

Asymetrický dimethylarginin a jeho vztah k aterogenezi

1. Úvod

2. Cíl práce

2.1. Zavedení metody detekce ADMA

2.2. Prognóza přežití a vliv ADMA na další klinické stavy

3. Asymetrický dimethylarginin – metabolismus

3.1. Arginin a jeho metabolismus

3.2. Oxid dusnatý a syntéza oxidu dusnatého

3.3. Účinky oxidu dusnatého a jeho význam pro organismus

3.4. Inhibitory syntézy oxidu dusnatého. Asymetrický dimethylarginin

3.5. Vznik a odbourávání asymetrického dimethylargininu

4. Asymetrický dimethylarginin – význam pro organismus

4.1. Asymetrický dimethylarginin u jednotlivých druhů onemocnění

4.1.1. ADMA a kardiovaskulární onemocnění

4.1.2. ADMA u hemodialyzovaných pacientů

4.1.3. ADMA a diabetes mellitus

4.1.4. ADMA a metabolismus lipidů

4.1.5. Intenzivní péče

4.2. Možností ovlivnění hladiny asymetrického dimethylargininu

5. Metody stanovení asymetrického dimethylargininu

5.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

5.1.1. Derivatizace pomocí OPA

5.1.2. Derivatizace pomocí NDA

5.1.3. Derivatizace pomocí AccQ-Fluor™

5.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) – hmotnostní spektrometrie (MS-Mass Spectrometry)

5.3. Imunochemické metody

5.4. Další metody stanovení ADMA

5.4.1. Kapilární elektroforéza

5.4.2. GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

5.5. Srovnání dvou metod stanovení ADMA – HPLC a ELISA

6. Výsledky

6.1. Stanovení referenčních hodnot ADMA (HPLC, ELISA)

6.2. Korelace hladiny ADMA a homocysteinu u hemodialyzovaných nemocných

6.3. Význam stanovení ADMA pro prognózu nemocných léčených hemodialýzou. Srovnání s dalšími rizikovými faktory celkové úmrtnosti.

6.3.1. Materiál a metody

6.3.2. Výsledky

6.4. Hladiny ADMA u obézních osob po transplantaci ledviny a vztah k hladinám adipocytokinů

6.4.1. Materiál a metody

6.4.2. Výsledky

6.5. Hladiny ADMA u nemocných léčených hemodialýzou, hemodiafiltrací a peritoneální dialýzou. Srovnání hladin a eliminace ADMA u jednotlivých metod.

6.5.1. Materiál a metody

6.5.2. Výsledky

7. Závěry a doporučení

7.1. Zavedení metody detekce ADMA

7.2. ADMA a homocysteinu u hemodialyzovaných nemocných

7.3. ADMA a prognóza nemocných léčených hemodialýzou. Srovnání s dalšími rizikovými faktory celkové úmrtnosti.

7.4. ADMA u obézních osob po transplantaci ledviny a vztah k hladinám adipocytokinů

7.6. ADMA u nemocných léčených hemodialýzou, hemodiafiltrací a peritoneální dialýzou.

8. Souhrn

9. Summary

10. Literatura

Poděkování

Příloha – seznam publikovaných prací, přednášek a posterových sdělení

- a) Publikace v časopisech s IF
- b) Publikace v časopisech bez IF
- c) Abstrakta
- d) Přednášky
- e) Posterová sdělení
- f) Grantové projekty

Seznam použitých zkratk

<i>ADMA</i>	asymetrický dimethylarginin
<i>ADN</i>	adiponektin
β	regresní koeficient
<i>AGE</i>	produkty pokročilé glykace
<i>AOPP</i>	produkty pokročilé oxidace
<i>apoA</i>	apolipoprotein A
<i>BMI</i>	body mass index
<i>BNP</i>	natriuretický peptid B
<i>CAPD</i>	kontinuální peritoneální dialýza
<i>CRP</i>	C-reaktivní protein
<i>CMP</i>	centrální mozková příhoda, iktus
<i>DDAH</i>	dimethylarginin dimethylaminohydroláza
<i>GC</i>	gas chromatography
<i>Hcy</i>	homocystein
<i>HDL</i>	HDL cholesterol
<i>HDF</i>	hemodiafiltrace
<i>HLA</i>	
<i>HPLC</i>	high performance liquid chromatography
<i>ICHS</i>	ischemická choroba srdeční
<i>LDL</i>	lipoproteiny o nízké hustotě
<i>L-NMMA</i>	N ^G -monomethyl-L-arginin
<i>LOQ</i>	limit of quantification
<i>MS</i>	mass spectrometry nebo metabolický syndrom
<i>NDA</i>	naftalen-2,3-dikarbaldehyd
<i>NO</i>	oxid dusnatý
<i>NOS</i>	nitroxidsynthasa

<i>OPA</i>	o-ftaldialdehyd
<i>PRMT I</i>	protein arginin-methyltransferasa typu I
<i>RRT</i>	
<i>SDMA</i>	symetrický dimethylarginin
<i>SPE</i>	solid phase extraction
<i>TNF-alfa</i>	tumor necrosis factor

1. Úvod

. V současné době je ateroskleróza považovaná za zánětlivé onemocnění, na jehož rozvoji se podílí mnoho mechanismů. Primárním je jistě vznik dysfunkce endotelu, na které mají velký podíl klasické rizikové faktory. Obecnými zdroji aterosklerózy jsou ovlivnitelné rizikové faktory, například kouření, nedostatek fyzické aktivity, obezita, hyperlipoproteinémie, diabetes melitus a inzulínová rezistence. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory náleží věk, pohlaví a genetické faktory. Rozvoj aterosklerózy je složitý proces, pro jehož iniciaci a progresi má zásadní význam zánětlivé poškození stěny endotelu. Přítomnost zánětlivých změn byla prokázána u stabilních a ve větším rozsahu u nestabilních lézí, současně je přítomen zánětlivý proces také v cirkulující krvi. Jedním z protizánětlivých faktorů, který ovlivňuje kvalitu endotelu je molekula oxidu dusnatého (NO). Je známo, že NO má významné vazodilatační účinky, dále působí antiagregačně a inhibuje proliferaci a migraci buněk hladké cévní svaloviny. Snížená produkce NO vede k endotelové dysfunkci, která může mít za následek rozvoj aterosklerotického procesu.

