

Pochodne nikotynamidu - nowa rodzina toksyn mocznicowych

Lista toksyn mocznicowych obejmuje ponad 100 związków gromadzących się w nadmiarze u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN). W poniższej publikacji przedstawiona została nowa rodzina substancji mocznicowych jedną z nich – pochodne nikotynamidu. W trakcie badań wykazano, iż pochodne te występują w podwyższonym stężeniu w surowicy chorych na PChN, co więcej ich stężenie koreluje ze stopniem upośledzenia funkcji nerek mierzonej jako wzrost stężenia kreatyniny (Scr) oraz obniżenie wyliczonej filtracji kłębuszkowej (eGFR). Pochodne nikotynamidu są obecne i mierzalne w płynach fizjologicznych. W ślinie pacjentów z PChN stężenie Met2PY koreluje z funkcją nerek. Kumulacja badanych toksyn w tkankach takich jak nerki, mózg, płuca czy mięśnie została udowodniona w trakcie eksperymentalnie wywołanej przewlekłej niewydolności nerek (pnn) u szczurów. W przypadku ludzi z PChN jeszcze niedializowanych pochodne nikotynamidu korelują z takimi markerami stresu oksydacyjnego jak glutation (GsH) czy malonyldialdehyd (MDA). Pochodne nikotynamidu hamują aktywność enzymu jądrowego poli(ADP-rybozo)polimerazy-1 (PARP-1), co zostało wykazane w badaniach nad wyizolowanym enzymie prowadzonych przez nasz zespół. Z hamowaniem aktywności PARP-1 wiąże się udział Met2PY w uszkodzeniu DNA. Z badań na hodowlach komórkowych wiadomo, że Met2PY ma podwójne działanie w przypadku oksydacyjnego uszkodzenia DNA. W niższych stężeniach wykazuje działanie ochronne, które zanika przy użyciu wysokich stężeń.

Dokładna rola patofizjologiczna pochodnych nikotynamidu wymaga kolejnych badań, aczkolwiek prezentowane wyniki pozwalają na zaliczenia ich do toksyn mocznicowych.

(NEFROL. DIAL. POL. 2014, 18, 174-177)

Nicotinamide derivatives - novel family of uremic toxins

The list of uremic toxins consists of more than 100 substances. In this publication we introduce the new family of uremic compounds, nicotinamide derivatives. After years of studies we found that both described substances have higher plasma concentration in patients with chronic kidney disease (CKD) than healthy people. These elevated concentrations correlate significantly with decline of kidney function measured as increase of serum creatinine concentration (SCr) and decrease of estimated glomerular filtration rate (eGFR). Nicotinamide derivatives are present and measurable in physiological fluids and tissues. We found higher saliva Me2PY concentration in CKD patients when compare to control. Saliva Me2PY correlated negatively with eGFR as well as positively with SCr. In rats with experimental chronic renal insufficiency (CRI) we found nicotinamide derivatives cumulate in several tissues as kidney, brain, lungs and muscle. In predialysis human, we observed significant correlations between tested uremic toxins and selected oxidative stress markers. Nicotinamide and its end products are potent inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). This fact was proved in experiments on isolated PARP-1, performed by our team. Interesting data were obtained from experiments on the cell cultures suggest that Met2PY may have double impact on the oxidative DNA injury. The lower concentration may be beneficial one, resulting in decreased level of injury, this positive property disappears in the presence of higher Met2PY concentration.

Summarizing we state that members of nicotinamide end products family fulfilled all criteria necessary to name them as uremic toxins, but exact pathophysiological role of presented compounds in the development of uremic syndrome needs further studies.

(NEPROL. DIAL. POL. 2014, 18, 174-177)

Mianem toksyn, czy też obecnie bardziej poprawnie związków mocznicowych określa się te, które spełniają odpowiednie warunki. Zgodnie z klasyczną definicją podaną przez J. Bergströma [1] uzupełnioną niedawno

przez grupę EUTOX działającą pod przewodnictwem R. Vanholdera przedstawiają się one następująco: 1) powinna ona mieć zidentyfikowaną budowę chemiczną, oraz być obecna i mierzalna w płynach fizjologicz-

Przemysław RUTKOWSKI^{1,2}
w imieniu zespołu badawczego*

Zespół badawczy:
Ewa SŁOMIŃSKA³
Ryszard SMOLEŃSKI³
Jolanta OCHOCIŃSKA³
Julian ŚWIERCZYŃSKI³
Marek SZOŁKIEWICZ¹
Wojciech WOŁYŃNIEC⁴
Marcin RENKE⁴
Bolesław RUTKOWSKI¹

