

ANNA SZOŁKIEWICZ

**METABOLIZM NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH
W ERYTROCYTACH DZIECI Z CHOROBYMI
NOWOTWOROWYMI**

*Praca na stopień doktora nauk medycznych
wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. med. Anny Balcerskiej
w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego*

GDAŃSK 2013

Składam serdeczne podziękowania

*Pani prof.dr hab.med. Annie Balcerskiej
za życzliwość i okazaną pomoc, a przede wszystkim za
wrozumiałość i cierpliwość*

*Pani doc. Ewie Słomińskiej
z Katedry i Zakładu Biochemii GUM-ed za pomoc w
przeprowadzeniu badań*

Mojej rodzinie

SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy	4
2. Wstęp	6
3. Cel pracy	21
4. Materiał i metodyka	22
5. Wyniki badań	32
5.1. Badania ogólne określające stężenie podstawowych parametrów krwi obwodowej u dzieci z chorobą nowotworową	32
5.2. Stężenie nukleotydów adeninowych oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową	38
5.3. Stężenie adeniny i adenozyiny w osoczu dzieci z chorobą nowotworową	41
5.4. Aktywność procesu inkorporacji adeniny i adenozyiny do wewnątrzerytrocytarnej puli nukleotydów adeninowych dzieci z chorobą nowotworową	43
5.5. Stężenie produktów degradacji nukleotydów adeninowych w erytrocytach i w osoczu oraz metabolitów dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w osoczu dzieci z chorobą nowotworową	45
6. Dyskusja	49
7. Wnioski	66
8. Streszczenie	68
9. Piśmiennictwo	71

1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2,3-DPG	2,3-bifosfoglicerynian
2PY/Met2PY	N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid
4PY/Met4PY	N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid
ACD	niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych (<i>z ang: anemia of chronic disorders</i>)
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AlAT	aminotransferaza alaninowa (EC 2.6.1.2)
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
APRT	fosforybozylotransferaza adeninowa (EC 2.4.2.7)
AspAT	aminotransferaza asparaginianowa (EC 2.6.1.1)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu (<i>z ang: insulin-like growth factor-1</i>)
IMP	inozyno-5'-monofosforan
MTA	5'-deoksy-5'-metyltioadenozyna
MTAP	fosforylaza-5'-deoksy-5'-metyltioadenozyny (EC 2.4.2.28)
MTR-1-P	5'-deoksy-5'-metyltiorybozo-1-fosforan
NAD ⁺	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona)
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma zredukowana)
NADP ⁺	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (forma utleniona)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (forma zredukowana)
PARP-1	polimeraza poli(ADP)rybozy (EC 2.4.2.30)

PDGF	plytkopochodny czynnik wzrostu (z <i>ang: platelet-derived growth factor</i>)
PNP	fosforylaza nukleozydów purynowych (EC 2.4.2.1)
PRPP	5-fosforybozylo-1-pirofosforan
RMS	mięsak prążkowano komórkowy (z <i>ang: rhabdomyosarcoma</i>)
SAH	S-adenozylohomocysteina
SAHH	hydrolaza S-adenozylohomocysteiny (EC 3.3.1.1)
Syntetaza PRPP	syntetaza 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (EC 2.7.6.1)
TGF- α , β	transformujący czynnik wzrostu – α , β (z <i>ang: transforming growth factor – α, β</i>)
TNF	czynnik martwicy nowotworów (z <i>ang: tumor necrosis factor</i>)
uPA	urokinazopodobny aktywator plazminogenu (z <i>ang: urokinase-type plasminogen activator</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (z <i>ang: vascular endothelial growth factor</i>)

2. WSTĘP

Choroba nowotworowa pozostaje nadal jednym z największych problemów zdrowotnych współczesnego świata [94,117]. Wprowadzenie zaawansowanych technik diagnostycznych oraz wysoce specjalistycznego i wielokierunkowego postępowania terapeutycznego znacznie poprawiło wyniki leczenia osób z tą patologią, jednakże jego skuteczność jest nadal ograniczona [33,46,96,111,112].

Choroby nowotworowe wieku dziecięcego zarówno w Polsce jak i na świecie stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonu w tej grupie populacyjnej. Według statystyk schorzeniem tym dotkniętych jest rocznie 110-130 dzieci na 1 milion populacji w wieku od 0 do 14 r.ż. W naszym kraju, przy populacji liczącej 8,5 mln dzieci i młodzieży do 17 r.ż., stanowi to około 1100-1200 nowych zachorowań w skali roku [66]. Notowany w ostatnich latach rozwój w rozpoznawaniu i leczeniu choroby nowotworowej w populacji dziecięcej sprawił, że odsetek pacjentów trwale wyleczonych w tej grupie sięga prawie 70% i jak wynika ze statystyk wciąż rośnie. W przypadku najczęstszego nowotworu wieku dziecięcego, jakim jest ostra białaczka limfoblastyczna, wyleczalność przekracza 80%, zaś w leczeniu chłoniaka Hodgkina i guza Wilmsa nawet 90% [40]. Postęp stał się możliwy dzięki wprowadzeniu coraz to doskonalszych metod diagnostycznych, a w szczególności technik obrazowania (wielorzędowa tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny, pozytonowa tomografia emisyjna) oraz zastosowaniu skojarzonego postępowania terapeutycznego: wielolekowej chemioterapii z możliwością użycia form liposomalnych cytostatyków, radioterapii (konformalnej, stereotaktycznej, intensywnej modulacji wiązki) i specjalistycznych technik operacyjnych. Na szeroką skalę wprowadzono leczenie przeszczepowe i immunomodulujące, a w fazie zaawansowanych prób klinicznych jest terapia genowa, która stwarza nadzieję dla pacjentów wykazujących pierwotną bądź

wtórna chemiooporność. Włączenie do schematów terapeutycznych tzw. „leczenia wspomagającego” pod postacią preparatów cytoprotekcyjnych, zastosowania szerokospektralnej antybiotykoterapii, leków przeciwwirusowych i przeciwgrzybiczych oraz czynników wzrostu, pozwoliło ograniczyć odsetek dzieci umierających z powodu powikłań leczenia przeciwnowotworowego. To właśnie tak szeroko specjalistyczne i wielokierunkowe postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne umożliwia planową realizację programów leczenia przeciwnowotworowego i pozwala osiągać sukces terapeutyczny u większości chorych dzieci [23,83,102,104].

Trudno jednak uznać aktualnie uzyskiwane wyniki terapeutyczne za zadowalające i dlatego na całym świecie nie ustają badania nad poznaniem etiopatogenezy choroby nowotworowej [22,129]. Jest to schorzenie dotyczące całego organizmu, w przebiegu którego występują różnego rodzaju zaburzenia metaboliczne. Oczywiście są one tym większe, im bardziej zaawansowana jest choroba podstawowa u pacjenta. Są one następstwem oddziaływania komórek rozrastającego się guza zarówno w aspekcie lokalnym, jak i ogólnoustrojowym, w tym poprzez produkcję cytokin (np. interferonu, interleukin, czynnika martwicy nowotworów, insulinopodobnego czynnika wzrostu), czy hormonów. Zaburzenia te można zaobserwować w komórkach praktycznie wszystkich tkanek i narządów, w tym także w erytrocytach. Powszechnie wiadomo, że głównym zadaniem krwinki czerwonej jest transport tlenu z płuc do tkanek obwodowych oraz zwrotny transport dwutlenku węgla. Erytrocyt ludzki nie należy do komórek skomplikowanych. W procesie dojrzewania pozbywa się nawet jądra komórkowego, co minimalizuje zużycie energii na potrzeby własne i jest interpretowane jako wyraz daleko posuniętej specjalizacji. Natomiast, podobnie jak każda inna komórka naszego organizmu, nie może prawidłowo funkcjonować bez stałej podaży energii w postaci adenozyno-5'-trifosforanu (ATP). Tym samym, wszelkie

wewnątrzerytrocytarne zaburzenia przemian metabolicznych towarzyszące chorobie nowotworowej, a zwłaszcza te sprzyjające zaburzeniom syntezy ATP, mogą przyczyniać się do nieprawidłowego funkcjonowania mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie integralności erytrocyta i skutkować jego przedwczesnym rozpadem, rozwojem niedokrwistości i niedostatecznym utlenowaniem tkanek.

Obraz kliniczny choroby nowotworowej może być bardzo zróżnicowany, jednakże niedokrwistość (jawna lub utajona) należy do objawów najczęstszych [11,47,71,93]. Klinicznie manifestuje się ona zwykle bladością skóry, spadkiem aktywności życiowej, zmęczeniem, dusznością, brakiem apetytu, trudnościami w koncentracji, bólami i zawrotami głowy, nadmierną sennością u chorego. Większość tych objawów wynika z pogarszającego się utlenowania tkanek, a ich nasilenie zależy od szybkości narastania anemizacji. Niedokrwistość może być pierwszym objawem choroby nowotworowej lub pojawić się na różnych jej etapach. Najczęściej jest wynikiem toczącej się choroby i towarzyszących jej zaburzeń metabolicznych, ale może się ujawnić dopiero jako niepożądany efekt leczenia. Jej negatywne następstwa są znacznie poważniejsze, aniżeli opisany powyżej obraz kliniczny. Jej obecność upośledza utlenowanie tkanek, w tym także prowadzi do hipoksji guza [53,121]. Jest to zjawisko ze wszech miar niekorzystne. Spadek utlenowania tkanki nowotworowej wyzwała mechanizmy adaptacyjne, niekorzystne z punktu widzenia prowadzonej terapii. Zwiększa się ekspresja genów czynników wzrostu (VEGF, PDGF, TGF- β , angiogeniny) i białek nasilających inwazyjność guza (uPA). Zmniejsza się również wytwarzanie integryn powierzchniowych, co ułatwia rozsiew komórek nowotworowych. Wszystko to sprzyja progresji nowotworu, powstawaniu odległych przerzutów i znacznie ogranicza skuteczność prowadzonej radio- i chemioterapii, uniemożliwiając tym samym realizację założonego programu terapeutycznego

[121,122]. W efekcie zmniejsza to szansę dziecka na całkowite i trwałe wyleczenie. Podstawowym sposobem leczenia niedokrwistości towarzyszącej chorobie nowotworowej jest przetaczanie masy erytrocytarnej. Jednak wielokrotne transfuzje stwarzają ryzyko wystąpienia powikłań, przede wszystkim o podłożu immunologicznym (począwszy od łagodnych odczynów skórnych pod postacią pokrzywki, po ciężkie odczyny uogólnione o charakterze wstrząsu) oraz o podłożu infekcyjnym. Prowadzą one do bezpośredniego zagrożenia życia chorego, zwłaszcza poddawanego chemioterapii. Z tych powodów onkolodzy uwagę swoją skierowali ku rekombinowanej erytropoetynie (rHuEpo) [2,5,12,20]. Jej pozytywny efekt terapeutyczny jest widoczny u około 50-80% pacjentów, chociaż zebrane na przestrzeni lat doświadczenia, jak i przeprowadzone w tym okresie badania kliniczne ujawniły także i negatywne aspekty jej podawania. Wprawdzie terapia erytropoetyną istotnie ogranicza konieczność przetaczania preparatów krwi, to jednak sprzyja rozwojowi nadciśnienia tętniczego, zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowozatorowych, a także możliwość wystąpienia aplazji czerwonych krwinek w układzie krwiotwórczym. Ponadto w ostatnich latach pojawiły się publikacje dowodzące, że komórki nowotworowe posiadają na swojej powierzchni receptory dla erytropoetyny i że terapia erytropoetyną może przyspieszać rozrost guza i zwiększać śmiertelność u pacjentów z chorobą nowotworową [1,16,41,92,119]. Problem ten wzbudza olbrzymie kontrowersje i stał się przedmiotem dyskusji onkologów na całym świecie. Jego rozwiązanie nie jest proste i wymaga niestety dalszych badań. Wiadomo jednak, iż prowadzenie leczenia onkologicznego u pacjenta, który osiągnął prawidłowe parametry morfotyczne krwi obwodowej jest bardziej efektywne oraz lepiej tolerowane przez chorego. Dlatego też pomimo pewnych wątpliwości, nasze postępowanie na dzień dzisiejszy nie uległo istotnej zmianie. W naszych działaniach staramy się osiągać takie

parametry morfologiczne krwi obwodowej, aby nie tylko poprawić samopoczucie leczonego dziecka, ale przede wszystkim, aby skutecznie przeprowadzić założony program terapeutyczny. Lepsze utlenowanie tkanki nowotworowej poprawia efekty chemio- i radioterapii [48].

Etiologia niedokrwistości towarzyszącej chorobie nowotworowej jest często złożona i stanowi wynik oddziaływania wielu współistniejących ze sobą czynników [11,47]. Warto jednak podkreślić, że z uwagi na podstawowe mechanizmy, które są za nią odpowiedzialne, niedokrwistość w przebiegu choroby nowotworowej zalicza się do grupy niedokrwistości towarzyszących chorobom przewlekłym (ACD – z *ang.*: *anemia of chronic disorders*). Pojęcie to wprowadzono w odniesieniu do niedokrwistości występujących w przebiegu przewlekłych chorób infekcyjnych, zapalnych (reumatoidalnych, kolagenoz) i właśnie nowotworowych [17,24,74]. W przebiegu ACD obserwuje się zarówno nieadekwatny do stopnia niedokrwistości niski poziom erytropoetyny i będącą tego efektem niewydolność erytropoezy, a także skrócony czas przeżycia krwinek czerwonych. Jednakże jej istotą są przede wszystkim zaburzenia przemian żelaza związane z upośledzonym jego uwalnianiem z magazynów ustrojowych. Jak pokazały prace badawcze ostatnich lat kluczową rolę w tych zaburzeniach odgrywa hepcydyna, 25 aminokwasowe białko syntetyzowane w neutrofilach i w makrofagach, ale przede wszystkim w komórkach wątroby [38,73,127]. Jest to białko, hormon, który w sposób bezpośredni reguluje gospodarkę żelazem. Istotą jej działania jest inaktywacja ferroportyny, głównego transportera błonowego pozwalającego wyeksportować jon żelaza (Fe^{+2}) z enterocytów i makrofagów. Nadmiar hepcydyny prowadzi do zmniejszonej absorpcji żelaza w jelitach, jego retencji w enterocytach i makrofagach, a w efekcie do redukcji zasobów żelaza w organizmie i niedostatecznej jego dostępności dla potrzeb erytropoezy. Ekspresja genu hepcydyny

jest oczywiście zależna od bieżącego stanu zasobów żelaza w ustroju, ale wpływ na nią ma także: niedotlenienie, erytropoetyna, a przede wszystkim obecność stanu zapalnego. Jest dobrze udokumentowanym, że przewlekły stan zapalny poprzez związane z nim prozapalne cytokiny (głównie IL-1, IL-6, TNF- α) nasila ekspresję genu hepcydyny prowadząc do wzrostu jej stężenia w osoczu, a co za tym idzie do inaktywacji ferroportyny. Skutkuje to zahamowaniem uwalniania żelaza z komórek, obniżeniem jego osoczowego stężenia, co uniemożliwia efektywną erytropoezę [37,128]. Ponadto cytokiny związane z przewlekłym stanem zapalnym upośledzają erytropoezę także poprzez zahamowanie wytwarzania erytropoetyny w nerkach oraz poprzez bezpośrednie hamowanie proliferacji komórek progenitorowych linii erytroidalnej i pobudzanie ich apoptozy [36,80]. W efekcie, wraz z rozwojem ACD pojawiają się charakterystyczne zmiany parametrów hematologicznych (Tabela 1). W surowicy pacjentów z tym zaburzeniem obserwuje się niskie stężenie żelaza, prawidłową lub obniżoną wartość transferyny, z obniżonym jej wysyceniem przez żelazo, prawidłowy lub podwyższony poziom ferrytyny. Charakterystyczny jest niski poziom endogennej erytropoetyny. Poziom retikulocytów jest zwykle obniżony, podobnie jak stężenie rozpuszczalnego receptora dla transferyny. ACD ma początkowo obraz niedokrwistości normocytarnej i normochromicznej, która w miarę postępu choroby zmienia się w mikrocytarną i hipochromiczną.

Niedokrwistość w przebiegu choroby nowotworowej może być także związana ze zmniejszonym wytwarzaniem erytrocytów w szpiku kostnym. Ten typ niedokrwistości charakteryzuje przede wszystkim nowotwory układu krwiotwórczego i limfatycznego, pierwotnie i wtórnie naciekające szpik (ostre i przewlekłe białaczki, chłoniaki), ale można go również zaobserwować w guzach litych, przebiegających z przerzutami do szpiku kostnego (np. neuroblastoma, mięsak Ewinga). Upośledzenie funkcji szpiku jest

również efektem prowadzonej chemio- i radioterapii, uszkadzającej szybko dzielące się komórki szpikowe. Istnieją także inne przyczyny niedokrwistości w przebiegu choroby nowotworowej. Brak apetytu, nudności i wymioty np. w guzach OUN, przyczyniają się do niedoborów licznych mikroelementów, w tym żelaza, kwasu foliowego i witaminy B₁₂. Co więcej, powikłania gastrotoksyczne po chemio- i radioterapii niedobory te nasilają. Pacjenci niejednokrotnie wymagają prowadzenia żywienia pozajelitowego, które pomimo swoich zalet, zubaża dietę i nie zawsze bilansuje straty energetyczne w organizmie. Towarzyszące chorobie nowotworowej zaburzenia krzepnięcia, a także mikro- i makrokrwawienia (uszkodzenie naczyń wskutek rozrastającego się guza, wielokrotne pobieranie krwi, zabiegi diagnostyczne i/lub lecznicze), również przyczyniają się rozwojowi niedokrwistości [11,47,71].

Osobnym typem niedokrwistości, choć rzadziej rozpoznawanym w przebiegu choroby nowotworowej, jest niedokrwistość hemolityczna [68,89]. Niedokrwistość ta jest spowodowana skróconym czasem przeżycia krwinek czerwonych, której narastanie przewyższa możliwości kompensacyjne szpiku. W warunkach prawidłowych erytrocyt żyje około 120 dni, natomiast w warunkach patologicznych czas ten może ulec różnego stopnia skróceniu. Prowadzi to do kompensacyjnego pobudzenia erytropoezy ze wzrostem odsetka krążących retikulocytów. Zmiany parametrów hematologicznych w przebiegu niedokrwistości hemolitycznej są odmienne, aniżeli te obserwowane w przebiegu ACD (Tabela 1). Niedokrwistość hemolityczna jest niedokrwistością normocytową i normobarwliwą, przebiegającą z podwyższonym poziomem żelaza, retikulocytów, wolnej hemoglobiny i wolnej bilirubiny, a obniżonym stężeniem haptoglobiny i ferrytyny. Najczęstszym mechanizmem nabytych postaci niedokrwistości hemolitycznych są procesy autoimmunologiczne lub mechaniczne uszkodzenie erytrocytów (mikroangiopatyczne), ale nietrudno sobie wyobrazić, że w

Tabela 1

Porównanie zmian wybranych parametrów hematologicznych w niedokrwistości towarzyszącej chorobom przewlekłym (ACD) i w niedokrwistości hemolitycznej.

