

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
KATEDRA i KLINIKA NEFROLOGII, TRANSPLANTOLOGII
I CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH

Przemysław Rutkowski

POCHODNE NIKOTYNAMIDU –
NOWA GRUPA TOKSYN MOCZNICOWYCH

Rozprawa habilitacyjna

Gdańsk 2008

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
Zlecenie KW/

SPIS TREŚCI

1.	TOKSYNY MOCZNICOWE – STARE I NOWE.....	5
2.	BADANIA NAD KWALIFIKACJĄ MET2PY I MET4PY DO GRUPY TOKSYN MOCZNICOWYCH	9
2.1.	KRYTERIUM I – IDENTYFIKACJA BUDOWY CHEMICZNEJ I STWIERDZENIE OBECNOŚCI W PŁYNACH FIZJOLOGICZNYCH.....	9
2.2.	KRYTERIUM II – POTWIERDZENIE KUMULACJI ZWIĄZKÓW (Met2PY I Met4PY) W SUROWICY ORAZ TKANKACH W NIEWYDOLNOŚCI NEREK.....	10
2.3.	KRYTERIUM III – ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY STĘŻENIEM Met2PY, Met4PY A STOPNIEM UPOŚLEDZENIA FUNKCJI NEREK	11
2.4.	KRYTERIUM IV - DZIAŁANIA BIOLOGICZNE POCHODNYCH NIKOTYNAMIDU IN VIVO, IN VITRO I EX VIVO	12
2.5.	KRYTERIUM V – PORÓWNANIE STĘŻENIA Met2PY I Met4PY UŻYWANYCH W BADANIACH IN VITRO	13
3.	WNIOSKI	15
4.	PODSUMOWANIE	16
5.	PIŚMIENNICTWO.....	18
6.	SPIS OPUBLIKOWANYCH PRAC BĘDĄCYCH PODSTAWĄ PRACY HABILITACYJNEJ.....	21

1. Toksyny mocznicowe – stare i nowe

Przewlekła niewydolność nerek (pnn) nieodłącznie wiąże się ze stanem zatrucia mocznicowego. Zatrucie mocznicowe wiąże się z retencją wielu substancji zwanych toksynami mocznicowymi, a stopień zatrucia zależy od stadium rozwoju niewydolności nerek. Od wielu lat trwają próby zidentyfikowania wszystkich toksyn, jednak w kolejnych latach odkrywano nowe substancje odpowiadające całkowicie lub częściowo definicji toksyny mocznicowej [1, 2]. Dla przypomnienia, od dawna ustalono, że każda substancja mająca być uznana za toksynę mocznicową powinna spełniać następujące warunki [3, 4]:

1. *powinna mieć zidentyfikowaną budowę chemiczną, powinna być obecna i mierzalna w płynach fizjologicznych,*
2. *jej całkowite stężenie w tkankach i surowicy powinno być wyższe u chorych na pnn niż u zdrowych,*
3. *podwyższone stężenie powinno korelować z objawami zatrucia mocznicowego i ustępować po zmniejszeniu stężenia toksyny w surowicy,*
4. *działanie biologiczne powinno być potwierdzone badaniami in vivo, in vitro lub ex vivo,*
5. *stężenia używane w tych badaniach powinny odpowiadać znajdowanym u ludzi na pnn.*

De facto jedynie niewiele z blisko 100 zidentyfikowanych toksyn mocznicowych spełnia wszystkie powyższe warunki, a na temat tych, które te warunki spełniają można dyskutować, dotyczy to dla przykładu takich substancji jak woda, potas czy fosforany. Wraz z rozwojem nowoczesnych technik jak wysokosprawną chromatografię cieczową czy spektrofotometrię cieczową staje się możliwa coraz dokładniejsza analiza surowicy chorych na pnn oraz identyfikacja toksycznych związków podlegających kumulacji w trakcie choroby. Do badań tych można używać również innych płynów zarówno ustrojowych (np. ślina), jak też tych powstających w trakcie różnych form dializoterapii.

Dla łatwiejszej charakterystyki, wszystkie toksyny podzielono na trzy grupy. Pierwszą stanowią substancje drobnocząsteczkowe, rozpuszczalne w wodzie o masie cząsteczkowej poniżej 500 D, których pierwowzorem jest mocznik, należą do nich również kwas moczowy, asymetryczna dimetylarginina (ADMA), pochodne nikotynamidu. Drugą grupę stanowią związki związane z białkami, ich prekursorem jest fenol, a niektórymi przedstawicielami homocysteina, pentozydyna jako przykład AGEs (*advanced glycation endproducts*), czy

