

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

EWA M. SŁOMIŃSKA

**METABOLITY NIKOTYNAMIDU I ICH ROLA
W FIZJOLOGII I PATOLOGII CZŁOWIEKA**

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Biochemii
Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii –
Prof. dr hab. med. Julian Świerczyński

Gdańsk 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie: KW/151/2009

Spis treści

	Wykaz wybranych publikacji będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej	5
	Wykaz stosowanych skrótów	6
1.	Wstęp	7
1.1.	Metabolizm nikotynamidu	7
1.2.	Stężenia nikotynamidu i jego metabolitów w płynach biologicznych	11
1.3.	Rola nikotynamidu i jego metabolitów	15
1.4.	Nowe metabolity przemian nikotynamidu	17
2.	Cel badań	20
3.	Metody	21
3.1.	Opracowanie metody oznaczania stężeń metabolitów nikotynamidu	21
4.	Wyniki	23
4.1.	Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu ludzi	23
4.1.1.	Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek	23
4.1.2.	Zależne od wieku zmiany stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu osób zdrowych	25
4.2.	Pochodne nikotynamidu inhibitorami polimerazy poli(ADP-rybozy)	27
4.3.	Cytoprotekcyjne działanie pochodnych nikotynamidu	28
4.4.	Nowe metabolity przemian nikotynamidu	30
4.4.1.	Pochodne nukleotydowe 1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu	30
4.4.2.	1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamid	32
5.	Podsumowanie	34
6.	Wnioski	37
7.	Piśmiennictwo	38

Wykaz wybranych publikacji będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

1. Slominska EM, Adamski P, Lipinski M, Swierczynski J, Smolenski RT. Liquid chromatographic/mass spectrometric procedure for measurement of NAD catabolites in human and rat plasma and urine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006, 25, 1245-9.
IF/KBN 0,671/10,000
2. Slominska EM, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Leaver N, Rutkowski B, Simmonds HA, Swierczynski J. Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure. *Mol Cell Biochem*, 2002, 231, 83-8.
IF/KBN 1,548/10,000
3. Slominska EM, Kowalik K, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Rutkowski P, Rutkowski B, Swierczynski J. Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*, 2006, 21, 800-6.
IF/KBN 2,007/20,000
4. Slominska EM, Rutkowski P, Smolenski RT, Szutowicz A, Rutkowski B, Swierczynski J. The age-related increase in N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NAD catabolite) in human plasma. *Mol Cell Biochem*, 2004, 267, 25-30.
IF/KBN 1,714/10,000
5. Slominska EM, Yuen A, Osman L, Gebicki J, Yacoub MH, Smolenski RT. Cytoprotective effects of nicotinamide derivatives in endothelial cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27, 863-6.
IF/KBN 0,571/10,000
6. Slominska EM, Carrey EA, Foks H, Orlewska C, Wiczerzak E, Sowinski P, Yacoub MH, Marinaki AM, Simmonds HA, Smolenski RT. A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate. *J Biol Chem*, 2006, 281, 32057-64.
IF/KBN 5,808/24,000
7. Slominska EM, Orlewska C, Yuen A, Osman L, Romaszko P, Sokolowska E, Foks H, Simmonds HA, Yacoub MH, Smolenski RT. Metabolism of 4-Pyridone-3-Carboxamide-1- β -D- Ribonucleoside Triphosphate and Its Nucleoside Precursor in the Erythrocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27, 830-4.
IF/KBN 0,571/10,000

Sumaryczny IF/KBN 12,89/94,000

* w tekście rozprawy habilitacyjnej dane z prac będących podstawą rozprawy zaznaczono w nawiasie kwadratowym, np. [publikacja 1]

Wykaz stosowanych skrótów

4PYMP	monofosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1- β -D-rybonukleozydu
4PYR, PCNR	1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamid
4PYTP	trójfosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1- β -D-rybonukleozydu
M2PY, 2PY, Met2PY	N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid
M4PY, 4PY, Met4PY	N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid
MNA, MetNA	N1-metylonikotynamid
NA	nikotynamid
NAD ⁺	dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADP ⁺	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NMN	mononukleotyd nikotynamidu
NNMT	metylotransferaza nikotynamidu
PARP	polimeraza poli(ADP-rybozy)
PNN	przewlekła choroba nerek (dawniej: przewlekła niewydolność nerek i ta nazwa jest używana w tekście rozprawy habilitacyjnej)

1. Wstęp

Nikotynamid i kwas nikotynowy są związkami chemicznymi występującymi często pod wspólną nazwą niacyna, witamina PP lub B₃. Zarówno nikotynamid jak i kwas nikotynowy dostarczane są do organizmu głównie z pokarmem. Możliwa jest również ich synteza w organizmie człowieka. W produktach roślinnych (otręby zbożowe, rośliny strączkowe, orzechy arachidowe, szpinak) występuje głównie kwas nikotynowy. W produktach pochodzenia zwierzęcego (wątroba, nerki, ryby) dominuje nikotynamid. Dzielne zapotrzebowanie na kwas nikotynowy i nikotynamid wynosi około 15-20 mg [1,2].

Kwas nikotynowy powstaje w wyniku przekształcenia tryptofanu w szlaku kynureinowym. Z 60 mg tryptofanu dostarczanego z dietą powstaje około 1 mg kwasu nikotynowego. Syntezę nikotynamidu opisano poniżej (rycina 1). Zarówno kwas nikotynowy, jak i nikotynamid są substratami do biosyntezy NAD⁺ i powodują wzrost stężenia tego dinukleotydu w komórkach [3]. Wspólną cechą kwasu nikotynowego i jego amidu jest ich skuteczność w leczeniu pelagry oraz innych stanów niedoboru witaminy B₃. Właściwości farmakologiczne nikotynamidu i kwasu nikotynowego są jednak różne [1]. Kwas nikotynowy jest skutecznym lekiem obniżającym stężenie LDL-cholesterolu i triacylogliceroli a podwyższającym zawartość HDL-cholesterolu we krwi [1,4]. Nikotynamid nie wpływa na stężenie lipidów we krwi*. W prezentowanej rozprawie przedstawione zostały dane dotyczące roli nikotynamidu i jego metabolitów w fizjologii i patologii człowieka, uzyskane w czasie realizacji rozprawy habilitacyjnej i przedyskutowane z danymi z piśmiennictwa.

1.1. Metabolizm nikotynamidu

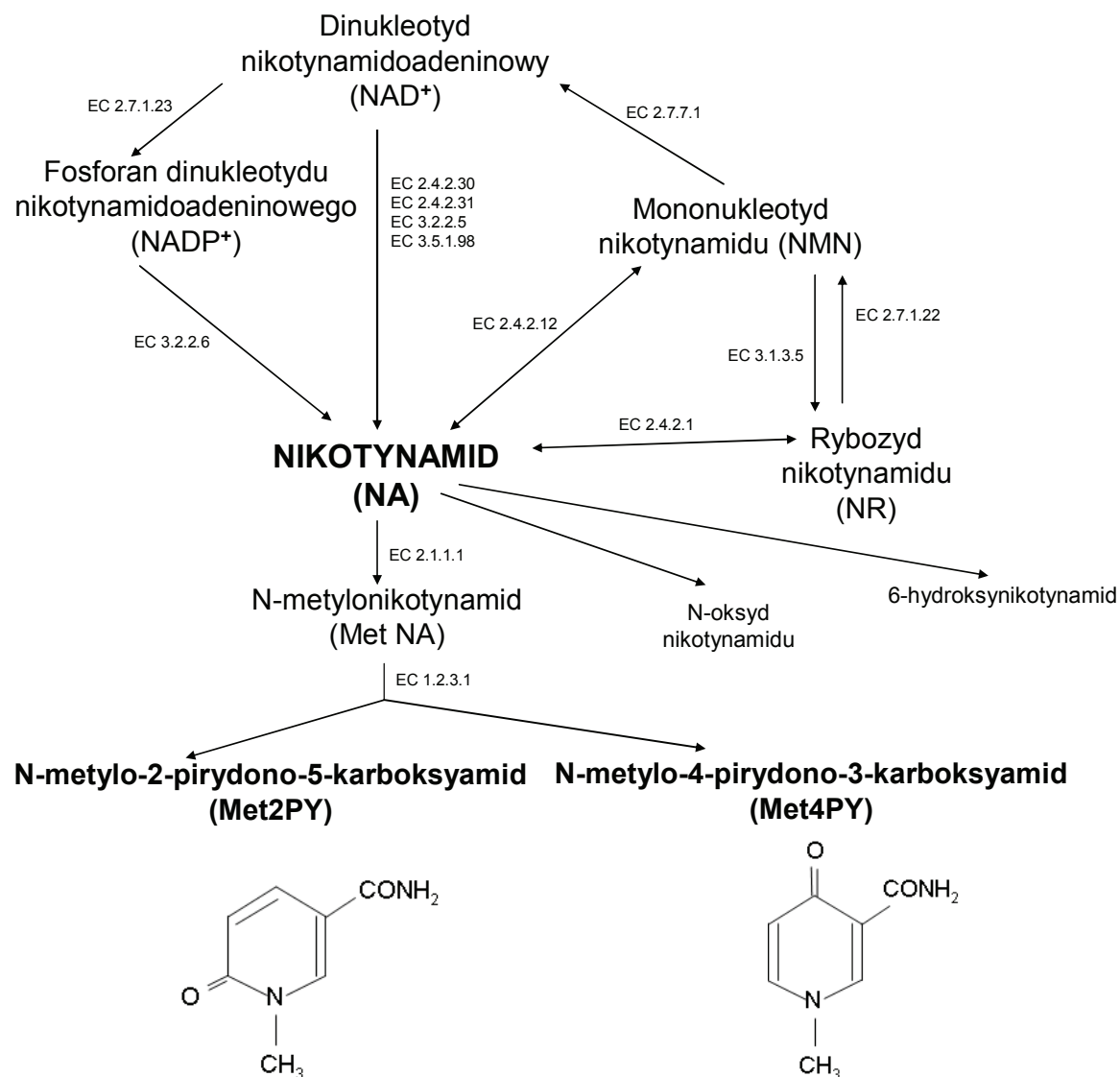
Nikotynamid (NA) może być bezpośrednim produktem wielu reakcji enzymatycznych w komórkach organizmu człowieka. Są to przede wszystkim reakcje związane z degradacją dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD⁺) [5,6]. Do grupy enzymów metabolizujących NAD⁺ należą: polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP; EC 2.4.2.30), mono-ADP-rybozylotransferaza (EC 2.4.2.31), sirtuiny (np. deacetylaza histonów, EC 3.5.1.98) oraz NAD(P)⁺ glikohydrolazy/cyklazy ADP-rybozy (EC 3.2.2.5 i EC 3.2.2.6) [7,8]. Reakcje katalizowane przez te enzymy odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, na przykład w między-

* Ze względu na znaczące różnice właściwości farmakologicznych kwasu nikotynowego i nikotynamidu nie powinno się stosować dla tych związków nazwy niacyna. Niestety nie jest to uwzględniane w publikacjach naukowych i podręcznikach.

i wewnątrzkomórkowej sygnalizacji, transkrypcji, naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego, mitozie, jak również apoptozie i nekrozie komórek [6,9,10]. Zaburzenia funkcjonowania tych procesów mogą być przyczyną wielu zjawisk patologicznych.

Poza degradacją NAD^+ nikotynamid może powstawać również w wyniku odwracalnej reakcji katalizowanej przez fosforylaze nukleozydu nikotynamidowego (EC 2.4.2.1) [11] lub przez fosforybozylotransferaze nikotynamidową (NamPRT; EC 2.4.2.12) [12].

Nikotynamid ulega przemianie do N-okszydu nikotynamidu i 6-hydroksynikotynamidu [13,14], a przy udziale cytoplazmatycznego enzymu - metylotransferazy nikotynamidu (NNMT, EC 2.1.1.1) do N-metylonikotynamidu (MNA, oznaczanego również symbolem MetNA) [15]. Metabolit ten pod wpływem oksydazy aldehydowej (EC 1.2.3.1) ulega degradacji do: N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (M2PY, oznaczanego również symbolem 2PY, Met2PY) i N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu (M4PY, oznaczanego również symbolem 4PY, Met4PY), które są końcowymi produktami degradacji nikotynamidu [16-18]. Nikotynamid jest prekursorem rybozydu nikotynamidu, a także mononukleotydu nikotynamidu (NMN) [12,19]. Ogólny metabolizm nikotynamidu przedstawiono na rycinie 1. Reakcje katalizowane przez enzymy, których kody umieszczono na rycinie 1 i szczegółowo omówiono w tabeli 1.



Rycina 1. Metabolizm nikotynamidu w komórkach u ssaków.

Fosforylaza nukleozydu nikotynamidowego (EC 2.4.2.1), fosforybozylotransferaza nikotynamidowa (NamPRT; EC 2.4.2.12), NAD⁺ glikohydrolaza/cyklaza ADP-rybozy (EC 3.2.2.5), NADP⁺ glikohydrolaza/cyklaza ADPR-rybozy (EC 3.2.2.6), polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP; EC 2.4.2.30), mono-ADP-rybozylotransferaza (EC 2.4.2.31), sirtuiny (EC 3.5.1.98), metylotransferaza nikotynamidu (NNMT, EC 2.1.1.1), oksydaza aldehydowa (EC 1.2.3.1), adenylotransferaza mononukleotydu nikotynamidu (EC 2.7.7.1), 5²- nukleotyduza (EC 3.1.3.5) kinaza rybozylonikotynamidu (EC 2.7.1.22), kinaza NAD⁺ (EC 2.7.1.23).

Tabela 1. Reakcje katalizowane przez enzymy uczestniczące w metabolizmie nikotynamidu i jego metabolitów

EC zgodnie z IUBMB **	Nazwa enzymu zalecana przez IUBMB (często stosowana)	Katalizowane reakcje
EC 2.4.2.1	Fosforylaza nukleozydów purynowych *fosforylaza nukleozydu nikotynamidowego	Nukleozyd purynowy + fosforan = zasada purynowa + α -D-rybozo-1-fosforan *rybozyd nikotynamidu + fosforan = nikotynamid + α -D-rybozo-1-fosforan + H ⁺ [11,20]
EC 2.4.2.12	fosforybozylotransferaza nikotynamidu	D-rybonukleotyd nikotynamidu + difosforan = nikotynamid + 5-fosfo- α -D-rybozo- 1-difosforan
EC 3.2.2.5	NAD ⁺ nukleozydaza (NAD ⁺ glikohydrolaza/ cyklaza ADPR-rybozy)	NAD ⁺ + H ₂ O = ADP-ryboza + nikotynamid
EC 3.2.2.6	NADP ⁺ nukleozydaza (NADP ⁺ glikohydrolaza/ cyklaza ADPR-rybozy)	NADP ⁺ + H ₂ O = ADP-ryboza(P) + nikotynamid
EC 2.4.2.30	NAD ⁺ ADP-rybozylo-transferaza (polimeraza poli(ADP-rybozy))	NAD ⁺ + (ADP-D-rybozylo) _n -akceptor = nikotynamid + (ADP-D-rybozylo) _{n+1} -akceptor + H ⁺
EC 2.4.2.31	NAD ⁺ ADP-rybozylo-transferaza reszt argininy białka (mono-ADP-rybozylotransferaza)	NAD ⁺ + L-arginina białka = nikotynamid + N ^ω -(ADP-D-rybozylo)-L-arginina białka
EC 3.5.1.98	deacetylaza histonów (niektóre sirtuiny)	Hydroliza reszty N(6)-acetylolizyny histonów z uwolnieniem deacetylowanych histonów (nie podano reakcji sumarycznej)
EC 2.1.1.1	N-metylotransferaza nikotynamidu	S-adenozylo-L-metionina + nikotynamid = S-adenozylo-L-homocysteina + 1-metylonikotynamid
EC 1.2.3.1	oksydaza aldehydowa	aldehyd + H ₂ O + O ₂ = kwas + H ₂ O ₂
EC 2.7.7.1	adenylotransferaza mononukleotydu nikotynamidu	ATP + rybonukleotyd nikotynamidu = difosforan + NAD ⁺
EC 3.1.3.5	5'- nukleotydaza	5'-rybonukleotyd + H ₂ O = rybonukleozyd + fosforan
EC 2.7.1.23	kinaza NAD ⁺	NAD ⁺ + ATP = NADP ⁺ + ADP
EC 2.7.1.22	kinaza rybozylonikotynamidu	ATP + N-rybozylonikotynamid = ADP + rybonukleotyd nikotynamidu

enzymy nie ujęte w spisie IUBMB, a katalizujące reakcje opisane w piśmiennictwie

** Rekomendowane przez Komitet Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej dla Nomenklatury i Klasyfikacji Reakcji Katalizowanych przez Enzymy [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/] (ang. *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse*)

1.2. Stężenia nikotynamidu i jego metabolitów w płynach biologicznych

Wartości stężeń nikotynamidu i jego metabolitów (MetNA, Met2PY i Met4PY) w osoczu i moczu ludzi zdrowych publikowane do tej pory różnią się znacząco między sobą (tabela 2). Wpływ na to może mieć wiele czynników. Jednym z nich może być jakość i ilość spożywanych pokarmów. U ludzi wydalanie z moczem MNA oraz Met2PY i Met4PY wzrasta po spożyciu kwasu nikotynowego lub nikotynamidu [21,22]. Po doustnym podaniu nikotynamidu lub kwasu nikotynowego zaobserwowano najwyższy wzrost ilości Met2PY (80% podanego związku przekształciło się w Met2PY) w moczu. Mniejszy wzrost nastąpił po podaniu MetNA i kwasu nikotynurowego, tylko 13%. Stężenia metabolitów nikotynamidu w moczu nie wzrastały po podaniu: kwasu N-metylo-2-pirydono-5-karboksyłowego, kwasu chinolowego, trigonelliny, kwasu 6-hydroksy-nikotynowego i 6-hydroksynikotynamidu [23], jak również po podaniu NAD^+ i NADH [24]. Dieta pozbawiona kwasu nikotynowego, ale bogata w kwas orotowy powodowała obniżenie wydalania MNA, Met2PY i Met4PY, gdyż jak sugerują autorzy zmniejsza się szybkość przekształcania tryptofanu do kwasu nikotynowego [25]. Kolejnym czynnikiem mogącym wpływać na rozbieżność wyników przedstawionych w tabeli 2 są różnice dobowe w wydalaniu metabolitów nikotynamidu z moczem. Wydalanie MNA największe jest rano i obniża się w porze popołudniowej [26]. Stężenia Met2PY i Met4PY są wysokie w porze rannej i wzrastają do popołudnia, a potem obniżają się. Najmniejsze stężenie metabolitów nikotynamidu obserwuje się wieczorem i w nocy [26]. Nie można jednak wykluczyć, że jest to także zależne od stosowanej diety, a przede wszystkim od pory dnia, w której spożywane są posiłki.

