

Anna Synakiewicz



*Stężenie wybranych aminokwasów na różnych etapach
leczenia onkologicznego u pacjentów pediatrycznych*

*Praca na stopień doktora nauk medycznych
Wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Teresy Stachowicz-Stencel
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego*

GDAŃSK 2015

Składam serdeczne podziękowania

*dr hab.n.med. Teresie Stachowicz-Stencel
za nieocenoną pomoc, wsparcie,
opiekę merytoryczną oraz zaangażowanie,
bez którego praca ta nie mogłaby powstać*

*Pani prof. dr hab.n.med.
Elżbiecie Adamkiewicz-Drożyńskiej
za życzliwość, wsparcie oraz umożliwienie przeprowadzenia badań*

*Pani prof. dr hab.n.med.
Annie Balcerskiej za cenne wskazówki*

*dr n.med. Małgorzacie Sawickiej-Żukowskiej
oraz dr n.med. Natalii Adrianowskiej
za pomoc w zbieraniu materiału*

*moim Pacjentom i ich Rodzicom
za okazane zrozumienie i wyrażenie zgody na badania*

*Dziękuję moim Rodzicom,
którzy zaszczepili we mnie pasję do nauki i umożliwili jej realizację*

*Szczególne podziękowania
składam mojemu mężowi Jarkowi
za niezwykłą zachętę i mobilizację do realizacji pracy,
cierpliwość i wsparcie na każdym etapie*

Pracę dedykuję moim Dzieciom

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	4
1. Wstęp	6
1.1. Glutamina	10
1.2. Arginina i asymetryczna dimetyloarginina.....	13
2. Cel pracy	19
3. Materiał i metody	20
3.1. Charakterystyka badanych dzieci	20
3.2. Metody prowadzonych badań.....	23
3.2.1. Warunki oznaczania stężenia argininy i glutaminy w surowicy.....	23
3.2.2. Warunki oznaczania asymetrycznej dimetyloargininy	24
3.3. Opracowanie statystyczne	24
4. Wyniki badań i omówienie	25
4.1. Grupa I kontrolna.....	25
4.2. Grupa II onkologiczna	25
5. Dyskusja	47
6. Wnioski	56
7. Piśmiennictwo	57
8. Streszczenie	69

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADMA	asymetryczna dimetyloarginina
ALL	ostra białaczka limfoblastyczna
AML	ostra białaczka mieloblastyczna
ANLL	ostra białaczka nielimfoblastyczna
Arg	arginina
ASL	liaza argininobursztynianowa
ASS	syntetaza argininobursztynianowa
BCAA	aminokwasy rozgałęzione
BUN	azot mocznika
CAC	CancerAnorexia/Cachexia Syndrome
CAT	transporter aminokwasów kationowych
CIN	śród nabłonkowa neoplazja szyjki macicy
CR	kliniczna remisja
CRP	białko C-reaktywne
DDAH	dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy
EAA	aminokwasy egzogenne
eNOS	śród błonkowa syntaza tlenku azotu
GH	hormon wzrostu
Gln	glutamina
HL	chłoniak Hodgkina
HSP70	białko szoku termicznego
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu-1
IL-1	interleukina 1
IL-6	interleukina 6
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu
L-NMMA	monometyloarginina
mTOR	kinaza białkowa treoninowo-serynowa
MTX	metotreksat
NHL	chłoniak nieziarniczny
NK	tzw. naturalni zabójcy
nNOS	neuronalna syntaza tlenku azotu

NO	tlenek azotu
NOS	syntaza tlenku azotu
OB	odczyn Biernackiego
PFAA	profil wolnych aminokwasów w osoczu
PK-M2	dimeryczna forma izoenzymu kinazy pirogronianowej
PR	częściowa remisja
PRMT	metylotransferaza argininowa
QL	jakość życia
SDMA	symetryczna dimetyloarginina
TAA	całkowite stężenie aminokwasów
TLR4	toll-like receptor 4
TNF α	czynnik martwicy nowotworów α
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

1. WSTĘP

Zaburzenia metabolizmu towarzyszą wielu przewlekłym chorobom u dzieci m.in. złośliwym procesom nowotworowym. Wyniszczenie w przebiegu choroby nowotworowej wynika głównie ze zmian metabolicznych zachodzących podczas samego procesu chorobowego, ale też stosowanych leków cytostatycznych.

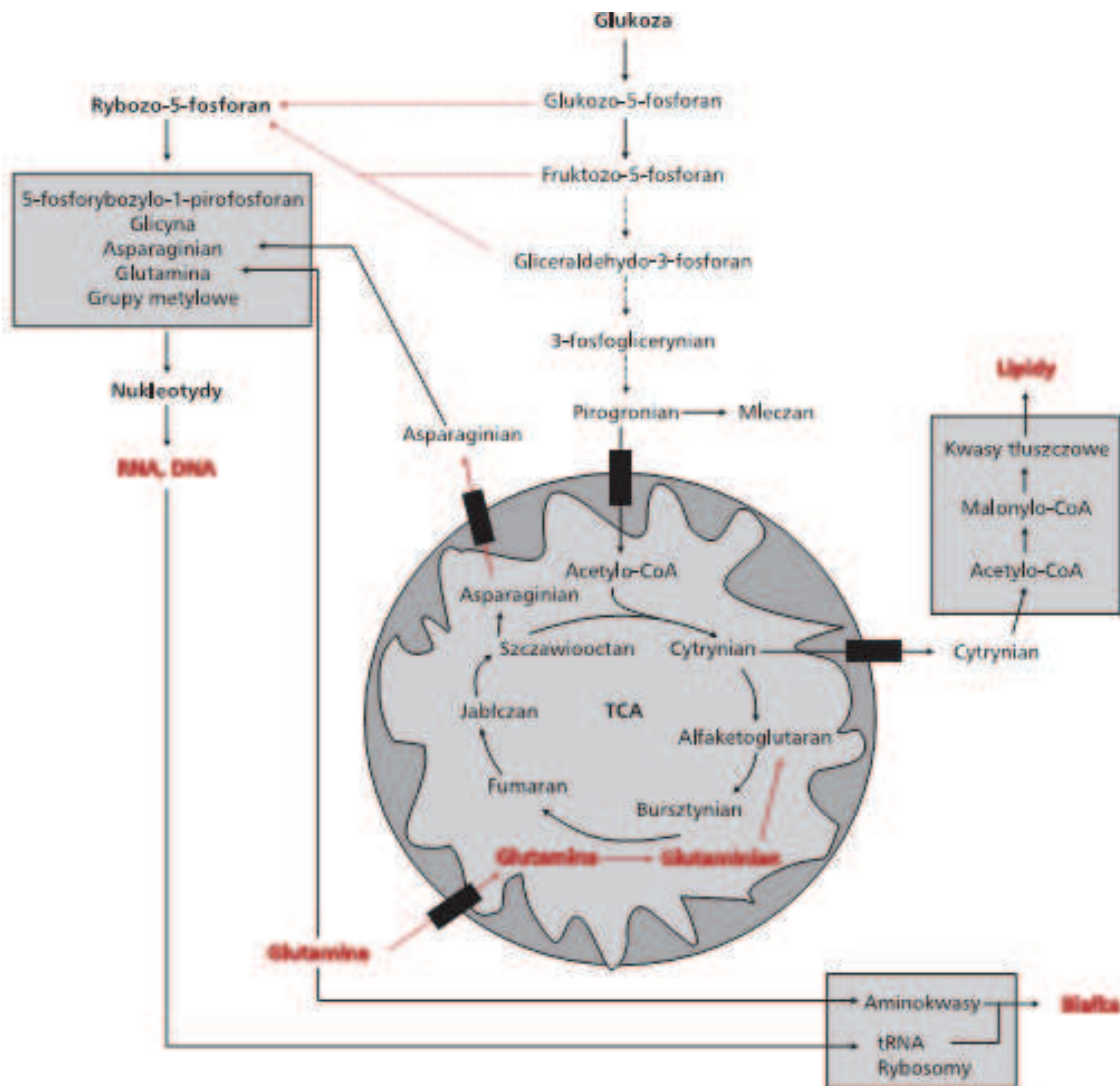
Populacja pacjentów pediatrycznych z rozpoznaniem złośliwego procesu nowotworowego w Polsce jest stosunkowo nieliczna (1100-1200 nowych zachorowań rocznie) w porównaniu z populacją dorosłych [1]. Również odmienna histologia i przebieg choroby powodują, iż podejście do dziecka obciążonego chorobą nowotworową musi być holistyczne. Ponieważ objawy choroby nowotworowej u dziecka mogą być wysoce niecharakterystyczne, około 80 % dzieci jest diagnozowanych w momencie, gdy obserwuje się przerzuty odległe (rozszkana choroba nowotworowa). Jednocześnie coraz nowocześniejsze metody diagnostyczne oraz terapeutyczne powodują, iż wzrasta odsetek pacjentów osiągających długotrwałą kliniczną remisję. Szacuje się, że wśród populacji osób dorosłych w wieku 20 lat na każdy tysiąc przypada jeden pacjent, który był leczony z powodu nowotworu złośliwego w dzieciństwie [1]. Sytuacja taka występuje również z powodu dużo bardziej intensywnego i kompleksowego leczenia (wielolekowa chemioterapia, megachemioterapia, radioterapia, zabiegi chirurgiczne). Działanie takie ma jednak swoje konsekwencje w postaci działań niepożądanych, zarówno wczesnych, jak i odległych. Mogą one stać się bezpośrednią przyczyną zgonu pacjenta. Zatem skuteczne przeciwdziałanie ich wystąpieniu jest obecnie podstawą w opiece onkologicznej nad pacjentem pediatrycznym.

Jednym z największych wyzwań u pacjenta onkologicznego wydaje się być zapobieganie wyniszczeniu nowotworowemu, a w przypadku jego wystąpienia możliwość skutecznego leczenia wspomagającego. Niedożywienie w chorobie nowotworowej obserwuje się u około 75 % pacjentów niezależnie od stadium zaawansowania procesu [2]. Ten stan jest niedoborem energii, białek i jakichkolwiek innych substancji odżywczych, których brak powoduje zauważalne skutki uboczne, dotyczące funkcjonowania ludzkiego organizmu lub jego stanu ogólnego. Uważa się, że u około 45 % pacjentów zdiagnozowanych z powodu nowotworu złośliwego występuje ubytek masy ciała rzędu 10% masy wyjściowej, a u 25% badanych różnica ta wynosi ponad 20% [3]. Sytuacja ta dotyczy nie tylko chorych z zaawansowanym procesem, ale również na wczesnych etapach choroby, jako że już w tym momencie ma miejsce wytwarzanie dużych ilości mediatorów kacheksji. Taki stan opisywany jest jako złożony zespół metabolicznych objawów związanych z chorobą podstawową

i charakteryzuje się utratą masy mięśniowej z lub bez utraty tkanki tłuszczowej [4]. Skrajne wyczerpanie prowadzi do znacznie upośledzonej jakości życia, a przede wszystkim uniemożliwia zastosowanie skutecznego, lecz agresywnego leczenia przeciwnowotworowego. Badania statystyczne pokazują, że utrata masy ciała większa niż 5% znacząco pogarsza rokowanie [1,5]. Obserwacje dotyczące kacheksji nowotworowej dowodzą, iż wczesne zapobieganie zespołowi CAC (Cancer Anorexia/Cachexia Syndrome) jest w stanie odwrócić patologiczne mechanizmy, które doprowadzają do niego, a tym samym zapobiec ciężkim uszkodzeniom narządowym i systemowym [6]. Onkologiczny, niedożywiony pacjent znajduje się w stanie hipermetabolicznym z nasilonymi procesami lipolizy, oksydacji kwasów tłuszczowych i glukoneogenezy, a także katabolizmu białek [7,8]. Metabolizm białek i aminokwasów u tych pacjentów wykazuje ściśle powiązanie z metabolizmem glukozy i jest regulowany przez te same hormony i ich metabolity [9]. Magazynowany w wątrobie i mięśniach szkieletowych glikogen powinien spełniać swoją rolę w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na glukozę u chorych onkologicznych, ale w związku z niedostateczną jej podażą w diecie jest często niewystarczający. Interesujący jest fakt, iż poziom glukozy w surowicy jest najczęściej prawidłowy z powodu zwiększonej glukoneogenezy w komórkach wątrobowych [10]. Obserwowane są zmiany w metabolizmie białek u pacjentów nowotworowych i korelują one z intensywnością glukoneogenezy. Zwiększony udział aminokwasu alaniny w procesie glukoneogenezy jest zauważalną anomalią w tej grupie [11]. Zmiany w profilu wolnych aminokwasów w osoczu są przedmiotem badań wielu naukowców. Wydaje się, że ich redystrybucja może wynikać nie tylko z powodu zmniejszonego przyjmowania pokarmu przez chorych, ale również bezpośredniej obecności komórek nowotworowych i ich wpływu na gospodarkę białkową organizmu [7,8,12]. Badania znakowanych izotopem aminokwasów przeprowadzone na modelach zwierzęcych obciążonych nowotworem wykazały zwiększony katabolizm białek w komórkach mięśniowych z jednoczesnym zmniejszeniem ich syntezy oraz zwiększony całkowity obrót białek w porównaniu z grupą kontrolną [13]. Udowodniono, że zmiany te wyprzedzają pojawienie się ujemnego bilansu azotowego, utraty masy ciała, czy zauważalnego zmniejszenia przyjmowania składników odżywczych.

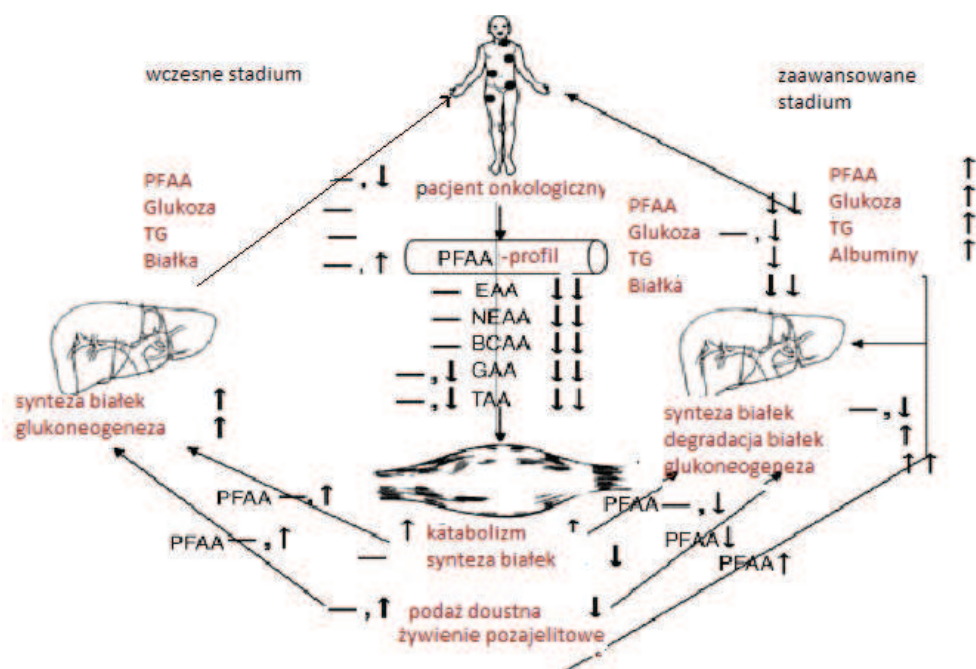
Komórki nowotworowe oprócz tego, że są niezależne od zewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych pobudzających proliferację, mają nieograniczony potencjał replikacyjny czy potencjał angiogeny, mają również zdolność do zmiany metabolizmu komórkowego [14]. Zjawisko Warburga to zwiększony wychwyty glukozy i cały szereg zjawisk, które prowadzą do produkcji kwasu mlekowego, nawet w warunkach wystarczającej ilości tlenu. W tym procesie

dochodzi do wytwarzania produktów pośrednich, które służą powstaniu kwasów nukleinowych, białek i lipidów [15]. Kwas mlekowy może również służyć jako cząsteczka sygnałowa dla komórek śródbłonka. Jako aktywator syntezy szlaku IL-8 mógłby nasilać procesy migracji i angiogenezy nowotworowej [16,17]. Te dwa związki - glutamina i glukoza są w ścisłym związku metabolicznym w komórkach nowotworowych [18]. Jak przedstawiono na Ryc.1.1 [19] pod wpływem heksokinazy, enzymu PK-M2, izoenzymu A dehydrogenazy mleczanowej dochodzi do przekształcenia glukozy do pirogronianu, a następnie do acetylokoenzymu A, który wchodzi w cykl kwasów trójkarboksylowych. Następnie z glutaminy pod wpływem działania glutaminazy powstaje glutaminian, a potem alfa-ketoglutaran. Do procesu syntezy białek wykorzystywane są aminokwasy, które pochodzą z przemian glutaminy i glukozy [20].



Ryc.1.1 Powiązanie metabolizmu glukozy i glutaminy w komórkach nowotworowych [19]

Proces nowotworowy jest rozpatrywany również, jako choroba „metaboliczna”, jako że intensywnie proliferujące komórki nowotworowe potrzebują większej ilości aminokwasów do syntezy białek i kwasów nukleinowych [21,22]. Krążące w osoczu wolne aminokwasy (PFAA) mogą częściowo odzwierciedlać metabolizm białek indukowany przez nowotwór [10]. Zauważalne różnice w poziomie PFAA były obserwowane u pacjentów niedożywionych na późnym etapie zaawansowania choroby nowotworowej [23]. Wart podkreślenia jest fakt, iż generalnie masa guza stanowi niewielką część masy ciała. Niektórzy autorzy zauważają, że rzadko przekracza ona 1% wagi pacjenta [8]. W związku z powyższym należy mieć na uwadze, iż na zaburzenie profilu aminokwasów będzie miała wpływ obecność nowotworu i jego białkowych przemian, ale w większości będzie to efekt metabolizmu białek w wątrobie i mięśniach szkieletowych gospodarza. Lai i wsp. [10] zaproponowali potencjalny mechanizm zmian w profilu wolnych aminokwasów w osoczu pacjentów onkologicznych. Autorzy założyli, że na wczesnych etapach choroby obrót aminokwasów mógłby być zwiększony w niewielkim stopniu w związku z hipermetabolizmem komórki nowotworowej (Ryc. 1.2). Jednakże zwykle w tym momencie profil PFAA nie wykazuje zmian lub obserwuje się niewielki spadek stężenia w zakresie aminokwasów glukogennych i całkowitego stężenia aminokwasów z powodu zwiększonego katabolizmu białek w mięśniach szkieletowych, który wynika z kolei ze zwiększonej glukoneogenezy w wątrobie. Wyjątkowo trudna jest sytuacja w przypadku zaawansowanego stadium, gdy dodatkowym czynnikiem jest kacheksja nowotworowa. Jak wspomniano wcześniej stan ten skutkuje wyraźnym niedoborem wolnych aminokwasów, w tym egzogennych, endogennych, aminokwasów rozgałęzionych i glukogennych. W mięśniach szkieletowych dochodzi do spadku syntezy białek i zauważalnej ich degradacji. Stan ten dodatkowo jest potęgowany przez zmniejszony dowóz pokarmu u tych chorych. Istnieją również pewne przesłanki sugerujące, że pochodzenie nowotworu z różnych organów może mieć także znaczenie, jako że proliferacja tych komórek zachodzi w różnym stopniu i może mieć to wpływ na metabolizm białek gospodarza i profil wolnych aminokwasów w osoczu [23-26]. Rozważa się wykorzystywanie PFAA jako dodatkowego, pomocniczego narzędzia w diagnostyce nowotworów złośliwych.