¹Katedra i Klinika Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik:
Prof. *Bolesław Rutkowski*

²Zakład Pielęgniarstwa Ogólnego, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik:
Dr hab. *Andrzej Chamienia*

³Katedra i Zakład Biochemii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Prof. *Julian Świerczyński*
4 Klinika Chorób Zawodowych i Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik:
Dr hab. *Marcin Renke*

Słowa kluczowe:

- toksyny mocznicowe
- przewlekła niewydolność nerek
- przewlekła choroba nerek
- pochodne nikotynamidu
- stres oksydacyjny
- uszkodzenie DNA

Key words:

- uremic toxins
- nicotinamide derivatives
- chronic kidney disease
- chronic renal impairment
- oxidative stress
- saliva
- DNA damage

Adres do korespondencji:

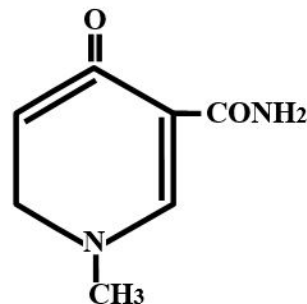
Dr hab. Przemysław Rutkowski
Klinika Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Akademia Medyczna
ul. Dębinki 7
80-299 Gdańsk
tel (58) 349 2505
fax (58) 346 11 86
e-mail: prut@gumed.edu.pl

nych, 2) jej całkowite stężenie w tkankach i surowicy powinno być wyższe u chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN) 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 z PChN [2-4]. Opisanie poniżej historia dotyczy nowo odkrytej rodziny toksyn mocznicowych – pochodnych nikotynamidu. Wszystko rozpoczęło się w latach 90-tych ubiegłego wieku w trakcie prac naszego zespołu nad kumulacją nukleotydów adeninowych u chorych z PChN [5]. Przy przeprowadzaniu rozdzielania chromatograficznego surowicy chorych z PChN okazało się wówczas, że za szczytem odpowiadającym miejscu adeniny stwierdzono obecność nieznanego dotąd związku. Rezultatem badań nad nukleotydami adeninowymi była rozprawa doktorska dr Barbary Bułto-Piąteckiej. Dzięki rozwojowi nauki i pozyskaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej wraz ze spektrometrią masową, w omawianym wcześniej miejscu rozdzielania pojawiły się kolejne szczyty, świadczące o obecności kilku innych substancji.

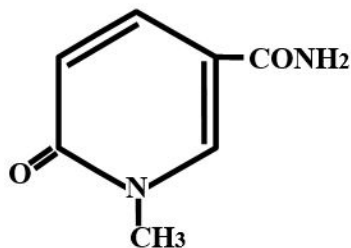
Po identyfikacji chemicznej okazało się, że są to produkty metabolizmu nikotynamidu, charakteryzujące się budową pierścieniową, niską masą cząsteczkową (152 Da) oraz rozpuszczalnością w wodzie (Ryc. 1). Ich nazwa chemiczna to odpowiednio N-metylo-2-pirydino-5-karboksamid (Met2PY) i N-metylo-4-pirydino-5-karboksamid (Met4PY). Stężenie Met2PY jest wyższe zarówno w surowicy osób zdrowych jak i chorych z PChN. W związku z tym, początkowe prace skupiły się na jego właściwościach. Wykazano, że w miarę pogorszenia funkcji wydalniczej nerek stężenie Met2PY zwiększa się w surowicy osób z PChN [6,7]. Dwie pierwsze publikacje, których pierwszym autorem był Prof. B. Rutkowski stanowiły podstawę otrzymania przez zespół badawczy nagrody Ministra

Zdrowia w roku 2004. Kolejne prace prowadzone przez nasz zespół pokazały, że stężenie Met2PY rośnie w surowicy osób zdrowych wraz z wiekiem i osiąga wartości nawet dwukrotnie wyższe u osób powyżej 80-tego roku życia w porównaniu do dzieci w wieku poniżej 10-ciu lat. Co więcej podwyższenie to nie jest zależne od zmian stężenia kreatyniny w surowicy krwi [8]. Mogłoby się zatem wydawać, że wzrost u osób z PChN