Wpływ na wydalanie metabolitów nikotynamidu mają także niektóre hormony. Zaobserwowano, że estrogeny powodują obniżenie wydalania NA, MetNA oraz Met2PY i Met4PY z moczem, natomiast testosteron pozostaje bez wpływu [27]. Stężenie MNA w moczu wzrasta, gdy stosowany jest hormon wzrostu [28]. Obniża się po podaniu steroidów (hydrokortyzon) i nie zmienia się, gdy oba hormony stosowane są jednocześnie. Stężenie Met2PY ulega obniżeniu, gdy stosowany jest hormon wzrostu, a nie zmienia się, gdy stosowany jest tylko hydrokortyzon [28].

Rozbieżności w wartościach stężeń metabolitów nikotynamidu publikowanych do tej pory mogą wynikać także z różnych metod stosowanych do ich oznaczania. Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV, stosowana niemal we wszystkich publikowanych dotychczas pracach, nie pozwala na jednoznaczną identyfikację analizowanych związków. Dlatego jednym z celów badań przedstawianych w niniejszej rozprawie habilitacyjnej było opracowanie metody pozwalającej na analizowanie stężeń nikotynamidu i jego metabolitów

w moczu i osoczu osób zdrowych oraz porównanie uzyskanych wyników z danymi z piśmiennictwa.

Z dostępnych danych piśmiennictwa oraz badań własnych wynika, że stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu i moczu ulegają zmianie w różnych stanach patologicznych (tabela 3). Badanie stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu lub moczu może pozwolić na śledzenie przebiegu procesów patologicznych, a w niektórych stanach patologicznych pełnić rolę wskaźników prognostycznych. MNA jest uważany za wskaźnik skuteczności leczenia białaczki u pacjentów po zabiegach naświetlania i przeszczepu szpiku kostnego [29]. U pacjentów dobrze rokujących, 20 dni po wspomnianych zabiegach, obserwuje się wzrost wydalania MNA, który normalizuje się do 40 dnia [29]. Normalizacji wydalania MNA nie obserwuje się u pacjentów źle rokujących [29]. Wydalanie większych ilości MNA zaobserwowano u wcześniaków w porównaniu z dziećmi urodzonymi w terminie. Na tej podstawie autorzy sugerują, że MNA może być markerem okołoporodowych zmian metabolicznych u dziecka [30]. MNA jest także uważany za wskaźnik zatrucia azotynami, gdyż jego stężenie w moczu wzrasta gwałtownie po ekspozycji na te związki [31].

U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) dochodzi do zaburzonego wydalania metabolitów nikotynamidu. Dlatego też badania dotyczące ich stężeń, a szczególnie roli jaką mogą odgrywać w przewlekłej niewydolności nerek, są jednym z celów badań niniejszej rozprawy.

Analiza stężenia w osoczu i wydalania z moczem metabolitów nikotynamidu jest interesująca nie tylko ze względu na możliwość monitorowania poziomu niacyny w organizmie (*niacin nutritional status*), katabolizmu NAD^+ , funkcji nerek czy innych stanów patologicznych. Metabolizm nikotynamidu zmienia się w różnych stanach fizjologicznych, np. w czasie starzenia. Ten stan fizjologiczny kojarzony jest ze spowolnieniem funkcji metabolicznych, stąd potrzeba sprawdzenia, czy wraz z długością życia zmieniają się stężenia metabolitów nikotynamidu.

Tabela 2. Stężenia nikotynamidu i jego metabolitów w osoczu (A) i wydalanie z moczem (B) u ludzi zdrowych.

Metabolit	Stężenie	Piśmiennictwo
-----------	----------	---------------

A)

NA	0,34 $\mu\text{mol/l}$ 0,026 \pm 0,01 $\mu\text{mol/l}$ 0,36 \pm 0,04 $\mu\text{mol/l}$	[32] [33] (*)
MetNA	0,17 $\mu\text{mol/l}$ 0,0073-0,85 $\mu\text{mol/l}$ 0,15 \pm 0,01 $\mu\text{mol/l}$ 0,0038 $\mu\text{mol/l}$	[34] [35] [36] (*)
Met2PY	1,32-3,95 $\mu\text{mol/l}$ 9 \pm 4,5 $\mu\text{mol/l}$ 0,83 \pm 0,18 $\mu\text{mol/l}$ 0,39 \pm 0,22 $\mu\text{mol/l}$ (osoby < 16 r.ż.) 1,01 \pm 0,5 $\mu\text{mol/l}$ (osoby > 60 r.ż.)	[21] [37] [publikacja 2] [38] [publikacja 4]
Met4PY	0,34 \pm 0,15 $\mu\text{mol/l}$ 0,26 \pm 0,09 $\mu\text{mol/l}$	(*) [publikacja 3] [33]

B)

NA	< 3 $\mu\text{mol/24h}$	[39]
MetNA	31,1 \pm 12,3 $\mu\text{mol/24h}$ (11,9 - 66,9 $\mu\text{mol/24h}$) 3,65-180 $\mu\text{mol/l}$ 42 \pm 26 $\mu\text{mol/24h}$ (zakres 12-108 $\mu\text{mol/24h}$) 25,61 \pm 10,11 $\mu\text{mol/24h}$ 36,5 $\mu\text{mol/24h}$ (11,1-86,1 $\mu\text{mol/24h}$)	[39] [35] [40] [26] [41]
Met2PY	0,658 – 31,6 $\mu\text{mol/l}$ 96,6 – 384,5 $\mu\text{mol/24h}$ (u mężczyzn) 84,1 – 132 $\mu\text{mol/24h}$ (u kobiet) 59,8 \pm 26,5 $\mu\text{mol/24h}$ (18 – 136 $\mu\text{mol/24h}$) 60 $\mu\text{mol/24h}$ (16,2 – 146 $\mu\text{mol/24h}$) 132 $\mu\text{mol/24h}$ 43,49 \pm 11,64 $\mu\text{mol/24h}$ 132,2 \pm 84,9 $\mu\text{mol/24h}$ (39,5 – 337,5 $\mu\text{mol/24h}$) 1,75 \pm 0,97 $\mu\text{mol/kg/24h}$ (osoby < 16 r.ż.) 1,20 \pm 0,97 $\mu\text{mol/kg/24h}$ (osoby >60 r.ż.)	[13] [22] [39] [41] [42] [26] [40] [publikacja 4]
Met4PY	7,1 \pm 3,3 $\mu\text{mol/24h}$ (zakres 2,4-15,8 $\mu\text{mol/24h}$) 30,7-44,9 $\mu\text{mol/24h}$ (u kobiet) 67,1-157,6 $\mu\text{mol/24h}$ (u mężczyzn) 5,79 \pm 2,15 $\mu\text{mol/24h}$ 28,9 \pm 22 $\mu\text{mol/24h}$	[39] [22] [26] [publikacja 6]

(*) Wyniki własne, niepublikowane. Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki własne autora rozprawy.

Tabela 3. Zmiany wydalania metabolitów nikotynamidu z moczem u ludzi (A) i szczurów (B) w różnych stanach patologicznych.

	Metabolit i jego wydalanie z moczem	Stan patologiczny	Piśmiennictwo
--	-------------------------------------	-------------------	---------------

A)

Podwyższony poziom	MetNA i Met2PY	- w marskości wątroby - po oparzeniach - w ciąży (ale tylko w trzecim trymestrze) - w cukrzycy typu 2	[36] [43] [44,45] [46]
	MetNA	- w stresie wywołanym zimnem - w nowotworach piersi - po leczeniu niektórymi lekami, np. pyrazinamidem - w chorobie Parkinsona	[26,47] [48] [49] [50-52]
Obniżony poziom	MetNA i Met2PY	- w alkoholowej pelagrze - w schizofrenii - we wtórnej depresji - w niedorozwoju umysłowym dzieci	[53,54] [55] [56] [57]
	Met2PY	- u dzieci z autyzmem	[58]
	MetNA	- w przewlekłym zapaleniu migdałków - w AIDS (z biegunką)	[59] [54]

B)

Podwyższony poziom	MetNA i Met2PY	- u szczurów po podaniu związków rakotwórczych	[60-62]
	MetNA	- u szczurów po podaniu związków hepatotoksycznych, np. klofibratu, dimetylohydrazyny	[63,64]
Obniżony poziom	MetNA	- u szczurów w marskości wątroby wywołanej czterochlorkiem węgla - przy dużej utracie masy ciała	[65] [64]

1.3. Rola nikotynamidu i jego metabolitów

Badania dotyczące roli nikotynamidu w fizjologii i patologii prowadzone są od kilkudziesięciu lat a zgromadzona wiedza jest obszerna. Poza rolę prekursora NAD(P)^+ , nikotynamid uczestniczy w procesach związanych z regulacją cyklu komórkowego i naprawą DNA. Liczne badania wykazały, że nikotynamid wykazuje przeciwzapalne właściwości wynikające między innymi z hamowania indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) [66], zdolności do usuwania wolnych rodników [67], a także hamowania ekspresji genów kodujących antygeny MHC klasy II [68] i wewnątrzkomórkowego czynnika adhezyjnego ICAM-1 w komórkach śródbłonna [69]. Nikotynamid jest również silnym inhibitorem syntezy prozapalnych cytokin: IL-1 β [70,71], IL-6 [70], IL-8 [70], IL-12 [72] i TNF α [70,72]. Jego właściwości przeciwzapalne próbowano wykorzystać w dermatologii [73-77] i w reumatologii [78,79]. Wiązano z nim także duże nadzieje w leczeniu cukrzycy typu I [80,81] i w chorobach układu nerwowego [82-84].

Niektóre skutki działania NA związane są z hamowaniem aktywności enzymów metabolizujących NAD^+ [85]. Nikotynamid hamuje polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARP) z IC_{50} $43 \pm 5,2 \mu\text{M}$ i mono-ADP-rybozylotransferazę z IC_{50} $3400 \pm 410 \mu\text{M}$ [86,87]. Niekompetycyjnie hamuje sirtuiny z K_i 50-150 μM [88-91]. Jest on także inhibitorem fosforylasy nukleozydu nikotynamidowego [92,93], fosfodiesterazy [76] oraz inhibitorem monoooksygenaz [94].

Polimeraza poli(ADP-rybozy) jako jeden z ważniejszych enzymów związanych z przemianą NAD-u odgrywa istotną rolę w komórce. PARP jest szczególnie ważną w utrzymaniu integralności genomu komórki [95,96], jest zaangażowana w dekondensację chromatyny [97,98], replikację DNA [99], naprawę DNA [100], transkrypcję [101,102], duplikację centrosomów [103], regulację funkcji telomerów [104,105], regulację mitozy [106], nekrozę [107], zależną od kaspaz [108-110] i niezależną od kaspaz apoptozę [111]. Reguluje także aktywność szlaków metabolicznych i sygnałowych [112]. W śródbłonku hiperglikemia, indukując stres oksydacyjny, aktywuje polimerazę poli(ADP-rybozy), która powoduje obniżenie stężenia NAD^+ , spowolnienie glikolizy, hamowanie transportu elektronów i obniżenie stężenia ATP. W rezultacie proces ten prowadzi do jego ostrej dysfunkcji [112].

Aktywność PARP odgrywa także istotną rolę w patogenezie licznych stanów chorobowych, takich jak: zawał i wylew krwi w mózgu, zawał mięśnia sercowego, cukrzyca, alergie i inne choroby zapalne oraz choroby neurodegeneracyjne, włączając w to chorobę Parkinsona i Alzheimera [78,113]. Z tego też powodu trwają intensywne poszukiwania inhibitorów PARP i sposobów ich podawania, które z jednej strony miałyby chronić przed negatywnymi skutkami

nadmiernej aktywności PARP (w tym obniżeniem stężenia NAD^+ w komórce), a z drugiej nie upośledzać naprawy uszkodzonego DNA.

Hamowanie aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) przez nikotynamid wskazuje na jego właściwości cytoprotekcyjne. Chroni komórki przed uszkodzeniami toksycznymi *in vitro*, jak również *in vivo* [114]. W obecności nikotynamidu w komórkach wątroby zaobserwowano mniejsze uszkodzenia po działaniu różnych czynników toksycznych [115]. W komórkach mięśniówki gładkiej naczyń [116], kardiomiocytach [117] poddanych działaniu peroksynitrytu lub endotoksyny nikotynamid hamował aktywność PARP i zapobiegał hamowaniu oddychania mitochondrialnego, a w konsekwencji prowadził do zachowania stężenia ATP w komórkach [116,117].

Struktura chemiczna większości znanych inhibitorów PARP-1[†] jest podobna do struktury nikotynamidu. Ponadto region nikotynamidowy w cząsteczce NAD^+ jest miejscem wiązania do PARP-1 [118]. Pochodne nikotynamidu, zwłaszcza Met2PY i Met4PY są strukturalnie podobne do znanych inhibitorów PARP, takich jak 3-aminobenzamid [118,119]. Dodatkowo jeszcze, większość inhibitorów PARP ma karboksamidową grupę (obecną również w metabolitach nikotynamidu), która, jak się okazało, odgrywa kluczową rolę w hamowaniu tego enzymu [118].

W związku z powyższym w ramach realizacji rozprawy habilitacyjnej sprawdzono czy pochodne nikotynamidu posiadają właściwości hamujące aktywność PARP.

W przeciwieństwie do nikotynamidu znaczenie jego pochodnych jest słabo poznane. Poza monitorowaniem ich stężeń (w osoczu i moczu) w czasie podawania lub w stanie niedoboru nikotynamidu lub kwasu nikotynowego nie przypisywano tym związkom większego znaczenia. Uzyskane w ostatnich latach dane nakazują powtórne zdefiniowanie roli tych związków w fizjologii i patologii człowieka.

