinamide adenine dinucleotide* / dinukleotyd nikotynamido-adeninowy
NMN – *nicotinamide mononucleotide* / mononukleotydu nikotynamidu
NNMT – *nicotinamide N-methyltransferase* / N-metylotransferaza nikotynamidu
NR – *riboside nicotinamide* / rybozydu nikotynamidu
NSE – *neuron specific enolase* / swoista enolaza neuronowa
PAP – *prostate alkaline phosphatase* / kwaśna fosfataza sterczowa
Phe – *phenylalanine* / fenyloalanina
PRL – *prolactin* / prolaktyna
Pro – *proline* / prolina
PSA – *prostate specific antigen* / swoisty antygen sterczowy
Rb – *retinoblastoma gene* / gen retinoblastomy
SCCAg – *squamous cell carcinoma antigen* / antygen raka płaskonabłonkowego
Ser – *serine* / seryna
Thr – *threonine* / treonina
TPA – *tissue polypeptide antigen* / tkankowy antygen polipeptydowy
TPS – *tissue polypeptide-specific antigen* / swoisty antygen polipeptydowy
Trp – *tryptophan* / tryptofan
Ty – *thyrosine* / tyrozyna
Val – *valine* / walina
VIP – *vasoactive intestinal peptide* / wazoaktywny peptyd jelitowy

1. WSTĘP

Nowotwory zlokalizowane w obrębie głowy i szyi (HNC, *head and neck cancer*) stanowią zróżnicowaną grupę nowotworów zarówno pod względem miejsca ich występowania, obrazu oraz przebiegu klinicznego. W tej grupie zdecydowanie dominuje rak płaskonabłonkowy. Wywodzi się on z nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, gardła, krtani, zatok przynosowych i nosa. Nowotwór ten charakteryzuje się szybkim wzrostem oraz wczesnym tworzeniem przerzutów głównie do węzłów chłonnych szyi. Wczesne rozpoznanie tego nowotworu i szybkie rozpoczęcie jego leczenia w 80–90% pozwala uzyskać 5-letnie przeżycie chorych. W przypadku pacjentów zgłaszających się w zaawansowanym stadium choroby (dotyczy to około 65% chorych) rokowanie jest niekorzystne ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne wynikające z rozległości procesu chorobowego oraz ryzyko wystąpienia poważnych dysfunkcji podstawowych czynności życiowych. Często również obserwuje się u tych pacjentów problemy psychiczne, będące następstwem znacznych zaburzeń estetycznych i funkcjonalnych [7, 36].

1.1. Epidemiologia i etiologia raka płaskonabłonkowego głowy i szyi

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) stanowi około 90% wszystkich nowotworów w tej lokalizacji i jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów na świecie [7]. Każdego roku zostaje odnotowanych około 500 tysięcy nowych zachorowań na ten typ nowotworu oraz 270 tysięcy zgonów z jego powodu [25]. 40% wszystkich HNSCC jest rozpoznawanych na Półwyspie Indyjskim, 35% w Południowej i Środkowej Europie [7, 128, 130]. W Europie Północnej, Stanach Zjednoczonych i Australii stanowią one 4,6%–5% ogółu nowotworów złośliwych, natomiast w Skandynawii tylko 0,7–1 % [128, 130]. Z danych przedstawionych w piśmiennictwie wynika, że w ostatnich dwóch dekadach zaznacza się na świecie tendencja spadkowa występowania nowotworów głowy i szyi. Wyjątkiem są nowotwory języka i migdałka podniebiennego, gdzie obserwuje się nieznaczny, ale stały wzrost zachorowań. Nie zmienia się natomiast długość życia chorych. Pomimo stałego rozwoju profilaktyki i diagnostyki, a także wprowadzania nowych metod i technologii leczenia nie ulega poprawie odsetek 5-letnich przeżyć, który od wielu lat kształtuje się na poziomie około 53% [183, 189]. W Polsce nadal obserwuje się stały wzrost zachorowań na raka głowy i szyi. HNSCC stanowi około 5% wszystkich rozpoznawanych nowotworów w naszym kraju [152]. Zachorowalność na ten typ nowotworu ponad trzykrotnie częściej dotyczy mężczyzn w 5, 6 dekadzie życia. Najczęstszą lokalizacją raka płaskonabłonkowego głowy i szyi jest krtani (około 40% ogółu HNSCC), jama ustna około 38%, stosunkowo rzadko szczęka (3%). W obrębie krtani najczęściej zajęta jest gło-

śnia (około 50%), w dalszej kolejności okolica nadgłośniowa (ponad 40%), rzadko okolica podgłośniowa (około 5%). Raki jamy ustnej z rakiem wargi łącznie stanowią 38% wszystkich HNSCC. Najczęściej lokalizują się one w obrębie języka (40%) oraz dna jamy ustnej (33%), następnie wargi, a znacznie rzadziej w obrębie błony śluzowej policzków i wyrostka zębodołowego [7, 17].

Proces kancerogenezy, trwający od kilku do kilkunastu lat, zapoczątkowany jest działaniem niekorzystnych czynników chemicznych, biologicznych i fizycznych, które doprowadzają do powstawania i nawarstwiania się licznych defektów genetycznych, takich jak mutacje genów supresorowych czy amplifikacje onkogenów. Skutkuje to rozregulowaniem cyklu komórkowego, zahamowaniem apoptozy, zaburzeniem procesów naprawy DNA, nasileniem proliferacji i migracji komórek, co w konsekwencji prowadzi do nabycia przez komórkę cech typowych dla komórki nowotworowej [165, 207].

Najważniejszym czynnikiem etiologicznym w HNSCC jest palenie papierosów i spożywanie wysokoprocentowych alkoholi. Palenie tytoniu zwiększa siedmiokrotnie, a spożywanie wysokoprocentowych alkoholi sześciokrotnie zagrożenie rozwoju nowotworu jamy ustnej w porównaniu do osób niepalących i niepijących. U około 75% pacjentów oba czynniki występują równocześnie i wówczas ryzyko wzrasta 15-krotnie [7, 19, 131]. Czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo zachorowania na ten nowotwór jest także nieodpowiedni sposób odżywiania. Dieta uboga w witaminy A, C, E i karotenoidy, oraz niedobory żelaza doprowadzają do powstania zmian atroficznych w błonie śluzowej jamy ustnej, w wyniku których zniszczeniu ulega naturalna bariera chroniąca przed uszkadzającym działaniem kancerogenów [50, 92, 148]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na rolę wirusów w procesie kancerogenezy. Dotyczy to głównie wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV, *human papilloma virus*), wirusa Epsteina-Barra (EBV, *Epstein-Barr virus*) oraz wirusa opryszczki pospolitej (HSV, *herpes simplex virus*). Zakażenie HPV (szczególnie jego podtypem HPV16) najczęściej związane jest z występowaniem nowotworu zlokalizowanego głównie w obrębie gardła środkowego, a zwłaszcza migdałka podniebiennego u osób młodych często niepalących i nienadużywających alkoholu [7, 54, 63, 163, 185].

Odsetek chorych z HNSCC, u których stwierdza się obecność HPV, wzrósł z 25% (dane z roku 1970) do 93% (dane z roku 2007) [28, 44, 101, 120]. Cechą charakterystyczną tego wirusa jest jego tropizm do błony śluzowej, również jamy ustnej, oraz nabłonka skóry. U chorych dochodzi do zakłócenia mechanizmów komórkowych przez blokowanie prawidłowych (niezmutowanych) genów supresorowych *Tp53* i *Rb* przez onkoproteiny wirusa. Histologicznie raki te przypominają *carcinoma basaloïdes* o niskim stopniu zróżnicowania. Pomimo tego rokowanie u tych pacjentów jest zdecydowanie lepsze niż u chorych, u których nie stwierdzono obecności wirusa HPV [177].

Wpływ na rozwój nowotworów mają również osobnicze predyspozycje, związane z wrodzonymi, dziedzicznymi zespołami chorobowymi, takimi jak:

anemia Fanconiego, zespół Li-Fraumeni, zespół ataksja-teleangiektazja czy wrodzona postać niepolipowatego raka jelita grubego [163]. Należy wspomnieć, że czynnikami, sprzyjającymi rozwojowi HNSCC są: żucie betelu, brak higieny jamy ustnej, przewlekłe mikrourazy spowodowane źle dopasowanymi uzupełnieniami protetycznymi czy ekspozycja na czynniki środowiskowe, takie jak: pył drzewny, węglowy, garbniki oraz nadmierna ekspozycja na słońce [14, 163].

1.2. Klasyfikacje kliniczne oceny zaawansowania raka płaskonabłonkowego głowy i szyi

W ocenie zaawansowania klinicznego nowotworu, planowania leczenia oraz rokowania stosuje się rekomendowane przez UICC/AJCC, (*Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Committee on Cancer TNM 7 2009 rok*) klasyfikacje:

1. System oceny zaawansowania anatomicznego nowotworu, na który składają się:
 - klasyfikacja kliniczna TNM raków głowy i szyi (tab. 1)
 - cTNM – klasyfikacja kliniczna
 - pTNM – klasyfikacja patologiczna – klasyfikacja histopatologiczna po leczeniu chirurgicznym
 - klasyfikacja stopni zaawansowania klinicznego raków głowy i szyi (tab. 2)
2. Ocena stopni złośliwości histologicznej Brodersa (tab. 3) *[39]

* nomenklatura klasyfikacji w oparciu o opracowanie „TNM klasyfikacja nowotworów złośliwych” pod redakcją L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, Ch. Wittekind z 2010 roku.

Tabela 1. Klasyfikacja kliniczna TNM raka głowy i szyi

Table 1. The clinical classification (TNM) of the head and neck cancer

Klasyfikacja kliniczna TNM raka wargi i jamy ustnej* <i>Clinical classification TNM of lip and floor of mouth cancer*</i>	
Wielkość guza pierwotnego – T <i>Size of the primary tumor – T</i>	
Tx	Guz nie może być oceniony
T0	Brak cech klinicznych guza pierwotnego
Tis	Rak <i>in situ</i>
T1	Największy wymiar guza ≤ 2 cm
T2	Największy wymiar guza >2 cm, ale ≤ 4 cm
T3	Największy wymiar guza > 4 cm
T4a	Rak wargi: guz nacieka kość, nerw zębodołowy dolny, dno jamy ustnej lub skórę twarzy
	Rak dna jamy ustnej: guz nacieka kość, głębokie mięśnie języka, zatokę szczękową i skórę twarzy
T4b	Rak wargi i dna jamy ustnej: guz nacieka przestrzeń żwaczy, wyrostki skrzydłowe lub podstawę czaszki i/lub tętnię szyjną wewnętrzną
Regionalne chłonne – N <i>Regional lymph nodes – N</i>	
Nx	Nie mogą być ocenione
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	Przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza < 3 cm
N2a	Przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza >3 cm, ale < 6 cm
N2b	Przerzuty w węzłach chłonnych po stronie guza, żaden nie jest $> niż 6$ cm
N2c	Przerzuty obustronne lub liczne po stronie guza, żaden nie jest $> niż 6$ cm
N3	Przerzut w węźle chłonnym, największy wymiar > 6 cm
Przerzuty odległe -M <i>Distant metastasis – M</i>	
M0	Przerzut odległy nieobecny
M1	Przerzut odległy obecny

*Dla raków gardła i szczęki zastosowano klasyfikację TNM właściwą dla danej lokalizacji

*For throat and maxilla cancer used classifications appropriate to the location

Tabela 2. Klasyfikacja stopni zaawansowania klinicznego raków głowy i szyi*

Table 2. Stage grouping of head and neck cancer*

Stopnie zaawansowania raków głowy i szyi <i>Stage grouping of head and neck cancer</i>	T	N	M
0	<i>in situ</i>	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
	1	1	0
	2	1	0
	3	1	0
IV A	4a	0	0
	4a	1	0
	1	2	0
	2	2	0
	3	2	0
	4a	2	0
	4b	Każde T	0
IV C	Każde T	3	0
	Każde T	Każde N	1

* oprócz nosowej części gardła i tarczycy

* without the nasopharynx and thyroid

Tabela 3. Stopień złośliwości histologicznej Brodersa

Table 3. Broders' stage of histological malignancy

Stopień złośliwości histologicznej Brodersa <i>Broders' stage of histological malignancy</i>	Stopień zróżnicowania histologicznego <i>Histological grade</i>
G1	wysoko
G2	umiarkowanie
G3	nisko
G4	niezróżnicowany

Klasyfikacje te są uniwersalne i proste w zastosowaniu, jednak niewystarczające zarówno dla pełnej oceny stanu zaawansowania choroby jak i jej przebiegu. Praktyka kliniczna pokazuje, że u niektórych chorych z wczesną fazą choroby nowotworowej pomimo radykalnego leczenia, szybko pojawiają się wznowy i przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Natomiast zdarza się, że pacjenci z klinicznie zaawansowanym procesem nowotworowym mają pomyślny przebieg choroby. Potwierdzają to dane z piśmiennictwa: według Doshi 35% guzów o wielkości T1-T2 charakteryzowało się złym rokowaniem, a Bundgaard, wskazuje na 25% odsetek złych rokowań we wczesnym stadium choroby [118]. Powyższe obserwacje spowodowały, że rutynowo stosowane klasyfikacje coraz częściej są uzupełniane o dane dotyczące: czynnika etiologicznego, stanu ogólnego pacjenta czy stanu układu immunologicznego [55]. Wskazana jest również ocena grubości ogniska pierwotnego, charakterystyka granicy nacieku i wypustek palczastych penetrujących podścielisko (tzw. front naciekania nowotworu – INT, *invasive tumor front*). Ocenia się również obecność naciekania naczyń krwionośnych, chłonnych i włókien nerwowych. Coraz częściej do diagnostyki włączane są badania molekularne oceniające: ekspresję genów supresorowych (np. genu *Tp53*, *tumor protein 53 gene*), markerów proliferacji komórkowej (antygen Ki-67, *antigen Ki-67*), czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) i wielu innych [5, 23, 68, 134, 205]. Nie wystarcza to jednak i wciąż trwają intensywne poszukiwania związku lub grupy związków, których oznaczanie pozwoliłoby na kompleksową ocenę stopnia zaawansowania klinicznego, ustalenie indywidualnego planu leczenia oraz przewidywania rokowania.

1.3. Markery nowotworowe

Markery nowotworowe są substancjami o zróżnicowanym charakterze i różnej budowie chemicznej. Są identyfikowane na różnych etapach choroby nowotworowej we krwi (tzw. krążące markery nowotworowe), moczu, ślinie i wysiękach, lub jako substancje związane z powierzchnią komórek nowotworowych (tzw. komórkowe markery nowotworowe). Są produkowane albo wyłącznie w komórkach nowotworowych, albo jednocześnie w komórkach nowotworowych i prawidłowych, przy czym ich stężenie w komórkach objętych procesem chorobowym jest zawsze znacząco wyższe. Markery nowotworowe są wykładnikiem toczących się w komórkach procesów patologicznych: a) proliferacji komórkowej guza np. swoisty antygen tkankowy TPS (*tissue polypeptide-specific antigen*), antygen proliferacji jądrowej PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), antygen Ki-67 i CD44, b) różnicowania np. białka CA 15-3, CA 125, Ca 19-9 i c) obumierania komórek np. tkankowy antygen polipeptydowy TPA (*tissue polypeptide antigen*), CYFRA 21-1 [7, 148].

Markerami są niektóre: hormony, enzymy, antygeny płodowo-zarodkowe, białka szkieletu komórkowego, receptory błonowe, markery genetyczne, antygeny grup krwi, glikoproteiny (tab. 4).

Tabela 4. Kliniczne zastosowanie wybranych markerów nowotworowych

Table 4. Clinical use of tumor markers

	Kliniczne zastosowanie wybranych markerów nowotworowych <i>Clinical use of tumor markers</i>
HORMONY <i>Hormones</i>	- Katecholaminy – guz chromochłonny nadnerczy [34, 70] - ADH – rak trzustki, rak kory nadnerczy [70] - PRL – rak żóładka, przysadki [100, 109] - ACTH – rak płuc [192] - VIP – rak trzustki, płuc, nerwiak płodowy [74, 116, 191]
ENZYMY <i>Enzymes</i>	- PAP, PSA – rak prostaty [97, 112] - ALP – rak wątroby, jajnika, płuc, monitorowanie przerzutów do kości [12, 60, 77] - NSE – rak drobnokomórkowy płuc [143, 208]
ANTYGENY PŁODOWO-ZARODKOWE <i>Fetal embryonic – antigen</i>	- AFP – rak wątroby i pęcherzyka żółciowego [129] - CEA – rak jelit, piersi, płuc, stercza [144]
BIAŁKA SZKIELETU KOMÓRKOWEGO CYTOKERATYNY <i>Cytoskeleton proteins</i>	- TPA – rak wątroby, rak płuc [105] - TPS – rak płuc [204] - CYFRA 21-1 – rak płuc, jajnika, jamy ustnej [141] - SCCA – rak płuc, szyjki macicy, głowy i szyi [105]
RECEPTORY BŁONOWE <i>Membrane receptors</i>	- EGFR – rak piersi, jelita grubego, przełyku, głowy i szyi, jajnika, macicy, [105] - Receptory błonowe i estrogenowe – rak piersi [99]
ONKOGENY <i>Oncogenes</i>	- Bcl-2 – białaczka, chłoniak [104] - N-ras, K-ras – rak trzustki, pęcherza moczowego [35, 51] - Her-2 – rak piersi, jajnika [97]
GENY SUPRESOROWE <i>Supresor genes</i>	- Rb – siatkówczak [13] - Apc – rak jelita grubego [31] - Brca 1, Brca 2 – rak jajnika, piersi [105]
GLIKOPROTEINY <i>Glicoproteins</i>	- CA 125 – rak jajnika, macicy [97] - CA 15-3 – rak jajnika, piersi [97]
ANTYGENY GRUP KRWI <i>Blood group antigens</i>	- CA 19-9, CA 50, CA 19-5 – rak przewodu pokarmowego, jajnika, piersi [97]
BIAŁKA <i>Proteins</i>	- S100 – czerniak, rak sutka, przewodu pokarmowego [106, 110] - Peptyd C – wyspiak [167] - tyreoglobulina – rak tarczycy [80]

ADH – hormon antydiuretyczny, **PRL** – prolaktyna, **ACTH** – hormon adrenokortykotropowy, **VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy, **PAP** – kwaśna fosfataza sterczowej, **PSA** – swoisty antygen sterczowy, **ALP** – fosfataza alkaliczna, **NSE** – swoista enolaza neuronowa, **AFP** – alfa fetoproteina, **CEA** – antygen rakowo-płodowy, **SCCA** – antygen raka płaskonabłonkowego, **EGF** – nabłonkowy czynnik wzrostu, **Her-2** – ludzki nabłonkowy receptor wzrostu -2, **Apc** – gen gruczłakowatego polipa okrężnicy, **Brca 1 i Brca 2** – geny raka piersi 1 i 2, **B2** – mikroglobulina, **S100** – białko 100

ADH – antidiuretic hormone, **PRL** – prolactin, **ACTH** – adrenocorticotrophic hormone, **VIP** – vasoactive intestinal peptide, **PAP** – prostate alkaline phosphatase, **PSA** – prostate specific antigen, **ALP** – alkaline phosphatase, **NSE** – neuron specific enolase, **AFP** – alfa-fetoprotein, **CEA** – carcinoembryonic antigen, **SCCAg** – squamous cell carcinoma antigen, **EGRF** – epidermal growth factor receptor, **Her-2** – human epidermal growth factor receptor, **Apc** – adenomatous polyposis coli gene, **Brca 1 and Brca 2** – breast cancer gene 1 and 2, **B2** – microglobulin, **S100** – peptide S100

Oznaczanie markerów nowotworowych ma zastosowanie na wszystkich etapach procesu chorobowego: w profilaktyce (badania przesiewowe), rozpoznaniu, określeniu stopnia zaawansowania klinicznego, monitorowaniu odpowiedzi na zastosowane leczenie, rokowaniu czy też identyfikacji wznowy [97].

O przydatności klinicznej markera decyduje jego czułość i swoistość diagnostyczna oraz wartość predykcyjna. Idealny marker powinien mieć 100% czułość i swoistość. Wzrost jego stężenia powinien jednoznacznie określać obecność i lokalizację choroby. Markerami, które charakteryzują się stosunkowo wysoką specyficznością narządową, są między innymi: PSA i PAP dla raka prostaty, kalcytonina i tyreoglobulina dla raka tarczycy. Oznaczanie pozostałych markerów w chwili obecnej ma charakter wyłącznie badania uzupełniającego w stosunku do badania klinicznego i histopatologicznego. Większość proponowanych w piśmiennictwie związków, pełniących rolę potencjalnych markerów nowotworowych, charakteryzuje się często niską swoistością i czułością. Poza tym wyniki dotyczące markerów prezentowane w publikacjach różnią się oceną przydatności analizowanego związku, co wynika ze znacznej różnorodności i liczności badanych grup, odmiennej wartości linii odcięcia a także różnych metod oznaczania badanych związków [16].

1.3.1. Markery nowotworowe u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi

W diagnostyce, leczeniu, monitorowaniu i prognozowaniu przebiegu choroby u pacjentów z nowotworami głowy i szyi zastosowanie specyficznego i swoistego markera ma duże znaczenie. Jest to istotne chociażby z tego powodu, że w HNSCC o tej samej lokalizacji i tym samym stopniu zaawansowania klinicznego przebieg choroby jak i odpowiedź na leczenie są często różne. Również zdiagnozowanie miejscowej wznowy i/lub rozsiewu procesu nowotworowego w tej lokalizacji nastręcza wiele trudności wynikających z obecności rozległych blizn i odczynów popromiennych. O złożoności procesów kancerogenezy w nowotworach głowy i szyi świadczy liczba badań i publikacji poświęconych molekularnym podstawom transformacji komórek nowotworowych oraz czynnikom kontrolującym cykl komórkowy, apoptozę i angiogenezę. Lepsze poznanie tych procesów wyjaśni odmienność przebiegu klinicznego choroby, pozwoli zaplanować indywidualne leczenie oraz przewidzieć rokowanie. W piśmiennictwie kilka związków typowano na markera nowotworów głowy i szyi, żaden jednak jak dotąd nie spełniał oczekiwań klinicystów. Najczęściej opisywane markery nowotworów głowy i szyi przedstawiono poniżej wraz z krótką ich charakterystyką:

- CEA – glikoproteina, wytwarzana w nieznacznych ilościach przez komórki przewodu pokarmowego. Oznaczana w surowicy krwi żyłnej ma zastosowanie w diagnostyce nowotworów przewodu pokarmowego.

W rakach narządów głowy i szyi charakteryzuje się niską czułością diagnostyczną (15–42%). Jej stężenie wzrasta w zaawansowanych procesach nowotworowych, ale nie stwierdzono zależności od wielkości guza (T) i obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N). Rosati i wsp. wskazują na wyższe stężenie tego związku w nowotworach dobrze zróżnicowanych G1 (54%) w stosunku do nisko zróżnicowanych nowotworów G3 (13%) [150]. Na stężenie CEA mają też wpływ takie czynniki jak palenie papierosów, ciąża, zapalenie jelit czy wątroby [38, 125].