Parametr	ACD	Niedokrwistość hemolityczna
Erytrocyt	mikrocyt, hipochromiczny	normocyt, normochromiczny
Żelazo	↓	↑
Retikulocyty	- ↓	↑
Ferrytyna	N lub ↑	↓
Bilirubina	N	↑
Haptoglobina	N lub ↑	↓
Mielogram	zahamowanie erytropoezy	pobudzenie erytropoezy

przebiegu choroby nowotworowej, podczas której dominuje ACD, także czas przeżycia erytrocyta może ulegać czasowemu lub trwałemu skróceniu. Załóżmy, że wewnątrzerytrocytarne mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie energii (ATP), niezbędne dla zachowania jego integralności są niewystarczające do powstałych w związku z rozwojem choroby potrzeb.

Jak już wspomniałam, dojrzały ludzki erytrocyt mimo, że nie należy do komórek skomplikowanych i choć jest pozbawiony jądra komórkowego, to nie może prawidłowo funkcjonować bez stałej podaży energii w postaci ATP. Głównym substratem zużywanym przez erytrocyty do produkcji energii jest glukoza, która przenika do erytrocyta na drodze ułatwionej dyfuzji (niezależnej ani od insuliny, ani energii), za pośrednictwem translokatora GLUT 1. W 90% jest ona metabolizowana w procesie beztlenowej glikolizy [85,126]. W jej przebiegu powstaje między innymi syntetyzowany wyłącznie w erytrocytach 2,3-DPG, który bierze czynny udział w

regulacji powinowactwa hemoglobiny do tlenu. Wzrost jego stężenia powoduje przesunięcie krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny w prawo, czego efektem jest nasilenie procesu uwalniania tlenu w tkankach [67]. W przebiegu beztlenowej glikolizy powstaje również NADH, który uczestniczy w przemianie pirogronianu w mleczan. Zapobiega on także powstawaniu niezdolnej do wiązania tlenu methemoglobiny. Jednakże zasadniczą funkcją glikolizy jest produkcja energii pod postacią ATP. Związek ten jest odpowiedzialny za właściwe funkcjonowanie pompy Na^+/K^+ , która utrzymuje fizjologiczny gradient jonów po obu stronach błony komórkowej, zapewnia jej właściwą strukturę i kształt. ATP bierze również udział w syntezie glutationu. Pozostałe 10% glukozy podlega przemianom w cyklu pentozomonofosforanowym. Jego zasadniczą rolą jest produkcja NADPH, koniecznego do redukcji utlenionego glutationu. W ten sposób możliwą staje się ochrona błony erytrocytarnej przed peroksydacją lipidów spowodowaną wolnymi rodnikami. Drugą ważną funkcją cyklu pentozomonofosforanowego jest dostarczanie rybozo-5-fosforanu (R-5-P), niezbędnego do syntezy fosforybozylpirofosforanu (PRPP), który z kolei odgrywa istotną rolę w procesie biosyntezy nukleotydów [126].

Efektywna przemiana beztlenowa glukozy w erytrocyte pozwalająca na uzyskanie odpowiedniej ilości ATP jest podstawowym warunkiem zachowania jego integralności i prawidłowego funkcjonowania. Dojrzały ludzki erytrocyt nie posiada jądra komórkowego, a tym samym nie posiada również aparatu enzymatycznego zdolnego do syntezy nukleotydów purynowych *de novo*. W takich warunkach wewnątrzerytrocytarna synteza nukleotydów adeninowych jest możliwa jedynie w następstwie wykorzystania zawierających pierścień purynowy związków pochodzenia pozaerytrocytarnego [30,31]. Do związków tych zalicza się adenozyne i adeninę. W warunkach fizjologicznych to adenozyne jest wykorzystywana jako główny donor

pierścienia purynowego dla wewnątrzerytrocytarnej syntezy ATP [29,30,81]. Jej pierwotnym źródłem jest wątroba, gdzie w następstwie reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny, S-adenozylhomocysteina ulega hydrolizie i w efekcie powstaje homocysteina oraz adenozyne:



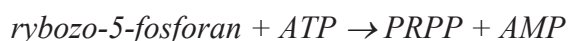
Tą drogą wątroba uwalnia kilkanaście mmoli adenozyne na dobę, co pozwala na utrzymanie dostatecznej produkcji AMP w reakcji katalizowanej przez kinazę adenozyne:



Drugim źródłem pierścienia purynowego niezbędnego do wewnątrzerytrocytarnej syntezy adenylanów jest adenina. Adenina powstaje głównie w procesie syntezy poliamin. Proces ten zachodzi w różnych tkankach i narządach, ale najintensywniej w wątrobie. W następstwie tego procesu powstaje 5-deoksy-5-metyltioadenozyne (MTA), która w reakcji katalizowanej przez fosforylazę 5-deoksy-5-metyltioadenozyne (MTAP) rozpada się i uwalnia adeninę:



Adenina wnika do erytrocyta, a następnie wchodząc w reakcję z 5-fosforybozylo-1-pirofosforanem (PRPP) jest wbudowywana do puli nukleotydów adeninowych. PRPP powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez syntetazę PRPP:



Reakcja znajdującej się już w erytrocycie adeniny i powstałego opisaną powyżej drogą PRPP jest katalizowana przez fosforybozylotransferazę adeninową i w jej następstwie adenina ulega przemianie do AMP:



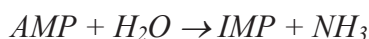
Jak wynika z przedstawionego opisu zdarzeń, zarówno adenozyzna, jak i adenina po inkorporacji do wnętrza erytrocyta podlegają przemianom, w następstwie których powstaje AMP. Następnym etapem powstawania nukleotydów jest synteza ADP i ATP.

Poza powstaniem ATP w ciągu glikolitycznym, dodatkowym jego źródłem jest przemiana katalizowana przez kinazę adenylanową:



W warunkach fizjologicznych stężenie ATP, a także proporcje ATP/ADP/AMP są ściśle kontrolowane i wynoszą średnio 100:10:1. Dzięki powyższej reakcji dochodzi do niewielkich zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu ATP, nawet podczas intensywnych procesów życiowych komórki wymagających dużej ilości energii. Synteza nukleotydów adeninowych w ludzkim erytrocycie została schematycznie przedstawiona na Rycinie 1.

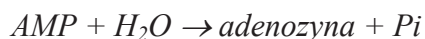
W erytrocycie zachodzi również proces degradacji nukleotydów adeninowych. Może on zachodzić dwiema alternatywnymi drogami, jednakże drogą główną jest droga deaminacji AMP katalizowana przez deaminazę AMP (EC 3.5.4.6):



W następstwie tej reakcji powstaje IMP, który podlega hydrolizie katalizowanej przez 5'-nukleotydazę (EC 3.1.3.5), co prowadzi do powstania inozyny:



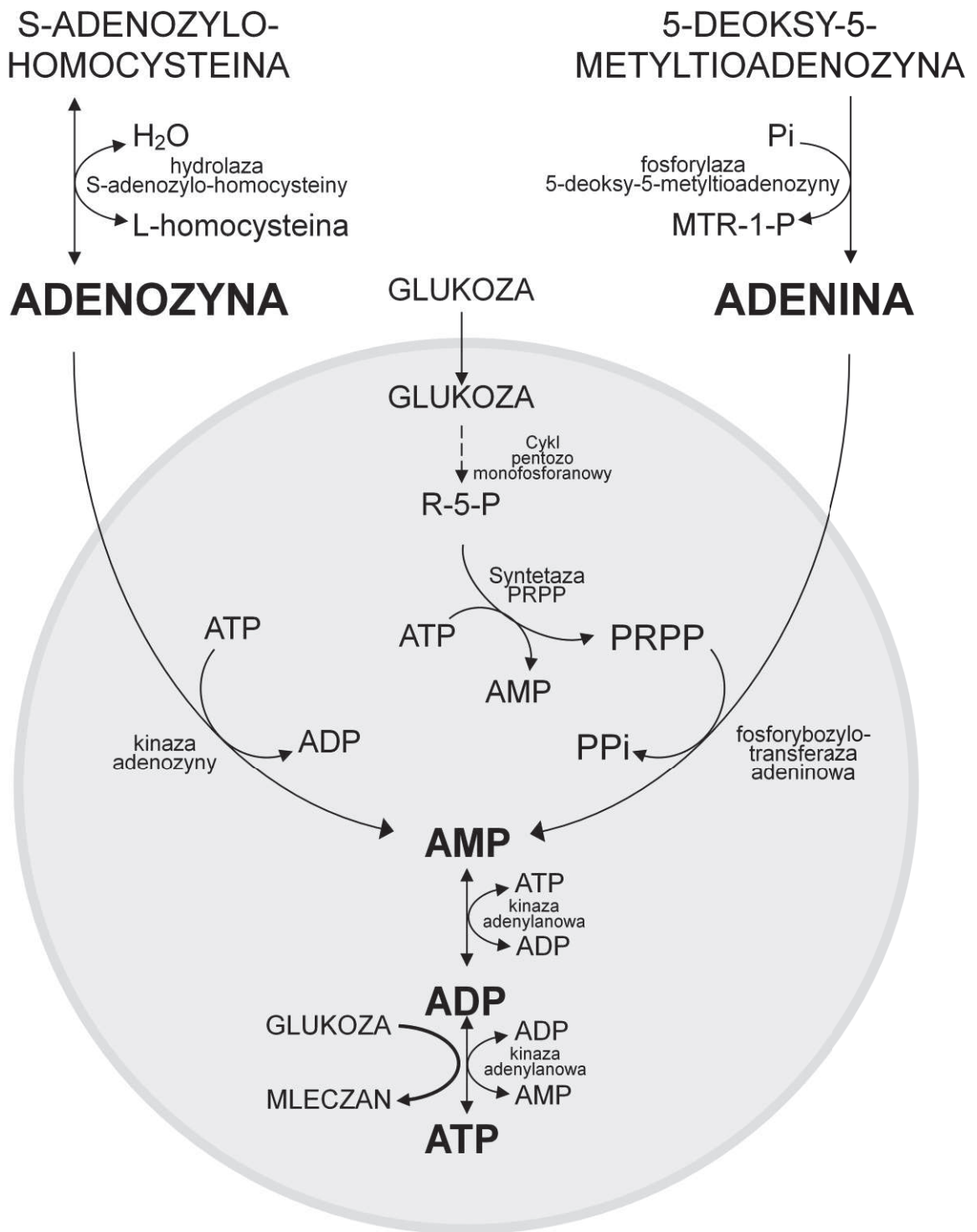
Pierwszy etap alternatywnego szlaku katabolizmu nukleotydów adeninowych w erytrocycie jest także katalizowany przez 5'-nukleotydazę. W następstwie tej reakcji AMP ulega hydrolizie z uwolnieniem adenozyzny:

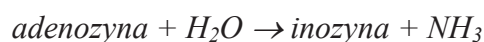


Powstała tą drogą adenozyzna ulega następnie deaminacji katalizowanej przez deaminazę adenozyzny (EC 3.5.4.4), w następstwie czego powstaje inozyna:

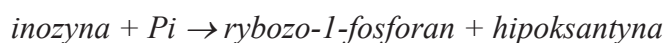
Rycina 1

Schemat syntezy nukleotydów adeninowych w ludzkim erytrocycie





Z przedstawionego opisu zdarzeń wynika, że obie drogi wewnątrzerytrocytarnej degradacji nukleotydów adeninowych prowadzą do powstania inozyny. Droga deaminacji AMP jest w warunkach fizjologicznych drogą podstawową, ponieważ w erytrocycie aktywność deaminazy AMP jest wielokrotnie wyższa, aniżeli aktywność 5'nukleotydazy [29,30]. Następny etap, już wspólny dla obu szlaków to fosforoliza inozyny, katalizowana przez fosforylaze nukleozydów purynowych, w efekcie której uwalnia się rybozo-1-fosforan i hipoksantyna:

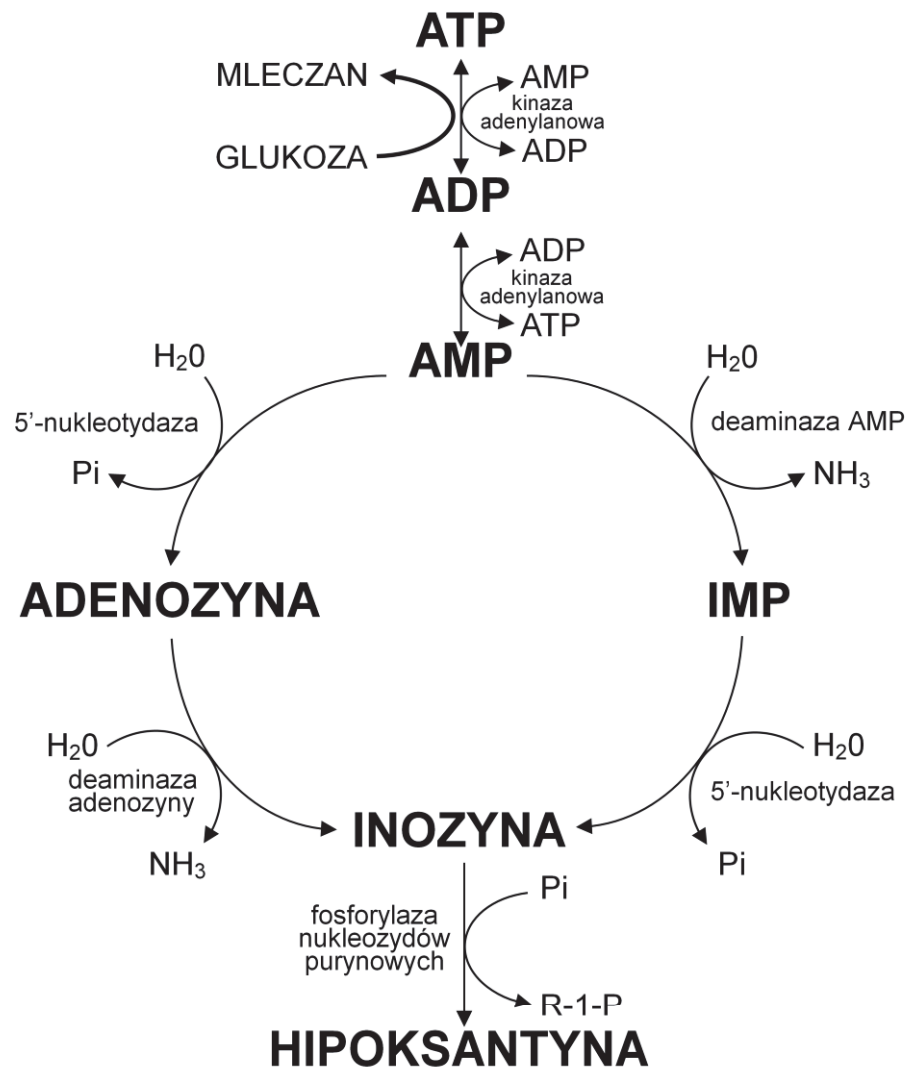


W ludzkim erytrocycie nie ma aktywności oksydazy ksantynowej i dlatego nie powstaje ani ksantyna, ani kwas moczowy. Końcowym produktem wewnątrzerytrocytarnej degradacji adenylanów jest hipoksantyna. W warunkach fizjologicznych pełen obrót pierścienia purynowego w krwi czerwonej zajmuje około 7 dni. Schemat degradacji nukleotydów adeninowych w erytrocycie ludzkim przedstawiono na Rycinie 2.

Sprawny obrót pierścienia purynowego i produkcja odpowiedniej ilości ATP jest jednym z gwarantów prawidłowego funkcjonowania erytrocyta. Brak odpowiedniej ilości ATP prowadzi między innymi do niewydolności pompy Na^+/K^+ , która jest odpowiedzialna za utrzymanie potencjału błonowego krwinki czerwonej oraz jej objętości. Niewydolność tej pompy skutkuje nieprawidłowym, błonowym gradientem stężeń sodu i potasu, zmianami kształtu komórki i w efekcie jej rozpadem. Można postawić hipotezę, że w przebiegu choroby nowotworowej, wewnątrzerytrocytarne przemiany nukleotydów purynowych prowadzące do produkcji ATP są upośledzone, co w efekcie sprzyja skróceniu czasu przeżycia erytrocyta i przyczynia się do rozwoju niedokrwistości. W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewielka ilość prac poświęcona

Rycina 2

Schemat degradacji nukleotydów adeninowych w ludzkim erytrocycie.



temu zagadnieniu. Powodem tego może być to, iż nie obserwowano istotnych zmian w stężeniach badanych nukleotydów, może obawiano się zbyt dużych różnic wynikających ze stopnia zaawansowania choroby u poszczególnych pacjentów, co w znacznym stopniu wpływa na uzyskane wyniki. Wyniki opublikowanych prac nie są jednoznaczne. Istnieją publikacje, w których badacze nie obserwowali u chorych zmian

w stężeniu badanych nukleotydów adeninowych [72,97,120]. Ale jest także doniesienie, w którym wykazano 30% spadek wewnątrzerytrocytarnego ATP [114].

3. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie zaburzeń jakim podlega metabolizm nukleotydów purynowych (głównie adeninowych) w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową o utkaniu pozaszpikowym i poszukiwanie ewentualnych związków pomiędzy tymi zaburzeniami, a towarzyszącą chorobie niedokrwistością.

Przeprowadzone badania miały odpowiedzieć na następujące pytania:

1. Jakie jest stężenie nukleotydów adeninowych i dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową?
2. Jakie jest osoczowe stężenie adeniny i adenozyiny, czyli głównych substratów wewnątrzerytrocytarnej syntezy nukleotydów adeninowych dzieci z chorobą nowotworową?
3. Jaka jest szybkość wbudowywania adeniny i adenozyiny do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów?
4. Jaka jest aktywność procesów degradacji nukleotydów adeninowych w erytrocycie dzieci z chorobą nowotworową określona na podstawie stężenia produktów ich degradacji w erytrocycie i w osoczu oraz jakie jest stężenie produktów degradacji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w osoczu?
5. Czy istnieje związek pomiędzy wewnątrzerytrocytarnymi zaburzeniami przemian adenylanów, a niedokrwistością obecną u dzieci z chorobą nowotworową?

4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Na prowadzenie badań, uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny). Zgoda nr TKEBN 656/98.