Z dostępnych publikacji wynika, że MNA wykazuje właściwości przeciwzapalne, które próbuje się stosować w leczeniu niektórych chorób skóry i oparzeniach [120-122] oraz w chorobach układu sercowo-naczyniowego [123]. Działania te są związane ze stymulacją produkcji prostacykliny w śródbłonku [124,125], jednego z najsilniejszych znanych czynników hamujących wykrzepianie i procesy zapalne. Z działaniem zwiększającym produkcję prostacykliny związany jest wpływ ochronny MNA na śluzówkę żołądka [126]. Analiza czynności śródbłonka u szczurów z cukrzycą i hipertriglicerydemią potwierdziła cytoprotekcyjny wpływ MNA [127]. W badaniach tych wykazano poprawę zależnych od śródbłonka mechanizmów regulujących przepływ krwi po podaniu MNA. Badania te wykazały również korzystny wpływ MNA na

[†] PARP-1 jest obecnie najlepiej poznanym izoenzymem polimerazy poli(ADP-rybozy). Poszukiwania specyficznych inhibitorów PARP dotyczą głównie tej izoformy.

patologiczny poziom triglicerydów we krwi. To działanie jest obecnie w fazie badań klinicznych i być może MNA będzie stosowany jako lek hipolipemizujący.

Przyпуска się, że MNA może zapobiegać i łagodzić rozwój cukrzycy typu I [128], a jednym z argumentów przemawiającym za tym ma być spostrzeżenie, że u ludzi i zwierząt z cukrzycą obserwuje się brak lub niedobór MNA [129,130]. MNA zaangażowany jest w proliferację komórek [131-133], może wpływać na ekspresję genów oraz produkcję hormonu wzrostu i prolaktyny [134,135]. Stwierdzono, że MNA w ośrodkowym układzie nerwowym jest czynnikiem neurotoksycznym i neurodegeneracyjnym [136,137], a w chwili obecnej trwają badania nad jego rolą w chorobie Parkinsona [50,51]. Istnieją również dane uzyskane w badaniach *in vitro* sugerujące neuroprotektoryjne działanie MNA [138,139]. MNA hamuje również aktywność metaloproteinazy-9 we wczesnej fazie przebudowy macierzy pozakomórkowej w mózgu wywołanych niedokrwieniem oraz aktywuje metaloproteinazę-2 w późnej fazie [140].

W ostatnich latach poszukuje się związku MNA z procesami nowotworowymi. Zaobserwowano nadekspresję genu kodującego metylotransferazę nikotynamidu (NNMT) w raku żołądka [141] oraz komórkach raka brodawkowatego tarczycy [142,143]. W jasnokomórkowym raku nerki stwierdzono korelację pomiędzy nadekspresją genu NNMT a wielkością guza [144]. Badania przeprowadzone przez Nakagawa i współ. [145] wykazały, że stężenie MNA we krwi może być markerem ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych. U osób narażonych na rozwój nowotworów złośliwych po podaniu NA zaobserwowano wzrost aktywności NNMT i wyższe stężenie MNA we krwi [145]. Uważa się, że MNA może być także wczesnym markerem raka jelita grubego [146].

Klirens MNA jest uważany za wskaźnik funkcji kanalików nerkowych w przewlekłych chorobach nerek [34], a w szczególności za wskaźnik transportu kationów [147,148]. Inne prace kwestionują jednak specyficzność MNA w tym aspekcie.

1.4. Nowe metabolity przemian nikotynamidu

W 1979 roku w moczu pacjenta z przewlekłą białaczką megaloblastyczną zidentyfikowano związek będący utlenionym rybozydem nikotynamidu - rybozyd 4PY (1-β-D-rybonukleozyd-4-pirydono-3-karboksyamidu, *ang.* 4-pyridone-3-carboxamid-1-β-ribonucleoside, 4PYR, PCNR) [149]. Dziesięć lat później została opublikowana praca opisująca izolację z moczu izoformy 1-β-D-rybofuranosylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (2PYR, 2-PCNR) [150]. PCNR może występować w formie dwóch izomerów: α i β, jednak w moczu znajduje się około 10 razy więcej

formy β niż α . Oprócz 4PYR w moczu zidentyfikowano także jego izomery strukturalne, takie jak: 2,5-PYR (1-D-rybonukleozyd 2-pirydono-5-karboksyamidu), 2,3-PYR (1-D-rybonukleozyd 2-pirydono-3-karboksy-amidu). Jednocześnie każdy z tych izomerów może występować w formie α lub β , co daje łącznie (wliczając 4,3-PYR) aż sześć możliwych różnych struktur PCNR [151]. W 1989 roku Mills stwierdził, że w moczu dominującą formą jest β 4-PYR [150], co kilka lat później potwierdził Schram [151]. Obaj przeprowadzali analizy moczu pochodzącego od osób z chorobą nowotworową. Związkiem o najwyższym stężeniu w moczu okazał się 4,3-PYR, zawartość 2,5-PYR wynosiła około 7% 4,3-PYR, a 2,3-PYR tylko 1% 2,5-PYR [150,151]. Jednak dopiero wykrycie w ostatnich latach rybozydu nikotynamidu rzuciło nowe światło na przemiany NAD^+ i stało się podstawą do dalszych badań [152].

Do niedawna wydawało się, że fizjologiczne nukleotydy są już dobrze poznane. Tym bardziej, że odgrywają one znaczącą rolę w prawie wszystkich procesach związanych z funkcją komórek (przekazywaniem informacji genetycznej, metabolizmem energetycznym i regulacją procesów). Zmiany w poziomie nukleotydów są kluczowe w różnych fazach cyklu komórkowego i różnicowania, a nukleotydy są stosowane w leczeniu chorób nowotworowych, zapalnych, immunosupresyjnych i wirusowych [153,154]. Jednak już 20 lat temu w rozdzielach chromatograficznych zauważono w erytrocytach osób z przewlekłą niewydolnością nerek niezidentyfikowane dotychczas związki o budowie trójfosforanów nukleotydów obecne w bardzo dużych ilościach [37,155]. Spektrum tych związków w UV było zbliżone do pochodnych nikotynamidu. Dlatego też jednym z celów moich badań była identyfikacja tych nukleotydów oraz ich prekursorów.

Opisane powyżej dane dotyczące nikotynamidu i jego metabolitów wskazują, że określenie roli tych związków w fizjologii i patologii wymaga jeszcze wielu badań. Ze względu na istniejące rozbieżności w wartościach stężeń tych związków we krwi i moczu konieczne było opracowanie metody pozwalającej na analizowanie stężeń nikotynamidu i jego metabolitów w płynach biologicznych. Stężenia te mogą pozwolić na śledzenie przebiegu procesów patologicznych, w niektórych przypadkach mogą pełnić rolę wskaźników prognostycznych. Duże znaczenie mogą mieć u chorych z PNN, w których dochodzi do zaburzonego wydalania metabolitów nikotynamidu. Dlatego też u tych chorych szczególnie ważne są badania dotyczące metabolizmu oraz roli jaką te związki mogą odgrywać w patologii przewlekłej niewydolności nerek. Jak wykazano powyżej, stężenia metabolitów nikotynamidu zmieniają się nie tylko w stanach patologicznych, ale także w różnych stanach fizjologicznych, stąd konieczność sprawdzenia jak zmieniają się one u osób zdrowych wraz z wiekiem. Strukturalne podobieństwo metabolitów

nikotynamidu do inhibitorów PARP sugeruje, że jedną z ich właściwości może być hamowanie tego enzymu i działanie cytoprotekcyjne tych związków.

Szczególnie interesujące wydają się pochodne rybozydu nikotynamidu, przede wszystkim pochodne nukleotydowe. Niezbędna jest identyfikacja ich prekursora, czynników regulujących jego syntezę, określenie jego metabolizmu i roli w organizmie tych związków.

2. Cel badań:

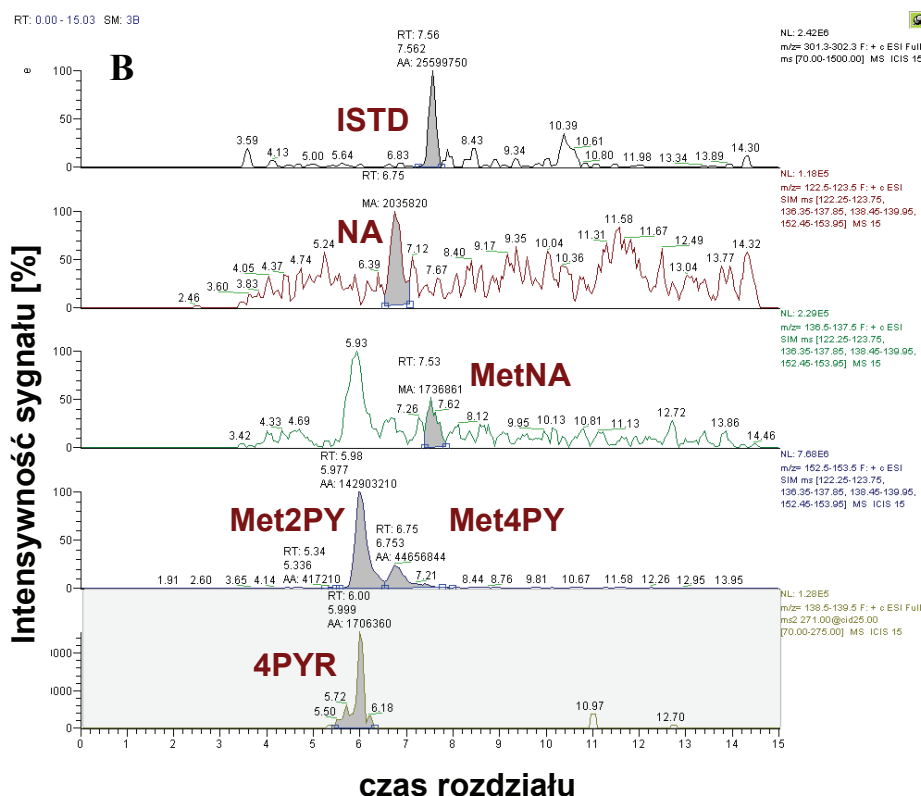
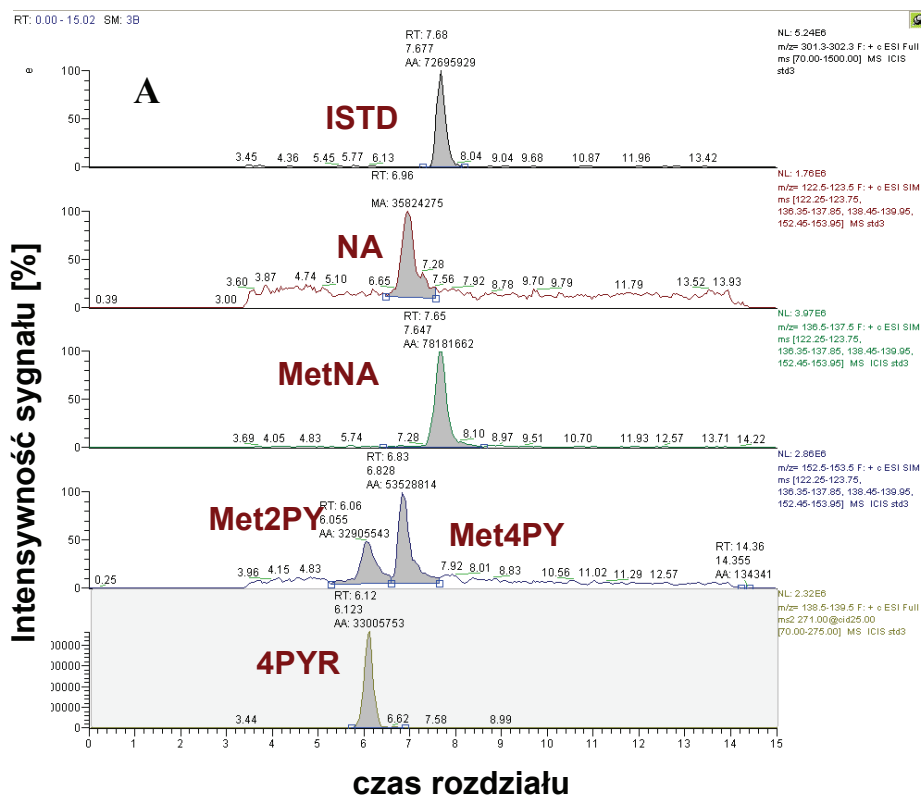
1. Opracowanie metody pozwalającej na analizę (z wykorzystaniem spektrometrii masowej) stężeń metabolitów nikotynamidu w płynach biologicznych i tkankach.
2. Oznaczenie stężeń metabolitów nikotynamidu we krwi i moczu u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek.
3. Analiza zmian stężeń metabolitów nikotynamidu w osoczu osób zdrowych w różnym wieku.
4. Zbadanie *in vitro*: a) wpływu pochodnych nikotynamidu na aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy), b) cytoprotekcyjnego działania pochodnych nikotynamidu.
5. Zbadanie metabolizmu pochodnych nikotynamidu – 4PYR, 4PYTP i 4PYMP. Oznaczenie stężeń tych związków w osoczu i erytrocytach u ludzi w stanach fizjologicznych i z PNN.

3. Metody

3.1. Opracowanie metody oznaczania stężeń metabolitów nikotynamidu

Jednym z celów badań przedstawianych w niniejszej rozprawie było opracowanie metody analizy stężeń nikotynamidu i jego metabolitów (NA, MetNA, Met2PY, Met4PY, 4PYR) w osoczu i moczu z wykorzystaniem spektrometrii masowej [publikacja 1]. Analizę stężeń wyżej wymienionych związków przeprowadzono przy użyciu detektora masowego Thermo-Finnigan LCQ Advantage ze źródłem jonów typu „electrospray” (ESI) pracującego w trybie jonizacji dodatniej. Praca detektora w trybie „single ion monitoring” (SIM) umożliwiała detekcję NA, MetNA, Met2PY, Met4PY oraz N-oksylu nikotynamidu, a w trybie „tandem MS” (MS2) detekcję 4PYR. Rozdział chromatograficzny uzyskano przy użyciu kolumny Synergi Hydro-RP (4 μ m, 150 x 2,0 mm). Jako fazę ruchomą A stosowano wodny roztwór 10 mM kwasu nonafluoropentanowego (NFPA), zaś jako fazę ruchomą B 100% acetonitryl. Analizę prowadzono przy przepływie 0,2 ml/min i gradiencie od 0% do 60% B w ciągu 12 minut. Procedury ekstrakcji materiału biologicznego (osocza, moczu) polegały na strąceniu białek z użyciem 10% kwasu trichlorooctowego, a następnie ekstrakcji uzyskanego supernatantu eterem. Alternatywnie stosowano metodę ekstrakcji przy użyciu 70% acetonitrylu lub ultrafiltrację z wykorzystaniem filtrów celulozowych o wielkości porów zatrzymujących białka o masie powyżej 10 kDa. Przy zastosowaniu wymienionych metod ekstrakcji uzyskiwano odzyski dla badanych związków w granicach 75-95%, co uwzględniano przy obliczaniu stężeń.

Opracowana metoda pozwala na oznaczenie stężeń izomerów (Met2PY i Met4PY), a przez zastosowanie MS2 z wysoką czułością - stężenia 4PYR. Dzięki tej metodzie możliwe jest jednoczesne określenie stężenia wszystkich badanych metabolitów w tych samych warunkach w ciągu 15 minut analizy. Na Rycinie 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy jonowe z rozdziału metabolitów nikotynamidu według własnej metody. Ze względu na zbyt niskie stężenie nie jest możliwe oznaczenie tą metodą stężeń N-oksylu nikotynamidu w osoczu.



Rycina 2. Przykładowe chromatogramy jonowe z rozdzielu nikotynamidu i jego metabolitów z wykorzystaniem chromatografii ciekowej z detekcją masową. (A) standardy (B) próbka osocza pacjenta z PNN. ISTD – standard wewnętrzny, 5-chloroadenozyna. Po prawej stronie chromatogramów dla każdego z analizowanych związków zaznaczono warunki analizy sygnału masowego.

4. Wyniki

4.1. Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu ludzi

4.1.1. Stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek

U dzieci i dorosłych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo zaobserwowano wielokrotny wzrost stężenia Met2PY w osoczu w porównaniu do osób zdrowych. Wydaje się, że ten wzrost jest związany bezpośrednio ze stopniem niewydolności nerek, gdyż wykazano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny (markerem diagnostycznym niewydolności nerek) a stężeniem Met2PY w osoczu [publikacja 2,3] [33]. Zaobserwowano także ujemną korelację pomiędzy stężeniem Met2PY a klirensem kreatyniny [33].