- SCCAg – inhibitor proteazy serynowej, należący do grupy wewnątrzkomórkowych serpin. Prawdopodobnie bierze on udział w hamowaniu procesów apoptozy poprzez hamowanie aktywności kaspaz [187, 199]. Został wyizolowany z tkanki raka płaskonabłonkowego szyjki macicy przez Kato i wsp. w 1977 [76, 108]. Podwyższone stężenie tego markera zostało stwierdzone również u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi oraz w raku płuc. Wysokie stężenie SCCAg we krwi wiązało się z krótszym przeżyciem chorych [14]. Wzrost stężenia SCCAg koreluje z wielkością guza, głębokością naciekania, stanem węzłów chłonnych oraz obecnością odległych przerzutów [78, 86, 93, 111, 214]. Zastosowanie SCCAg w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi jest jednak ograniczone ze względu na niską czułość diagnostyczną (21–50%), pomimo 95% swoistości [6, 141].
- Maspina – serpina, biorąca udział w hamowaniu neoangiogenezy i ograniczaniu proliferacji i migracji komórek nowotworowych. Jej wzrost ekspresji w tkance nowotworowej koreluje pozytywnie z długością przeżycia i brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, natomiast złemu rokowaniu towarzyszy spadek jej ekspresji [211].
- CYFRA 21-1 - fragment cytokeratyny 19, ściśle związany z obecnością dysplazji komórkowej (stąd nazywany markerem różnicowania nabłonkowego). Jej podwyższone stężenie obserwuje się u 20–72% chorych z rakami głowy i szyi i koreluje ono ze stadium zaawansowania klinicznego i stopniem złośliwości histologicznej guza. Nie obserwuje się natomiast zależności między wielkością guza, stanem węzłów chłonnych i obecnością odległych przerzutów [24, 102]. Czułość diagnostyczna tego markera w porównaniu z SCCAg jest znacząco wyższa [8]. Natomiast czułość diagnostyczna kompleksu SCCAg i CYFRA 21-1 wynosi 65% przy swoistości 91%, co uzasadnia przydatność oznaczania obu tych markerów [6].
- Gen *Tp53* – gen supresorowy, należący do grupy cyklinozależnych inhibitorów kinaz. Jego mutację stwierdza się u około 60% pacjentów z HNSCC [3]. Wzrost ekspresji zmutowanego *Tp53* koreluje z promieniotwórczością. Nie ma natomiast zgody wśród badaczy co do jego war-

tości prognostycznej i ewentualnego zastosowania klinicznego [56, 135, 140].

- *Rb1* – gen supresorowy, jego obniżoną ekspresję stwierdza się u 6–74% pacjentów z HNSCC [56, 216]. Mutacje w tym genie korelują z wyższym prawdopodobieństwem powstawania przerzutów i złym rokowaniem, wyniki te są jednak niejednoznaczne [166].
- Białka p16, p21, p27 – produkty genów supresorowych. Spadek ekspresji p16 w tkankach guza nowotworowego stwierdzony u 89% pacjentów, korelował ze wzrostem ilości przerzutów i krótszym czasem przeżycia chorych [40, 165, 166]. Obecność białka p21 w tkankach guza nowotworowego stwierdzono u 29–92% chorych, a jego ekspresja korelowała odwrotnie proporcjonalnie do wielkości guza. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy przerzutami do węzłów chłonnych (N) i stopniem złośliwości histologicznej guza (G) [107, 212]. Wzrost ekspresji białka p27 w tkankach guza obserwowano u 18–62% chorych i wiązało się to z lepszym rokowaniem [88].
- Cyklina D – białko pełniące istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego [103, 126, 147, 171]. Jej nadekspresja występowała u 68% pacjentów z HNSCC, u których stwierdzono obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych [49, 73, 166]. Część badaczy uważa, że może ona być dobrym markerem prognostycznym w HNSCC [49, 49, 164–166].
- Białko Bcl-2 – białko antyapoptotyczne. Wzrost ekspresji Bcl-2 korelował z umiarkowanym i niskim stopniem złośliwości histologicznej nowotworu. Brak natomiast zależności pomiędzy ekspresją Bcl-2 a wielkością guza i obecnością przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych [90]. Białko to ma małą wartość prognostyczną w nowotworach głowy i szyi [135, 140].
- PCNA i Ki-67 – markery proliferacji komórkowej, wzrost ich ekspresji koreluje ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza i złym rokowaniem [59, 79, 84, 181].
- CD44 – glikoproteina powierzchniowa, odpowiedzialna za adhezję komórek. Wzrost jej ekspresji powoduje zwiększone przyleganie komórek nowotworowych i ich migrację przez ścianę naczyń, w których tworzy mikrozatory, co sprzyja tworzeniu przerzutów. Najsilniejszą ekspresję tego białka obserwuje się w HNSCC. Większość badaczy uważa ją za bardzo dobry wykładnik stopnia dysplazji nabłonkowej i marker prognostyczny [9, 10, 45, 117, 133, 164], inni jednak twierdzą że nie ma większego znaczenia klinicznego [15, 206].
- EGFR – onkogen, należący do rodziny receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. Jest związany z namnażaniem komórek guza i transfor-

macją nowotworową. Występuje w wielu typach nowotworów (np. piersi, prostaty, płuc, pęcherza moczowego, trzustki). Jego obecność wiąże się ze złym rokowaniem [16, 58, 146, 166]. W HNSCC wzrost ekspresji EGFR stwierdza się u 50–100% pacjentów z zaawansowanym procesem chorobowym [162, 184], co często koreluje z wysokim stopniem zaawansowania klinicznego [91, 200].

- Gen *c-myc* – protoonkogen kontrolujący wzrost i różnicowanie komórek, angiogenezę i apoptozę. Jego ekspresja wzrasta w nisko zróżnicowanych HNSCC [69].
- VEGF – białko sygnalizacyjne związane z angiogenezą i limfangiogenezą w guzie nowotworowym. Występuje w 4 podtypach (A, B, C, D). Zwiększoną ekspresję podtypu A i B obserwuje się w angio- i limfangiogenezie guza, zaś ekspresja podtypu C i D wzrasta wraz ze wzrostem ryzyka przerzutów węzłowych [169]. Ekspresja VEGF koreluje z gorszym rokowaniem u pacjentów z HNSCC [198] [45].
- CRP – białko ostrej fazy. Wykazano silną korelację pomiędzy stężeniem CRP a wielkością guza. Wzrost jego stężenia wskazuje na niekorzystne rokowanie [89].
- COX-2 – enzym cyclooksygenaza 2. Wzrost ekspresji tego białka silnie koreluje z przerzutami do węzłów chłonnych, progresją nowotworu i krótszym przeżyciem chorych [16]. Jednocześnie wzrost ekspresji COX-2 uwrażliwia komórki nowotworowe na radioterapię [194].

Duże zróżnicowanie w interpretacji przydatności wyżej opisanych związków wskazuje na konieczność dalszego poszukiwania substancji, które w odniesieniu do nowotworów głowy i szyi mogą być lepszymi wykładnikami przebiegu procesu nowotworowego w tej lokalizacji. Z tego powodu zdecydowano się na poszukiwanie powiązania procesu nowotworowego w obrębie głowy i szyi z metabolizmem związków azotowych.

1.4. Nikotynamid i jego metabolity

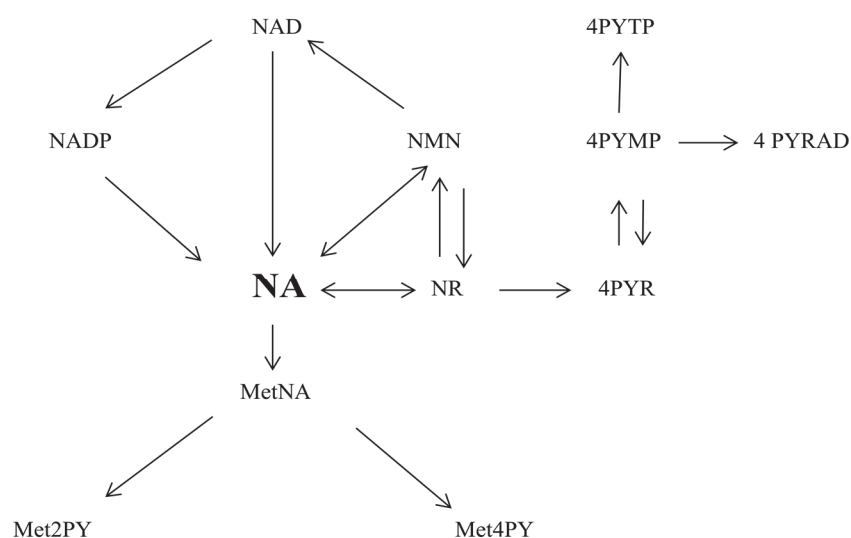
1.4.1. Metabolizm nikotynamidu

Wśród związków azotowych dużą grupę stanowią metabolity i pochodne dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). Jest on zaangażowany w procesy oksydoredukcyjne, jest także substratem dla ADP-rybozylacji (polimerazy poli ADP-rybozy), czy acetylacji białek (sirtuiny). Produktem degradacji NAD jest nikotynamid (NA). Jest to główna droga jego powstawania, ale nikotynamid może również powstać z mononukleotydu nikotynamidu (NMN) lub rybozydu nikotynamidu (NR) [41, 151] (ryc. 1). Do organizmu jest on dostarczany także z pokarmem, przeważnie w produktach pochodzenia zwierzęcego (wątroba, ryby, nerki). Metabolizm nikotynamidu może przebiegać trzema szlakami:

- przemianie do NMN, stanowiąc pulę do syntezy NAD
- pod wpływem kinazy rybozydu nikotynamidu przekształcać się do rybozydu nikotynamidu (NR)
- ulegać degradacji.

Pod wpływem N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) nikotynamid w nieodwracalnej reakcji ulega przemianie do N-metylonikotynamidu (MNA). Należy nadmienić, że z nikotynamidu obok MNA mogą powstawać także N-oksyd nikotynamidu i 6-hydroksynikotynamid, ale są to przemiany o małym znaczeniu biologicznym [33, 41, 113, 138].

Szlak powstawania rybozydu nikotynamidu i jego przemiana do NMN, stanowiące znaczące źródło do syntezy NAD, to wyniki badań pochodzące z ostatnich lat prac zespołu Sauve [26] i Brennera [21]. Z kolei przemiana rybozydu nikotynamidu do 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR), a następnie metabolizm 4PYR do jego nukleotydowych pochodnych to wyniki prac ostatnich lat zespołu z Katedry i Zakładu Biochemii GUMed. Wynika z nich, że pod wpływem oksydazy aldehydowej z rybozydu nikotynamidu powstaje 4PYR, który przy udziale kinazy adenozyiny przekształca się do monofosforanowej pochodnej – 4PYMP (monofosforanu 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu). 4PYMP może: a) w wyniku działania 5'-nukleotydyazy być degradowany do 4PYR, b) przekształcany do trójfosforanu 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu (4PYTP) lub c) przekształcany do pochodnej NAD, w której rybozyd nikotynamidu zastąpiony jest 4PYR (4PYRAD – dinukleotyd 4-pirydono-3-karboksymidoadeninowy) [172, 174]. Schemat metabolizmu nikotynamidu przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Metabolizm nikotynamidu w komórkach ssaków

Figure 1. Nicotinamide metabolism in mammalian cells

1.4.2. Rola i znaczenie nikotynamidu i jego metabolitów

Do niedawna uważano, że nikotynamid i jego metabolity nie mają istotnego znaczenia w procesach fizjologicznych i patologicznych człowieka. Znano rolę nikotynamidu w leczeniu pelagry, jako inhibitora wielu reakcji enzymatycznych odpowiadających za utrzymanie stabilności genomu oraz przekazywanie sygnałów w obrębie komórki człowieka. W chwili obecnej, dzięki licznym badaniom prowadzonym w ostatnich latach, zdecydowanie zwiększyła się wiedza na temat właściwości biologicznych i potencjalnego zastosowania nikotynamidu. Wybrane zastosowanie nikotynamidu i jego pochodnych zamieszczono w tabeli 5.

Tabela 5. Właściwości i zastosowanie nikotynamidu i jego pochodnych

Table 5. Properties and use of nicotinamide and its derivatives

Zastosowanie nikotynamidu i jego pochodnych <i>Use of nicotinamide and its derivatives</i>	Sposób działania <i>The way of actions</i>
Reumatologia <i>Rheumatology</i>	- inhibitor syntezy prozapalnych cytokin, TNF [197] - inhibitor indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) [85, 124, 201]
Diabetologia <i>Diabetology</i>	- ochronia komórki β trzustki przed nekrozą [137] - wpływa na zwiększoną syntezę insuliny [4] - wpływa na uwalnianie insuliny przez blokowanie działania IL-1 β [4]
Neurologia <i>Neurology</i>	- działa neuroprotekcynie, przeciwdrgawkowo [87] - ochronia komórki nerwowe przed nekrozą i apoptozą [57] - wpływa na śródbłonek naczyń mózgowych (przy anoksji) [57] - wpływa na zwiększenie stężenia choline w mózgu [43]
Dermatologia <i>Dermatology</i>	- stymuluje syntezę kolagenu, gilaagryny, inwolukryny [53] - wpływa na różnicowanie keratynocytów - redukuje zaburzenia pigmentacji poprzez hamowanie transferu melanosomów z melanocytów [18]
Onkologia/Radioterapia <i>Oncology/Radiotherapy</i>	- uwrażliwia tkanki nowotworowe na radioterapię [66]
Hematologia <i>Hematology</i>	- obniża ekspresję CD11b - zapobiega uszkodzeniu śródbłonna naczyń przez endotoksyny [221]

Doniesienia naukowe dotyczące roli metabolitów nikotynamidu w fizjologii i patologii są nadal nieliczne. Znane są wartości stężeń tych związków w moczu i osoczu ludzi zdrowych, jednak publikowane wartości stężeń tych związków różnią się między sobą. Wynikać to może z: stosowania różnej diety [2, 32], pory dnia, w której pobierano próbki do badań [127], stosowanej terapii hormonalnej [157, 168], czy zastosowanej do ich oznaczania metody analitycznej. Stężenie nikotynamidu i produktów jego degradacji wzrasta także z wiekiem [21, 175].

Z piśmiennictwa wynika, że w pewnych stanach fizjologicznych i chorobowych dochodzi do zmian stężenia produktów degradacji nikotynamidu. Podwyższone stężenie metabolitów nikotynamidu (MNA i Met2PY) w wydalonym moczu stwierdzono między innymi w marskości wątroby [142], cukrzycy typu 2 [156], w trzecim trymestrze ciąży [67], po oparzeniach [11]. Zmniejszenie wydalania metabolitów nikotynamidu obserwuje się: w schizofrenii [22], depresji [30], niedorozwoju umysłowym [98], autyzmie, w alkoholowej pelagrze [202]. Stężenie Met2PY i Met4PY w osoczu jest dobrym wykładnikiem funkcji nerek i może być uważane za czynnik monitorujący leczenie w przewlekłej chorobie nerek [176].

W piśmiennictwie pojawiają się także doniesienia o powiązaniu metabolitów nikotynamidu z chorobą nowotworową. Zaobserwowano zwiększone wydalenie z moczem MNA u kobiet z nowotworem piersi [136]. W komórkach nowotworowych raka żołądka [96], raka nerki [158] i raka brodawkowego tarczycy [213] zaobserwowano nadekspresję NNMT. Wzrost aktywności NNMT w osoczu uznano za wczesny marker raka jelita grubego [149]. Ponadto zwiększone wydalenie z moczem 4PYR zaobserwowano u pacjentów z nowotworem płuc, piersi [114, 182], białaczką szpikową [62, 197], złośliwym międzybłoniakiem [20, 48], oraz rakiem jajnika [123]. Co więcej niektórzy badacze sugerują nawet, że 4PYR (nazywany w piśmiennictwie też PCNR) może być markerem procesu nowotworowego i czynnikiem monitorującym proces leczenia [179, 179].

Informacje na temat metabolizmu nikotynamidu i jego metabolitów w nowotworach głowy i szyi są nieliczne. W piśmiennictwie istnieją jedynie pojedyncze doniesienia na ten temat. Zauważono, że wyższy poziom NNMT koreluje ze stopniem zróżnicowania w HNSCC [42], a ekspresja mRNA genu *Nnmt* może spełniać rolę markera prognostycznego [160]. Wzrost stężenia 4PYR w moczu zaobserwowano jedynie u pacjentów z rakiem nosowej części gardła [196].

1.5. Aminokwasy

Kancerogeneza jest wielostopniowym procesem nawarstwiania się zmian genetycznych doprowadzających do powstania linii komórkowych o nieprawidłowej strukturze i biologii. Dochodzi również do zmian w przebiegu podstawowych procesów metabolicznych na poziomie komórki. Jednym z nich jest metabolizm związków azotowych, w tym metabolizm aminokwasów.

Zmiany stężenia aminokwasów stwierdzono u pacjentów z rakiem prostaty [81], pęcherza moczowego [27], przełyku i żołądka [1, 220], jelita grubego [122], wątroby [72], w ostrej białaczce limfatycznej u dzieci [154] i w zespole policyklicznych jajników [83, 188, 215]. Zmiany stężeń poszczególnych aminokwasów przedstawiono w tabeli 6.

U pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym narządów głowy i szyi stwierdzono zmiany w stężeniach aminokwasów. Somashekar i wsp. w swojej pracy wskazują na zaburzenia metabolizmu homocysteiny występujące u pacjentów z HNSCC. Stwierdzono podwyższone stężenie homocysteiny (Hcy) w tkankach guza w porównaniu do tkanki pobranej od osób zdrowych. Podwyższone stężenie tego aminokwasu występowało również w węzłach chłonnych, w których stwierdzono obecność przerzutów. Natomiast stężenia Hcy w tkankach guza zlokalizowanego w obrębie języka, warg, dna jamy ustnej i krtani nie wykazały statystycznie znamiennych różnic [180]. Nacci i wsp. analizowali stężenie Hcy we krwi u pacjentów z rakiem krtani. Wykazali oni statystycznie znamienny wzrost jej stężenia we krwi chorych w porównaniu z osobami zdrowymi, nie obserwując korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny a stopniem zaawanso-

wania klinicznego nowotworu. Ponadto u pacjentów z leukoplakią obserwowano również podwyższony poziom Hcy (taki sam jak w grupie SCC) dlatego też nie może być ona brana pod uwagę jako marker diagnostyczny. Przeanalizowano również grupę osób zdrowych dzieląc ich na palących papierosy, nadużywających alkoholu i osób niestosujących tych używek. Stwierdzono, że u palących papierosy i pijących alkohol stężenie homocysteiny jest podwyższone, a kwasu foliowego obniżone w porównaniu z osobami niepijącymi i niepalącymi [119]. Wykorzystując spektrometrię ramanowską wykazano w nowotworach jamy ustnej podwyższoną intensywność pasm: fenyloalaniny, treoniny i tyrozyny we krwi [155]. Analiza stężenia aminokwasów w ślinie u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej wykazała podwyższone stężenie histydyny, treoniny, waliny, izoleucyny, metioniny, leucyny, lizyny, tyrozyny, argininy, alaniny, glicyny, seryny, asparaginy. Wzrost ten dotyczył pacjentów z wysoko zróżnicowanym rakiem płaskonabłonkowym (G1) w porównaniu z pacjentami z umiarkowanie zróżnicowanym rakiem (G2) i z osobami zdrowymi. Podwyższony poziom aminokwasów w ślinie pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej zaobserwowali również inni badacze [145, 186] (tab. 6).

Tabela 6. Zmiany stężeń aminokwasów w stanach chorobowych

Table 6. The changes of concentrations of amino acids in various disease states.

Choroby <i>Diseases</i>	Badany materiał <i>Test material</i>	Aminokwasy <i>Amino acids</i>	
		Wzrost stężenia <i>Increase the concentration</i>	Spadek stężenia <i>Decrease the concentration</i>
Rak prostaty <i>Prostate cancer</i>	osocze	Sarkozyna [82, 83]	
Rak pęcherza moczowego <i>Urinary bladder cancer</i>	osocze		Leu, Ile, Tyr, Gly [27]
Rak przełyku i żołądka <i>Oesophageal gastrin cancer</i>	osocze	Glu, Asp, Leu, Phe, Lys, Val [1, 220]	
	tkanka		Met, Trp, [220]
Rak jelita grubego <i>Colorectal cancer</i>	osocze	Glu, Cys [122]	Phe, Thr, Val, Glu, Tauryna, Gln [94, 203]
	tkanka		Tyr, Ala, Met, [203]
Rak wątroby <i>Hepatocellular carcinoma</i>	osocze		Val, Leu, Ile[72]
Ostra białaczka limfoblastyczna	osocze	Hcy [154]	
Zespół policyklicznych jajników <i>Polycystic ovary syndrome</i>	osocze	Hcy [215]	Leu, Ile, Met, Glu, Arg [188]

2. CEL PRACY

Cele pracy:

1. Analiza stężeń metabolitów NAD we krwi chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w porównaniu do chorych ze zmianami łagodnymi w tej lokalizacji i osobami zdrowymi.
2. Analiza stężeń aminokwasów w osoczu chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w porównaniu do chorych ze zmianami łagodnymi w tej lokalizacji i osobami zdrowymi.
3. Ustalenie panelu metabolitów związków azotowych pozwalających na różnicowanie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi i zmian łagodnych.
4. Analiza zmian stężeń związków azotowych we krwi chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w odniesieniu do obrazu klinicznego i histopatologicznego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Charakterystyka badanej grupy

Badaniem objęto pacjentów leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej (kierownik prof. dr hab. Adam Włodarkiewicz) oraz Klinice Otolaryngologii (kierownik prof. dr hab. Czesław Stankiewicz) Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2008–2013. Z udziału w badaniach wykluczono pacjentów, u których stwierdzono współistniejącą niewydolność nerek, w przeszłości chorowali i byli leczeni z powodu choroby nowotworowej, oraz tych, którzy przyjmowali witaminę B (niacyna) co najmniej 30 dni przed badaniem. Ostatecznie do badań zakwalifikowano 110 pacjentów, których podzielono na dwie grupy.

Do grupy pierwszej zakwalifikowano 69 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 61,8, przy czym dla kobiet i mężczyzn była niemal identyczna. Najmłodszy pacjent był w wieku 40 lat, a najstarszy 85. W badanej grupie mężczyzn było dwukrotnie więcej (46) niż kobiet (23).

Do grupy drugiej zakwalifikowano 41 pacjentów (w tym 18 kobiet i 23 mężczyzn) z chorobami o charakterze łagodnym. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 41,3. U 17 pacjentów rozpoznano torbiel korzeniową, u 9 stwierdzono torbiel zawiązkową, a 15 osób było leczonych z powodu przewlekłego zapalenia zatoki szczękowej. U wszystkich pacjentów zastosowano leczenie chirurgiczne z badaniem histopatologicznym usuniętych tkanek, które potwierdziło łagodny charakter schorzenia oraz obecność przewlekłego stanu zapalnego. Dla potrzeb niniejszej pracy grupę tę nazwano zmiany łagodne.