Badaniami objęto 58 dzieci (31 dziewcząt i 27 chłopców) w wieku 2-17 lat z rozpoznaną chorobą nowotworową, leczonych przewlekłe w latach 1998-2004 w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Grupę kontrolną (n=19) stanowiły dzieci zdrowe (11 dziewcząt i 8 chłopców) w wieku 3-16 lat, u których na podstawie szczegółowego wywiadu i badania przedmiotowego wykluczono obecność choroby mogącej mieć wpływ na wyniki planowanych badań. Podstawowe cechy statystyczne dzieci objętych badaniami umieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

Podstawowe cechy statystyczne dzieci z rozpoznaną chorobą nowotworową (grupa badana) i dzieci grupy kontrolnej (grupa kontrolna) biorących udział w badaniu:

Cecha statystyczna	Grupa kontrolna (n=19)	Grupa badana (n=58)	Statystyka p<
Wiek (lata)	11.4±3.2	9.8±4.9	n.s.
Wzrost (cm)	153.0±20.1	138.4±27.8	n.s.
Waga (kg)	46.8±15.3	36.9±18.6	n.s.
BMI	19.3±2.2	17.8±3.1	n.s.

n.s. – różnica nieznamienna statystycznie

Podstawowym kryterium włączenia do badań była rozpoznana, dotychczas nieleczona choroba nowotworowa o lokalizacji pozaszpikowej w stopniu

zaawansowania od II do IV. W przypadku choroby w IV stopniu zaawansowania, brak lokalizacji szpikowej nowotworu był potwierdzony badaniem histopatologicznym szpiku. Dzieci ukończyły 2 rok życia i nie wykazywały cech miejscowej/uogólnionej infekcji, ani innych poza chorobą nowotworową stanów patologicznych mogących wpłynąć na uzyskiwane wyniki badań, w tym zwłaszcza na stopień niedokrwistości. Żaden pacjent nie wymagał przetoczenia masy erytrocytarnej. Krew do badań pobierano na czczo, w godzinach porannych, przed rozpoczęciem specjalistycznego leczenia. Charakterystyka choroby podstawowej, zastosowany protokół leczenia i końcowy efekt terapeutyczny przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

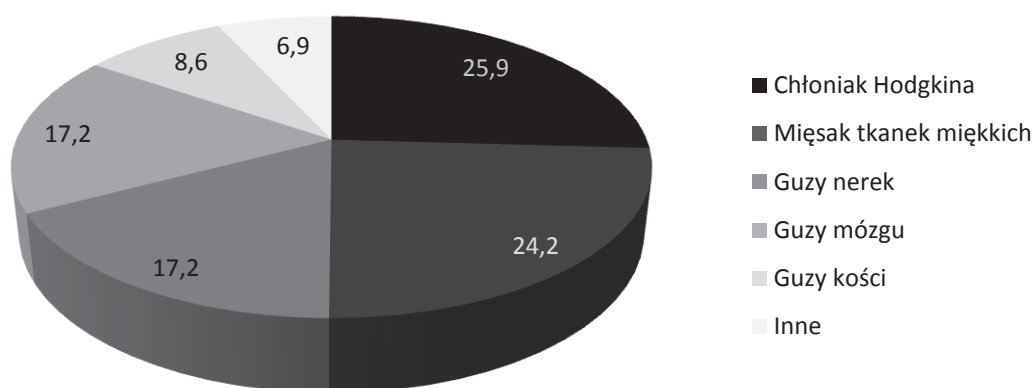
Charakterystyka kliniczna badanych dzieci: płeć, wiek, rozpoznanie, stopień zaawansowania klinicznego choroby, stosowany protokół leczniczy i uzyskany końcowy efekt terapeutyczny.

L.p.	Płeć	Wiek (lata)	Rozpoznanie	Stopień Zaawansowania	Schemat Leczniczy	Efekt końcowy
1.	K	3	Tu.Wilms	III	SIOP 92-01	Remisja
2.	K	2	Tu.Wilms	IV	SIOP 92-01	Remisja
3.	K	6	Tu.Wilms	III	SIOP 92-01	Remisja
4.	M	2	Tu.Wilms	II	SIOP 92-01	Remisja
5.	K	2	Tu.Wilms	II	SIOP 92-01	Remisja
6.	K	2	Tu.Wilms	IV	SIOP 92-01	Zgon
7.	K	5	Tu.Wilms	II	SIOP 92-01	Remisja
8.	M	4	Tu.Wilms	II	SIOP 92-01	Remisja
9.	M	4	Tu.Wilms	IV	SIOP 92-01	Remisja
10.	K	13	Ca clarocellulare	II	SIOP 92-01	Remisja
11.	K	6	RMS	IV	CWS 96	Zgon
12.	M	10	RMS	IV	CWS 96	Zgon
13.	K	14	RMS	IV	CWS 96	Zgon
14.	K	3	RMS	III	CWS 96	Remisja
15.	K	7	RMS	II	CWS 96	Remisja
16.	M	5	RMS	IV	CWS 96	Zgon
17.	K	5	RMS	III	CWS 96	Remisja
18.	M	3	RMS	III	CWS 2002	Remisja
19.	M	14	Schwannoma mal.	III	CWS 96	Remisja
20.	M	14	Fibrosarcoma	III	CWS 96	Remisja

L.p.	Płeć	Wiek (lata)	Rozpoznanie	Stopień Zaawansowania	Schemat Lecznicy	Efekt końcowy
21.	M	2	Leyomyosarcoma	III	CWS 96	Remisja
22.	K	13	Rhabdoid tumor	III	CWS 96	Remisja
23.	K	8	Tu.Triton	III	CWS 96	Zgon
24.	M	14	Tu.Triton	III	CWS 96	Remisja
25.	K	6	Sarcoma Ewinga	IV	EURO- EWING99	Remisja
26.	M	12	Sarcoma Ewinga	III	EURO- EWING99	Zgon
27.	K	14	Osteosarcoma	III	OS94,EORTC	Remisja
28.	M	17	Osteosarcoma	IV	EORTC	Zgon
29.	K	16	Chondrosarcoma	IV	-	Zgon
30.	M	9	Gliomatosis cerebri	IV	Protokół I	Zgon
31.	M	12	Ganglioglioma anaplasticum	IV	Protokół I	Zgon
32.	K	3	Ependymoma anaplasticum	III	Protokół III	Remisja
33.	K	11	Astrocytoma anaplasticum	III	Protokół II	Zgon
34.	M	5	Medulloblastoma	III	Protokół I	Zgon
35.	M	6	Medulloblastoma	III	Protokół I	Zgon
36.	M	16	Medulloblastoma	III	Protokół I	Remisja
37.	M	14	Glioblastoma	IV	Protokół II	Zgon
38.	K	15	Glioblastoma	IV	Protokół II	Zgon
39.	M	16	Pinealoblastoma	III	Protokół I	Zgon
40.	K	14	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
41.	M	17	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
42.	M	13	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
43.	K	16	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
44.	M	14	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
45.	M	17	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
46.	K	15	Morbus Hodgkini	III	HD 97	Remisja
47.	K	15	Morbus Hodgkini	IV	HD 97	Remisja
48.	K	10	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
49.	K	13	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
50.	K	17	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
51.	M	9	Morbus Hodgkini	IV	HD 97	Remisja
52.	M	5	Morbus Hodgkini	II	HD 97	Remisja
53.	K	15	Morbus Hodgkini	III	HD 97	Remisja
54.	M	5	Morbus Hodgkini	IV	HD 97	Zgon
55.	K	2	Yolk sac tumor	HRG	VIP	Remisja
56.	K	10	Ovary Embryonic Tu.	HRG	VIP	Remisja
57.	M	6	Ganglioneuroblastoma	IV	CWS 96	Remisja
58.	K	14	Lymphoepithelioma	III	Cysplatyna, 5-FU, Zabieg, RTX	Remisja

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 3, w grupie dzieci badanych najczęściej było pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina (15 przypadków,

25,9%). Niewiele mniej stanowiły mięsaki tkanek miękkich (14 chorych, 24,2%). Poza tym wśród badanych dzieci obserwowano 10 przypadków guzów nerek (17,2%), z których olbrzymią większość stanowiły guzy Wilmsa, 10 dzieci z guzem mózgu (17,2%), 5 chorych z guzem kości (8,6%) oraz 4 przypadki innych postaci choroby nowotworowej (6,9%). Dane dotyczące ilości poszczególnych rozpoznań klinicznych przedstawiono w formie graficznej na wykresie 1.



Wykres 1

Procentowy rozdział rozpoznań klinicznych w grupie dzieci badanych z rozpoznaną chorobą nowotworową.

4.1.Oznaczenia morfologii krwi obwodowej wraz z pomiarem stężenia dodatkowych czynników pozwalających określić ewentualną przyczynę istniejącej niedokrwistości, a także oznaczenia stężenia podstawowych parametrów gospodarki elektrolitowej, wapniowo-fosforanowej, określających wydolność nerek i wątroby, CRP.

Wszystkim dzieciom z chorobą nowotworową zakwalifikowanym do grupy badanej, jak również wszystkim dzieciom zdrowym z grupy kontrolnej w godzinach

porannych, na czczo pobierano krew żylną na badania laboratoryjne. Morfologię krwi obwodowej, odsetek retikulocytów, ale także stężenia wolnej hemoglobiny, haptoglobiny, ferrytyny, żelaza, bilirubiny wolnej i całkowitej, Na^+ , K^+ , wapnia, fosforu, kreatyniny, BUN (azot pozabiałkowy mocznika), transaminaz, wskaźnika protrombinowego i CRP oznaczano w oparciu o rutynowe metody laboratoryjne stosowane w Laboratorium Centralnym Państwowego Szpitala Klinicznego nr 1 w Gdańsku (obecnie Centralne Laboratorium Kliniczne Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku). Kierownikiem laboratorium jest obecnie dr n.med. Krzysztof Lewandowski.

4.2.Ultrafiltracja osocza.

5 ml krwi żyłnej pobierano do probówki z zawartością heparyny. Probówki umieszczano w wirówce laboratoryjnej (Janetzki T32c) i wirowano przez 5 minut przy 3000 obrotów/minutę. Po odwirowaniu, część osocza (około 0,5 ml) przenoszono do probówek typu Eppendorf firmy Milipore z celulozowymi ultrafiltrami zatrzymującymi cząsteczki o masie powyżej 10 kDa i wirowano w temperaturze 4°C w wirówce typu Sorvall RC-5B (rotor: Sorvall 5BRC). Powstały przesącz analizowano korzystając z wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

4.3 Izolacja i ekstrakcja erytrocytów.

Pozostałą część osocza uzyskaną podczas pierwotnego wirowania opisanego w części 4.2 usunięto, a znajdujące się w probówce erytrocyty przepłukano zmodyfikowanym buforem Krebsa-Ringera zawierającym: 10 mM HEPES, 1,2 mM KH_2PO_4 , 5 mM glukozę, 3 mM MgSO_4 , 2,6 mM KCl oraz 125 mM NaCl. W dalszym etapie przepłukane erytrocyty ponownie wirowano (wirówka Janetzki T32c) przez 5

minut przy 3000 obrotów/minutę. Procedurę tę jeszcze 2-krotnie powtarzano w celu całkowitego usunięcia pozostałości osocza. Opisaną procedurę prowadzono w temperaturze pokojowej.

Uzyskane tą drogą erytrocyty poddawano ekstrakcji. Reakcje enzymatyczne zachodzące w płukanych erytrocytach przerywano poprzez dodanie do zawierającej je próbówki w stosunku objętościowym 1:1 schłodzonego w lodzie 2,4 M HClO_4 . Po natychmiastowym wymieszaniu, próbówki umieszczano na 15 minut w pojemniku z lodem. Następnie próbówki umieszczano w mikrowirówce (Centrifuge 5417R) i wirowano przez 3 minuty przy 13000 obrotów/minutę w temperaturze 4°C. Otrzymany supernatant (około 600 μl) przenoszono do probówek Eppendorf'a. W celu uzyskania pH 6-7 dodawano dodatkowo 100 μl 3M K_3PO_4 , a następnie próbówki umieszczano na 15 minut w pojemniku z lodem w celu wytrącenia KClO_4 . Po tym czasie próbówki ponownie wirowano przez 2 minuty przy 13000 obrotów/minutę w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant bezpośrednio analizowano lub przechowywano do czasu analizy w temperaturze -35°C.

4.4.Oznaczenie hematokrytu

Stężenie oznaczanych nukleotydów oraz ich produktów degradacji wyrażano w odniesieniu do objętości erytrocytów. Wyizolowane i przepłukane erytrocyty pobierano do kapilary firmy Modulohm (pojemność 20 μl , długość 75 mm), którą zamykano masą plastyczną. Następnie kapilary wirowano w wirówce hematokrytowej (Mechanika Precyzyjna typ 316) przez 3 minuty przy 5000 obrotów/minutę. Odczytu dokonywano bezpośrednio po wirowaniu.

4.5. Inkorporacja radioaktywnej adeniny i adenozyiny do puli nukleotydów adeninowych erytrocytów.

Do 100 μ l wyizolowanych i przepłukanych erytrocytów (hematokryt 85%) dodawano 300 μ l buforu inkubacyjnego o pH 7,4 zawierającego 10 mM HEPES, 1,2 mM KH_2PO_4 , 5 mM glukozę, 3 mM MgSO_4 , 2,6 mM KCl oraz 125 mM NaCl. Dodatkowo do środowiska dodawano 15 μ l inhibitora deaminazy adenozyiny (EHNA) w celu ochrony przed degradacją dodawanej w kolejnym etapie adenozyiny. W ten sposób rozpoczynano 15 minutową preinkubację w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Po tym czasie dodawano 5 μ l radioaktywnej adeniny lub adenozyiny (znakowana ^{14}C w pozycji 8 pierścienia purynowego). Aby uzyskać odpowiednie stężenie i radioaktywność specyficzną, radioaktywną adeninę i adenozyinę (50 mCi/L, radioaktywność specyficzną 55 mCi/mmol) mieszało odpowiednio z 1 mM roztworami nieradioaktywnej adeniny i adenozyiny w proporcjach objętościowych 1:1. Inkubację z adeniną prowadzono w czasie 0, 5, 10 i 15 minut w celu określenia szybkości jej wbudowywania się na przestrzeni czasu. Inkubację z adenozyiną prowadzono w czasie 0, 2,5, 5 i 10 minut. Reakcję przerywano dodając 100 μ l 2,4 M HClO_4 (kwasu nadchlorowego), a następnie próbki wirowano przy 13000/minutę. Do 350 μ l uzyskanego w ten sposób supernatantu dodawano 35 μ l 3 M K_3PO_4 . Procedurę kwaśnej ekstrakcji przeprowadzano w temperaturze 4°C. Ekstrakty bezpośrednio poddano analizie lub zamrażano i przechowywano w -35°C.

4.6. Pomiar stężenia nukleotydów i produktów ich degradacji w ekstraktach erytrocytów i osoczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

4.6.1. Opis systemu chromatograficznego

Wszystkie pomiary stężeń nukleotydów i produktów ich degradacji zostały wykonane korzystając z systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [26] firmy Merck-Hitachi/Hewlett-Packard będącego na wyposażeniu Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zestaw składał się z pompy wysokociśnieniowej połączonej liniowo ze sterownikiem gradientu typu L-6200, detektorem z matrycą fotodiodową (typu DAD) serii 1050 firmy Hewlett-Packard oraz autosamplerem AS-2000 połączonym z termostatem utrzymującym temperaturę 4°C. Uzyskane dane chromatograficzne analizowano komputerowo korzystając z oprogramowania HPChemStation firmy Hewlett-Packard. Pozwalało ono uzyskiwać oraz porównywać spektra rozdzielanych związków, co było istotne dla ich identyfikacji. Radioaktywność zawartą w rozdzielanych związkach pochodzących z ekstraktów erytrocytów oznaczano stosując detektor radiochemiczny Berthold typ LB 507A z kuwetą przepływową ze stałym scyntylantem, podłączony do systemu chromatograficznego za detektorem z matrycą fotodiodową. Informacje z detektora radiochemicznego analizowano komputerowo korzystając z oprogramowania Turbochrom.

4.6.2. Oznaczanie stężenia nukleotydów, nukleozydów i zasad purynowych przy wykorzystaniu HPLC

Rozdziały były przeprowadzane przy użyciu kolumny analitycznej o wymiarach 0,46x15 cm z wypełnieniem o typie odwróconej fazy o wielkości ziarna 3 µm firmy Shandon (Hypersil-BDS, C-18). Przed kolumną zainstalowano prekolumnę SecurityGuard firmy Phenomenex wypełnioną złożem C-18 zatrzymującą potencjalne zanieczyszczenia. Zastosowana metoda jest metodą gradientową. Bufor A zawierał 122 mM KH_2PO_4 , 150 mM KCl i 28 mM K_2HPO_4 . Bufor B uzyskiwano dodając 15%

acetonitryl do buforu A. Wielkość przepływu wynosiła 0,9 ml/minutę i miała charakter stały. Termostat utrzymywał stałą temperaturę kolumny (18°C), a ciśnienie wynosiło 160-180 atmosfer. W pierwszej kolejności przeprowadzano rozdział standardów (17 związków), a następnie prowadzono analizy próbek kolejnych. Kolejność elucji była następująca: GTP, GDP, kwas moczowy, kreatynina, GMP, IMP, ATP, ADP, hipoksantyna, ksantyna, AMP, NADP, NAD, adenina, inozyna, guanozyna, adenozyne.

Piki poszczególnych związków analizowano jakościowo porównując czasy retencji na chromatogramach analizowanych próbek z czasami retencji na chromatogramach standardów. Ponadto analizę jakościową pików oparto także na porównaniu spektrum oznaczonych związków ze spektrum standardów.

Analiza ilościowa była oparta o skalibrowaną mieszaninę standardów. Podstawą dla pomiarów było określenie zależności pomiędzy powierzchnią szczytu chromatograficznego badanego związku oraz jego nastrzykniętą ilością. Zależność ta była liniowa w zakresie badanych stężeń dla wszystkich analizowanych związków. Mieszanina standardów używanych do analizy pozwalała na rutynową kontrolę działania HPLC. Stężenie oznaczanych nukleotydów oraz ich katabolitów wyrażano w odniesieniu do objętości erytrocytów.

Pomiary stężeń wszystkich badanych nukleotydów oraz produktów ich degradacji zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUM-ed kierowanym przez prof.dr hab.med. Juliana Świerczyńskiego.

4.7.Odczynniki

Producentem odczynników wykorzystywanych do chromatografii, czyli KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl , acetonitrylu, HClO_4 , K_3PO_4 była firma Merck. Producentem standardów zasad purynowych, nukleozydów oraz nukleotydów, jak również wszystkich

pozostałych odczynników była firma Sigma. Wodę wykorzystywaną podczas przygotowywania buforów do HPLC, jak również do buforu Krebsa-Ringera produkowano dwuetapowo: odwrócona osmoza i molekularny jonowymieniacz. Podczas jej produkcji wykorzystano systemy MiliQ firmy Milipore lub Maxima firmy Elga. Dostawcą adeniny i adenozyiny znakowanych izotopowo o radioaktywności specyficznej 55 mCi/mmol i stężeniu 50 mCi/L była firma Polatom.

4.8. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono korzystając z oprogramowania Microsoft Excel i Statistica. Wyniki przedstawione są jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe. Weryfikacji hipotezy dotyczącej zgodności pomiędzy zbiorem wartości w badanej próbie, a rozkładem normalnym dokonano przy pomocy testu Shapiro-Wilka, natomiast znamienność różnic średnich pomiędzy badanymi grupami wykazano w oparciu o niesparowany lub sparowany test t-studenta. Zależności pomiędzy badanymi parametrami poszukiwano w oparciu o współczynnik korelacji Pearsona. Za różnicę znamienną statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

5. WYNIKI BADAŃ

5.1. Badania ogólne krwi obwodowej, w tym wybrane parametry osocza związane z diagnostyką niedokrwistości, a także określające stopień wydolności nerek i funkcję wątroby.