U dorosłych z PNN leczonych zachowawczo stwierdzono też około 5-krotny wzrost stężenia Met4PY w osoczu. Średnie stężenie wynosiło $1,59 \pm 1,35 \mu\text{mol/l}$ w porównaniu do wartości $0,34 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$ w grupie kontrolnej (wyniki własne niepublikowane, wartości średnie \pm SD). U dzieci ten wzrost był nawet 10-krotny. Stężenie Met4PY w osoczu wynosiło $2,1 \pm 2,61 \mu\text{mol/l}$ w porównaniu z wartościami stężeń $0,259 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$ u dzieci zdrowych [publikacja 3]. Podobnie jak w przypadku Met2PY, wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem Met4PY a stężeniem kreatyniny oraz ujemną korelację pomiędzy stężeniem Met4PY a klirensem kreatyniny [publikacja 3] [33].

U osób dorosłych z PNN nie obserwowano podwyższonego stężenia nikotynamidu w osoczu w porównaniu z osobami zdrowymi (odpowiednio $0,51 \pm 0,27 \mu\text{mol/l}$ i $0,36 \pm 0,13 \mu\text{mol/l}$) (wyniki własne niepublikowane). Natomiast u dzieci z PNN średnie stężenie nikotynamidu było wyższe niż u dzieci zdrowych i wykazywało dodatnią korelację ze stężeniem kreatyniny i ujemną z klirensem kreatyniny [publikacja 3].

Przeprowadzono również badania w grupie chorych z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych zabiegowi hemodializy. U pacjentów tych średnie stężenie Met2PY w osoczu było ponad 20-krotnie wyższe niż u osób zdrowych. Bezpośrednio po hemodializie stężenie Met2PY obniżało się o połowę, podobnie jak kreatynina i wzrastało przed następną dializą [publikacja 2] [33,37]. Już w 1964 roku obecność Met2PY stwierdzono w płynie dializacyjnym [156]. Podobnie jak Met2PY zmieniało się stężenie Met4PY w tej grupie chorych: przed dializą wynosiło $2,34 \pm 2,73 \mu\text{mol/l}$, a po zabiegu $0,80 \pm 0,48 \mu\text{mol/l}$ (wyniki własne niepublikowane). Na szczególną

uwagę zasługuje fakt, że już po 30 minutach hemodializy stężenia obu końcowych metabolitów nikotynamidu obniżyły się o 50% (wyniki własne niepublikowane). Jednocześnie obniżenie stężenia nikotynamidu w czasie hemodializy było niewielkie, z $0,47 \pm 0,25 \mu\text{mol/l}$ do $0,33 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$ po 270 minutach zabiegu. Nie zaobserwowano natomiast zmian w stężeniu MNA w osoczu tych chorych (wyniki własne niepublikowane).

Bezpośrednio po transplantacji nerek stężenie Met2PY w osoczu osiągało wartości zbliżone do obserwowanych u osób zdrowych ($1,64 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$) [publikacja 2] [33]. Potwierdzają to też inni badacze [33,37].

Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że u ludzi produkowane są znaczne ilości końcowych metabolitów nikotynamidu, szczególnie Met2PY, który jest głównym metabolitem nikotynamidu [27,157]. U osób zdrowych związki te wydalane są z moczem. Zależności pomiędzy stopniem niewydolności nerek a stężeniem Met2PY i Met4PY sugerują, że upośledzone wydalanie jest główną przyczyną wzrostu stężenia tych związków w osoczu. Po transplantacji nerek wartości te wracają do normy. Jednak wzrost stężenia Met2PY u osób z PNN jest wyższy niż kreatyniny, bo ponad 20-krotny przy 12-krotnym wzroście markera przewlekłej niewydolności nerek. To sugeruje, że niewydolność nerek nie jest jedyną przyczyną wzrostu stężeń metabolitów nikotynamidu. Dlatego należy rozważyć inne czynniki mogące mieć wpływ na całkowitą pulę nikotynamidu np. dieta i masa mięśniowa a także wzrost produkcji końcowych metabolitów nikotynamidu w następstwie uszkodzenia DNA związanego z PNN. Dieta nie ma najprawdopodobniej większego znaczenia, gdyż grupa ludzi zdrowych była dobierana losowo i badane osoby różniły się zarówno stosowaną dietą jak i masą mięśniową, a różnice w stężeniu Met2PY w osoczu były maksymalnie dwukrotne. Jest natomiast możliwe, że u chorych z PNN dochodzi do zwiększonej aktywacji enzymów produkujących nikotynamid, np. polimerazy poli(ADP-rybozy). Wprawdzie nie ma danych dotyczących aktywności tego enzymu u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, jednak kilka poniższych faktów może przemawiać za tą hipotezą. U pacjentów z PNN obserwuje się liczne uszkodzenia DNA [158,159], które aktywują polimerazę poli(ADP-rybozy), enzym biorący udział w naprawie uszkodzonego DNA [160,161]. Aktywacja tego enzymu powoduje przeniesienie reszt ADP-rybozy z NAD^+ na białka jądrowe z jednoczesnym uwolnieniem nikotynamidu [160]. Jednocześnie związanie PARP z uszkodzoną nicią DNA powoduje 500-krotną aktywację tego enzymu [162,163]. U chorych z PNN obserwuje się jednak tylko niewielki wzrost stężenia nikotynamidu w osoczu. Jest to prawdopodobnie spowodowane natychmiastową degradacją nikotynamidu do Met2PY i Met4PY. Nie ma danych na temat aktywności metylotransferazy nikotynamidu i oksydazy aldehydowej u chorych z PNN, ale wiadomo, że procesy transmetylacji są u tych osób nasilone, czego dowodem jest zwiększona

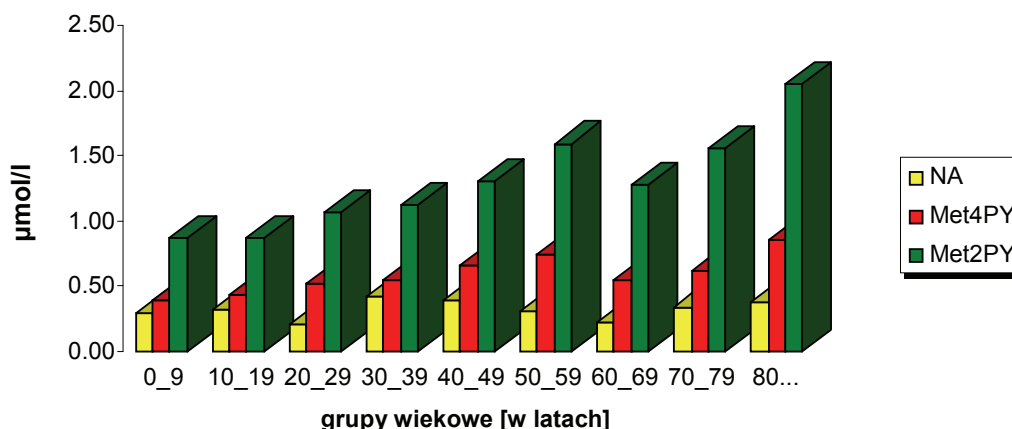
produkcja poliamin [164]. Mało prawdopodobna jest inkorporacja nikotynamidu do NAD^+ u chorych z PNN. Obserwuje się wprawdzie wzrost stężenia ATP, substratu dla adenylotransferazy mononukleotydu nikotynamidu (NNMAT) w erytrocytach [165], ale nie obserwuje się wzrostu stężenia NAD^+ [publikacja 6].

Podsumowując można stwierdzić, że wysokie stężenia Met2PY i Met4PY mogą pełnić znaczącą rolę w przebiegu mocznicy [publikacja 2,3][33]. Mogą być także czułym, wczesnym i łatwym do oznaczania wskaźnikiem niewydolności nerek. Mogą również świadczyć o wzroście aktywności PARP i uszkodzeniach DNA spowodowanych procesem chorobowym [166-168].

4.1.2. Zależne od wieku zmiany stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu osób zdrowych

Z przeprowadzonych badań wynika, że stężenie Met2PY w osoczu dzieci (poniżej 16 roku życia) było niższe ($0,39 \pm 0,22 \mu\text{mol/l}$) niż u osób powyżej 50 roku życia ($1,01 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$). Wprawdzie stężenie kreatyniny także było wyższe u osób starszych, jednak stosunek stężeń kreatyniny osób starszych do młodszych wynosił 1,6 a Met2PY - 2,6 [publikacja 4]. Również stężenie Met4PY było wyższe w grupie osób starszych. Nie zaobserwowano natomiast różnic w stężeniu nikotynamidu pomiędzy tymi grupami, które wynosiło około $0,30 \mu\text{mol/l}$ (wyniki własne niepublikowane). Dzielne wydalanie Met2PY z moczem było zdecydowanie wyższe u osób starszych. Po przeliczeniu na kg masy ciała uzyskano wynik wskazujący na około 30% niższe wydalanie Met2PY u osób starszych [publikacja 4], co jest także zgodne z danymi z piśmiennictwa [52].

Ciekawym spostrzeżeniem jest istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem końcowych metabolitów nikotynamidu, a wiekiem [publikacja 4], co przedstawiono na Rycinie 3 (wyniki własne niepublikowane). Aby wykluczyć wpływ funkcji nerek przebadano grupę osób w różnym wieku, ale o podobnym stężeniu kreatyniny. W tym przypadku także potwierdzono zależność pomiędzy stężeniem Met2PY a wiekiem. To sugeruje, że nie tylko pogorszenie funkcji nerek związane z wiekiem, ale także wiek są niezależnymi czynnikami wpływającymi na stężenie Met2PY. Potwierdza to wieloczynnikowa analiza korelacji pomiędzy zmianami stężenia Met2PY w osoczu a wiekiem i stężeniem kreatyniny w osoczu. Analiza ta wykazała, że w przypadku ludzi zdrowych wiek jest czynnikiem decydującym o wzroście stężenia Met2PY w osoczu [publikacja 4].



Rycina 3. Stężenia nikotynamidu i jego końcowych metabolitów w osoczu u osób zdrowych w zależności od wieku.

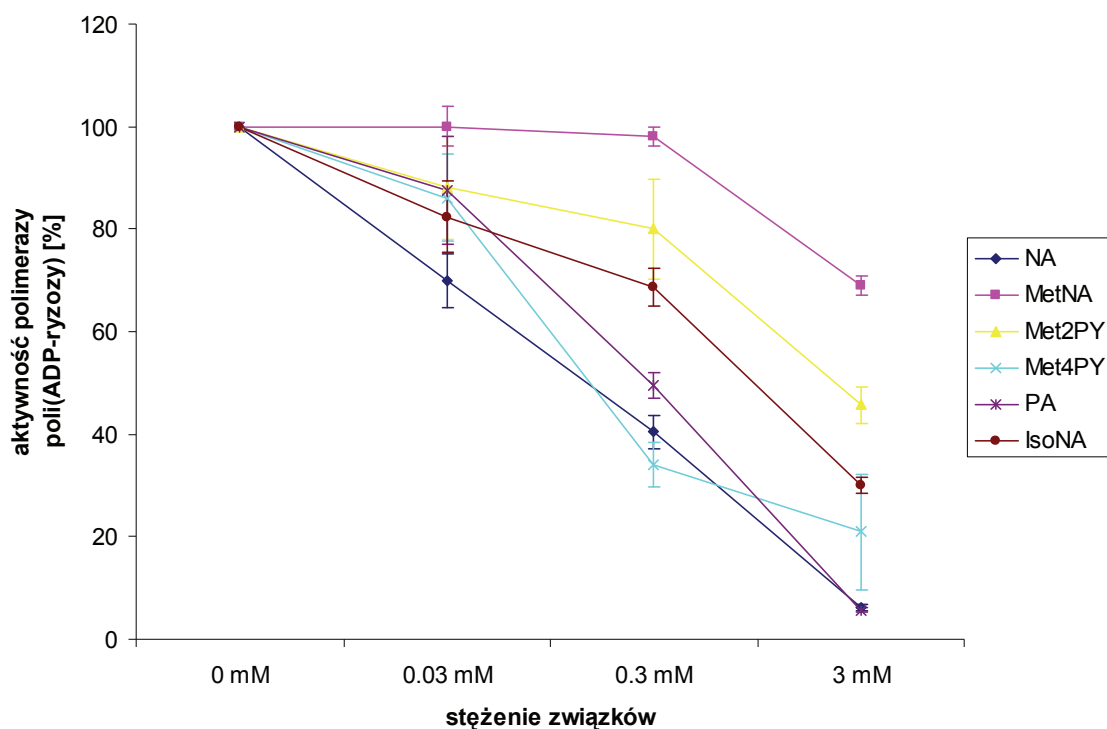
Wydaje się, że podwyższone stężenia Met2PY i Met4PY we krwi [publikacja 4] (rycina 3) mogą być skutkiem wzrostu degradacji NAD^+ i/lub obniżenia wbudowywania nikotynamidu do puli NAD^+ . Jednak na podstawie moich wyników nie można tego jednoznacznie stwierdzić. Wprawdzie analizowane stężenia nikotynamidu i NAD^+ w wątrobie (głównym miejscu metabolizmu NAD^+) szczurów młodych były wyższe niż u starych, to jednak nie były to różnice statystycznie znamienne. Dodatkowo były one odpowiednio 10 i 20 razy wyższe niż stężenia Met2PY zmierzone w wątrobach tych zwierząt [publikacja 4]. Ponadto Met2PY i Met4PY mogą powstać tylko z nikotynamidu, a zatem u ludzi starszych produkcja tego związku musi być zwiększona. W komórkach limfocytarnych pochodzących od stulatków zaobserwowano większą aktywność poli(ADP-rybozy)lacji [169]. Zaobserwowany wzrost uszkodzeń DNA związany z wiekiem [170] stymuluje aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy) [10,160,161,171]. W ostatnich latach stwierdzono (na razie tylko u organizmów jednokomórkowych), że aktywność sirtuin, enzymów produkujących nikotynamid, związana jest z długością życia [172,173]. Wydaje się także, że zwiększona produkcja Met2PY i Met4PY może być związana bezpośrednio ze zwiększoną aktywnością enzymów degradujących nikotynamid u ludzi starszych. Nie ma w piśmiennictwie danych potwierdzających te przypuszczenia. Stwierdzono jedynie bardzo niską (poniżej 2%) aktywność metylotransferazy nikotynamidu (NNMT, EC 2.1.1.1) w wątrobie płodu szczura, ale już 28 dni po urodzeniu była taka jak u osobnika dorosłego, jednak nie badano, czy wraz z wiekiem się zwiększa [174]. Podobnie aktywność oksydazy aldehydowej u myszy jest niska w 1, 7 i 14 dniu, a pełną aktywność osiąga w 4 tygodniu życia [175]. Podobne wyniki uzyskano u dzieci. Zaraz po urodzeniu aktywność oksydazy aldehydowej jest bardzo niska i powoli z wiekiem wzrasta. Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy aktywnością enzymu a wiekiem,

masą ciała, powierzchnią ciała oraz wielkością wątroby. Aktywność obserwowaną u osób dorosłych oksydaza aldehydowa osiąga około 3 roku życia i przy masie ciała około 15 kg [176].

Proponowana zatem sekwencja: wiek → aktywacja enzymów metabolizujących NAD^+ (sirtuin, polimerazy poli(ADP-rybozy)) → wzrost produkcji nikotynamidu → wzrost stężenia Met2PY i Met4PY jest bardzo prawdopodobna.

4.2. Pochodne nikotynamidu inhibitorami polimerazy poli(ADP-rybozy)

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że końcowe metabolity nikotynamidu są inhibitorami PARP. Najsilniejszym inhibitorem tego enzymu okazał się Met4PY [publikacja 3], słabszym Met2PY [publikacja 3] [33]. Natomiast wśród pochodnych silne właściwości hamujące wykazują izomery nikotynamidu – pikolinamid i izonikotynamid (wyniki własne niepublikowane, rycina 4). Wśród metabolitów NAD^+ najsilniejszym inhibitorem PARP-u jest nikotynamid, jednak jego stężenie w osoczu jest niskie i nie wzrasta znacząco w przewlekłej niewydolności nerek (rozdział 4.1.1). Hamowanie aktywności PARP przez Met2PY i Met4PY może mieć znaczenie dla przebiegu niektórych chorób. O ile u ludzi zdrowych stężenia metabolitów nikotynamidu są bardzo niskie w osoczu o tyle u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek wzrastają kilkunastokrotnie, osiągając wartości zbliżone do hamujących PARP *in vitro*. Co prawda IC_{50} dla Met2PY wynosi ok. 2 mM, a dla Met4PY ok. 0,2 mM, to jednak trzeba zauważyć, że wysokie stężenia tych związków utrzymują się przez cały czas w organizmie chorych [publikacja 3], a ich działanie kumuluje się. Co więcej, w komórce stężenia końcowych metabolitów nikotynamidu mogą być wyższe niż w osoczu (ze względu na możliwość aktywnego transportu i zagęszczanie). Niewykluczone, że hamowanie aktywności PARP przez gromadzące się metabolity jest odpowiedzialne za limfopenię [177] i częstszy rozwój nowotworów u niektórych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek [178].