Trzecią grupę, kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników (12 kobiet, 18 mężczyzn). Średnia wieku w tej grupie wynosiła 56 lat.

3.1.2. Lokalizacja nowotworu

Wśród pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym najczęstszą lokalizacją było dno jamy ustnej – 13 pacjentów (18,8%), w tym u 3 pacjentów nowotwór obejmował tylko dno jamy ustnej, u 4 język, a u 6 wyrostek zębodołowy żuchwy. Język był pierwotną lokalizacją guza u 10 osób (14,5%) w tym na bocznej powierzchni języka występował u 5 osób, na powierzchni grzbietowej u 2, nasada języka zajęta była u 1 chorego, a u dwóch nowotwór naciekał również dno jamy ustnej. Raka płaskonabłonkowego wargi dolnej stwierdzono u 10 osób (15,2%), błony śluzowej policzka u 3 (4,3%), a u 4 pacjentów (5,8%) dziąsła dolnego. W obrębie gardła raka płaskonabłonkowego rozpoznano u 4 pacjentów (5,8%),

a w obrębie krtani u 17 osób (24,6%), w tym u 5 (7,2%) zlokalizowany był w obrębie głośni (fałdy głosowe), a u 12 (17,4%) nadgłośni. U 8 pacjentów rozpoznano raka zatoki szczękowej. Liczbę pacjentów w zależności od lokalizacji nowotworu przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Liczba pacjentów w zależności od lokalizacji nowotworu

Table 7. The number of patients in different tumor site

	Lokalizacja nowotworu <i>Tumor site</i>	Liczba pacjentów (%) <i>The number of patients</i>
Jama ustna <i>The mouth</i>	Warga dolna <i>Lower lip</i>	10 (15,2%)
	Dziąsło dolne <i>(Lower gingiva)</i>	4 (5,8%)
	Błona śluzowa policzka <i>Buccal mucosa</i>	3 (4,3%)
	Język <i>Tongue</i>	10 (14,5%)
	Dno jamy ustnej <i>Floor of mouth</i>	13 (18,8%)
Gardło <i>Pharynx</i>	Migdałek podniebienny <i>Palate tonsil</i>	4 (5,8%)
Krtień <i>Larynx</i>	Nadgłośnia <i>Supraglottis</i>	12 (17,4%)
	Głośnia <i>Glottis</i>	5 (7,2%)
	Zatoka szczękowa <i>Maxillary sinus</i>	8 (11,0%)

W niektórych przypadkach guz pierwotny obejmował również sąsiednie obszary anatomiczne, dlatego dla celów przeprowadzanej analizy lokalizacje nowotworów pogrupowano w następujący sposób:

1. jama ustna – 40 pacjentów (58%) i obejmował nowotwory zlokalizowane w obrębie wargi dolnej, dziąsła dolnego, policzka, języka oraz dna jamy ustnej
2. gardło – 4 chorych (5,8%)
3. krtień – 17 osób (24,6%)
4. zatoka szczękowa – 8 chorych (11,6%)

3.1.3. Klasyfikacja pTNM raka głowy i szyi

Anatomiczna rozległość nowotworów występujących u wszystkich pacjentów z HNSCC została oceniona na podstawie klasyfikacji pTNM [39].

Najczęściej stwierdzono cechę pT1 (37,7%) i pT2 (36,2%) odpowiednio 26 i 25 osób. Cecha pT3 występowała u 14 pacjentów (20,3%), natomiast pT4 tylko u 4 osób (5,8%).

Obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych w badaniu histopatologicznym stwierdzono u 26 chorych (37,7%), przy czym 18 z nich sklasyfikowano jako pN1 (69,2%), a 8 jako pN2 (30,8%). U żadnego z pacjentów nie stwierdzono cechy pN3 ani obecności przerzutów odległych. Biorąc pod uwagę lokalizację nowotworu stwierdzono, że w obrębie jamy ustnej cecha pT1 występowała u 17 osób (42,5%) a pT2 u 18 osób (45%). U chorych z rakiem zlokalizowanym w obrębie gardła u 4 pacjentów (po jednej osobie w grupie pT1, pT2, pT3, pT4). W obrębie krtani raka nadgłośni pT1 stwierdzono u 3 osób (25%), pT2 u 2 osób (16,6%), pT3 u 5 (42%) i pT4 u 2 pacjentów (16,6%). Natomiast w obrębie głośni u jednego chorego guz pierwotny obejmował jeden fałd głosowy – pT1 (20%), a u 4 pacjentów (80%) wielkość guza odpowiadała cesze pT2. U chorych z rakiem zatoki szczękowej u 4 pacjentów (50%) występowała cecha T1, u 3 T3 (37,5%) i u 1 pacjenta T4 (12,5%). Przerzuty do węzłów chłonnych w rakach jamy ustnej stwierdzono u 14 pacjentów (35%), w tym pN1 u 11 (27,5%) i pN2 u 3 (7,5%). W rakach zlokalizowanych w obrębie gardła przerzuty do węzłów chłonnych obserwowano u wszystkich badanych, w tym pN1 u 3 osób (75%) i pN2 u 1 osoby (25%). W grupie chorych z rakiem nadgłośni u trzech osób (25%) występowała cecha pN3, a w nowotworze zlokalizowanym w obrębie fałdów głosowych u jednej osoby (20%) pN1. W przypadku chorych z rakiem zatoki szczękowej cecha pN1 wystąpiła u 3 (37,5%) osób, pN2 u 1 (12,5%) osoby (tab. 8).

Tabela 8. Liczba pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w zależności od klasyfikacji pTNM i lokalizacji nowotworu

Table 8. The number of patients, depending on the clinical classification in different tumor site

Lokalizacja guza <i>Tumor site</i>	pTNM									
	<i>n</i>	pT1	pT2	pT3	pT4	pN0	pN1	pN2	pM0	pM1
Jama ustna <i>Mouth</i>	40	17 42,5%	18 45%	5 12,5%	0 0%	26 65%	11 27,5%	3 7,5%	40 100%	0 0%
Gardło <i>Pharynx</i>	4	1 25%	1 25%	1 25%	1 25%	0 0%	3 75%	1 25%	4 100%	0 0%
Nadgłośnia <i>Supraglottis</i>	12	3 25%	2 16,6%	5 42%	2 16,6%	9 75%	0 0%	3 25%	12 100%	0 0%
Głośnia <i>Glottis</i>	5	1 20%	4 80%	0 0%	0 0%	4 80%	1 20%	0 0%	5 100%	0 0%
Zatoka szczękowa <i>Maxillary sinus</i>	8	4 50%	0 0%	3 37,5%	1 12,5%	4 50%	3 37,5%	1 12,5%	8 100%	0 0%
Razem <i>Total</i>	69	26 37,7%	25 36,2%	14 20,3%	4 5,8%	43 72,5%	18 26%	8 11,5%	69 100%	0 0%

3.1.4. Ocena stopnia złośliwości nowotworu według Brodersa.

U wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badań standardowo wykonywano badanie histopatologiczne wycinka zmiany nowotworowej oraz mikroskopowe badanie pooperacyjne w celu określenia ostatecznego rozpoznania, oceny marginesu chirurgicznego oraz obecności przerzutów do węzłów chłonnych. Wszystkie badania zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik prof. dr hab. Wojciech Biernat).

W badaniach histopatologicznych preparatów pooperacyjnych u wszystkich 69 chorych rozpoznano raka płaskonabłonkowego. Postać raka umiarkowanie zróżnicowanego (G2) występowała u 41 pacjentów (59%), raka wysoko zróżnicowanego (G1) rozpoznano u 20 pacjentów (29%), nowotwór nisko zróżnicowany stwierdzono u 7 pacjentów (10%), natomiast u jednego pacjenta (2%) rozpoznano raka niezróżnicowanego.

Nowotwory umiarkowanie i nisko zróżnicowane najczęściej występowały w obrębie gardła i krtani, z czego cechą G2 rozpoznano u 13 pacjentów (62%), a G3 u 4 pacjentów (19%).

W jamie ustnej przeważały raki wysoko i umiarkowanie zróżnicowane, cecha G1 u 13 pacjentów (35%) a G2 u 23 pacjentów (58%). Tylko u jednego pacjenta rozpoznano raka niezróżnicowanego i był on zlokalizowany w obrębie szczęki. Dane przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Stopień złośliwości histologicznej guza u pacjentów z HNSCC w zależności od lokalizacji

Table 9. Histological classification of tumor differentiation in different tumor site

Lokalizacja guza <i>Tumor site</i>	Stopień złośliwości histologicznej guza <i>Histological grading of tumors</i>				
	<i>n</i>	G1	G2	G3	G4
Jama ustna <i>Mouth</i>	40	14 35%	23 58%	3 7%	0 0%
Gardło <i>Pharynx</i>	4	1 25%	2 50%	1 25%	0 0%
Nadgłośnia <i>Supraglottis</i>	12	2 16,6%	9 75%	1 8,4%	0 0%
Głośnia <i>Glottis</i>	5	1 20%	2 40%	2 40%	0 0%
Zatoka szczękowa <i>Maxillary sinus</i>	8	2 25%	5 63%	0 0%	1 12%
Razem <i>Total</i>	69	20 29%	41 59%	7 10%	1 2%

3.1.5. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu

W badanej populacji I stopień zaawansowania klinicznego nowotworu występował u 23 pacjentów (33,3%), II u 12 (17,4%), III u 25 (36,2%), a IV u 9 (13,1%). W obrębie jamy ustnej u chorych najczęściej stwierdzano I i III stopień zaawansowania klinicznego, odpowiednio 17 (42,5%) i 13 (32,5%) przypadków. U 4 pacjentów z nowotworem zlokalizowanym w obrębie gardła III stopień zaawansowania nowotworu stwierdzono u 75% pacjentów, a IV u 25% pacjentów.

W obrębie nadgłośni u 3 osób (25%) rozpoznano nowotwór w I lub IV stopniu zaawansowania klinicznego, II u 2 osób (16,7%) a III u 4 pacjentów (33,3%). W raku głośni w 60% przypadków (3 osoby) nowotwór miał II stopień zaawansowania, a I i III stopień występował u 20% chorych (po 1 osobie w każdym ze stopni). W obrębie zatoki szczękowej najczęściej identyfikowano nowo-

twory w I i III stopniu zaawansowania – u 6 pacjentów, po 3 chorych w każdej grupie (37,5%) (tab. 10).

Tabela 10. Stopnie zaawansowania klinicznego raka głowy i szyi w zależności od lokalizacji

Table 10. Stage grouping of head and neck cancer in different tumor site

Lokalizacja guza <i>Tumor side</i>	Grupy stopni zaawansowania klinicznego raka głowy i szyi <i>Stage grouping of head and neck cancer</i>				
	<i>n</i>	I	II	III	IV
Jama ustna <i>Mouth</i>	40	17 42,5%	7 17,5%	13 32,5%	3 7,5%
Gardło <i>Pharynx</i>	4	0 0%	0 0%	3 75%	1 25%
Nadgłośnia <i>Supraglottis</i>	12	3 25%	2 16,7%	4 33,3%	3 25%
Głośnia <i>Glottis</i>	5	1 20%	3 60%	1 20%	0 0%
Zatoka szczękowa <i>Maxillary sinus</i>	8	3 37,5%	0 0%	3 37,5%	2 25%
Razem <i>Total</i>	69	23 33,3%	12 17,4%	25 36,2%	9 13,1%

3.1.6. Przebieg leczenia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi

Kwalifikacja chorych z HNSCC do leczenia chirurgicznego odbywała się na podstawie badania klinicznego oraz badań dodatkowych, w tym badań obrazowych. Spośród 69 chorych u 38 (55%) wykonano zabieg ograniczony do usunięcia guza pierwotnego. U 31 pacjentów (45%) leczenie polegało na wycięciu guza pierwotnego i usunięciu układu chłonnego szyi. W zależności od rozległości procesu chorobowego, u tych chorych wykonano jedno- lub obustronną operację węzłową, odpowiednio u 17 osób (54,8%) i 14 osób (45,2%). W 30 przypadkach była to operacja selektywna, natomiast u 1 pacjenta została przeprowadzona operacja radykalna zmodyfikowana. U 5 pacjentów poddanych selektywnej operacji węzłowej badanie histopatologiczne nie wykazało obecności przerzutów do węzłów chłonnych. 28 pacjentów (40,6%) wymagało leczenia uzupełniającego radioterapią, chemioterapią lub radio- i chemioterapią. 16 pacjentów otrzymało w leczeniu uzupełniającym tylko radioterapię, 10 – radio- i che-

mioteraapię, 2 chorych poddanych zostało leczeniu operacyjnemu i chemioterapii.

Badaniem kontrolnym objęto 56 pacjentów (81,2%). O 13 chorych (18,8%) brak danych z powodu niezgłoszenia się na badania kontrolne. Z grupy 56 pacjentów 19 (34%) zmarło w okresie od 1 miesiąca do 56 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. W okresie 14–48 miesięcy po leczeniu u 5 chorych (7,2%) nastąpiła wznowa, w tym u 2 tylko węzłowa, u 2 węzłowa oraz miejscowa, natomiast u 1 pacjenta tylko miejscowa. Pacjenci, u których wystąpiła wznowa, poddani zostali terapii adiuwantowej lub reoperacji – radioterapię zastosowano u 2 pacjentów, u kolejnych 2 zastosowano chemioterapię, a u jednego pacjenta wykonano reoperację.

3.1.7. Dane etiologiczne

Do najczęstszych czynników etiologicznych raka płaskonabłonkowego głowy i szyi zalicza się: palenie papierosów, przewlekłe nadużywanie alkoholu, złą higienę jamy ustnej oraz nieodpowiednią dietę (ubogą w owoce i warzywa). Wśród pacjentów objętych poniższym badaniem papierosy dłużej niż 10 lat paliło 48 osób (69,5%), do nadużywania alkoholu (kilka razy w tygodniu) przyznało się 12 osób (17,4%), które wskazywały także na uzależnienie od nikotyny. U 40 pacjentów (58%) stan uzębienia, higieny jamy ustnej i uzupełnień protetycznych był niezadowolający, u 10 (14,5%) – zły. Jedynie 10 osób (14,5%) z badanej grupy regularnie spożywało owoce i warzywa, 13 (18,8%) raz w tygodniu, pozostałe 46 osób (66,7%) kilka razy w miesiącu.

3.2. Metody

3.2.1. Materiał do badań

Do próbek zawierających heparynę pobrano około 5 ml krwi od wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania oraz ochotników (grupa kontrolna). Pobraną krew niezwłocznie przekazano do Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik prof. dr hab. Julian Świerczyński).

Na badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym nr NKEBN/469/2007 i NKEBN/469-12/2010.

3.2.2. Przygotowanie materiału do badań

Dostarczoną krew, w nieprzekraczalnym czasie 30 minut od pobrania, wirowano w probówkach w wirówce laboratoryjnej typu Janetzki T32c przez 5 minut przy 3000 obr./min. Następnie pobierano osocze i zamrażano w temperaturze - 80 °C do czasu analizy. Erytrocyty płukano zmodyfikowanym buforem Krebsa-Ringera, który zawierał: 10 mM HEPES, 1,2 mM KH_2PO_4 , 125 mM NaCl, 5 mM glukozę, 2,6 mM KCl, 3 mM MgSO_4 . Celem usunięcia pozostałego osocza erytrocyty ponownie dwukrotnie płukano i wirowano, stosując te same parametry jak za pierwszym razem. Opisane procedury wykonywano w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzano ekstrakcje erytrocytów.

3.2.3. Ekstrakcja erytrocytów

Do płukanych erytrocytów w celu zahamowania reakcji enzymatycznych zachodzących w tych komórkach dodawano w stosunku 1:1 schłodzony w lodzie 2,4 M HClO_4 . Następnie próbki mieszano i umieszczano w pojemniku z lodem na około 15 minut. W dalszej kolejności próbki wirowano w mikrowirówce Centrifuge 5417R przez 3 minuty przy szybkości 13000 obr./min. Supernatant przenoszono do probówek typu Eppendorf i doprowadzano pH próbki do wartości 6-7 stosując 3M K_3PO_4 . Następnie probówki pozostawiano w lodzie na około 15 minut celem wytrącenia KClO_4 , po czym próbki ponownie wirowano przez 5 minut przy szybkości 13000 obr./min. i zbierano supernatant. Przygotowany w ten sposób ekstrakt z erytrocytów był poddawany analizie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją w UV.

3.2.4. Ekstrakcja osocza

Do osocza celem strącenia białek dodawano acetonitryl, w takiej ilości, aby jego końcowe stężenie wynosiło 70%. Następnie mieszaninę umieszczano w lodzie i po około 15 minutach wirowano przez 5 minut przy szybkości 13000 obr./min. Zebrany supernatant następnie liofilizowano, a pozostałość rozpuszczano w 100 μl buforu B fazy ruchomej metody pozwalającej na analizę metabolitów nikotynamidu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS).

3.2.5. Analiza stężeń nukleotydów w ekstraktach erytrocytów, stężeń nikotynamidu i jego metabolitów oraz aminokwasów w osoczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

3.2.5.1. Opis systemu chromatograficznego i zasady oznaczania nukleotydów przy użyciu HPLC z detekcją w UV

Oznaczenia stężeń nukleotydów adeninowych, guaninowych oraz NAD i NADP a także nukleotydowych pochodnych 4PYR (4PYTP, 4PYDP, 4PYMP i 4PYRAD) w ekstraktach erytrocytów wykonano stosując system wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC, Agilent 1100. Dane chromatograficzne zbierano i przetwarzano z zastosowaniem programu komputerowego ChemStation firmy Agilent. System ten umożliwiał uzyskanie i porównanie widm rozdzielanych związków, co ułatwiało ich identyfikację. Do rozdzielania chromatograficznych użyto prekolumny firmy Phenomenex typu SecurityGuard, wypełnionej złożem typu C18, której rola polega na zatrzymywaniu ewentualnych zanieczyszczeń, oraz kolumny właściwej firmy Phenomenex, HyperClone 3 μ BDS C18 o wymiarach 150 x 4,6 mm. Stosowano metodę gradientową opisaną wcześniej [178]. W trakcie analizy próbki były utrzymywane w temperaturze 4 °C. Analiza jakościowa badanych związków opierała się na porównaniu czasów retencji i spektrum UV do tych uzyskanych dla mieszaniny standardów. Analiza ilościowa oznaczanych związków odbywała się w oparciu o kalibrację uzyskaną na podstawie mieszaniny standardów.

3.2.5.2. Opis systemu chromatograficznego i zasady oznaczania nikotynamidu i jego metabolitów oraz aminokwasów przy użyciu HPLC z detekcją masową

Analizę stężeń nikotynamidu i produktów jego katabolizmu (MetNA, Met2PY oraz Met4PY), 4PYR i panelu aminokwasów w osoczu przeprowadzono przy użyciu detektora masowego typu potrójnego kwadrupola: TSQ Vantage EMR sprzężonego z chromatografem cieczowym Surveyor (Thermo Scientific). Jako źródło jonów użyto głowicę typu HESI2 w trybie jonizacji dodatniej. Praca detektora w trybie MS2 umożliwiała detekcję NA, MetNA, Met2PY, Met4PY oraz 4PYR w oparciu o analizę specyficznych dla tych związków jonów pochodnych. Rozdział chromatograficzny uzyskano przy użyciu kolumny Synergii Hydro-RP (4 μ m, 150 x 2,0 mm). Jako fazę ruchomą A stosowano wodny roztwór 5 mM kwasu nonafluoropentanowego (NFPA), zaś jako fazę ruchomą B 100% acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym. Analizę prowadzono przy przepływie 0,2 ml/min i gradiencie od 0% do 60% buforu B w ciągu 7 minut. Do oznaczania stężeń aminokwasów zastosowano ten sam system chromatograficz-

ny oraz detektor, zwiększając spektrum monitorowanych jonów i ich pochodnych o te, które odpowiadają poszczególnym aminokwasom.

3.3. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ SEM. Porównanie statystyczne dwóch grup przeprowadzono z zastosowaniem testu t-Studenta. Porównanie statystyczne trzech i więcej grup przeprowadzono z zastosowaniem analizy wariancji jednoczynnikowej lub testu Kruskal-Wallisa. Wartość $p < 0,05$ przyjęto jako statystycznie znaczącą.

4. WYNIKI

4.1. Stężenia nukleotydów adeninowych i guaninowych oraz NAD i NADP w ekstraktach erytrocytów u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

Stężenie ATP w erytrocytach pacjentów z HNSCC nie różniły się od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej i wynosiły odpowiednio: $1554 \pm 35,16$ i $1594 \pm 71,6$ $\mu\text{mol/l RBC}$. W grupie pacjentów ze zmianami łagodnymi stężenie ATP wynosiło $1648 \pm 49,26$ $\mu\text{mol/l RBC}$ i nie różniło się statystycznie od dwóch pozostałych grup. Stężenia katabolitów ATP (ADP, AMP oraz IMP) w badanych grupach chorych nie wykazywały różnic znamiennych statystycznie w porównaniu z wartościami obserwowanymi w grupie kontrolnej (tab. 11). Stosunek stężeń ATP/ADP we wszystkich badanych grupach wynosił około 10 (dokładniejsze dane znajdują się w tabeli 11), co jest wartością prawidłową, świadczącą o braku degradacji ATP. Ponadto ładunek energetyczny adenylanów wykazywał wartość 0,95, uznawaną za fizjologiczną, zarówno w grupie kontrolnej, jak i grupie chorych ze zmianami łagodnymi oraz z HNSCC.

Przeanalizowano także stężenia nukleotydów guaninowych (GTP i GDP) w grupie kontrolnej, ze zmianami łagodnymi i nowotworowymi (HNSCC) i nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic (tab.11). Ze względu na analizy stężeń nikotynamidu i jego metabolitów konieczne było zbadanie stężenia NAD i NADP we krwi, gdyż jak wiadomo głównym źródłem nikotynamidu w osoczu jest degradacja NAD oraz NADP. Stężenie NAD w erytrocytach w grupie osób zdrowych wynosiło $67,08 \pm 2,64$ $\mu\text{mol/l RBC}$, w grupie ze zmianami łagodnymi $67,36 \pm 2,45$ $\mu\text{mol/l RBC}$, a w grupie pacjentów z HNSCC $64,45 \pm 1,55$ $\mu\text{mol/l RBC}$ i nie były to wartości znamienne statystycznie. Podobnie stężenie NADP nie wykazywało różnic znamiennych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną ($46,11 \pm 1,68$ $\mu\text{mol/l RBC}$), a grupami chorych: ze zmianami łagodnymi i HNSCC (odpowiednio: $45,34 \pm 1,19$ i $43,15 \pm 0,89$ $\mu\text{mol/l RBC}$). Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM (tab. 11).