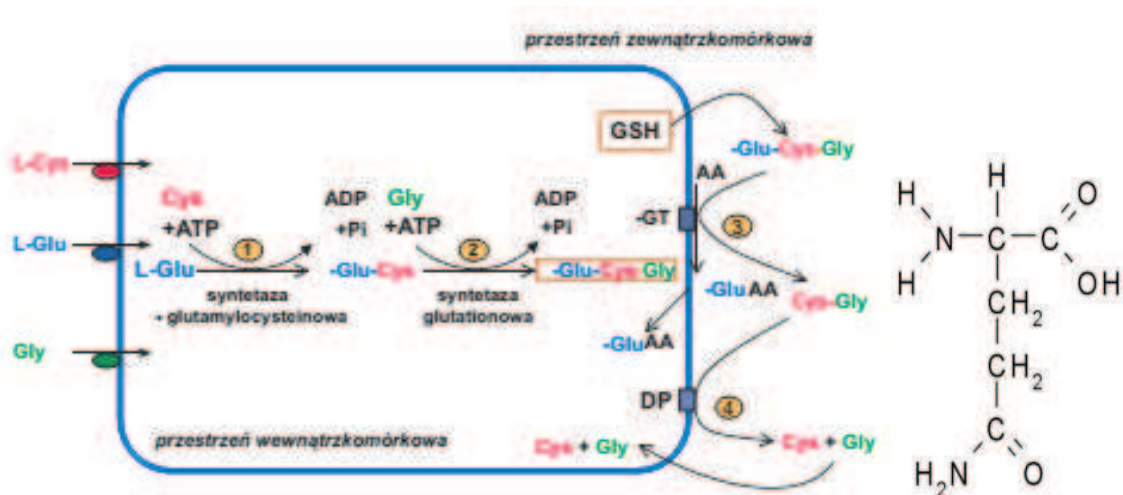
Ryc.1.2 Proponowany mechanizm zmian w profilu wolnych aminokwasów u pacjentów onkologicznych w zależności od stadium zaawansowania [na podstawie 10]

U pacjentów onkologicznych glutamina i arginina znalazły się w kręgu szczególnego zainteresowania. Podejmowane są próby suplementacji glutaminą celem m.in. poprawy stanu odżywienia, a także podaż leków powodujących obniżenie stężenia argininy jako leczenia chemicznego, mającego na celu osiągnięcie klinicznej remisji.

1.1 Glutamina

Glutamina jest jednym z aminokwasów, który odgrywa niezwykle ważną rolę w funkcjonowaniu ludzkiego organizmu. Jest ona syntetyzowana w komórkach niektórych tkanek organizmu. Głównym miejscem, w którym zachodzi produkcja tego aminokwasu i jego przechowywanie są mięśnie szkieletowe, w nieznacznym stopniu tkanka płucna i mózgowa [27].

Wiadomo, że glutamina jest prekursorem glutationu poprzez syntezę glutaminianu. Jednak należy pamiętać, że obecność cysteiny i glicyny jest ważnym czynnikiem w procesie syntezy glutationu i bez ich obecności reakcja ta nie byłaby możliwa (Ryc.1.1.1) [28]



Ryc.1.1.1. Glutamina i jej udział w tworzeniu glutationu [28]

Glutamina jest niezbędna do wzrostu i rozwoju wielu funkcji (w tym wielu funkcji fizjologicznych). Jej profil działania jest bardzo szeroki. Wśród korzystnych oddziaływań warto wyróżnić: zwiększoną wrażliwość na insulinę, zwiększenie O-glikozylacji podczas stresu, wzmożoną produkcję białek szoku termicznego, zmniejszenie dostępności wolnych rodników, zmniejszenie translokacji bakterii jelitowych i endotoksyn (rola w utrzymaniu bariery błony śluzowej jelita), korzystne oddziaływanie na funkcję limfocytów, kontrolę formacji tlenku azotu – NO (transport azotu pomiędzy poszczególnymi organami m.in z mięśni do jelit, nerek i wątroby) i równowagi kwasowo-zasadowej [29]. Glutamina służy również jako jeden z substratów dla intensywnie proliferujących komórek, takich jak te, które znajdują się w przewodzie pokarmowym, a także dla limfocytów, makrofagów, fibroblastów i retikulocytów [30]. W normalnych, fizjologicznych warunkach wytwarzanie i dystrybucja glutaminy są wystarczające, aby sprostać wymaganiom organizmu. Wykazano, że dodatkowa suplementacja doustną glutaminą w przypadku grupy dorosłych zdrowych osób z prawidłowym jej poziomem w osoczu, nie przynosi żadnych dodatkowych korzyści [31]. Z kolei w sytuacjach patologicznych, w warunkach stresu katabolicznego, produkcja omawianego aminokwasu i jego uwalnianie z tkanek jest niewystarczające, aby sprostać wymaganiom poszczególnych narządów i komórek, zwłaszcza tych, które używają glutaminy do prawidłowego funkcjonowania (jelita, wątroba, nerki, komórki zapalne i układ odpornościowy). Glutamina oprócz tego, że jest „paliwem” dla namnażających się komórek, bierze również udział w kontroli ekspresji genów (związanych z metabolizmem), a także jest zaangażowana w aktywację i naprawę wewnątrzkomórkowych szlaków

sygnalizacyjnych [32]. Udział w procesach antyoksydacyjnych ustroju jest jednym z ważniejszych aspektów oddziaływania glutaminy, ponieważ u krytycznie chorych pacjentów zawsze obserwuje się zmiany w statusie redox. Badania eksperymentalne przeprowadzone na szczurach wskazują, że podawanie Gln przed zabiegiem operacyjnym pobudza ekspresję HSP70 (białko szoku termicznego), a także zmniejsza odpowiedź zapalną ze względu na regulację syntazy tlenku azotu (NOS) w narządach, takich jak: wątroba, serce i płuca [33]. Podobne obserwacje zostały poczynione przez Coeffier i wsp. [34], którzy oceniali wpływ suplementacji argininy i glutaminy, jako łączne działanie tych dwóch aminokwasów. W przypadku takiej kombinacji uwalnianie cytokin prozapalnych było znacznie niższe [35].

Również wiele poważnych schorzeń związanych jest z niedożywieniem i pośrednio z uszkodzeniem bariery jelitowej i tkanki limfatycznej układu pokarmowego. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że suplementacja Gln może wpłynąć korzystnie na poprawę czynności jelit [36,37]. Jak wspomniano powyżej, Gln odgrywa również ważną rolę w funkcji immunologicznej. Kessel i wsp. [37] poddali obserwacji szczury po doustnej suplementacji glutaminy i zauważyli zmiany w zachowaniu białek, które odgrywają rolę w aktywacji wrodzonej odporności w odpowiedzi na ekspozycję bakteryjną np. poprzez Toll-like receptor 4 (TLR4). Autorzy wykazali obecność obniżonej ekspresji TLR 4 w komórkach nabłonka jelita, które zostały zajęte przez bakterie Gram-ujemne [37]. Zwiększenie ekspresji tego białka prowadzi do indukcji cytokin prozapalnych np. IL-1, IL-6, TNF- α .

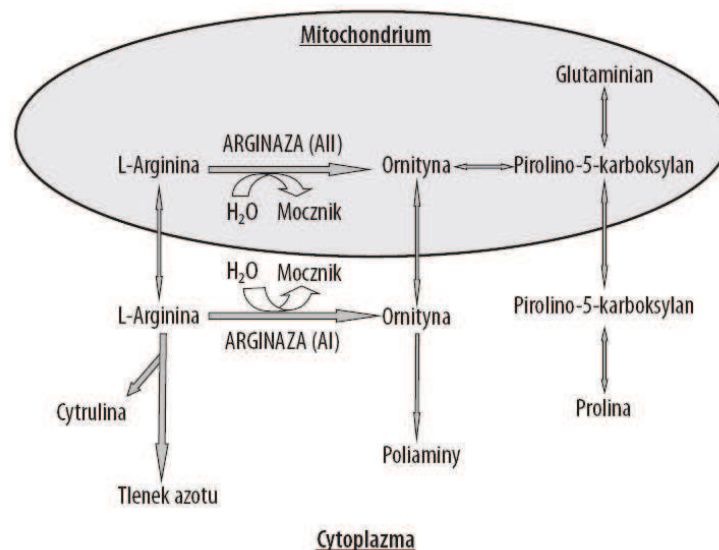
Większość pacjentów onkologicznych cierpi z powodu zaburzeń spowodowanych chorobą podstawową, ale także z powodu komplikacji po leczeniu. Wśród nich warto wymienić wspomnianie wcześniej niedożywienie, powikłania ze strony przewodu pokarmowego, a także ciężkie zakażenia. Wydaje się, że terapia wspomagająca, która pomogłaby lub wręcz zniwelowała te niekorzystne działania, będzie krokiem milowym w leczeniu tej grupy chorych. Zapalenie śluzówek jamy ustnej jest jednym z najczęstszych powikłań leczenia cytostatykami. Ze względu na stopień nasilenia zmian zapalnych, stan ten prowadzi często do częściowego lub całkowitego żywienia pozajelitowego, zwiększając ryzyko niedożywienia i w konsekwencji znacznego pogorszenia jakości życia (QL) pacjenta. Zaburzenie w funkcjonowaniu błony śluzowej jamy ustnej i całego przewodu pokarmowego samo w sobie przyczynia się także do wystąpienia bardziej nasilonych skutków ubocznych chemioterapii (CHT) i radioterapii (RTX) i wzrostu śmiertelności. Szeroko pojęte zmiany metaboliczne (stan zapalny, wzmożona proteoliza mięśniowa, zmiany w metabolizmie węglowodanów, białek i tłuszczów) i zaburzenia odżywiania (anoreksja) są pierwszym

krokiem prowadzącym do wyniszczenia organizmu. Suplementacja glutaminą, dożylnie lub doustnie, jest obecnie coraz częściej uznawana za leczenie wspomagające (tzw. supporting therapy), ponieważ jest ona uważana za substrat dla szybko dzielących się komórek, które uległy zniszczeniu w procesach nowotworowych, prowadząc do upośledzenia wielu narządów i ich funkcji. Z drugiej strony podejście takie wymaga dużej ostrożności, jako że w latach 90 opublikowano kilka doniesień o zużyciu glutaminy przez komórki nowotworowe. Badania przeprowadzone w 1990 roku na liniach komórkowych wykazały, że Gln może być potencjalnym źródłem energii dla komórek nowotworowych [37]. Zjawisko to może być jednym z możliwych wyjaśnień stanu niedożywienia u pacjentów z rozpoznaniem złośliwego procesu nowotworowego. Wysłunięto hipotezę, że glutamina, która jest uwalniana z mięśni, przepływa bezpośrednio do guza nasilając jego wzrost. Według autorów w przypadku suplementacji zapewnia się dodatkową ilość krążącej glutaminy, która stanowi składnik "odżywczy" nowotworu. Jednak najbardziej wiarygodnymi i obiektywnymi badaniami oceniającymi wpływ w/w suplementacji na wzrost guza są te, które wykonuje się w warunkach *in vivo*.

Aktualnie dane takie nie zostały opublikowane, dlatego doświadczenia na modelach zwierzęcych oraz te na nowotworowych liniach komórkowych muszą służyć za obserwacje wyjściowe. Badania doświadczalne na szczurach leczonych metotreksatem (MTX) z powodu mięsaka zostały wykonane przez Rouse i wsp. [38]. Zaobserwowano, że toksyczność w stosunku do układu pokarmowego, indukowana przez MTX była mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej, a wielkość nowotworu zmniejszyła się u szczurów karmionych glutaminą.

1.2. Arginina i asymetryczna dimetyloarginina (ADMA)

Arginina, podobnie jak glutamina jest substancją, której obecnie poświęca się niezwykle dużo uwagi. Ten częściowo niezbędny aminokwas odgrywa ważną rolę w wielu szlakach metabolicznych u ludzi (Ryc.1.2.1)



Ryc.1.2.1. Główne szlaki metaboliczne L-Argininy [39]

Istnieją pewne doniesienia, które sugerują jego znaczącą rolę w biologii niektórych nowotworów i procesie kancerogenezy. Rozważa się również pozytywny wpływ argininy na funkcjonowanie układu immunologicznego [40]. Glutamina i arginina są ściśle ze sobą powiązane, ponieważ pierwszy z wymienionych aminokwasów ma swój udział w syntezie de novo argininy przez ścieżkę jelitowo-nerkową [41]. Następnie poprzez proces transformacji glutaminy do cytruliny, zarówno na drodze bezpośredniej, jak i proces przemiany proliny i glutaminianu w eneterocytach, glutamina jest uwalniana i wykorzystywana w produkcji argininy [42]. Dalej arginina może być hydrolizowana przez arginazę w wątrobie do mocznika i ornityny, a następnie przekształcana do glutaminianu, proliny i glutaminy. Jednak wspólne szlaki metaboliczne obu aminokwasów nie dowodzą ich wspólnych funkcji. Sugeruje się, że zarówno Arg, jak i Gln zwiększają wrażliwość na insulinę, ale w przypadku ich udziału w procesie produkcji tlenku azotu (NO) ich rola jest antagonistyczna [43,44]. Arginina zwiększa NO przez iNOS (indukowalną syntazę tlenku azotu) w makrofagach, komórkach śródbłonna i komórkach nabłonkowych jelita cienkiego [42]. Glutamina doprowadza do obniżenia poziomu tlenku azotu przez makrofagi i komórki śródbłonna [46], ale nie ma wpływu na komórki nabłonka jelitowego i ich syntezę NO [42]. Takie opozycyjne działanie zaobserwować można także w przypadku wpływu na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne, takie jak mTOR (mammalian target of rapamycin kinase): Arg stymuluje, a Gln nie odgrywa żadnej roli, pomimo że sugeruje się pewien udział mTOR w końcowych efektach działania glutaminy [43]. Syntetaza argininobursztynianowa (ASS) jest również łącznikiem pomiędzy tymi dwoma aminokwasami. Gln powoduje zwiększenie poziomu

aktywności ASS w komórkach jelitowych, zwiększając syntezę Arg de novo w warunkach fizjologicznych, natomiast w stanach zapalnych wywiera odwrotny efekt [47]. Nie jest znany dokładny mechanizm tego działania i czy proces ten odbywa się łącznie, czy też toczy się równolegle. Bardzo ważne obserwacje zostały opublikowane przez Bertolo i wsp. [48], a także Urschel i wsp. [49], którzy zauważyli, że współdziałanie Gln i Arg może zależeć od wieku (etapu rozwoju). Badania te przeprowadzono u nowonarodzonych świń. Te doniesienia znalazły potwierdzenie w badaniach ludzkich noworodków [50]. Tak skomplikowane relacje i zależności powyższych substancji w organizmie człowieka wymagają dalszych badań.

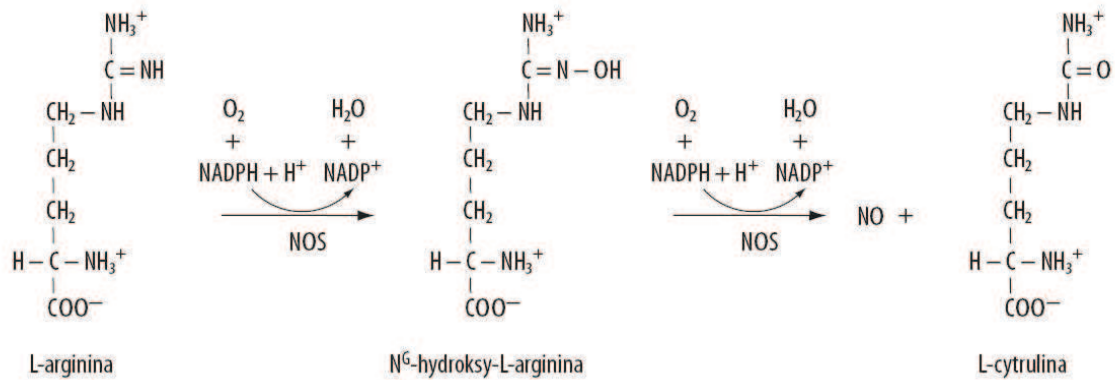
Biorąc pod uwagę fakt, że w szczególnych warunkach, takich jak ciężki uraz lub złośliwa choroba nowotworowa, najczęściej w ich wyniku dochodzi do niedoboru lub braku pewnych substancji, warto dążyć do poszukiwania markerów, które mogłyby być przydatne w bardzo wczesnym wykryciu tych zmian patologicznych. W ostatnich latach powstało wiele badań opisujących rolę asymetrycznej dimetyloargininy, jako nowego biomarkera w chorobach związanych ze stanem zapalnym i niedotlenieniem. Do tej pory w bazie PubMed opublikowano tylko dwa badania oceniające jej potencjalny udział w chorobie nowotworowej [51,52].

Większość komórek człowieka jest w stanie syntetyzować argininę z cytruliny w reakcji katalizowanej przez syntetazę argininobursztynianową (ASS) oraz liazę argininobursztynianową (ASL). ASS katalizuje przekształcanie cytruliny do argininobursztynianu, kwasu asparaginowego, który z kolei jest hydrolizowany przez ASL do argininy i fumaranu. W warunkach nasilonych procesów katabolicznych synteza argininy jest niewystarczająca. Głównymi narządami, które są odpowiedzialne za syntezę L-argininy są nerki i wątroba, a głównym substratem dla tej reakcji jest cytrulina, która z kolei jest syntetyzowana w jelicie cienkim [53]. W wątrobie produkcja argininy odbywa się poprzez przemiany chemiczne cyklu moczniowego. Do produkcji Arg wymagana jest obecność wszystkich związków cyklu ornitynowego. Wysoka aktywność wątrobowej arginazy powoduje, że arginina nie może być wydalana do układu krążenia z powodu szybkiej hydrolizy [54]. Dowiedziono także, że komórki nabłonka jelita odgrywają ważną rolę w endogennej syntezie argininy [55]. Glutamina i glutaminian pochodzące z diety, endogenna glutamina i prolina są komponentami do syntezy argininy i cytruliny [56]. Cynober i wsp. [57] wykazali, że ponad 25% glutaminy w jelitach zostaje przekształcone w cytrulinę i wprowadzone do krążenia. Zauważono również, że po urodzeniu jelito cienkie jest głównym miejscem, w którym produkowana jest arginina ze względu na wysoką aktywność ASS i ASL oraz brak lub niską aktywność arginazy [58]. Tylko u noworodków gatunku ludzkiego

i niektórych ssaków dochodzi do całkowitej endogennej syntezy jelitowej argininy. Około 80% cytruliny mającej swoje źródło w jelitach zostaje przetransportowane do nerek, gdzie powstaje Arg, która jest uwalniana do krwi i tkanek. Reszta jest wychwytywana przez wątrobę [59]. Jak wspomniano wcześniej dominującym narządem odpowiedzialnym za regulację stężenia Arg są nerki. Bardzo ciekawe obserwacje opisali van de Poll i wsp. [60], które wskazują, że podczas głodu zdolność nerki do wytwarzania Arg jest znacznie wyższa niż produkcja cytruliny w jelitach. Taka reakcja zapewnia właściwy poziom argininy endogennej, pomimo braku białek.