Nemocní v terminální fázi onemocnění ledvin léčení hemodialýzou mají zvýšené kardiovaskulární riziko. Částečně se na tom podílejí tradiční rizikové faktory jako například arteriální hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidémie aj. Zánětlivé procesy, zvýšená aktivace sympatiku a akumulace inhibitorů enzymu NO syntázy (zejména asymetrický dimethylarginin) jsou faktory, kterým se v tomto ohledu také připisuje nemalý význam. Asymetrický dimethylarginin je považován za důležitý rizikový faktor rozvoje aterosklerózy . Úloha ADMA v predikci úmrtí u hemodialyzovaných pacientů není doposud vyjasněna.

2. Cíl studie

Cílem této práce bylo porovnání rizikových faktorů aterosklerozy s hladinou ADMA a zjistit sílu prevalence ADMA jako prediktoru úmrtí u hemodialyzovaných pacientů. U pacientů s poruchou funkce ledvin pak porovnat hladiny ADMA před a po dialýze v závislosti na různém typu dialýzy.

2.1. ADMA a HD pacienti – predikce úmrtí a /nebo vznik kardiovaskulárního onemocnění v závislosti na hladině ADMA

2.2. ADMA a homocystein – korelace a vzájemné metabolické vazby

2.3. ADMA, peritoneální dialýza a hemodiafiltrace – porovnat výkonnost RRT (hemodialýza [HD], hemodiafiltrace [HDF] and peritoneální dialýza [PD]) metod a jejich vliv na koncentraci ADMA.

2.4. ADMA a obezita – sledování vztahu mezi plazmatickou koncentrací ADMA, adiponektinu v tukové tkáni, obezitou a funkcí transplantované ledviny

3. Asymetrický dimethylarginin – metabolismus

3.1. Arginin a jeho metabolismus

L-arginin patří mezi semiesenciální aminokyseliny a jeho degradace je spojena s přenosem NH₂ skupiny a vylučováním močoviny

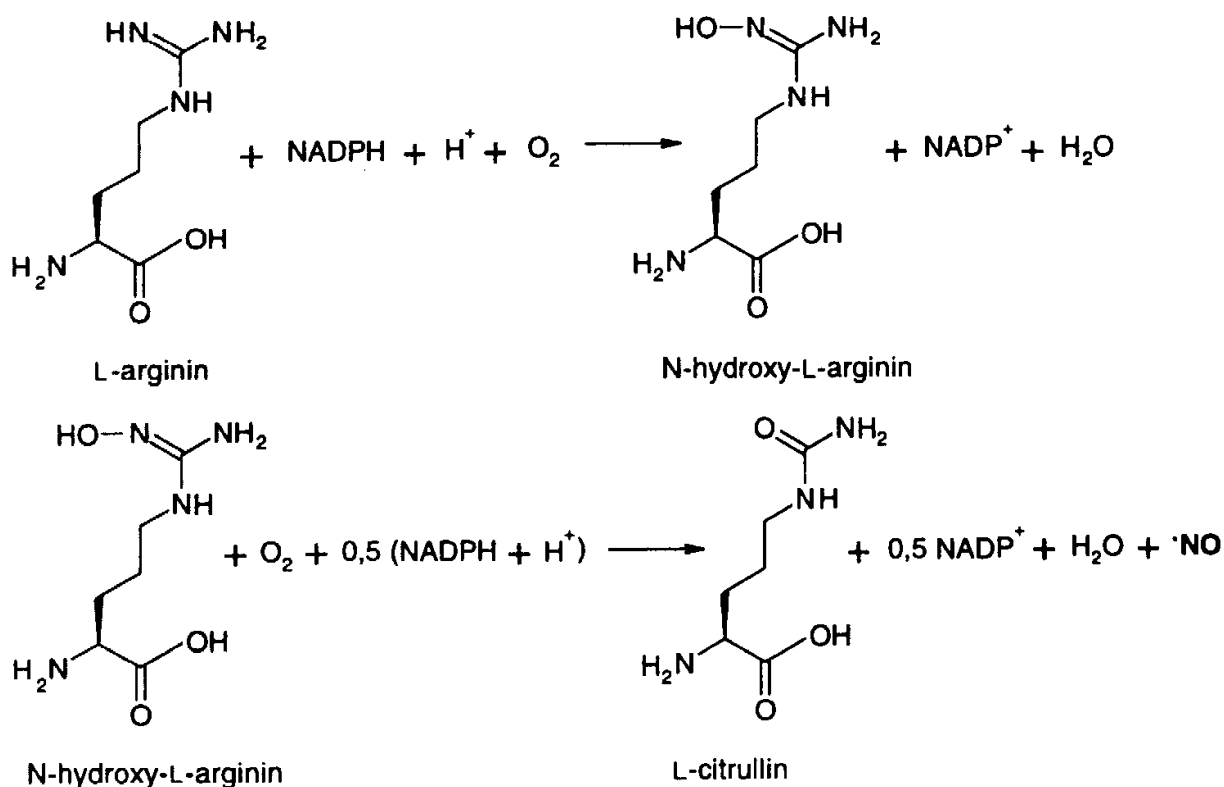
Jestliže je L-arginin přítomen v množství, které přesahuje metabolické potřeby, je jeho uhlíkový řetězec katabolizován na amfibolické intermediáty nebo na substráty sloužící k biosyntéze sacharidů a lipidů. Nejčastější počáteční reakcí jeho katabolismu je odstranění alfa-aminodusíku transaminací. V následujících reakcích je odstraněn další dusík a je restrukturován uhlovodíkový skelet pro přeměnu na L-glutamát a alfa-ketoglutarát. Určité množství L-argininu je metabolizováno též v cyklu homocysteinu, kde proteiny bohaté na tuto aminokyselinu jsou methylovány protein-arginin-methyltransferázou typu I (PRMT I) za vzniku asymetrického dimethylargininu, symetrického dimethylargininu a N-monomethylargininu. Další možností je přeměna argininu na citrulin za uvolnění molekuly oxidu dusnatého v reakci katalyzované syntázou oxidu dusnatého.