Tabela 11. Stężenia nukleotydów adeninowych i guaninowych, NADP i NAD oraz wielkość ładunku energetycznego adenylanów w erytrocytach osób zdrowych, ze zmianami łagodnymi i chorymi z HNSCC

Table 11. Concentration of adenine and guanine nucleotides. NADP and NAD as well as adenylate energy charge in erythrocytes of healthy subject, with benign changes and patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)

Nukleotydy purynowe <i>Purine nucleotides</i>		Kontrola <i>Control</i>	Zmiany łagodne <i>Benign changes</i>	HNSCC
GTP	μmol/l RBC	14,50 ± 0,66	15,97 ± 0,79	14,68 ± 0,47
GDP		10,52 ± 0,87	14,10 ± 1,73	13,56 ± 0,79
IMP		4,10 ± 1,42	4,44 ± 0,86	4,55 ± 0,81
ATP		1594 ± 71,6	1648 ± 49,26	1554 ± 35,16
ADP		155 ± 8,48	165,42 ± 7,19	143 ± 5,53
AMP		12,76 ± 0,87	13,43 ± 0,78	11,67 ± 0,88
NADP		46,11 ± 1,68	45,34 ± 1,19	43,15 ± 0,89
NAD		67,08 ± 2,64	67,36 ± 2,45	64,45 ± 1,55
ATP/ADP		10,34 ± 0,3	10,41 ± 0,44	11,35 ± 0,26
Ładunek energetyczny adenylanów <i>Adenylate energy charge</i>		0,95 ± 0,002	0,95 ± 0,003	0,95 ± 0,002

4.2. Stężenia metabolitów nikotynamidu we krwi u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

4.2.1. Stężenia nikotynamidu i produktów jego degradacji w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

Stężenie nikotynamidu w osoczu w grupie kontrolnej wynosiło $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/l}$ i nie różniło się w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie chorych z HNSCC $0,06 \pm 0,002$ $\mu\text{mol/l}$, ani w grupie pacjentów ze zmianami łagodnymi, gdzie wynosiło $0,007 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/l}$. Jednak proces przemiany nikotynamidu do N-metylonikotynamidu przy udziale N-metylotransferazy nikotynamidu jest bardzo szybki. Dlatego też konieczne jest oznaczenie stężenia N-metylonikotynamidu (MNA) w osoczu. Stężenie MNA w osoczu w żadnej z badanych grup nie różniło się statystycznie i wynosiło odpowiednio: w grupie kontrolnej $0,11 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/l}$, w grupie chorych ze zmianami łagodnymi $0,12 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/l}$ i w grupie chorych z HNSCC $0,1 \pm 0,008$ $\mu\text{mol/l}$.

W wyniku działania oksydazy aldehydowej MNA ulega przemianie do dwóch utlenionych izoform: Met2PY i Met4PY. Stężenie Met2PY w grupie pacjentów z HNSCC było o około 50% wyższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło odpowiednio $1,47 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/l}$ oraz $1,13 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/l}$. Z kolei stężenie Met2PY w grupie pacjentów ze zmianami łagodnymi wynosiło $1,14 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/l}$ i nie różniło się od stężenia obserwowanego u osób zdrowych. Wyniki przedstawiono na ryc. 2A.

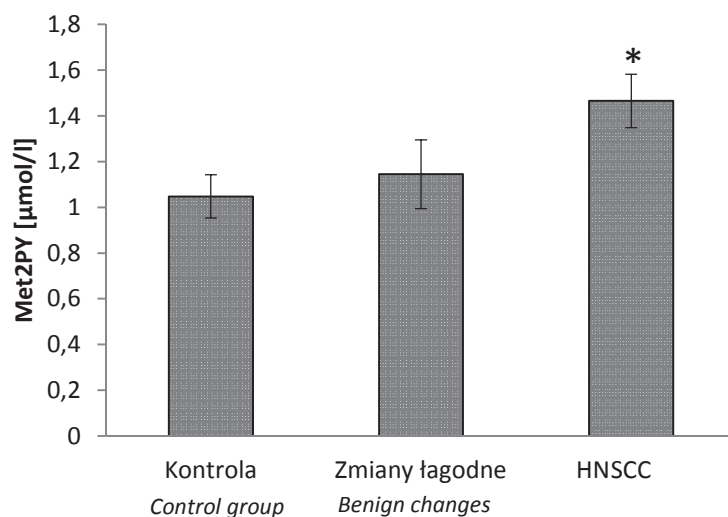
Stężenie Met4PY w osoczu pacjentów z HNSCC było 2-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło odpowiednio: $0,7 \pm 0,034$ $\mu\text{mol/l}$ i $0,37 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/l}$. Niestety ten wzrost stężenia Met4PY nie pozwala na odróżnienie pacjentów z HNSCC od chorych ze zmianami łagodnymi, gdyż w tej ostatniej grupie stężenie Met4PY było takie samo jak w grupie pacjentów z HNSCC i wynosiło $0,74 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/l}$. Wyniki przedstawiono na ryc. 2B.

Suma stężeń Met2PY i Met4PY nie pozwala na zróżnicowanie grupy pacjentów z HNSCC od pacjentów ze zmianami łagodnymi. U pacjentów z HNSCC suma stężeń końcowych metabolitów nikotynamidu była najwyższa i wynosiła $2,17 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/l}$, u pacjentów ze zmianami łagodnymi $1,88 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/l}$. U osób zdrowych (kontrola) suma stężeń była najniższa i wynosiła $1,32 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/l}$. Wyniki przedstawiono na ryc. 2C.

Ze względu na podwyższone stężenie Met2PY i Met4PY w grupie pacjentów z HNSCC suma stężeń wszystkich głównych produktów katabolizmu NAD była najwyższa i wynosiła $2,33 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/l}$ i była statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej ($1,48 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/l}$). Stężenie wszystkich metabolitów NAD w grupie pacjentów ze zmianami łagodnymi było nieznacznie wyższe w porównaniu do kontroli i nieznacznie niższe w porównaniu do grupy

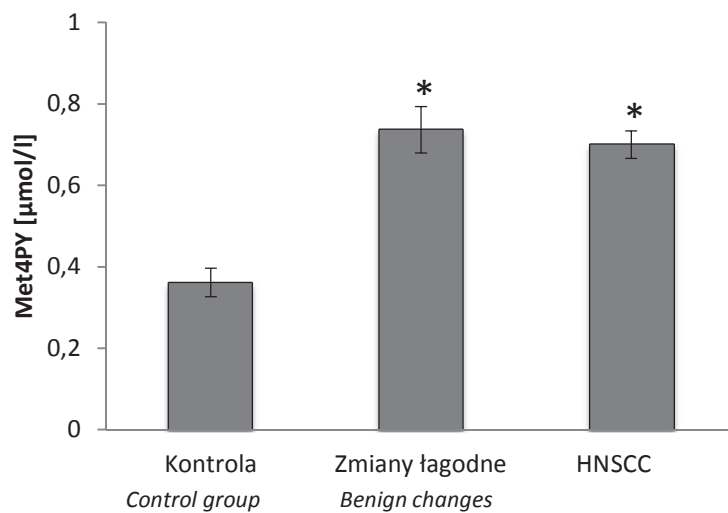
z HNSCC i wynosiło $2,06 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$. Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.

A)



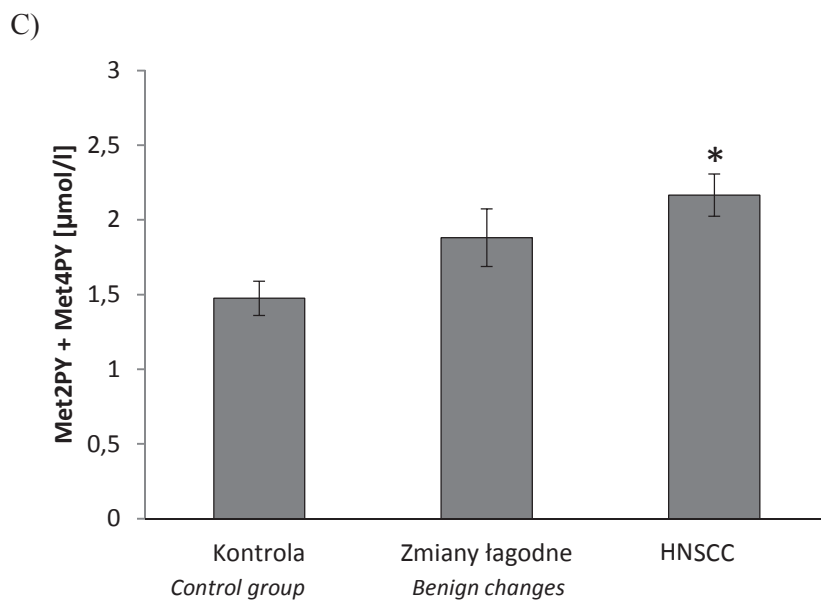
* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0.05$ control group vs. HNSCC)

B)



* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0.05$ control group vs. HNSCC)

* $p < 0,05$ kontrola vs. zmiany łagodne (* $p < 0.05$ control group vs. benign changes)



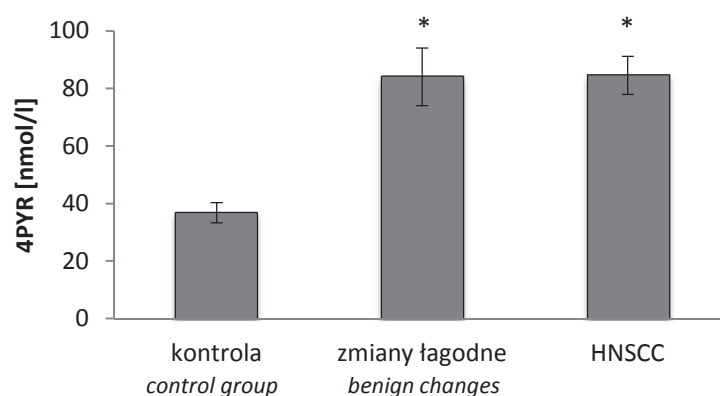
* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0.05$ control group vs. HNSCC)

Rycina 2. Stężenia końcowych produktów nikotynamidu w osoczu osób zdrowych (kontrola), ze zmianami łagodnymi i HNSCC: A) stężenie Met2PY, B) stężenie Met4PY, C) suma stężeń Met2PY i Met4PY

Figure 2. The final concentration of nicotinamide in healthy (control group) plasma, benign and HNSCC: A) concentration Met2PY, B) concentration Met4PY, C) sum of the concentrations Met2PY i Met4PY

4.2.2. Stężenie 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

Stężenie 4PYR w osoczu pacjentów z HNSCC było 2-krotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną i wynosiło odpowiednio: $0,087 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$ i $0,037 \pm 0,004 \mu\text{mol/l}$. Był to wzrost statystycznie znamieny ($p < 0.05$). U chorych ze zmianami łagodnymi stężenie 4PYR w osoczu wynosiło $0,74 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$ i było statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki nie pozwalają na zróżnicowanie grupy pacjentów z HNSCC od grupy chorych ze zmianami łagodnymi (ryc. 3). Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.



* $p < 0.05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0.05$ control group vs. HNSCC)

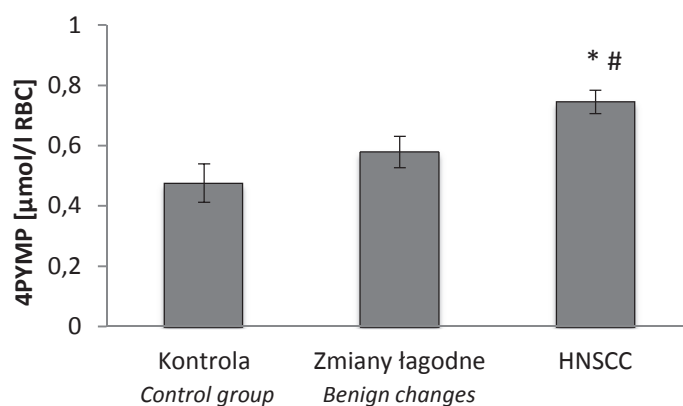
* $p < 0.05$ kontrola vs. zmiany łagodne (* $p < 0.05$ control group vs. benign changes)

Rycina 3. Stężenia 4PYR w osoczu osób zdrowych (kontrola), ze zmianami łagodnymi i HNSCC

Figure 3. 4PYR concentrations in plasma in patients with HNSCC, benign changes and control group

4.2.3. Stężenia pochodnych nukleotydowych 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) w erytrocytach u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

4PYR z osocza wychwytywany jest przez erytrocyty, które mają zdolność metabolizowania tego związku do nukleotydowych pochodnych. Pod wpływem kinazy adenzynowej 4PYR przekształcany jest do 4PYMP. Stężenie 4PYMP w ekstraktach erytrocytów osób zdrowych wynosiło $0,48 \pm 0,06 \mu\text{mol/l RBC}$. W grupie pacjentów z HNSCC było wyższe, istotnie statystycznie i wynosiło $0,7 \pm 0,039 \mu\text{mol/l RBC}$. Stężenie 4PYMP u pacjentów ze zmianami łagodnymi wynosiło $0,57 \pm 0,05 \mu\text{mol/l RBC}$ i nie wykazywało różnic statystycznie znamiennej w stosunku do osób zdrowych. Było natomiast statystycznie niższe w stosunku do wartości obserwowanych u osób z chorobą nowotworową (ryc. 4).



* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0,05$ control group vs. HNSCC)

$p < 0,05$ zmiany łagodne vs. HNSCC (# $p < 0,05$ benign vs. HNSCC)

Rycina 4. Stężenia 4PYMP w ekstraktach erytrocytów u osób z HNSCC, ze zmianami łagodnymi i osób zdrowych

Figure 4. 4PYMP concentrations in erythrocytes in patients with HNSCC, benign changes and control group

Z kolei 4PYMP może z jednej strony ulegać przemianie do 4PYDP, a następnie do 4PYTP, z drugiej do analogu NAD – 4PYRAD. W przeprowadzonych analizach nie zaobserwowano różnic w stężeniu żadnego z tych związków w trzech badanych grupach (tab. 12).

Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.

Tabela 12. Stężenia pochodnych 4PYR w ekstraktach erytrocytów u osób z HNSCC, ze zmianami łagodnymi i osób zdrowych

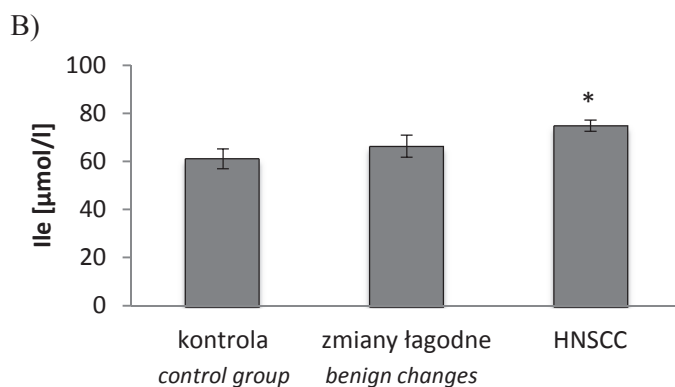
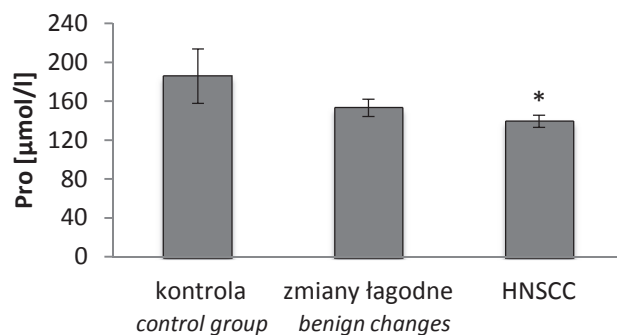
Table 12. Concentration of 4PYR derivatives in erythrocyte extracts of patients with HNSCC, benign changes and in healthy subject (control group)

Pochodne nukleotydowe 4 PYR w erytrocytach <i>4PYR derivatives in erythrocytes</i>		Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Zmiany łagodne <i>Benign changes</i>	HNSCC
4PYDP	μmol/l RBC	0,41 ±0,06	0,56 ±0,04	0,51 ±0,031
4PYTP		15,33 ±0,76	15,58 ±0,77	17,21 ±0,65
4PYRAD		0,35 ±0,05	0,45 ±0,05	0,44 ±0,040

4.3. Stężenia aminokwasów w osoczu u chorych z rakiem płaskonabłonkowym, zmianami łagodnymi oraz u osób zdrowych

Stężenia aminokwasów w procesie nowotworzenia ulegają zmianom, jednak niewiele wiadomo na temat ich zmian w przypadku HNSCC. Z tego powodu oznaczono panel 16 stężeń aminokwasów w osoczu. W wyniku przeprowadzonych analiz okazało się, że stężenie proliny (Pro) u pacjentów z HNSCC istotnie statystycznie obniża się w porównaniu do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, odpowiednio $185,95 \pm 28 \mu\text{mol/l}$ i $139,35 \pm 6,14 \mu\text{mol/l}$ (ryc. 5A). Wzrost stężenia pomiędzy tymi dwoma grupami zaobserwowano w przypadku innego aminokwasu, izoleucyny (Ile). W grupie kontrolnej stężenie Ile wynosiło $61,16 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$, a w grupie pacjentów z HNSCC $74,89 \pm 2,28 \mu\text{mol/l}$ (ryc. 5B). U pacjentów ze zmianami łagodnymi, stężenie proliny było obniżone w stosunku do grupy kontrolnej, ale nie statystycznie różne, zaś stężenie izoleucyny podobne jak u osób zdrowych (ryc. 5A, 5B).

A)

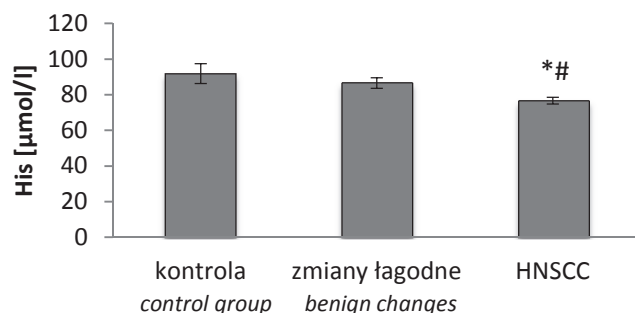


* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0.05$ control vs. HNSCC)

Rycina 5. Stężenia proliny (A) i izoleucyny (B) w osoczu osób z HNSCC w porównaniu z grupą pacjentów ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną

Figure 5. Proline and isoleucine concentration in plasma in patients with HNSCC in comparison with a group of patients with benign changes and control group

Aminokwasem, którego stężenie jest niższe w grupie pacjentów z HNSCC jest histydyna (His). Stężenie His u pacjentów w grupie z HNSCC wynosiło $76,63 \pm 1,94 \mu\text{mol/l}$ i było statystycznie znacząco niższe zarówno w stosunku do grupy kontrolnej ($91,88 \pm 5,58 \mu\text{mol/l}$), jak i u pacjentów ze zmianami łagodnymi ($86,61 \pm 2,97 \mu\text{mol/l}$) (ryc. 6).



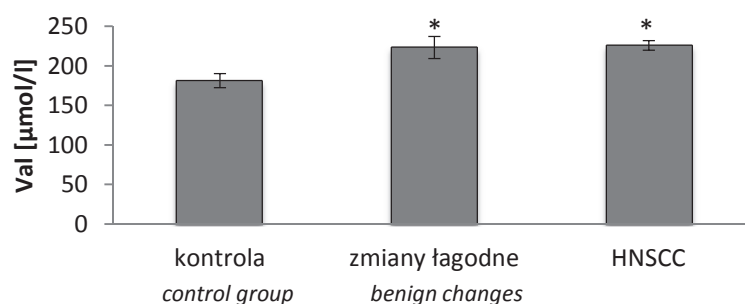
* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0,05$ control vs. HNSCC)

$p < 0,05$ zmiany łagodne vs. HNSCC (# $p < 0,05$ benign vs. HNSCC)

Rycina 6. Stężenia histydy w osoczu osób z HNSCC w porównaniu z grupą pacjentów ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną

Figure 6. Histidine concentration in plasma in patients with HNSCC in comparison with a group of patients with benign changes and control group

Aminokwasem, którego stężenie wzrastało u pacjentów z HNSCC w porównaniu do kontroli była walina (Val). W grupie kontrolnej to stężenie wynosiło $181,51 \pm 8,94$ μmol/l, natomiast w grupie pacjentów z HNSCC wynosiło $225,98 \pm 6,14$ μmol/l. Stężenie to wzrastało także u pacjentów ze zmianami łagodnymi i wynosiło $223,29 \pm 13,84$ μmol/l (ryc. 7)



* $p < 0,05$ kontrola vs. HNSCC (* $p < 0,05$ control vs. HNSCC)

* $p < 0,05$ kontrola vs. zmiany łagodne (* $p < 0,05$ benign vs. HNSCC)

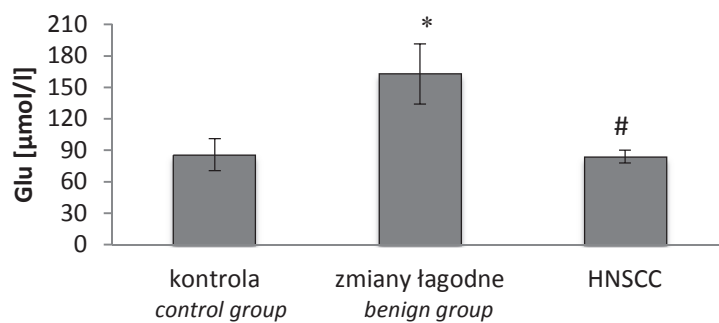
Rycina 7. Stężenia waliny w osoczu osób z HNSCC z grupą pacjentów ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną

Figure 7. Valine concentration in plasma in patients with HNSCC in comparison with a group of patients with benign changes and control group

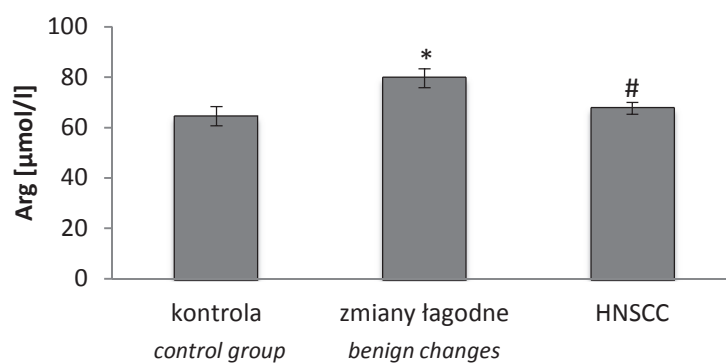
Interesująco przedstawiają się stężenia pięciu aminokwasów: seryny (Ser), asparaginy (Asp), asparaginy (Asn), glutaminianu (Glu) i argininy (Arg). W przypadku tych aminokwasów nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z HNSCC. Natomiast w grupie pacjentów ze zmia-

nami łagodnymi zaobserwowano znaczący statystycznie wzrost stężeń tych aminokwasów, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, ale też i grupy pacjentów nowotworowych. W przypadku Asp i Glu ten wzrost był ponad 2-krotny (ryc. 8).