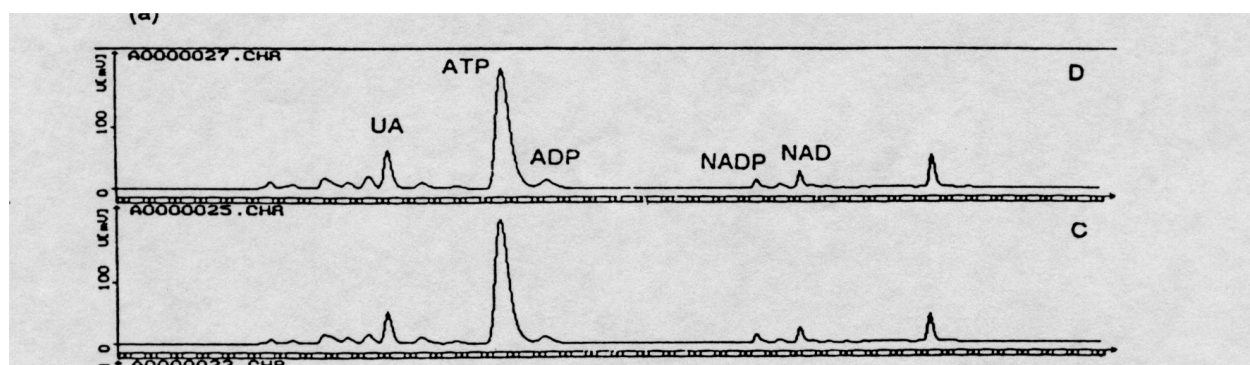
spermina, w chwili obecnej znanych jest ponad 20 związków będących toksynami tej grupy [4]. Do trzeciej grupy należą cząsteczki duże o masie powyżej 500 D. Są to tak zwane cząsteczki średnie a ich przedstawicielami są β_2 -mikroglobulina, leptyna czy parathormon. Obecnie opisanych jest również ponad 20 takich związków a 12 spośród nich posiada masę większą niż 12 000 D. Szczegółowy podział toksyn przedstawiony został w tabeli 1.

We współpracy z Katedrą Biochemii naszej uczelni od połowy lat dziewięćdziesiątych badaliśmy zaburzenia dotyczące stężenia nukleotydów purynowych u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. W momencie uzyskania sprzętu o wyższej rozdzielczości zauważono, że w miejscu gdzie znajdował się pik dla adeniny wydzielili się kolejne leżące w pobliżu sygnały niezidentyfikowanych dotąd związków. Jako, że u osób z niewydolnością nerek związki te kumulowały się w sposób widoczny, podjęto hipotezę, że mogą być to kolejne toksyny mocznicowe (ryc.1). Po identyfikacji chemicznej stwierdzono, że są to pochodne nikotynamidu-N-metylo-2-pirydyno-5-karboxyamid (Met2PY) oraz N-metylo-4-pirydyno-5-karboksyamid (Met4PY). W kolejnych etapach prowadzonych badań nad znaczeniem tych substancji w patofizjologii zespołu mocznicowego, starano się potwierdzić, że odpowiadają one przytoczonym powyżej kryteriom toksyny mocznicowej.

Tabela 1. Podział toksyn mocznicowych w oparciu o klasyfikację grupy EUTOX [4] w modyfikacji własnej.