Istnieją doniesienia, które wskazują na zaburzenia syntezy i metabolizmu argininy w różnych stanach patologicznych. Jednym z nich jest choroba nowotworowa. W badaniach *in vitro* wykazano, że prawidłowe komórki reagują na usunięcie argininy z otoczenia zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 [61], podczas gdy w komórkach nowotworowych dochodzi do ich śmierci w przypadku pozbawienia ich argininy [62]. W przypadku podawania egzogennej Arg jedynie prawidłowe komórki nadal mają zdolność do wzrostu i proliferacji. Doprowadziło to do próby podziału nowotworów na auksotroficzne względem argininy - gruczolakorak prostaty, rak wątrobowokomórkowy oraz czerniak [63]. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy proliferacją komórek a aktywnością syntazy argininobursztynianowej w odpowiedzi na usunięcie argininy. Obserwacje te znalazły zastosowanie w praktyce leczenia niektórych nowotworów z zastosowaniem enzymów metabolizujących argininę [64]. Generalnie aminokwasy są substratami, które biorą udział w tworzeniu innych związków niezbędnych w wielu szlakach biochemicznych, odgrywając ważną rolę we wzroście, proliferacji i metabolizmie komórek nowotworowych. Są one w stanie pozyskać krążącą argininę, która między innymi w około 50% jest dostarczana poprzez dietę [65,66]. Transport odbywa się poprzez system transportowy y^+ , niezależny od Na^+ . Znany jest również proces syntezy NO z argininy przez bezpośredni kontakt białka transportowego z NOS. Ten tak zwany "paradoks argininy" jest związany ze śródbłonkową NOS (eNOS), ale także z indukowalną NOS (iNOS), co spotykamy w komórkach nowotworowych [67]. Taki zwiększony transport Arg poprzez system y^+ odnotowano w przypadku pierwotnego raka gruczołowego i jego przerzutów do wątroby [68].

Wiadomo, że z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu, dochodzi do wytworzenia NO, co poza innymi funkcjami może hamować tworzenie się i uwalnianie wolnych rodników (Ryc.1.2.2) [69].

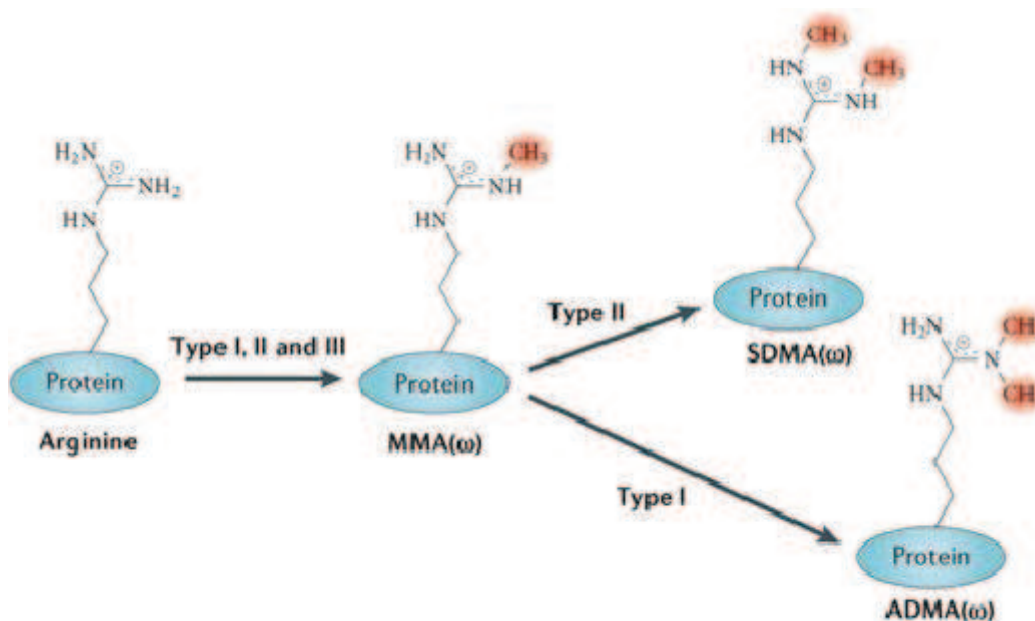


Ryc. 1.2.2. Reakcja powstawania tlenku azotu katalizowana przez syntazę tlenku azotu [39]

W komórkach nowotworowych spotykamy wszystkie trzy izoformy NOS; wspomniane wcześniej iNOS i eNOS oraz neuronalną (nNOS). Tą najczęściej spotykaną jest iNOS, a w przypadku raka sutka stopień ekspresji tej syntazy koreluje ze stopniem zaawansowania guza [70]. W przypadku łagodnych nowotworów, taka zależność nie jest obserwowana. Tlenek azotu, który jest jednym z najważniejszych mediatorów i neuroprzekaźników jest wytwarzany w procesie metabolizmu argininy i odgrywa wiele ważnych ról w organizmie ludzkim. Na ogół powoduje rozszerzenie naczyń, hamuje agregację płytek krwi, adhezję monocytów, uwalnianie wolnych rodników, proliferację mięśni gładkich i utlenianie LDL. Jest on również zaangażowany w proces neurotransmisji w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Pomimo swojej niezwykle pozytywnej roli, należy jednak zauważyć, że zbyt wysoki poziom NO ma działanie cytotoksyczne. Tak więc, niezbędne są mechanizmy regulacyjne, które będą kontrolować i utrzymywać właściwy poziom. Jednym z takich regulatorów wydaje się być arginaza. Niektórzy autorzy uważają, że arginaza „wykorzystuje” L-argininę jako substrat, w ten sposób chroniąc komórki przed nadmiernym wytwarzaniem tlenku azotu. Rozważa się także rolę NO jako czynnika proapoptotycznego. Brak zdolności do apoptozy jest jedną z podstawowych funkcji komórek nowotworowych, umożliwiając im przeżycie i proliferację. W małych stężeniach tlenek azotu hamuje apoptozę, natomiast bardzo wysoki poziom NO przyczynia się zaprogramowania śmierci komórki [70]. Endogenne NO okazał się odpowiedzialny za hamowanie apoptozy komórek czerniaka w procesie potranslacyjnej modyfikacji białek regulatorowych [71]. Innym ważnym aspektem w procesie nowotworzenia jest angiogeneza, która w przypadku niektórych nowotworów jest bezwzględnie konieczna do wzrostu guza. NO może stymulować rozwój naczyń i predysponować do przerzutów drogą naczyń krwionośnych. Tlenek azotu odgrywa rolę

w wielu stadiach rozwoju naczyń, takich jak stymulacja proliferacji śródbłonna i czynników wzrostu naczyń (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) [71].

Arginina jest także substratem dla metylotransferaz argininy. Metylacja białek jest procesem potranslacyjnej modyfikacji, która jest reakcją kowalencyjną i nieodwracalną. Izomer argininy - asymetryczna dimetyloarginina i symetryczna dimetyloarginina (SDMA) są produktami takiej reakcji (Ryc.1.2.3). ADMA działa jako endogenny, kompetycyjny inhibitor wszystkich trzech form NOS. Konkuruje z L-argininą, dla której NO jest również substratem.



Ryc.1.2.3. Arginina i jej metylowane pochodne [72]

W pierwszych doniesieniach dotyczących roli ADMA opisywano obniżenie poziomu NO, w przypadku podwyższonego poziomu asymetrycznej dimetyloargininy [73]. ADMA, SDMA i L-NMMA (monometyloarginina) przechodzą do komórek poprzez transportery aminokwasów kationowych (CAT), znany również jako γ + [74]. Wszystkie trzy izoformy dimetyloargininy są wydalane drogą nerek. Patomechanizm wzrostu poziomu ADMA do patologicznych wartości może być następujący: zwiększona metylacja białek przez PRMT; zwiększona proteoliza i w konsekwencji zwiększone wydalanie metyloarginin; również nieprawidłowe nerkowe wydzielanie i upośledzenie funkcji/metabolizmu dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAH). Ten ostatni enzym jest odpowiedzialny za eliminację ADMA poprzez degradację do cytruliny i dimetyloaminy lub monometyloaminy. Istnieją doniesienia opisujące zwiększoną ekspresję PMRT podczas stresu [75], a także w niewydolności serca (stan hyperwolemii) [76], niewydolności nerek lub diety

o wysokiej zawartości soli [77]. W warunkach hiperkatabolicznych, takich jak dystrofia mięśniowa lub endotoksemia [78], zwiększona proteoliza może również zwiększać poziom ADMA. Wykazano, że ADMA jest niezależnym czynnikiem ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych i może odgrywać rolę jako marker wczesnej dysfunkcji narządów oraz śmiertelności na oddziałach intensywnej terapii [79]. Jak wspomniano wcześniej, do tej pory opublikowano dwa wstępne raporty dotyczące roli ADMA w onkologii. Szuba i wsp. [51] przebadali 86 pacjentów leczonych z powodu nowotworów układu krwiotwórczego. Zaobserwowano wzrost L-argininy i ADMA. Nadmierny katabolizm białek charakterystyczny dla chorób nowotworowych układu krwiotwórczego został uznany za jeden z czynników wpływających na te wyniki. Drugie badanie dotyczyło dorosłych ozdowieńców, którzy w dzieciństwie byli leczeni z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej i osiągnęli kliniczną remisję [52]. Autorzy wykazali nieznaczny wzrost poziomu asymetrycznej dimetyloargininy i zasugerowali, że ADMA może być bardzo wczesnym czynnikiem predykcyjnym śmiertelności z powodu chorób układu krążenia u tych chorych.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena stężeń wybranych aminokwasów i ich zachowanie się w zależności od etapu leczenia onkologicznego u dzieci dotkniętych chorobą nowotworową.

Cel pracy został zrealizowany poprzez:

- I. Oznaczenie stężeń argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy w surowicy na różnych etapach leczenia onkologicznego:
 - A – okres wstępny przed rozpoczęciem terapii
 - B – w trakcie aktywnej chemio- i lub radioterapii
 - C – po pomyślnym zakończeniu leczenia
- II. Porównanie otrzymanych wyników w grupie pediatrycznych pacjentów onkologicznych z grupą kontrolną rekrutowaną spośród dzieci zdrowych
- III. Poszukiwanie zależności pomiędzy profilem wybranych aminokwasów a etapem leczenia, uzyskiwaną odpowiedzią na terapię, a także budową histologiczną nowotworu i wpływem radioterapii.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Charakterystyka badanych dzieci

Badane dzieci zostały podzielone na dwie grupy:

- grupa I obejmowała dzieci zdrowe, z których utworzono grupę porównawczą (kontrolną)
- grupa II obejmowała dzieci leczone z powodu choroby nowotworowej

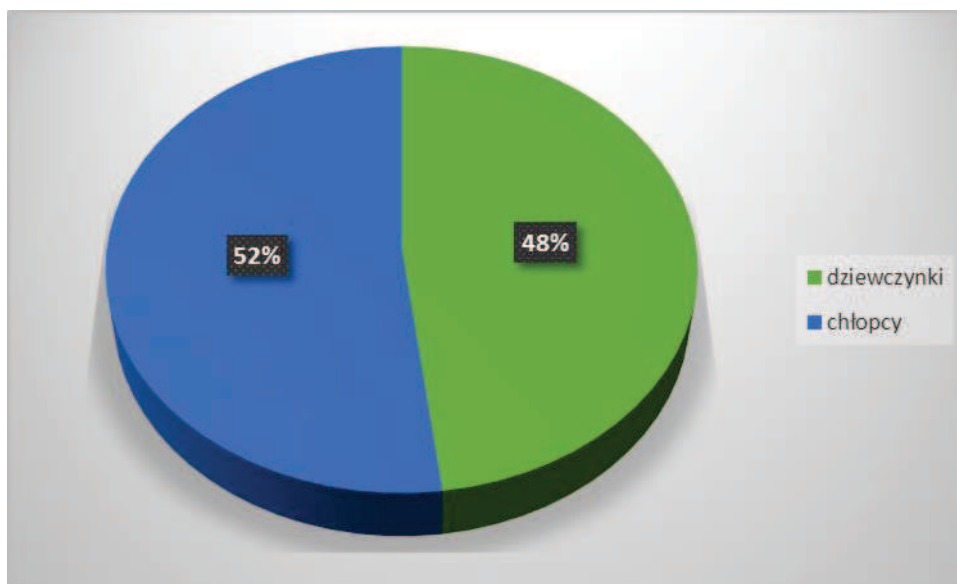
Grupa I kontrolna

Do badań zakwalifikowano 34 dzieci zdrowych w wieku od 2 lat do 18 roku życia, przebywających w Klinice Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży GUMed. Bezpośrednim powodem hospitalizacji tych pacjentów była planowana korekcja wrodzonych nieprawidłowości (obecność przepuklin, stulejka). W oparciu o badania fizykalne oraz podstawowe badania laboratoryjne (OB, morfologię z rozmazem, CRP, transaminazy, BUN, kreatyninę, kwas moczowy i badanie ogólne moczu) nie stwierdzono u nich istnienia czynnego procesu chorobowego. Dzieci otrzymywały dietę ogólną odpowiednią do wieku. Stosunek dziewcząt do chłopców był 13/21. Średni wiek dzieci wynosił 8,1 lat, mediana 7 lat.

Grupa II onkologiczna

Grupę II – onkologiczną stanowiło 50 pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową, w wieku od 4 miesięcy do 18 roku życia leczonych w okresie październik 2012 - styczeń 2015 w pediatrycznych ośrodkach onkologicznych w Gdańsku, Łodzi i Białymstoku (Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed, Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Klinika Onkologii i Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku)

Średni wiek wynosił 8,4 lat, mediana 7,00. Stosunek dziewcząt do chłopców był 24/26 (48/52%). Graficznie przedstawiono to na ryc. 3.1.1

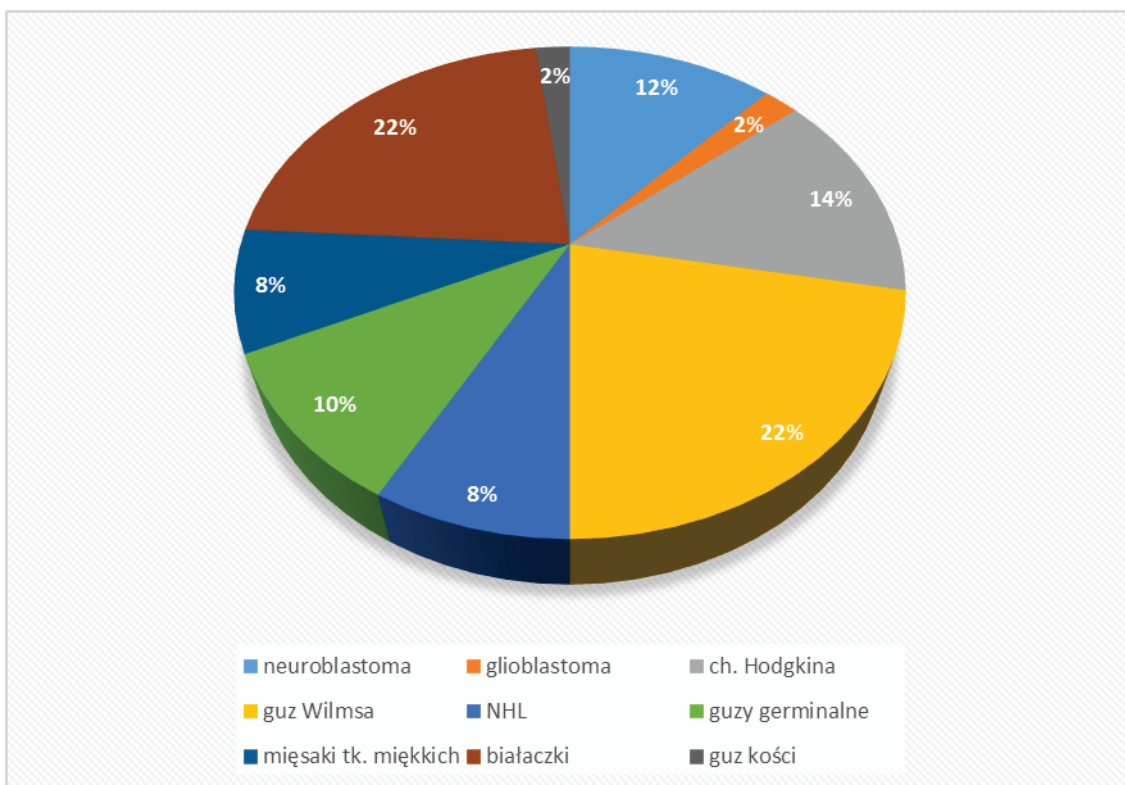


Ryc. 3.1.1. Procentowy udział dziewczynek i chłopców w grupie II onkologicznej

W dalszej analizie chorych podzielono na dwie podgrupy w zależności od budowy histologicznej nowotworu (guzy lite i choroby rozrostowe układu krwiotwórczego) i etapu leczenia. Badania histologiczne tkanki nowotworowej były wykonywane w Zakładach Patomorfologii w Gdańsku, Łodzi i Białymstoku oraz weryfikowane w Zakładzie Patomorfologii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. W grupie pacjentów z guzami litymi byli pacjenci z rozpoznaniem: guza Wilmsa, nerwiaka zarodkowego współczulnego (neuroblastoma), guza germinalnego, mięsaka tkanek miękkich, guza kości i guza mózgu.

Rozpoznanie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego (ostra białaczka limfoblastyczna- ALL, ostra białaczka nieлимfoblastyczna- ANLL, chłoniak nieziarniczny - NHL, chłoniak Hodgkina- HL) postawiono na podstawie biopsji aspiracyjnego i trepanobiopsji szpiki kostnej oraz cytometrii przepływowej bądź badania histopatologicznego pobranego węzła chłonnego.

Graficznie dane te obrazuje ryc. 3.1.2



Ryc. 3.1.2. Procentowy udział typów histologicznych w grupie II onkologicznej

W oparciu o wywiad zebrany od najbliższej rodziny u dzieci chorych stosowano dietę ogólną odpowiednią do wieku przed rozpoczęciem leczenia. Krew do badań pobierano w ilości 5 ml z wkłucia obwodowego, bądź z cewników centralnych. W grupie kontrolnej dokonywano jednorazowego oznaczenia badanych parametrów (arginina, glutamina, asymetryczna dimetyloarginina). Natomiast u pacjentów będących w okresie aktywnego leczenia onkologicznego wykonywano oznaczenia w/w parametrów przed rozpoczęciem wstępnym chemioterapii (49 pacjentów) i/lub w trakcie leczenia (20 pacjentów) oraz po zakończonym leczeniu (44 pacjentów). Powyższa różnica w liczbie pacjentów po pomyślnym zakończeniu terapii wynikała z błędu przedlaboratoryjnego.

W dalszej analizie pacjentów onkologicznych podzielono na dwie podgrupy:

IIA – chorych z dobrą odpowiedzią na leczenie (kliniczna remisja - CR i częściowa remisja - PR)

IIB – chorzy, u których stwierdzono brak odpowiedzi na leczenie, progresję lub wznowę choroby nowotworowej.

Na przeprowadzenie badań w Gdańsku, Łodzi i Białymstoku uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKBBN/199/2010 i NKBB/199-223/2012).

Opiekunowie prawni pacjentów po zapoznaniu się z celem badań wyrazili świadomą pisemną zgodę na pobranie materiału biologicznego.

3.2 Metody prowadzonych badań

Oznaczanie stężenia argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy.

Materiał badany: Krew żylną -5 ml- do badań pobierano na czczo do probówki na skrzep. Surowicę wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut z przyspieszeniem 3000xg z wykorzystaniem wirówki MPW-212.