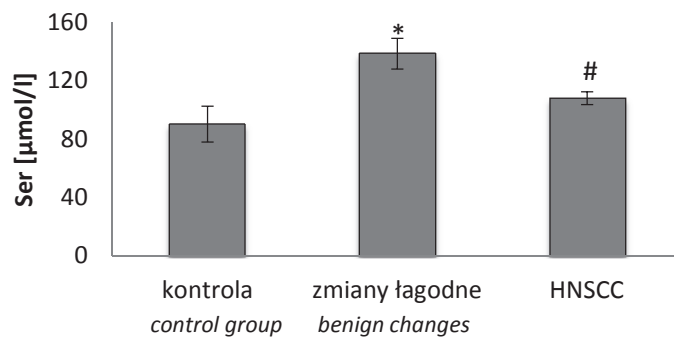
A)



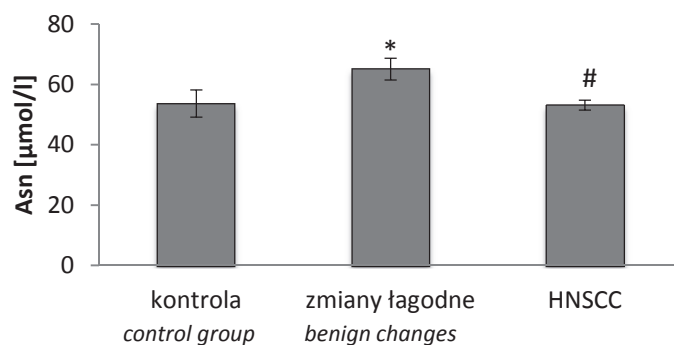
B)



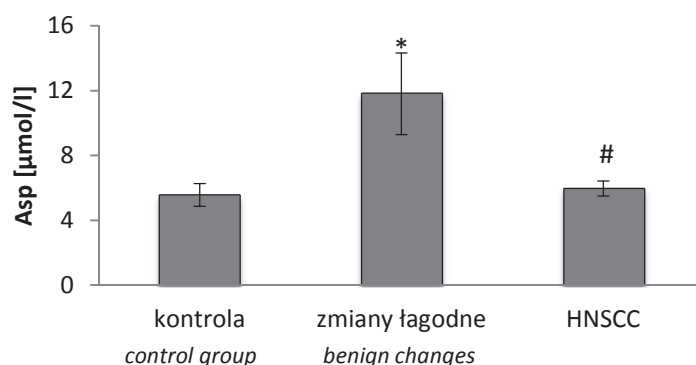
C)



D)



E)



* $p < 0,05$ kontrola vs. zmiany łagodne (* $p < 0.05$ control vs. benign)

$p < 0,05$ zmiany łagodne vs. HNSCC (# $p < 0.05$ benign vs. HNSCC)

Rycina 8. Stężenia glutaminianu (A), argininy (B), seryny (C), asparaginy (D), kwasu asparaginowego (E) w osoczu osób z HNSCC w porównaniu z grupą pacjentów ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną

Figure 8. Concentration of glutamate (A), arginine (B), serine (C), asparagine (D), aspartic acid (E) in plasma in patients with HNSCC in comparison with a group of patients with benign changes and control group

W przypadku stężenia leucyny (Leu) i tryptofanu (Trp) można zaobserwować tendencję spadku stężenia tych aminokwasów w grupie pacjentów z HNSCC w porównaniu do grupy kontrolnej i pacjentów ze zmianami łagodnymi, ale nie są to różnice statystycznie znamienne (wyniki w tabeli 13).

Stężenia alaniny (Ala), metioniny (Met), tyrozyny (Tyr), treoniny (Thr), fenylalaniny (Phe), cysteiny (Cys) nie wykazywały różnic pomiędzy badanymi grupami. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.

Tabela 13. Stężenia aminokwasów w osoczu osób z HNSCC w porównaniu z grupą pacjentów ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną

Table 13. Amino acids concentration in plasma of subject with HNSCC in comparison with subject with benign changes and control group

Aminokwasy <i>Amino acids</i>		Kontrola <i>Control group</i>	Zmiany łagodne <i>Benign changes</i>	HNSCC
Ala	μmol/l	274,79 ±23,30	242,01 ±11,69	228,01 ±12,08
Cys		32,05 ±4,56	30,82 ±2,25	36,52 ±1,63
Met		25,00 ±1,62	32,18 ±6,41	22,92 ±0,69
Tyr		68,51 ±4,54	78,55 ±5,53	67,37 ±1,94
Leu		124,60 ±7,86	122,29 ±7,03	101,47 ±3,86
Thr		50,85 ±2,58	57,23 ±2,83	55,44 ±1,45
Phe		68,85 ±3,07	70,70 ±4,05	68,82 ±1,65
Trp		66,12 ±4,97	58,37 ±3,75	56,37 ±1,94

4.4. Stężenie nikotynamidu i jego pochodnych we krwi a zaawansowanie anatomiczne i stopień złośliwości histologicznej raka płaskonabłonkowego głowy i szyi

4.4.1. Zależność pomiędzy stężeniem metabolitów nikotynamidu w osoczu oraz nukleotydowych pochodnych 4PYR w erytrocytach u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a stopniem złośliwości histologicznej nowotworu

U pacjentów z HNSCC obserwuje się wzrost metabolitów i pochodnych nikotynamidu we krwi (omówiony w pkt. 4.2–4.3). To spostrzeżenie nasuwa pytanie, czy istnieje zależność pomiędzy stężeniami badanych związków a stopniem złośliwości histologicznej nowotworu.

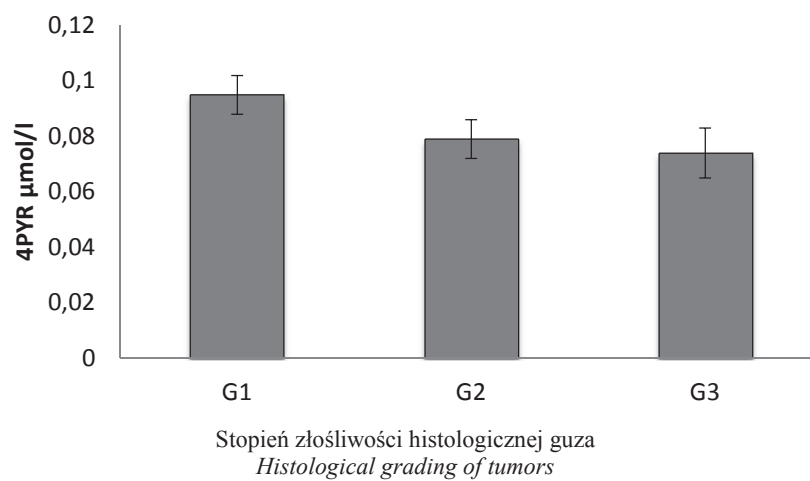
Ze względu na niewielką grupę pacjentów z nowotworami nisko zróżnicowanymi (G3) i niezróżnicowanymi (G4) na potrzeby prowadzonych badań chorych z cechą G4 włączono do grupy G3.

Analiza wyników pokazała, że stężenie 4PYR w osoczu obniżało się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. W stopniu G1 wynosiło $94,7 \pm 17$ nmol/l, natomiast w G3 74 ± 9 nmol/l. Jednak nie była to wartość istotna statystycznie (ryc. 9A). Podobne zmiany obserwowano w przypadku monofosforanu 4PYR. Najwyższe stężenie 4PYMP w erytrocytach stwierdzono w grupie pacjentów z nowotworem wysoko zróżnicowanym G1 i wynosiło ono $0,81 \pm 0,06$ μ mol/l RBC. W grupie pacjentów z nowotworem umiarkowanie zróżnicowanym G2 stężenie 4PYMP w erytrocytach wynosiło $0,65 \pm 0,05$ μ mol/l RBC, najniższe natomiast stwierdzono w grupie chorych z rakiem nisko zróżnicowanym G3 i wynosiło $0,35 \pm 0,07$ μ mol/l RBC. Wyniki te były istotnie statystycznie i pozwalały na zróżnicowanie pacjentów w zależności od stopnia złośliwości histologicznej zarówno między G1 vs. G3 jak i G2 vs. G3. Pomimo tendencji spadkowej nie pozwoliły na zróżnicowanie G1 vs. G2 (ryc. 9B).

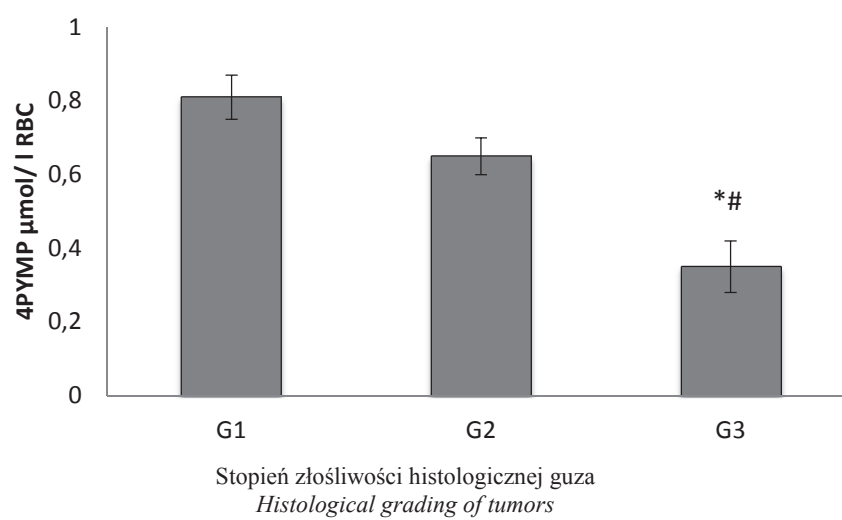
Analizując stężenie 4PYRAD w erytrocytach, stwierdzono odwrotną zależność: stężenie tego związku wzrastało wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. Najwyższe stężenie 4PYRAD odnotowano u pacjentów z rakiem nisko zróżnicowanym G3 ($0,56 \pm 0,10$ μ mol/l RBC). W przypadku G2 stężenie to wynosiło $0,46 \pm 0,05$ μ mol/l RBC. Najniższa wartość stężenia była w grupie chorych, w której rozpoznano wysoko zróżnicowaną postać raka płaskonabłonkowego G1 i wynosiła ona $0,39 \pm 0,06$. Stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy G1 vs. G3. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic między grupami pacjentów ze zróżnicowaniem: G2 vs. G3 i G1 vs. G2 (ryc. 9C).

Dla pozostałych pochodnych nikotynamidu nie stwierdzono żadnych zależności ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu (wyniki zamieszczono w tabeli 14). Stężenia żadnego z analizowanych aminokwasów nie korelowały ze stopniem złośliwości histologicznej.

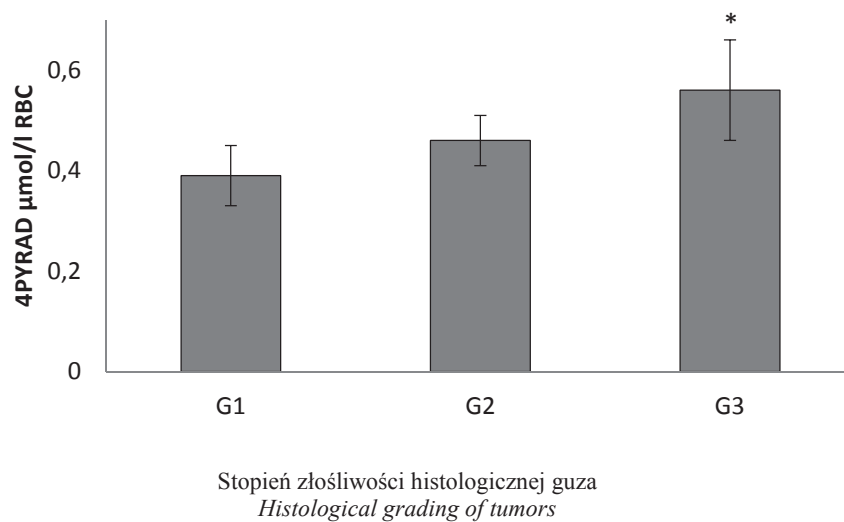
A)



B)



C)



* $p < 0,05$ G1 vs. G3 (* $p < 0.05$ G1vs.G3)

$p < 0,05$ G2 vs. G3 (# $p < 0.05$ G2vs.G3)

Rycina 9. Stężenie 4PYR w osoczu (A) oraz 4PYMP (B) i 4PYRAD (C) w ekstraktach erytrocytów pacjentów z HNSCC w różnych stopniach złośliwości histologicznej

Figure 9. 4PYR plasma concentration A) 4PYMP B) 4PYRAD C) in red blood cell in patients in various histological degree

Tabela 14. Stężenie nikotynamidu i jego pochodnych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu

Table 14. Nicotinamide and its derivatives concentration depending on the degree of histological differentiation

A)

Nikotynamid i jego metabolity <i>Nicotinamide and its derivatives</i>		Stopnie złośliwości histologicznej <i>Degree of histological differentiation</i>		
		G1	G2	G3
NA	μmol/l	0,06 ±0,004	0,06 ±0,002	0,07 ±0,006
MetNA		0,1 ±0,02	0,11 ±0,009	0,12 ±0,02
Met2PY		1,43 ±0,2	1,5 ±0,16	1,12 ±0,23
Met4PY		0,71 ±0,06	0,69 ±0,05	0,59 ±0,06

B)

Pochodne nukleotydowe 4 PYR w erytrocytach <i>4PYR derivatives in erythrocytes</i>		Stopnie złośliwości histologicznej <i>Degree of histological differentiation</i>		
		G1	G2	G3
4PYDP	μmol/RBC	0.48 ±0.046	0.47 ±0.07	0.35 ±0.07
4PYTP		18.53 ±1.5	17.12 ±0.8	16.57 ±1.42

4.4.2. Zależność pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu

Do celów tej analizy chorych z HNSCC w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu podzielono na dwie grupy:

1. do grupy I zaliczono 35 chorych, u których stwierdzono I i II stopień zaawansowania klinicznego nowotworu, gdzie zasięg guza pierwotnego ograniczony jest do narządu, z którego się wywodzi
2. do grupy II zaliczono 34 chorych z rozległym procesem nowotworowym, w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego, gdzie nowotwór obejmował również regionalne węzły chłonne i narządy odległe.

Analiza stężenia wszystkich badanych metabolitów nikotynamidu w osoczu (tab. 15A) oraz stężeń nukleotydowych pochodnych 4PYR w ekstraktach erytrocytów (tab. 15B) pacjentów z HNSCC nie wykazała statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupami. Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.

Tabela 15. Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu (A) oraz stężenia nukleotydowych pochodnych 4PYR w ekstraktach erytrocytów (B) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu

Table 15. Nicotinamide metabolites concentration in serum A) derivatives 4PYR concentration in erythrocytes B) in HNSCC patients depending on the clinical severity of cancer

A)

Metabolity nikotynamidu w osoczu <i>Nicotinamide metabolites</i>		Grupy zaawansowania klinicznego nowotworu <i>Groups of clinical severity of cancer</i>	
		I	II
NA	μmol/l	0,06 ±0,03	0,06 ±0,03
MetNA		0,11 ±0,01	0,10 ±0,01
Met2PY		1,45 ±0,16	1,43 ±0,17
Met4PY		0,73 ±0,05	0,67 ±0,04
4PYR		0,086 ±0,007	0,088 ±0,01

B)

Pochodne nukleotydowe 4PYR w erytrocytach <i>4PYR derivatives in erythrocytes</i>		Grupy zaawansowania klinicznego nowotworu <i>Groups of clinical severity of cancer</i>	
		I	II
4PYMP	μmol/l RBC	0,6 ±0,05	0,73 ±0,05
4PYDP		0,49 ±0,04	0,47 ±0,04
4PYTP		17,2 ±0,91	18,46 ±1,11
4PYRAD		0,42 ±0,04	0,41 ±0,06

4.4.3. Zależność pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi a klasyfikacją kliniczną TNM

W grupie pacjentów z HNSCC nie znaleziono żadnej zależności pomiędzy wielkością guza pierwotnego a stężeniami badanych związków. Stężenia pochodnych nikotynamidu w zależności od cechy T przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu (A) oraz stężenia nukleotydowych pochodnych 4PYR w ekstraktach erytrocytów (B) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w zależności od cechy T klasyfikacji klinicznej TNM

Table 16. Nicotinamide metabolites concentration in serum A) derivatives 4PYR concentration in erythrocytes B) in HNSCC patients depending on the TNM classification (feature T)

A)

Metabolity nikotynamidu w osoczu <i>Nicotinamide metabolites</i>		Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu Cecha T <i>Clinical severity of cancer (feature T)</i>		
		T1	T2	T3
NA	μmol/l	0,06 ±0,004	0,06 ±0,003	0,06 ±0,004
MetNA		0,093 ±0,008	0,12 ±0,09	0,095 ±0,01
Met2PY		1,38 ±0,12	1,68 ±0,25	1,3 ±0,22
Met4PY		0,68 ±0,05	0,75 ±0,07	0,66 ±0,06
4PYR		0,087 ±0,006	0,096 ±0,018	0,073 ±0,006

B)

Pochodne nukleotydowe 4PYR w erytrocytach <i>4PYR derivatives in erythrocytes</i>		Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu Cecha T <i>Clinical severity of cancer (feature T)</i>		
		T1	T2	T3
4PYMP	μmol/l RBC	0,78 ±0,06	0,7 ±0,06	0,75 ±0,08
4PYDP		0,48 ±0,04	0,46 ±0,04	0,49 ±0,07
4PYTP		17,4 ±0,93	18,56 ±1,47	17,41 ±1,27
4PYRAD		0,42 ±0,05	0,39 ±0,06	0,46 ±0,09

Dla potrzeb dalszych analiz wszystkich pacjentów, u których stwierdzono obecność HNSCC, podzielono pod względem cechy N na dwie grupy:

- grupa N0 – pacjenci, u których w badaniu histopatologicznym nie stwierdzono obecności przerzutów do węzłów chłonnych (43 osoby)
- oraz grupa N+ – pacjenci, u których obecne były przerzuty do węzłów chłonnych (26 osób).

Statystycznie znamiennej zależności nie przyniosło również porównanie wartości stężeń metabolitów nikotynamidu u pacjentów z HNSCC w zależności od cechy N. Wyniki przedstawiono w tabeli 17.

Wszystkie wartości są przedstawiane jako wartość średnia $\pm$ SEM.

Tabela 17. Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu (A) oraz stężenia nukleotydowych pochodnych 4PYR w ekstraktach erytrocytów (B) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w zależności od cechy N klasyfikacji klinicznej TNM

Table 17. Nicotinamide concentration of metabolites in patients with head and neck carcinoma depending of grade staging on the lymph nodes

A)

Metabolity nikotynamidu w osoczu <i>Nicotinamide metabolites</i>		Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu Cecha N <i>Clinical severity of cancer (feature N)</i>	
		N0	N1
NA	μmol/l	0,06 ±0,003	0,06 ±0,004
MetNA		0,11 ±0,009	0,10 ±0,016
Met2PY		1,54 ±0,15	1,35 ±0,18
Met4PY		0,73 ±0,05	0,65 ±0,04
4PYR		0,084 ±0,006	0,092 ±0,016

B)

Pochodne nukleotydowe 4PYR w erytrocytach <i>4PYR derivatives in erythrocytes</i>		N0	N1
4PYMP	μmol/l RBC	0,76 ±0,046	0,72 ±0,05
4PYDP		0,49 ±0,036	0,46 ±0,04
4PYTP		16,99 ±0,83	19,19 ±1,29
4PYRAD		0,42 ±0,04	0,41 ±0,07

Nie stwierdzono żadnej zależności pomiędzy stężeniami metabolitów nikotynamidu, stężeniami aminokwasów a lokalizacją guza.

5. DYSKUSJA

Trwające od wielu lat poszukiwania związku lub grupy związków mogących być markerem raka płaskonabłonkowego w obrębie głowy i szyi, a także nie-liczne doniesienia o zależności pomiędzy związkami azotowymi, ich metabolizmem, a tym typem nowotworu skłoniły mnie do szerszego zainteresowania się tym zagadnieniem. W swoich badaniach skoncentrowałam się nad stężeniami produktów degradacji NAD i ich pochodnych w ekstraktach erytrocytów i osoczu oraz stężeniami aminokwasów w osoczu chorych z HNSCC.

Metabolity nikotynamidu i produkty jego katabolizmu

Przeprowadzone badania wykazały, że stężenia końcowych produktów degradacji nikotynamidu w grupie chorych z HNSCC są wyższe niż u osób zdrowych. Stężenie Met4PY w osoczu w grupie chorych było 2-krotnie wyższe w stosunku do stężenia obserwowanego u osób zdrowych. Wzrost ten był obecny u 90% badanych chorych (62/69 osób). Stężenie Met2PY w osoczu chorych z HNSCC było wyższe o 50% w porównaniu do osób zdrowych i ten wzrost obserwowano u 54% pacjentów (37/69 osób). Na początku należy wykluczyć, że zmiany w stężeniach produktów degradacji nikotynamidu są spowodowane degradacją NAD, wynikającą z procedury przygotowywania próbek do analizy. Stężenie NAD w erytrocytach we wszystkich badanych grupach były niemal identyczne (wyniki umieszczone w tab.11). Należy więc dopatrywać się innych przyczyn wzrostu stężeń tych związków.

W piśmiennictwie istnieją doniesienia, że wzrost stężenia Met2PY i Met4PY obserwuje się w stanach patologicznych. Wiadomo bowiem, że u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek dochodzi do akumulacji tych związków w organizmie [176], a wzrost stężenia tych związków silnie koreluje ze stopniem niewydolności tego narządu [173]. W przypadku jednak przedstawianych tutaj badań u wszystkich badanych pacjentów stężenie kreatyniny w osoczu było w granicach normy fizjologicznej, nie był to więc powód wzrostu stężenia Met2PY i Met4PY u chorych z HNSCC.

Badania pokazują, że metabolizm nikotynamidu ma też silny związek z wiekiem. Z jednej strony wiadomo, że wraz z wiekiem zwiększa się ilość uszkodzeń DNA, co z kolei wpływa na zwiększoną aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy), jednego z enzymów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzonego DNA. Taką zwiększoną aktywność zaobserwowano w limfocytach u studentów [115]. Z drugiej strony od dawna istnieją powiązania pomiędzy długością życia a sirtuinami, enzymami odpowiedzialnymi za deacetylację białek [71, 195]. Substratem dla obu tych enzymów jest NAD i w wyniku aktywacji tych enzymów powstaje nikotynamid. Nasilenie wspomnianych wyżej procesów z wiekiem może wiązać się ze zwiększoną degradacją nikotynamidu. Badając wpływ wieku na przemianę nikotynamidu, zaobserwowano, że w osoczu ludzi

starszych stężenie końcowych metabolitów nikotynamidu jest ok. 2-krotnie wyższe niż u osób młodych [175]. Ponadto wiadomo, że ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową wzrasta z wiekiem pacjenta. Zachorowanie na HNSCC częściej występuje u ludzi w wieku powyżej 50 roku życia, niż u ludzi młodych co zaobserwowano we własnej praktyce, jak i publikowanych danych statystycznych. Jednak w uzyskanych wynikach, wiek nie był czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost stężenia Met2PY i Met4PY, gdyż dla wyeliminowania tego czynnika grupa kontrolna była pod względem wieku taka sama jak grupa chorych z HNSCC (w obu grupach średnia wieku była podobna i wynosiła około 60 lat).