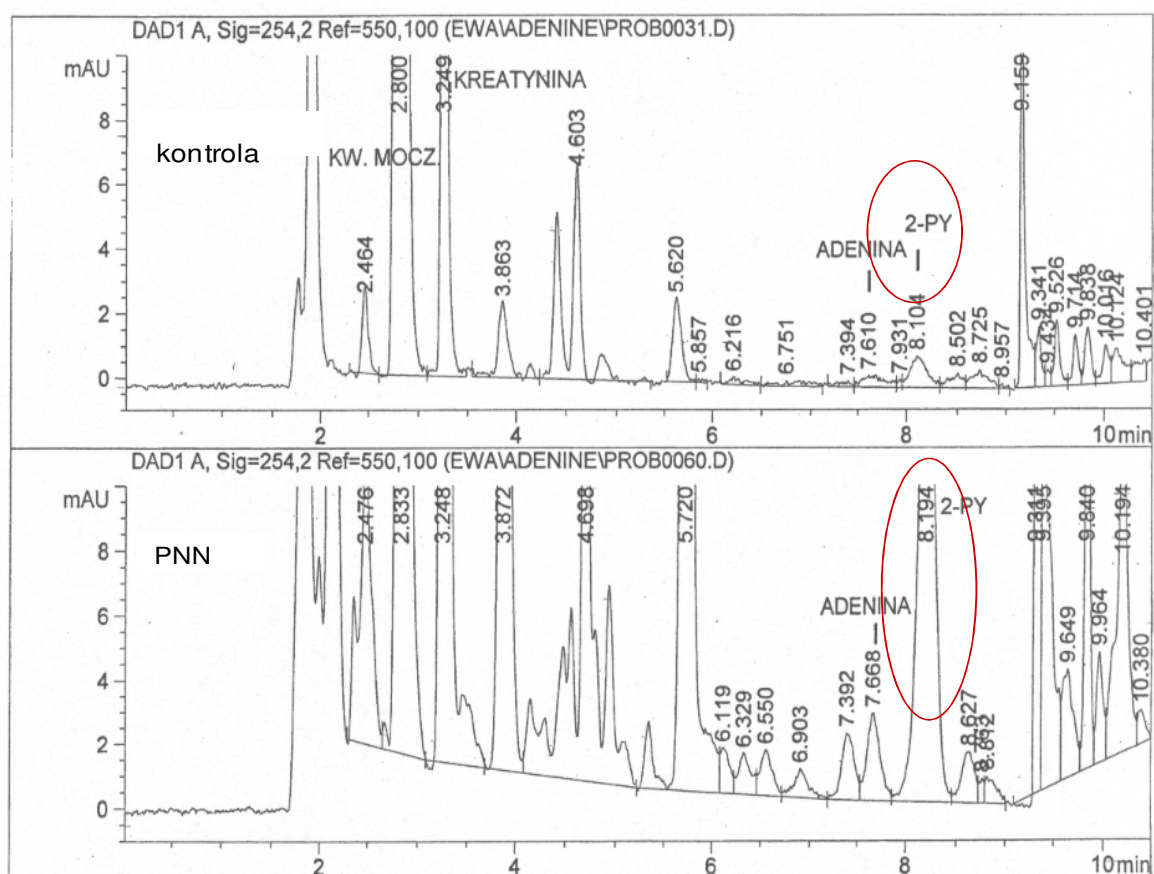
Substancje drobnocząsteczkowe - rozpuszczalne w wodzie	Substancje wiążące się z białkami	Średnie cząsteczki
<u>Pochodne guanidyny</u> asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) Guanidyna Kreatyna Kreatynina kwas guanidyno octowy kwas guanidynobursztynowy symetryczna dimetyloarginina (SDMA)	<u>Końcowe produkty glikacji białek (AGEs)</u> Dezoksyglukagon Fruktolizyna Glioksal Metyloglioksal N-karbosymetylizyna Pentozydyna	<u>Cytokiny</u> czynnik D dopełniacza interleukina 1 β Interleukina 6 TNF- α
<u>Pochodne purynowe</u> Cytydyna Hipoksantyna Ksantyna kwas moczowy	<u>Pochodne hippuranu</u> kwas hippurowy kwas P-O hippurowy	<u>Peptydy</u> Adrenomedullina β -endorfina β 2-mikroglobulina białko Clara cell (CC16) białko hamujące degranulację 1
<u>Pochodne pirymidynowe</u> Met2PY, Met4PY kwas orotowy Ortydyna Tymina Urydyna	<u>Pochodne fenolowe</u> metoksyrezorcinol Fenol Hydrochinon p-krezol	białko wiążące retinol Choecystokinina Cystatyna Endotelina kwas hialuronowy
<u>Metylowe pochodne amin</u> Metylamina Dimetylamina Trimetylamina	<u>Pochodne indolowe</u> Kynurenina kwas indolo3octowy kwas kynurenowy Melatonina siarczan indoksylu Kwas chinolinowy	łańcuchy lekkie Ig (κ i λ) Metionino enkefalina Neuropeptyd Y Parathormon peptyd indukujący fazę snu delta przedsionkowy czynnik natriuretyczny
<u>Substancje niesklasyfikowane</u> alkohol benzylowy Dimetyloglicyna Malonylodialdehyd Mocznik	<u>Peptydy</u> białko wiążące retinol Leptyna	
	<u>Poilylaminy</u> Putrescyna Spermidyna Spermina	
	<u>Inne</u> Homocysteina	

a)



Bułto B. et al. Renal Failure 1996,18, 247-252

b)



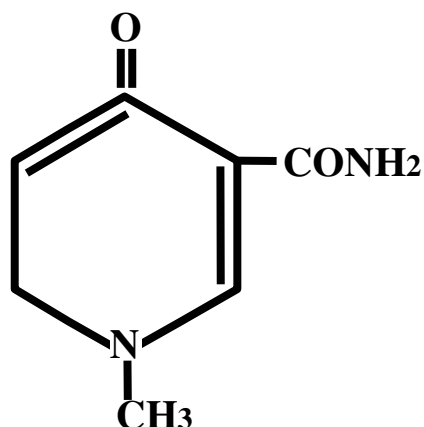
Ryc. 1. Obecność niezidentyfikowanego związku w chromatografach z surowicy pacjenta dializowanego (a) oraz identyfikacja Met2PY w surowicy pacjenta z pnn oraz człowieka zdrowego przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