Rycina 4. Hamowanie polimerazy poli(ADP-rybozy) przez wybrane pochodne nikotynamidu.

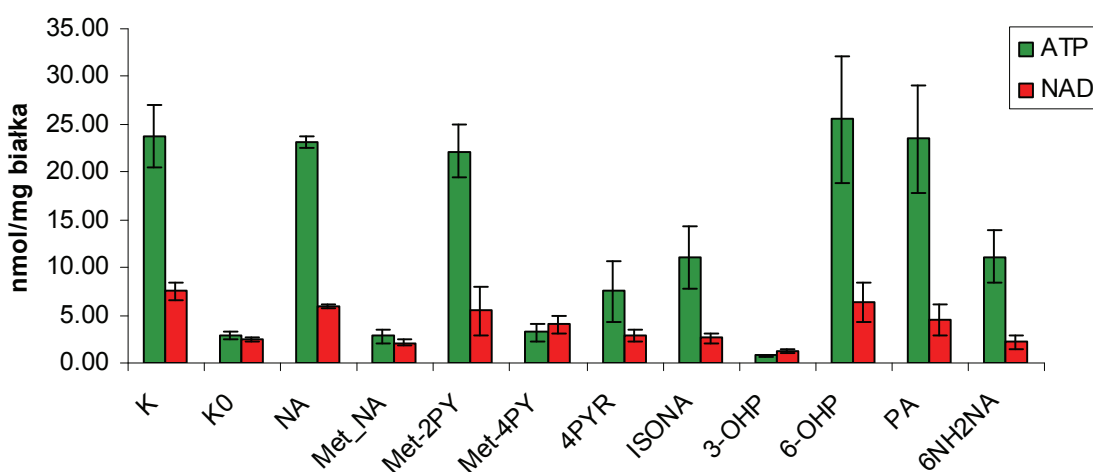
NA-nikotynamid, MetNA-N1-metylonikotynamid, Met2PY-N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid, Met4PY-N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu, PA-pikolinamid, IsoNA– izonikotynamid. 100% to aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy) bez inhibitora.

4.3. Cytoprotekcyjne działanie pochodnych nikotynamidu

Z przeprowadzonych badań z pochodnymi nikotynamidu wynika, że niektóre z tych związków mają właściwości cytoprotekcyjne. Efekty te obserwowano w dużych stężeniach (ok. 0,122 g/l), to jednak w przypadku cukrzycy i chorób neurologicznych stosowane są dawki nikotynamidu wynoszące około 1g/dzień [2,84]. Wśród pochodnych nikotynamidu związkami o najsilniejszych właściwościach cytoprotekcyjnych okazały się: Met2PY, PA, a także 6-OHP (rycina 5) [publikacja 5]. Wydaje się, że hamowanie PARP-u może mieć znaczenie w cytoprotekcyjnym działaniu tylko w przypadku pikolinamidu (PA). Ani IsoNA, ani tym bardziej Met4PY nie chronią komórek endotelium poddanych działaniu peroksynitrytu przed obniżeniem stężenia NAD^+ i ATP. Nie ma więc ścisłej zależności pomiędzy bezpośrednim hamowaniem PARP-u a działaniem cytoprotekcyjnym. Związkiem, który wykazywał porównywalne z nikotynamidem właściwości cytoprotekcyjne, okazał się 6-OHP, ale jego izomer 3-OHP już takich właściwości nie wykazywał. W przypadku związków takich jak 6-OHP

mechanizm działania wymaga wyjaśnienia. Najprawdopodobniej decydującą rolę odgrywa struktura tych związków. Wydaje się, że im bliżej azotu (N1) w pierścieniu pirydonowym znajdują się podstawniki (grupa hydroksylowa lub ketonowa) tym lepsza ochrona przed cytotoksycznym działaniem peroksynitrytu [publikacja 5].

Obserwacje kliniczne sugerują, że cytoprotekcyjne działanie Met2PY u chorych z PNN najprawdopodobniej nie ma istotnego znaczenia. Być może jego stężenie w tych warunkach jest zbyt niskie albo przedłużona ekspozycja nie jest skuteczna. Wzrost stężenia Met2PY może mieć natomiast związek ze stresem oksydacyjnym. Zaobserwowano bowiem dodatnią korelację pomiędzy stężeniem malonyldialdehydu (MDA) - markerem stresu oksydacyjnego a stężeniem Met2PY oraz Met4PY w osoczu. Zwiększona częstość występowania nowotworów u chorych z PNN, która może być związana z hamowaniem procesów naprawy DNA (w których uczestniczy PARP), sugeruje, że Met2PY i Met4PY mogą być toksynami mocznicowymi [179,180].



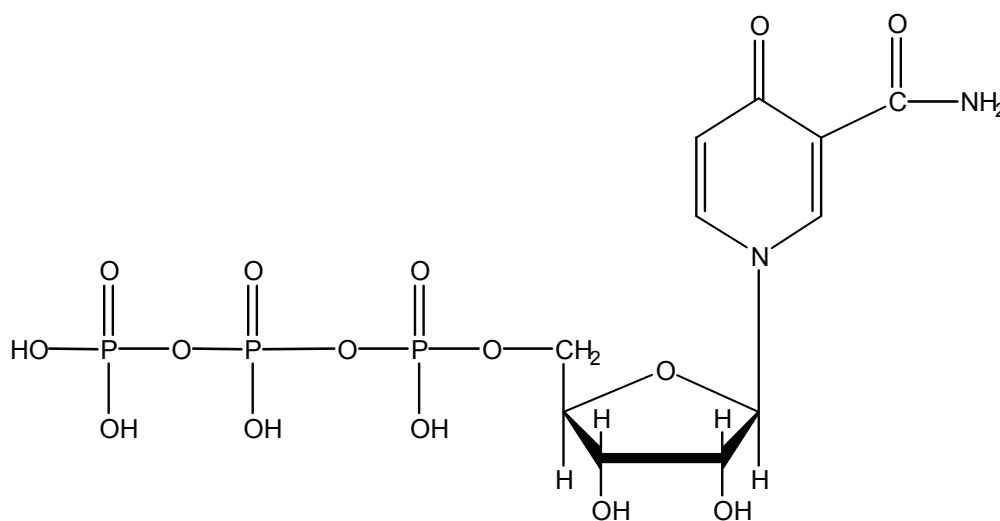
Rycina 5. Cytoprotekcyjne działanie pochodnych nikotynamidu.

Stężenie ATP i NAD⁺ w komórkach śródbłonka po ekspozycji na 100 μM peroksynitryl. Wyniki stanowią $\bar{x} \pm SD$ (n=5). K-kontrola bez peroksynitrytu, K0-kontrola z peroksynitrytem, NA- nikotynamid, Met_NA-N1-metylonikotynamid, Met2PY-N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid, Met4PY-N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamidu, 4PYR- 1-β-D-rybonukleozyd-4-pirydono-3-karboksyamidu, ISONA- izonikotynamid, 3-OHP-kwas 3-hydroksypikolinowy, 6-OHP-kwas 6-hydroksypikolinowy, PA-pikolinamid, 6NH2NA- 6-aminonikotynamid.

4.4. Nowe metabolity przemian nikotynamidu

4.4.1. Pochodne nukleotyde 1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamidu

W 2004 roku udało się zidentyfikować nieznaną dotychczas nukleozydotrójfosforan. Było to możliwe po dokonaniu izolacji tego nukleotydu z ekstraktów erytrocytów chorych z PNN. Nukleotyde poddano następnie degradacji przy użyciu fosfatazy alkalicznej. Uzyskany nukleozyd został użyty do analiz chemicznych. Kilkakrotne oczyszczanie otrzymanego produktu było konieczne w celu uzyskania dostatecznej czystości do dalszej analizy tego związku. Identyfikacja oparta była o wyniki uzyskane przy pomocy spektroskopii w podczerwieni, magnetycznego rezonansu jądrowego, chromatografii cieczowej oraz spektrometrii masowej. Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację nieznanego nukleotydu jako trójfosforanu 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu (4PYTP) [publikacja 6].



Rycina 6. Trójfosforan 4-pirydono-3-karboksyamido-1-β-D-rybonukleozydu (4PYTP).

Ustalono następnie, że prekursorem tego nukleotydu w organizmie jest 4PYR, który jest przekształcany do nukleotydoczynnych pochodnych: mono- i trójfosforanowych (odpowiednio 4PYMP i 4PYTP) [publikacje 6,7]. Przemiana 4PYR do 4PYMP odbywa się przy udziale kinazy adenozykowej. Jednocześnie proces ten powoduje znaczne obniżenie stężenia ATP, nasilenie katabolizmu nukleotydoczynnych adeninowych (wzrost stężenia hipoksantyny). Nie wpływa jednak na

zmianę stężenia NAD^+ w komórce [publikacje 6,7]. 5'jodotubercydyna, inhibitor kinazy adenozyiny, hamuje wbudowanie 4PYR do puli nukleotydów [publikacja 6]. Podobne wyniki uzyskano, gdy zamiast 4PYR stosowano 4-pirydono-3-karboksyamid (4PY) [publikacje 6,7]. Dodanie 4PYR do erytrocytów oraz innych komórek powoduje powstanie zdecydowanie większej ilości 4PYMP, niż 4PYTP. Po 3h inkubacji erytrocytów w obecności 300 μM 4PYR stężenie 4PYTP wzrosło w tych komórkach z $16,1 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$ erytr. do $74,9 \pm 9,17 \mu\text{mol/l}$ erytr., a 4PYMP z $5 \mu\text{mol/l}$ erytr. do $254,7 \pm 13,9 \mu\text{mol/l}$ erytr. [publikacje 6,7].

Bardzo interesująca jest degradacja nukleotydowych pochodnych 4PYR. Zaobserwowano zależne od czasu obniżenie stężenia 4PYMP i wzrost stężenia 4PYR. 4PYTP praktycznie nie ulegał degradacji. Powstawanie 4PYR a nie 4PY wskazuje, że to 5'nukleotydaza jest odpowiedzialna za przemianę 4PYMP do 4PYR [publikacja 7].

Nukleotydy 4PYR są obecne w erytrocytach osób zdrowych, a ich stężenia wynoszą: 4PYTP $13 \pm 4,7 \mu\text{mol/l}$ erytr. [publikacja 6] i 4PYMP $0,8 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ erytr. (wyniki własne niepublikowane). U dzieci stężenie 4PYTP w erytrocytach jest mniejsze niż u osób dorosłych i wynosi $8,7 \pm 4,8 \mu\text{mol/l}$ erytr., zaś 4PYMP $0,5 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ erytr. (wyniki własne niepublikowane). To sugeruje, że wraz z wiekiem stężenie nukleotydowych pochodnych 4PYR wzrasta. Te dane wskazują również, że w erytrocytach osób zdrowych stężenie 4PYTP jest znaczące, stanowi jednak około 2% stężenia ATP. W erytrocytach osób z niewydolnością nerek stężenie 4PYTP wielokrotnie wzrasta i stanowi od 10 do 30% stężenia ATP komórkowego [publikacja 6]. Szczególnie duży jest ten wzrost u chorych dializowanych otrzewnowo [37,155,181]. Z przeprowadzonych analiz wynika, że stężenie 4PYTP u chorych z PNN wzrasta do wartości $40,9 \pm 22,4 \mu\text{mol/l}$ erytr., zaś stężenie 4PYMP do wartości $3,7 \pm 2,04 \mu\text{mol/l}$ erytr. (wyniki własne niepublikowane). Zaobserwowano wprawdzie korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny a stężeniem 4PYR w osoczu oraz stężeniem 4PYR w osoczu a stężeniem 4PYMP w erytrocytach, ale nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem kreatyniny w osoczu a stężeniem 4PYTP w erytrocytach u chorych z PNN. Wydaje się, że synteza 4PYTP w erytrocytach chorych z PNN jest zależna od wielu czynników. U chorych z PNN dializowanych, którzy regularnie otrzymywali erytropoetynę stężenia zarówno 4PYTP, jak i 4PYMP były niższe prawie o połowę w porównaniu do grupy chorych, która nie dostawała erytropoetyny, odpowiednio 4PYTP: $41 \pm 23,8 \mu\text{mol/l}$ erytr. i $81,2 \pm 36,2 \mu\text{mol/l}$ erytr. i 4PYMP $3,66 \pm 2,27 \mu\text{mol/l}$ erytr. i $6,0 \pm 2,53 \mu\text{mol/l}$ erytr. (wyniki własne niepublikowane). Jednocześnie bezpośrednio, po zakończeniu hemodializy nie obserwowano obniżenia stężeń nukleotydów 4PYR. U pacjentów po przeszczepie nerki zarówno stężenie 4PYTP, jak i 4PYMP było wyższe (4PYTP: $18,9 \pm 7,9 \mu\text{mol/l}$ erytr., 4PYMP: $2,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/l}$ erytr.) niż w grupie

osób zdrowych. Ze wstępnych naszych obserwacji wynika, że stężenie nukleotydów 4PYR u osób po przeszczepie nerki wraca do wartości obserwowanych u osób zdrowych dopiero po kilku latach (wyniki własne niepublikowane). Badania te wymagają jednak potwierdzenia na większej grupie chorych. Prezentowane wyniki zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Stężenia 4PYTP i 4PYMP w erytrocytach osób zdrowych i z PNN.

Badana grupa		Stężenie w erytrocytach [$\mu\text{mol/l RBC}$]	
		4PYTP	4PYMP
Osoby zdrowe	Dzieci	$8,7 \pm 4,8$	$0,5 \pm 0,4$
	Dorośli	$13,0 \pm 4,7$	$0,8 \pm 0,5$
Osoby z PNN	leczeni zachowawczo	$40,9 \pm 22,4$	$3,7 \pm 2,0$
	dializowani	- EPO	$81,2 \pm 36,2$
		+ EPO	$41,0 \pm 23,8$
	po transplantacji	$18,9 \pm 7,9$	$2,0 \pm 1,1$

Liczba osób w grupie badanej nie była niższa niż 12

4.4.2. 1- β -D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamid

Identyfikacji 4PYR w osoczu dokonano w wyniku badań przedstawianych w niniejszym opracowaniu [publikacja 6]. Stężenie 4PYR w osoczu osób zdrowych jest bardzo niskie i wynosi $0,013 \pm 0,006 \mu\text{mol/l}$. Znaczny wzrost 4PYR obserwuje się w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, gdzie osiąga stężenie $0,563 \pm 0,321 \mu\text{mol/l}$ [publikacja 6]. Tak znaczącego, niemal 50-krotnego wzrostu stężenia tego związku nie można tłumaczyć jedynie upośledzeniem funkcji wydalniczej nerek, gdyż względny wzrost stężenia kreatyniny, pseudourydyny czy kwasu moczowego u tych chorych był zdecydowanie niższy. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że dobowe wydalanie 4PYR w moczu osób zdrowych wynosi $26,7 \pm 18,2 \mu\text{mol/24h}$ [publikacja 6].

W piśmiennictwie istnieją doniesienia dotyczące analizy stężeń 4PYR lub jego izomerów w moczu chorych z różnym typem nowotworów. Prace te są jednak sprzeczne pod względem oznaczonych wartości stężeń. Nie dokonano także przekonującej identyfikacji pod względem budowy chemicznej tych związków, nie wiadomo bowiem czy jest to 4PYR (nazwany w tych pracach 4-PCNR), czy jego analog 2PYR (2-PCNR). Stężenie 2PYR lub 4PYR zostało oznaczone

w moczu u chorych z różnym typem nowotworu (piersi, płuc), w większości z zaawansowaną chorobą bądź stwierdzonymi przerzutami [182,183], z przewlekłą białaczką szpikową [184,185], ze złośliwym międzybłoniakiem [186,187], z rakiem jajnika [188], z rakiem nosowej części gardła [189]. Autorzy jednej z opublikowanych niedawno prac sugerują, że stężenie 2PYR lub 4PYR obok innych zmodyfikowanych nukleozydów (pseudourydyny, N2,N2-dimetyloguaniny, 1-metylo-guanozyny, 2-metyloguanozyny i 1-metyloadenozyny) może być markerem procesu nowotworowego, pozwalającym na kontrolę terapii tego procesu [190]. W piśmiennictwie istnieją również dane dotyczące oznaczania PCNR (zdefiniowanego jako 2PYR) w osoczu u chorych zakażonych wirusem HIV, w których stwierdzono, że związek ten obok pseudourydyny może być niezależnym czynnikiem prognostycznym AIDS [191]. Wprawdzie w większości wyżej wymienionych prac podano, że oznaczone stężenia dotyczą 2PYR, jednak wydaje się, że bardziej prawdopodobne jest to, że faktycznie analizowano stężenie 4PYR lub sumę stężeń tych związków. W powyższych pracach brak jest danych czy jakiegokolwiek dyskusji dotyczącej 4PYR, a metody analityczne zastosowane w tych badaniach nie pozwalają na zróżnicowanie tych izomerów.