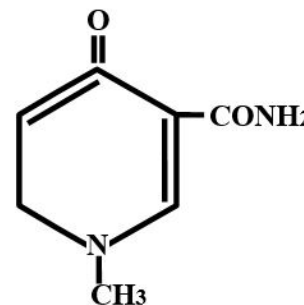
związany jest z wiekiem, a nie z upośledzeniem funkcji nerek. Okazało się jednak, że w przypadku osób w stadium piątym PChN kumulacja Met2PY jest ponad 10-krotna w porównaniu do osób zdrowych i dotyczy to zarówno osób dorosłych jak i dzieci [9,10]. Podsumowując powyższe wyniki badań, zidentyfikowana i opisana została struktura chemiczna badanych substancji, potwierdzona ich obecność w płynach ustrojowych



Nikotynamid (m.w. 122 Da)



Met2PY (m.w. 152 Da)

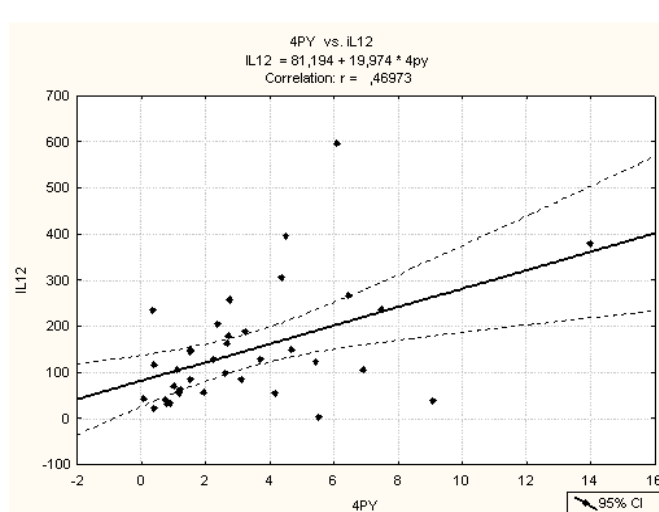
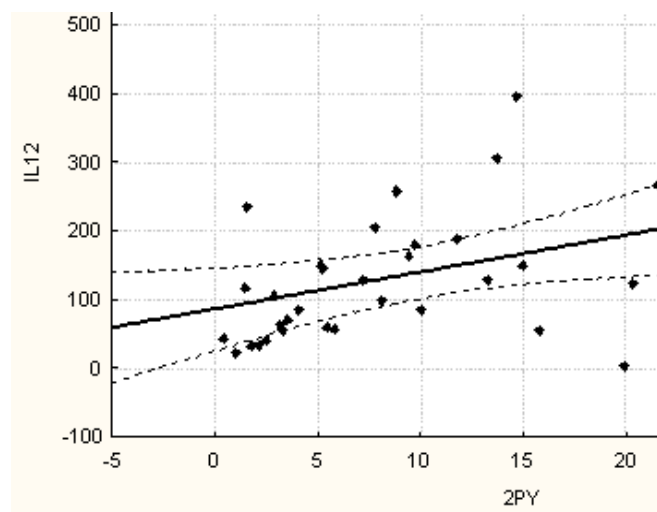


Met4PY (m.w. 152 Da)

Rycina 1

Struktura chemiczna nikotynamidu i jego pochodnych N-metylo-2-pirydino-5-karboksamid (Met2PY) i N-metylo-4-pirydino-5-karboksamid (Met4PY).

Chemical structure of nicotinamide and its end-products - N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (Met2PY) and N-methyl-4-pyridone-5-carboxamide (Met4PY).



Rycina 2

Korelacja pomiędzy interleukiną 12 (IL12) a Met2PY (a) oraz Met4PY (b) u pacjentów chorych na przewlekłą niewydolność nerek z kreatyniną powyżej 2,5 mg/dl. (n=50).