2. Badania nad kwalifikacją Met2PY i Met4PY do grupy toksyn mocznicowych

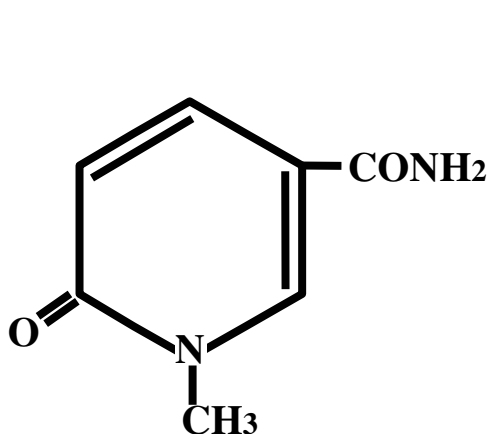
2.1. Kryterium I – identyfikacja budowy chemicznej i stwierdzenie obecności w płynach fizjologicznych

Pochodne nikotynamidu zostały zidentyfikowane jako N-metylo-2-pirydyno-5-karboxyamid (Met2PY) oraz N-metylo-4-pirydyno-5-karboksyamid (Met4PY). Posiadają one podobnie jak nikotynamid budowę pierścieniową, są rozpuszczalne w wodzie oraz mają niską masę cząsteczkową 152 kDa – prace A, E [5-7] (ryc. 2). Dzięki tym informacjom możliwe było zsyntetyzowanie substancji *de novo*. Miało to miejsce we współpracy z Zakładem Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego naszej Uczelni (kierownik: prof. Henryk Fox), co pozwoliło na dalsze prace z wykorzystaniem syntetycznych pochodnych nikotynamidu. U zdrowych ochotników poziomy badanych substancji w surowicy krwi są bardzo niskie i nie przekraczają 2 $\mu\text{mol/l}$ – prace A, B, C, F [5, 8-10], rosną jednak wraz z wiekiem, co udowodniono w pracy nie będącej częścią poniższej rozprawy habilitacyjnej [11], nie osiągając jednak nawet w wieku podeszłym wartości obecnych u chorych ze schyłkową przewlekłą niewydolnością nerek. Dokonywano również pomiarów stężenia obu związków w moczu. Stwierdzono, że stężenie pochodnych nikotynamidu w moczu osób zdrowych jest bardzo wysokie i zależne od diety, zmniejsza się wraz z postępem pnn [12, 13], u osób dializowanych ze względu na brak oddawania moczu takie badanie nie były prowadzone. W kolejnych badaniach stwierdzono także obecność Met2PY i Met4PY w ślinie osób zdrowych i pacjentów z pnn w stężeniach porównywalnych do tych, które stwierdzano w surowicy [14].

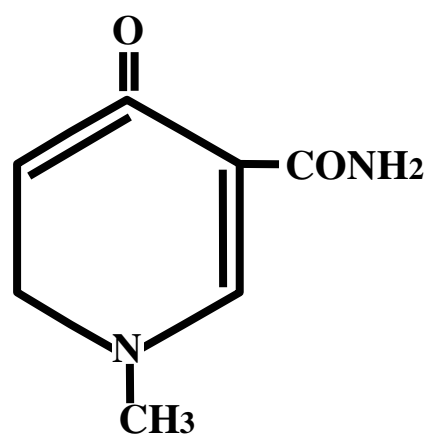
Wniosek: Zarówno Met2PY, jak też Met4PY spełniają pierwsze kryterium klasyfikujące do grupy toksyn mocznicowych. Posiadają one zidentyfikowaną budowę chemiczną umożliwiającą ich syntezę *de Novo* a także są obecne w płynach ustrojowych osób zdrowych i chorych z pnn (surowica, mocz, ślina).



Nikotinamid (m.w. 122 Da)



Met2PY (m.w. 152 Da)



Met4PY (m.w. 152 Da)

Ryc. 2. Wzory strukturalne nikotynamidu, Met2PY i Met4PY

2.2. *Kryterium II – potwierdzenie kumulacji związków (Met2PY i Met4PY) w surowicy oraz tkankach w niewydolności nerek*

U pacjentów w różnych stadiach niewydolności nerek wykazano stopniowy wzrost stężenia pochodnych nikotynamidu – prace A, B, E, F [5, 6, 8, 10]. Najwyższe stężenie w surowicy chorych na pnn osiąga Met2PY (max 20 razy więcej niż w zdrowej kontroli), nieco mniej, bowiem dziesięciokrotny wzrost obserwuje się w przypadku Met4PY jak i nikotynamidu, będącego prekursorem dwóch wyżej wspomnianych związków – prace A, E [5, 6]. Wartym

podkreślenia jest fakt tak dużej różnicy w stężeniach obu pochodnych. W trakcie badań prowadzonych przez naszą grupę, jak i przez badaczy z Wielkiej Brytanii, odkryto, że Met4PY jest dalej metabolizowany przez erytrocyty, w skutek czego powstaje kolejny związek będący potencjalną toksyną mocznicową 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside (4PYR) [15-17]. Prace nad tym ostatnim jeszcze trwają i nie stanowią części prezentowanych tez habilitacyjnych. Oznaczając stężenie pochodnych nikotynamidu w surowicy dorosłych pacjentów dializowanych zaobserwowano, że są one usuwane w trakcie zabiegu hemodializy, a po udanej transplantacji ulegają normalizacji – prace A, E [5, 6]. Wyniki tych badań zostały potwierdzone również w populacji pediatrycznej w pracy nie włączonej w skład habilitacji [18].