3.2.1 Warunki oznaczania stężenia argininy i glutaminy w surowicy

Oznaczenia aminokwasów dokonywano po uprzednim przygotowaniu próbek jak podano wyżej. Wykorzystano ultrasprawy chromatograf cieczerowy Nexera UHPLC (Shimadzu) oraz kolumnę 150x4 Kinetex RP18.

Argininę i glutaminę oznaczano metodą z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczerowej (UHPLC) w odwróconym układzie faz. Ponieważ tylko niektóre aminokwasy wykazują samoistną fluorescencję, niezbędne było zastosowanie przedkolumnowej derywatyżacji. Próbkę osocza oraz roztwory kalibracyjne aminokwasów były buforowane przed derywatyżacją w roztworze tetraboranu sodu o pH 9,5.

Do analizy pobierano 0.1 ml osocza, rozcieńczano 5-krotnie mieszaniną metanol:woda w stosunku 2:8, a następnie odwirowywano przez 16 minut- 4000 obrotów/min. Następnie supernatant rozcieńczono 4-krotnie i poddano analizie chromatograficznej.

Kontrolę jakościową i ilościową przeprowadzano za pomocą roztworu wolnych L-aminokwasów do chromatograficznego badania próbek biologicznych firmy SIGMA ALDRICH. Otrzymane wyniki przedstawiono jako ilość nmoli w 1 ml (nmol/ml).

3.2.2. Warunki oznaczania asymetrycznej dimetyloargininy

Do oznaczeń stężenia asymetrycznej dimetyloargininy wykorzystano zestaw Xpress Elisa firmy Imundiagnostik (Niemcy).

Oznaczenia ADMA dokonywano w próbkach surowicy pobranej od badanych chorych i grupy kontrolnej. Do pomiarów użyto płytki fabrycznie opłaszczanej poliklonalnymi przeciwciałami dla asymetrycznej dimetyloargininy. Zmianę absorbancji mierzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Wykorzystano aparat StatFax-2200 [ELM-3000]. Stężenie ADMA w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czułość metody wynosiła 0,04 $\mu\text{mol/l}$.

Otrzymane wyniki przedstawiono jako ilość μmoli w 1 litrze ($\mu\text{mol/l}$).

Oznaczeń ADMA dokonano w Zakładzie i Katedrze Żywienia Klinicznego i Dietetyki GUMed, natomiast wybranych aminokwasów w Zakładzie Toksykologii Środowiska GUMed.

3.3 Opracowanie statystyczne

Otrzymany materiał badany poddano analizie statystycznej.

Wyniki uzyskanych badań opracowano statystycznie. Dla wszystkich grup zostały wyliczone wartość średnia (X), mediana (M), kwartale (25Q-75Q), zakres (min-max) i odchylenie standardowe (SD) badanych parametrów ciągłych.

Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w grupach przeprowadzono metodą analizy wariancji ANOVA lub dla grup o małej liczbie przypadków albo niejednorodnej wariancji, testem nieparametrycznym sumy rang Kruskala-Wallisa (jednorodność wariancji sprawdzano testem Bartlett'a).

Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w próbkach zależnych przeprowadzono testem nieparametrycznym kolejności par Wilcoxon.

$P \leq 0.05$ uznawano za znaczące statystycznie. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując komputerowy pakiet programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.1.1.14 (z dnia 2-07-2013).

4. WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

4.1. Grupa I kontrolna

Stężenie poszczególnych aminokwasów w surowicy krwi zawarto w tabeli 4.1.1.

Arginina i glutamina nie zostały oznaczone u wszystkich pacjentów ze względu na błąd przedlaboratoryjny.

Tabl. 4.1.1. Stężenie argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy w surowicy w grupie I (kontrolnej)

	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	32	104,5	86,0	15,7	342,7	64,8	118,0	69,4
Gln	33	773,9	741,2	100,4	1880,8	375,1	1106,4	471,6
ADMA	34	1,10	1,09	0,32	2,84	0,83	1,28	0,44

Obrazuje ona wartości średnie, mediany, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne poszczególnych pacjentów.

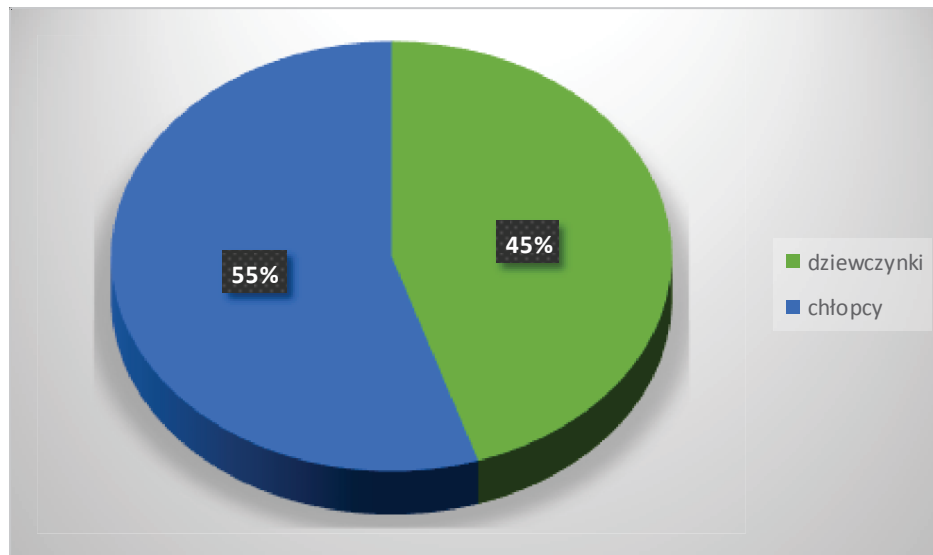
Analiza porównawcza pacjentów grupy kontrolnej z uwzględnieniem podziału na wiek (od 2 lat do 18 roku życia) oraz płeć nie wykazała różnic znamienne statystycznych dotyczących oznaczanych parametrów. Dlatego też przyjęto za normy wartości opracowane w oparciu o łączną analizę całej grupy badanej bez uwzględnienia różnic wiekowych i płci.

4.2. Grupa II onkologiczna

W oparciu o analizę grupy kontrolnej nie stwierdzono różnic w wynikach kontrolnych w zależności od płci i wieku. Dlatego w dalszych rozważaniach nie uwzględniono tych zależności u badanych chorych. Natomiast, aby ocenić związek pomiędzy stężeniem poszczególnych aminokwasów a stanem klinicznym choroby nowotworowej (remisja, progresja/ wznowa) pacjentów grupy onkologicznej podzielono na trzy podgrupy:

- III1. Dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej przed rozpoczęciem aktywnego leczenia onkologicznego (50 pacjentów)
- III2. Chorzy aktywnie leczeni
- III3. Pacjenci, którzy pomyślnie zakończyli terapię onkologiczną

Wśród 20/50 pacjentów z czynnym procesem nowotworowym stosunek dziewcząt do chłopców stanowiła 9/11, a zatem płeć żeńska stanowiła 45 % badanej grupy. Obrazuje to Ryc. 4.2.1.



Ryc. 4.2.1. Płeć dzieci w grupie II (dzieci w trakcie aktywnego leczenia przeciwnowotworowego).

Podgrupa II3 obejmowała 44 spośród 50 dzieci, które pomyślnie zakończyły leczenie onkologiczne z powodu nowotworu złośliwego i są pod kontrolą Poradni Onkohematologicznych Dziecięcych.

Wśród badanych chorych z w/w grupy było 21 dziewczynek, co stanowi 48 % badanej grupy oraz 23 chłopców, co stanowi 52 %.

Oceniano stężenie argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy w powiązaniu z:

- A- etapem leczenia choroby nowotworowej,
- B- rozpoznaniem histologicznym nowotworu
- C- wpływem radioterapii na analizowane parametry
- D- przebiegiem choroby nowotworowej

A - etapy leczenia choroby nowotworowej

Aby dokonać oceny porównawczej stężeń analizowanych aminokwasów w surowicy odnoszono uzyskane wartości średnie w grupie chorych (przed – II1, w trakcie – II2 i po leczeniu – II3) do wyników średnich grupy kontrolnej.

Zmienna liczba pacjentów onkologicznych zawarta w tabelach wynika z błędu przedlaboratoryjnego i braku możliwości wykonania badań u poszczególnych pacjentów. Nieoznaczone parametry dotyczą różnych pacjentów.

III. Pacjenci onkologiczni przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego

Szczegółowe dane pokazujące średnie, mediany, odchylenia standardowe oraz zakres wartości minimalnych i maksymalnych analizowanych parametrów obrazuje tabela 4.2.1.

Tab. 4.2.1. Stężenie argininy, glutaminy i ADMA w surowicy w grupie III (przed rozpoczęciem leczenia).

		N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Początek leczenia	49	150,0	115,5	41,7	582,0	71,0	185,3	113,6
Gln		49	452,4	335,0	68,7	1947,8	224,3	486,8	371,3
ADMA		48	1,86	1,88	0,71	2,70	1,46	2,38	0,57

Porównując grupę chorych z grupą zdrowych można stwierdzić podwyższenie stężenia Arg (mediana 115,5 nmol/ml, bliskie istotności statystycznej $p=0,0589$) i ADMA (mediana 1,88 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,00000$) oraz obniżenie stężenia Gln (mediana 335,0 nmol/ml, $p=0,0009$).

II2 – Pacjenci onkologiczni w trakcie aktywnego leczenia

Szczegółowe dane analizowanych parametrów przedstawia tabela 4.2.2.

Tab. 4.2.2. Stężenie argininy, glutaminy i ADMA w surowicy w grupie II2 (w trakcie leczenia)

Badane parametry	Etap leczenia	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	W trakcie leczenia	18	156,0	160,3	25,0	271,2	99,0	200,5	70,4
Gln		19	506,3	289,8	32,3	1880,4	216,5	568,3	501,7
ADMA		20	1,89	2,06	0,72	2,56	1,43	2,33	0,54

Porównując grupę chorych z grupą dzieci zdrowych stwierdzono: podwyższenie stężenia Arg (mediana 160,3 nmol/ml) i ADMA (mediana 2,06 $\mu\text{mol/l}$) oraz obniżenie Gln (mediana 289,8 nmol/ml). Wszystkie omawiane różnice w stężeniach aminokwasów między grupą kontrolną a onkologiczną wykazywały znamienność statystyczną.

II3 – Pacjenci onkologiczni po pomyślnie zakończonym leczeniu

Szczegółowe dane analizowanych parametrów przedstawia tabela 4.2.3.

Tab. 4.2.3. Stężenie argininy, glutaminy i ADMA w surowicy w grupie II3 (po leczeniu)

Badane parametry	Etap leczenia	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Koniec leczenia	44	191,5	171,8	48,0	522,0	111,4	252,1	103,5
Gln		44	317,6	299,3	25,4	680,1	205,0	423,6	152,0
ADMA		42	1,81	1,79	0,75	2,99	1,54	2,11	0,49

Porównując wyniki pacjentów tej grupy z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej zdrowych dzieci stwierdzono wyższe wartości argininy (mediana 171,8 nmol/ml) i ADMA (mediana 1,79 μ mol/l) oraz obniżenie stężenia glutaminy (mediana 299,3 nmol/ml)

Stwierdzone różnice w stężeniach wszystkich aminokwasów między grupą kontrolną a onkologiczną po leczeniu były statystycznie znamienne.

Zbiorcze przedstawienie istotności statystycznej na wszystkich etapach leczenia onkologicznego zamieszczono w tabeli 4.2.4.

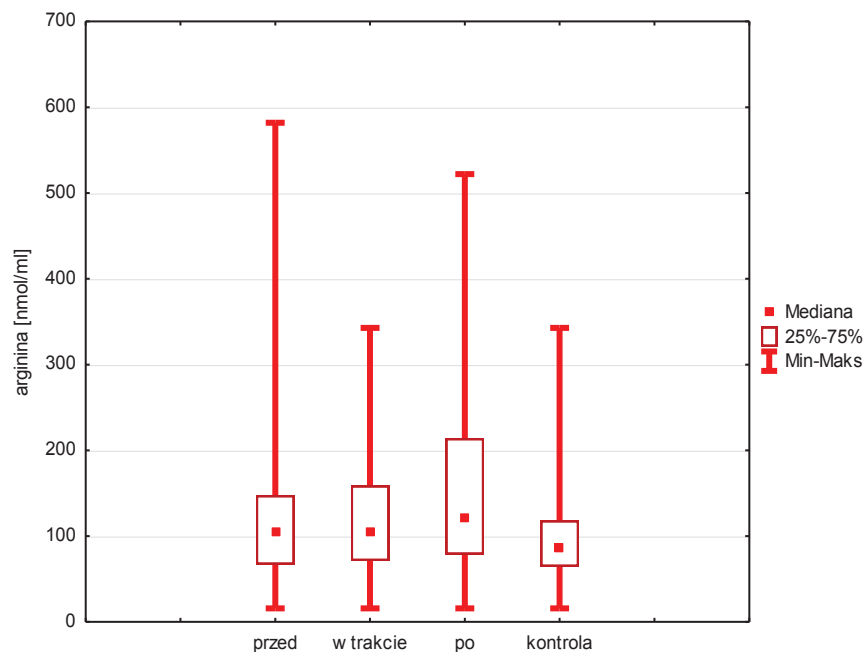
Tab. 4.2.4. Znamienność statystyczna poszczególnych aminokwasów na różnych etapach leczenia pomiędzy grupą onkologiczną a kontrolną.

		p Onkologia vs kontrola
Arg	Początek leczenia	0,0589*
Gln		0,0009*
ADMA		0,00000
Arg	W trakcie leczenia	0,0060*
Gln		0,0220*
ADMA		0,0000*
Arg	Koniec leczenia	0,0000*
Gln		0,0000*
ADMA		0,00000

Legenda: p – statystyczny poziom istotności, *test Kruskala-Wallis

Aby odpowiedzieć na pytanie jak zmieniają się wartości analizowanych parametrów dokonano analizy porównawczej poszczególnych aminokwasów w zależności od etapu leczenia.

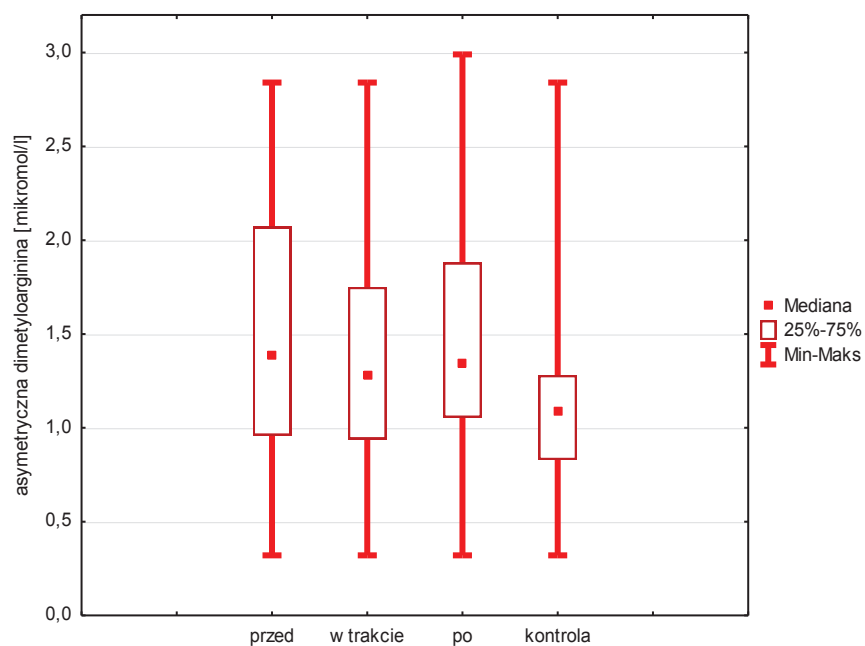
Ryc. 4.2.2 Stężenie argininy w surowicy przed, w trakcie i po leczeniu onkologicznym



Podwyższone stężenie argininy na wszystkich etapach leczenia onkologicznego w porównaniu z grupą kontrolną. Najwyższe stężenie Arg uzyskano u pacjentów po zakończonym leczeniu onkologicznym ($p=0,0000$)

Podobnie zachowuje się stężenia ADMA w surowicy (ryc. 4.2.3.)

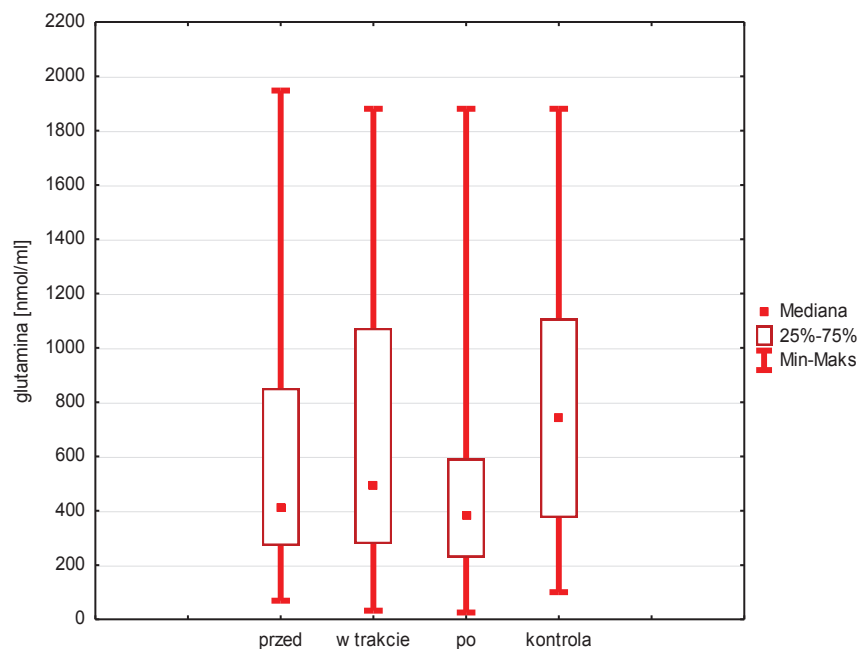
Ryc. 4.2.3 Stężenie ADMA w surowicy przed, w trakcie i po leczeniu onkologicznym



Statystycznie znaczne podwyższone stężenie ADMA ($p=0,0000$) na wszystkich etapach leczenia onkologicznego w porównaniu z grupą kontrolną. Najwyższe stężenie ADMA uzyskano u pacjentów przed rozpoczęciem leczenia.

Stwierdzono odmienne zachowanie się stężenia glutaminy w surowicy od pozostałych parametrów (ryc. 4.2.4.)

Ryc. 4.2.4 Stężenie glutaminy w surowicy przed, w trakcie i po leczeniu onkologicznym



Statystycznie znaczne obniżenie stężenia glutaminy na początku leczenia ($p=0,0009$), w trakcie leczenia ($p=0,0220$) i na koniec leczenia onkologicznego ($p=0,0000$) w porównaniu z grupą kontrolną. Najniższe stężenie glutaminy osiągnęli pacjenci po pomyślnie zakończonej terapii.

Zbiorczo przedstawiono w tabeli 4.2.5 zachowanie się aminokwasów na poszczególnych etapach leczenia określając ich statystyczny poziom istotności

Tab. 4.2.5. Statystyczny poziom istotności Arg, Gln i ADMA na poszczególnych etapach leczenia.