Najprostszym badaniem laboratoryjnym pozwalającym rozpoznać istniejącą niedokrwistość jest morfologia krwi obwodowej. Stężenie hemoglobiny ($p < 0,001$), podobnie jak liczba erytrocytów ($p < 0,001$) oraz hematokryt ($p < 0,005$) były statystycznie znacząco niższe w grupie dzieci z chorobą nowotworową, aniżeli w grupie dzieci zdrowych. Pomędzy badanymi grupami nie zanotowano istotnych różnic w wielkości wskaźnika średniej objętości krwinki czerwonej (MCV), a odsetek retikulocytów choć w grupie dzieci badanych wykazywał tendencję wzrostową w porównaniu do grupy dzieci kontrolnych, to jednak zmiana ta nie osiągnęła wartości znaczących statystycznie. Wyniki morfologii krwi obwodowej zostały przedstawione w tabeli 4.

W prezentowanej pracy dokonano także pomiarów niektórych parametrów osocza stosowanych w diagnostyce niedokrwistości. Nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami dzieci ani w stężeniu żelaza, ani wolnej hemoglobiny, ani także wolnej bilirubiny. Znacząco wyższe było natomiast stężenie haptoglobiny ($p < 0,02$) oraz ferrytyny ($p < 0,05$) w osoczu dzieci z chorobą nowotworową, aniżeli w osoczu dzieci zdrowych. Wyniki opisanych badań przedstawiono w tabeli 5.

Stężenie sodu było podobne w obu badanych grupach, chociaż stężenie potasu było nieznacznie wyższe w grupie dzieci chorych ($p < 0,05$). Nie zanotowano natomiast pomiędzy badanymi grupami żadnych różnic w stężeniach podstawowych parametrów gospodarki wapniowo-fosforanowej: stężenie wapnia i fosforanu organicznego było w obu grupach zbliżone. Wyniki przedstawiono w tabeli 6.

Wydolność nerek w grupie dzieci z chorobą nowotworową była podobna do wydolności nerek dzieci grupy kontrolnej. Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu kreatyniny. Podobnie wypadła także ocena funkcji wątroby. Nie zanotowano znamienych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami ani w zakresie stężenia transaminaz, ani w zakresie wskaźnika protrombinowego. Istotnie wyższe było natomiast stężenie białka C-reaktywnego w grupie dzieci chorych, aniżeli w grupie dzieci zdrowych. Wyniki badań oceniających wydolność nerek, funkcję wątroby oraz stężenie CRP przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 4

Podstawowe parametry morfologii krwi obwodowej dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

Badany parametr	Hemoglobina g/dl	Erytrocyty mln/ μ l	Hematokryt %	MCV fl	Retikulocyty ‰
Grupa kontrolna (n=19)	13.9 $\pm$ 1.1	5.0 $\pm$ 0.3	40.5 $\pm$ 3.5	83.1 $\pm$ 3.3	9.4 $\pm$ 3.2
Grupa badana (n=58)	12.0 $\pm$ 1.4	4.4 $\pm$ 0.4	36.5 $\pm$ 4.2	80.6 $\pm$ 5.9	14.7 $\pm$ 9.8
Statystyka p	<0.001	<0.001	<0.005	n.s.	n.s.

n.s. – różnica niezamienna statystycznie

Tabela 5

Porównanie wybranych parametrów osocza rutynowo stosowanych w diagnostyce niedokrwistości pomiędzy dziećmi z chorobą nowotworową (Grupa badana), a dziećmi zdrowymi (Grupa kontrolna).

Badany parametr	Żelazo μg/dl	Ferrytyna μg/l	Wolna hemoglobina mg/dl	Bilirubina wolna mg/dl	Haptoglobina g/l
Grupa kontrolna (n=19)	87.5±36.2	19.7±2.1	40.8±22.1	0.6±0.2	0.54±0.32
Grupa badana (n=58)	68.7±42.8	46.7±28.9	34.1±22.4	0.7±0.4	1.86±1.2
Statystyka p	n.s.	<0.05	n.s.	n.s.	<0.02

n.s. – różnica niezamienna statystycznie

Tabela 6

Porównanie stężeń podstawowych parametrów gospodarki sodowo-potasowej oraz wapniowo-fosforanowej pomiędzy dziećmi z chorobą nowotworową (Grupa badana), a dziećmi zdrowymi (Grupa kontrolna).

Badany parametr	Na ⁺ mEq/l	K ⁺ mEq/l	Ca ⁺² mg/dl	PO ₄ ⁻ mg/dl
Grupa kontrolna (n=19)	139±2.3	3.9±0.2	9.7±0.3	4.9±0.3
Grupa badana (n=58)	138±2.7	4.3±0.3	9.6±0.5	4.4±0.7
Statystyka p	n.s.	<0.05	n.s.	n.s.

n.s. – różnica niezamienna statystycznie

Tabela 7

Podstawowe parametry określające stopień wydolności nerek, funkcję wątroby oraz stężenie białka C-reaktywnego u dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i u dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

Badany parametr	Kreatynina mg/dl	AspAT I.U.	AlAT I.U.	Wskaźnik protrombinowy %	Białko C-reaktywne mg/l
Grupa kontrolna (n=19)	0.7±0.1	25±9.4	16±8.3	92.5±5.0	0.23±0.11
Grupa badana (n=58)	0.7±0.2	30±17.7	26±25.9	96.4±9.5	9.63±11.5
Statystyka p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<0.01

n.s. – różnica niezamienna statystycznie

5.2. Stężenie nukleotydów adeninowych oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową

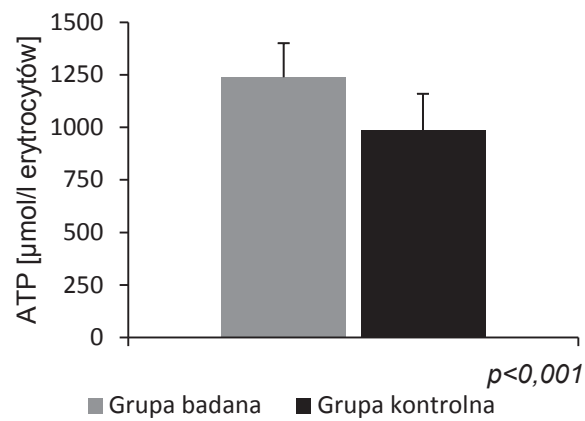
W pracy dokonano pomiarów stężenia nukleotydów adeninowych w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową, a uzyskane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi u dzieci zdrowych. Różnice nie były duże, niemniej wewnątrzerytrocytarne stężenie ATP było o 25% wyższe w grupie badanej, aniżeli w grupie kontrolnej i różnica ta była istotna statystycznie (1238 ± 162 vs. 990 ± 170 $\mu\text{mol/l}$ erytrocytów; $p < 0,001$). Podobne wyniki uzyskano dokonując pomiarów stężenia ADP i AMP. W obu przypadkach stężenie tych nukleotydów było znamienne wyższe w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową, aniżeli w erytrocytach dzieci zdrowych. Wyniki przedstawiono graficznie na wykresie 2. Warto podkreślić, że zaobserwowano także znamienne statystycznie pozytywną korelację pomiędzy stężeniem adeniny w surowicy, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP ($r = 0,32$, $p < 0,01$). Nie obserwowano takiej korelacji pomiędzy wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP, a stężeniem adenozyiny w surowicy. Krzywą korelacji przedstawiono na wykresie 3.

Proces syntezy ATP w erytrocytach jest przede wszystkim wynikiem efektywnie przebiegającej glikolizy, a jej sprawność jest zależna między innymi od odpowiedniej podaży dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD) - koenzymu wielu oksydoreduktaz. W ramach niniejszej pracy dokonano pomiarów wewnątrzerytrocytarnego stężenia NAD oraz NADP w erytrocytach dzieci z grupy badanej i grupy kontrolnej. Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu NAD i NADP pomiędzy badanymi grupami. Wyniki przedstawiono graficznie na wykresie 4.

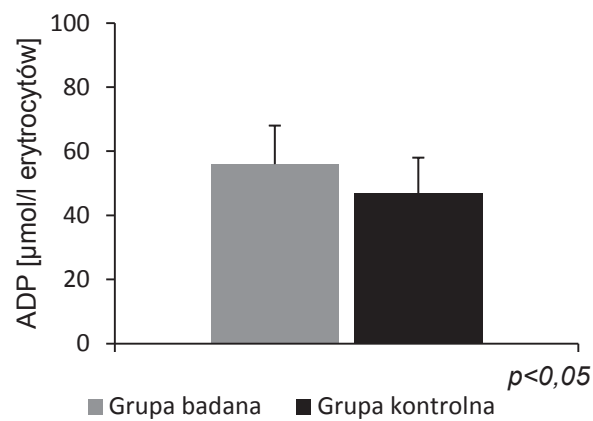
Wykres 2

Porównanie stężenia ATP (A), ADP (B) oraz AMP (C) w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

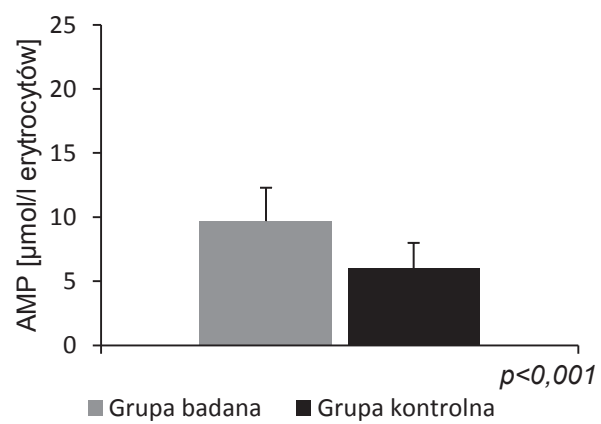
A)



B)

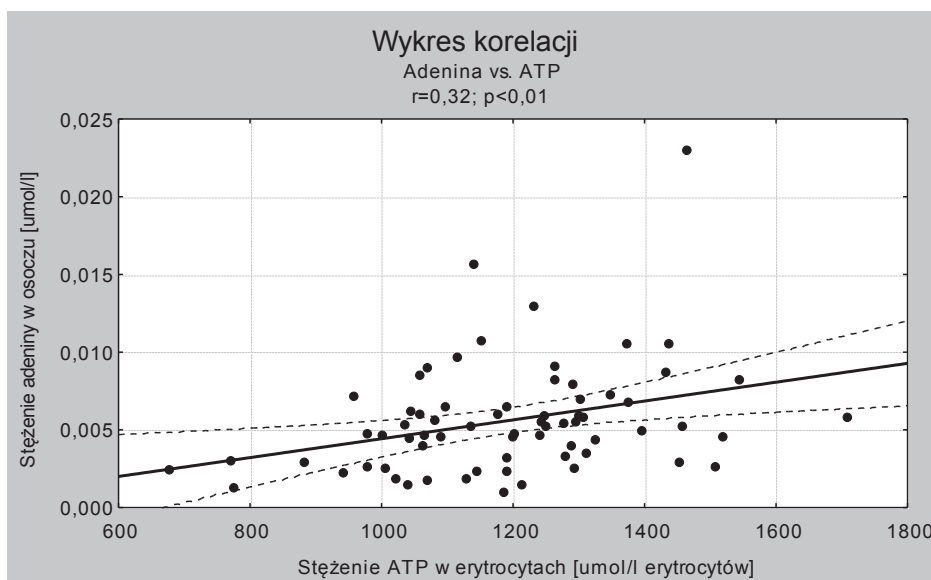


C)



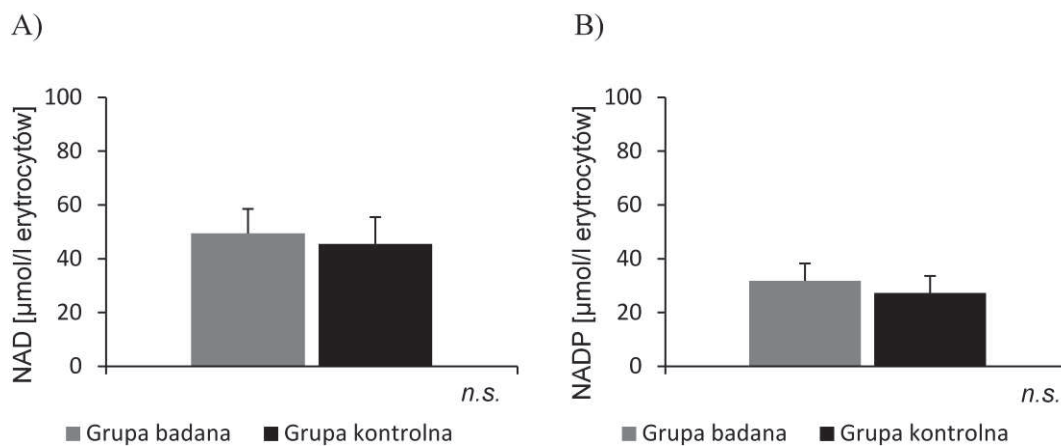
Wykres 3

Krzywa zależności pomiędzy stężeniem adeniny w osoczu, a stężeniem ATP w erytrocytach.



Wykres 4

Porównanie stężenia NAD (A) oraz NADP (B) w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).



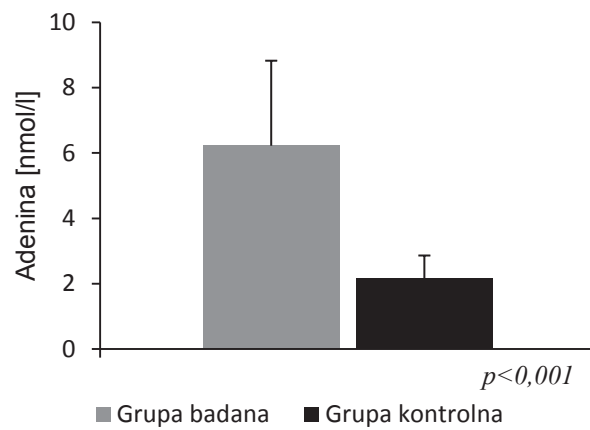
5.3. Stężenie adeniny i adenozyiny w osoczu dzieci z chorobą nowotworową

W warunkach prawidłowych adenina, a zwłaszcza adenozyina odgrywają kluczową rolę w wewnątrzerytrocytarnej syntezie nukleotydów adeninowych. Są donorami pierścienia purynowego, bez którego synteza tych związków byłaby niemożliwa. Stężenie adeniny było prawie trzykrotnie wyższe w osoczu dzieci z chorobą nowotworową w porównaniu z dziećmi zdrowymi ($6,2 \pm 2,8$ vs. $2,1 \pm 1,0$ nmol/l; $p < 0,001$). Nie zaobserwowano natomiast istotnej różnicy w osoczym stężeniu adenozyiny pomiędzy badanymi grupami. Wyniki opisanych badań przedstawiono graficznie na wykresie 5.

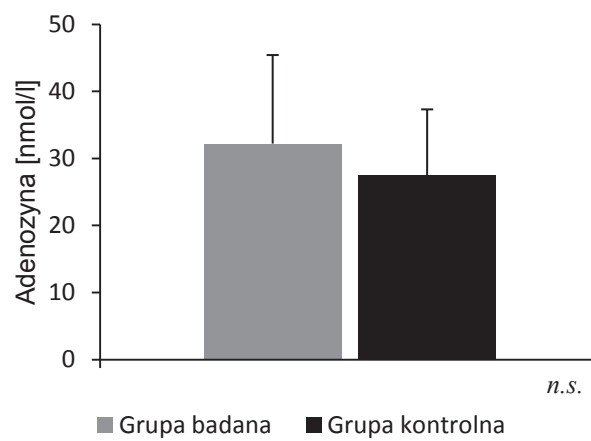
Wykres 5

Porównanie stężenia adeniny (A) i adenozyiny (B) w osoczu dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

A)



B)



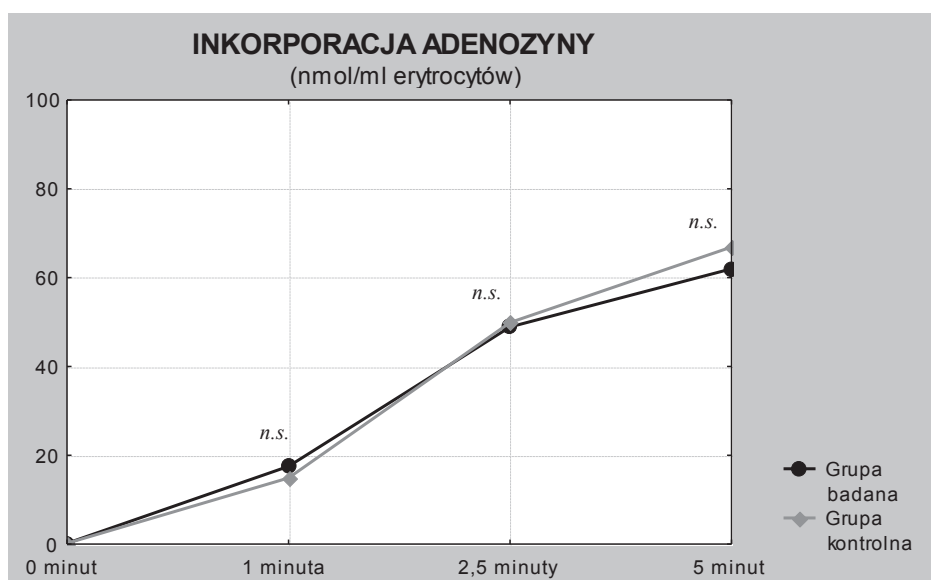
5.4.Szybkość inkorporacji radioaktywnej adeniny i adenozyiny do wewnątrzerytrocytarnej puli nukleotydów adeninowych dzieci z chorobą nowotworową i dzieci zdrowych.

W niniejszej pracy przeprowadzono także badania oceniające szybkość wbudowywania się znakowanej izotopowo adeniny i adenozyiny do wewnątrzerytrocytarnej puli nukleotydów adeninowych. Nie zaobserwowano istotnej różnicy w szybkości wbudowywania się radioaktywnej adenozyiny do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów pomiędzy dziećmi z chorobą nowotworową i dziećmi zdrowymi. Oczekiwanej różnicy nie obserwowano na żadnym z trzech badanych punktów czasowych (1 minuta, 2,5 minuty, 5 minut od rozpoczęcia eksperymentu). Krzywą inkorporacji adenozyiny przedstawiono na wykresie 6.

Zanotowano natomiast wyraźną różnicę w szybkości inkorporacji adeniny do puli nukleotydów adeninowych zawartych w erytrocytach. Aktywność tego procesu była wyraźnie wyższa u dzieci z chorobą nowotworową w porównaniu do dzieci zdrowych. Różnica znamionna statystycznie wystąpiła już po 5 minutach ($p < 0,03$) i była widoczna także w 10 minucie ($p < 0,01$) oraz w 30 minucie ($p < 0,01$) trwania tego procesu. Krzywą inkorporacji adeniny przedstawiono na wykresie 7.