Badania nad stężeniem pochodnych nikotynamidu w tkankach prowadzone były w oparciu o eksperymentalny model niewydolności nerek - praca G [19]. Do tego celu użyto szczurów rasy Wistar, u których wywoływano przewlekłą niewydolność nerek przy pomocy subtotalnej 5/6 nefrektomii a wyniki porównywano z grupą zwierząt kontrolnych po operacji pozorowanej. Potwierdzono podwyższone stężenie Met2PY i Met4PY w osoczu badanych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną. W tkankach szczurów z mocznicą zaobserwowano zwiększoną kumulację Met2PY i Met4PY w porównaniu z osoczem. W przypadku nikotynamidu jedynie w nerce zaobserwowano znamienne wyższe stężenie u zwierząt z pnn w porównaniu ze zdrowymi. Największe stężenie Met2PY i Met4PY u zwierząt z pnn obserwowano w płucach, wątrobie i mięśniach, znamienne statystycznie podwyższenie obserwowano również w sercu i w nerkach. W przypadku Met2PY nie wykazano zwiększonego gromadzenia w mózgu w warunkach pnn, natomiast stężenie Met4PY nie osiągnęło znamienności statystycznej w przypadku tkanki tłuszczowej.

Wniosek: Zarówno Met2PY, jak też Met4PY spełniają drugie kryterium klasyfikujące do grupy toksyn mocznicowych. Jak bowiem wykazano na podstawie prezentowanych prac zarówno Met2PY jak i Met4PY są występują w podwyższonym stężeniu zarówno w osoczu jak i w tkankach w warunkach przewlekłej niewydolności nerek.

2.3. Kryterium III – zależność pomiędzy stężeniem Met2PY, Met4PY a stopniem upośledzenia funkcji nerek

Wykazano obecność zależności pomiędzy stężeniem badanych związków a funkcją nerek. W kolejnych badaniach stwierdzono obecność silnie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem Met2PY a stężeniem kreatyniny w surowicy ludzkiej oraz ujemnej z obliczoną, przy użyciu

zarówno wzoru Cocrofta-Gaulta jak i MDRD, wartością filtracji kłębuszkowej - prace A, E, F [5, 6, 10]. Podobnie stężenie Met4PY wykazywało podobne korelacje ze stężeniem kreatyniny jak i wyliczonej filtracji kłębuszkowej. Udowodniono więc, że pogorszeniu funkcji nerek towarzyszy wzrost stężenia badanych substancji. Jednocześnie zabieg hemodializy powoduje zmniejszenie stężenia badanych substancji po każdej sesji dializacyjnej. Natomiast w ciągu kolejnych 24 godzin następuje ponowny wzrost ich stężenia - prace A, E, F [5, 6, 10]. Udana przeszczepienie nerki powoduje normalizację poziomu Met2PY i Met4PY w surowicy badanych - prace A, B, E, F [5, 6, 8, 10]. Podsumowując w prowadzonych przeze mnie pracach wykazano związek pomiędzy funkcją nerek a pochodnymi nikotynamidu.

Wniosek: Zarówno Met2PY, jak też Met4PY spełniają trzecie kryterium klasyfikujące do grupy toksyn mocznicowych. W przedstawionych powyżej badaniach wykazano istnienie związku pomiędzy funkcją nerek (pacjenci leczeni zachowawczo) oraz stopniem zaawansowania stanu mocznicowego (pacjenci dializowani i po przeszczepieniu nerki) a badanymi pochodnymi nikotynamidu.

2.4. Kryterium IV - działania biologiczne pochodnych nikotynamidu *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo*

Wiadomym jest, że wraz z pogorszeniem funkcji nerek dochodzi do stopniowego rozwoju toksemii mocznicowej [20-22]. Nie udało się do tej pory odnaleźć jednej toksyny odpowiedzialnej za występowanie wszystkich objawów niewydolności nerek, dlatego też w przypadku każdej nowej substancji należy odkryć, w którym miejscu skomplikowanego układu zwanego mocznicą się znajdujemy. Stan toksemii mocznicowej związany jest nieodłącznie z podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego [23-25]. W chwili obecnej dostępne są coraz bardziej wysublimowane metody jego badania, np. zmiany spinu w rezonansie magnetycznym, użycie wysokosprawnej spektrometrii cieczowej lub cytometrii przepływowej. Jednak w codziennych badaniach stałe miejsce znalazły badania poziomu malonylodialdehydu oraz stężenia glutationu jak markerów stresu oksydacyjnego. W kolejnych pracach wykazano, że stężenia obu badanych substancji (Met2PY i Met4PY) korelują pozytywnie ze stężeniem malonylodialdehydu oraz negatywnie ze stężeniem glutationu – praca C,F [9, 10]. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób związane są one ze stresem oksydacyjnym - pełnią rolę ochronną, czy są jego przyczyną. Stres oksydacyjny może uszkadzać DNA. Jednym z mechanizmów obronnych jest aktywacja enzymu jądrowego poli(ADP-rybozo)polimerazy1 (*PARP1*), która za-