Correlation between interleukine 12 (IL 12) and Met2PY (a) and Met4PY (b) | patients with chronic renal insufficiency and serum creatinine concentration over 2,5 mg/dl (n=50).

w warunkach fizjologicznych i chorobowych. Wykazano również związek pomiędzy pogorszeniem funkcji nerek a kumulacją Met2PY i Met4PY w surowicy krwi, jak również pozytywny wpływ zabiegów hemodializy oraz udanej transplantacji nerek na zmniejszenie ich stężenia w surowicy (Tab. I i II) [9-11]. Wyniki doświadczeń uzyskanych przez naszą grupę, dotyczące wzrostu stężenia w surowicy badanych substancji u osób z PChN zostały potwierdzone przez badaczy z Wielkiej Brytanii [12-13]. W kolejnych badaniach, stwierdzono, że Met2PY jest wydzielany ze śliną pacjentów chorych z PChN. Stężenie Met2PY w ślinie koreluje w utratą filtracji kłębuszkowej wyliczonej ze skróconego wzoru MDRD. Ponadto u 1/3 badanych stężenie Met2PY w ślinie znacznie przewyższa to oznaczane w surowicy. Zatem część chorych z PChN może być zidentyfikowana jako dobrzy wydzielający Met2PY. Powoduje to jednocześnie, że badanie stężenia Met2PY w ślinie nie będzie przydatnym testem służącym do wczesnego wykrycia niewydolności nerek (dane niepublikowane). Wyniki kolejnych badań dotyczą zwiększonego stężenia Met2PY i Met4PY w tkankach. W tym celu badano grupę szczurów rasy Wistar w doświadczalnym modelu nefrektomii 5/6. Po wywołaniu niewydolności nerek, oznaczano stężenie badanych substancji w takich tkankach jak nerki, płuca, mózg, mięśnie. Analizy wynika, że w PChN kumulacja obu substancji we wszystkich badanych tkankach przewyższa wielokrotnie ich stężenie w tkankach zwierząt z grupy kontrolnej [14].

Nasuwa się zatem pytanie, czy istnieją jakiegokolwiek dowody na „toksyczne” działanie metabolitów nikotynamidu u osób chorych z PChN. Nikotynamid w swoim metabolizmie bierze udział w regulacji aktywności ważnego enzymu jądrowego jakim jest poli(ADP-rybozo) polimeraza pierwsza (PARP-1). W badaniach prowadzonych na izolowanym enzymie wykazano iż zarówno sam nikotynamid jak i Met2PY oraz Met4PY są silnymi inhibitorami PARP-1 [9,10]. PARP-1 jest enzymem biorącym udział w wielu procesach, między innymi naprawie uszkodzonego DNA, aktywacji apoptozy, częstym czynnikiem aktywującym jego działanie są jednoniciowe uszkodzenia DNA wywołane stresem oksydacyjnym. Kolejnym zagadnieniem wymagającym rozstrzygnięcia było, czy badane „toksyny” mają jakiegokolwiek związek ze stresem oksydacyjnym. Jak wiadomo stres oksydacyjny jest nierozłącznie związany ze stanem mocznicowym zarówno w okresie przeddializacyjnym jak i w trakcie leczenia nerkozastępczego [15,16]

W kolejnych badaniach wykazano, iż zarówno Met2PY jak i Met4PY korelują z takimi markerami stresu oksydacyjnego jak malonyldialdehyd, czy też wewnątrzerytrocytarna pula glutationu (Tab. II) [17,18]. W tym miejscu należy wspomnieć o istnieniu istotnej korelacji pomiędzy interleukiną 12 (IL12) a Met2PY i Met4PY w populacji pacjentów z upośledzoną funkcją nerek wyrażającą się stężeniem kreatyniny powyżej 2,5 mg/dl (Ryc. 2). Cytokina ta związana jest również z procesami apoptozy oraz naprawy DNA [19]. Prezentacja wyników na ten temat została wyróżniona jako najlepszy plakat w trakcie konferencji EDTA

Tabela I

Wartości stężenia Met2PY w surowicy krwi w różnych fazach zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek (pnn) oraz podczas leczenia nerkozastępczego.

Met2PY plasma concentration in the different stage of chronic kidney insufficiency (CRI) and during renal replacement therapy.

Pacjent	Stężenie kreatyniny ($\mu\text{mol/l}$)	Stężenie Met2PY ($\mu\text{mol/l}$)
Kontrola (ludzie zdrowi)	91,5	0,83
Chorzy z PChN w stadium predializy		
PChN G3	210,3	4,1
PChN G4	540,1	9,2
PChN G5	827,6	15,5
Leczenie nerkozastępcze		
przed hemodializą	733,6	19,3
po hemodializie	324,2	10,2
48 godzin po hemodializie	706,6	17,3
po przeszczepieniu nerki	111,3	1,64

Tabela II

Korelacje pomiędzy Met2PY, Met4PY a funkcją nerek wyrażoną jako stężenie kreatyniny (Scr) i wyliczoną za pomocą wzoru MDRD filtracją kłębuszkową ($\text{eGFR}_{\text{MDRD}}$) oraz wybranymi markerami stresu oksydacyjnego – malonyldialdehydem (MDA) i glutationem (GSH).