3.2. Oxid dusnatý a syntéza oxidu dusnatého

Poškození endotelu je jedním z několika intenzivně zkoumaných parametrů předpovídajících riziko rozvoje aterosklerózy. Většina nových studií udává, že důležité prognostické informace o kardiovaskulárních komplikacích lze zjistit sledováním některých parametrů v periferním krevním oběhu. Jedním z nich je i oxid dusnatý resp. jeho radikál ([•]NO), který vzniká dvoustupňovou reakcí z L-argininu působením syntázy oxidu dusnatého (nitroxidsynthasy, NOS), ale i bez jejího vlivu, a to působením superoxidu. Tyto reakce umožňují vznik NO i ve tkáních neobsahujících NOS. Reakce probíhá dvoustupňově – nejprve dojde k hydroxylaci jednoho z guanidinových dusíků L-argininu za vzniku N-hydroxy-L-argininu. Druhou fází reakce je tříelektronová oxidace tohoto intermediátu, kdy se uvolňuje oxid dusnatý a L-citrulin.(viz. obr. 1) Tuto druhou část reakce může katalyzovat kromě NOS i superoxid. Potvrzením této možnosti je i výrazný pokles produkce NO vlivem

SOD, která odstraňuje potřebný superoxid. [Vetrovsky *et al.*, 1996] Jsou známy dva typy NOS – konstituční (cNOS, závisí na Ca^{2+} a kalmodulinu) a indukibilní (iNOS). NO způsobuje vazodilataci a je klíčovým inhibitorem adheze a agregace trombocytů. Inhibicí produkce tkáňového faktoru (TF) v monocytech brzdí NO iniciaci koagulační kaskády.[Racek J., 1999]

Obr. 1 Syntéza oxidu dusnatého NO



3.3. Účinky oxidu dusnatého a jeho význam pro organismus

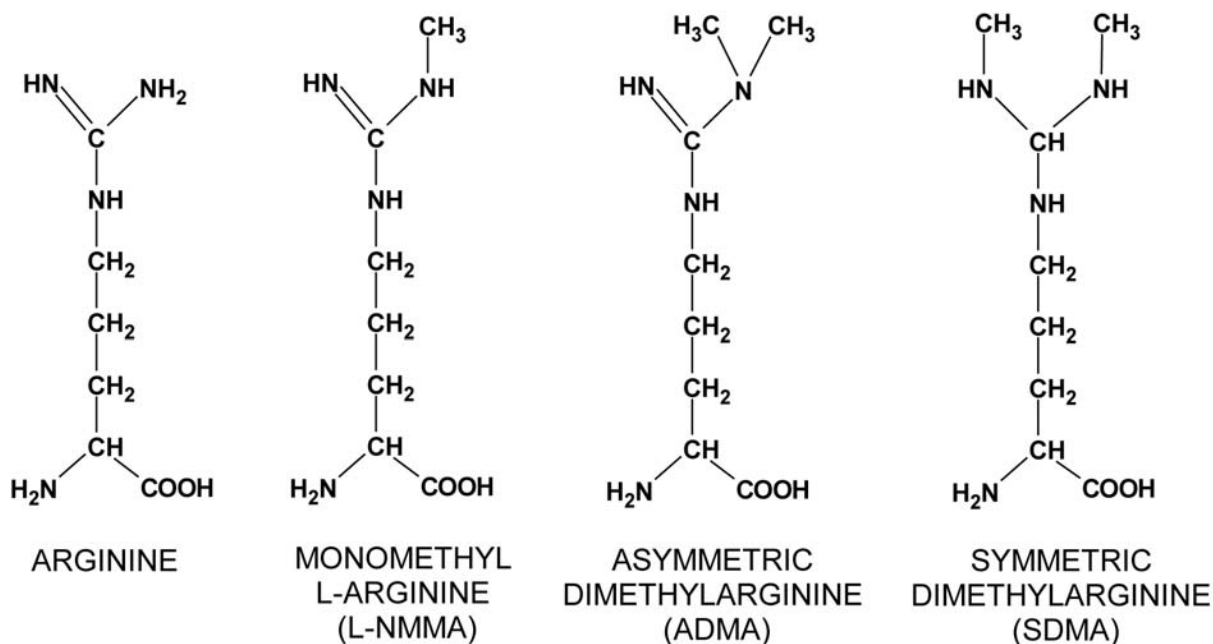
NO způsobuje vazodilataci a je klíčovým inhibitorem adheze a agregace trombocytů. Navíc tato molekula snižuje produkci superoxidového radikálu v cévách a působí jako inhibitor oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) zatímco ($\text{O}_2^{\cdot-}$) má účinek vazokonstrikční. Přitom některé typy buněk jsou schopné produkovat obě tyto látky a pro rovnováhu mezi nimi je důležitá nejen citlivá regulace tvorby pomocí cytokinů, ale i vznik peroxynitritu z těchto dvou molekul. Peroxynitrit je toxický a může oxidovat

thiolové skupiny bílkovin a methionin. Po intramolekulárním přesmyku vznikne málo škodlivá kyselina dusičná nebo dojde ke štěpení na další toxické radikály a ionty. Inhibicí produkce tkáňového faktoru v monocytech brzdí NO iniciaci koagulační kaskády. Hojivé pochody a remodelace cévní stěny jsou rovněž kontrolovány NO. Vzhledem k významnému vlivu NO na cévní stěnu je jeho mezinárodní název „endogenous anti-atherosclerotic molecule“ více než výstižný.

3.4. Inhibitory syntézy oxidu dusnatého. Asymetrický dimethylarginin (ADMA)

Syntéza NO je selektivně inhibována kompetitivní blokádu aktivního centra NOS dvěma deriváty L-argininu: N^G -monomethyl-L-argininem (L-NMMA) a N^G,N^G -dimethyl-L-argininem (asymetrický dimethylarginin – ADMA). Vzorce jednotlivých methylderivátů uvádí obr. 2.