wiaduje procesami naprawczymi lub daje sygnał do apoptozy, gdy uszkodzenie jest niemożliwe do naprawienia [26-28]. Jak wykazano w badaniach *in vitro* nikotynamid jak i Met2PY są silnymi inhibitorami *PARP-1* – praca A [5]. Zjawisko to zostało potwierdzone w kolejnej publikacji nie wchodzącej w skład habilitacji [18]. Hamowanie *PARP-1* może mieć dwojakie znaczenie, z jednej strony upośledzenie procesów naprawczych, z drugiej strony brak sygnału do apoptozy powoduje przeżycie komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym. W badaniach dotyczących uszkodzenia DNA wykazano, że pacjenci ze schyłkową niewydolnością nerek mają wyższy poziom uszkodzenia materiału genetycznego w porównaniu ze zdrową kontrolą. W badaniach na hodowli komórkowej wykazano, że w zależności od zastosowanego stężenia Met2PY zmniejsza oksydacyjne uszkodzenie DNA, bądź nasila to zjawisko – praca E,H [6, 29]. Pośrednio o udziale Met2PY w procesach związanych z uszkodzeniem i naprawą DNA świadczy także istnienie korelacji pomiędzy stężeniem tej substancji a interleukiną 12 – praca E [6]. W opisywanych przez wielu autorów interleukina 12 bierze udział w procesach związanych z naprawą i uszkodzeniem DNA, wykazując w zależności od rodzaju uszkodzenia pozytywne bądź negatywne efekty [30-32].

Wniosek: Zarówno Met2PY, jak też Met4PY spełniają trzecie kryterium klasyfikujące do grupy toksyn mocznicowych. Jak wykazano w bieżącym podrozdziale badane substancje zarówno w badaniach *in vitro* jak też *in vivo* wywołują bezpośrednie działanie toksyczne prowadzące do zahamowania procesów naprawczych DNA. Jednocześnie stwierdzono, że Met2PY w zależności od stężenia może zachowywać się jak toksyna lub też mieć działanie ochronne.

2.5. Kryterium V – porównanie stężenia Met2PY i Met4PY używanych w badaniach *in vitro*

W badaniach dotyczących aktywności *PARP-1* użyte stężenia Met2PY wahały się od 0,03 do 3 mM, podobnie w badaniach na hodowlach komórkowych dotyczących uszkodzenia DNA użyte stężenia wynosiły od 0,03 poprzez 1 do 10 mM [5, 6, 29]. W surowicy najwyższe obserwowane w naszych badaniach stężenia sięgały 0,03 mM. Należy jednak podkreślić, że kumulacja pochodnych nikotynamidu w tkankach zwierzęcych jest wielokrotnie wyższa niż w surowicy (0,5 μ M w surowicy vs 6 μ M w sercu czy też 15 μ M w mięśniach). Można przyjąć, że w przypadku ludzi jest podobnie, co potwierdzają badania na erytrocytach prowadzone

przez wspomnianą grupę brytyjską. Stwierdzono w nich kumulację pochodnych nikotynamidu w erytrocytach chorych na pnn [15-17].

Wniosek: Zarówno Met2PY, jak też Met4PY spełniają piąte kryterium klasyfikujące do grupy toksyn mocznicowych. Pochodne nikotynamidu, w szczególności Met2PY wykazują działanie toksyczne w badaniach *in vitro* przy użyciu stężeń występujących w surowicy ludzi z pnn oraz w tkankach zwierząt z eksperymentalnie wywołaną pnn.

3. Wnioski

1. Pochodne nikotynamidu mają zidentyfikowano i opisaną budowę chemiczną, są obecne i mierzalne w płynach fizjologicznych.
2. Stężenie pochodnych nikotynamidu jest podwyższone u chorych na pnn oraz w tkankach zwierząt z mocznicą.
3. Stężenie pochodnych nikotynamidu koreluje ze stężeniem kreatyniny oraz wyliczoną filtracją kłębuszkową. Dodatkowo istnieje zależność pomiędzy badanymi związkami wybranymi markerami stresu oksydacyjnego.
4. W badaniach *in vitro* udowodniono wpływ hamujący na aktywność enzymu *PARP-1* oraz zależny od stężenia wpływ na oksydacyjne uszkodzenie DNA.
5. Stężenia używane w badaniach odpowiadały występującym w surowicy ludzi z pnn oraz w tkankach zwierząt z eksperymentalnie wywołaną pnn.