Szlak powstawania 4PYR jest nieznany. Pojawiły się spekulacje, że 4PYR może powstawać z dinukleotydu adeninonikotynamidowego (NAD⁺) [183,192], czy mononukleotydu nikotynamidowego (NMN) [22]. Sugerowano także, że 4PYR to zmodyfikowany nukleotyd pochodzący z degradacji tRNA [183]. Na obecnym etapie naszych badań wydaje się, że źródłem tego związku może być rybozyd nikotynamidu [publikacja 6]. Pod wpływem oksydazy aldehydowej, mógłby być przekształcony do 4PYR i jego izomerów. Przemawiają za tym wyniki badań u chorych z deficytem kofaktora molibdenowego [37], a aktywność oksydazy aldehydowej zależy między innymi od obecności molibdenianu [193,194].

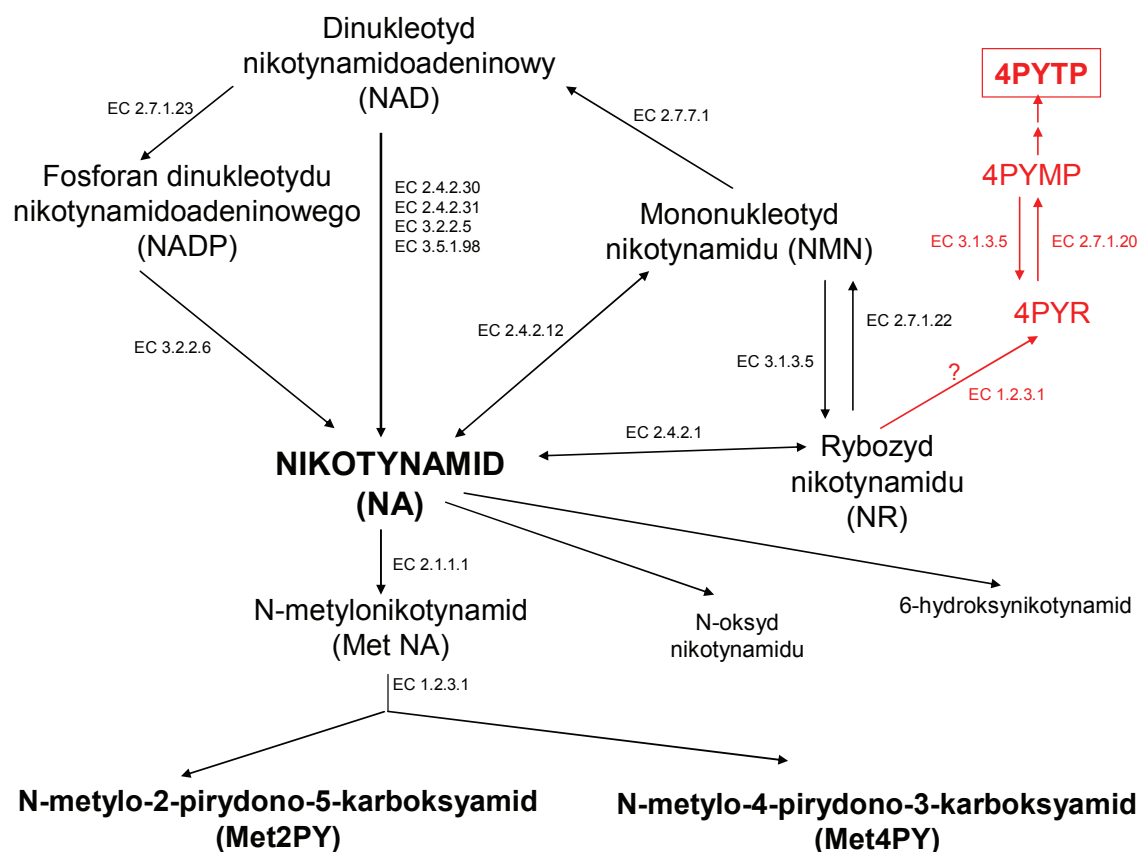
Na temat roli jaką 4PYR i powstające z niego nukleotydy mogą pełnić w komórce w chwili obecnej nic nie wiadomo. Na podstawie badań [publikacja 6] zasugerowano, że powstający w tkankach obwodowych nukleotyd 4PYR jest związkiem toksycznym. Aby zapobiec tej toksyczności jest on wychwytywany przez erytrocyty, w których ulega przemianie głównie do formy monofosforanowej i bardzo powoli do trójfosforanu. W nerce natomiast zachodziłby proces odwrotny – katabolizm 4PYMP do nukleozydu i jego wydalanie z moczem. Powstawanie 4PYTP byłoby więc procesem niemającym fizjologicznego znaczenia, ale który zachodzi intensywnie tylko wtedy, gdy wzrośnie stężenie 4PYMP w komórce. Koncepcja ta pozostaje jednak hipotezą.

5. Podsumowanie

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie habilitacyjnej dostarczyły nowych informacji o przemianach i roli metabolitów nikotynamidu w stanach fizjologicznych i patologicznych. Identyfikacja nowego metabolitu przemian nikotynamidu - 4PYTP w erytrocytach, identyfikacja jego prekursora (4PYR) oraz propozycja szlaku przemian tego związku stanowią oryginalne, ciekawe osiągnięcia prezentowane w przedstawionej rozprawie habilitacyjnej. Identyfikacja tych związków była możliwa przy zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni, magnetycznego rezonansu jądrowego, chromatografii cieczowej a przede wszystkim spektrometrii masowej. Przemiana 4PYR do 4PYMP w erytrocytach odbywa się przy udziale kinazy adenozynej powodując obniżenie stężenia ATP wewnątrz krwinki czerwonej, nasilenie katabolizmu nukleotydów adeninowych oraz zwiększoną produkcję hipoksantyny. Wyniki te mają znaczenie poznawcze oraz potencjalne znaczenie praktyczne.

Analiza stężeń nukleotydów 4PYR w erytrocytach osób zdrowych wykazała, że stężenia 4PYTP są rzędu kilku mikromolowego, natomiast 4PYMP są dużo niższe. U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek obserwuje się kilkudziesięciokrotny wzrost stężenia tych nukleotydów w erytrocytach, szczególnie widoczny u pacjentów dializowanych. Co ciekawe, proces hemodializy nie obniża stężeń tych związków u chorych z PNN. Po transplantacji nerek stężenie 4PYTP i 4PYMP we krwi obniża się powoli, ale nie osiąga wartości obserwowanych u ludzi zdrowych.

W świetle przedstawionych badań wydaje się uzasadnione uzupełnienie schematu metabolizmu nikotynamidu o szlak przemian 4PYR (rycina 7).



Rycina 7. Proponowany schemat metabolizmu nikotynamidu u ssaków.

Fosforylaza nukleozydu nikotynamidowego (EC 2.4.2.1), fosforybozylotransferaza nikotynamidowa (NamPRT; EC 2.4.2.12) NAD⁺ glikohydrolaza/cyklaza ADPR-rybozy (EC 3.2.2.5), NADP⁺ glikohydrolaza (EC 3.2.2.6), polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP; EC 2.4.2.30), mono-ADP-rybozylotransferaza (EC 2.4.2.31), sirtuiny (EC 3.5.1.-), metylotransferaza nikotynamidu (NNMT, EC 2.1.1.1), oksydaza aldehydowa (EC 1.2.3.1), adenylotransferaza mononukleotydu nikotynamidu (EC 2.7.7.1), 5'- nukleoty daza (EC 3.1.3.5) kinaza rybozylonikotynamidu (EC 2.7.1.22), kinaza adenozyiny (EC 2.7.1.20), kinaza NAD⁺ (EC 2.7.1.23).

Opracowanie procedury analizy stężeń metabolitów nikotynamidu z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detekcją masową przyczyniło się także do wzbogacenia możliwości metodycznych analizy przemian nikotynamidu. Metoda ta pozwala na analizę stężeń wszystkich istotnych metabolitów nikotynamidu w jednym rozdiale chromatograficznym. Ponadto możliwy jest dalszy rozwój metody i jednoczesne oznaczenie innych związków.

Wyniki analiz stężeń metabolitów nikotynamidu we krwi wykazały, że zarówno stany patologiczne, takie jak przewlekła niewydolność nerek oraz stany fizjologiczne takie jak podeszły wiek prowadzą do wzrostu stężenia niektórych metabolitów nikotynamidu we krwi, nie tylko 4PYR, lecz również Met2PY i Met4PY. U ludzi starszych stężenia Met2PY i Met4PY w osoczu były znamienne statystycznie wyższe niż u dzieci. Analiza tych stężeń wykazała istnienie

dotodniej korelacji pomiędzy stężeniem końcowych metabolitów nikotynamidu a wiekiem. Ponadto analiza wieloczynnikowej korelacji pomiędzy zmianami stężenia Met2PY w osoczu a wiekiem i stężeniem kreatyniny w osoczu potwierdziła, że u ludzi zdrowych czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowany wzrost stężenia Met2PY w osoczu jest wiek.

U osób z przewlekłą niewydolnością nerek stężenie końcowych metabolitów nikotynamidu w osoczu było wielokrotnie wyższe niż u osób zdrowych. Stężenia zarówno Met2PY, jak i Met4PY w osoczu wzrastały wraz ze stopniem niewydolności nerek. U chorych hemodializowanych stężenia tych związków bezpośrednio po hemodializie obniżały się o połowę, podobnie jak kreatynina, po czym wracały do wartości obserwowanych przed dializą. Natomiast transplantacja nerki powodowała, że stężenie Met2PY po tym zabiegu osiągało wartości zbliżone do tych obserwowanych u osób zdrowych.

Badania przedstawione w niniejszym opracowaniu wykazały, że pochodne nikotynamidu są inhibitorami polimerazy poli(ADP-rybozy), a wśród końcowych metabolitów nikotynamidu najsilniejsze właściwości hamujące wykazywał Met4PY. Stwierdzono również efekty cytoprotekcyjne pochodnych nikotynamidu (szczególnie Met2PY) polegające na zahamowaniu obniżenia stężenia ATP i NAD^+ w komórkach śródbłonna poddanych działaniu peroksynitrytu.

6. Wnioski

1. Zastosowanie chromatografii cieczowej z detekcją masową znacząco zwiększa możliwości analizy jakościowej i ilościowej pochodnych nikotynamidu.
2. Przewlekła niewydolność nerek związana jest ze wzrostem stężeń katabolitów nikotynamidu we krwi. Wzrost ten jest wynikiem zarówno upośledzonego wydalania jak i zwiększonej syntezy tych związków.
3. Stężenie katabolitów nikotynamidu we krwi wzrasta wraz z wiekiem niezależnie od zmian funkcji wydalniczej nerek.
4. Pochodne nikotynamidu (takie jak: Met2PY, kwas 6-hydroksypikolinowy i pikolinamid) wykazują działanie cytoprotekcyjne (zapobiegając obniżeniu stężenia ATP i NAD^+ w komórkach śródbłonna poddanych działaniu peroksynitrytu).
5. Katabolity nikotynamidu takie jak Met2PY i Met4PY są inhibitorami PARP-1.
6. 4PYR jest prekursorem nukleotydów 4PYTP i 4PYMP w krwinkach czerwonych człowieka.
7. W przewlekłej niewydolności nerek wzrości stężenia 4PYR w osoczu towarzyszy wzrost pochodnych nukleotydowych 4PYR w erytrocytach: 4PYMP i 4PYTP. Syntezie tych nukleotydów *in vitro* w krwinkach czerwonych towarzyszy obniżenie stężenia ATP, wzrost stężenia hipoksantyny oraz brak zmian w stężeniu NAD^+ .

7. Piśmiennictwo

1. Offermanns, S. The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target, *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 384-390.
2. Knip, M., Douek, I. F., Moore, W. P., Gillmor, H. A., McLean, A. E., Bingley, P. J., Gale, E. A. Safety of high-dose nicotinamide: a review, *Diabetologia* 2000, 43, 1337-1345.
3. Jackson, T. M., Rawling, J. M., Roebuck, B. D., Kirkland, J. B. Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD⁺ and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats, *J. Nutr.* 1995, 125, 1455-1461.
4. Nagalski, A., Bryla, J. Niacin in therapy, *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2007, 61, 288-302.
5. Belenky, P., Bogan, K. L., Brenner, C. NAD⁺ metabolism in health and disease, *Trends Biochem. Sci.* 2007, 32, 12-19.
6. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., Hottiger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006, 70, 789-829.
7. Graeff, R., Munshi, C., Aarhus, R., Johns, M., Lee, H. C. A single residue at the active site of CD38 determines its NAD cyclizing and hydrolyzing activities, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 12169-12173.
8. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., Mehta, K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function, *Immunol. Today* 1994, 15, 95-97.
9. Denu, J. M. The Sir 2 family of protein deacetylases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 9, 431-440.
10. Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease, *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64, 1282-1288.
11. Rowen, J. W., Kornberg, A. The phosphorylation of nicotinamide riboside, *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 497-507.
12. Elliott, G. C., Ajioka, J., Okada, C. Y. A rapid procedure for assaying nicotinamide phosphoribosyltransferase, *Anal. Biochem.* 1980, 107, 199-205.
13. Moore, W. P., Bolton, C. H., Downs, L., Gilmor, H. A., Gale, E. A. Measurement of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in urine by high performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.* 2000, 14, 69-71.
14. Chaykin, S., Bloch, K. The metabolism of nicotinamide-N-oxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1959, 31, 213-216.
15. Hoshino, J., Schluter, U., Kroger, H. Nicotinamide methylation and its relation to NAD synthesis in rat liver tissue culture. Biochemical basis for the physiological activities of 1-methyl-nicotinamide, *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 801, 250-258.
16. Felsted, R. L., Chaykin, S. N1-methylnicotinamide oxidation in a number of mammals, *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 1274-1279.
17. Quinn, G. P., Greengard, P. The pathway for the biosynthesis of N 1-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, *Arch. Biochem. Biophys.* 1966, 115, 146-152.
18. Stanulovic, M., Chaykin, S. Aldehyde oxidase: catalysis of the oxidation of N1-methyl-nicotinamide and pyridoxal, *Arch. Biochem. Biophys.* 1971, 145, 27-34.
19. Preiss, J., Handler, P. Enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide, *J. Biol. Chem.* 1957, 225, 759-770.
20. Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Orsomando, G., Raffaelli, N., Ruggieri, S. Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man, *Cell Mol. Life Sci.* 2004, 61, 19-34.
21. Abelson, D., Boyle, A., Depatie, C., Seligson, H. N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in human plasma, *Clin. Chim. Acta* 1963, 8, 603-606.
22. Chang, M. L., Johnson, B. C. N-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide as a metabolite of nicotinic acid in man and monkey, *J. Biol. Chem.* 1961, 236, 2096-2098.
23. Walters, C. J., Brown, R. R., Kaihara, M., Price, J. M. The excretion of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide by man following ingestion of several known or potential precursors, *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 489-495.