Wydaje się, że obserwowany w osoczu wzrost stężenia Met2PY i Met4PY nie jest jednoznacznie znamienny tylko dla procesu nowotworowego, a raczej częściowo związany z przebiegiem procesu zapalnego. Wskazują na to wyniki uzyskane u pacjentów ze zmianami łagodnymi. Stężenie Met4PY w osoczu w grupie chorych ze zmianami łagodnymi, podobnie jak w grupie z HNSCC, było 2-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Aż u 83% chorych stężenie Met4PY w osoczu było podwyższone w stosunku do wartości średniej w grupie kontrolnej (34/41 osoby). Stężenie Met2PY w osoczu nie różniło się znacząco od stężenia obserwowanego w grupie kontrolnej. U mniej niż 30% pacjentów ze zmianami łagodnymi obserwowano podwyższone stężenie tego związku w stosunku do wartości średniej w grupie kontrolnej. Niemniej jednak nie zaobserwowano statystycznie znamiennej różnicy stężenia Met2PY w grupie chorych ze zmianami łagodnymi w porównaniu z chorymi z HNSCC.

W piśmiennictwie istnieją doniesienia o powiązaniu stanów zapalnych z nowotworami jamy ustnej [47]. Kilka prac wskazuje na powiązanie metabolizmu NAD z czynnikami prozapalnymi. Z jednej strony istnieje zależność pomiędzy aktywnością sirtuin, a procesem zapalnym [52, 139], z drugiej powiązania pomiędzy visfatyną (adipokiną posiadającą właściwości enzymatyczne fosforybozylotransferazy nikotynamidu) a czynnikami prozapalnymi (IL-6, CRP) [95]. Dodatkowo jeszcze najnowsze doniesienia wskazują, że poziom visfatyny w osoczu pacjentów z OSCC (*oral squamous cell carcinoma*) jest wyższy niż u osób zdrowych i wzrasta z postępem choroby. Autorzy tych badań sugerują, że visfatyna, będąca prozapalną cytokiną, odgrywa ważną rolę w patogenezie OSCC [218]. Nie ma jednak żadnych doniesień łączących stężenia końcowych produktów degradacji nikotynamidu z czynnikami prozapalnymi, co wydaje się ciekawym wynikiem, jednak konieczna jest głębsza analiza tych zależności.

W wyniku przeprowadzonych analiz nie zaobserwowano zmian w stężeniach nikotynamidu i N-metylonikotynamidu pomiędzy grupą chorych z HNSCC a kontrolą. Nie pozostaje to jednak w sprzeczności z danymi piśmiennictwa. Co prawda pojawiły się informacje o wzroście aktywności NNMT w grupie chorych z OSCC w porównaniu do aktywności w tkance zdrowej [159]. Pojawiły się też informacje o wyższym poziomie białka NNMT w ślinie

pacjentów z OSCC [159]. W żadnym z powyższych przypadków nie oznaczano jednak stężenia NA i MNA w badanym materiale biologicznym. Wydaje się, że prawdopodobny szlak zdarzeń u chorych z HNSCC przedstawia się następująco: wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za powstawanie nikotynamidu, aktywowany czynnikami zapalnymi, zwiększona aktywność NNMT oraz oksydazy aldehydowej i to w konsekwencji prowadzi do zwiększonego stężenia końcowych metabolitów nikotynamidu u pacjentów z HNSCC.

Metabolizm 4PYR

Stężenie 4PYR w osoczu chorych z HNSCC było 2-krotnie wyższe w stosunku do stężenia oznaczonego u osób zdrowych. Ten wzrost obserwowano u 93% badanych chorych (64/69 badanych osób). Wzrost stężenia tego związku, tylko kilkunastokrotny, zaobserwowano u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek [172]. I o ile wzrost stężenia 4PYR w osoczu pacjentów z przewlekłą chorobą nerek można wyjaśnić niewydolnością nerek, o tyle u pacjentów z HNSCC nie jest to przyczyną. Można jedynie przypuszczać, że z jednej strony w procesie nowotworowym obserwujemy zwiększoną degradację nikotynamidu, z drugiej zwiększone przekształcanie do rybozydu nikotynamidu, a następnie przy udziale oksydazy aldehydowej powstawanie 4PYR. Tym bardziej, że zwiększone wydalanie z moczem 4PYR zaobserwowano u pacjentów z nowotworem płuc, piersi [114, 182], białaczką szpikową [62, 197], złośliwym międzybłoniakiem [20, 48], rakiem jajnika [123]. Wzrost stężenia 4PYR w moczu zaobserwowano także u pacjentów z rakiem nosowej części gardła [196]. Co więcej niektórzy badacze sugerują nawet, że 4PYR (nazywany w piśmiennictwie też PCNR) może być markerem procesu nowotworowego i czynnikiem monitorującym proces leczenia [179]. Wydaje się, że jest to sugestia błędna, nie analizowano bowiem stężenia tego związku w stanach zapalnych. Przedstawione przeze mnie wyniki pokazują, że w przypadku pacjentów ze zmianami łagodnymi stężenie 4PYR w osoczu także wzrasta znacząco w stosunku do stężenia obserwowanego w grupie osób zdrowych, i jest ono podobne u pacjentów z HNSCC. Wzrost stężenia 4PYR w osoczu pacjentów ze zmianami łagodnymi odnotowano dla 79% chorych. Należy więc przypuszczać, że wzrost ten może być związany z obecnością stanu zapalnego. Konieczne są więc dalsze badania nad wpływem czynników prozapalnych na metabolizm 4PYR.

W piśmiennictwie przemiany 4PYR do nukleotydowych pochodnych (4PYMP, 4PYDP, 4PYTP) w stanach patologicznych u ludzi opisano jedynie dla chorych z przewlekłą chorobą nerek, zarówno dzieci [190] jak i osób dorosłych [153, 172]. Zaobserwowano, że w erytrocytach osób z niewydolnością nerek wielokrotnie wzrasta stężenie zarówno 4PYMP, jak i 4PYTP. Szczególnie duży wzrost tych związków obserwuje się u pacjentów poddawanych zabiegowi hemodializy, a stężenie 4PYTP w erytrocytach nie obniża się po zabiegu. Rów-

niez u pacjentów po transplantacji nerki stężenie 4PYTP w erytrocytach przez długi czas pozostaje podwyższone [48]. Analiza stężeń pochodnych nukleotydowych 4PYR w chorobie nowotworowej została przeprowadzona po raz pierwszy. U chorych z HNSCC stężenie 4PYMP w erytrocytach było znacząco wyższe zarówno w porównaniu do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, jak i chorych ze zmianami łagodnymi. Jest to wynik pozwalający na wstępne odróżnienie chorych nowotworowych od pacjentów ze zmianami łagodnymi (w większości zapalnymi). Mechanizm tego wzrostu jest niewyjaśniony. Nie zaobserwowano natomiast wzrostu stężenia 4PYDP, zaś stężenie 4PYTP w grupie chorych z HNSCC było nieznacznie wyższe w porównaniu do grupy osób zdrowych, jednak nie był to wzrost statystycznie znamieny. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu 4PYRAD, niedawno zidentyfikowanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed pochodnej NAD (manuskrypt w przygotowaniu).

Stężenia aminokwasów w osoczu chorych z HNSCC i zmianami łagodnymi

Stężenia aminokwasów w osoczu są wypadkową stosowanej diety i zachodzących przemian metabolicznych. Zmiany stężeń tych związków obserwuje się w wielu stanach patologicznych, w tym w chorobie nowotworowej.

Analiza stężeń 16 aminokwasów w osoczu pacjentów z HNSCC oraz zmianami łagodnymi wykazała różnicę statystycznie znamieną 9 z nich w porównaniu ze stężeniami obserwowanymi w grupie kontrolnej.

Z przeanalizowanego panelu aminokwasów jedynie stężenie dwóch z nich było podwyższone u pacjentów z HNSCC w porównaniu do stężeń obserwowanych w grupie kontrolnej. Były to: izoleucyna i walina.

Stężenie izoleucyny u pacjentów z HNSCC było wyższe niż u osób zdrowych, zaś u pacjentów ze zmianami łagodnymi podobne jak w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie w zależności od typu nowotworu doniesienia na ten temat są różne. Wzrost stężenia tego aminokwasu obserwuje się w tkance nowotworowej żołądka [210] i przełyku [209]. Natomiast obniżone stężenie tego egzogenego aminokwasu stwierdzono w osoczu [219] i moczu [61] pacjentów z nowotworem przełyku.

Z kolei stężenie waliny w osoczu było wyższe zarówno w grupie chorych z HNSCC, jak i ze zmianami łagodnymi w stosunku do grupy kontrolnej. Być może przyczyną wzrostu tych egzogenych aminokwasów jest zwiększone ich dostarczanie z dietą. Należy też pamiętać, że te rozgałęzione aminokwasy są niezbędne w syntezie białek a także są głównym źródłem azotu do syntezy glutaminy i alaniny w mięśniach. Być może proces nowotworowy powoduje aktywację proteolizy mięśni szkieletowych i zwiększa oksydację rozgałęzionych aminokwasów [65].

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że stężenie proliny w osoczu u chorych z HNSCC jest znacząco niższe niż u osób zdrowych, a tendencja ta zarysowuje się już u pacjentów ze zmianami łagodnymi. Brak jest

w piśmiennictwie informacji na temat stężenia proliny w procesie nowotworowym. Można jednak przypuszczać, że jest to związane z jednej strony z upośledzoną syntezą proliny z glutaminianu, a z drugiej ze zwiększonym metabolizmem tego aminokwasu. W procesie nowotworzenia obserwuje się zwiększoną aktywność p53 i indukcję oksydazy prolilowej [132], a także zwiększony obrót kolagenu [170].

Z kolei obniżone stężenie histydyny w osoczu pacjentów z HNSCC w stosunku do grupy kontrolnej, ale także do chorych ze zmianami zapalnymi pozwala na wstępne wyselekcjonowanie pacjentów ze zmianami nowotworowymi. To zmniejszenie stężenia histydyny w osoczu pacjentów z HNSCC jest także spostrzeżeniem Scioscia [161]. Przyczyna zmniejszonego stężenia jest niejasna, chociaż można pokusić się o hipotezę, że u tych chorych z HNSCC występuje zwiększony katabolizm histydyny. Zaobserwowano wprawdzie, że metionina *in vivo* zwiększa katabolizm histydyny poprzez stymulację przemian jednowęglowych [46], jednak w moich badaniach nie zaobserwowałam obniżenia stężenia metioniny w osoczu pacjentów z HNSCC.

Dodatkowo jeszcze zaobserwowano tendencję spadku stężenia alaniny, leucyny i tryptofanu w grupie chorych z HNSCC w porównaniu do pozostałych badanych grup, jednak nie była to zależność znamienna statystycznie. Szczególnie ważne jest stężenie tryptofanu w organizmie. Jest to bowiem aminokwas, którego organizm nie jest w stanie sam wyprodukować i dlatego musi on zostać dostarczony z pokarmem. W mózgu jest niezbędny do produkcji serotoniny, ale należy też pamiętać, że jest prekursorem nikotynamidu. W piśmiennictwie pojawiają się sugestie, że aminokwas ten może być związany z kancerogenezą. Z badań Tankiewicza wynika, że stężenie tryptofanu w tkance nowotworowej HNSCC jest wyższe niż w tkance zdrowej. Oznaczał on także stężenie tego aminokwasu w osoczu u pacjentów z HNSCC, jednak nie porównał do wartości obserwowanej u ludzi zdrowych [193]. W badaniach Scioscia wykazano, że u pacjentów z HNSCC oprócz stężenia alaniny, obserwuje się zmniejszone stężenie w osoczu: asparaginy, asparaginanu, glicyny, fenyloalaniny, seryny i treoniny [161].

Ciekawe spostrzeżenia dotyczą kolejnych pięciu analizowanych aminokwasów: glutaminianu, argininy, seryny, asparaginanu i asparaginy. W przypadku tych aminokwasów zaobserwowano znaczący wzrost ich stężenia w osoczu osób ze zmianami łagodnymi w porównaniu zarówno do osób zdrowych jak i osób z HNSCC. Stężenie wyżej wymienionych aminokwasów w grupie chorych z HNSCC było niemal identyczne jak w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie istnieją doniesienia, że w tkance nowotworowej obserwuje się wzrost stężenia glutaminy, glutaminianu i asparaginanu [180]. Metabolizm tych trzech aminokwasów jest ze sobą ściśle powiązany. Asparaginan, aminokwas endogenny może być syntetyzowany ze szczawiooctanu przy udziale glutaminianu przez

aminotransferazę asparaginianową w obecności witaminy B6 lub z asparaginy z udziałem asparaginazy. Asparaginian odgrywa ważną rolę w cyklu mocznikowym i metabolizmie DNA. Jego zwiększone stężenie hamuje cykl mocznikowy, obniża degradację aminokwasów oraz hamuje syntetazę argininobursztynianu w cyklu mocznikowym. Istnieją sugestie, że te procesy aktywowane są procesami zapalnymi.

Podsumowując przedstawione dotychczas wyniki, można stwierdzić, że zażaden z przeanalizowanych związków nie może pełnić roli markera raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Niemniej jednak należy zauważyć, że analiza stężenia 4PYR lub Met4PY w osoczu pozwala na zróżnicowanie osób zdrowych od osób z chorobami jamy ustnej (ze zmianami łagodnymi i nowotworowymi). Zróżnicowanie chorych z HNSCC od tych ze zmianami łagodnymi wymaga analizy stężeń panelu związków: Met2PY w osoczu i 4PYMP w ekstraktach erytrocytów oraz stężeń aminokwasów: His, Glu, Arg, Ser, Asn, Asp.

Zmiany stężeń nikotynamidu i jego metabolitów we krwi u pacjentów z HNSCC a cechy kliniczne nowotworu

Celem niniejszej pracy była również ocena zmian stężeń nikotynamidu i jego metabolitów we krwi u pacjentów z HNSCC w zależności od cech klinicznych guza. Zbadano zależność stężenia metabolitów nikotynamidu we krwi od stopnia zaawansowania nowotworu (klasyfikacja TNM i grupy zaawansowania klinicznego) oraz stopnia złośliwości histologicznej.

Klasyfikacja TNM jest powszechnie stosowana do oceny stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu, planowania leczenia i określenia rokowania. Wielu badaczy oceniając ewentualne zastosowanie analizowanego związku jako markera nowotworowego odwołuje się do niej, porównując stężenie czy ekspresję badanych związków z wielkością guza pierwotnego, stanem regionalnych węzłów chłonnych czy obecnością przerzutów odległych. W przeprowadzonej analizie wykazano, że wielkość guza nowotworowego nie ma wpływu na stężenie nikotynamidu i jego metabolitów we krwi. Wartości badanych związków różniły się nieznacznie w poszczególnych grupach zaawansowania narządowego i nie były to wartości statystycznie znamienne. Stwierdzenie braku zależności pomiędzy stężeniem badanego związku a wielkością guza nie jest przypadkiem odosobnionym. Takiej korelacji nie znalazł Hoffmann, analizując stężenie CEA, p53 i cykliny D1 u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi [64] oraz Doweck badając stężenie CYFRA 21-1 [37]. W piśmiennictwie jedynie dla SCCAg stwierdzono pozytywną korelację między stężeniem tego markera a cechą T [78, 125] jednak nie były to wartości statystycznie znamienne.

Ryzyko wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych zależy od cech biologicznych nowotworu, które są zbieżne z niskim stopniem zróżnicowania guza (G), cechą T i jego lokalizacją. W badanej grupie analiza wartości

stężeń ocenianych związków nie różniła się między pacjentami z rozpoznanymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (N+), a grupą chorych bez przerzutów (N0). Jedynie stężenie 4PYTP w erytrocytach u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych było nieznacznie wyższe niż w grupie chorych, u których przerzutów nie obserwowano. Nie były to jednak wartości statystycznie znamienne pozwalające na zróżnicowanie obu grup chorych. Markerem, którego wzrost stężenia obserwuje się w obecności przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentów z HNSCC, jest COX-2. Powodując wzrost oddziaływania komórek nowotworu na tkanki otaczające, prowadzi do naciekania otoczenia przez komórki nowotworowe i tworzenia przerzutów. Uważa się, że przyczyną wzrostu stężenia COX-2 jest również mniej lub bardziej nasilony proces zapalny, towarzyszący często procesowi nowotworowemu toczącemu się w obrębie głowy i szyi [217]. Kolejnym związkiem, którego stężenie wzrasta w obecności przerzutów do węzłów chłonnych jest VEGF. Jest on odpowiedzialny nie tylko za stymulowanie neoangiogenezy w guzie nowotworowym, ale również za limfangiogenezę, stąd prawdopodobnie jego silna ekspresja u chorych ze stwierdzoną obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [169]. Wraz z pojawieniem się przerzutów w węzłach chłonnych wzrasta również ekspresja EGFR i cykliny D1, nie potwierdzono jednak ich roli w prognozowaniu przebiegu choroby [49, 73, 75]. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy cechą N a stężeniami związków: CYFRA 21-1 [24, 102], CEA [150], Bcl-2 [90].

Ciekawą obserwacją wynikającą z tych badań jest znaleziona zależność pomiędzy stężeniem nukleotydowych pochodnych 4PYR we krwi (4PYMP oraz 4PYRAD) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza. Stężenie 4PYMP w erytrocytach chorych z HNSCC spadało wraz ze wzrostem złośliwości guza. Odwrotnie było z 4PYRAD. Najwyższą wartość stężenia tego związku obserwowano w grupie pacjentów z nowotworem nisko zróżnicowanym, najniższą w grupie z nowotworem wysoko zróżnicowanym. Wynik jest interesujący, gdyż do powstania 4PYRAD prowadzi szlak: 4PYR → 4PYMP → 4PYRAD. Należy przypuszczać, że obniżone stężenie 4PYR w osoczu i 4PYMP w erytrocytach jest wynikiem wzrostu stężenia 4PYRAD w erytrocytach. Co ciekawe w grupie chorych z HNSCC z nisko zróżnicowanym nowotworem preferowane jest przekształcenie 4PYMP do 4PYRAD, a nie do trójfosforanowej pochodnej. Można przypuszczać, że przemiany te nie zachodzą jedynie w erytrocytach, ale też innych komórkach organizmu. W przyszłości konieczne jest więc sprawdzenie, jak te przemiany wyglądają w komórkach guza nowotworowego. Nieznacznie podwyższone, ale bez statystycznej znamienności były wartości stężenia 4PYDP, 4PYTP. W piśmiennictwie wykazano zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej a stężeniem SCCAg. Ogawa i Banal w dwóch niezależnych badaniach stwierdzili, że w nisko dojrzałych (G3) rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi ekspresja SCCAg jest bardzo niska w porównaniu z grupą G2 i G1 [8, 125]. Ponadto zaobserwowano, że wzrost ekspresji p53, Bcl-2, CEA,

cykliny D1, PCNA, Ki-67 i EGFR koreluje ze wzrostem złośliwości histologicznej guza [29, 64, 121].

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi jest nowotworem o tym samym pochodzeniu, lecz różnej lokalizacji. Takes i wsp. porównywali ekspresję białek (p53, Rb, cyclin D1 myc, bcl-2, EGFR, neu, E-Cadherin, Ep-CAM, desmoplakiny1) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym zlokalizowanym w gardle, krtani i jamie ustnej. Wśród tych trzech lokalizacji stwierdzono nasiloną ekspresję cykliny D1 w gardle oraz obniżoną ekspresję EGFR w krtani w porównaniu z pozostałymi lokalizacjami. Wyniki tych badań świadczą o odmienności biologicznej raków płaskonabłonkowych w różnej lokalizacji. W analizowanej przeze mnie grupie chorych nie stwierdzono, aby lokalizacja guza miała wpływ na wartość stężenia nikotynamidu i jego metabolitów. Otrzymane wartości stężeń metabolitów były zbliżone i nie pozwalały na zróżnicowanie w zależności od lokalizacji nowotworu.

6. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych analiz wyciągnięto następujące wnioski:

1. Analiza stężeń metabolitów NAD we krwi wykazała, że:
 - a) stężenie N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (Met4PY) i 1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) w osoczu osób z chorobami głowy i szyi (ze zmianami łagodnymi i nowotworowymi) jest wyższe niż u osób zdrowych.
 - b) stężenie N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (Met2PY) w osoczu chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi jest wyższe niż u osób zdrowych
 - c) stężenie monofosforanu 4-pirydono-3-karboksyamido-1- β -D-rybonukleozydu (4PYMP) w erytrocytach jest podwyższone u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi zarówno w porównaniu do stężeń obserwowanych u osób ze zmianami łagodnymi jak i u osób zdrowych.
2. Analiza stężeń aminokwasów w osoczu chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi wykazała:
 - a) podwyższone stężenie izoleucyny i waliny w osoczu pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w stosunku do stężeń obserwowanych u osób zdrowych.
 - b) obniżone stężenie histydyny i proliny w osoczu pacjentów z nowotworami głowy i szyi w stosunku do stężeń obserwowanych u osób zdrowych.
3. Analiza stężeń panelu związków: Met2PY w osoczu i 4PYMP w erytrocytach oraz stężeń aminokwasów w osoczu: histydyny, glutaminianu, argininy, seryny, asparaginy, asparaginianu pozwala na różnicowanie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi i zmian łagodnych.
4. Analiza zmian stężeń badanych związków azotowych we krwi chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w odniesieniu do obrazu klinicznego i histopatologicznego wykazała jedynie, że stężenie 1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PYR) i jego pochodnych nukleotydowych zmienia się wraz ze stopniem złośliwości histologicznej guza, natomiast nie zmienia się w odniesieniu do obrazu klinicznego.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abbassi-Ghadi N., Kumar S., Huang J., Goldin R., Takats Z., Hanna G.B.: Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: A systematic review. *Eur. J. Cancer*, 2013.
2. Abelson D., Boyle A., DEPATIE C., Seligson H.: N'-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in human plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1963, 8, 603-606.
3. Ahomadegbe J.C., Barrois M., Fogel S., Le Bihan M.L., Douc-Rasy S., Duvillard P., Armand J.P., Riou G.: High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene*, 1995, 10, 1217-1227.
4. Andersen H.U., Jorgensen K.H., Egeberg J., Mandrup-Poulsen T., Nerup J.: Nicotinamide prevents interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 1994, 43, 770-777.
5. Anneroth G., Hansen L.S., Silverman S Jr: Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J. Oral Pathol.*, 1986, 15, 162-168.
6. Ayude D., Gacio G., Paez d.l.C., Pallas E., Martinez-Zorzano V.S., de C.A., Rodriguez-Berrocal F.J.: Combined use of established and novel tumour markers in the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2003, 10, 1345-1350.
7. Bagan J., Sarrion G., Jimenez Y.: Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.*, 2010, 46, 414-417.
8. Banal A., Hacene K., Berthelot-Ruff E., Mahe E., Fontana X., Pichon M.F.: Comparison of Cyfra 21-1 and SCC assays in head and neck tumours. *Tumour. Biol.*, 2001, 22, 27-35.
9. Bankfalvi A., Krassort M., Buchwalow I.B., Vegh A., Felszeghy E., Piffko J.: Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J. Pathol.*, 2002, 198, 343-351.
10. Bankfalvi A., Krassort M., Vegh A., Felszeghy E., Piffko J.: Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, 2002, 31, 450-457.
11. Barlow G.B., Sutton J.L., Wilkinson A.W.: Metabolism of nicotinic acid in children with burns and scalds. *Clin. Chim. Acta*, 1977, 75, 337-342.
12. Bayrak S.B., Ceylan E., Serter M., Karadag F., Demir E., Cildag O.: The clinical importance of bone metabolic markers in detecting bone metastasis of lung cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2012, 17, 112-118.