Oznaczone parametry	p					
		początek vs w trakcie		początek vs koniec		w trakcie vs koniec
ARG	17	0,266	43	0,0664	13	0,463
GLN	18	0,231	43	0,287	14	0,0480
ADMA	20	0,467	40	0,554	13	0,345

Legenda: p – statystyczny poziom istotności

Istotną znamienność statystyczną wykazano jedynie w stężeniu glutaminy pomiędzy grupą chorych w trakcie a zakończonym leczeniem.

B – ocena zależności analizowanych parametrów od budowy histologicznej

nowotworu

Grupę pacjentów onkologicznych podzielono na dwie podgrupy w zależności od budowy histologicznej nowotworu:

I – dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego (białaczki i chłoniaki)

II – guzy lite (nerwiak zarodkowy współczulny, guz Wilmsa, mięsaki tkanek miękkich, guz mózgu, guzy kości i guzy germinalne).

Stężenia argininy i ADMA w grupie I i II na początku leczenia w porównaniu do grupy kontrolnej były podwyższone. Różnicę statystycznie znamiennej stwierdzono w grupie II w przypadku Arg oraz w grupie I i II w ADMA. Stężenie glutaminy w obu grupach dzieci onkologicznych było obniżone w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,0002$, $p=0,0425$, odpowiednio).

W trakcie leczenia onkologicznego nie u wszystkich pacjentów udało się dokonać oznaczeń poszczególnych aminokwasów. Różnice istotne statystycznie stwierdzono w grupie I i II versus kontrola dla Arg i ADMA, natomiast dla Gln jedynie w grupie II.

Podobne wyniki jak na początku leczenia uzyskano w grupie I i II dla wszystkich oznaczanych parametrów. Znamienność statystyczną uzyskano dla wszystkich aminokwasów.

Nie znaleziono zależności znamiennej statystycznie pomiędzy grupą I a II na wszystkich etapach leczenia.

Szczegółowe zestawienie przedstawiono w tabelach 4.2.6, 4.2.7, 4.2.8 i na rycinach 4.2.5-4.2.13.

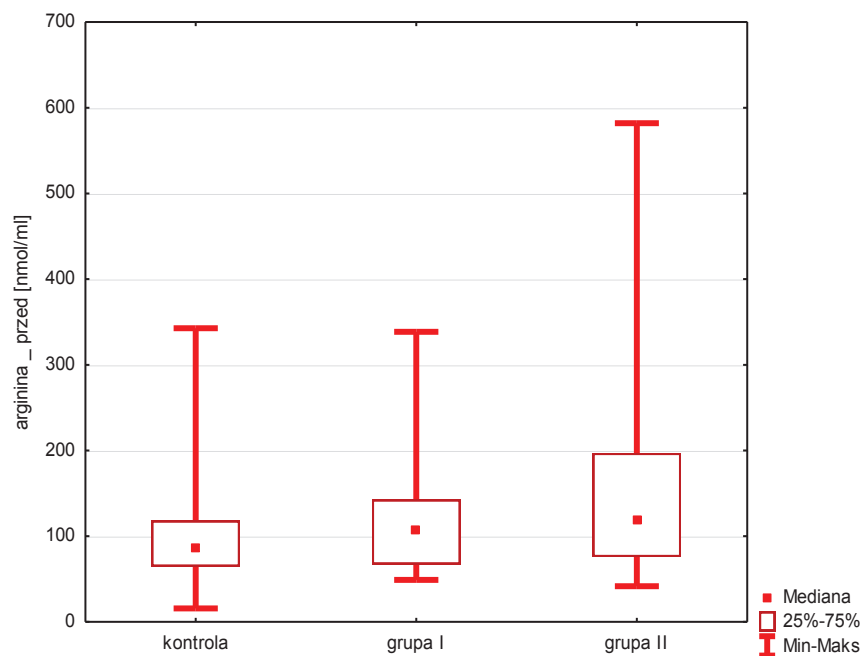
Tab. 4.2.6. Stężenia argininy, glutaminy i ADMA w grupie I w zależności od etapu leczenia.

Badane parametry	Etap leczenia	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Początek leczenia	22	133,0	108,4	49,0	338,6	67,3	142,6	84,7
Gln		22	327,8	289,0	68,7	803,0	224,3	436,7	161,1
ADMA		22	1,90	1,91	0,71	2,70	1,75	2,38	0,59
Arg	W trakcie leczenia	7		115,3	83,5	244,9	92,3	224,2	
Gln		8		384,3	32,3	1880,4	144,9	861,0	
ADMA		8		2,29	0,72	2,56	1,56	2,44	
Arg	Koniec leczenia	20	211,2	203,0	66,3	522,0	134,4	261,0	111,4
Gln		20	327,9	335,7	66,1	545,0	189,0	447,7	150,1
ADMA		19	1,75	1,75	0,75	2,99	1,35	2,11	0,60

Tab. 4.2.7. Stężenia argininy, glutaminy i ADMA w grupie II w zależności od etapu leczenia.

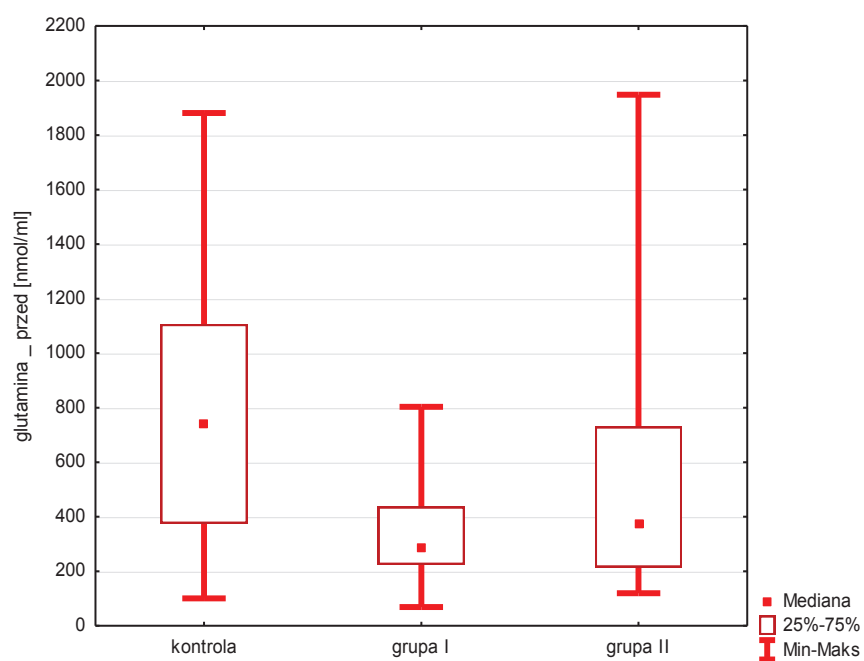
Badane parametry	Etap leczenia	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Początek leczenia	27	163,8	118,1	41,7	582,0	75,9	197,0	132,5
Gln		27	554,0	377,2	119,5	1947,8	214,8	730,2	458,0
ADMA		26	1,83	1,88	0,86	2,67	1,33	2,37	0,56
Arg	W trakcie leczenia	11		173,8	25,0	271,2	99,0	200,5	
Gln		11		274,5	195,4	1584,9	217,4	533,0	
ADMA		12		1,80	1,31	2,54	1,43	2,16	
Arg	Koniec leczenia	24	175,1	156,2	48,0	460,7	107,0	242,7	95,6
Gln		24	309,1	243,9	25,4	680,1	211,8	401,6	156,2
ADMA		23	1,86	1,85	1,10	2,44	1,60	2,25	0,39

Ryc. 4.2.5. Stężenie argininy w surowicy przed rozpoczęciem leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



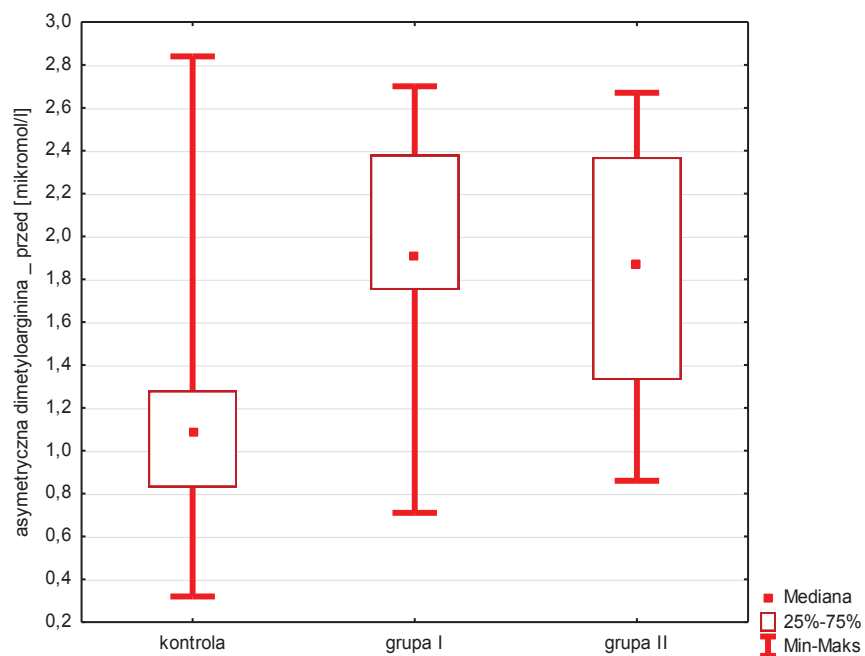
Stężenie argininy w grupie I (mediana 108,4 nmol/ml) i w grupie II (mediana 118,1 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 86,0 nmol/ml) było podwyższone. Jedynie w grupie II stwierdzono znamienność statystyczną ($p=0,0454$).

Ryc. 4.2.6. Stężenie glutaminy w surowicy przed rozpoczęciem leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



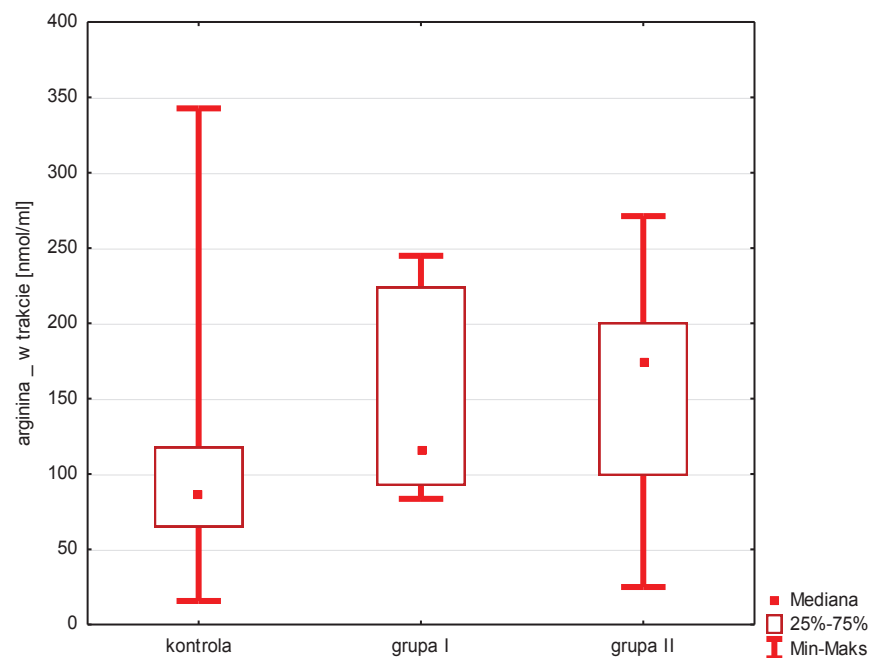
Stężenie glutaminy w grupie I (mediana 289,0 nmol/ml) i w grupie II (mediana 377,2 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 741,2 nmol/ml) było statystycznie obniżone ($p=0,0002$ i $p=0,0425$, odpowiednio)

Ryc. 4.2.7. Stężenie ADMA w surowicy przed rozpoczęciem leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



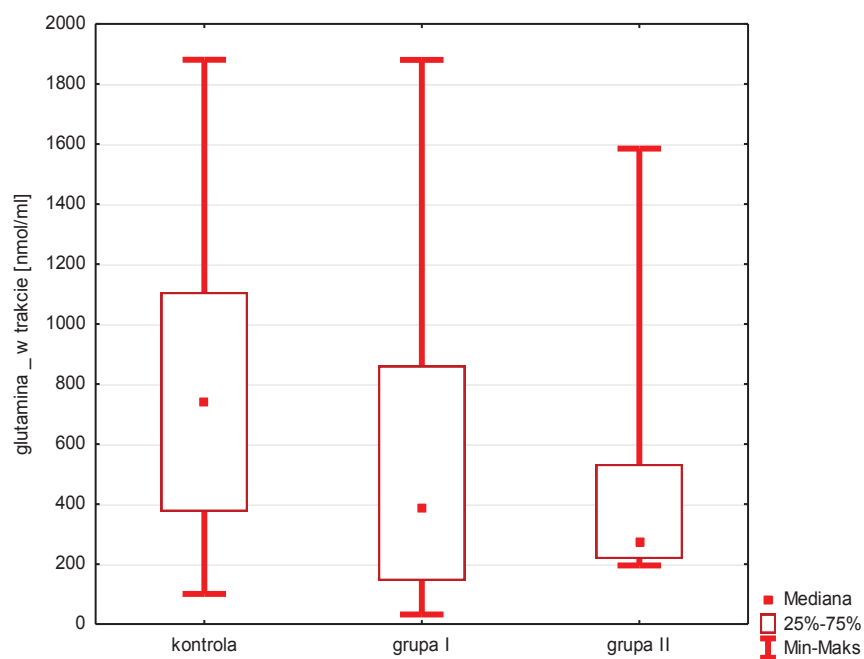
Znamiennie statystycznie podwyższone stężenie ADMA ($p=0,0000$) w grupie I (mediana $1,91 \mu\text{mol/l}$) i w grupie II (mediana $1,88 \mu\text{mol/l}$) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana $1,09 \mu\text{mol/l}$).

Ryc. 4.2.8. Stężenie argininy w surowicy w trakcie leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



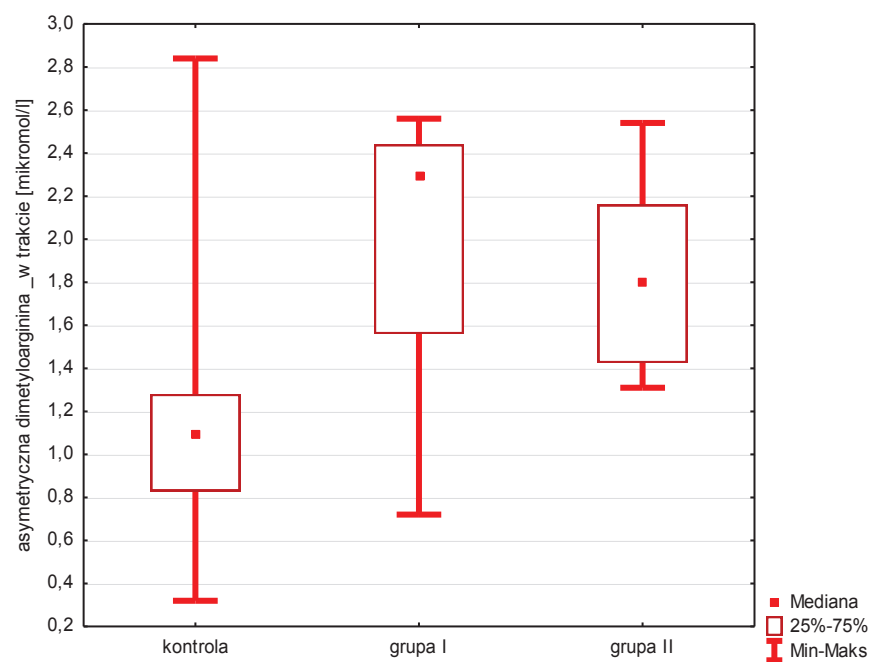
Stężenie argininy w grupie I (mediana 115,3 nmol/ml) i w grupie II (mediana 173,8 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 86,0 nmol/ml) było podwyższone. W obu grupach stwierdzono znamienność statystyczną ($p=0,0441$ i $p=0,0242$, odpowiednio)

Ryc. 4.2.9. Stężenie glutaminy w surowicy w trakcie leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



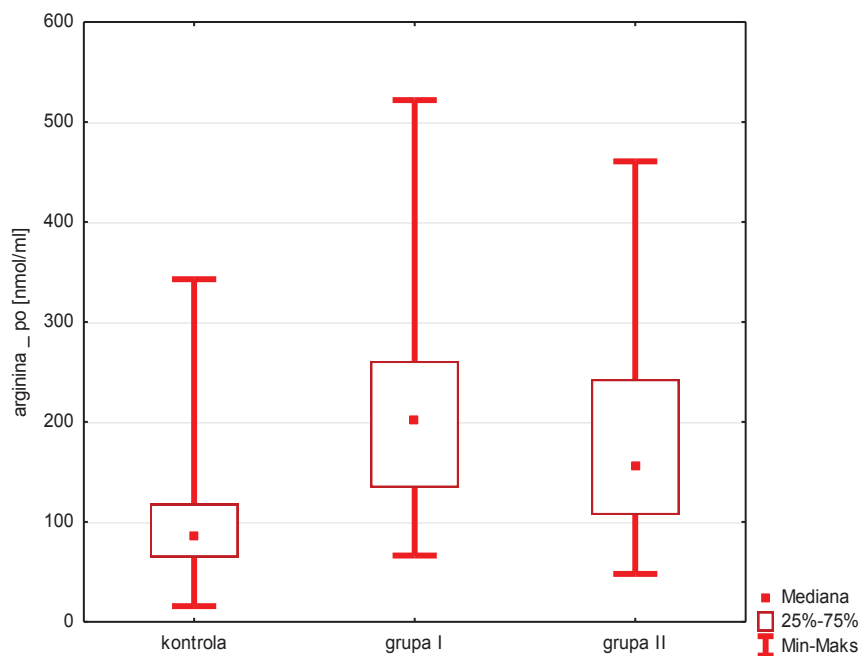
Stężenie glutaminy w grupie I (mediana 384,3 nmol/ml) i w grupie II (mediana 274,5 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 741,2 nmol/ml) było obniżone. Jedynie w grupie II opisano znamienność statystyczną ($p=0,0272$).

Ryc. 4.2.10. Stężenie ADMA w surowicy w trakcie leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



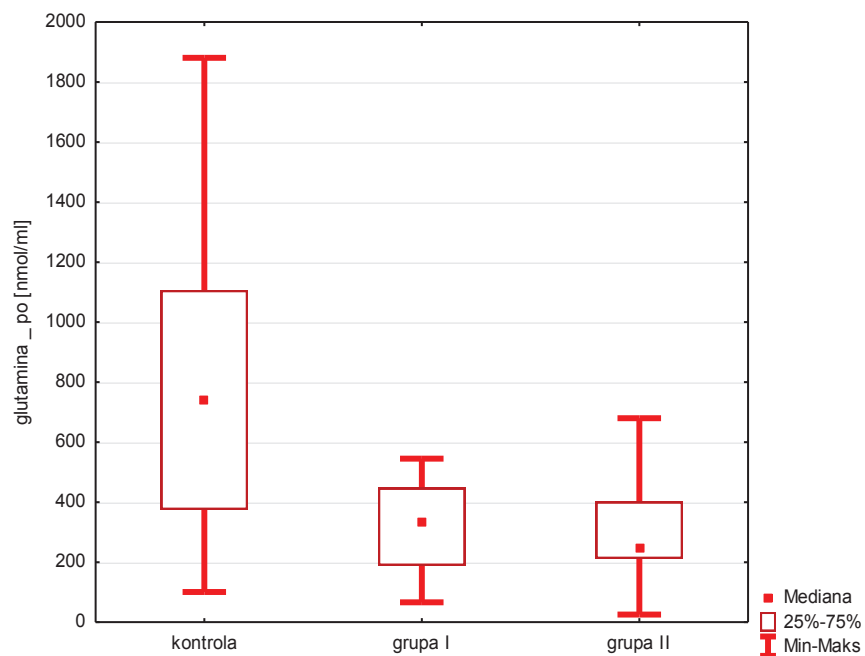
Znamiennie statystycznie podwyższone stężenie ADMA w grupie I (mediana 2,29 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0068$) i w grupie II (mediana 1,80 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0000$) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 1,09 $\mu\text{mol/l}$).