Obr. 2

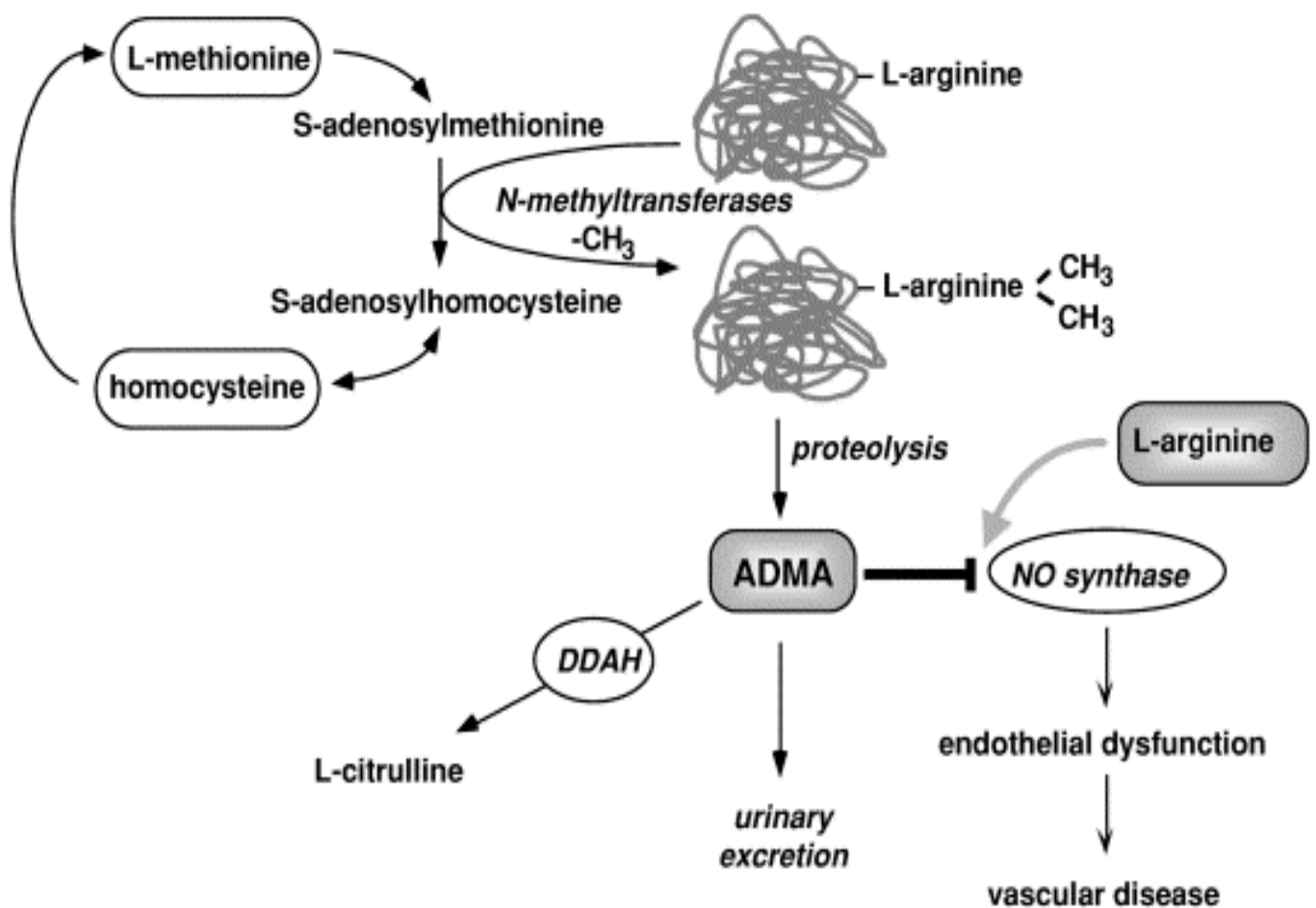


3.5. Vznik a odbourávání asymetrického dimethylargininu

Metabolismus ADMA začíná methylací proteinů bohatých na L-arginin pomocí protein-arginin methyltransferázy typu I (PRMT I). Působením enzymu proteinmethyltransferázy (PRMT) I a II dochází k methylaci zbytků argininu v molekulách proteinů a při jejich degradaci vznikají dva stereoizomery, ADMA a

SDMA. Lidské endotelové buňky jsou schopny syntetizovat ADMA i SDMA [Azuma *et al.*, 1995; Böger *et al.*, 2000; MacAllister *et al.*, 1994]. PRMT I je zodpovědná za syntézu ADMA a NMA. Minoritně je ADMA vylučován ledvinami, ale hlavní metabolická degradace probíhá hydrolýzou na dimethylamin a L-citrulin pomocí enzymu dimethylarginin dimethylaminohydrolázy (DDAH). Vznik a odbourávání ADMA jsou schematicky znázorněny na obr. 3.

Obr. 3 Schéma vzniku a odbourávání ADMA.



Společná lokalizace DDAH a NOS v buňkách endotelu podporuje hypotézu o přímém vlivu koncentrace ADMA na buňky tvořící NO.[Kurose *et al.*, 1995] Faraci a kol. experimentálně určili patologickou koncentraci ADMA v lidské plazmě, která významně inhibovala NOS v buňkách cévního endotelu a tím snižovala množství měřeného NO, na 2 – 10 $\mu\text{mol/l}$ [Faraci *et al.*, 1995]

ADMA zde za určitých podmínek, např. za přítomnosti oxidovaných LDL, figuruje jako autokrinní regulátor aktivity endotelové NOS. Ito a kol. [Ito *et al.*, 1999] prokázali, že po inkubaci oxidovaných LDL a TNF-alfa (tumor necrosis factor) s buňkami endotelu dochází na rozdíl od kontrolní skupiny ke zvýšení hodnot ADMA. Hladina dimethylargininů v cytoplazmě (nikoliv v extracelulárním prostoru) byla též zvýšena. Bogle a kol.[Bogle *et al.*, 1995] demonstrovali kompetitivní inhibici ADMA na vazebném místě pro L-arginin. Stejně výsledky popsali Azuma a kol. [Azuma *et al.*, 1995] u balónové angioplastiky. Prokázali, že regenerovaný endotel produkuje více ADMA než kontrolní buňky.

Metabolismus ADMA, ale nikoli SDMA probíhá hydrolytickou degradací na citrulin a dimethylamin pomocí enzymu dimethylarginin diaminohydrolasy (DDAH).[Ogawa *et al.*, 1987]

Inhibice DDAH způsobuje vazokonstrikci, která je reverzibilní za přítomnosti L-argininu.[MacAllister *et al.*, 1996] Jsou známy dvě izoformy DDAH: DDAH-1 a DDAH-2. První z nich lze nalézt v tkáni syntetizující neuronální NOS a druhou v tkáních zodpovědných za syntézu endotelové NOS. [Leiper *et al.*, 1999] Aktivita tohoto enzymu je závislá na komplexu regulačních mechanismů, které ještě nejsou zcela detailně popsány. Bylo prokázáno, že oxidační stres indukovaný oxidovanými LDL nebo TNF-alfa snižuje aktivitu DDAH, ale nikoli expresi jejího proteinu v buňkách endotelu in vitro. [Ito *et al.*, 1999]Aktivita DDAH je blokována zvýšenou koncentrací homocysteinu (Hcy) v buňce jednak pomocí redox přenašečů a zároveň přímou interferencí Hcy se samotnou DDAH. Oba mechanismy vedou ke zvýšení koncentrace ADMA. [Stühlinger *et al.*, 2001] Dále je DDAH inaktivována S-nitrosylací, [Leiper *et al.*, 2002]což vede k předpokladu zpětné regulace hladiny ADMA při zvýšené hladině NO. Exprese genu DDAH je indukována tzv. all-trans retinovou kyselinou. [Achan *et al.*, 2002]

4. Asymetrický dimethylarginin – význam pro organismus

Od roku 1995 je intenzivně zkoumán vztah ADMA k ostatním onemocněním. Přehled publikací zabývajících se zvýšením hladiny ADMA v lidské plazmě nebo séru uvádí následující tabulka.