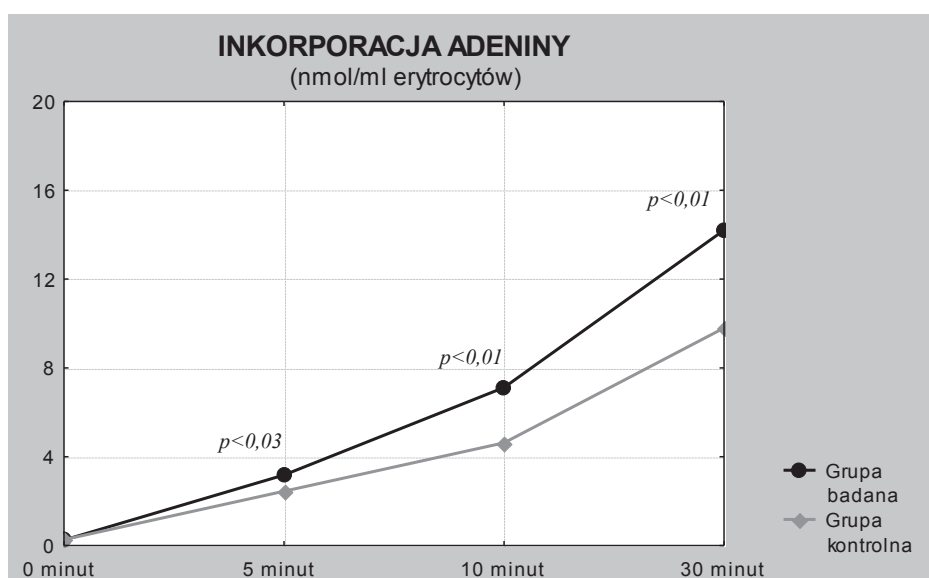
Wykres 6

Porównanie szybkości inkorporacji radioaktywnej adenozyyny do puli nukleotydów adeninowych w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).



Wykres 7

Porównanie szybkości inkorporacji radioaktywnej adeniny do puli nukleotydów adeninowych w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).



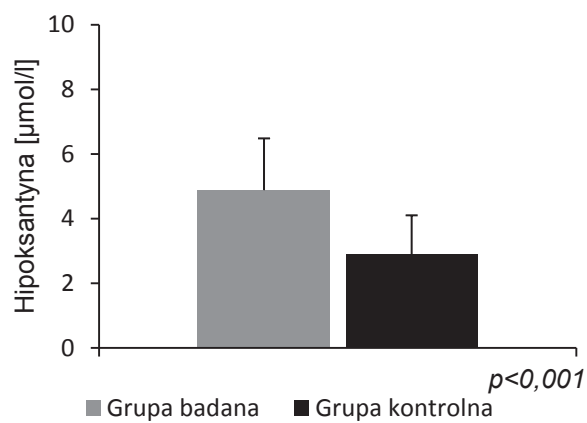
5.5. Stężenie produktów degradacji nukleotydów adeninowych w erytrocytach i w osoczu oraz metabolitów dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w osoczu dzieci z chorobą nowotworową w porównaniu do dzieci zdrowych.

Z uwagi na brak aktywności oksydazy ksantynowej, degradacja nukleotydów adeninowych w erytrocycie ludzkim kończy się na etapie hipoksantyny. Jej stężenie w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową było o 70% wyższe, aniżeli w erytrocytach dzieci grupy kontrolnej ($4,9 \pm 1,6$ vs. $2,9 \pm 1,2$ $\mu\text{mol/l}$). Różnica ta była istotna statystycznie ($p < 0,001$). Natomiast w osoczu, obok hipoksantyny obecne są także pozostałe produkty degradacji nukleotydów adeninowych, czyli ksantyna i kwas moczowy. W osoczu dzieci chorych występują one w znamienne statystycznie wyższych stężeniach w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Dotyczy to zarówno hipoksantyny ($5,8 \pm 1,9$ vs. $4,4 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$), jak i ksantyny ($1,1 \pm 0,5$ vs. $0,7 \pm 0,3$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,005$) oraz kwasu moczowego ($144 \pm 30,9$ vs. $118 \pm 25,4$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$). Omawiane wyniki przedstawiono graficznie na wykresie 8 oraz 9.

Degradacja NAD jest w dominującym stopniu wynikiem działania polimerazy poli(ADP-rybozy) – enzymu jądrowego, a tym samym niewystępującego w dojrzałym erytrocycie. Dlatego też metabolity NAD oznaczono jedynie w osoczu. U dzieci z chorobą nowotworową stwierdzono dwukrotnie wyższe osoczowe stężenie nikotynamidu w porównaniu do dzieci zdrowych ($0,092 \pm 0,04$ vs. $0,048 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$) i różnica ta była znamienna statystycznie. Także stężenia końcowych produktów degradacji NAD były notowane w osoczu dzieci chorych w znamienne wyższych stężeniach, aniżeli w osoczu dzieci zdrowych. Wyższe było zarówno stężenie N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu ($1,34 \pm 0,88$ vs. $0,67 \pm 0,24$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,005$), jak również stężenie N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu ($0,44 \pm 0,16$ vs. $0,26 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$). Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie 10.

Wykres 8

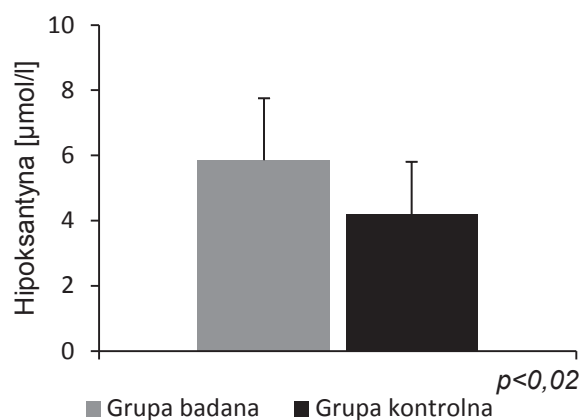
Porównanie stężenia hipoksantyny w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).



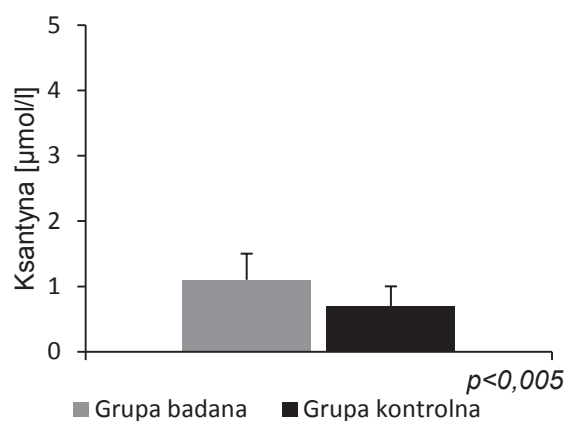
Wykres 9

Porównanie stężenia produktów degradacji nukleotydów adeninowych: hipoksantyny (A), ksantyny (B) oraz kwasu moczowego (C) w osoczu dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

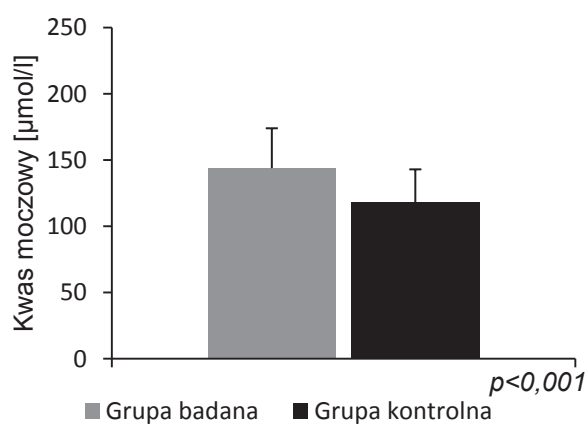
A)



B)



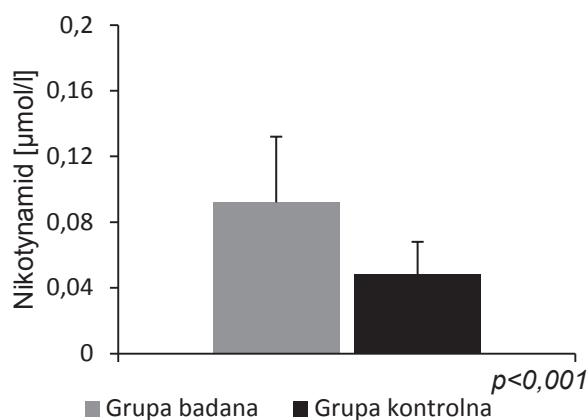
C)



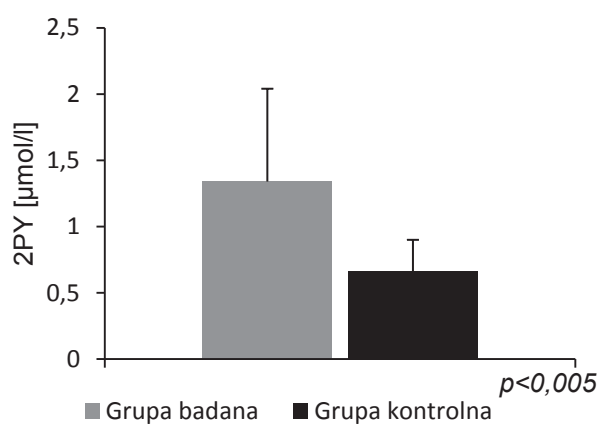
Wykres 10

Porównanie stężenia produktów degradacji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego: nikotynamidu (A), N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (B) oraz N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (C) w osoczu dzieci z chorobą nowotworową (Grupa badana) i dzieci zdrowych (Grupa kontrolna).

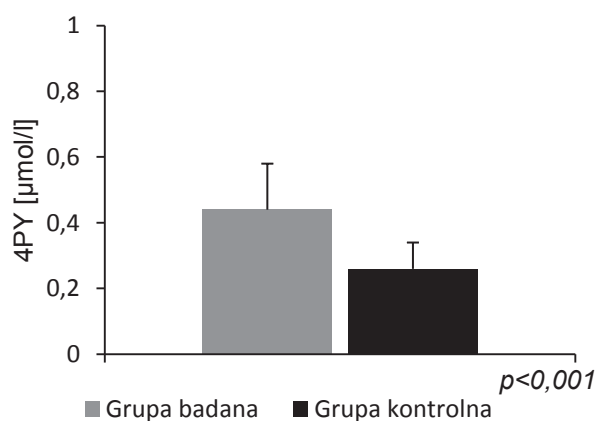
A)



B)



C)



6. DYSKUSJA

Obecność nukleotydów adeninowych w ludzkiej krwi udokumentowano po raz pierwszy już w 1914 roku, ale dopiero badania przeprowadzone ponad 20 lat później przez Buell dowiodły, że są one obecne w erytrocytach i pozwoliły na ich ogólną ocenę ilościową [14]. W swoich badaniach dokonała ona pomiarów wykorzystując metodę nefelometryczną. Na początku lat pięćdziesiątych jej wyniki badań potwierdziła grupa badaczy kierowana przez Albaum. Grupa ta korzystała już z metody spektrofotometrycznej [4] i jako pierwsza przedstawiła wyniki zawartości we krwi niektórych postaci nukleotydów adeninowych. Od lat 70-tych podstawową metodą wykorzystywaną do pomiarów stężenia nukleotydów jest wysokosprawna chromatografia ciekowa (HPLC) [26]. Jest ona oceniana jako metoda najlepsza i najbardziej efektywna. Dlatego właśnie tę metodę wykorzystano do pomiarów w niniejszej pracy.

W erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową zanotowano podwyższone stężenie nukleotydów adeninowych. Nie znaleziono potwierdzenia tej obserwacji w dostępnym piśmiennictwie. Może to wynikać z faktu, że opublikowane dane dotyczą badań w większości sprzed wielu lat i obejmują populacje ludzi dorosłych [72,97,114,120]. Wyniki przedstawione w tych publikacjach nie są jednoznaczne, jednak przeważa pogląd, że stężenie nukleotydów adeninowych, zwłaszcza ATP w erytrocytach pacjentów z chorobą nowotworową ulega raczej obniżeniu. To oczywiście wynik odmienny od uzyskanego w niniejszej pracy. Trudno wyjaśnić tę rozbieżność. Nie można na przykład próbować jej wyjaśniać zastosowaną metodą pomiaru. Stocchi *i wsp.*, którzy w swojej pracy zanotowali 27% spadek stężenia ATP w erytrocytach pacjentów z guzami litymi dokonywali pomiarów także korzystając z wysokosprawnej chromatografii ciekowej [114]. Czy jest możliwym, aby obserwowana różnica

wynikała z odmiennego wieku biorących udział w badaniu (dorośli i dzieci)? Innymi słowy, czy jest możliwym, aby w obliczu choroby nowotworowej erytrocyt dziecka reagował inaczej, aniżeli erytrocyt osoby dorosłej? Aktualnie jedynie wiadomo, że istnieją różnice w przemianach nukleotydów purynowych, a także pirymidynowych w zależności od wieku, co jest najpewniej wyrazem zwiększonego obrotu nukleotydami w dojrzewających organizmach [123]. Z wiekiem zmienia się także metabolizm samej krwinki czerwonej, w tym także w zakresie przemian adenylanów [69,90]. Dowiedziono nawet istnienia negatywnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjenta, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP [90]. Nie można tym samym wykluczyć, że to właśnie różnice w przemianach metabolicznych pomiędzy erytrocytem dziecka, a osoby dorosłej przyczyniły się do uzyskania w niniejszej pracy wyników odmiennych od tych, które uzyskali w zakresie wewnątrzerytrocytarnego stężenia adenylanów inni badacze. Co więcej, za słusznością takiego rozumowania przemawia spójność pozostałych uzyskanych przeze mnie wyników: podwyższone stężenie adeniny w osoczu dzieci z chorobą nowotworową, przyspieszona inkorporacja adeniny do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów oraz pozytywna korelacja pomiędzy osoczym stężeniem adeniny i wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP.

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że podwyższone stężenie nukleotydów adeninowych w krwince czerwonej dzieci z chorobą nowotworową może być przynajmniej w części wynikiem zwiększonej ich biosyntezy. Jak już wspomniałam wcześniej, dojrzały erytrocyt pozbawiony jądra komórkowego nie posiada zestawu enzymów, które pozwoliłyby na wewnątrzerytrocytarną syntezę ATP *de novo* [70]. Biosynteza nukleotydów adeninowych jest możliwa jedynie dzięki reutilizacji pierścienia purynowego [30,31]. Reutilizacji, której efektem jest synteza ATP podlega przede wszystkim adenozyne lub adenina. Powszechnie uważa się, że w warunkach

fizjologicznych podstawowym donorem pierścienia purynowego niezbędnego do syntezy ATP jest adenozyzna, która wbudowywuje się do erytrocyta kilkunastokrotnie szybciej aniżeli adenina [29,30,81]. Jednakże wyniki niniejszej pracy nie pozwalają uznać adenozyzny, jako czynnika sprzyjającego zwiększonej biosyntezie ATP w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową. Stężenie adenozyzny w osoczu grupy badanej, jak również szybkość jej inkorporacji do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów były podobne jak w grupie dzieci zdrowych. Tym samym mało prawdopodobnym jest, aby to adenozyzna była źródłem dodatkowych ilości pierścienia purynowego niezbędnego do nasilonej biosyntezy ATP w krwince czerwonej w czynnej chorobie nowotworowej.

Wiele natomiast przemawia za tym, że to adenina jest tym źródłem i że to właśnie ta purynowa zasada jest wykorzystywana przez erytrocyt do zwiększonej biosyntezy ATP. Co za tym przemawia? Po pierwsze, przeprowadzone badania dowodzą, że stężenie adeniny w osoczu dzieci z chorobą nowotworową jest istotnie wyższe, aniżeli w osoczu dzieci zdrowych. Przyczyna tego stanu nie została w niniejszej pracy jednoznacznie ustalona. Obserwowany wzrost mógłby być wynikiem zarówno jej zwiększonej produkcji, upośledzonej degradacji albo zmniejszonego jej wydalania. Funkcja nerek w obu grupach była prawidłowa, średnie stężenie kreatyniny w osoczu grupy badanej było niskie i porównywalne z wynikiem uzyskanym w grupie kontrolnej. I chociaż liczne prace dowodzą, że adenina rzeczywiście gromadzi się w surowicy pacjentów z niewydolnością nerek [75,110], to jednak w niniejszej pracy, biorąc pod uwagę przedstawione wyniki przyczyną obserwowanego wzrostu stężenia adeniny nie jest raczej zmniejszone jej wydalanie z moczem. Jest natomiast wysoce prawdopodobnym, że przyczyną wysokiego stężenia adeniny jest jej nadmierna produkcja. Jak już wspomniano wcześniej, adenina powstaje praktycznie wyłącznie w

procesie biosyntezy poliamin, który to proces zachodzi we wszystkich komórkach, tkankach i narządach organizmu. Poliaminy biorą czynny udział we wzroście, dojrzewaniu i proliferacji komórek [55,88,116]. W niniejszej pracy nie badano ani aktywności biosyntezy poliamin, ani nie badano stężenia poliamin w płynach ustrojowych. Niemniej, choroba nowotworowa jest jedną z tych patologii, w przebiegu których aktywność biosyntezy poliamin jest zwiększona. Zwiększona synteza poliamin, a zwłaszcza ich wewnątrzkomórkowa kumulacja jest cechą charakterystyczną aktywnych procesów nowotworowych, w których dochodzi do niekontrolowanego rozrostu masy guza. Obserwowano wysokie stężenia poliamin między innymi w guzach mózgu, nerek, prostaty, jelit, macicy, piersi, a wzrastające ich stężenie jest postrzegane jako zapowiedź nawrotu choroby lub pojawienia się zmian przerzutowych [6,51,60,82,84,98]. Co więcej, przedmiotem szczegółowych dyskusji jest, czy zwiększona biosynteza poliamin jest odpowiedzialna za potencjał rozrostowy guza. Ich efektem są między innymi prace doświadczalne i kliniczne z zastosowaniem związków hamujących syntezę poliamin w chorobach nowotworowych. Wyniki tych prac nie są jak dotąd zadowalające. Stosowane związki (najlepiej przebadany jest inhibitor dekarboksylazy ornityny – DFMO) nie są dostatecznie skuteczne w terapii przeciwnowotworowej [78]. Niemniej, nadprodukcja poliamin towarzysząca chorobie nowotworowej może być przyczyną zwiększonego stężenia adeniny, która tym samym może być wykorzystywana jako substrat do nasilonej wewnątrzerytrocytarnej syntezy adenylanów.