13. Bejjani A., Choi M.R., Cassidy L., Collins D.W., O'Brien J.M., Murray T., Ksander B.R., Seigel G.M.: RB116: an RB1+ retinoblastoma cell line expressing primitive markers. *Mol. Vis.*, 2012, 18, 2805-2813.
14. Bello I.O., Soini Y., Salo T.: Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.*, 2010, 46, 630-635.
15. Bettendorf O., Herrmann G.: Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat Spec.*, 2002, 64, 200-205.
16. Bettendorf O., Piffko J., Bankfalvi A.: Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.*, 2004, 40, 110-119.
17. Bien S., Kaminski B., Zylka S., Mezyk R., Piasta Z., Markowski J., Paluch J., Kordylewska M., Wierzbicka M., Morshed K., Gryczynski M., Murlewska A., Modrzejewski M., Skladzien J., Jaworowska E., Matyja G., Burduk P., Muller M., Kowalska B., Mikaszewski B., Misiolek M., Namyslowski G., Bruzgielewicz A., Osuch-Wojcikiewicz E., Szymanski L., Krecicki T., Karasiewicz P., Mikulewicz W., Pietrysiak A., Jurkiewicz D., Kubik P., Janeczek T.: The evolution of epidemiology and clinical characteristics of laryngeal and hypopharyngeal carcinoma in Poland from 1991 to 2001. *Otolaryngol. Pol.*, 2005, 59, 169-181.
18. Bissett D.L., Oblong J.E., Berge C.A.: Niacinamide: A B vitamin that improves aging facial skin appearance. *Dermatol. Surg.*, 2005, 31, 860-865.
19. Blot W.J., McLaughlin J.K., Winn D.M., Austin D.F., Greenberg R.S., Preston-Martin S., Bernstein L., Schoenberg J.B., Stemhagen A., Fraumeni J.F., Jr.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.*, 1988, 48, 3282-3287.
20. Borek E., Sharma O.K., Waalkes T.P.: New applications of urinary nucleoside markers. *Recent Results Cancer Res.*, 1983, 84, 301-316.
21. Brenner C.: On the nonspecific degradation of NAD⁺ to nicotinamide riboside. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 1e5.
22. Brown F.C., WHITE J.B., Jr., KENNEDY J.K.: Urinary excretion of tryptophan metabolites by schizophrenic individuals. *Am. J. Psychiatry*, 1960, 117, 63-65.
23. Bryne M., Boysen M., Alfsen C.G., Abeler V.M., Sudbo J., Nesland J.M., Kristensen G.B., Piffko J., Bankfalvi A.: The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res.*, 1998, 18, 4757-4764.
24. Buntzel J., Hornig A., Glatzel M., Micke O., Bruns F., Schafer U., Frohlich D.: Tumor markers and lymphatic metastasis in head and neck cancer patients. *Anti-cancer Res.*, 2005, 25, 1539-1542.
25. Cadoni G., Boccia S., Petrelli L., Di G.P., Arzani D., Giorgio A., De F.E., Pandolfini M., Galli P., Paludetti G., Ricciardi G.: A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 2012, 32, 1-11.

26. Canto C., Houtkooper R.H., Pirinen E., Youn D.Y., Oosterveer M.H., Cen Y., Fernandez-Marcos P.J., Yamamoto H., Andreux P.A., Cettour-Rose P., Gademann K., Rinsch C., Schoonjans K., Sauve A.A., Auwerx J.: The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab*, 2012, 15, 838-847.
27. Cao M., Zhao L., Chen H., Xue W., Lin D.: NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. *Anal. Sci.*, 2012, 28, 451-456.
28. Capoluongo E., Almadori G., Concolino P., Bussu F., Santonocito C., Vendittelli F., Galli J., Zuppi C., Ameglio F., Paludetti G., Giardina B.: GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. *Clin. Chim. Acta*, 2007, 376, 174-178.
29. Carlos d., V, Junquera Gutierrez L.M., Zapatero A.H., Fresno Forcelledo M.F., Hernandez-Vallejo G., Lopez Arranz J.S.: Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck*, 2004, 26, 22-30.
30. Cazzullo C.L., Sacchetti E., Smeraldi E.: N-methylnicotinamide excretion and affective disorders. *Psychol. Med.*, 1976, 6, 265-270.
31. Ceol C.J., Pellman D., Zon L.I.: APC and colon cancer: two hits for one. *Nat. Med.*, 2007, 13, 1286-1287.
32. Chang M.L., JOHNSON B.C.: N-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide as a metabolite of nicotinic acid in man and monkey. *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2096-2098.
33. Chaykin S., Bloch K.: The metabolism of nicotinamide-N-oxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 31, 213-216.
34. Chin S.N., Boyne M.S., McGrowder D., Gibson T.N., McKenzie C.A.: The predictive value of urinary vanillylmandelic acid testing in the diagnosis of pheochromocytoma at the University Hospital of the West Indies. *West Indian Med. J.*, 2011, 60, 141-147.
35. Dabritz J., Preston R., Hanfler J., Oettle H.: Follow-up study of K-ras mutations in the plasma of patients with pancreatic cancer: correlation with clinical features and carbohydrate antigen 19-9. *Pancreas*, 2009, 38, 534-541.
36. de Araujo R.F.J., Barboza C.A., Clebis N.K., de Moura S.A., Lopes Costa A.L.: Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2008, 13, E344-E347.
37. Doweck I., Barak M., Greenberg E., Uri N., Kellner J., Lurie M., Gruener N.: Cyfra 21-1. A new potential tumor marker for squamous cell carcinoma of head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995, 121, 177-181.
38. Dreyfuss A.I., Clark J.R., Andersen J.W.: Lipid-associated sialic acid, squamous cell carcinoma antigen, carcinoembryonic antigen, and lactic dehydrogenase levels as tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 1992, 70, 2499-2503.

39. Edge S.B., Compton C.C.: The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.*, 2010, 17, 1471-1474.
40. El-Naggar A.K., Lai S., Clayman G.L., Zhou J.H., Tucker S.A., Myers J., Luna M.A., Benedict W.F.: Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum. Pathol.*, 1999, 30, 1013-1018.
41. Elliott G.C., Ajioka J., Okada C.Y.: A rapid procedure for assaying nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Anal. Biochem.*, 1980, 107, 199-205.
42. Emanuelli M., Santarelli A., Sartini D., Ciavarella D., Rossi V., Pozzi V., Rubini C., Lo M.L.: Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Histol. Histopathol.*, 2010, 25, 15-20.
43. Erb C., Klein J.: Enhancement of brain choline levels by nicotinamide: mechanism of action. *Neurosci. Lett.*, 1998, 249, 111-114.
44. Ernster J.A., Sciotto C.G., O'Brien M.M., Finch J.L., Robinson L.J., Willson T., Mathews M.: Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope*, 2007, 117, 2115-2128.
45. Faratzis G., Tsiambas E., Rapidis A.D., Machaira A., Xiromeritis K., Patsouris E.: VEGF and ki 67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue: An immunohistochemical and computerized image analysis study. *Oral Oncol.*, 2009, 45, 584-588.
46. Fell D., Steele R.D.: Effect of methionine on in vivo histidine metabolism in rats. *J. Nutr.*, 1983, 113, 860-866.
47. Feller L., Altini M., Lemmer J.: Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncol.*, 2013, 49, 887-892.
48. Fischbein A., Sharma O.K., Selikoff I.J., Borek E.: Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma. *Cancer Res.*, 1983, 43, 2971-2974.
49. Fortin A., Guerry M., Guerry R., Talbot M., Parise O., Schwaab G., Bosq J., Bourhis J., Salvatori P., Janot F., Busson P.: Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. *Clin. Cancer Res.*, 1997, 3, 1609-1614.
50. Franceschi S., Bidoli E., Baron A.E., Barra S., Talamini R., Serraino D., La V.C.: Nutrition and cancer of the oral cavity and pharynx in north-east Italy. *Int. J. Cancer*, 1991, 47, 20-25.
51. Fujimoto K., Yamada Y., Okajima E., Kakizoe T., Sasaki H., Sugimura T., Tera-da M.: Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.*, 1992, 52, 1393-1398.
52. Galli M., Van G.F., Leo O.: Sirtuins and inflammation: Friends or foes? *Biochem. Pharmacol.*, 2011, 81, 569-576.

53. Gehring W.: Nicotinic acid/niacinamide and the skin. *J Cosmet. Dermatol.*, 2004, 3, 88-93.
54. Gillison M.L.: Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24, 5623-5625.
55. Gillison M.L., Koch W.M., Capone R.B., Spafford M., Westra W.H., Wu L., Zahurak M.L., Daniel R.W., Viglione M., Symer D.E., Shah K.V., Sidransky D.: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92, 709-720.
56. Gleich L.L., Li Y.Q., Biddinger P.W., Gartside P.S., Stambrook P.J., Pavelic Z.P., Gluckman J.L.: The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 suppressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. *Laryngoscope*, 1996, 106, 1378-1381.
57. Gruber B.M.: Epigenetics and etiology of neurodegenerative diseases. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online.)*, 2011, 65, 542-551.
58. Grunwald V., Hidalgo M.: Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95, 851-867.
59. Gryczynski M., Papierz W., Niewiadomska H., Kobos J., Pietruszewska W.: Evaluation of CD44 adhesion molecule, nm23 gene product expression and intensity of angiogenesis in patients with laryngeal cancer. *Otolaryngol. Pol.*, 2000, 54, 669-674.
60. Hann H.W., Wan S., Myers R.E., Hann R.S., Xing J., Chen B., Yang H.: Comprehensive analysis of common serum liver enzymes as prospective predictors of hepatocellular carcinoma in HBV patients. *PLoS. One.*, 2012, 7, e47687.
61. Hasim A., Ma H., Mamtimin B., Abudula A., Niyaz M., Zhang L.W., Anwer J., Sheyhidin I.: Revealing the metabonomic variation of EC using (1)H-NMR spectroscopy and its association with the clinicopathological characteristics. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39, 8955-8964.
62. Heldman D.A., Grever M.R., Speicher C.E., Trewyn R.W.: Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leukemia. *J. Lab Clin. Med.*, 1983, 101, 783-792.
63. Hille J.J., Webster-Cyriaque J., Palefski J.M., Raab-Traub N.: Mechanisms of expression of HHV8, EBV and HPV in selected HIV-associated oral lesions. *Oral Dis.*, 2002, 8 Suppl 2, 161-168.
64. Hoffmann T.K., Trellakis S., Okulicz K., Schuler P., Greve J., Arnolds J., Bergmann C., Bas M., Lang S., Lehnerdt G., Brandau S., Mattheis S., Scheckenbach K., Finn O.J., Whiteside T.L., Sonkoly E.: Cyclin B1 expression and p53 status in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res.*, 2011, 31, 3151-3157.

65. Holecek M., Sprongl L., Skopec F., Andrys C., Pecka M.: Leucine metabolism in TNF-alpha- and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273, E1052-E1058.
66. Horsman M.R.: Nicotinamide and other benzamide analogs as agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumours. A review. *Acta Oncol.*, 1995, 34, 571-587.
67. Horwitt M.K., Harper A.E., Henderson L.M.: Niacin-tryptophan relationships for evaluating niacin equivalents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, 34, 423-427.
68. Howaldt H.P., Kainz M., Euler B., Vorast H.: Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1999, 27, 275-288.
69. Itoh S., Matsui K., Furuta I., Takano Y.: Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncol.*, 2003, 39, 829-835.
70. Jelski W., Kutylowska E., Laniewska-Dunaj M., Szmitkowski M.: Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) as candidates for tumor markers in patients with pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2011, 20, 255-259.
71. Kaerberlein M., Andalis A.A., Fink G.R., Guarente L.: High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction. *Mol. Cell Biol.*, 2002, 22, 8056-8066.
72. Kakazu E., Kondo Y., Kogure T., Ninomiya M., Kimura O., Iwata T., Morosawa T., Iwasaki T., Shimosegawa T.: Supplementation of branched-chain amino acids maintains the serum albumin level in the course of hepatocellular carcinoma recurrence. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2013, 230, 191-196.
73. Kalish L.H., Kwong R.A., Cole I.E., Gallagher R.M., Sutherland R.L., Musgrove E.A.: Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 7764-7774.
74. Kanakis G., Kaltsas G.: Biochemical markers for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NETs). *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2012, 26, 791-802.
75. Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., Jeltsch M., Jackson D.G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.*, 2004, 5, 74-80.
76. Kato H., Miyauchi F., Morioka H., Fujino T., Torigoe T.: Tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma: correlation of circulating levels with disease progress. *Cancer*, 1979, 43, 585-590.

77. Kimura E., Kobayashi S., Terashima Y.: Tumor marker--screening for gynecological cancer; personal experience. Utility of tumor markers in screening of ovarian cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1990, 17, 2443-2450.
78. Kimura Y., Fujieda S., Takabayashi T., Tanaka T., Sugimoto C., Saito H.: Conventional tumor markers are prognostic indicators in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.*, 2000, 155, 163-168.
79. Koelbl O., Rosenwald A., Haberl M., Muller J., Reuther J., Flentje M.: p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2001, 49, 147-154.
80. Kogan E.A., Rozhkova E.B., Seredin V.P., Paltsev M.A.: Prognostic value of the expression of thyroglobulin and oncomarkers (p53, EGFR, ret-oncogene) in different types of papillary carcinoma of the thyroid: clinicomorphological and immunohistochemical studies. *Arkh. Patol.*, 2006, 68, 8-11.
81. Koochekpour S.: Glutamate, a metabolic biomarker of aggressiveness and a potential therapeutic target for prostate cancer. *Asian J. Androl*, 2013, 15, 212-213.
82. Koochekpour S., Majumdar S., Azabdaftari G., Attwood K., Scioneaux R., Subramani D., Manhardt C., Lorusso G.D., Willard S.S., Thompson H., Shourideh M., Rezaei K., Sartor O., Mohler J.L., Vessella R.L.: Serum glutamate levels correlate with Gleason score and glutamate blockade decreases proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in prostate cancer cell. *Clin. Cancer Res.*, 2012, 18, 5888-5901.
83. Koutros S., Meyer T.E., Fox S.D., Issaq H.J., Veenstra T.D., Huang W.Y., Yu K., Albanes D., Chu L.W., Andriole G., Hoover R.N., Hsing A.W., Berndt S.I.: Prospective evaluation of serum sarcosine and risk of prostate cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*, 2013.
84. Krecicki T., Jelen M., Zalesska-Krecicka M., Rak J., Szkudlarek T., Jelen-Krzyszewska J.: Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol.*, 1999, 35, 180-186.
85. Kretowski A., Mysliwiec J., Szelachowska M., Kinalski M., Kinalska I.: Nicotinamide inhibits enhanced in vitro production of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha in peripheral whole blood of people at high risk of developing type 1 diabetes and people with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2000, 47, 81-86.
86. Krimmel M., Hoffmann J., Krimmel C., Cornelius C.P., Schwenzer N.: Relevance of SCC-Ag, CEA, CA 19.9 and CA 125 for diagnosis and follow-up in oral cancer. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1998, 26, 243-248.
87. Kryzhanovskii G.N., Shandra A.A., Makul'kin R.F., Lokasiuk B.A., Godlevskii L.S.: Effect of nicotinamide on epileptic activity in the cerebral cortex. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 1980, 89, 37-41.

88. Kudo Y., Takata T., Yasui W., Ogawa I., Miyauchi M., Takekoshi T., Tahara E., Nikai H.: Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1998, 83, 2447-2455.
89. Kulpa J., Stasik Z., Skolyszewski J., Wojcik E., Rychlik U., Pudelek K.: Predictive value of SCC-Ag, CYFRA 21-1 and selected acute phase proteins in radiotherapy of pharyngeal and laryngeal cancer. A preliminary report. *Neoplasma*, 2004, 51, 103-109.
90. Kummoona R., Mohammad S.S., Al-Kapptan I., Al-Muala H.: Study of antiapoptotic gene of oral carcinoma by using Bcl-2 oncogene. *J. Oral Pathol. Med.*, 2008, 37, 345-351.
91. Kusakawa J., Harada H., Shima I., Sasaguri Y., Kameyama T., Morimatsu M.: The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, 1996, 32B, 217-221.
92. La V.C., Negri E., D'Avanzo B., Boyle P., Franceschi S.: Dietary indicators of oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Epidemiol.*, 1991, 20, 39-44.
93. Lachowicz M.A., Hassmann-Poznanska E., Kozlowski M.D., Rzewnicki I.: Squamous cell carcinoma antigen in patients with cancer of the larynx. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, 1999, 24, 270-273.
94. Lee J.C., Chen M.J., Chang C.H., Tiai Y.F., Lin P.W., Lai H.S., Wang S.T.: Plasma amino acid levels in patients with colorectal cancers and liver cirrhosis with hepatocellular carcinom. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50, 1269-1273.
95. Li R.Z., Ma X., Hu X.F., Kang S.X., Chen S.K., Cianflone K., Lu H.L.: Elevated visfatin levels in obese children are related to proinflammatory factors. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab*, 2013, 26, 111-118.
96. Lim B.H., Cho B.I., Kim Y.N., Kim J.W., Park S.T., Lee C.W.: Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in gastric cancer tissues and its potential post-translational modification. *Exp. Mol. Med.*, 2006, 38, 455-465.
97. Lindblom A., Liljegren A.: Regular review: tumour markers in malignancies. *BMJ*, 2000, 320, 424-427.
98. Lis E.W., Lis A.W., DeHackbeil K.F.: Ultraviolet-absorbing components of urine from mentally retarded children. 3. *Clin. Chem.*, 1970, 16, 714-721.
99. Litwiniuk M.M., Roznowski K., Filas V., Godlewski D.D., Stawicka M., Kaleta R., Breborowicz J.: Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of BRCA1 mutation carriers. *BMC. Cancer*, 2008, 8, 100.
100. Losa M., Franzin A., Mortini P., Terreni M.R., Mangili F., Giovanelli M.: Usefulness of markers of cell proliferation in the management of pituitary adenomas. *Clin. Sci. (Lond)*, 1998, 95, 129-135.

101. Lundberg M., Leivo I., Saarilahti K., Makitie A.A., Mattila P.S.: Increased incidence of oropharyngeal cancer and p16 expression. *Acta Otolaryngol.*, 2011, 131, 1008-1011.
102. Ma B.B., Leungm S.F., Hui E.P., Mo F., Kwan W.H., Zee B., Yuen J., Chan A.T.: Prospective validation of serum CYFRA 21-1, beta-2-microglobulin, and ferritin levels as prognostic markers in patients with nonmetastatic nasopharyngeal carcinoma undergoing radiotherapy. *Cancer*, 2004, 101, 776-781.
103. MacLachlan T.K., Sang N., Giordano A.: Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 1995, 5, 127-156.
104. Majid A., Tsoulakis O., Walewska R., Gesk S., Siebert R., Kennedy D.B., Dyer M.J.: BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the BCL2 938A>C promoter single nucleotide polymorphism. *Blood*, 2008, 111, 874-877.
105. Malati T.: Tumour markers: An overview. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2007, 22, 17-31.
106. Maletzki C., Bodammer P., Breittruck A., Kerkhoff C.: S100 proteins as diagnostic and prognostic markers in colorectal and hepatocellular carcinoma. *Hepat. Mon.*, 2012, 12, e7240.
107. Mineta H., Miura K., Suzuki I., Takebayashi S., Amano H., Araki K., Harada H., Ichimura K., Wennerberg J.P., Dicator M.R.: Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1999, 85, 1011-1017.
108. Mino N., Iio A., Hamamoto K.: Availability of tumor-antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs. *Cancer*, 1988, 62, 730-734.
109. Miskad U.A., Semba S., Kato H., Matsukawa Y., Kodama Y., Mizuuchi E., Maeda N., Yanagihara K., Yokozaki H.: High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.*, 2007, 450, 303-310.
110. Missotten G.S., Korse C.M., van D.C., Linders T.C., Keunen J.E., Jager M.J., Bonfrer J.M.: S-100B protein and melanoma inhibitory activity protein in uveal melanoma screening. A comparison with liver function tests. *Tumour. Biol.*, 2007, 28, 63-69.
111. Molina R., Torres M.D., Moragas M., Perez-Villa J., Filella X., Jo J., Farrus B., Gimenez N., Traserra J., Ballesta A.M.: Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer. *Tumour. Biol.*, 1996, 17, 81-89.
112. Montie J.E., Meyers S.E.: Defining the ideal tumor marker for prostate cancer. *Urol. Clin. North Am.*, 1997, 24, 247-252.

113. Moore W.P., Bolton C.H., Downs L., Gilmor H.A., Gale E.A.: Measurement of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 2000, 14, 69-71.
114. Mrochek J.E., Dinsmore S.R., Waalkes T.P.: Analytic techniques in the separation and identification of specific purine and pyrimidine degradation products of tRNA: application to urine samples from cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974, 53, 1553-1563.
115. Muir M.L., Muller M., Schachter F., Burkle A.: Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J. Mol. Med. (Berl)*, 1998, 76, 346-354.
116. Muller J.M., Philippe M., Chevrier L., Heraud C., Alleaume C., Chadeneau C.: The VIP-receptor system in neuroblastoma cells. *Regul. Pept.*, 2006, 137, 34-41.
117. Munoz-Guerra M.F., Marazuela E.G., Fernandez-Contreras M.E., Gamallo C.: P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicator of poor prognosis. *Cancer*, 2005, 103, 960-969.
118. Munoz-Guerra M.F., Marazuela E.G., Martin-Villar E., Quintanilla M., Gamallo C.: Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, 2004, 100, 553-560.
119. Nacci A., Dallan I., Bruschini L., Traino A.C., Panicucci E., Bruschini P., Mancini V., Rognini F., Fattori B.: Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with laryngeal cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2008, 134, 1328-1333.
120. Nasman A., Attner P., Hammarstedt L., Du J., Eriksson M., Giraud G., Ahrlund-Richter S., Marklund L., Romanitan M., Lindquist D., Ramqvist T., Lindholm J., Sparen P., Ye W., Dahlstrand H., Munck-Wikland E., Dalianis T.: Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int. J. Cancer*, 2009, 125, 362-366.
121. Nishioka H., Hiasa Y., Hayashi I., Kitahori Y., Konishi N., Sugimura M.: Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. *Oncology*, 1993, 50, 426-429.
122. Nishiumi S., Kobayashi T., Ikeda A., Yoshie T., Kibi M., Izumi Y., Okuno T., Hayashi N., Kawano S., Takenawa T., Azuma T., Yoshida M.: A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS. One.*, 2012, 7, e40459.
123. Oerlemans F., Lange F.: Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: a pilot study. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1986, 22, 212-217.
124. Offermanns S.: The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006, 27, 384-390.