Ryc. 4.2.11. Stężenie argininy w surowicy po zakończeniu leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



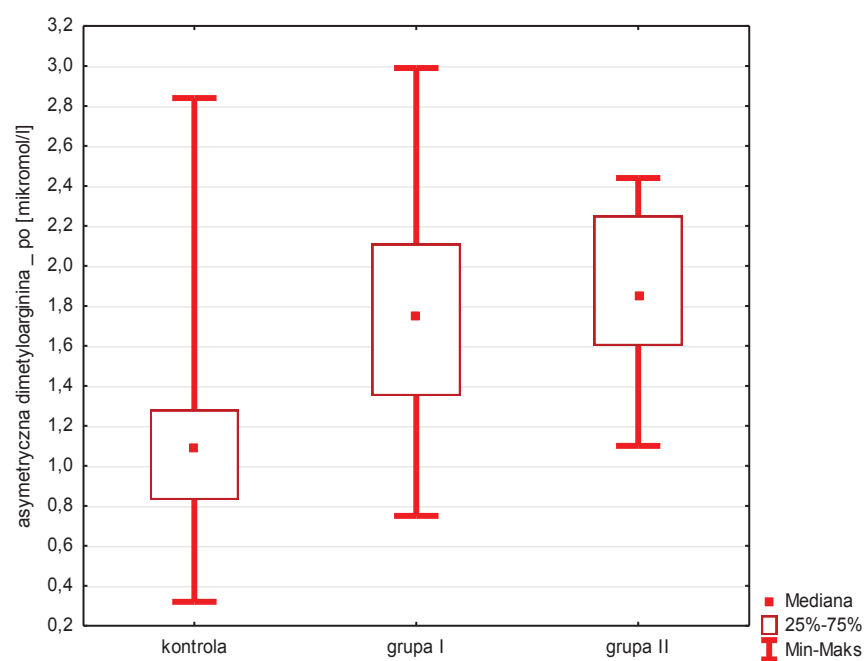
Stężenie argininy w grupie I (mediana 203,0 nmol/ml) i w grupie II (mediana 118,1 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (86,0 nmol/ml) było podwyższone. Stwierdzono istotność statystyczną w obu grupach ($p=0,0001$ i $p=0,0014$, odpowiednio).

Ryc. 4.2.12. Stężenie glutaminy w surowicy w trakcie leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



Stężenie glutaminy w grupie I (mediana 335,7 nmol/ml) i w grupie II (mediana 243,9 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 741,2 nmol/ml) wykazało statystycznie znaczne obniżenie wartości ($p=0,0008$ oraz $p=0,0001$, odpowiednio).

Ryc. 4.2.13. Stężenie ADMA w surowicy w trakcie leczenia w grupie I i II w stosunku do grupy kontrolnej



Znamiennie statystycznie podwyższone stężenie ADMA w grupie I (mediana 1,75 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0001$) i w grupie II (mediana 1,85 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0000$) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 1,09 $\mu\text{mol/l}$).

Tab. 4.2.8. Poziom istotności statystycznej dla argininy, glutaminy i ADMA w grupie I i II

Badane parametry	Etap leczenia	p Gr I vs Gr II	p Gr I vs kontrola	p Gr II vs kontrola
Arg	Początek leczenia	0,457*	0,260*	0,0454*
Gln		0,191*	0,0002*	0,0425*
ADMA		0,748*	0,0000*	0,0000*
Arg	W trakcie leczenia	0,964*	0,0441*	0,0242*
Gln		0,869*	0,195*	0,0272*
ADMA		0,316*	0,0068*	0,0000*
Arg	Koniec leczenia	0,278*	0,0001*	0,0014*
Gln		0,741*	0,0008*	0,0001*
ADMA		0,536*	0,0001*	0,0000*

*test Kruskala-Wallis

C – Wpływ radioterapii na analizowane parametry

Pacjentów onkologicznych podzielono na dwie podgrupy

IIA – dzieci, u których zastosowano radioterapię (n=13)

IIB – dzieci, u których nie stosowano radioterapii (n=37)

Porównując obydwie grupy nie uzyskano różnic znamienne statystycznych w zakresie wszystkich oznaczanych parametrów. Porównanie to przedstawiono w tabelach 4.2.9 i 4.2.10

Tab. 4.2.9 Stężenie argininy, glutaminy i ADMA u pacjentów w podgrupie IIA

		N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Początek leczenia	13	109,2	107,2	41,7	234,4	71,0	142,1	51,7
Gln		13	407,4	335,0	119,5	1167,3	214,8	498,8	295,4
ADMA		13	1,58	1,52	0,71	2,56	0,97	2,39	0,70
Arg	W trakcie leczenia	7		146,8	25,0	256,7	92,3	198,0	
Gln		7		246,5	197,7	568,3	216,5	533,0	
ADMA		7		1,70	1,08	2,35	1,31	2,31	
Arg	Koniec leczenia	11		158,4	63,6	460,7	101,5	256,0	
Gln		11		345,0	132,4	680,1	182,6	456,1	
ADMA		10		1,65	1,05	2,34	1,35	2,05	

Tab. 4.2.10 Stężenie argininy, glutaminy i ADMA u pacjentów w podgrupie IIB

		N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Arg	Początek leczenia	36	164,7	117,9	49,0	582,0	71,8	218,1	126,2
Gln		36	468,7	342,2	68,7	1947,8	241,7	480,0	397,7
ADMA		35	1,96	1,98	0,86	2,70	1,77	2,37	0,48
Arg	W trakcie leczenia	11		173,8	79,0	271,2	104,4	224,2	
Gln		12		384,3	32,3	1880,4	235,0	895,9	
ADMA		13	1,98	2,09	0,72	2,56	1,55	2,38	0,56
Arg	Koniec leczenia	33	192,4	179,9	48,0	522,0	117,9	247,3	101,9
Gln		33	304,5	275,0	25,4	545,9	208,8	390,8	141,0
ADMA		32	1,84	1,83	0,75	2,99	1,57	2,19	0,51

Tab. 4.2.11 Poziom istotności statystycznej dla argininy, glutaminy i ADMA w grupie IIA vs IIB

		p RTX- vs RTX+
Arg	Początek leczenia	0,287*
Gln		0,634*
ADMA		0,0994*
Arg	W trakcie leczenia	0,618*
Gln		0,353*
ADMA		0,219*
Arg	Koniec leczenia	0,561*
Gln		0,476*
ADMA		0,755*

*test Kruskala-Wallis

D – Ocena porównawcza analizowanych parametrów ze stanem klinicznych choroby nowotworowej (progresja/wznowa, remisja)

Analizując grupę onkologiczną pod kątem przebiegu choroby podzielono ją na dwie podgrupy:

IIA- grupę chorych, u których osiągnięto kliniczną remisję

IIB- grupę chorych, u których nastąpiła progresja lub wznowa choroby nowotworowej

Tab.4.2.12 Stężenie argininy, glutaminy i ADMA u pacjentów w grupie IIA

		N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
ARG	Początek leczenia	44	145,7	116,6	41,7	460,2	73,5	191,2	97,9
GLN		44	463,9	329,7	68,7	1947,8	220,6	492,8	387,6
ADMA		43	1,88	1,88	0,71	2,70	1,45	2,38	0,57
ARG	W trakcie leczenia	15	160,2	173,8	25,0	271,2	99,0	224,2	73,9
GLN		16	526,1	282,2	32,3	1880,4	207,1	585,6	543,4
ADMA		17	1,87	2,04	0,72	2,54	1,44	2,27	0,80
ARG	Koniec leczenia	39	191,0	173,0	48,0	522,0	110,4	249,6	105,5
GLN		39	307,9	292,6	25,4	637,0	208,8	390,8	139,9
ADMA		38	1,78	1,76	0,75	2,99	1,53	2,08	0,50

U pacjentów będących w remisji choroby nowotworowej stężenie Arg na wszystkich etapach leczenia było podwyższone (początek leczenia – mediana 116,6 nmol/ml; w trakcie leczenia - mediana 173,8 nmol/ml; koniec leczenia – mediana 173,0 nmol/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 86,0 nmol/ml).

Podobnie zachowywała się ADMA (początek leczenia – mediana 1,88 μ mol/l; w trakcie leczenia - mediana 2,04 μ mol/l; koniec leczenia – mediana 1,76 μ mol/l) w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 1,09 μ mol/l).

Natomiast stężenie glutaminy na wszystkich etapach leczenia było obniżone w stosunku do grupy kontrolnej (mediana 741,2 nmol/ml): początek leczenia – mediana 329,7 nmol/ml; w trakcie leczenia - mediana 282,2 nmol/ml; koniec leczenia – mediana 292,6 nmol/ml.

Tab.4.2.13 Stężenie argininy, glutaminy i ADMA u pacjentów w grupie IIB

		N	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q
ARG	Początek leczenia	5	86,0	62,1	582,0	64,7	142,1
GLN		5	335,0	194,1	612,0	259,1	357,4
ADMA		5	1,79	0,85	2,39	1,52	2,07
ARG	W trakcie leczenia	3	115,3	92,3	197,4		
GLN		3	416,2	217,4	568,3		
ADMA		3	2,35	1,08	2,56		
ARG	Koniec leczenia	5	167,9	101,5	304,0	112,4	292,0
GLN		5	441,0	132,4	680,1	182,6	532,8
ADMA		4	2,15	1,60	2,40	1,83	2,33

Ze względu na zbyt małą liczebność podgrupy IIB (n=5) niemożliwe było porównanie statystyczne obu grup.

5. DYSKUSJA

Na podstawie wykonanych badań i przeprowadzonych obserwacji wykazano, że istnieje zależność pomiędzy stanem klinicznym badanych dzieci (współistnienie złośliwego procesu nowotworowego) a stężeniami argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy. Stwierdzono znamienne statystycznie różnice pomiędzy profilami badanych parametrów u pacjentów onkologicznych a grupą kontrolną dzieci.

Przeprowadzone przeze mnie badania mają charakter nowatorski, gdyż do tej pory nie opublikowano badań profilu wolnych aminokwasów w surowicy na grupie pediatrycznych pacjentów onkologicznych. Nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie doniesień o oznaczaniu identycznych parametrów jak w grupie badanych chorych. Istnieje wiele prac opisujących zachowanie się PFAA czy też poszczególnych aminokwasów w surowicy u dorosłych pacjentów z rozpoznaniem złośliwej choroby nowotworowej. Są one niezwykle ciekawe, gdyż dotyczą także badań prowadzonych na różnych etapach procesu nowotworzenia. Problemem pozostaje jednak fakt, że typowe nowotwory dla wieku dorosłego różnią się budową histologiczną, lokalizacją, protokołami terapeutycznymi i naturalnym przebiegiem klinicznym choroby od typowych dla populacji dziecięcej. Dlatego trudno przeprowadzać analizę porównawczą pomiędzy różnymi typami nowotworów i sformułować jednoznaczne wnioski. Niemniej w dalszych rozważaniach przeprowadzono analizę zachowania się poszczególnych stężeń oznaczanych parametrów u onkologicznych pacjentów pediatrycznych na różnych etapach leczenia przeciwnowotworowego i skonfrontowano je z najnowszymi doniesieniami innych autorów z tej dziedziny.

Dodatkowym aspektem, na który należy zwrócić uwagę jest fakt oznaczania parametrów w różnych płynach ustrojowych i tkankach u ludzi i zwierząt. Ze względu na to, że badania własne dotyczyły oznaczeń w surowicy, doniesienia o wynikach z materiału tkankowego nie będą szeroko omawiane. Badania własne obejmują oznaczenia argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy surowicy. W grupie badanej przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego stwierdzono podwyższenie stężenia Arg i ADMA oraz obniżenie stężenia Gln w porównaniu do grupy zdrowych osób.

U pacjentów w trakcie leczenia, którzy pozytywnie odpowiadali na przeprowadzane leczenie onkologiczne oraz u chorych po pomyślnie zakończonej terapii również zaobserwowano podobne zachowanie się powyższych parametrów. Stwierdzone różnice w stężeniach wszystkich oznaczanych parametrów wykazały znamiennej istotności

statystycznej w porównaniu z grupą kontrolną. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż odstęp pomiędzy pierwszym badaniem a końcem leczenia chorych będących w remisji był stosunkowo krótki, bowiem ostatnie pobranie odbyło się tuż po zakończeniu leczenia. Z pewnością warto by takie badania powtórzyć kilka lat po zakończeniu terapii u chorych w klinicznej remisji. Dokonując porównania na poszczególnych etapach leczenia statystycznie znamienne było jedynie stężenie glutaminy porównując pacjentów w trakcie leczenia onkologicznego i po osiągnięciu klinicznej remisji.

Zadano również pytanie czy budowa histologiczna nowotworu ma wpływ na otrzymane wyniki. W związku z powyższym podzielono pacjentów na dwie podgrupy: dzieci z rozpoznaniem chorób rozrostowych układu krwiotwórczego (białaczki i chłoniaki) oraz guzami litymi (nerwiak zarodkowy współczulny, guz Wilmsa, guz mózgu, mięsaki tkanek miękkich, nowotwory złośliwe kości i guzy germinalne). W przypadku pacjentów onkologicznych stwierdzono podwyższony poziom argininy i ADMA oraz obniżony poziom glutaminy w stosunku do grupy kontrolnej niezależnie od budowy histologicznej.

Jak wspomiano wcześniej, wielu badaczy zauważyło, że u dorosłych pacjentów onkologicznych dochodzi do znaczących zmian w profilu wolnych aminokwasów w osoczu [23,80-87]. Już wiele lat temu Bennegard i wsp. [88] opisali między innymi obniżenie stężenia glutaminy u pacjentów z nowotworami złośliwymi w stanie wyniszczenia nowotworowego, podobnie jak Watanabe i wsp. [86] u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym. W tej ostatniej pracy założono, że zmiany w profilu PFAA (obniżenie ich całkowitego stężenia) wynikają ze zwiększonej konsumpcji aminokwasów przez komórki nowotworowe. Takie same wyniki osiągnęli Kubota i wsp. [24]. U 24 pacjentów z rozpoznaniem złośliwego nowotworu przewodu pokarmowego (obniżenie stężenia Gln), natomiast u 22 pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego zanotowali spadek stężenia Gln, a wzrost Arg. Autorzy zasugerowali, że siedem z oznaczanych aminokwasów, takich jak: glutamina, treonina, histydyna, cysteina, alanina, arginina i ornityna wykazuje ścisłą korelację z badanymi typami nowotworów. Brak jednak mechanizmu patogenetycznego, który wyjaśniałby, w jaki sposób dochodzi do takich zmian, oprócz znanych procesów katabolicznych m.in. zwiększonej proteolizy, całkowitego obrotu białek czy glukoneogenezy.

Te obserwacje dotyczące stężenia argininy i glutaminy są spójne z wynikami badań własnych, gdzie również wykazano wzrost Arg i spadek Gln chorych onkologicznych.

Russel i wsp. [89] poddali obserwacji pacjentów z rakiem płuca. Badacze ci obserwowali z kolei podwyższenie stężenia glutaminy i argininy. Jako potencjalne wytłumaczenie

otrzymanych wyników podano znany mechanizm, w którym dochodzi do zwiększonego katabolizmu białek, wchodzenia wyprodukowanych aminokwasów w cykl mocznikowy, a następnie stymulacji syntezy poliamin. Autorzy ci wysunęli wniosek, że do zmian tych dochodzi niezależnie od stanu odżywienia pacjenta i zaawansowania procesu nowotworowego.

W ostatnich doniesieniach Gu i wsp. [90] opisali przypadki pacjentów z rozpoznaniem raka gruczołu sutkowego, żołądka i gruczołu tarczowego badając profil wolnych aminokwasów w surowicy jako potencjalnego biomarkera procesu nowotworowego. Chorzy ci prezentowali całkowicie odmiennie zachowanie się PFFA w stosunku do grupy kontrolnej. Warty zauważenia jest fakt, że obniżenie wartości profilu aminokwasów było związane z istnieniem przerzutów do węzłów chłonnych w przypadku raka żołądka. Dodatkowo ich poziom korelował z klinicznymi markerami choroby w wyżej wymienionej grupie chorych, a u pacjentek z rozpoznaniem raka sutka z markerami immunohistochemicznymi. Stężenie argininy w obu grupach było znamienne statystycznie podwyższone, a glutaminy obniżone, co pozostaje w zgodności z badaniami własnymi. W opisywanym opracowaniu zwrócono również uwagę na proliferacyjny efekt niektórych aminokwasów, takich jak alanina, arginina, asparagina czy cysteina, na komórki raka gruczołu sutkowego [90]. Z kolei cysteina wpływała na proliferację komórek raka żołądka, a alanina i kwas glutaminowy wywierały efekt hamujący poprzez indukcję apoptozy tych komórek.

Tkanka nowotworowa do swojego wzrostu wymaga obecności glutaminy, glicyny, asparaginy i amoniaku do syntezy puryn i pirymidyn [91]. Przez wiele lat aminokwas argininę postrzegano jedynie jako niezbędny składnik odżywczy wspomagający m. in. gojenie się ran i substancję konieczną w immunomodulacyjnym postępowaniu u pacjentów krytycznie chorych [92]. Obecnie coraz częściej podnosi się jej rolę jako stymulatora wzrostu komórek nowotworowych [93]. Interpretacja takich wyników jest niezwykle trudna, gdyż brak jest jednoznaczności w dostępnej literaturze. Hasim i wsp. [94] przebadali grupę 22 pacjentek z postawionym rozpoznaniem raka szyjki macicy oraz 26 chorych ze stanem przednowotworowym CIN (cervical intraepithelial neoplasia) porównując otrzymane wyniki z grupą 35 zdrowych osób. U pacjentek nowotworowych stężenie argininy było znacząco niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, a u tych z rozpoznaniem CIN wyższe. Podobny wynik zmniejszonego stężenia Arg w aktywnym procesie nowotworowym raka trzustki i jelita grubego opisał Vissers i wsp. [95]. Być może odrębności histologiczne poszczególnych nowotworów mają wpływ na odmiennie zachowanie się oznaczanych aminokwasów.

Prowadząc takie rozważania, warto zastanowić się nad potencjalnymi czynnikami wpływającymi na takie zachowanie się analizowanych substancji. Czy jest to tylko kwestia stanu odżywienia pacjenta onkologicznego, jego osobniczych predyspozycji, czy też może zależy od stadium zaawansowania choroby nowotworowej lub jej typu?