Po drugie, badania z wykorzystaniem adeniny znakowanej izotopowo pokazują, że podlega ona inkorporacji do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów istotnie szybciej w przypadku dzieci z chorobą nowotworową, aniżeli u dzieci zdrowych. Nie wiemy, czy to pierwotnie nadprodukcja adeniny towarzysząca chorobie nowotworowej

sprzyja jej zwiększonej inkorporacji do wnętrza erytrocyta i tym samym wtórnie działa stymulująco na biosyntezę ATP, czy też pierwotne zaburzenia przemian w obrębie krwinki czerwonej wymagają zwiększonej ilości ATP, co w sprzyjających warunkach wtórnie wymusza zwiększony dowóz substratu zawierającego pierścień purynowy niezbędny do jego syntezy. Ale fakt, że zaobserwowano różnicę w szybkości inkorporacji adeniny do erytrocytów dzieci chorych i dzieci zdrowych pomimo tego, że były one poddane temu samemu stężeniu radioaktywnej adeniny bardziej przemawia za tym drugim mechanizmem. Należy przypuszczać, że to jednak zmiany w samym erytrocycie spowodowane chorobą nowotworową wymuszają mechanizmy pozwalające mu na zwiększoną produkcję energii niezbędnej do zachowania integralności komórki w stanie choroby. W dostępnym piśmiennictwie nie ma publikacji, które opisywałyby szybkość inkorporacji związków zawierających pierścień purynowy do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów w obliczu choroby nowotworowej. Są natomiast opublikowane wyniki badań dotyczących tej problematyki, a przeprowadzonych u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN). W obrazie tej choroby także notuje się wysokie stężenie ATP w erytrocytach i tam również obserwuje się wysokie stężenie adeniny w osoczu oraz zwiększoną szybkość jej inkorporacji do wewnątrzerytrocytarnej puli nukleotydów adeninowych [75,100,110]. Jednak mechanizmy prowadzące do wzrostu stężenia adeniny w osoczu chorych z PNN są bardziej złożone. Tu także dochodzi najpewniej do jej nadprodukcji wynikającej z nasilonej biosyntezy poliamin, ale dodatkowo istotny, a być może decydujący wpływ na jej stężenie w osoczu ma upośledzone jej wydalanie spowodowane postępującym spadkiem filtracji kłębuszkowej [109,110]. W efekcie, wobec dodatkowo utrzymującej się w warunkach PNN kwasicy metabolicznej i hyperfosfatemii, które działają stymulująco na wewnątrzerytrocytarną biosyntezę fosforybozylpirofosforanu (PRPP) i

aktywność fosforybozylotransferazy adeninowej (APRT-azy, enzymu katalizującego reakcję powstawania AMP z adeniny i PRPP [8,10]), zachowane są optymalne warunki do zwiększonej inkorporacji adeniny do wewnątrzerytrocytarnej puli nukleotydów adeninowych. Wprawdzie u dzieci z chorobą nowotworową biorących udział w niniejszym badaniu nie obserwowano cech niewydolności nerek, a tym bardziej kwasicy metabolicznej, czy hiperfosfatemii, to jednak nie można nie dostrzec pewnego podobieństwa pomiędzy tymi zespołami chorobowymi, zwłaszcza w kontekście przemian nukleotydów adeninowych. W obu przypadkach choroba podstawowa ma charakter przewlekły, w obu występuje niedokrwistość w tym także ta spowodowana skróconym czasem przeżycia erytrocytów, w obu obserwuje się podwyższone stężenie ATP w erytrocytach i w obu głównym donorem pierścienia purynowego niezbędnego do zwiększonej produkcji ATP jest nie jak to ma miejsce w warunkach fizjologicznych adenozyne, a adenina. Może u człowieka adenozyne pełni rolę donora pierścienia purynowego tylko dla zaspokojenia podstawowych potrzeb wewnątrzerytrocytarnego obrotu ATP, a adenina odgrywa kluczową rolę w stanach wymagających zwiększonej puli nukleotydów? Taki problem wymaga dalszych badań.

Trzecim czynnikiem przemawiającym za tym, że to właśnie adenina jest związkiem reutilizowanym w celu pozyskania pierścienia purynowego niezbędnego do zwiększonej produkcji ATP jest obecność pozytywnej korelacji pomiędzy osoczym stężeniem adeniny, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP, którą zaobserwowano w niniejszej pracy u dzieci z chorobą nowotworową. Czynnikiem ten jest niewątpliwie dodatkowym elementem pozwalającym podtrzymać wyżej zaprezentowany sposób rozumowania.

Jak wynika z przedstawionych badań, wysokie wewnątrzerytrocytarne stężenie nukleotydów adeninowych obserwowane u dzieci z chorobą nowotworową może być

efektem zwiększonej ich biosyntezy. Ale teoretycznie może być ono także wynikiem upośledzonej ich degradacji. Jak już wcześniej wspomniałam, degradacja adenylanów w krwince czerwonej przebiega dwoma alternatywnymi szlakami i wobec braku aktywności oksydazy ksantynowej końcowym jej produktem jest hipoksantyna. W ludzkim erytrocycie nie powstaje ani ksantyna, ani kwas moczowy. Oznacza to, że produkcja hipoksantyny odzwierciedla aktywność procesu degradacji nukleotydów adeninowych. W niniejszej pracy w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową stwierdzono o 70% wyższe stężenie hipoksantyny, aniżeli w erytrocytach dzieci zdrowych. Jest to wynik w jakimś stopniu zaskakujący. Wiedząc, że u tych pacjentów wewnątrzerytrocytarne stężenie nukleotydów adeninowych jest wysokie, można było zakładać, że ich degradacja będzie raczej upośledzona, a tym samym produkcja hipoksantyny zmniejszona. Zwłaszcza, że wewnątrzerytrocytarny wzrost stężenia dotyczy nie tylko ATP, ale także AMP, który jest naturalnym inhibitorem degradacji adenylanów. Jednak tak nie jest. Oznacza to, że w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową występuje nie tylko zwiększona biosynteza adenylanów, ale również zwiększona ich degradacja, czyli mamy do czynienia ze zwiększonym obrotem całej puli nukleotydów adenylowych, a tym samym pierścienia purynowego. Trudno udzielić odpowiedzi na pytanie, dlaczego tak się dzieje. Jest to jakaś konsekwencja zaburzeń metabolicznych występujących na poziomie erytrocyta w przebiegu choroby nowotworowej u dzieci.

W osoczu dzieci z chorobą nowotworową także zanotowano wyższe stężenie hipoksantyny w porównaniu z dziećmi zdrowymi, ale także wyższe stężenie ksantyny i kwasu moczowego. W osoczu aktywność oksydazy ksantynowej, jak i rejestrowane stężenia produktów degradacji adenylanów są przede wszystkim wynikiem ich uwalniania ze wszystkich komórek organizmu ulegających rozpadowi. Trudno sobie

wyobrazić, aby obserwowany wzrost był wynikiem tylko przenikania powstałej w erytrocytach hipoksantyny do osocza i jej dalszej tam degradacji. Zwłaszcza, że stężenie hipoksantyny w osoczu jest wyższe, aniżeli w erytrocytach. Jest prawdopodobnym, że podwyższone stężenie hipoksantyny i pozostałych produktów degradacji nukleotydów adenylowych jest wynikiem postępującego, spontanicznego rozpadu komórek guza [59,101]. Z rozpadłych komórek uwalniają się kwasy nukleinowe, a ich składowe, w tym nukleotydy adeninowe ulegają dalszej degradacji, której końcowym produktem jest kwas moczowy. Zjawisko to częściej dotyczy pacjentów z nowotworami o wysokiej frakcji proliferacyjnej i dużej masie guza (ostre białaczki, chłoniaki), ale dotyczy także i pacjentów z guzami litymi. W niektórych przypadkach spontanicznemu (występującemu przed rozpoczęciem leczenia) rozpadowi guza towarzyszą wszystkie objawy metaboliczne (hiperurykemia, hiperkaliemia, hiperfosfatemia, hipokalcemia) i kliniczne (drgawki, zaburzenia rytmu, niewydolność nerek) pozwalające rozpoznać klasyczny zespół rozpadu guza [21,54]. Nie można na podstawie jedynie wyższego stężenia kwasu moczowego i potasu w surowicy krwi obserwowanych w niniejszej pracy w grupie dzieci z chorobą nowotworową zdiagnozować u nich pełnego zespołu rozpadu guza, ale obecność tego mechanizmu na pewno należy brać w tym przypadku pod uwagę.

Zwiększony obrót całej puli nukleotydów adeninowych w krwinkach czerwonych dzieci z chorobą nowotworową wiąże się oczywiście ze zwiększonym zużyciem energii, a jej głównym źródłem jest metabolizowana w procesie glikolizy glukoza. Proces ten nie mógłby przebiegać efektywnie, gdyby nie szereg innych związków, w tym między innymi obecność dostatecznej ilości dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) [91,95]. Jest to koenzym odgrywający kluczową rolę w przemianach energetycznych, biorący udział w wielu reakcjach utleniania i redukcji. W niniejszej pracy nie

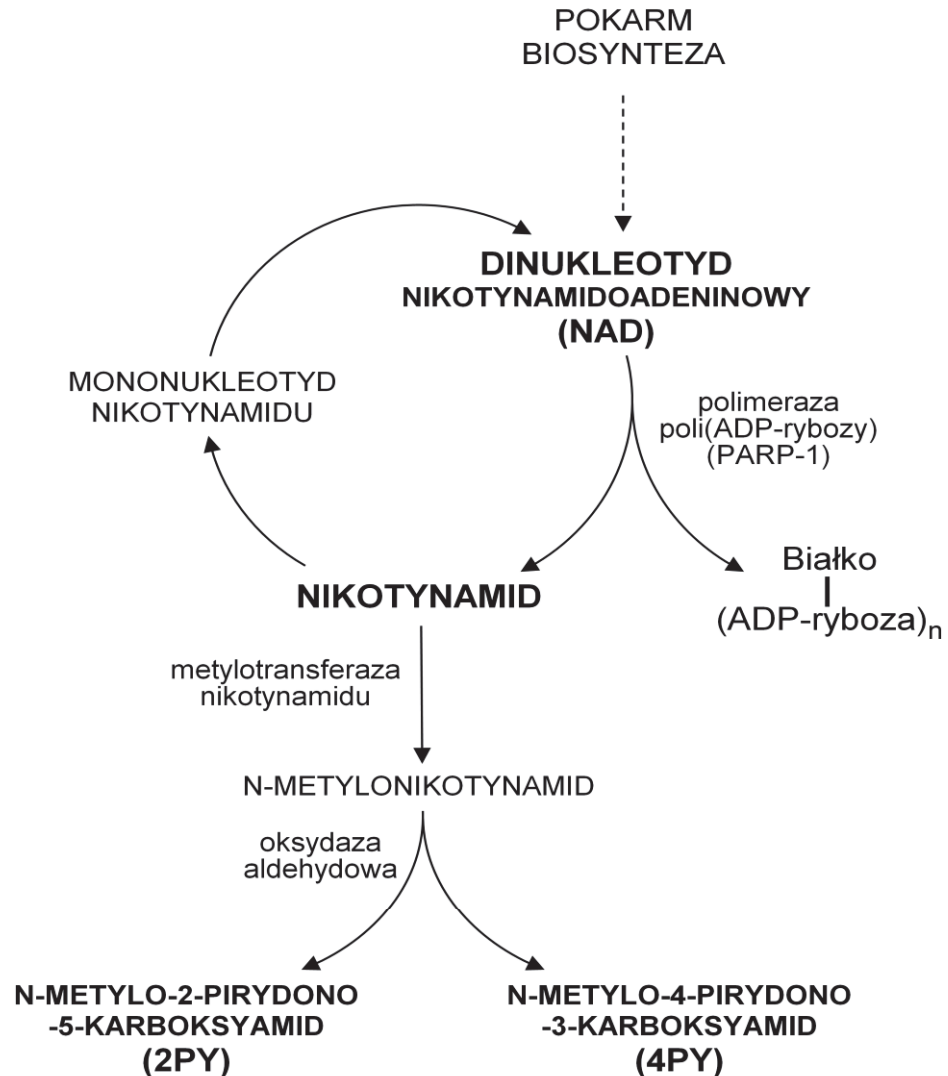
zanotowano różnic w wewnątrzerytrocytarnym stężeniu NAD/NADP pomiędzy grupą dzieci z chorobą nowotworową, a grupą dzieci zdrowych. Takiego wyniku można było się jednak spodziewać, zwłaszcza w komórkach które nie są bezpośrednio objęte procesem nowotworowym. Wewnątrzerytrocytarny system regeneracji NAD jest wysoce efektywny, a jego niewydolność skutkuje zahamowaniem glikolizy, spadkiem stężenia ATP i w efekcie prowadzi do rozpadu komórki.

Podstawową rolą NAD jest oczywiście udział w reakcjach utleniania i redukcji. Ale jest on także substratem dla reakcji poli(ADP-rybozylacji) katalizowanej przez polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) [25,56]. Jest to enzym jądrowy, nieobecny w dojrzałym erytrocycie, odgrywający niezmiernie ważną rolę w każdej komórce. Jest odpowiedzialny za zachowanie integralności genomu komórki [15,58]. Bierze udział w sygnalizacji komórkowej i regulacji szlaków metabolicznych [61], uczestniczy w dekondensacji chromatyny [27], procesach transkrypcji [50,130], replikacji DNA [34], a zwłaszcza jego naprawy [28,43,44,103]. W wyniku reakcji katalizowanej przez PARP-1 cząsteczki ADP-rybozy są sukcesywnie przenoszone na białka docelowe tworząc polimery [25]. Jest to jednocześnie pierwszy, a zarazem kluczowy etap degradacji NAD. W jej następstwie powstaje nikotynamid, podlegający dalszym przemianom do N-metylonikotynamidu i dalej do N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (2PY/Met2PY) oraz N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (4PY/Met4PY), które są wydalone z organizmu z moczem. 2PY oraz 4PY są końcowymi produktami degradacji NAD [68]. Schemat degradacji NAD przedstawiono na rycinie 3.

W niniejszej pracy zaobserwowano dwukrotny wzrost stężenia produktów degradacji NAD w osoczu dzieci z chorobą nowotworową w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Wzrost ten dotyczył zarówno nikotynamidu, jak i jego metabolitów, czyli 2PY i 4PY. W takim przypadku nasuwają się dwa kluczowe pytania: skąd ten wzrost

Rycina 3

Schemat degradacji dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD)



pochodzi i czy ma on jakiegokolwiek znaczenie biologiczne? Wysokie stężenie produktów degradacji NAD obserwowane u dzieci z chorobą nowotworową mogłoby być wynikiem zwiększonej zawartości nikotynamidu w diecie pacjentów. Jednak z racji losowego doboru chorych czynniki te nie mogą mieć w tym przypadku istotnego znaczenia. Wprawdzie dieta spożywana przez obie grupy badane nie podlegała ścisłej

kontroli, to jednak nie wprowadzano żadnych ograniczeń, które mogłyby wpłynąć na charakter uzyskanych wyników. Średni ciężar ciała także był podobny w obu grupach, a to pośrednio wyklucza istotne różnice w wielkości masy mięśniowej. Przeprowadzone dotychczas badania dowodzą także, że produkty degradacji NAD gromadzą się w osoczu pacjentów z niewydolnością nerek [99,108], w tym także u dzieci [107] i że są one w dużej mierze wynikiem postępującego spadku filtracji kłębuszkowej. Jednak w obu badanych grupach nie obserwowano cech niewydolności nerek, a stężenie kreatyniny w surowicy było zbliżone. Wobec powyższego także i tego czynnika nie należy brać pod uwagę jako decydującego o uzyskanych w niniejszej pracy wynikach. Można natomiast założyć, że wysokie stężenie metabolitów NAD w osoczu dzieci z chorobą nowotworową jest wynikiem zwiększonej aktywności PARP-1 i w efekcie reakcji poli(ADP-rybozylacji). Niestabilność genomu wywołana uszkodzeniem DNA jest praktycznie stałym zjawiskiem towarzyszącym chorobie nowotworowej [18,45,76]. Może być zarówno jej przyczyną, jak i jej skutkiem. Gdy uszkodzenia genomu są znaczne wówczas najczęściej dochodzi do przyśpieszonego starzenia się komórki, apoptozy bądź do inicjacji/kontynuacji rozrostu nowotworowego. Natomiast przy niewielkich uszkodzeniach genomu, uruchamiane są różnorodne procesy naprawcze. Jednym z nich jest poli(ADP-rybozylacja) katalizowana przez PARP-1 [25,28,56]. Dowiedziono, że czynniki uszkadzające DNA powodują nawet 500- krotny wzrost aktywności tego enzymu [9,49]. W efekcie, naprawie DNA towarzyszy zwiększona produkcja nikotynamidu i jego metabolitów. To może być główna przyczyna obserwowanego w niniejszej pracy wzrostu stężenia produktów degradacji NAD w osoczu dzieci z chorobą nowotworową.

Trudno powiedzieć, czy obserwowany wzrost stężenia nikotynamidu, czy też 2PY/4PY ma istotne znaczenie biologiczne. Niemniej, nie można zapominać że

produkty degradacji NAD są jednocześnie inhibitorami PARP-1 [7,87,99,107]. Z pozoru jest to zjawisko jednoznacznie niekorzystne, bo przecież PARP-1 biorąc udział w procesach naprawy DNA działa cytoprotekcyjnie. Ale z drugiej strony nadmierna, utrzymująca się zwiększona aktywność PARP-1 podtrzymuje nasiloną degradację NAD, zmniejsza wewnątrzkomórkowe zasoby ATP i tym sposobem może prowadzić do śmierci komórki. W kontekście komórki nowotworowej jest to zjawisko pożądane, dostrzeżone przez badaczy, skutkujące prowadzeniem licznych badań klinicznych wykorzystujących inhibitory PARP w terapii przeciwnowotworowej [19,32,57]. Na umiejętne wykorzystywanie inhibitorów PARP w leczeniu nowotworów będziemy musieli jednak jeszcze poczekać. A twierdzenie, że obserwowany w niniejszej pracy wzrost stężenia inhibitorów PARP-1 jest wynikiem reakcji obronnej organizmu w związku z rozrastającym się guzem jest na tym etapie badań absolutnym nadużyciem, zwłaszcza że notowane ich stężenia w osoczu choć dwukrotnie wyższe, niż w grupie kontrolnej to jednak nadal wyraźnie niższe od tych, które w warunkach *in vitro* wywołują istotny efekt biologiczny [107]. Raczej należy przyjąć, że jest to wynik nasilonej poli(ADP-rybozylacji) towarzyszącej toczącej się chorobie nowotworowej. Warto jednak podkreślić, że w niniejszej pracy obserwowano wzrost stężenia kilku inhibitorów PARP-1 (nikotynamid, 2PY, 4PY), a ponieważ są one chemicznie pokrewne, ich hamujący wpływ na PARP-1 może być skumulowany.

Czy uzyskane w niniejszej pracy wyniki, zwłaszcza te dotyczące wewnątrzerytrocytarnych zaburzeń przemian nukleotydów adeninowych mają związek z towarzyszącą chorobie nowotworowej niedokrwistością? Choć niewiele za tym przemawia, to jednak nie można tego wykluczyć. Jest wiele powodów, dla których u dzieci z chorobą nowotworową rozwija się niedokrwistość, a hemoliza wewnątrznaczyniowa jest powszechnie uznawana za jeden z nich. Prowadzone badania

miały na celu ujawnienie potencjalnych mechanizmów, które na poziomie molekularnym mogłyby wpływać na skrócenie czasu przeżycia krwinki czerwonej, a tym samym przyczyniających się do ich przedwczesnego rozpadu. Nie jest to zadanie łatwe, a dobrana populacja tym bardziej tego zadania nie ułatwiła. Wprawdzie u dzieci z chorobą nowotworową obserwowano istotnie niższe parametry morfologii krwi obwodowej, to jednak w porównaniu z grupą kontrolną różnice te nie były bardzo duże. Udowodnienie bezpośredniego związku pomiędzy istniejącymi wewnątrzerytrocytarnymi zaburzeniami przemian adenylanów, a niedokrwistością jest zadaniem niezmiernie trudnym. Łatwiej jest przyjąć, że zwiększony (wymuszony?) obrót całej puli nukleotydów adeninowych może się do niej przyczyniać, ale nie że jest jej istotą. Zwłaszcza, że nasilenie biosyntezy ATP sięga 20%, a szpik ludzki potrafi zwiększyć aktywność erytropoezy kilkukrotnie [77].