4. Podsumowanie

W przebiegu przeprowadzonej serii badań przedstawionych w powyższych rozważaniach udowodniono, że pochodne nikotynamidu spełniają wszystkie wymagane kryteria, aby zaliczyć je w poczet rodziny toksyn mocznicowych tabela 2. Zostało to potwierdzone przez ostatnią publikacją European Uremic Toxins Work Group (EUTOX), w której Met2PY został wymieniony jako jedna z nowych toksyn mocznicowych [33]. Pochodne nikotynamidu wymagają dalszych badań. W trakcie są prace mające na celu prześledzenie dalszego metabolizmu Met4PY przez krwinki czerwone oraz rola związków akumulowanych w erytrocytach na patogenezę niedokrwistości związanej z niewydolnością nerek. Kolejnym kierunkiem badań jest powiązanie podwyższonych stężeń opisanych toksyn z zaburzeniami ze strony układu krążenia, układu odpornościowego, występowaniem chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych. Powyższa praca jest zatem podsumowaniem wstępnego etapu badań nad nową grupą toksyn mocznicowych. Jednocześnie stworzyła one możliwości podjęcia wielokierunkowych dociekań nad zmianami Met2PY i Met4PY w rozwoju i klinicznej manifestacji zespołu mocznicowego.

Tabela 2. Zestawienie badań będących podstawą rozprawy habilitacyjnej z wyszczególnieniem najważniejszych wniosków z nich wypływających

Praca	Publikacja	Główne wnioski
Praca A [5]	<i>Kidney Int</i> 2003	Droga powstawania Met2PY i Met4PY, określenie ich budowy i struktury chemicznej. Wykazanie właściwości hamujących aktywność PAPR-1
Praca B [8]	<i>Semin Nephrol</i> 2004	Wykazanie korelacji pomiędzy funkcją nerek (Scr, eGFR) a stężeniem pochodnych nikotynamidu
Praca C [9]	<i>J Ren Nutr</i> 2006	Potwierdzenie związku Met2PY i Met4PY z parametrami niewydolności nerek oraz markerami stresu oksydacyjnego.
Praca D [22]	<i>Przegl Lek</i> 2006	Praca poglądowa dotycząca złożoności wpływu toksyn mocznicowych na zmiany metaboliczne i objawy kliniczne u chorych na pnn
Praca E [6]	<i>Nephrol. Dial. Pol.</i> 2006	Wykazanie korelacji pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu a IL12 oraz ich związek z uszkodzeniem DNA
Praca F [10]	<i>Scand J Urol Nephrol</i> 2007	Korelacje pomiędzy stężeniem pochodnych nikotynamidu a MDA i GSH jako wykładnikami stresu oksydacyjnego
Praca G [19]	<i>J Ren Nutr</i> 2008	Obecność i kumulacja pochodnych nikotynamidu w tkankach zwierząt z eksperymentalnie wywołaną mocznicą
Praca H [29]	<i>J Ren Nutr</i> 2008	Wpływ Met2PY na uszkodzenie DNA wywołane przez czynniki oksydacyjne i alkilujące w hodowlach komórkowych

Legenda: Met2PY- N-metylo-2 –pirydino-5-karboxyamid, Met4PY – N-metylo-4-pirydino-5-karboxyamid, PARP -1 - poli(ADP-rybozo)polimeraza1 MDA – malonyldialdehyd, GSH - glutatio

5. Piśmiennictwo

1. Bergstrom J, Furst P: Uremic toxins. *Kidney International* 13(suppl8):s9-12, 1978
2. Massry SG: Is parathyroid hormone a uremic toxin? *Nephron* 19:125-130, 1977
3. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, *et al.*: Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 63:1934-1943, 2003
4. Vanholder R, De Smet R, Lameire NH: Redesigning the map of uremic toxins. *Contrib Nephrol*:42-70, 2001
5. Rutkowski B, Slominska E, Szolkiewicz M, *et al.*: N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int Suppl*:S19-21, 2003
6. Rutkowski P, Rutkowski B: Novel family of uremic toxins. *Nephrol. Dial. Pol.* 10:152-155, 2006
7. Slominska EM, Adamski P, Lipinski M, *et al.*: Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Procedure for Measurement of NAD Catabolites in Human and Rat Plasma and Urine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25:1245-1249, 2006
8. Rutkowski B, Swierczynski J, Slominska E, *et al.*: Disturbances of purine nucleotide metabolism in uremia. *Semin Nephrol* 24:479-483, 2004
9. Rutkowski P, Malgorzewicz S, Slominska E, *et al.*: Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J Ren Nutr* 16:190-193, 2006
10. Rutkowski P, Slominska EM, Szolkiewicz M, *et al.*: Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Scand J Urol Nephrol* 41:243-248, 2007
11. Slominska EM, Rutkowski P, Smolenski RT, *et al.*: The age-related increase in N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NAD catabolite) in human plasma. *Mol Cell Biochem* 267:25-30, 2004
12. Adamski P, Bury K, Słomińska E, *et al.*: The concentration of 2PY and 4PY in urine. *11th International Scientific Students' Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Poland, 9-10 May 2003 : abstract book*, 2003
13. Słomińska E, Bury K, Adamski P, *et al.*: Decrease in daily urine excretion and metabolites in patients with chronic renal failure. *Acta Biochim. Pol.* 50:189, 2003 (abstrakt)