Tab.č 1 Onemocnění zvyšující koncentraci ADMA v plasmě/séru (vzhledem ke zdravým kontrolám)

typ onemocnění	nárůst ADMA	citace
chronické renální selhání	2 – 7x	[Kielstein <i>et al.</i> , 1999],
hypertenze	2x	[Surdacki <i>et al.</i> , 1999]
dětská hypertenze	2,3x	[Goonasekera <i>et al.</i> , 2000]
hypertenze v těhotenství	2x	[Holden <i>et al.</i> , 1998; Savvidou <i>et al.</i> , 2003]
preeklampsie	2 – 3x	[Savvidou <i>et al.</i> , 2003]
plicní hypertenze	2,5x	[Gorenflo <i>et al.</i> , 2001]
ICHS	2x	[Boger RH, 2003; Sydow <i>et al.</i> , 2004]
ICHDK	2 – 3x	[Ceremuzyński <i>et al.</i> , 1997; Sydow <i>et al.</i> , 2004]
CMP	2x	[Yoo & Lee, 2001]
hypercholesterolémie	2x	[Böger <i>et al.</i> , 1998]
hyperhomocysteinémie	2x	[Jiang <i>et al.</i> , 2004; Sydow <i>et al.</i> , 2004]

srdeční selhání	2 – 3x	[Usui <i>et al.</i> , 1998]
hyperthyreóza	2x	[Hermenegildo <i>et al.</i> , 2002]

4.1. Asymetrický dimethylarginin u jednotlivých druhů onemocnění

4.1.1 ADMA a kardiovaskulární onemocnění

Zvýšená hodnota ADMA v lidské plazmě u nemocných s hypercholesterolémií s aterosklerózou byla prokázána již v roce 1998. Koncentrace ADMA (u zdravých jedinců 1,0 $\mu\text{mol/l}$) dosáhla hodnoty 2,2 $\mu\text{mol/l}$ u mladých, klinicky asymptomatických jedinců s hypercholesterolémií. [Böger *et al.*, 1998] U starších pacientů s onemocněním periferních arterií a generalizovanou aterosklerózou byly změřeny hladiny ADMA od 2,5 do 3,5 $\mu\text{mol/l}$; jejich výše odpovídala stadiu poškození cévního systému. [Böger *et al.*, 1997] Multicentrická studie CARDIAC, provedená v Německu a zahrnující 400 pacientů s koronárním onemocněním srdce (CAD) a více než 400 zdravých jedinců, potvrdila signifikantně zvýšené hodnoty ADMA u pacientů s CAD na rozdíl od věkem a pohlavím srovnatelných zdravých jedinců. [Boger RH, 2003]

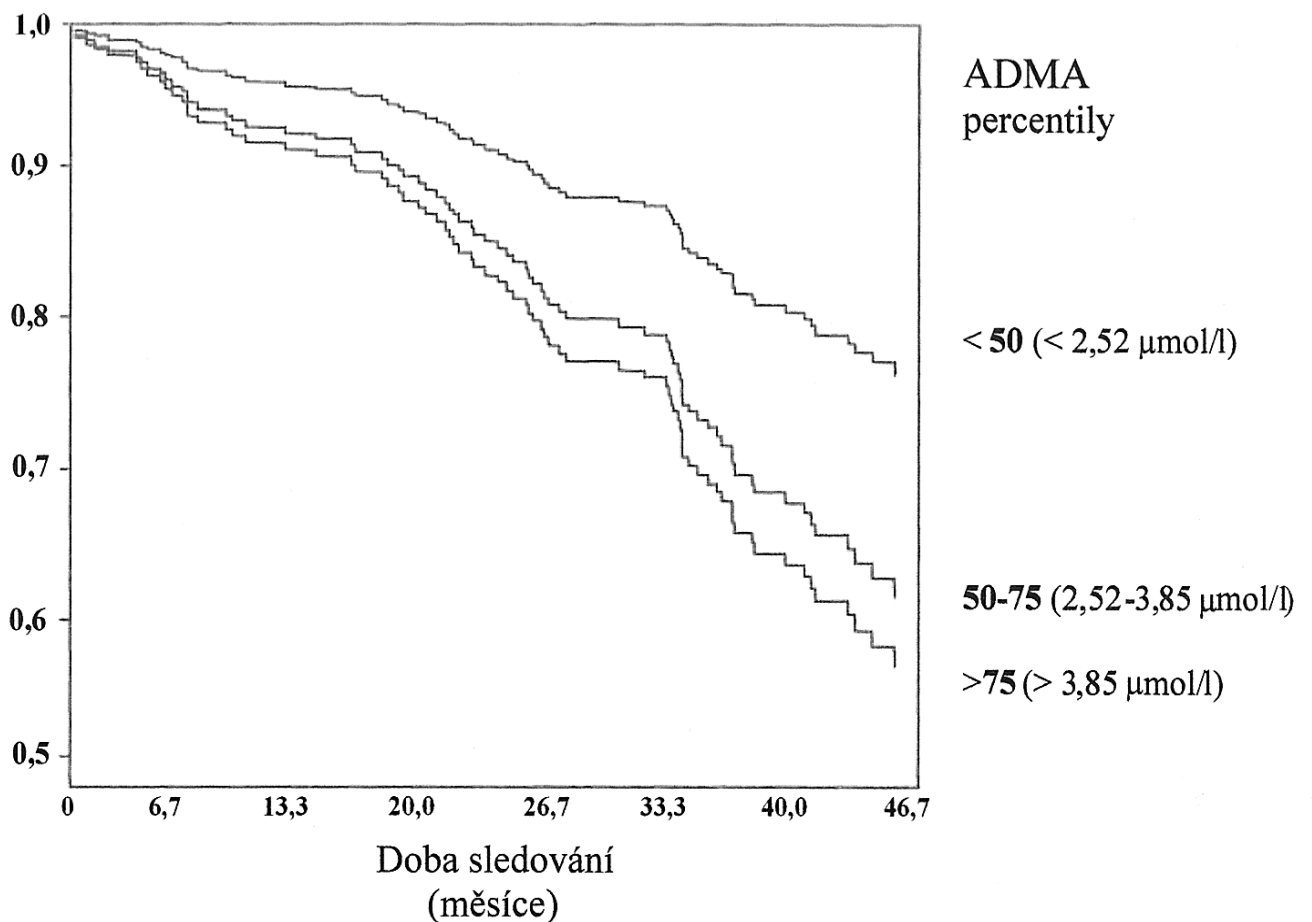
Pacienti s chronickou srdeční nedostatečností mají vyšší koncentraci ADMA než zdraví jedinci. [Hornig B, 1998] Echokardiografické parametry ukazující funkci levé srdeční komory u 198 pacientů s ESRD jeví významný vztah k hladině ADMA: pozitivní byla korelace mezi koncentrací ADMA a tloušťkou stěny levé komory myokardu, významný inverzní vztah byl nalezen mezi ADMA a hodnotou ejekční frakce [Zoccali *et al.*, 2002] Další z poznatků souvisejících se zvýšenou hladinou ADMA je inverzní vztah mezi ADMA a maximální spotřebou kyslíku během fyzické zátěže [Hornig B, 1998]