Analiza uzyskanych w niniejszej pracy wyników dotyczących wybranych parametrów osocza rutynowo stosowanych w diagnostyce hemolizy w zasadzie w ogóle nie pozwala na potwierdzenie jej istnienia. A już na pewno nie pozwala na wysunięcie żadnego jednoznacznego wniosku. Ale w rzeczywistości, wniosków takich też i nie oczekiwano. Jak już kilkakrotnie podkreślałam, niedokrwistość w chorobie nowotworowej ma charakter wieloczynnikowy i trudno było się spodziewać, aby analiza tych kilku parametrów, zwłaszcza w przypadku niezaawansowanej niedokrwistości udzieliła jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o jej etiologię. Przeprowadzone badania miały raczej pokazać, czy u dzieci z chorobą nowotworową można zaobserwować charakterystyczne zmiany stężenia wskaźników typowych dla wewnątrznaczyniowej hemolizy. Jak wynika z przedstawionych wyników - nie można. Stężenie żelaza jest w obu grupach podobne. Jego średnie stężenie jest wprawdzie niższe w grupie dzieci chorych (co można by uznać za jedną z przesłanek

pozwalających na doszukiwanie się niedokrwistości chorób przewlekłych), jednak różnica ta nie osiągnęła wartości znamiennej statystycznie. Przeciwnie istotnej hemolizie wewnątrznaczyniowej świadczą też wyniki stężenia w osoczu wolnej hemoglobiny i wolnej bilirubiny. Nie zanotowano różnic w stężeniu tych markerów pomiędzy badanymi grupami, a przecież trudno rozpoznać znaczącą hemolizę bez podwyższonego stężenia zarówno wolnej hemoglobiny, czy też wolnej bilirubiny. Co więcej, w grupie dzieci chorych obserwowano ponad 2-krotnie wyższe stężenie ferrytyny, a przede wszystkim ponad 3-krotnie wyższe stężenie haptoglobiny w osoczu. Jest to wynik, który w swej istocie mógłby praktycznie wykluczyć możliwość istotnego wewnątrznaczyniowego rozpadu erytrocytów. Jak powszechnie wiadomo, haptoglobina jest białkiem produkowanym w wątrobie, którego podstawową rolą jest wychwyt i nieodwracalne wiązanie wolnej hemoglobiny pojawiającej się we krwi z rozpadłych erytrocytów. Tworzy wraz z nią kompleks, który jest fagocytowany i rozkładany w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. W pewnym sensie białko to chroni organizm przed nadmierną utratą żelaza (kompleks haptoglobina-wolna hemoglobina nie ulega filtracji kłębuszkowej), jak i przed toksycznym uszkodzeniem narządów spowodowanym wysokim jego stężeniem. W efekcie, w ostrej hemolizie obserwuje się znaczny spadek stężenia haptoglobiny w osoczu i jest to wynik całkowicie odmienny od obserwowanego w niniejszej pracy [64]. Jednak haptoglobina oprócz tego, że jest bardzo dobrym markerem hemolizy, jest także pozytywnym białkiem ostrej fazy. Pozytywnym, czyli takim którego stężenie w osoczu w odpowiedzi na toczący się proces zapalny w ustroju rośnie [39,63]. Do grupy tych białek należy także ferrytyna. Oznacza to, że obserwowane zmiany stężenia tych parametrów nie muszą zaprzeczać istnieniu wewnątrznaczyniowej hemolizy, bo mogą być następstwem toczącego się lokalnie i/lub ogólnoustrojowo stanu zapalnego towarzyszącego chorobie

nowotworowej. I tak jest najpewniej w tym przypadku, o czym świadczy obserwowane także w grupie badanej wysokie stężenie białka C-reaktywnego (CRP). Wysokie stężenie CRP w chorobie nowotworowej jest zjawiskiem obserwowanym przez wielu badaczy [35,79,86]. Wiele jest przekonanych, że zmiany stężenia CRP są zależne od wielkości guza i stopnia zaawansowania choroby, w tym obecności zmian przerzutowych [42]. Nowotwór jest czynnikiem uszkadzającym struktury tkankowe, wyzwalającym miejscowy odczyn zapalny. Gromadzące się w miejscu uszkodzenia limfocyty, a przede wszystkim monocyty/makrofagi wydzielają cytokiny prozapalne (czynniki martwicy nowotworów: TNF α i TNF β ; interleukiny: 1, 6, 8), które indukują syntezę szeregu białek wspólnie określanych mianem białek ostrej fazy [52]. Ich rolą jest opanowanie toczącego się stanu zapalnego i przywrócenie homeostazy. CRP odgrywa w tym procesie ważną rolę i jest ona dobrze udokumentowana. Tworzy ono kompleksy z uszkodzonymi elementami komórek i pośredniczy w ich eliminacji poprzez aktywację układu dopełniacza, nasilenie procesu opsonizacji i fagocytozy [113,125]. W ten sposób bierze czynny udział w procesach naprawczych. Jednak o ile wzrost stężenia i aktywności białek ostrej fazy w typowych stanach infekcyjnych jest zjawiskiem korzystnym, wręcz pożądanym i w krótkim czasie ulegającym normalizacji, o tyle ocena tej samej reakcji będącej wynikiem stanu zapalnego towarzyszącego chorobie nowotworowej nie jest już taka jednoznaczna. Według wielu autorów przewlekły stan zapalny obecny w przebiegu choroby nowotworowej i towarzysząca mu reakcja ostrej fazy o umiarkowanym nasileniu przyczyniają się do rozwoju wielu niekorzystnych zjawisk, w tym między innymi do rozwoju zespołu wyniszczenia nowotworowego [3,118]. Niedokrwistość jest oczywiście także jego stałym elementem. Niemniej, obserwowane w niniejszej pracy zmiany stężenia ferrytyny, czy haptoglobiny nie są bezpośrednim wynikiem hemolizy, a raczej podobnie jak i wzrost stężenia CRP

są częścią reakcji ostrej fazy stanowiącej odpowiedź organizmu na stan zapalny towarzyszący rozwijającemu się w ustroju nowotworowi.

Nie udało się także znaleźć żadnych korelacji pomiędzy parametrami układu czerwono krwinkowego, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem adenylanów i/lub produktami ich degradacji. Nie oznacza to oczywiście, że wewnątrzerytrocytarne zaburzenia przemian adenylanów nie odgrywają żadnej roli w rozwoju przedmiotowej niedokrwistości. Ale oznacza to, że najpewniej nie ma pomiędzy nimi bezpośredniej zależności statystycznej. Wobec powyższego, w jaki sposób i czy w ogóle można rozpatrywać zaburzenia przemian nukleotydów adeninowych w kontekście niedokrwistości występującej u dzieci z chorobą nowotworową? Elementem, który łączy te zagadnienia i który można brać pod uwagę jest na pewno sprawność działania ATP-azy Na^+/K^+ . Jest to kluczowy enzym błonowy erytrocyta (jak i każdej innej komórki), odpowiadający za utrzymanie jego potencjału błonowego i objętości. Niewydolność tego enzymu skutkuje nieprawidłowym, błonowym gradientem stężeń sodu i potasu, zmianami kształtu komórki i w efekcie jej rozpadem. Sprawność działania ATP-azy Na^+/K^+ jest uzależniona od stałego, niezaburzonego dopływu ATP [105,106]. Aktywność ATP-azy Na^+/K^+ w erytrocytach pacjentów z chorobą nowotworową była przedmiotem wielu badań. Wyniki tych prac nie są jednoznaczne, ale dominuje pogląd że aktywność tego enzymu ulega obniżeniu [13,62,65,124]. Co więcej, istnieją doniesienia, że u chorych z będącą następstwem leczenia remisją choroby aktywność ATP-azy Na^+/K^+ ulega odbudowie [65]. Nie wiadomo, czy spadek aktywności ATP-azy Na^+/K^+ jest wynikiem działania czynników wewnątrz-, czy zewnątrzkrwinkowych. Jedna z hipotez zakłada, że to poliaminy produkowane w nadmiarze u pacjentów z chorobą nowotworową są odpowiedzialne za upośledzenie aktywności tego enzymu [124]. Warto zauważyć, że obniżona aktywność ATP-azy

Na^+/K^+ może być jedną z przyczyn zwiększonego wewnątrzerytrocytarnego stężenia ATP, ale jeżeli hamujący wpływ na jej aktywność jest w dominującym stopniu spowodowany czynnikami zewnątrzkrwinkowymi to być może wewnątrzerytrocytarny wzrost syntezy ATP jest wtórny, kompensacyjny, obronny, konieczny dla zachowania kształtu i integralności komórki. Zwiększona synteza i zużycie ATP jest być może niezbędne dla zachowania prawidłowego funkcjonowania erytrocyta w obliczu choroby nowotworowej, a każdy stan, który burzy tę względną równowagę, każdy zwłaszcza przewlekający się stan zapalny, infekcyjny lub nieinfekcyjny może skutkować niewydolnością tego procesu, przedwczesnym rozpadem erytrocytów i w efekcie przyczyniać się do rozwoju niedokrwistości.

Biorąc pod uwagę przedstawione tu fakty i rozważania, oparte w części na badaniach własnych, a w części wysunięte na podstawie dostępnego piśmiennictwa można stwierdzić, że metabolizm nukleotydów adeninowych jest w erytrocytach dzieci dotkniętych chorobą nowotworową istotnie zaburzony. Zwiększona jest zarówno ich biosynteza, jak i degradacja. Ponadto, w osoczu obserwuje się nasiloną degradację dinukleotydu nikotynamidoadeninowego. Przeprowadzona przeze mnie dyskusja dotycząca zarówno przyczyn, jak i skutków obserwowanych zjawisk na pewno nie jest zakończona. Konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie patogenezy oraz klinicznych następstw omawianych zaburzeń.

7.WNIOSKI

1. W erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową występuje zwiększone stężenie nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP). Stężenie dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) oraz NADP jest podobne jak w grupie dzieci zdrowych.
2. Wysokie wewnątrzerytrocytarne stężenie adenylanów jest najpewniej wynikiem ich zwiększonej biosyntezy, a substratem dla ich zwiększonej biosyntezy jest adenina. Przemawia za tym stwierdzone wysokie osoczowe stężenie adeniny, zwiększona inkorporacja adeniny do puli nukleotydów adeninowych zawartych w erytrocytach oraz pozytywna korelacja pomiędzy osoczym stężeniem adeniny, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP. Osoczowe stężenie adenozyiny, jak i szybkość jej inkorporacji do puli nukleotydów adeninowych w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową jest podobne jak u dzieci zdrowych.
3. W erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową obserwuje się zwiększone stężenie hipoksantyny, końcowego produktu degradacji nukleotydów adeninowych. Oznacza to, że w obliczu tej choroby w erytrocytach występuje zwiększony obrót całej puli adenylanów, a tym samym obrót pierścienia purynowego.
4. W osoczu dzieci z chorobą nowotworową gromadzi się w nadmiarze nikotynamid oraz inne produkty degradacji nukleotydu nikotynamidoadeninowego. Może to być wynikiem zwiększonej aktywności poli(ADP-rybozylacji), jednego z podstawowych procesów odpowiedzialnych za zachowanie integralności genomu komórki, w tym między innymi poprzez naprawę DNA.

5. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących związku pomiędzy wewnątrzerytrocytarnymi zaburzeniami metabolizmu nukleotydów adeninowych, a niedokrwistością obserwowaną u dzieci z chorobą nowotworową.

8. STRESZCZENIE

Choroba nowotworowa jest schorzeniem dotyczącym całego organizmu, w przebiegu którego występują różnego rodzaju zaburzenia metaboliczne. Zaburzenia te można zaobserwować w komórkach większości tkanek, w tym także w erytrocytach. Erytrocyt, podobnie jak każda inna komórka, nie może prawidłowo funkcjonować bez stałej podaży ATP. Dlatego też wszelkie zaburzenia sprzyjające nieprawidłowej syntezie ATP w erytrocytach mogą przyczyniać się do upośledzenia funkcjonowania mechanizmów odpowiedzialnych za jego integralność i skutkować rozpadem, rozwojem niedokrwistości i niedostatecznym utlenowaniem tkanek.

Celem niniejszej pracy była ocena przemian nukleotydów purynowych w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową o utkaniu pozaszpikowym oraz poszukiwanie związku pomiędzy istniejącymi zaburzeniami, a towarzyszącą chorobie niedokrwistością.

Badaniami objęto 58 pacjentów Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii AM w Gdańsku w wieku od 2 do 17 lat, z rozpoznaniem choroby nowotworowej o utkaniu pozaszpikowym (guzy łebe u 43 dzieci i choroba Hodgkina u 15 chorych), w stopniu zaawansowania od II do IV. Badania przeprowadzono przed rozpoczęciem leczenia. Uzyskane wyniki odniesiono do 19-osobowej grupy kontrolnej, którą stanowiły dzieci zdrowe.

W obu badanych grupach wykonano wybrane badania krwi obwodowej (morfologia, elektrolity, wapń, fosforany, białko C-reaktywne), podstawowe badania związane z diagnostyką niedokrwistości (retikulocyty, żelazo, ferrytyna, haptoglobina, wolna hemoglobina, bilirubina), a także określające stopień wydolności nerek (kreatynina) i funkcję wątroby (transaminazy, wskaźnik protrombinowy). Jednak przede wszystkim, korzystając z systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC),

w erytrocytach obu badanych grup oznaczono stężenie nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP) oraz stężenie produktów ich degradacji (hipoksantyna). Oznaczono także osoczowe stężenie adeniny i adenozyiny, związków zawierających pierścień purynowy, którego reutilizacja jest niezbędna do wewnątrzerytrocytarnej syntezy adenylanów oraz korzystając z badań izotopowych określono szybkość ich inkorporacji do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów. Ponadto w erytrocytach obu badanych grup oznaczono stężenie dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD), natomiast stężenie produktów jego degradacji (nikotynamid, Met2PY, Met4PY) oznaczono w osoczu.

U dzieci z chorobą nowotworową stwierdzono statystycznie niższe stężenia erytrocytów, hemoglobiny i hematokrytu, wysokie stężenie CRP świadczące o współistniejącym stanie zapalnym, a także wysokie stężenia innych białek ostrej fazy- ferrytyny i haptoglobiny. W badaniach nie stwierdzono obecności cech typowych dla istotnej hemolizy wewnątrznaczyniowej (niezmienione stężenie wolnej hemoglobiny, bilirubiny, retikulocytozy, podwyższone stężenie haptoglobiny). Nie stwierdzono także nieprawidłowości w funkcjonowaniu nerek i wątroby (prawidłowe stężenie kreatyniny, transaminaz, wskaźnika protrombinowego). W erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową obserwowano natomiast podwyższone stężenie nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP), wysokie osoczowe stężenie adeniny, zwiększoną szybkość jej inkorporacji do wewnątrzerytrocytarnej puli adenylanów, a także pozytywną korelację pomiędzy osoczym stężeniem adeniny, a wewnątrzerytrocytarnym stężeniem ATP. W erytrocytach chorych dzieci zanotowano także wyższe stężenie hipoksantyny, końcowego produktu przemian adenylanów. Wewnątrzerytrocytarne stężenie NAD było podobne w obu badanych grupach, jednak

w osoczu dzieci z chorobą nowotworową stwierdzono statystycznie wyższe stężenia produktów jego degradacji (nikotynamid, Met2PY, Met4PY).

Uzyskane wyniki dowodzą obecności istotnych zaburzeń dotyczących przemian nukleotydów w erytrocytach dzieci z chorobą nowotworową. Wysokie wewnątrzerytrocytarne stężenie adenylanów jest najpewniej wynikiem zwiększonej ich biosyntezy, dla której głównym substratem wydaje się być adenina. Co więcej, wysokie stężenie hipoksantyny obecne w erytrocytach tych dzieci jest dowodem na zwiększony obrót całej puli nukleotydów adeninowych, a tym samym pierścienia purynowego. W osoczu dzieci z chorobą nowotworową gromadzi się w nadmiarze nikotynamid oraz inne produkty degradacji NAD, co może być wynikiem zwiększonej aktywności procesu poli(ADP-rybozylacji). Otrzymane wyniki nie pozwalają jednak na wyciągnięcie ostatecznych wniosków dotyczących związku pomiędzy wewnątrzerytrocytarnymi zaburzeniami przemian nukleotydów adeninowych, a istniejącą niedokrwistością u dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej.