Jednoznacznie dowiedziono, że znaczna redukcja masy ciała powyżej 20% i związane z nią wyniszczenie (kacheksja) u pacjentów nowotworowych mają wpływ na zmiany w profilu aminokwasów. Takie obserwacje przedstawił Clark i wsp. [82] porównując pacjentów onkologicznych, u których wystąpił ubytek masy ciała powyżej 20% z pacjentami onkologicznymi bez redukcji wagi. Analogiczne wyniki osiągnął Georgiannos i wsp. [26] opisując pacjentów wyniszczonych i bez objawów kacheksji. Stan odżywienia u tych pacjentów wykazuje ścisły związek ze stadium zaawansowania choroby nowotworowej.

Jak wspomniano wcześniej, podczas analizy dostępnej literatury nasuwa się pytanie, czy typ histologiczny nowotworu, bądź jego umiejscowienie w konkretnym narządzie ma wpływ na stężenie poszczególnych aminokwasów lub całkowity ich profil?

Moje obserwacje nie pozwalają na wysunięcie tak jednoznacznych wniosków ze względu na zbyt małą liczbę poszczególnych typów histopatologicznych nowotworów u badanych dzieci. Jednakże takie próby są podejmowane w odniesieniu do modeli zwierzęcych i dorosłych pacjentów onkologicznych. Wykazano, że u szczurów z wszczepionymi komórkami szczurzego mięsakoraka Walkera 256 (WC256) dochodzi to zwiększonego uwalniania alaniny i glicyny, a z komórkami hepatoma 7777 do wzrostu stężenia glicyny [96]. Poszukiwanie takich zmian w organizmie ludzkim doprowadziło do pewnych wniosków. Mianowicie, obniżenie PFAA zaobserwowano u chorych z nowotworami układu pokarmowego, co wydaje się mieć uzasadnienie w fakcie, iż większość szlaków metabolicznych aminokwasów ma przynajmniej częściowo miejsce właśnie w tych narządach (np. jelitach). W tej grupie pacjentów dochodzi do znacznej utraty białek drogą jelitową poprzez uszkodzenie śluzówek przez masy nowotworowe. Z kolei u pacjentów z inną lokalizacją dochodzi do zwiększonego uwalniania m.in. aminokwasów w następstwie uwalniania ich z mięśni, czego nie obserwuje się w pierwszej grupie chorych [10].

Wzrost stężeń PFAA zanotowano u pacjentek z rakiem sutka. Przypuszcza się, że ma to związek z tym, że chore te rzadko prezentują stan wyniszczenia nowotworowego, poza stadium terminalnym choroby, agresywność tego typu nowotworu jest stosunkowo mniejsza niż w innych „bardziej aktywnych metabolicznie nowotworach” [81,97]. Poczyniono nawet obserwacje, w których poziom wolnych aminokwasów w osoczu był 3 razy wyższy u chorych onkologicznych z rozpoznaniem raka gruczołu piersiowego w porównaniu z grupą zdrowych

kobiet [98]. Bardzo ciekawe zestawienie opracował Lai i wsp. [10], gdzie pokazano porównanie zachowania się poszczególnych aminokwasów na podstawie analizy wielu opublikowanych badań. We wszystkich omówionych badaniach w przypadku siedmiu aminokwasów alaniny, histydyny, treoniny, argininy, proliny, glutaminy/kwasu glutaminowego i glicyny obserwowano 3-krotną ich redukcję. Hack i wsp. [99] oceniali obniżenie proporcji glutaminy do cysteiny u pacjentów z rakiem płuca. Autorzy zasugerowali, że w tych osób regulacja poziomu cysteiny jest zaburzona w następstwie nieprawidłowego katabolizmu wątrobowego cysteiny w warunkach postępującego, nasilonego katabolizmu zachodzącego w mięśniach szkieletowych.

Ciekawe wyniki osiągnęli również Muscartitoli i wsp. [100] u pacjentów z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego, w tym wypadku ostrą białaczką mieloblastyczną (AML). W odniesieniu do argininy i glutaminy nie wykazano różnic znamienne statystycznych w stężeniach oznaczanych aminokwasów w porównaniu z grupą kontrolną. Poruszono natomiast kwestię obniżonego stężenia tauryny, jako typowej w AML i mogącej mieć wpływ na odległe następstwa samej choroby i leczenia. Już wiele lat temu skupiono się na obserwacjach poziomu aminokwasów w komórkach układu białokrwinkowego (limfocytach i granulocytach), wskazując, że ze wszystkich aminokwasów tauryna jest obecna w największym stężeniu w leukocytach [101]. Donoszono również o znaczącym spadku tego aminokwasu po chemioterapii w tej grupie pacjentów [102]. Także dodatkowa suplementacja tauryną u napromienianych myszy spowodowała wzrost poziomu neutrocytów.

Kwestia suplementacji rozpatrywana w aspekcie leczenia wspomagającego jest obecnie szeroko badana. Większość z nich dotyczy pacjentów z oddziałów intensywnej terapii, niemających diagnozy złośliwej choroby nowotworowej i wydaje się, że taka suplementacja może przynieść korzyści w postaci przyspieszonej regeneracji śluzówek, szybszej rekonwalescencji po zabiegach operacyjnych. Dostępne są komercyjne preparaty glutaminy w postaci doustnej zalecane właśnie dla tej grupy chorych. Natomiast wyżej wymienione postępowanie wymaga niezwyklej ostrożności u chorych nowotworowych. Jak wspomniano we wstępie pracy na obecnym etapie wiedzy nie można wykluczyć potencjalnego prokancerogennego działania glutaminy.

Istnieją badania, które pokazują, że suplementacja glutaminą powoduje ograniczenie wzrostu guza [103]. Te przeprowadzone badania przez Fahr i wsp. [104] dowodzą, że w 40% dochodzi do redukcji wzrostu nowotworu i w 30% do wzrostu ilości komórek NK (natural killers). Autorzy uważają, że suplementacja glutaminą powoduje redukcję wzrostu guza poprzez spadek produkcji glutationu z jednoczesną aktywacją komórek NK. Doniesienia te są

spójne z badaniem Learn i Thomas [105], którzy stosowali stymulowane neutrofile i komórki nowotworowe osiągając podobne wyniki. Paradoksalny efekt glutaminy na metabolizm glutationu w tkankach zdrowych i nowotworowych opisano w przeglądzie Savarrese i wsp. [106]. Jedną z hipotez tłumaczy, że przepływ zredukowanej formy glutationu w mitochondriach komórek nowotworowych jest zablokowany przez lokalne zwiększenie stężenia glutaminy, które jest z kolei spowodowane obecnością glutaminazy. W mitochondriach komórek prawidłowych ten transport nie jest upośledzony [38, 108,109]. Kolejną hipotezę podaje, że środowisko wewnątrz komórek guza jest zdecydowanie bardziej kwaśne niż w zdrowych komórkach i w ten sposób dochodzi do blokady 5-okso-L-prolinazy, która jest bardzo wrażliwa na zmiany pH. Autorzy argumentują również, że w komórkach nowotworowych nie może dochodzić do dodatkowej stymulacji glutaminazy, a zatem poziom wewnątrzkomórkowego glutationu jest wyczerpany, przeciwnie niż w normalnych komórkach, gdzie zewnętrznie dostarczana glutamina działa jako receptor γ -glutamylowy i zwiększa czułość glutaminazy [108,109]. Klinicznie zarówno dożylna i doustna suplementacja glutaminy wywoływała mniejsze uszkodzenia błony śluzowej jelit i przyspieszony proces gojenia się wokół przewodu pokarmowego u szczurów z nowotworami [110-112]. Jednak van den Berg i wsp. [112] w ich podwójnie ślepych, randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu, przeprowadzonym na grupie niemowląt o bardzo małej masie urodzeniowej, nie wykazali pozytywnego wpływu na integralność śluzówki jelit po wzbogaceniu żywienia dojelitowego w glutaminę. Badania przeprowadzone przez Kaufmann i wsp. [113] u szczurów z rakiem sutka wykazały, że dożołądkowe podanie glutaminy w dawce 1 g/kg/dzień zapobiegało wzrostowi guza poprzez regulację enzymów cyklu gamma-glutamylowego. Powyższe obserwacje powodują, że poszukuje się potwierdzenia takiego mechanizmu działania u ludzi.

Ward i wsp. [114] przeprowadzili ukierunkowane badanie na znalezienie optymalnego dawkowania glutaminy u pediatrycznych pacjentów onkologicznych. Autorzy stwierdzili, że pojedyncza dawka około 0,65 g/kg jest bezpieczna dla dzieci. W innych badaniach oceniano dzienną dawkę 4 g/m² powierzchni ciała dla dzieci otrzymujących leczenie onkologiczne [115,116].

Występowanie biegunki jest częstym skutkiem ubocznym rozwijającym się podczas chemioterapii. W badaniach pacjentów z przerzutowym rakiem okrężnicy i odbytnicy otrzymujących irinotekan wykazano, że częstość występowania biegunki była zmniejszona u tych pacjentów, którzy otrzymywali dodatkowo glutaminę w postaci doustnej lub dożylniej

[117]. Podobne obserwacje zostały poczynione przez Daniele i wsp. [118], którzy badali dorosłych pacjentów z rakiem jelita grubego poddawanych leczeniu 5-fluorouracylem i suplementacji glutaminą. Pozytywnych efektów nie stwierdzono u pacjentek cierpiących na raka sutka, które podczas leczenia chemicznego również otrzymywały dodatkową podaż Gln [119]. Szczególnie interesujące było badanie przeprowadzone przez Uderzo i wsp. [120], prospektywne, podwójnie zaślepienie, kontrolowane u 120 pacjentów pediatrycznych, u których przeprowadzono HSCT (hematopoietic stem cell transplantation). Otrzymywali oni standardowe żywienie pozajelitowe lub wzbogacone o glutaminę. Nie stwierdzono istotnych różnic w ciężkości zapalenia śluzówek jamy ustnej i błony śluzowej jelita. Jednym z możliwych wyjaśnień jest istniejący w trakcie badania poziom odżywienia z tych pacjentów. Wszystkie dzieci prezentowały dobry stan odżywienia oceniany na podstawie pomiarów masy ciała przed przeszczepem i poziomów prealbumin. Powyższe wyniki są zgodne z wynikami innych badań przeprowadzonych u dorosłych pacjentów bez istniejących cech niedożywienia. Nie stwierdzono istotnego wpływu suplementacji glutaminą na stan ogólny pacjentów [121,122].

Równie dyskusyjna jest dodatkowa podaż kolejnego oznaczanego w moich badaniach aminokwasu argininy. Opisano, że w przypadku pierwotnego gruczolaka i przerzutów do wątroby dochodzi do zwiększonego wychwytu argininy przez transportery y^+ . W takim wypadku suplementacja wydaje się mieć negatywne skutki dla pacjenta onkologicznego. Inne doniesienia sugerują z kolei, że suplementacja L-argininy może ograniczyć przemianę gruczolaka jelita grubego w raka jelita grubego. Ma i wsp. [123] oceniali pod tym kątem 60 pacjentów z rakiem jelita grubego i 60 z diagnozą gruczolaka tej okolicy. W każdej grupie 30 pacjentów otrzymywało 30 g L-argininy przez 3 kolejne dni, a pozostała grupa kontrolna stanowiąca 30 dorosłych pacjentów otrzymywała 5% glukozę. Autorzy mierzyli w surowicy takie parametry jak NO, NOS (ścieżka L-argininy / NO) i dekarboksylazę ornityny. Wyniki tych badań wykazały, że L-arginina znacząco zwiększa iNOS i w związku z tym może hamować jelitową hiperproliferyzację i ekspresję surwiwiny - inhibitora apoptozy. Nanthakumaran i wsp. [124] obserwowali również w ludzkich liniach komórkowych raka żołądka mniejszy wzrost komórek w wyniku apoptozy w związku z suplementacją argininy, ale arginina nie miała wpływu na inwazyjne zdolności tych komórek.

Wiadomo, że arginina indukuje ekspresję genu GH przez ścieżkę sygnalizacyjną NOS/NO. Sperling i wsp. [125] zauważyli, że ryzyko rozwoju raka gruczołowego i zgonu w warunkach nadmiaru hormonu wzrostu może być związana z podwyższonym poziomem serum insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1). IGF-1 może hamować apoptozę

poprzez stymulowanie wzrostu komórek. Melmed i wsp. [126] wykazali, że zwiększona ekspresja czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) działa jako promotor angiogenezy poprzez szlak sygnalizacyjny IGF-1. Koncepcja indukowania białaczki u pacjentów leczonych GH była analizowana już w przeszłości, szczególnie wśród pacjentów w Japonii. Nishi i wsp. [127] zebrali dane u 32.000 pacjentów z niedoborem GH i leczonych za jego pomocą. U 14 pacjentów zaobserwowano wystąpienie białaczki, wśród nich sześciu było zdecydowanie bardziej predysponowanych do zachorowania na chorobę onkologiczną z powodu anemii Fanconiego, przebytej radioterapii i chemioterapii. Wystąpienie białaczki u osób bez znanych czynników ryzyka było takie same jak w zdrowej populacji.

Pekić i wsp. [128] w swoich badaniach dotyczących ryzyka zachorowania na raka po terapii hormonem wzrostu, nie wykazali, aby było ono zwiększone u pacjentów bez znanego obciążenia genetycznego. Natomiast u dorosłych leczonych w dzieciństwie z powodu złośliwego nowotworu i otrzymujących GH ryzyko drugiego nowotworu było zwiększone w porównaniu z dziećmi leczonymi z powodu schorzenia onkologicznego, ale bez terapii GH [129].

Podnoszona ostatnio kwestia suplementacji argininy w aspekcie poprawy funkcji układu immunologicznego u pacjentów z upośledzoną odpornością nie znajduje potwierdzenia w badaniach. W randomizowanych, podwójnie ślepych, kontrolowanych placebo badaniach przeprowadzonych przez van Bokhorst-de van der Schueren i wsp. [130] oraz McCartera i wsp. [131] oceniających pacjentów z rakiem szyi/głowy i nowotworów przewodu pokarmowego, nie wykazano wpływu suplementacji argininy na funkcje immunologiczne.

Zdecydowanie więcej uwagi poświęca się nowotworom, które do wzrostu i przeżycia swoich komórek potrzebują argininy i z tego względu celem terapeutycznym jest jej obniżenie lub całkowite wyeliminowanie. W dostępnej literaturze nie opisano typowych nowotworów dziecięcych zależnych od argininy.

Wszystkie powyższe obserwacje dowodzą, że z pewnością dochodzi do zaburzeń w szeroko pojętym metabolizmie proteinowym u pacjenta onkologicznego, w tym również pediatrycznego. Jakie są jednak implikacje kliniczne takich wyników? Czy ma to znaczenie praktyczne dla pacjentów? Wydaje się, że może mieć dodatkowe znaczenie w diagnostyce molekularnej, która ułatwiłaby leczenie pacjentów z określonymi mutacjami. U 50 pacjentów z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca znaleziono dwanaście mutacji K-ras, gdzie glicyna była „przełączana” na cysteinę, pięć mutacji zamiany glicyny na cysteinę, po jednej na alaninę, kwas asparaginowy, argininę i walinę [132]. Rajendra i wsp [133] wykazali

obecność treoniny zamiast argininy w pozycji 482 (R482T) u pacjentek z rakiem sutka, a Storey i wsp [134] opisali, że polimorfizm p53, który koduje ekspresję argininy (p53Arg) lub proliny (p53Pro) w kodonie 72 jest związany z rakiem szyjki macicy. W związku z powyższym wczesne wykrycie zmian w profilu wolnych aminokwasów w osoczu może przyczynić się do szybszej diagnostyki genetycznej u takich pacjentów.

6. WNIOSKI

Otrzymane wyniki upoważniają do wysunięcia następujących wniosków:

1. Czynny proces nowotworowy istniejący w ustroju dziecka jest związany z podwyższaniem stężenia argininy, asymetrycznej dimetyloargininy oraz obniżeniem glutaminy w surowicy krwi w porównaniu z wartościami stwierdzonymi u zdrowych dzieci w porównywalnym wieku.
2. Przeprowadzone badania własne nie pozwalają na udokumentowanie zależności pomiędzy typem histologicznym nowotworu a stwierdzanymi poziomami argininy, asymetrycznej dimetyloargininy i glutaminy w surowicy krwi u badanych chorych.
3. Porównując profil Arg, ADMA i Gln w dwóch grupach chorych różnie odpowiadających na leczenie (remisja, progresja), zauważono, że w grupie pacjentów, którzy osiągnęli kliniczną remisję oznaczane parametry nie osiągnęły wartości otrzymanych w grupie kontrolnej, co wskazuje na istniejące zaburzenia metabolizmu białek pomimo pomyślnie zakończonego leczenia. Zbyt mała liczba chorych będących w progresji choroby nowotworowej uniemożliwiła statystyczną analizę.
4. Wykazano, że przeprowadzana radioterapia nie ma wpływu na stężenia argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy w badanej grupie chorych.
5. Analiza dostępnego piśmiennictwa nie upoważnia do podjęcia próby podaży glutaminy u pacjentów onkologicznych z obniżonym poziomem tego aminokwasu w surowicy wobec rozbieżności poglądów co do jego wpływu na proces nowotworowy.

7. LITERATURA

1. Kowalczyk JR. Epidemiologia nowotworów złośliwych u dzieci. W: Onkologia i hematologia dziecięca (red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008,3-7.
2. Mantovani G. Cachexia and anorexia. *Support Care Cancer* 2000; 8: 506-9.
3. Lochs H, Allison SP, Meier R, Pirlich M, Kondrup J, Schneider S, van denBerghe G, Pichard C. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, definitions and general topics. *Clin Nutr* 2006; 25:180-6.
4. Lizak A, Kałmuk A, Huras B, Brudło I. Zespół wyniszczenia nowotworowego- etiopatogeneza w świetle aktualnej wiedzy. *Współcz Onkol* 2003; 6: 441-7.
5. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008; 27: 793-9.
6. Tisdale MJ. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 2001; 17: 438-42.
7. Bernstein E, Ortiz Z. Megestrol acetate for the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane database. Syst Rev* 2005; 2: CD004310.
8. Giovannucci E. The epidemiologic basis for nutritional influences on the cancer cell. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, editors. *Nutritional Oncology*. California: Academic Press; 1999. p. 61–73.
9. Pisters PW, Pearlstone DB. Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: investigative techniques and therapeutic interventions. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1993;30:223–72.
10. Lai HS, Lee JC, Lee PH, Wang ST, Chen WJ. Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Semin Cancer Biol.* 2005 Aug;15:267-7
11. Rossi Fanelli F, Cangiano C, Muscaritoli M, Conversano L, Torelli GF, Cascino A. Tumor-induced changes in host metabolism: a possible marker of neoplastic disease. *Nutrition* 1995;11:595–600 .
12. Heber D, Byerly LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. *Cancer* 1985;55:225–9.