4.1.2 ADMA u hemodialyzovaných pacientů

Pacienti s chronickou renální insuficiencí byli první skupinou s vysokou hladinou ADMA, kdy získané výsledky byly publikovány a potvrzeny mnoha dalšími studii [Böger & Zoccali, 2003; Siroká *et al.*, 2005; Široká R., 2005]. Zvýšení hladiny ADMA u hemodialyzovaných pacientů je částečně způsobeno zhoršenou eliminací ADMA

během dialýzy [Kielstein *et al.*, 1999]. Takto chronicky zvýšená hladina ADMA může částečně souviset s vysokým výskytem kardiovaskulární morbidity a mortality u pacientů s chronickou renální insuficiencí [Böger & Zoccali, 2003]. Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byla provedena prognostická studie s 224 hemodialyzovanými pacienty: pacienti s hodnotou ADMA v nejvyšším kvartilu vykazovali nejvyšší celkovou úmrtnost a nejvíce kardiovaskulárních příhod během dalších tří let, kdy byli sledováni (graf č.1). Např. celková úmrtnost pacientů během 33 měsíců sledování byla o 72 % vyšší u pacientů s hodnotou ADMA nad mediánem (2,52 $\mu\text{mol/l}$) ve srovnání s těmi, jejichž koncentrace ADMA byla nižší než medián [Zoccali *et al.*, 2001]. Přestože je díky omezené glomerulární filtraci vysoká hladina ADMA u hemodialyzovaných obvyklá, lze tyto nemocné podle koncentrace ADMA rozdělit na skupiny s vysokým a nízkým rizikem.

Graf 1. Úmrtnost dialyzovaných nemocných, rozdělených na kvartily podle koncentrace ADMA (dle [Zoccali *et al.*, 2001]).



4.1.3 ADMA a diabetes mellitus

ADMA může též hrát důležitou roli jako ukazatel rizika kardiovaskulárních komplikací u diabetických pacientů. V sérii studií různých autorů je popsána zvýšená hladina ADMA u diabetiků 2. typu [Abbasi *et al.*, 2001; Fard *et al.*, 2000; Stühlinger *et al.*, 2002]. Molekulární mechanismus zvýšení ADMA v plazmě u diabetiků, lze objasnit například oxidačním stresem, který porušuje aktivací PRMT rovnováhu mezi tvorbou ADMA a jeho odbouráváním účinkem DDAH, nebo mechanismem závislým na angiotenzinu II [Ito *et al.*, 2002]

4.1.4. ADMA a metabolismus lipidů

Existuje zřejmě vztah mezi přítomností tradičních rizikových faktorů aterosklerózy (dyslipidémie) a endotelovou dysfunkcí. Jedním z mechanismů, spojujících poruchy lipidového metabolismu s endotelem, je aminokyselina ADMA. Ta působí jako inhibitor základního enzymu, potřebného pro tvorbu oxidu dusnatého – NOS. Bylo například zjištěno, že u zdravých osob s hypercholesterolémií dochází asi k dvojnásobnému zvýšení koncentrace ADMA ve srovnání s osobami s normální hladinou cholesterolu. Jednalo se o mladé jedince bez klinické manifestace aterosklerózy. Zvýšení koncentrace ADMA bylo navíc doprovázeno zhoršenou schopností vazodilatace a sníženou hladinou metabolitů NO v moči [Böger *et al.*, 1998]. Podobné změny byly pozorovány i v některých pokusech na zvířecích modelech. Dále bylo prokázáno, že rovněž hypertriacylglycerolémie, další významný rizikový faktor aterogeneze, je asociována se zvýšenou koncentrací ADMA. Patofyziologie zvýšené koncentrace ADMA u poruch lipidového metabolismu je však zatím neznámá [Lundman *et al.*, 2001] a lze pouze předpokládat vliv léčby fibráty na zvýšení hladiny Hcy a tím nepřímo i na ADMA.

4.1.5. Intenzivní péče

V holandské studii s 52 pacienty léčenými na jednotkách intenzivní péče byl ADMA při použití mnohorozměrné analýzy jedním ze silných prediktorů přežití [Nijveldt *et al.*, 2003]. Pacienti s hodnotou ADMA v nejvyšším kvartilu byli 17krát více ohroženi rizikem selhání životních funkcí. Také bylo prokázáno, že hladina ADMA v plazmě je

kontrolována z velké části funkcí ledvin a jater [Nijveldt *et al.*, 2003; Nijveldt *et al.*, 2003]]. Některé studie hovoří v této souvislosti o zvýšení ADMA u pacientů se selháním jaterních funkcí [Tsikas *et al.*, 2003]