14. Rutkowski P, Słomińska E, Ochocińska J, *et al.*: Saliva excretion of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2PY) correlate with kidney function in patients with chronic renal failure. *Int. J. Artif. Organs* 27:569, 2004(abstrakt)
15. Carrey EA, Smolenski RT, Edbury SM, *et al.*: Origin and characteristics of an unusual pyridine nucleotide accumulating in erythrocytes: positive correlation with degree of renal failure. *Clinica Chimica Acta* 335:117-129, 2003
16. Carrey EA, Smolenski RT, Edbury SM, *et al.*: An unusual pyridine nucleotide accumulating in erythrocytes: its identity and positive correlation with degree of renal failure. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23:1135-1139, 2004
17. Slominska EM, Carrey EA, Foks H, *et al.*: A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside triphosphate. *J Biol Chem* 281:32057-32064, 2006
18. Slominska EM, Kowalik K, Smolenski RT, *et al.*: Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 21:800-806, 2006
19. Rutkowski P, Slominska EM, Wolyniec W, *et al.*: Nicotinamide metabolites accumulate in the tissues of uremic rats. *J Ren Nutr* 18:56-59, 2008
20. Meyer TW, Hostetter TH: Uremia. *N Engl J Med* 357:1316-1325, 2007
21. Rutkowski B, Rutkowski P: Toksyny mocznicowe - stare i nowe. w: A. Więcek, F. Kokot *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym*, 111-119, Katowice 2003
22. Rutkowski P: Kliniczne i metaboliczne konsekwencje zatrucia mocznicowego. *Przegl Lek* 63:209-217, 2006
23. Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, *et al.*: Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 56:308-314, 2001
24. Annuk M, Zilmer M, Lind L, *et al.*: Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12:2747-2752, 2001
25. Himmelfarb J, McMonagle E: Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif* 19:200-205, 2001
26. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G: The PARP superfamily. *Bioassays* 26:882-893, 2004
27. Dantzer F, Ame JC, Schreiber V, *et al.*: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* 409:493-510, 2006

28. Ollikainen T, Puhakka A, Kahlos K, *et al.*: Modulation of cell and DNA damage by poly(ADP)ribose polymerase in lung cells exposed to H₂O₂ or asbestos fibres. *Mutat Res* 470:77-84, 2000
29. Rutkowski P: Are so-called uremic toxins always toxic? *J Ren Nutr* 18:7-11, 2008
30. Katiyar SK: Interleukin-12 and photocarcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:220-227, 2007
31. Schwarz A, Maeda A, Gan D, *et al.*: Green tea phenol extracts reduce UVB-induced DNA damage in human cells via interleukin-12. *Photochem Photobiol* 84:350-355, 2008
32. Schwarz A, Stander S, Berneburg M, *et al.*: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* 4:26-31, 2002
33. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G: What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol*, 2008

6. Spis opublikowanych prac będących podstawą pracy habilitacyjnej

- A. Rutkowski B, Slominska E, Szolkiewicz M, Smolenski R.T., Stirley C., Rutkowski P., Swierczynski J.: N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int Suppl*:S19-21, 2003
- B. Rutkowski B, Swierczynski J, Slominska E, Szolkiewicz M., Smolenski R.T., Marlewski M., Bullo B., Rutkowski P.: Disturbances of purine nucleotide metabolism in uremia. *Semin Nephrol* 24:479-483, 2004
- C. Rutkowski P., Malgorzewicz S, Slominska E, Renke M, Łysiak-Szydlowska W, Swierczynski J, Rutkowski B. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J Ren Nutr* 16:190-193, 2006
- D. Rutkowski P.:Kliniczne i metaboliczne następstwa zatrucia mocznikowego *Przegl Lek* 63:209-217, 2006
- E. Rutkowski P., Rutkowski B: Novel family of uremic toxins. *Nephrol. Dial. Pol.* 10:152-155, 2006
- F. Rutkowski P., Slominska EM, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz E, Smolenski RT, Wołyniec 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* 41:243-248, 2007
- G. Rutkowski P., Slominska EM, Wołyniec W, Smoleński RT., Szolkiewicz M, Swierczyński J, Rutkowski B.: Nicotinamide metabolites accumulate in the tissues of uremic rats. *J Ren Nutr* 18:56-59, 2008
- H. Rutkowski P.: Are so-called uremic toxins always toxic? *J Ren Nutr* 18:7-11, 2008