125. Ogawa T., Tsurusako Y., Kimura N., Nishioka S., Akagi H., Nishizaki K., Nishioka K., Rutka J.: Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol. Suppl*, 1999, 540, 72-76.
126. Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M.: Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.*, 1995, 15, 2612-2624.
127. Okamoto H., Ishikawa A., Nishimuta M., Kodama N., Yoshitake Y., Fukuwatari T., Shibata K.: Effects of stress on the urinary excretory pattern of niacin catabolites, the most reliable index of niacin status, in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2002, 48, 417-419.
128. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J.: Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, 1993, 54, 594-606.
129. Peng S.Y., Chen W.J., Lai P.L., Jeng Y.M., Sheu J.C., Hsu H.C.: High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int. J. Cancer*, 2004, 112, 44-50.
130. Petersen P.E.: Continuous improvement of oral health in the 21st century: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Zhonghua Kou Qiang. Yi. Xue. Za Zhi.*, 2004, 39, 441-444.
131. Petersen P.E.: Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol.*, 2009, 45, 454-460.
132. Phang J.M., Donald S.P., Pandhare J., Liu Y.: The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino. Acids*, 2008, 35, 681-690.
133. Pich A., Chiusa L., Navone R.: Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann. Oncol.*, 2004, 15, 1319-1329.
134. Piffko J., Bankfalvi A., Ofner D., Bryne M., Rasch D., Joos U., Bocker W., Schmid K.W.: Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas. *Br. J. Cancer*, 1997, 75, 1543-1546.
135. Pignataro L., Carboni N., Pagliari A.V., Capaccio P., Ottaviani F., Pruneri G.: Bcl-2 expression is related to poor differentiation and advanced clinical stage in laryngeal squamous cell carcinoma. *J. Chemother.*, 1997, 9, 115-116.
136. Poulter J.M., Dickerson J.W., White W.F.: Tryptophan metabolism in patients with breast cancer. *Acta Vitaminol. Enzymol.*, 1985, 7, 93-97.
137. Pozzilli P., Browne P.D., Kolb H.: Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. The Nicotinamide Trialists. *Diabetes Care*, 1996, 19, 1357-1363.
138. PREISS J., Handler P.: Enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, 1957, 225, 759-770.

139. Preyat N., Leo O.: Sirtuin deacylases: a molecular link between metabolism and immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, 93, 669-680.
140. Pruneri G., Pignataro L., Carboni N., Ronchetti D., Cesana B.M., Ottaviani A., Neri A., Buffa R.: Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 1998, 79, 263-268.
141. Pujol J.L., Molinier O., Ebert W., Daures J.P., Barlesi F., Buccheri G., Paesmans M., Quoix E., Moro-Sibilot D., Szturmowicz M., Brechot J.M., Muley T., Grenier J.: CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br. J. Cancer*, 2004, 90, 2097-2105.
142. Pumpo R., Sarnelli G., Spinella A., Budillon G., Cuomo R.: The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *Am. J. Gastroenterol.*, 2001, 96, 1183-1187.
143. Quoix E., Purohit A., Faller-Beau M., Moreau L., Oster J.P., Pauli G.: Comparative prognostic value of lactate dehydrogenase and neuron-specific enolase in small-cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer*, 2000, 30, 127-134.
144. Ratto C., Sofo L., Ippoliti M., Merico M., Doglietto G.B., Crucitti F.: Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. *Dis. Colon Rectum*, 1998, 41, 1033-1049.
145. Reddy I., Sherlin H.J., Ramani P., Premkumar P., Natesan A., Chandrasekar T.: Amino acid profile of saliva from patients with oral squamous cell carcinoma using high performance liquid chromatography. *J. Oral Sci.*, 2012, 54, 279-283.
146. Rhee J.C., Khuri F.R., Shin D.M.: Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist*, 2004, 9, 302-311.
147. Rivera A., Mavila A., Bayless K.J., Davis G.E., Maxwell S.A.: Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cell Mol. Life Sci.*, 2006, 63, 1425-1439.
148. Rodriguez T., Altieri A., Chatenoud L., Gallus S., Bosetti C., Negri E., Franceschi S., Levi F., Talamini R., La V.C.: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.*, 2004, 40, 207-213.
149. Roessler M., Rollinger W., Palme S., Hagmann M.L., Berndt P., Engel A.M., Schneidinger B., Pfeffer M., Andres H., Karl J., Bodenmuller H., Ruschoff J., Henkel T., Rohr G., Rossol S., Rosch W., Langen H., Zolg W., Tacke M.: Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 6550-6557.
150. Rosati G., Riccardi F., Tucci A.: Use of tumor markers in the management of head and neck cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2000, 15, 179-183.
151. Rowen J.W., Kornberg A.: The phosphorylation of nicotinamide riboside. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 497-507.

152. Rusin P., Markiewicz L., Majsterek I.: Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online.)*, 2008, 62, 490-501.
153. Rutkowski B., Rutkowski P., Slominska E., Smolenski R.T., Swierczynski J.: Cellular toxicity of nicotinamide metabolites. *J. Ren Nutr.*, 2012, 22, 95-97.
154. Ruud E., Holmstrom H., Brosstad F., Wesenberg F.: Children with acute lymphoblastic leukaemia have high plasma levels of total homocysteine at time of diagnosis. *Scand. J. Clin. Lab Invest*, 2006, 66, 67-78.
155. Sahu A., Sawant S., Mamgain H., Krishna C.M.: Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers. *Analyst*, 2013, 138, 4161-4174.
156. Salek R.M., Maguire M.L., Bentley E., Rubtsov D.V., Hough T., Cheeseman M., Nunez D., Sweatman B.C., Haselden J.N., Cox R.D., Connor S.C., Griffin J.L.: A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics*, 2007, 29, 99-108.
157. Sanada H., Miyazaki M.: Regulation of tryptophan-niacin metabolism by hormones. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 1980, 26, 617-627.
158. Sartini D., Muzzonigro G., Milanese G., Pierella F., Rossi V., Emanuelli M.: Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma. *J. Urol.*, 2006, 176, 2248-2254.
159. Sartini D., Pozzi V., Renzi E., Morganti S., Rocchetti R., Rubini C., Santarelli A., Lo M.L., Emanuelli M.: Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease. *Biol. Chem.*, 2012, 393, 505-511.
160. Sartini D., Santarelli A., Rossi V., Goteri G., Rubini C., Ciavarella D., Lo M.L., Emanuelli M.: Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Mol. Med.*, 2007, 13, 415-421.
161. Scioscia K.A., Snyderman C.H., Wagner R.: Altered serum amino acid profiles in head and neck cancer. *Nutr. Cancer*, 1998, 30, 144-147.
162. Scully C.: Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 1993, 22, 337-347.
163. Scully C., Bagan J.: Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.*, 2009, 45, 301-308.
164. Scully C., Field J.K., Tanzawa H.: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.*, 2000, 36, 256-263.
165. Scully C., Field J.K., Tanzawa H.: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol.*, 2000, 36, 311-327.

166. Scully C., Field J.K., Tanzawa H.: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol.*, 2000, 36, 404-413.
167. Service F.J., O'Brien P.C., Kao P.C., Young W.F., Jr.: C-peptide suppression test: effects of gender, age, and body mass index; implications for the diagnosis of insulinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, 74, 204-210.
168. Shibata K., Toda S.: Effects of sex hormones on the metabolism of tryptophan to niacin and to serotonin in male rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61, 1200-1202.
169. Shintani S., Li C., Ishikawa T., Mihara M., Nakashiro K., Hamakawa H.: Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 2004, 40, 13-20.
170. Shintani Y., Maeda M., Chaika N., Johnson K.R., Wheelock M.J.: Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2008, 38, 95-104.
171. Singhal S., Vachani A., Antin-Ozerkis D., Kaiser L.R., Albelda S.M.: Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 3974-3986.
172. Slominska E.M., Carrey E.A., Foks H., Orlewska C., Wiczerzak E., Sowinski P., Yacoub M.H., Marinaki A.M., Simmonds H.A., Smolenski R.T.: A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 32057-32064.
173. Slominska E.M., Kowalik K., Smolenski R.T., Szolkiewicz M., Rutkowski P., Rutkowski B., Swierczynski J.: Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.*, 2006, 21, 800-806.
174. Slominska E.M., Orlewska C., Yuen A., Osman L., Romaszko P., Sokolowska E., Foks H., Simmonds H.A., Yacoub M.H., Smolenski R.T.: Metabolism of 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate and its nucleoside precursor in the erythrocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27, 830-834.
175. Slominska E.M., Rutkowski P., Smolenski R.T., Szutowicz A., Rutkowski B., Swierczynski J.: The age-related increase in N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NAD catabolite) in human plasma. *Mol. Cell Biochem.*, 2004, 267, 25-30.
176. Slominska E.M., Smolenski R.T., Szolkiewicz M., Leaver N., Rutkowski B., Simmonds H.A., Swierczynski J.: Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure. *Mol. Cell Biochem.*, 2002, 231, 83-88.
177. Smith E.M., Ritchie J.M., Summersgill K.F., Klusmann J.P., Lee J.H., Wang D., Haugen T.H., Turek L.P.: Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int. J. Cancer*, 2004, 108, 766-772.

178. Smolenski R.T., Lachno D.R., Ledingham S.J., Yacoub M.H.: Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J. Chromatogr.*, 1990, 527, 414-420.
179. Smolenski R.T., Marlewski M.: Degradation of adenine nucleotides in the erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Acta Biochim. Pol.*, 1990, 37, 153-157.
180. Somashekar B.S., Kamarajan P., Danciu T., Kapila Y.L., Chinnaiyan A.M., Rajendiran T.M., Ramamoorthy A.: Magic angle spinning NMR-based metabolic profiling of head and neck squamous cell carcinoma tissues. *J. Proteome. Res.*, 2011, 10, 5232-5241.
181. Spafford M.F., Koeppe J., Pan Z., Archer P.G., Meyers A.D., Franklin W.A.: Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1996, 122, 627-632.
182. Speer J., Gehrke C.W., Kuo K.C., Waalkes T.P., Borek E.: tRNA breakdown products as markers for cancer. *Cancer*, 1979, 44, 2120-2123.
183. St John M.A., Li Y., Zhou X., Denny P., Ho C.M., Montemagno C., Shi W., Qi F., Wu B., Sinha U., Jordan R., Wolinsky L., Park N.H., Liu H., Abemayor E., Wong D.T.: Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2004, 130, 929-935.
184. Stanton P., Richards S., Reeves J., Nikolic M., Edington K., Clark L., Robertson G., Souter D., Mitchell R., Hendler F.J., .: Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts. *Br. J. Cancer*, 1994, 70, 427-433.
185. Stoeckli S.J., Broglie M.A.: Recent innovations in head and neck oncology: a report from the ICHNO. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 2013, 13, 535-539.
186. Sugimoto M., Wong D.T., Hirayama A., Soga T., Tomita M.: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.*, 2010, 6, 78-95.
187. Suminami Y., Nagashima S., Vujanovic N.L., Hirabayashi K., Kato H., Whiteside T.L.: Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 981-989.
188. Sun L., Hu W., Liu Q., Hao Q., Sun B., Zhang Q., Mao S., Qiao J., Yan X.: Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. *J. Proteome. Res.*, 2012, 11, 2937-2946.
189. Swango P.A.: Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. *J. Public Health Dent.*, 1996, 56, 309-318.
190. Synesiou E., Fairbanks L.D., Simmonds H.A., Slominska E.M., Smolenski R.T., Carrey E.A.: 4-Pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate

- (4PyTP), a novel NAD metabolite accumulating in erythrocytes of uremic children: a biomarker for a toxic NAD analogue in other tissues? *Toxins. (Basel)*, 2011, 3, 520-537.
191. Szilasi M., Buglyo A., Treszl A., Kiss L., Schally A.V., Halmos G.: Gene expression of vasoactive intestinal peptide receptors in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 2011, 39, 1019-1024.
192. Takano K., Takayama K., Nakano H., Hagimoto N., Nakanishi Y., Hara N.: Small cell lung cancer associated with ectopic ACTH syndrome. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, 1996, 34, 220-225.
193. Tankiewicz A., Dziemianczyk D., Buczek P., Szarmach I.J., Grabowska S.Z., Pawlak D.: Tryptophan and its metabolites in patients with oral squamous cell carcinoma: preliminary study. *Adv. Med. Sci.*, 2006, 51 Suppl 1, 221-224.
194. Terakado N., Shintani S., Yano J., Chunnan L., Mihara M., Nakashiro K., Hamakawa H.: Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioreistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 2004, 40, 383-389.
195. Tissenbaum H.A., Guarente L.: Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2001, 410, 227-230.
196. Trewyn R.W., Glaser R., Kelly D.R., Jackson D.G., Graham W.P., III, Speicher C.E.: Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma. Preliminary diagnostic/prognostic evaluations. *Cancer*, 1982, 49, 2513-2517.
197. Trewyn R.W., Grever M.R.: Urinary nucleosides in leukemia: laboratory and clinical applications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1986, 24, 71-93.
198. Uehara M., Sano K., Ikeda H., Sekine J., Irie A., Yokota T., Tobita T., Ohba S., Inokuchi T.: Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 2004, 40, 321-325.
199. Uemura Y., Pak S.C., Luke C., Cataltepe S., Tsu C., Schick C., Kamachi Y., Pomeroy S.L., Perlmutter D.H., Silverman G.A.: Circulating serpin tumor markers SCCA1 and SCCA2 are not actively secreted but reside in the cytosol of squamous carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2000, 89, 368-377.
200. Ulanovski D., Stern Y., Roizman P., Shpitzer T., Popovtzer A., Feinmesser R.: Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol.*, 2004, 40, 532-537.
201. Ungerstedt J.S., Blomback M., Soderstrom T.: Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 131, 48-52.
202. Vannucchi H., Mello de Oliveira J.A., Dutra de Oliveira J.E.: Tryptophan metabolism in alcoholic pellagra patients: measurements of urinary metabolites and histochemical studies of related muscle enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, 35, 1368-1374.
203. Vecer J., Kvapil M., Sprongl L., Kubatova H., Hoch J., Jech Z., Charvat J.: Tissue amino acids in patients with colorectal carcinoma. *Vnitr. Lek.*, 1998, 44, 192-194.

204. Wang J., Shi G., Zhang S., Wang Q., Yang X., Li X., Wang H., Zhang H., Song C.: Clinical value of serum TPS, CEA, Pro-GRP and CYFRA21-1 in patients with lung cancer. *Zhongguo Fei. Ai. Za Zhi.*, 2010, 13, 500-505.
205. Wang Y.P., Chen H.M., Kuo R.C., Yu C.H., Sun A., Liu B.Y., Kuo Y.S., Chiang C.P.: Oral verrucous hyperplasia: histologic classification, prognosis, and clinical implications. *J. Oral Pathol. Med.*, 2009, 38, 651-656.
206. Welkoborsky H.J., Hinni M., Dienes H.P., Mann W.J.: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1995, 104, 503-510.
207. Williams H.K.: Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol. Pathol.*, 2000, 53, 165-172.
208. Wojcik E., Kulpa J.K., Sas-Korczynska B., Korzeniowski S., Jakubowicz J.: ProGRP and NSE in therapy monitoring in patients with small cell lung cancer. *Anticancer Res.*, 2008, 28, 3027-3033.
209. Wu H., Xue R., Lu C., Deng C., Liu T., Zeng H., Wang Q., Shen X.: Metabolomic study for diagnostic model of oesophageal cancer using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, 877, 3111-3117.
210. Wu H., Xue R., Tang Z., Deng C., Liu T., Zeng H., Sun Y., Shen X.: Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 1385-1395.
211. Xia W., Lau Y.K., Hu M.C., Li L., Johnston D.A., Sheng S., El-Naggar A., Hung M.C.: High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2000, 19, 2398-2403.
212. Xie X., Clausen O.P., Boysen M.: Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2002, 128, 897-902.
213. Xu J., Moatamed F., Caldwell J.S., Walker J.R., Kraiem Z., Taki K., Brent G.A., Hershman J.M.: Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, 4990-4996.
214. Yasumatsu R., Nakashima T., Azuma K., Hirakawa N., Kuratomi Y., Tomita K., Cataltepe S., Silverman G.A., Clayman G.L., Komiyama S.: SCCA1 expression in T-lymphocytes peripheral to cancer cells is associated with the elevation of serum SCC antigen in squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Lett.*, 2001, 167, 205-213.
215. Yilmaz N., Pektas M., Tonguc E., Kilic S., Gulerman C., Gungor T., Mollamahmutoglu L.: The correlation of plasma homocysteine with insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2008, 34, 384-391.

-
216. Yokoyama J., Shiga K., Sasano H., Suzuki M., Takasaka T.: Abnormalities and the implication of retinoblastoma locus and its protein product in head and neck cancers. *Anticancer Res.*, 1996, 16, 641-644.
 217. Yu Q., Stamenkovic I.: Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.*, 1999, 13, 35-48.
 218. Yu-Duan T., Chao-Ping W., Chih-Yu C., Li-Wen L., Tsun-Mei L., Chia-Chang H., Fu-Mei C., Hsien-Chang L., Hsia-Fen H., Yau-Jiunn L., Jer-Yiing H.: Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in male oral squamous cell carcinoma patients. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2013, 18, e180-e186.
 219. Zhang J., Bowers J., Liu L., Wei S., Gowda G.A., Hammoud Z., Raftery D.: Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS. One.*, 2012, 7, e30181.
 220. Zhang X., Xu L., Shen J., Cao B., Cheng T., Zhao T., Liu X., Zhang H.: Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC-based focused metabolomics of blood serum. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1832, 1207-1216.
 221. Zingarelli B., Salzman A.L., Szabo C.: Protective effects of nicotinamide against nitric oxide-mediated delayed vascular failure in endotoxic shock: potential involvement of polyADP ribosyl synthetase. *Shock*, 1996, 5, 258-264.

8. STRESZCZENIE

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie. Jego szybki wzrost, wczesne przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, jak również nieprzewidywalność przebiegu klinicznego zmuszają do podejmowania kolejnych prób opracowania metod wczesnego wykrywania nowotworu, ustalenia sposobu leczenia i przewidywania rokowania. Związki azotowe, to liczna grupa związków, jednak o ich powiązaniu z procesem nowotworowym wciąż niewiele wiadomo.

Celem pracy była analiza stężeń metabolitów NAD oraz stężeń aminokwasów we krwi chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w porównaniu do chorych ze zmianami łagodnymi w tej lokalizacji i osobami zdrowymi. Zbadano także zależność pomiędzy stężeniem analizowanych związków a obrazem klinicznym.

Przeprowadzone analizy wykazały wzrost stężenia końcowych produktów degradacji nikotynamidu (Met2PY, Met4PY) oraz jego metabolitu (4PYR) w osoczu pacjentów z HNSCC w porównaniu do stężeń obserwowanych u ludzi zdrowych.

Stężenia tych związków, szczególnie Met2PY i 4PYR były także podwyższone u osób ze zmianami łagodnymi. Analiza stężenia monofosforanowej pochodnej 4PYR (4PYMP) w erytrocytach wykazała istotny statystycznie wzrost tego związku u pacjentów z HNSCC w porównaniu zarówno do grupy ze zmianami łagodnymi jak i grupy kontrolnej. Dla pozostałych nukleotydowych pochodnych 4PYR (4PYDP, 4PYTP i 4PYRAD) takich różnic nie znaleziono.

Analiza stężeń aminokwasów w osoczu wykazała zmiany stężeń dziewięciu z nich. U pacjentów z HNSCC zaobserwowano wzrost stężenia izoleucyny i waliny, zaś stężenia proliny i histydyny w osoczu były obniżone. Stężenia seryny, asparaginy, asparaginianu, glutaminianu i argininy w osoczu nie wykazywały różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupą z HNSCC, były jednak znacząco wyższe u chorych ze zmianami łagodnymi.

W wyniku przeprowadzonych analiz znaleziono zależność pomiędzy stężeniem dwóch nukleotydowych pochodnych 4PYR (4PYMP i 4PYRAD) we krwi a stopniem złośliwości histologicznej guza (G). Stężenie 4PYMP w erytrocytach obniżało się, zaś stężenie 4PYRAD zwiększało się wraz ze wzrostem złośliwości histologicznej guza. Nie zaobserwowano natomiast zależności w stężeniach badanych związków od stopnia zaawansowania TNM, stopnia zaawansowania klinicznego.

Podsumowując przedstawione wyniki, można stwierdzić, że żaden z przeanalizowanych związków nie może samodzielnie pełnić roli markera raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Niemniej jednak należy zauważyć, że analiza stężenia 4PYR lub Met4PY w osoczu pozwala na zróżnicowanie osób zdrowych od osób z chorobami jamy ustnej (ze zmianami łagodnymi i nowotworowymi). Zróżnicowanie chorych z HNSCC od tych ze zmianami łagodnymi wymaga analizy stężeń panelu związków: Met2PY, histydyny, glutaminianu, argininy, seryny, asparaginy, asparaginianu w osoczu oraz 4PYMP w ekstraktach erytrocytów.

9. SUMMARY

Squamous cell carcinoma of head and neck is one of the most common cancers in the world. Its rapid growth, early metastasis to regional lymph nodes, as well as the unpredictability of the clinical course are forcing researchers to make further attempts to develop methods for early detection, determine the method of treatment and prediction. Nitrogen compounds are most common metabolites in the human body, but its association cancer is still unclear.

Therefore purpose of this work was analysis of NAD metabolites and amino acids in blood of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, with the benign changes and healthy subjects. Assessment of a correlation between the concentration of the test compounds, and clinical outcome has also been done.

This analysis revealed increased concentration of end products of nicotinamide degradation (Met2PY and 4PYR) and its metabolite 4PYR in patients with HNSCC as compared to healthy subjects. Concentration of these compounds in particular Met2PY and 4PYR was also increased in subjects with benign changes. Analysis of concentration of monophosphate derivative of 4PYR (4PYMP) in the erythrocytes revealed significant increase in patients with HNSCC in comparison with benign changes and in controls. For the other nucleotide derivatives 4PYR (4PYDP, 4PYTP, 4PYRAD) such changes were not shown.

Analysis of concentration of amino acids in plasma revealed changes of nine of them. Concentrations of isoleucine, and valine were elevated in patients with HNSCC while concentrations of proline and histidine were decreased. Concentrations of serine, asparagine, aspartate, glutamate and arginine in plasma were not different between HNSCC patients and controls but were elevated in patients with benign changes.

This analysis revealed association of two nucleotide derivatives of 4PYR (4PYMP and 4PYRAD) in blood with histological malignancy of tumor (G). Concentration of 4PYMP in the erythrocytes decreased while concentration of 4PYRAD increased with advance of histological malignancy. However, association between these concentrations and TNM grade was not observed.

To summarize, none of the compounds measured could serve as single marker of planocellular cancer of head and neck. However, combined analysis of 4PYR and Met4PY in plasma allows to differentiate healthy subject from those with benign or malignant changes. Differentiation of patients with HNSCC from those with benign changes require comparison of metabolite panels including Met2PY as well as histidine, glutamate, arginine serine, asparagines and aspartate in plasma and 4PYRMP in erythrocyte extracts.