Correlations between Met2PY, Met4PY and kidney function measured as serum creatinine concentration (Scr) and estimated using MDRD formula glomerular filtration rate ($\text{eGFR}_{\text{MDRD}}$) and selector markers of oxidative stress – malonyldialdehyde (MDA) and glutathione (GSH).

Korelacja	R	p
Funkcja nerek		
Met2PY vs. Scr	0,68	0,00001
Met4PY vs. Scr	0,64	0,00001
Met2PY vs. $\text{eGFR}_{\text{MDRD}}$	-0,55	0,00001
Met4PY vs. $\text{eGFR}_{\text{MDRD}}$	-0,59	0,00008
Stres oksydacyjny		
Met2PY vs. MDA	0,42	0,006
Met4PY vs. MDA	0,38	0,02
Met2PY vs. GSH	-0,37	0,02
Met4PY vs. GSH	-0,46	0,005

w roku 2005 w Lizbonie. Łącząc ze sobą informację o hamowaniu przez metabolity nikotynamidu aktywności PARP-1 biorącej udział w naprawie DNA oraz korelacji ze stresem oksydacyjnym będącym częstą przyczyną uszkodzenia DNA, wysnuiliśmy hipotezę o udziale Met2PY oraz Met4PY w wyżej wymienionych procesach. Ze względu na złożoność tego problemu oraz obecność wielu „aktorów” biorących jednocześnie udział w oksydacyjnym uszkodzeniu DNA *in vivo* trudno pokusić się o jednoznaczne wskazanie miejsca badanych toksyn w tych procesach. Aby prześledzić te działania wykonano badania *in vitro*. W komórkach endotelialnych wywoływano uszkodzenie za pomocą aktywnych rodników tlenowych. Dodatek Met2PY lub nikotynamidu w niskich stężeniach miał działanie protekcyjne w zakresie zmniejszenia puli NAD-u i ATP przy czym działanie nikotynamidu było silniejsze niż Met2PY [20]. Badając wpływ Met2PY na uszkodzenie DNA pod wpływem środków alkilujących wykazano iż zahamowanie

PARP-1 powoduje zwiększone uszkodzenie DNA komórek mysiej białaczki [21] natomiast w przypadku oksydacyjnego uszkodzenia wywołanego wolnymi rodnikami tlenowymi, Met2PY działa dwójako w zależności od zastosowanego stężenia [21]. Wpływ na stopień uszkodzenia DNA badano przy użyciu testu komety (alkalicznej elektroforezy w żelu agarozowym) powszechnie używanego w tym celu [22,23]. Hamujący wpływ na aktywność PARP-1 może mieć podwójny efekt, z jednej strony brak sygnału do apoptozy chroni przed śmiercią część komórek, z drugiej jednak strony przeżycie komórek o większym stopniu uszkodzenia DNA grozi zwiększoną częstością transformacji nowotworowej. Można na tej podstawie poprzeć wysuniętą wcześniej hipotezę roboczą, iż zaburzenia powyższe mogą leżeć u podstawy częstszego występowania chorób nowotworowych w populacji chorych z PChN [24,25]. Większość przedstawionych powyżej publikacji stanowiła podstawę rozprawy habilitacyjnej opisującego tę

historię w imieniu całego zespołu. Dalsza część badań poświęcona była udoskonaleniu metody badania stężenia pochodnych nikotynamidu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [26]. Okazało się ponadto, że Met4PY metabolizowany jest do 4PYR i aktywnie transportowany do erytrocytów. W erytrocytach jego dalszy metabolizm powoduje zmniejszenie wewnętrzerytocyjnej puli ATP [27]. Może oznaczać to kolejny element, który prowadzi do skrócenia przeżycia erytrocytów w PChN [28]. Seria ostatnich prac stała się podstawą pracy habilitacyjnej dr E. Słomińskiej – członka grupy badawczej z Katedry i Zakładu Biochemii GUMed.

Podsumowując w trakcie kilkuletnich badań udowodniono, iż wykryte i opisane przez nasz zespół substancje, Met2PY i Met4PY spełniają wszystkie przedstawione na wstępie do niniejszego opracowania kryteria, pozwalające zakwalifikować je do grupy związków określanych toksynami mocznicowymi. Niewątpliwie był to jeden z bardziej znaczących sukcesów możliwych dzięki współpracy zespołowej.