24. Kimura, N., Fukuwatari, T., Sasaki, R., Shibata, K. Comparison of metabolic fates of nicotinamide, NAD⁺ and NADH administered orally and intraperitoneally; characterization of oral NADH, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 2006, 52, 142-148.
25. Fukuwatari, T., Morikawa, Y., Sugimoto, E., Shibata, K. Effects of fatty liver induced by niacin-free diet with orotic acid on the metabolism of tryptophan to niacin in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 1196-1204.
26. Okamoto, H., Ishikawa, A., Yoshitake, Y., Kodama, N., Nishimuta, M., Fukuwatari, T., Shibata, K. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide, *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 406-410.
27. Shibata, K., Toda, S. Effects of sex hormones on the metabolism of tryptophan to niacin and to serotonin in male rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 1200-1202.
28. Sanada, H., Miyazaki, M. Regulation of tryptophan-niacin metabolism by hormones, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 1980, 26, 617-627.
29. Tamulevicius, P., Streffer, C. N-methylnicotinamide as a possible prognostic indicator of recovery from leukaemia in patients treated with total-body irradiation and bone marrow transplants, *Strahlentherapie.* 1984, 160, 249-254.
30. Trump, S., Laudi, S., Unruh, N., Goelz, R., Leibfritz, D. 1H-NMR metabolic profiling of human neonatal urine, *MAGMA.* 2006, 19, 305-312.
31. Jansen, E. H., van den Berg, R. H., Boink, A. B., Hegger, C., Meulenbelt, J. A new physiological biomarker for nitrate exposure in humans, *Toxicol. Lett.* 1995, 77, 265-269.
32. Jacobson, E. L., Dame, A. J., Pyrek, J. S., Jacobson, M. K. Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis, *Biochimie* 1995, 77, 394-398.
33. Rutkowski, B., Slominska, E., Szolkiewicz, M., Smolenski, R. T., Striley, C., Rutkowski, P., Swierczynski, J. N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin?, *Kidney Int. Suppl* 2003, S19-S21.
34. Maiza, A., Waldek, S., Ballardie, F. W., Daley-Yates, P. T. Estimation of renal tubular secretion in man, in health and disease, using endogenous N-1-methylnicotinamide, *Nephron* 1992, 60, 12-16.
35. Musfeld, C., Biollaz, J., Belaz, N., Kesselring, U. W., Decosterd, L. A. Validation of an HPLC method for the determination of urinary and plasma levels of N1-methylnicotinamide, an endogenous marker of renal cationic transport and plasma flow, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 391-404.
36. Pumpo, R., Sarnelli, G., Spinella, A., Budillon, G., Cuomo, R. The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production, *Am. J. Gastroenterol.* 2001, 96, 1183-1187.
37. Carrey, E. A., Smolenski, R. T., Edbury, S. M., Laurence, A., Marinaki, A. M., Duley, J. A., Zhu, L., Goldsmith, D. J., Simmonds, H. A. Origin and characteristics of an unusual pyridine nucleotide accumulating in erythrocytes: positive correlation with degree of renal failure, *Clin. Chim. Acta* 2003, 335, 117-129.
38. Rutkowski, B., Swierczynski, J., Slominska, E., Szolkiewicz, M., Smolenski, R. T., Marlewski, M., Butto, B., Rutkowski, P. Disturbances of purine nucleotide metabolism in uremia, *Semin. Nephrol.* 2004, 24, 479-483.
39. Shibata, K., Matsuo, H. Correlation between niacin equivalent intake and urinary excretion of its metabolites, N¹-methylnicotinamide, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, in humans consuming a self-selected food, *Am. J. Clin. Nutr.* 1989, 50, 114-119.
40. Terry, R. C., Simon, M. Determination of niacin metabolites 1-methyl-5-carboxylamide-2-pyridone and N-1-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 1982, 232, 261-274.
41. Carter, E. G. Quantitation of urinary niacin metabolites by reversed-phase liquid chromatography, *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, 36, 926-930.
42. Price, J. M. The determination of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in human urine, *J. Biol. Chem.* 1954, 211, 117-124.
43. Barlow, G. B., Sutton, J. L., Wilkinson, A. W. Metabolism of nicotinic acid in children with burns and scalds, *Clin. Chim. Acta* 1977, 75, 337-342.
44. Horwitt, M. K., Harper, A. E., Henderson, L. M. Niacin-tryptophan relationships for evaluating niacin equivalents, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, 34, 423-427.

45. Wertz, A. W., Lojkin, M. E., Bouchard, B. S., Derby, M. B. Tryptophan-niacin relationships in pregnancy, *J. Nutr.* 1958, *64*, 339-353.
46. Salek, R. M., Maguire, M. L., Bentley, E., Rubtsov, D. V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B. C., Haselden, J. N., Cox, R. D., Connor, S. C., Griffin, J. L. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human, *Physiol Genomics* 2007, *29*, 99-108.
47. Okamoto, H., Ishikawa, A., Nishimuta, M., Kodama, N., Yoshitake, Y., Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of stress on the urinary excretory pattern of niacin catabolites, the most reliable index of niacin status, in humans, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 2002, *48*, 417-419.
48. Poulter, J. M., Dickerson, J. W., White, W. F. Tryptophan metabolism in patients with breast cancer, *Acta Vitaminol. Enzymol.* 1985, *7*, 93-97.
49. Shibata, K., Fukuwatari, T., Sugimoto, E. Effects of dietary pyrazinamide, an antituberculosis agent, on the metabolism of tryptophan to niacin and of tryptophan to serotonin in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001, *65*, 1339-1346.
50. Aoyama, K., Matsubara, K., Kondo, M., Murakawa, Y., Suno, M., Yamashita, K., Yamaguchi, S., Kobayashi, S. Nicotinamide-N-methyltransferase is higher in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 2001, *298*, 78-80.
51. Williams, A. C., Pall, H. S., Steventon, G. B., Green, S., Buttrum, S., Molloy, H., Waring, R. H. N-methylation of pyridines and Parkinson's disease, *Adv. Neurol.* 1993, *60*, 194-196.
52. Aoyama, K., Matsubara, K., Okada, K., Fukushima, S., Shimizu, K., Yamaguchi, S., Uezono, T., Satomi, M., Hayase, N., Ohta, S., Shiono, H., Kobayashi, S. N-methylation ability for azaheterocyclic amines is higher in Parkinson's disease: nicotinamide loading test, *J. Neural Transm.* 2000, *107*, 985-995.
53. Vannucchi, H., Mello de Oliveira, J. A., Dutra de Oliveira, J. E. Tryptophan metabolism in alcoholic pellagra patients: measurements of urinary metabolites and histochemical studies of related muscle enzymes, *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, *35*, 1368-1374.
54. Monteiro, J. P., da Cunha, D. F., Filho, D. C., Silva-Vergara, M. L., dos Santos, V. M., da Costa J. C., Jr., Etchebehere, R. M., Goncalves, J., de Carvalho da Cunha SF, Jordao, A. A., Chiarello, P. G., Vannucchi, H. Niacin metabolite excretion in alcoholic pellagra and AIDS patients with and without diarrhea, *Nutrition* 2004, *20*, 778-782.
55. Brown, F. C., White, J. B., Jr., Kennedy, J. K. Urinary excretion of tryptophan metabolites by schizophrenic individuals, *Am. J. Psychiatry* 1960, *117*, 63-65.
56. Cazzullo, C. L., Sacchetti, E., Smeraldi, E. N-methylnicotinamide excretion and affective disorders, *Psychol. Med.* 1976, *6*, 265-270.
57. Lis, E. W., Lis, A. W., DeHackbeil, K. F. Ultraviolet-absorbing components of urine from mentally retarded children. *Clin. Chem.* 1970, *16*, 714-721.
58. Lis, A. W., McLaughlin, I., Mclaughlin, R. K., Lis, E. W., Stubbs, E. G. Profiles of ultraviolet-absorbing components of urine from autistic children, as obtained by high-resolution ion-exchange chromatography, *Clin. Chem.* 1976, *22*, 1528-1532.
59. Aleszczyk, J. Connection between changing the vitamin and immune status and the character of the throat microflora in patients with chronic tonsillitis, *Otolaryngol. Pol.* 2003, *57*, 221-224.
60. Chu, B. C., Lawley, P. D. Increased urinary excretion of pyrimidine and nicotinamide derivatives in rats treated with methyl methanesulphonate, *Chem. Biol. Interact.* 1974, *8*, 65-73.
61. Chu, B. C., Lawley, P. D. Increased urinary excretion of nucleic acid and nicotinamide derivatives by rats after treatment with alkylating agents, *Chem. Biol. Interact.* 1975, *10*, 333-338.
62. Ohkubo, M., Shimizu, M., Kubo, A., Fujimura, S. Increased urinary excretion of 1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in rats administered 2-acetylaminofluorene, *Chem. Biol. Interact.* 1977, *18*, 101-110.
63. Ishihara, K., Katsutani, N., Aoki, T. A metabonomics study of the hepatotoxicants galactosamine, methylene dianiline and clofibrate in rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006, *99*, 251-260.
64. Connor, S. C., Wu, W., Sweatman, B. C., Manini, J., Haselden, J. N., Crowther, D. J., Waterfield, C. J. Effects of feeding and body weight loss on the 1H-NMR-based urine metabolic profiles of male Wistar Han rats: implications for biomarker discovery, *Biomarkers* 2004, *9*, 156-179.
65. Egashira, Y., Isagawa, A., Komine, T., Yamada, E., Ohta, T., Shibata, K., Sanada, H. Tryptophan-niacin metabolism in liver cirrhosis rat caused by carbon tetrachloride, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 1999, *45*, 459-469.

66. Andersen, H. U., Jorgensen, K. H., Egeberg, J., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J. Nicotinamide prevents interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans, *Diabetes* 1994, *43*, 770-777.
67. Burkart, V., Koike, T., Brenner, H. H., Kolb, H. Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islet cells in vitro, *Diabetologia* 1992, *35*, 1028-1034.
68. Otsuka, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J., Kono, N., Tarui, S. Nicotinamide and 3-aminobenzamide reduce interferon-gamma-induced class II MHC (HLA -DR and -DP) molecule expression on cultured human endothelial cells and fibroblasts, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1991, *13*, 263-280.
69. Hiromatsu, Y., Sato, M., Tanaka, K., Ishisaka, N., Kamachi, J., Nonaka, K. Inhibitory effects of nicotinamide on intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured human thyroid cells, *Immunology* 1993, *80*, 330-332.
70. Ungerstedt, J. S., Blomback, M., Soderstrom, T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines, *Clin. Exp. Immunol.* 2003, *131*, 48-52.
71. Kolb, H., Burkart, V. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited, *Diabetes Care* 1999, *22 Suppl 2*, B16-B20.
72. Kretowski, A., Mysliwiec, J., Szelachowska, M., Kinalski, M., Kinalska, I. Nicotinamide inhibits enhanced in vitro production of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha in peripheral whole blood of people at high risk of developing type 1 diabetes and people with newly diagnosed type 1 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2000, *47*, 81-86.
73. Chaidemenos, G. C. Tetracycline and niacinamide in the treatment of blistering skin diseases, *Clin. Dermatol.* 2001, *19*, 781-785.
74. Fivenson, D. P., Breneman, D. L., Rosen, G. B., Hersh, C. S., Cardone, S., Mutasim, D. Nicotinamide and tetracycline therapy of bullous pemphigoid, *Arch. Dermatol.* 1994, *130*, 753-758.
75. Shalita, A. R., Smith, J. G., Parish, L. C., Sofman, M. S., Chalker, D. K. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris, *Int. J. Dermatol.* 1995, *34*, 434-437.
76. Namazi, M. R. Nicotinamide: a potential addition to the anti-psoriatic weaponry, *FASEB J.* 2003, *17*, 1377-1379.
77. Namazi, M. R. Nicotinamide as a potential addition to the anti-atopic dermatitis armamentarium, *Int. Immunopharmacol.* 2004, *4*, 709-712.
78. Virag, L., Szabo, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, *Pharmacol. Rev.* 2002, *54*, 375-429.
79. Kroger, H., Miesel, R., Dietrich, A., Ohde, M., Rajnavolgyi, E., Ockenfels, H. Synergistic effects of thalidomide and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice, *Inflammation* 1996, *20*, 203-215.
80. Cabrera-Rode, E., Molina, G., Arranz, C., Vera, M., Gonzalez, P., Suarez, R., Prieto, M., Padron, S., Leon, R., Tillan, J., Garcia, I., Tiberti, C., Rodriguez, O. M., Gutierrez, A., Fernandez, T., Govea, A., Hernandez, J., Chiong, D., Dominguez, E., Di Mario, U., Diaz-Diaz, O., Diaz-Horta, O. Effect of standard nicotinamide in the prevention of type 1 diabetes in first degree relatives of persons with type 1 diabetes, *Autoimmunity* 2006, *39*, 333-340.
81. Gale, E. A., Bingley, P. J., Emmett, C. L., Collier, T. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes, *Lancet* 2004, *363*, 925-931.
82. Koppen, A., Klein, J., Holler, T., Loffelholz, K. Synergistic effect of nicotinamide and choline administration on extracellular choline levels in the brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993, *266*, 720-725.
83. Vargas, H. M., Jenden, D. J. Elevation of cerebrospinal fluid choline levels by nicotinamide involves the enzymatic formation of N1-methylnicotinamide in brain tissue, *Life Sci.* 1996, *58*, 1995-2002.
84. Maiese, K., Chong, Z. Z. Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain, *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, *24*, 228-232.
85. Yang, J., Klaidman, L. K., Adams, J. D. Medicinal chemistry of nicotinamide in the treatment of ischemia and reperfusion, *Mini. Rev. Med Chem.* 2002, *2*, 125-134.
86. Okazaki, I. J., Moss, J. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases, *Annu. Rev. Nutr.* 1999, *19*, 485-509.

87. Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., Ueda, K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase, *J. Biol. Chem.* 1992, *267*, 1569-1575.
88. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M., Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1, *J. Biol. Chem.* 2002, *277*, 45099-45107.
89. Landry, J., Slama, J. T., Sternglanz, R. Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, *278*, 685-690.
90. Sauve, A. A., Schramm, V. L. Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry, *Biochemistry* 2003, *42*, 9249-9256.
91. Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., and Boeke, J. D. The biochemistry of sirtuins, *Annu. Rev. Biochem.* 2006, *75*, 435-465.
92. Grossman, L., Kaplan, N. O. Nicotinamide riboside phosphorylase from human erythrocytes. I. Phosphorolytic activity, *J. Biol. Chem.* 1958, *231*, 717-726.
93. Grossman, L., Kaplan, N. O. Nicotinamide riboside phosphorylase from human erythrocytes. II. Nicotinamide sensitivity, *J. Biol. Chem.* 1958, *231*, 727-740.
94. Gaudineau, C., Auclair, K. Inhibition of human P450 enzymes by nicotinic acid and nicotinamide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, *317*, 950-956.
95. Jeggo, P. A. DNA repair: PARP-another guardian angel?, *Curr. Biol.* 1998, *8*, R49-R51.
96. Burkle, A. Poly(ADP-ribosylation), a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability, *Cancer Lett.* 2001, *163*, 1-5.
97. de Murcia, G., Huletsky, A., Poirier, G. G. Modulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosylation), *Biochem. Cell Biol.* 1988, *66*, 626-635.
98. de Murcia G., Huletsky, A., Lamarre, D., Gaudreau, A., Pouyet, J., Daune, M., Poirier, G. G. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation, *J. Biol. Chem.* 1986, *261*, 7011-7017.
99. Eki, T. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase alpha, delta and epsilon in vitro, *FEBS Lett.* 1994, *356*, 261-266.
100. Satoh, M. S., Poirier, G. G., Lindahl, T. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage, *Biochemistry* 1994, *33*, 7099-7106.
101. Hassa, P. O., Hottiger, M. O. A role of poly(ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation, *Biol. Chem.* 1999, *380*, 953-959.
102. Ziegler, M., Oei, S. L. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription, *Bioessays* 2001, *23*, 543-548.
103. Kanai, M., Tong, W. M., Sugihara, E., Wang, Z. Q., Fukasawa, K., Miwa, M. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosylation) in regulation of centrosome function, *Mol. Cell Biol.* 2003, *23*, 2451-2462.
104. Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., de Lange, T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres, *Science* 1998, *282*, 1484-1487.
105. Smith, S., de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells, *Curr. Biol.* 2000, *10*, 1299-1302.
106. Dynek, J. N., Smith, S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis, *Science* 2004, *304*, 97-100.
107. Szabo, C. Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation, *Eur. J. Pharmacol.* 1998, *350*, 1-19.
108. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., Poirier, G. G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.* 1993, *53*, 3976-3985.
109. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., Earnshaw, W. C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 1994, *371*, 346-347.
110. Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., Poirier, G. G. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7, *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 28379-28384.
111. Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., Dawson, V. L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor, *Science* 2002, *297*, 259-263.