4.2. Možností ovlivnění hladiny asymetrického dimethylargininu

Výsledky výše zmíněných studií naznačují, že by zvýšená koncentrace ADMA mohla sloužit jako marker endotelové dysfunkce a časných stadií aterosklerózy. Její monitorování by tedy mohlo být prospěšné zejména v primární prevenci těchto poruch. Skutečnost, že významné zvýšení rizika bylo zjištěno pouze u pacientů s hodnotou ADMA v nejvyšším kvartilu, ukazuje, že existuje nějaká „kritická koncentrace“ ADMA v plazmě, která je důležitá při uplatnění jeho patologického vlivu. S rostoucími poznatky o metabolismu ADMA lze dále diskutovat možná terapeutická řešení, z nichž nejjednodušší se jeví suplementace L-argininem. Schopnost exogenního L-argininu zlepšovat funkci a strukturu cév byla prověřena několika experimentálními a klinickými studiemi. Tyto studie prokázaly, že L-arginin zlepšuje funkci endotelu a zároveň redukuje klinické symptomy prodělaných kardiovaskulárních onemocnění [Böger *et al.*, 1998; Ceremuzyński *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 2000; Rector *et al.*, 1996; Tousoulis *et al.*, 2003]. Mechanismus působení je jasný – přirozený substrát L-arginin vytěsňuje s aktivního centra NOS kompetitivní inhibitor tohoto enzymu, ADMA. Některé prameny rovněž uvádějí snížení hladiny ADMA v důsledku podávání ACE inhibitorů nebo blokátorů angiotenzinových receptorů [Delles *et al.*, 2002] a pod vlivem substituce folátem [Holven *et al.*, 2003]. Další možností snížení koncentrace ADMA představuje podání statinů [Lu *et al.*, 2004; Valkonen *et al.*, 2003], i když naopak Jing J a spol. ve své studii popírají vliv simvastatinu na aktivitu DDAH či snížení koncentrace ADMA. Další možností je ovlivnění oxidačního stresu podáváním antioxidantů – superoxid totiž zvyšuje aktivitu methylačních enzymů a tedy následně i produkci ADMA [Sydow & Münzel, 2003]. popřípadě snížení hmotnosti – u morbidně obézních pacientek (BMI = 49) byla ADMA vyšší než u kontrol (BMI < 25) a při poklesu hmotnosti na BMI 34 koncentrace ADMA signifikantně klesla [Krzyzanowska *et al.*, 2004]. V pilotní studii prokázal Saran při podávání 800 mg vitamínu E nemocným v predialyzační péči po

dobu 8 týdnů snížení hladin ADMA [Saran R, 2003].

5. Metody stanovení asymetrického dimethylargininu

5.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Pro studium systému arginin-NO a jeho významu při monitorování inhibice NOS bylo popsáno několik metod pracujících na stejném principu dělení a detekce derivátů L-argininu (ADMA a SDMA) vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Molekuly argininu a jeho derivátů je nutno extrahovat z krevní plazmy a poté derivatizovat na fluorescenčně aktivní látky. (viz kap. 3.1.1 – 3.1.3) V literatuře je popsáno několik způsobů extrakce [Dobashi *et al.*, 2002; Pi *et al.*, 2000; Teerlink *et al.*, 2002; Vishwanathan *et al.*, 2000] založených na principu kolonové chromatografie: cation exchange column SPE solid phase extraction, s různým způsobem aktivace sorbentu a následným několika stupňovým promýváním kolony. Absolutní návratnost cca 85% lze kompenzovat přidáním interního standardu, poté je relativní návratnost téměř 100% a výsledky kvantitativně odpovídají množství ADMA v extracelulárních tekutinách.

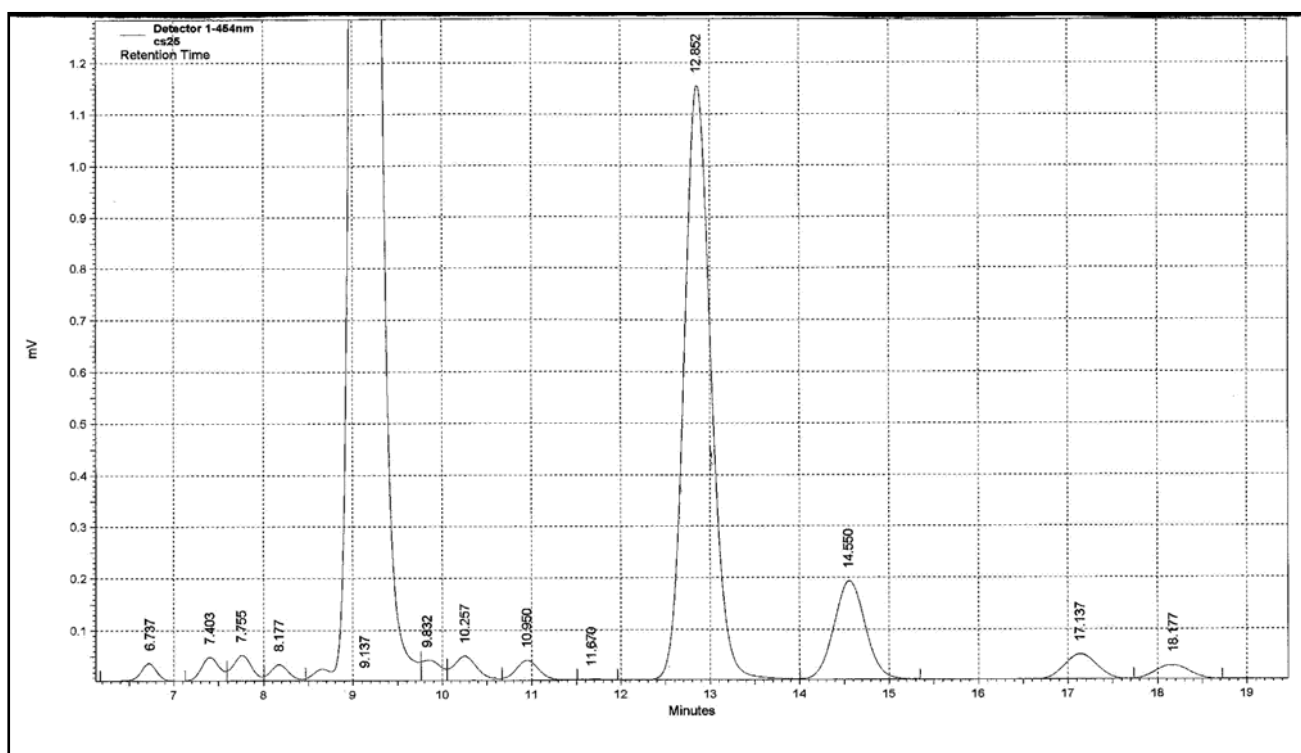
5.1.1. Derivatizace pomocí OPA

Pro správné a přesné určení koncentrace ADMA v lidské krevní plazmě, séru a moči bylo popsáno několik metod. Jednou z nich je i proces využívající detekce nikoliv přímo molekul ADMA a jeho derivátů, ale derivátů α -aminoskupiny těchto látek s o-ftaldialdehydem (OPA) a 3-merkapt ethanollem [Pi *et al.*, 2000] nebo 3-merkaptopropionovou kyselinou [Teerlink *et al.*, 2002]. Vzniklé produkty reakce jsou detekovány fluorescenčně (excitace 340 nm, emise 450 nm).