9.PIŚMIENNICTWO

1. Aapro M, Jelkmann W, Constantinescu SN, Leyland-Jones B: Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *Br J Cancer* 2012, 106: 1249-1258
2. Abels RI, Larholt KM, Krantz KD, Bryant EC: Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) for the Treatment of the Anemia of Cancer. *Oncologist* 1996, 1: 140-150
3. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G: Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006, 72: 1605-1621
4. Albaum HG, Cayle T, Shapiro A: Blood levels of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1951, 30: 525-530
5. Balcerska A: Niedokrwistość w chorobie nowotworowej u dzieci. Terapeutyczna rola erytropoetyny. W: Erytropoetyna od odkrycia do zastosowania klinicznego. *Wyd.Med.Medmak* 2001: 241-247
6. Balitskaia OV, Berdinskikh NK, Kononenko NG: The possibilities of using the free polyamines of the peripheral blood as biochemical tumor markers in nephroblastoma in children. *Vopr Onkol* 1992, 38: 674-82
7. Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K: Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 1992, 267: 1569-1575
8. Becker MA, Puig JG, Mateos FA, Jimenez ML, Kim M, Simmonds HA: Inherited superactivity of phosphoribosylpyrophosphate synthetase: association of uric acid overproduction and sensorineural deafness. *Am J Med* 1988, 85: 383-390
9. Benjamin RC, Gill DM: ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. *J Biol Chem* 1980, 255: 10493-10501
10. Berman PA, Black DA, Human L, Harley EH: Oxypurine cycle in human erythrocytes regulated by pH, inorganic phosphate, and oxygen. *J Clin Invest* 1988, 82: 980-986
11. Birgegard G, Aapro MS, Bokemeyer C, Dicato M, Drings P, Hornedo J, Krzakowski M, Ludwig H, Pecorelli S, Schmoll H, Schneider M, Schrijvers D, Shasha D, Van Belle S: Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment. *Oncology* 2005, 68(Suppl 1): 3-11
12. Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, Zwahlen M, Clarke M, Weingart O, Kluge S, Piper M, Rades D, Steensma DP, Djulbegovic B, Fey MF, Ray-Coquard I, Machtay M, Moebus V, Thomas G, Untch M, Schumacher M, Egger M, Engert A: Recombinant human erythropoiesis-

- stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomized trials. *Lancet* 2009, 373: 1532-1542
13. Borg AL, Gallice PM, Kovacic HN, Nicoara AE, Favre RG, Crevat AD: Impairment of sodium pump and Na⁺/H⁺ antiport in erythrocytes isolated from cancer patients. *Cancer Res* 1996, 56: 511-514
 14. Buell MV: The adenine nucleotide content of human blood. I. Determination and content. *J Biol Chem* 1935, 108: 273
 15. Burkle A: Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett* 2001, 163: 1-5
 16. Cao Y: Erythropoietin in cancer: a dilemma in risk therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2013, 24: 190-199
 17. Cartwright GE, Lee GR. The anaemia of chronic disorders. *Br J Haematol* 1971, 21: 147-152
 18. Cassidy LD, Venkitaraman AR: Genome instability mechanisms and the structure of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 2012, 22: 10-23
 19. Chalmers AJ: The potential role and application of PARP inhibitors in cancer treatment. *Br Med Bull* 2009, 89: 23-40
 20. Chang J, Couture F, Young S, McWatters KL, Lau CY: Weekly epoetin alfa maintains hemoglobin, improves quality of life, and reduces transfusion in breast cancer patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005, 23: 2597-2605
 21. Coiffier B, Altman A, Pui CH, Younes A, Cairo MS: Guidelines for the management of pediatric and adult tumor lysis syndrome: an evidence-based review. *J Clin Oncol* 2008, 26: 2767-2778
 22. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD: Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013, 5(Suppl 5): S479-S490
 23. Cross D, Burmester JK: Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 2006, 4: 218-227
 24. Cullis J: Anaemia of chronic disease. *Clin Med* 2013, 13: 193-196
 25. D'Amours D, Desnoyers S, S'Silva I, Poirier GG: Poly(ADP-ribosyl) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999, 342: 249-268
 26. De Abreu RA, Van Baal JM, De Bruyn CH, Bakkeren JA, Schretlen ED: High-performance liquid chromatographic determination of purine and pyrimidine bases, ribonucleosides, deoxyribonucleosides and cyclic ribonucleotides in biological fluids. *J Chromatogr* 1982, 229: 67-75

27. De Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG: Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem* 1986, 261: 7011-7017
28. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Waltztinger C, Chambon P, de Murcia G: Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 7303-7307
29. DeVerdier CH, Ericson A, Niklasson F, Groth T: Erythrocyte metabolism of purines and purine nucleosides during storage and simulated physiological conditions. *Prog Clin Biol Res* 1981, 55: 629-642
30. DeVerdier CH, Ericson A, Niklasson F, Groth T: Purine metabolism of human erythrocytes during storage and physiological conditions. *Acta Biol Med Ger* 1981, 40: 677-682
31. DeVerdier CH, Strauss D, Ericson A, Akerblom O, Hogman CF: Purine metabolism of erythrocytes preserved in adenine, adenine-inosine, and adenine-guanosine supplemented media. *Transfusion* 1981, 21: 397-404
32. Dębska S, Kubicka J, Czyżykowski R, Habib M, Potemski P: Inhibitory PARP – podstawy teoretyczne i zastosowanie kliniczne. *Postepy Hig Med Dosw* 2012, 66: 311-321
33. Dłużniewska A, Balwierz W, Balcerska A, Chybicka A, Kamińska E, Karolczyk G, Karpińska-Derda I, Krawczuk-Rybak M, Kowalczyk JR, Lewandowska D, Maciejka-Kapuścińska L, Kołtano S, Malinowska I, Matysiak M, Mikołajczyk M, Mizia-Malarz A, Muszyńska-Roslan K, Niedźwiedzki M, Pohorecka J, Sikorska-Fic B, Sobol G, Sońta-Jakimczyk D, Tomaszewska R, Urański T, Wachowiak J, Wieczorek M, Wójcik B, Wysocki M: Treatment failure in children with acute myelocytic leukemia: over 25-year experience of Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group with four consecutive unified treatment protocols for childhood acute myelocytic leukemia. *Przegl Lek* 2010, 67: 366-370
34. Eki T: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase alpha, delta and epsilon in vitro. *FEBS Lett* 1994, 356: 261-266
35. Falconer JS, Fearon KC, Ross JA, Elton R, Wigmore SJ, Garden OJ, Carter DC: Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* 1995, 75: 2077-2082
36. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA: Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 1992, 79: 1987-1994
37. Filipczyk L, Król P, Wystrychowski A: Hepcydyna - hormon wątrobowy kontrolujący hemostazę żelaza. *Forum Nefrologiczne* 2010, 3: 233-242

38. Fleming MD: The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology* 2008; 151-158
39. Gabay C, Kushner I: Acute phase protein and other systemic responses to inflammation. *N Eng J Med* 1999, 340: 448-454
40. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, Dimitrova N, Jakab Z, Kaatsch P, Lacour B, Mallone S, Marcos-Gragera R, Minicozzi P, Sanchez-Perez MJ, Sant M, Santaquilani M, Stiller C, Tavilla A, Trama A, Visser O, Peris-Bonet R; EUROCare Working Group: Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCare-5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014, 15: 35-47
41. Glaspy J, Crawford J, Vansteenkiste J, Henry D, Rao S, Bowers P, Berlin JA, Tomita D, Bridges K, Ludwig H: Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *Br J Cancer* 2010, 102: 301-315
42. Göransson J, Jonsson S, Lason A: Pre-operative plasma levels of C-reactive protein, albumin and various plasma protease inhibitors for the pre-operative assessment of operability and recurrence in cancer surgery. *Eur J Surg Oncol* 1996, 22: 607-617
43. Gradwohl G, Mazen A, de Murcia G: Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148: 913-919
44. Gradwohl G, Ménissier de Murcia JM, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JH, de Murcia G: The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 2990-2994
45. Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004, 23: 11-27
46. Green DM, Kun LE, Matthay KK, Meadows AT, Meyer WH, Meyers PA, Spunt SL, Robison LL, Hudson MM: Relevance of historical therapeutic approaches to the contemporary treatment of pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2013, 60: 1083-1094
47. Grotto HZ: Anaemia of cancer: an overview of mechanisms involved in its pathogenesis. *Med Oncol* 2008, 25: 12-21
48. Hadland BK, Longmore GD: Erythroid-stimulating agents in cancer therapy: potential dangers and biologic mechanisms. *J Clin Oncol* 2009, 27: 4217-4226
49. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO: Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Bio. Rev* 2006, 70: 789-829

50. Hassa PO, Hottiger MO: A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 1999, 380: 953-959
51. Hayase R, Eguchi K, Sekiba K: Polyamine levels in gynecologic malignancies. *Acta Med Okayama* 1985, 39: 35-45
52. Heinrich PC, Castell JV, Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990, 265: 621-636
53. Hockel M, Vaupel P: Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 2001, 28 (Suppl 8): 36-41
54. Howard SC, Jones DP, Pui C: The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med* 2011, 364: 1844-1854
55. Igarashi K, Kashiwagi K: Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42: 39-51
56. Jacobson MK, Jacobson EL: Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *TIBS* 1999, 24: 415-417
57. Javle M, Curtin NJ: The potential for poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2011, 3: 257-267
58. Jeggo PA: DNA repair: PARP - another guardian angel? *Curr Biol* 1998, 8: R49-51
59. Kekre N, Djordjevic B, Touchie C: Spontaneous tumour lysis syndrome. *CMAJ* 2012, 184: 913-916
60. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ, Dixon JM: Polyamines in breast cancer. *Br J Surg* 1984, 71: 352-356
61. Kiss L, Szabo C: The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 100 (Suppl 1): 29-37
62. Kolanjiappan K, Manoharan S, Kayalvizhi M: Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta* 2002, 326: 143-149
63. Korczowska I, Hrycaj P, Łacki JK: Białka ostrej fazy we współczesnej diagnostyce medycznej. *Post N Med* 2011, S2: 3-10
64. Kormoczi GF, Saemann MD, Buchta C, Peck-Radosavljevic M, Mayr WR, Schwartz DW, Dunkler D, Spitzauer S, Panzer S: Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur J Clin Invest* 2006, 36: 202-209
65. Kovacic HN, Gallice PM, Nicoara AE, Mordoff RI, Favre RG, Crevat AD: Sodium pump and Na⁺/H⁺ antiport restoration in erythrocytes from cancer patients in remission. *Oncol Res* 1998, 10: 333-339

66. Kowalczyk JR: Epidemiologia nowotworów dziecięcych. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej 2011: 5-11
67. Kwiatkowska J: Enzymy krwinki czerwonej, a jej struktura i funkcja. *Post Biochem* 1989, 39: 575-584
68. Lechner K, Obermeier HL: Cancer-related microangiopathic hemolytic anemia: clinical and laboratory features in 168 reported cases. *Medicine (Baltimore)* 2012, 91: 195-205
69. Lestas AN, Nicolaides KH, Rodeck CH, Bellingham AJ: Normal levels of ATP, total nucleotides and activities of three enzymes related to nucleotide metabolism in fetal erythrocytes. *Br J Haematol* 1986, 63: 471-476
70. Lowy BA, Williams MK, London IM: Enzymatic deficiencies of purine nucleotide synthesis in the human erythrocyte. *J Biol Chem* 1962, 237: 1622-1625
71. Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, Birgegard G, Bokemeyer C, Gascon P, Kosmidis P, Krzakowski M, Nortier J, Olmi P, Schneider M, Schrijvers D: The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer* 2004, 40: 2293-2306
72. Łaciak J, Witkowski S: Badania nad zawartością związków adeninowych krwinek czerwonych u chorych na raka krtani. *Otolaryngologia Polska* 1966, 2: 269-275
73. Malinowska I, Pawłowska J, Socha J, Adamowicz-Salach A, Matysiak M: Niedokrwistość w chorobach wątroby ze szczególnym uwzględnieniem roli hepacydyny. *Med Sci Rev Hepatologia* 2007, 7: 60-63
74. Manzini CU, Manzini E, Ferri C: The pathogenesis of the anaemia of chronic disorders. *Reumatismo* 2012, 64: 128-133
75. Marlewski M, Smoleński RT, Szólkiewicz M, Aleksandrowicz Z, Rutkowski B, Świerczyński J: Increased rate of adenine incorporation into adenine nucleotide pool in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Nephron* 2000, 86: 281-286
76. Maslov AY, Vijg J: Genome instability, cancer and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1790: 963-969
77. Matysiak M: Niedokrwistości hemolityczne u dzieci. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej pod redakcją JR Kowalczyka. 2011: 171-183
78. McCann PP, Pegg AE: Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol Ther* 1992, 54: 195-215
79. McMillan DC, Canna K, McArdle CS: Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003, 90: 215-219

80. Means RT Jr, Krantz SB: Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992, 80: 1639-1647
81. Meyskens FL, Williams HE: Adenosine metabolism in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1971, 240: 170-179
82. Milovic V, Turchanova L: Polyamines and colon cancer. *Biochem Soc Trans* 2003, 31: 381-383
83. Moestue S, Sitter B, Bathen TF, Tessem MB, Gribbestad IS: HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. *Curr Top Med Chem* 2011, 11: 2-26
84. Mohan RR, Challa A, Gupta S, Bostwick DG, Ahmad N, Agarwal R, Marengo SR, Amini SB, Paras F, MacLennan GT, Resnick MI, Mukhtar H: Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clin Cancer Res* 1999, 5: 143-147
85. Murray RK: Erythrocyty i leukocyty. W: *Biochemia Harpera*. PZWL 2012: 742-761
86. Nozoe T, Matsumata T, Sugimachi K: Preoperative elevation of serum C-reactive protein is related to impaired immunity in patients with colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2000, 23: 263-266
87. Okazaki IJ, Moss J: Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu Rev Nutr* 1999, 19: 485-509
88. Pegg AE, Casero RA Jr: Current status of the polyamine research field. *Methods Mol Biol* 2011, 720: 3-35
89. Puthenparambil J, Lechner K, Kornek G: Autoimmune hemolytic anemia as a paraneoplastic phenomenon in solid tumors: A critical analysis of 52 cases reported in the literature. *Wien Klin Wochenschr* 2010, 122: 229-236
90. Rabini RA, Petruzzi E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M, Mazzanti L: Diabetes mellitus and subjects' ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activities in human erythrocytes. *Eur J Clin Invest* 1997, 27: 327-332
91. Rapoport S: The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. *Essays Biochem* 1968, 4: 69-103
92. Ribatti D: Angiogenic effects of erythropoietin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012, 299: 199-234
93. Rodgers GM 3rd, Becker PS, Blinder M, Cella D, Chanan-Khan A, Cleeland C, Coccia PF, Djulbegovic B, Gilreath JA, Kraut E, Matulonis UA, Millenson MM, Reinke D, Rosenthal J, Schwartz RN, Soff G, Stein RS, Vlahovic G, Weir AB 3rd:

- Cancer- and chemotherapy-induced anemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2012, 10: 628-653
94. Rodriguez-Galindo C, Friedrich P, Morrissey L, Frazier L: Global challenges in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr* 2013, 25: 3-15
 95. Rose IA: Regulation of human red cell glycolysis: a review. *Exp Eye Res* 1971, 11: 264-272
 96. Rossig C, Juergens H, Schrappe M, Moericke A, Henze G, von Stackelberg A, Reinhardt D, Burkhardt B, Woessmann W, Zimmermann M, Gadner H, Mann G, Schellong G, Mauz-Koerholz C, Dirksen U, Bielack S, Berthold F, Graf N, Rutkowski S, Calaminus G, Kaatsch P, Creutzig U: Effective childhood cancer treatment: the impact of large scale clinical trials in Germany and Austria. *Pediatr Blood Cancer* 2013, 60: 1574-1581
 97. Rottino A, Hoffman GT, Albaum H, Kristan J: Adenine nucleotide content of red blood cells of normal individuals and of patients suffering from Hodgkin's disease and other diseases. *Blood* 1952, 7: 836-841
 98. Russell DH, Russell SD: Relative usefulness of measuring polyamines in serum, plasma and urine as biochemical markers of cancer. *Clin Chem* 1975, 21: 860-863
 99. Rutkowski B, Słomińska E, Szolkiewicz M, Smoleński RT, Striley C, Rutkowski P, Świerczyński J: N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int* 2003, 84: S19-21
 100. Rutkowski B, Świerczyński J, Słomińska E, Szolkiewicz M, Smoleński RT, Marlewski M, Bułło B, Rutkowski P: Disturbances of purine nucleotide metabolism in uremia. *Semin Nephrol* 2004, 24: 479-483
 101. Saini N, Pyo Lee K, Jha S, Patel S, Bonthu N, Kansagra A, Bhatia A, Martinez SE, Patel J, Altamimi S, Ghotb S: Hyperuricemic renal failure in nonhematologic solid tumors: a case report and review of the literature. *Case Rep Med* 2012, 2012, Id: 314056
 102. Sapra P, Shor B: Monoclonal antibody-based therapies in cancer: advances and challenges. *Pharmacol Ther* 2013, 138: 452-469
 103. Satoh MS, Poirier GG, Lindahl T: Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry* 1994, 33: 7099-7106
 104. Sen K, Mandal M: Second generation liposomal cancer therapeutics: transition from laboratory to clinic. *Int J Pharm* 2013, 448: 28-43
 105. Skou JC, Esmann M: The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992, 24: 249-261
 106. Skou JC: The Na,K-pump. *Methods Enzymol* 1988, 156: 1-25

107. Słomińska EM, Kowalik K, Smoleński RT, Szolkiewicz M, Rutkowski P, Rutkowski B, Świerczyński J: Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2006, 21: 800-806
108. Słomińska EM, Smoleński RT, Szolkiewicz M, Leaver N, Rutkowski B, Simmonds HA, Świerczyński J: Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure. *Mol Cell Biochem* 2002, 231: 83-88
109. Słomińska EM, Szolkiewicz M, Rutkowski B, Świerczyński J: Reutilizacja adeniny jedną z przyczyn wzrostu stężenia ATP w erytrocytach pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. *Pol Arch Med Wewn* 2001, 1: 45-50
110. Słomińska EM, Szolkiewicz M, Smoleński RT, Rutkowski B, Świerczyński J: High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP. *Nephron* 2002, 91: 286-291
111. Sogaard M, Thomsen RW, Bossen KS, Sorensen HT, Norgaard M: The impact of comorbidity on cancer survival: a review. *Clin Epidemiol* 2013, 5(Suppl 1): 3-29
112. Stachowicz-Stencel T, Bien E, Balcerska A, Godzinski J, Synakiewicz A, Perek-Polnik M, Kurylak A, Pietras W, Kuzmich M, Mizia-Malarz A, Rybczynska A, Nurzynska-Flak J: Diagnosis and treatment of renal cell carcinoma in children: a report from the Polish pediatric rare tumor study group. *Klin Pediatr* 2011, 223: 138-141
113. Stasik Z, Skotnicki P, Nowak-Sadzikowska J, Kulpa JK: Białko C-reaktywne u chorych na nowotwory złośliwe. *Nowotwory* 2008, 58: 441-446
114. Stocchi V, Canestrari F, Giacchi R, Sebastiani M, Lungarotti F, Dacha U, Dacha M: Adenine and pyridine nucleotides in the red blood cells of subjects with solid tumors. *Tumori* 1987, 73: 25-28
115. Stratford MR, Dennis MF: High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide and its metabolites in human and murine plasma and urine. *J Chromatogr* 1992, 582: 145-151
116. Tabor CW, Tabor H: Polyamines. *Ann Rev Biochem* 1984, 53: 749-790
117. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM: The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 2010, 31: 100-110
118. Tisdale MJ: The cancer cachexia: metabolic alternations and clinical manifestations. *Nutrition* 1997, 13: 1-7
119. Tonelli M, Hemmelgarn B, Reiman T, Manns B, Reaume MN, Lloyd A, Wiebe N, Klarenbach S. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. *CMAJ* 2009, 180: 62-71
120. Vali L, Hahn O, Kupcsulik P, Drahos A, Sarvary E, Szentmihalyi K, Pallai Z, Kurucz T, Sipos P, Blazovics A: Oxidative stress with altered element content and

- decreased ATP level of erythrocytes in hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008, 20: 393-398
121. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M: Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 2001, 28(Suppl 8): 29-35
 122. Vaupel P, Mayer A: Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26: 225-239
 123. Vidotto C, Fousert D, Akkermann M, Griesmacher A, Muller MM: Purine and pyrimidine metabolites in children's urine. *Clin Chim Acta* 2003, 335: 27-32
 124. Villano PJ, Gallice PM, Nicoara AE, Honore SG, Owczarczak K, Favre RG, Briand CM: Polyamines secreted by cancer cells possibly account for the impairment of the human erythrocyte sodium pump activity. *Cell Mol Biol* 2001, 47: 305-312
 125. Volanakis JE: Human C-reactive protein: expression, structure and function. *Mol Immunol* 2001, 38: 189-197
 126. Widda WF: Facilitated transfer of hexoses across human erythrocyte membrane. *J Physiol* 1954, 125: 163-181
 127. Yanaji S, Sharp P, Ramesh B, Srai SK: Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood* 2004, 104: 2178-2180
 128. Zhang X, Rovin BH: Beyond anemia: hepcidin, monocytes and inflammation. *Biol Chem* 2013, 394: 1-10
 129. Zhao XF, Reitz M, Chen QC, Stass S: Pathogenesis of early leukemia and lymphoma. *Cancer Biomark* 2010, 9: 341-374
 130. Ziegler M, Oei SL: A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays* 2001, 23: 543-548