112. Kiss, L., Szabo, C. The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005, *100 Suppl 1*, 29-37.
113. de la Lastra, C. A., Villegas, I., Sanchez-Fidalgo, S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: new pharmacological functions and potential clinical implications, *Curr. Pharm. Des* 2007, *13*, 933-962.
114. Szabo, C., Dawson, V. L. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion, *Trends Pharmacol. Sci.* 1998, *19*, 287-298.
115. Kroger, H., Ehrlich, W., Klewer, M., Gratz, R., Dietrich, A., Miesel, R. The influence of antagonists of poly(ADP-ribose) metabolism on acetaminophen hepatotoxicity, *Gen. Pharmacol.* 1996, *27*, 167-170.
116. Szabo, C., Zingarelli, B., Salzman, A. L. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite, *Circ. Res.* 1996, *78*, 1051-1063.
117. Bowes, J., McDonald, M. C., Piper, J., Thiernemann, C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat cardiomyocytes against oxidant stress, *Cardiovasc. Res.* 1999, *41*, 126-134.
118. Ruf, A., de Murcia, G., Schulz, G. E. Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling, *Biochemistry* 1998, *37*, 3893-3900.
119. Virag, L., Szabo, C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death, *FASEB J.* 2001, *15*, 99-107.
120. Wozniacka, A., Wieczorkowska, M., Gebicki, J., Sysa-Jedrzejowska, A. Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study, *Clin. Exp. Dermatol.* 2005, *30*, 632-635.
121. Gebicki, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Adamus, J., Wozniacka, A., Rybak, M., Zielonka, J. 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin, *Pol. J. Pharmacol.* 2003, *55*, 109-112.
122. Bryniarski, K., Biedron, R., Jakubowski, A., Chlopicki, S., Marcinkiewicz, J. Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin, *Eur. J. Pharmacol.* 2008, *578*, 332-338.
123. Chlopicki, S., Swies, J., Mogielnicki, A., Buczko, W., Bartus, M., Lomnicka, M., Adamus, J., Gebicki, J. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway, *Br. J. Pharmacol.* 2007, *152*, 230-239.
124. Biedron, R., Ciszek, M., Tokarczyk, M., Bobek, M., Kurnyta, M., Slominska, E. M., Smolenski, R. T., Marcinkiewicz, J. 1-Methylnicotinamide and nicotinamide: two related anti-inflammatory agents that differentially affect the functions of activated macrophages, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2008, *56*, 127-134.
125. Mogielnicki, A., Kramkowski, K., Pietrzak, L., Buczko, W. N-methylnicotinamide inhibits arterial thrombosis in hypertensive rats, *J. Physiol Pharmacol.* 2007, *58*, 515-527.
126. Brzozowski, T., Konturek, P. C., Chlopicki, S., Sliwowski, Z., Pawlik, M., Ptak-Belowska, A., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Pajdo, R., Slonimska, E., Konturek, S. J., Pawlik, W. W. Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, *326*, 105-116.
127. Bartus, M., Lomnicka, M., Kostogryns, R. B., Kazmierczak, P., Watala, C., Slominska, E. M., Smolenski, R. T., Pisulewski, P. M., Adamus, J., Gebicki, J., Chlopicki, S. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats, *Pharmacol. Rep.* 2008, *60*, 127-138.
128. Gosteli, J. Nicotinamide trials in diabetes intervention. Does a metabolite provide benefit?, *Med. Hypotheses* 2005, *64*, 1062-1063.
129. Pasquariello, G. Research on the typtophan-nicotinic acid pathway in diabetes mellitus, *Acta Vitaminol. Enzymol.* 1964, *18*, 225-234.
130. Thomas, M. C., Tikellis, C., Burns, W. C., Thallas, V., Forbes, J. M., Cao, Z., Osicka, T. M., Russo, L. M., Jerums, G., Ghabrial, H., Cooper, M. E., Kantharidis, P. Reduced tubular cation transport in diabetes: prevented by ACE inhibition, *Kidney Int.* 2003, *63*, 2152-2161.

131. Hoshino, J., Kuhne, U., Kroger, H. Enhancement of DNA synthesis and cell proliferation by 1-methylnicotinamide in rat liver cells in culture: implication for its in vivo role, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, *105*, 1446-1452.
132. Hoshino, J., Kuhne, U., Kroger, H. Methylation of nicotinamide in rat liver cytosol and its correlation with hepatocellular proliferation, *Biochim. Biophys. Acta* 1982, *719*, 518-526.
133. Lucas, D. L., Tanuma, S., Davies, P. J., Wright, D. G., Johnson, G. S. Maturation of human promyelocytic leukemia cells induced by nicotinamide: evidence of a regulatory role for ADP-ribosylation of chromosomal proteins, *J. Cell Physiol* 1984, *121*, 334-340.
134. Kimura, N., Kimura, N., Cathala, G., Baxter, J. D., Johnson, G. S. Nicotinamide and its derivatives increase growth hormone and prolactin synthesis in cultured GH3 cells: role for ADP-ribosylation in modulating specific gene expression, *DNA* 1983, *2*, 195-203.
135. Sanchez-Pacheco, A., Aranda, A. The thyroid hormone response element is required for activation of the growth hormone gene promoter by nicotinamide analogs, *FEBS Lett.* 1992, *312*, 42-46.
136. Williams, A. C., Cartwright, L. S., Ramsden, D. B. Parkinson's disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication?, *QJM.* 2005, *98*, 215-226.
137. Willets, J. M., Lunec, J., Williams, A. C., Griffiths, H. R. Neurotoxicity of nicotinamide derivatives: their role in the aetiology of Parkinson's disease, *Biochem. Soc. Trans.* 1993, *21*, 299S.
138. Slomka, M., Zieminska, E., Lazarewicz, J. Nicotinamide and 1-methylnicotinamide reduce homocysteine neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule cells, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2008, *68*, 1-9.
139. Slomka, M., Zieminska, E., Salinska, E., Lazarewicz, J. W. Neuroprotective effects of nicotinamide and 1-methylnicotinamide in acute excitotoxicity in vitro, *Folia Neuropathol.* 2008, *46*, 69-80.
140. Dragun, P., Makarewicz, D., Wojcik, L., Ziemka-Nalecz, M., Slomka, M., Zalewska, T. Matrix metalloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA), *J. Physiol Pharmacol.* 2008, *59*, 441-455.
141. Lim, B. H., Cho, B. I., Kim, Y. N., Kim, J. W., Park, S. T., Lee, C. W. Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in gastric cancer tissues and its potential post-translational modification, *Exp. Mol. Med.* 2006, *38*, 455-465.
142. Xu, J., Moatamed, F., Caldwell, J. S., Walker, J. R., Kraiem, Z., Taki, K., Brent, G. A., Hershman, J. M. Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2003, *88*, 4990-4996.
143. Xu, J., Hershman, J. M. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide represses nicotinamide N-methyltransferase and hepatocyte nuclear factor-1beta gene expression in human papillary thyroid cancer cells, *Thyroid* 2006, *16*, 151-160.
144. Sartini, D., Muzzonigro, G., Milanese, G., Pierella, F., Rossi, V., Emanuelli, M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma, *J. Urol.* 2006, *176*, 2248-2254.
145. Nakagawa, K., Miyazaki, M., Okui, K., Kato, N., Moriyama, Y., Fujimura, S. N1-methylnicotinamide level in the blood after nicotinamide loading as further evidence for malignant tumor burden, *Jpn. J. Cancer Res.* 1991, *82*, 1277-1283.
146. Roessler, M., Rollinger, W., Palme, S., Hagmann, M. L., Berndt, P., Engel, A. M., Schneidinger, B., Pfeffer, M., Andres, H., Karl, J., Bodenmuller, H., Ruschoff, J., Henkel, T., Rohr, G., Rossol, S., Rosch, W., Langen, H., Zolg, W., Tacke, M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 2005, *11*, 6550-6557.
147. Keating, E., Lemos, C., Azevedo, I., Martel, F. Characteristics of thiamine uptake by the BeWo human trophoblast cell line, *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006, *39*, 383-393.
148. Hong, M., Schlichter, L., Bendayan, R. A novel zidovudine uptake system in microglia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, *296*, 141-149.
149. Dutta, S. P., Crain, P. F., McCloskey, J. A., Chheda, G. B. Isolation and characterization of 1-beta-D-ribofuranosylpyridin-4-one-3-carboxamide from human urine, *Life Sci.* 1979, *24*, 1381-1388.
150. Mills, G. C., Davis, N. J., Lertratanakoon, K. Isolation and identification of 1-ribosyl pyridone nucleosides from human urine, *Nucleosides & Nucleotides* 1989, *8*, 415.

151. Schram, K. H. Urinary nucleosides, *Mass Spectrom. Rev.* 1998, *17*, 131-251.
152. Bieganski, P., Brenner, C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans, *Cell* 2004, *117*, 495-502.
153. Fairbanks, L. D., Bofill, M., Ruckemann, K., Simmonds, H. A. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors, *J. Biol. Chem.* 1995, *270*, 29682-29689.
154. Ruckemann, K., Fairbanks, L. D., Carrey, E. A., Hawrylowicz, C. M., Richards, D. F., Kirschbaum, B., Simmonds, H. A. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans, *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 21682-21691.
155. Carrey, E. A., Smolenski, R. T., Edbury, S. M., Laurence, A., Marinaki, A. M., Duley, J. A., Zhu, L. M., Goldsmith, D. J., Simmonds, H. A. An unusual pyridine nucleotide accumulating in erythrocytes: its identity and positive correlation with degree of renal failure, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004, *23*, 1135-1139.
156. Kramer, B., Seligson, H., Seligson, D., Baltrush, H. Isolation of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide from hemodialysis fluid obtained from uremic patients, *Clin. Chim. Acta* 1964, *10*, 447-452.
157. Stratford, M. R., Dennis, M. F. High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide and its metabolites in human and murine plasma and urine, *J. Chromatogr.* 1992, *582*, 145-151.
158. Targ, D. C., Huang, T. P., Wei, Y. H., Liu, T. Y., Chen, H. W., Wen, C. T., Yang, W. C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.* 2000, *36*, 934-944.
159. Targ, D. C., Huang, T. P., Liu, T. Y., Chen, H. W., Sung, Y. J., Wei, Y. H. Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients, *Kidney Int.* 2000, *58*, 790-799.
160. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. G. Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.* 1999, *342*, 249-268.
161. Jacobson, M. K., Jacobson, E. L. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more, *Trends Biochem. Sci.* 1999, *24*, 415-417.
162. Benjamin, R. C., Gill, D. M. ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA, *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 10493-10501.
163. Menissier-de Murcia, J., Molinete, M., Gradwohl, G., Simonin, F., de Murcia, G. Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA, *J. Mol. Biol.* 1989, *210*, 229-233.
164. Saito, A., Takagi, T., Chung, T. G., Ohta, K. Serum levels of polyamines in patients with chronic renal failure, *Kidney Int. Suppl* 1983, *16*, S234-S237.
165. Slominska, E. M., Szolkiewicz, M., Smolenski, R. T., Rutkowski, B., Swierczynski, J. High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP, *Nephron* 2002, *91*, 286-291.
166. Pieper, A. A., Verma, A., Zhang, J., Snyder, S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death, *Trends Pharmacol. Sci.* 1999, *20*, 171-181.
167. Pieper, A. A., Waller, T., Wei, G., Clements, E. E., Verma, A., Snyder, S. H., Zweier, J. L. Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption, *Mol. Med.* 2000, *6*, 271-282.
168. Zhang, J., Pieper, A., Snyder, S. H. Poly(ADP-ribose) synthetase activation: an early indicator of neurotoxic DNA damage, *J. Neurochem.* 1995, *65*, 1411-1414.
169. Muir, M. L., Muller, M., Schachter, F., Burkle, A. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians, *J. Mol. Med.* 1998, *76*, 346-354.
170. Summerfield, F. W., Tappel, A. L. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA, *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, *233*, 408-416.
171. Soldatenkov, V. A., Smulson, M. Poly(ADP-ribose) polymerase in DNA damage-response pathway: implications for radiation oncology, *Int. J. Cancer* 2000, *90*, 59-67.
172. Tissenbaum, H. A., Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 2001, *410*, 227-230.

173. Kaerberlein, M., Andalis, A. A., Fink, G. R., Guarente, L. High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction, *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 8056-8066.
174. Seifert, R., Hoshino, J., Kroger, H. Nicotinamide methylation. Tissue distribution, developmental and neoplastic changes, *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 801, 259-264.
175. Tayama, Y., Moriyasu, A., Sugihara, K., Ohta, S., Kitamura, S. Developmental changes of aldehyde oxidase in postnatal rat liver, *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007, 22, 119-124.
176. Tayama, Y., Miyake, K., Sugihara, K., Kitamura, S., Kobayashi, M., Morita, S., Ohta, S., Kihira, K. Developmental changes of aldehyde oxidase activity in young Japanese children, *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 81, 567-572.
177. Kurz, P., Kohler, H., Meuer, S., Hutteroth, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect, *Kidney Int.* 1986, 29, 1209-1214.
178. Maisonneuve, P., Agodoa, L., Gellert, R., Stewart, J. H., Bucciante, G., Lowenfels, A. B., Wolfe, R. A., Jones, E., Disney, A. P., Briggs, D., McCredie, M., Boyle, P. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study, *Lancet* 1999, 354, 93-99.
179. Rutkowski, P., Malgorzewicz, S., Slominska, E., Renke, M., Lysiak-Szydłowska, W., Swierczynski, J., Rutkowski, B. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress, *J. Ren Nutr.* 2006, 16, 190-193.
180. Rutkowski, P., Slominska, E. M., Szolkiewicz, M., Aleksandrowicz, E., Smolenski, R. T., Wolyniec, W., Renke, M., Wisterowicz, K., Swierczynski, J., Rutkowski, B. Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2007, 41, 243-248.
181. Carrey, E. A., Synesiou, E., Simmonds, H. A., Fairbanks, L. D. The novel nucleotide 4KNTP, in high concentrations in erythrocytes of renal failure children: a comparison with accumulation of other putative precursors in the plasma, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006, 25, 1051-1054.
182. Mrochek, J. E., Dinsmore, S. R., Waalkes, T. P. Analytic techniques in the separation and identification of specific purine and pyrimidine degradation products of tRNA: application to urine samples from cancer patients, *J. Natl. Cancer Inst.* 1974, 53, 1553-1563.
183. Speer, J., Gehrke, C. W., Kuo, K. C., Waalkes, T. P., Borek, E. tRNA breakdown products as markers for cancer, *Cancer* 1979, 44, 2120-2123.
184. Trewyn, R. W., Heldman, D. A., Grever, M. R. Clinical application of urinary nucleosides in cancer, *Cancer Bull* 1985, 37, 82.
185. Heldman, D. A., Grever, M. R., Speicher, C. E., Trewyn, R. W. Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leukemia, *J. Lab Clin. Med* 1983, 101, 783-792.
186. Borek, E., Sharma, O. K., Waalkes, T. P. New applications of urinary nucleoside markers, *Recent Results Cancer Res.* 1983, 84, 301-316.
187. Fischbein, A., Sharma, O. K., Selikoff, I. J., Borek, E. Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma, *Cancer Res.* 1983, 43, 2971-2974.
188. Oerlemans, F., Lange, F. Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: a pilot study, *Gynecol. Obstet. Invest* 1986, 22, 212-217.
189. Trewyn, R. W., Glaser, R., Kelly, D. R., Jackson, D. G., Graham, W. P., III, Speicher, C. E. Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma. Preliminary diagnostic/prognostic evaluations, *Cancer* 1982, 49, 2513-2517.
190. Seidel, A., Brunner, S., Seidel, P., Fritz, G. I., Herbarth, O. Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control, *Br. J. Cancer* 2006, 94, 1726-1733.
191. Intrieri, M., Calcagno, G., Oriani, G., Pane, F., Zarrilli, F., Cataldo, P. T., Foggia, M., Piazza, M., Salvatore, F., Sacchetti, L. Pseudouridine and 1-ribosylpyridin-4-one-3-carboxamide (PCNR) serum concentrations in human immunodeficiency virus type 1-infected patients are independent predictors for AIDS progression, *J. Infect. Dis.* 1996, 174, 199-203.
192. Trewyn, R. W., Grever, M. R. Urinary nucleosides in leukemia: laboratory and clinical applications, *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 1986, 24, 71-93.
193. Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Higashino, K. Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes, *Histol. Histopathol.* 1997, 12, 513-524.

194. Rooseboom, M., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs, *Pharmacol. Rev.* 2004, *56*, 53-102.