Piśmiennictwo:

- Bergstrom J, Furst P: Uremic toxins. *Kidney Int.* 1978; 13(Suppl. 8): s9-12.
- Rutkowski P: Kliniczne i metaboliczne następstwa zatrucia mocznicowego. *Przegl Lek.* 2006; 63: 209-217.
- Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U. et al: Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003; 63: 1934-1943.
- Vanholder R, De Smet R, Lameire NH: Redesigning the map of uremic toxins. *Contrib Nephrol.* 2001;133: 42-70.
- Bullo B, Marlewski M, Smolenski RT, Rutkowski B, Swierczynski J. et al: Erythrocyte nucleotides and blood hypoxanthine in patients with uremia evaluated immediately and 24 hours after hemodialysis. *Ren Fail.* 1996; 18: 247-252.
- Slominska EM, Smolenski R, Szolkiewicz M, Leaver N, Rutkowski B. et al: Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure. *Mol Cell Biochem.* 2002; 231: 83-88.
- Rutkowski B, Swierczynski J, Slominska E, Szolkiewicz M, Smolenski RT. et al: Disturbances of purine nucleotide metabolism in uremia. *Semin Nephrol.* 2004; 24: 479-483.
- Slominska EM, Rutkowski P, Smolenski RT, Szutowicz A, Rutkowski B. et al: The age-related increase in N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NAD catabolite) in human plasma. *Mol Cell Biochem.* 2004; 267: 25-30.
- Szolkiewicz B, Slominska E, Szolkiewicz M, Smolenski RT, Striley C. et al: N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int.* 2003; 84 (Suppl.): S19-21.
- Slominska EM, Kowalik K, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Rutkowski P. et al: Accumulation of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 800-806.
- Rutkowski B, Rutkowski P: Toksyny mocznicowe - stare i nowe. w: *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym*, red. A. Więcek, F. Kokot. *Wyd. Medycyna Praktyczna, Kraków*, 2003.
- Carrey EA, Smolenski RT, Edbury SM, Laurence A, Marinaki AM. et al: 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.
- Carrey EA, Smolenski RT, Edbury SM, Laurence A, Marinaki AM. et al: 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.
- Rutkowski B, Rutkowski P, Slominska E, Swierczynski J: Distribution of purine nucleotides in uremic fluids and tissues. *J Ren Nutr.* 2010; 20: S7-10.
- Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Zilmer K, Viha-lemm T. et al: Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol.* 2001; 56: 308-314.
- Himmelfarb J, McMonagle E: Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif.* 2001; 19: 200-205.
- Rutkowski P, Malgorzewicz S, Slominska E, Renke M, Lysiak-Szydłowska W. et al: Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J Ren Nutr.* 2006; 16: 190-193.
- Rutkowski P, Slominska EM, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz E, Smolenski RT. et al: Relationship between uremic toxins and oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Scand J Urol Nephrol.* 2007; 41: 243-248.
- Schwarz A, Maeda A, Kernebeck K, van Steeg H, Beissert S. et al: Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J Exp Med.* 2005; 201: 173-179.
- Slominska EM, Smolenski RT, Osborne F, Swierczynski J, Yacoub MH: The effect of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, a nicotinamide catabolite on poly ADP-ribosylation and oxidative stress injury in endothelial cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005; 24: 259-262.
- Rutkowski P, Rutkowski B: Novel family of uremic toxins. *Nephrol Dial Pol.* 2006; 10: 152-155.
- Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U: Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38: 296-301.
- Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W. et al: Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004; 19: 51-59.
- Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart J, Buccianti G. et al: Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet* 1999; 354: 93-99.
- Teschner M, Garte C, Ruckle-Lanz H, Mader U, Stopper H. et al: Incidence and spectrum of malignant disease among dialysis patients in North Bavaria. *Dtsch Med Wochenschr.* 2002; 127: 2497-2502.
- 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: 1245-1249.
- Slominska EM, Orlewska C, Yuen A, Osman L, Romaszko P. et al: Metabolism of 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside triphosphate and its nucleoside precursor in the erythrocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27: 830-834.
- Rutkowski B, Rutkowski P: Nicotinamide metabolites. w: *Uremic toxins*. T. Niwa (red.) John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA 2012.