13. Kawamura I, Moldawer LL, Keenan RA, Batist G, Bothe Jr A, Bistrian BR, et al. Altered amino acid kinetics in rats with progressive tumor growth. *Cancer Res* 1982;42:824–9.
14. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674 .
15. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011; 27: 441–464.
16. Choi S.Y., Collins C.C., Gout P.W., Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J. Pathol.* 2013; 230: 350–355.
17. Végran F., Boidot R., Michiels C., Sonveaux P., Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2011; 71: 2550–2560.
18. Dang C.V., Hamaker M., Sun P., Le A., Gao P. Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2011; 89: 205–212.
19. Malenda A, Nowis DA. Znaczenie metabolizmu glukozy w diagnostyce oraz terapii nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego. *Hematologia.* 2013; 4 (3); 227-238.
20. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C. i wsp. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: G7–17.
21. Altman BJ, Dang CV. Normal and cancer cell metabolism: lymphocytes and lymphoma. *FEBS J.* 2012;279:2598–609
22. Hiller K, Metallo CM. Profiling metabolic networks to study cancer metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24:60–8.
23. Norton JA, Gorschboth CM, Wesley RA, Burt ME, Brennan MF. Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. *Cancer* 1985;56:1181–6.
24. Kubota A, Meguid MM, Hitch DC. Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors. *Cancer* 1992;69:2343–8.
25. Cascino A, Muscaritoli M, Cangiano C, Conversano L, Laviano A, Ariemma S, et al. Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer. *Anticancer Res* 1995;15:507–10 .
26. Georgiannos SN, Weston PM, Goode AW. Correlation between albuminuria and positively charged amino acids in gastrointestinal cancer. *Int Surg* 1995;80:49–52.

27. Wernerman J. Clinical use of glutamine supplementation. *J Nutrition* 2008; 138: 2040-44.
28. Lorenc-Koci E. XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2003, red. Maria Śmiałkowska.
29. Wischmeyer PE. Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future. *Nutr Clin Pract* 2003; 18: 377-85.
30. Ligthart-Melis GC, Van De Poll MCG, Boelens PG, et al. Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of Arginine in humans. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1282-9.
31. Kuhn KS, Stehle P, Furst P. Glutamine content of protein and peptide-based enteral products. *J Parenteral Enteral Nutr* 1996; 20: 292-5.
32. Neu J, Shenoy V, Chakrabarti R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB Journal* 1996; 10: 829-37.
33. Wischmeyer PE, J. Riehm, K. D. Singleton et al. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2003; 19: 1-6.
34. Coeffier M, Marion-Letellier R, Dechelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 16:518-24.
35. Wang J, Chen L, Li P, et al. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr* 2008; 138: 1025-32.
36. Kessel A, Toubi E, Pavlotzky E, Mogilner J, Coran AG, Lurie M, et al. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 341-7.
37. Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 1998; 176: 166-78.
38. Rouse K, Nwokedi E, Woodliff JE, et al. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann Surg* 1995; 221: 420-6.

39. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Graboń W, Barańczyk-Kuźma A. New insights into Arginase. Part II. Role in physiology and pathology. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008 May 14;62:214-21.
40. Graboń W. Arginine as a crucial amino acid in carcinogenesis and tumor growth. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 483-9.
41. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008; 27: 328-39.
42. Wu G, Bazer FW, Davis TA, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009; 37:153-68.
43. Coeffier M, Marion-Letellier R, Dechelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 16:518-24.
44. Dechelotte P, Hasselmann M, Cynober L, et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med* 2006; 34: 598–604.
45. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009; 37: 1–17.
46. Marion R, Coeffier M, Leplingard A, et al. Cytokine-stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human intestinal cells: lack of modulation by glutamine. *Clin Nutr* 2003; 22: 523-8.
47. Brasse-Lagnel C, Lavoinnie A, Loeber D, et al. Glutamine and interleukin-1beta interact at the level of Sp1 and nuclear factor-kappa B to regulate Argininosuccinate synthetase gene expression. *FEBS J* 2007; 274: 5250–62.
48. Bertolo RF, Brunton JA, Pencharz PB, et al. Arginine, ornithine, and proline interconversion is dependent on small intestinal metabolism in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E915–E922.
49. Urschel KL, Rafii M, Pencharz PB, et al. A multitracer stable isotope quantification of the effects of Arginine intake on whole body Arginine metabolism in neonatal piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E811–E818.
50. Tomlinson C, Rafii M, Sgro M, et al. Arginine is synthesized from proline not glutamate in enterally fed preterm human infants. *FASEB J* 2008; 22: 869. 28

51. Szuba A, Chachaj A, Wróbel T, Dietczenia J, Mazur G, Antonowicz-Juchniewicz J, Kuliczkowski K, Andrzejak R. Asymmetric dimethylArginine in hematological malignancies: a preliminary study. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 2316-20.
52. Sulicka J, Surdacki A, Strach M, Kwater A, Gryglewska B, Ćwiklińska M, Balwierz W, Grodzicki TK. Elevated asymmetric dimethylArginine in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. *Dis Markers* 2012; 33: 69-76.
53. Wakabayashi Y. Tissue-selective expression of enzymes of Arginine synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998; 1: 335-9.
54. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, Arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 223-8.
55. Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 2000; 119: 1496-505.
56. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr* 2000; 130: 978S-82S.
57. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 2002; 18: 761-6.
58. Wu G. Synthesis of citrulline and Arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol.* 1997; 272: G1382-90.
59. Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for Arginine. *J Nutr* 2004; Suppl: 2752S-2759S.
60. van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr* 2004;79: 185-97.
61. Szende B, Tyihak E, Trezl L. Role of Arginine and its methylated derivatives in cancer biology and treatment. *Cancer Cell International* 2001; 1-5.
62. Wheatley DN, Philip R, Campbell E. Arginine deprivation and tumour cell death: Arginase and its inhibition. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000; 244: 177-85.
63. Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA. Incidence and distribution of Argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to Arginine deprivation. *Cancer* 2004 15; 100: 826-33.

64. Cheng PN, Leung YC, Lo WH, Tsui SM, Lam KC. Remission of hepatocellular carcinoma with Arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic Arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: Arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 224: 67-80.
65. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*.1998 Nov 15;336 (Pt 1):1-17.
66. Ścibor D, Czeczot H. Arginina - metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Postępy Hig Med Dośw.* 2004; 58:321-332.
67. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by Arginine can explain the Arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 15; 100: 4843-8.
68. Izzo F, Marra P, Beneduce G, Castello G, Vallone P, De Rosa V, Cremona F, Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA, Ng C, Curley SA. Pegylated Arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1815-22.
69. Graboń W. Arginina- podstawowy aminokwas w procesie nowotworzenia. *Postępy Hig Med. Dosw* 2006; 60: 483-9.
70. Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr* 2004; 134 (10 Suppl): 2837S-41S.
71. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by Arginase and Arginine recycling. *J Nutr* 2007; 137 (6 Suppl 2): 1616S-20S.
72. Yang Y, Bedford MT. Protein Arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Jan;13:37-50
73. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylArginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 (Suppl 12): 60-2.
74. Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-Arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol* 1995; 269: C750-6.
75. Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylArginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003; 42: 985-90.

76. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998; 62: 2425-30.
77. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000 29; 101: 856-61.
78. Mittermayer F, Namiranian K, Pleiner J, Schaller G, Wolzt M. Acute Escherichia coli endotoxaemia decreases the plasma l-Arginine/asymmetrical dimethylArginine ratio in humans. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106: 577-81.
79. Nijveldt RJ, Siroen MP, Teerlink T, van Leeuwen PA. Elimination of asymmetric dimethylArginine by the kidney and the liver: a link to the development of multiple organ failure? *J Nutr* 2004; 134: 2848S–52S.
80. Lee JC, Chen MJ, Chang CH, Tiai YF, Lin PW, Lai HS, et al. Plasma amino acid levels in patients with colorectal cancers and liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1269–73.
81. Proenza AM, Oliver J, Palou A, Roca P. Breast and lung cancer are associated with a decrease in blood cell amino acid content. *J Nutr Biochem* 2003;14:133–8 .
82. Clarke EF, Lewis AM, Waterhouse C. Peripheral amino acid levels in patients with cancer. *Cancer* 1978;42:2909–13.
83. Ching N, Grossi C, Jham G, Angers J, Zurawinsky H, Ching CY, et al. Plasma amino acid and serum unesterified fatty acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment. *Surgery* 1984;95:730–8.
84. Bennegard K, Lindmark L, Eden E, Svaninger G, Lundholm K. Flux of amino acids across the leg in weight-losing cancer patients. *Cancer Res* 1984;44:386–93.
85. Watanabe A, Higashi T, Sakata T, Nagashima H. Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1984;54:1875–82.
86. Naini AB, Dickerson JW, Brown MM. Preoperative and postoperative levels of plasma protein and amino acid in esophageal and lung cancer patients. *Cancer* 1988;62:355–60.
87. Yamanaka H, Kanemaki T, Tsuji M, Kise Y, Hatano T, Hioki K, et al. Branched-chain amino acid-supplemented nutritional support after gastrectomy for gastric cancer with special reference to plasma amino acid profiles. *Nutrition* 1990;6:241–5.

88. Heslin MJ, Newman E, Wolf RF, Pisters PW, Brennan MF. Effect of systemic hyperinsulinemia in cancer patients. *Cancer Res* 1992;52:3845–50.
89. Russell DM, Shike M, Anderson GH, et al. Amino acid metabolism in small lung cancer. *J Parenter Enteral Nutr* 1981; 6:592.
90. Gu Y, Chen T, Fu S, Sun X, Wang L, Wang J, Lu Y, Ding S, Ruan G, Teng L, Wang M. Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *J Transl Med.* 2015 Jan 27;13(1):35.
91. Wang LB, Shen JG, Zhang SZ, Ding KF, Zheng S. Amino acid uptake in arteriovenous serum of normal and cancerous colon tissues. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1297–300.
92. Braga M. Perioperative immunonutrition and gut function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15:485–8.
93. Phillips MM, Sheaff MT, Szlosarek PW. Targeting Arginine-dependent cancers with Arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges. *Cancer Res Treat.* 2013;45:251–62 .
94. Hasim A, Aili A, Maimaiti A, Mamtimin B, Abudula A, Upur H. Plasma-free amino acid profiling of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia patients and its application for early detection. *Mol Biol Rep.* 2013;40:5853–9.
95. Vissers YL, Dejong CH, Luiking YC, Fearon KC, von Meyenfeldt MF et al. Plasma Arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for Arginine deficiency? *Am J Clin Nutr;* 2005: 81:1142–1146 .
96. Sauer LA, Dauchy RT. Ketone body, glucose, lactic acid, and amino acid utilization by tumors in vivo in fasted rats. *Cancer Res* 1983;43:3497–503.
97. Kern KA, Norton JA. Cancer cachexia. *JPEN* 1988;12:286–98
98. Quevedo-Coli S, Crespi C, Benito E, Palou A, Roca P. Alterations in circulating fatty acids and the compartmentation of selected metabolites in women with breast cancer. *Biochem Mol Biol Int* 1997;41:1–10.
99. Hack V, Schmid D, Breitzkreutz R, Stahl-Henning C, Drings P, Kinscherf R, et al. Cystine levels, cystine flux, and protein catabolism in cancer cachexia, HIV/SIV infection, and senescence. *FASEB J* 1997;11:84–92.
100. Muscaritoli M, Conversano L, Petti MC, Torelli GF, Cascino A, Mecerocci S, Annicchiarico MA, Rossi Fanelli F. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. *Nutrition.* 1999 Mar;15(3):195-9. Erratum in: *Nutrition* 1999 Nov-Dec;15(11-12):828.

101. Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakajima T, Usai T. Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem* 1982; 28:1758.
102. Desai TK, Maliakal J, Kinsie JL, et al. Taurine deficiency after intensive chemotherapy and/or radiation. *Am J Clin Nutr* 1992;55:708.
103. Erbil Y, Oztezcan S, Giris M, et al. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci* 2005;78:376–82
104. Fahr MJ, Kornbluth J, Blossom S, et al. Harry M. Vars Research Award. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth. *J Parenteral Enteral Nutr* 1994;18:471–6
105. Learn DB, Thomas EL. Inhibition of tumor cell glutamine uptake by isolated neutrophils. *J Clin Invest* 1988;82:789-96
106. Savarese DM, Savy G, Vahdat L, Wischmeyer PE, Corey B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. *Cancer Treat Rev* 2003;29:501-13
107. Carretero J, Obrador E, Pellicer J, Pascual A, and Estrela J. Mitochondrial glutathione depletion by glutamine in growing tumor cells. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29, 913–23
108. Klimberg VS, Claude H. Organ, Jr. Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. *Am J Surg* 1996;172:418–424
109. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, et al. Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:1523–9
110. El Malt M, Ceelen W, Boterberg T, et al. Does the addition of glutamine to total parenteral nutrition have beneficial effect on the healing of colon anastomosis and bacterial translocation after preoperative radiotherapy? *Am J Clin Oncol* 2003;26:54–9
111. Salman B, Oguz M, Akmansu M, et al. Effect of timing of glutamine- enriched enteral nutrition on intestinal damage caused by irradiation. *Adv Ther* 2007;24:648–61
112. van den Berg A, Fetter WP, Westerbeek EA, van der Vegt IM, van der Molen HR, van Elburg RM. The effect of glutamine-enriched enteral nutrition on intestinal permeability in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006;30:408-14

113. Kaufmann Y, Todorova VK, Luo S, Klimberg VS. Glutamine affects glutathione recycling enzymes in a DMBA-induced breast cancer model. *Nutr Cancer* 2008; 60:518–25
114. Ward E, Picton S, Reid U, et al. Oral glutamine in paediatric oncology patients: a dose finding study. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:31–6
115. Okur A, Ezgu FS, Tumer L, et al. Effects of oral glutamine supplementation on children with solid tumors receiving chemotherapy. *Pediatr Hematol Oncol* 2006;23:277–85
116. Anderson PM, Schroeder G, Skubitz KM. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. *Cancer* 1998;83:1433–9
117. Xue H, Sawyer MB, Field CJ, et al. Nutritional modulation of antitumor efficacy and diarrhea toxicity related to irinotecan chemotherapy in rats bearing the ward colon tumor. *Clin Cancer Res* 2007;13:7146–54
118. Daniele B, Perrone F, Gallo C, et al. Oral glutamine in the prevention of fluorouracil induced intestinal toxicity: a double blind, placebo controlled, randomised trial. *Gut* 2001;48:28–33
119. Li Y, Yu Z, Liu F, et al. Oral glutamine ameliorates chemotherapy-induced changes of intestinal permeability and does not interfere with the antitumor effect of chemotherapy in patients with breast cancer: a prospective randomized trial. *Tumori* 2006;92:396–401
120. Uderzo C, Rebora P, Marrocco E, et al. Glutamine-enriched nutrition does not reduce mucosal morbidity or complications after stem-cell transplantation for childhood malignancies: a prospective randomized study. *Transplantation*. 2011; 27:1321-5
121. Wang WS, Lin JK, Lin TC, et al. Oral glutamine is effective for preventing oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer patients. *Oncologist* 2007; 12:312–9
122. Amara S. Oral glutamine for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Ann Pharmacother* 2008;42:1481–5.
123. Ma Q, Wang Y, Gao X, et al. L-Arginine reduces cell proliferation and ornithine decarboxylase activity in patients with colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 ;13:7407-12

124. Nanthakumaran S, Brown I, Heys SD, Schofield AC. Inhibition of gastric cancer cell growth by Arginine: molecular mechanisms of action. *Clin Nutr* 2009; 28:65-70
125. Sperling MA, Saenger PH, Ray Hintz, et al.; Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. LWPES Executive Committee and the LWPES Drug and Therapeutics Committee. Growth hormone treatment and neoplasia-coincidence or consequence? *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:5351-2
126. Melmed GY, Devlin SM, Vlotides G, et al. Anti-aging therapy with human growth hormone associated with metastatic colon cancer in a patient with Crohn's colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6:360-3
127. Nishi Y, Tanaka T, Takano K, et al. Recent status in the occurrence of leukemia in growth hormone-treated patients in Japan. GH Treatment Study Committee of the Foundation for Growth Science, Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1961-5
128. Pekic S, Popovic V. GH therapy and cancer risk in hypopituitarism: what we know from human studies. *Eur J Endocrinol*. 2013; 169:89-97
129. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, et al. Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87:3136-41.
130. van Bokhorst-De Van Der Schueren MA, Quak JJ, von Blombergvan der Flier BM, et al. Effect of perioperative nutrition, with and without Arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity, and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:323–32
131. McCarter MD, Gentilini OD, Gomez ME, Daly JM. Preoperative oral supplement with immunonutrients in cancer patients. *JPEN J Parenter Enter Nutr* 1998; 22:206–11
132. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL, Roig B, Queralt C, Escuin D, et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003;193:207–16.

133. Rajendra R, Gounder MK, Saleem A, Schellens JH, Ross DD, Bates SE, et al. Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin. *Cancer Res* 2003;63:3228–33.
134. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393:229–34.

8. STRESZCZENIE

Przeprowadzane badania dotyczą pediatrycznych pacjentów onkologicznych z rozpoznaniem chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i guzów litych. Grupę stanowiło 84 dzieci, w tym 50 chorych leczonych w ośrodkach onkologii i hematologii dziecięcej w Polsce oraz 34 dzieci zakwalifikowanych do korekcyjnych zabiegów chirurgicznych, takich jak wrodzone przepukliny czy stulejka, stanowiących grupę kontrolną. Dokonano oceny stężeń wybranych aminokwasów: argininy (Arg), glutaminy (Gln) i asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) w surowicy na różnych etapach leczenia onkologicznego: przed włączeniem chemioterapii, w trakcie aktywnego leczenia onkologicznego oraz po pomyślnie zakończonej terapii przeciwnowotworowej. Osobnej ocenie poddano chorych, u których doszło do progresji bądź wznowy procesu zasadniczego. W grupie kontrolnej pomiaru dokonywano jednorazowo. Płeć i wiek badanych pacjentów nie miały wpływu na wartość oznaczanych parametrów.

Celem pracy była ocena stężeń wybranych substancji w badanej grupie chorych i ich zachowanie się w zależności od etapu leczenia. Poszukiwano zależności pomiędzy profilem argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy a poszczególnymi etapami terapii przeciwnowotworowej, uzyskiwaną odpowiedzią na leczenie, a także budową histologiczną nowotworu.

Otrzymane wyniki pozwalają na wysunięcie następujących wniosków: u wszystkich dzieci zdiagnozowanych z powodu choroby nowotworowej dochodzi do zmian w stężeniach oznaczanych aminokwasów. Różnice te są znamienne statystycznie. Przeprowadzone badania własne nie pozwalają na udokumentowanie zależności pomiędzy typem histologicznym nowotworu a stwierdzanymi poziomami argininy, asymetrycznej dimetyloargininy i glutaminy w surowicy krwi u badanych chorych. Porównując profil Arg, ADMA i Gln w dwóch grupach chorych różnie odpowiadających na leczenie (remisja, progresja), zauważono, że w grupie pacjentów, którzy osiągnęli kliniczną remisję oznaczane parametry nie osiągnęły wartości otrzymanych w grupie kontrolnej, co wskazuje na istniejące zaburzenia metabolizmu białek pomimo pomyślnie zakończonego leczenia. Zbyt mała liczba chorych będących w progresji choroby nowotworowej uniemożliwiła statystyczną analizę. Ponadto

przeprowadzana radioterapia nie miała wpływu na stężenia argininy, glutaminy i asymetrycznej dimetyloargininy w badanej grupie chorych.

Analizując dostępne piśmiennictwo brak jednoznacznych wskazań do podaży glutaminy u pacjentów onkologicznych z obniżonym jej stężeniem w surowicy wobec rozbieżności poglądów co do wpływu tego aminokwasu na proces nowotworowy.

Ze względu na stosunkowo małą liczbę badanych pacjentów poczynione obserwacje traktuje się jako wstępne. Jednakże otrzymane wyniki dają podstawę do kontynuacji wybranej tematyki, rozważając poszerzenie panelu oznaczanych parametrów i wydłużenie czasu obserwacji po zakończeniu leczenia.