Na našem pracovišti byla zavedena metoda detekce ADMA pomocí HPLC (přístroj Thermo separation product, Miami, Florida, USA) s derivatizací OPA. Po extrakci vzorků na pevné fázi (SPE – solid-phase extraction) na polymerní kation-exchange koloně (OASIS MCX, Waters, Milford, MA, USA) a následné derivatizaci pomocí OPA obsahujícího 3-merkaptopropionovou kyselinu byly vzorky podrobeny izokratické analýze na C 18 koloně (Waters, Milford, MA, USA; mobilní fáze 8,7%

acetonitril, 50 mmol/l fosfátový pufr, pH 6,5) s tandemově zapojeným fluorescenčním detektorem (excitace při vlnové délce 340 nm a emise 450 nm). Jako interní standard (IS) byl použit NG-monomethyl-L-arginin (20 $\mu\text{mol/l}$). Kalibrační křivka pro ADMA je lineární do koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, relativní analytická návratnost (recovery) vztažená na IS 90 – 95 %, reprodukovatelnost 5,2% a limit detekce 0,12 $\mu\text{mol/l}$ ADMA pro objem vzorků 0,2 ml. Separace obou stereoizomerů byla kvantitativní, rozdíl v jejich retenčních časech odpovídal 1,1 minuty (viz obr. 4)

Obr.č. 4 Graf HPLC analýzy směsi derivátů L-argininu (retenční časy jednotlivých derivátů v minutách) – L-arginin (9,1), NG-monomethyl-L-arginin–interní standard (12,8), homoarginin (14,5), ADMA (17,1), SDMA (18,1)



5.1.2. Derivatizace pomocí NDA

Marra a kol. modifikovali předchozí metodu a použili jako derivatizační činidlo naftalen-2,3-dikarbaldehyd (NDA). Vzniklá fluorescenčně aktivní forma 1-kyanobenz[f]isoindolu je stabilnější v čase (pokles fluorescence o 30 % za 7 dní) než OPA deriváty a retenční časy obou izomerů se liší o více než 6 minut, což vylučuje možnost překrytí signálů. Nevýhodou této metody je prodloužení doby analýzy o 10 minut [Marra *et al.*, 2003].

5.1.3. Derivatizace pomocí AccQ-Fluor™

Heresztyn a kol. použili po standardní extrakci aminů z plazmy (SPE kolony) vysoce stabilní reagent Acc-Q-Fluor™ (6-aminochinolyli-N-hydroxysukcinimidylkarbamát). Stabilita vzniklých derivátů argininu se po týdnu prakticky nemění (zmenšená plocha píku do 5 %) [Heresztyn *et al.*, 2004]. I tato metoda však při zlepšení stability vzorku posouvá délku analýzy o dalších 10 minut. Na rozdíl od derivátů OPA se čas celkové analýzy posouvá až ke 45 minutám.

5.2. HPLC-MS (HPLC-Mass Spectrometry - Hmotnostní spektrometrie)

Detekce ADMA pomocí tandemového zapojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru (MS) patří mezi nové metody [Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2003]. Použitím dvou detektorů lze obejít náročnou preanalytickou přípravu vzorku, která zahrnuje pouze precipitaci a zahuštění vzorku. Vzorek je po derivatizaci OPA a 2-merkptoethanolem separován na RP18 koloně gradientovou elucí (mravenčanový pufr/methanol) a detekován pomocí ESI-MS (electrospray ionization-mass spectrometry). Jako interní standard byl použit $^{13}\text{C}_6$ -arginin. Vzorky je možno měřit jak sérové tak plazmatické a k analýze lze použít i moč. Detekce hladiny citrulinu v jedné sérii lze použít i pro monitorování aktivity enzymu DDAH.

5.3. Imunochemické metody

Enzymatická imunoanalýza je nejnovější metoda měření koncentrace ADMA v séru nebo plazmě. Pro detekci ADMA v této práci byla použita souprava ADMA[®] ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) od firmy DLD Diagnostika GmbH (Hamburg, Německo), založená na kompetitivním principu: ADMA z přidaného vzorku je acylován a soutěží s ADMA fixovaným na pevné fázi mikrotitrační destičky o vazebná místa limitovaného množství přidané králičí anti-N-acyl-ADMA protilátky. Po ukončení ekvilibrace jsou volný antigen a volné komplexy antigen-protilátka odstraněny promytím a protilátka navázaná na pevnou fázi prostřednictvím fixovaného ADMA je detekována činidlem obsahujícím protilátku proti králičímu imunoglobulinu značené peroxidázou. Poslední fází je přidání TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) jako substrátu peroxidázy a barevný produkt reakce je detekován při vlnové délce 450 nm (fotometr AUTO-EIA II, Labsystems Oy, Espoo, Finsko). Množství protilátky navázané na pevnou fázi (a tedy i měřená absorbance) je nepřímo úměrné koncentraci ADMA ve vzorku.

5.4. Další metody stanovení ADMA

5.4.1. Kapilární elektroforéza (CE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Kapilární elektroforézou v koncentrovaném borátovém pufru o pH 9,5 lze rozdělit směs obsahující dimethyl-L-argininu, NG-monomethyl-L-argininu, L-argininu, L-homoargininu, L-ornitinu a L-citrulinu jako deriváty 4-fluoro-7-nitrobenzofurazanu. Micelární elektrokinetickou chromatografií lze poté rozdělit i ADMA a SDMA přičemž jako surfaktant je do borátového pufru přidána kyselina deoxycholová o vysoké koncentraci (50 – 100 mM). Pro dosažení úplného kvantitativního rozdělení těchto derivátů byla použita různá koncentrace výchozího pufru, různé pH a přesná koncentrace kyseliny deoxycholové. Rychlost separace (10,8 min.) byla zvýšena zúžením vnitřního průměru kapiláry při zachování kvalitativního rozdělení píků a

meze detekce. Limit stanovitelnosti (LOQ) pro ADMA ve vodném roztoku při CE separaci a UV detekci byl 20 μM . Mnohem lepší výsledky vykazuje laserově indukovaná fluorescenční detekce (LIF) – LOQ = 0,1 μM ADMA. [Trapp *et al.*, 2004]

5.4.2. GC-MS (Gass Chromatography-Mass Spectrometry)

Tandemové zapojení plynový chromatograf (GC-NICI (negative-ion chemical ionization)) a hmotnostní spektrometr je metoda rychlá a alternativní k HPLC, která poskytuje výborné výsledky i pro velmi malé objemy vzorků lidské plazmy nebo supernatantu buněčných kultur. Plazmatický ADMA je po SPE přeměněn na methylester pentafluoropropionamidu a tento derivát je analyzován bez další purifikace. Interním standardem je [$^2\text{H}_6$]-ADMA a limit detekce jsou 2 fmol [Albsmeier *et al.*, 2004]

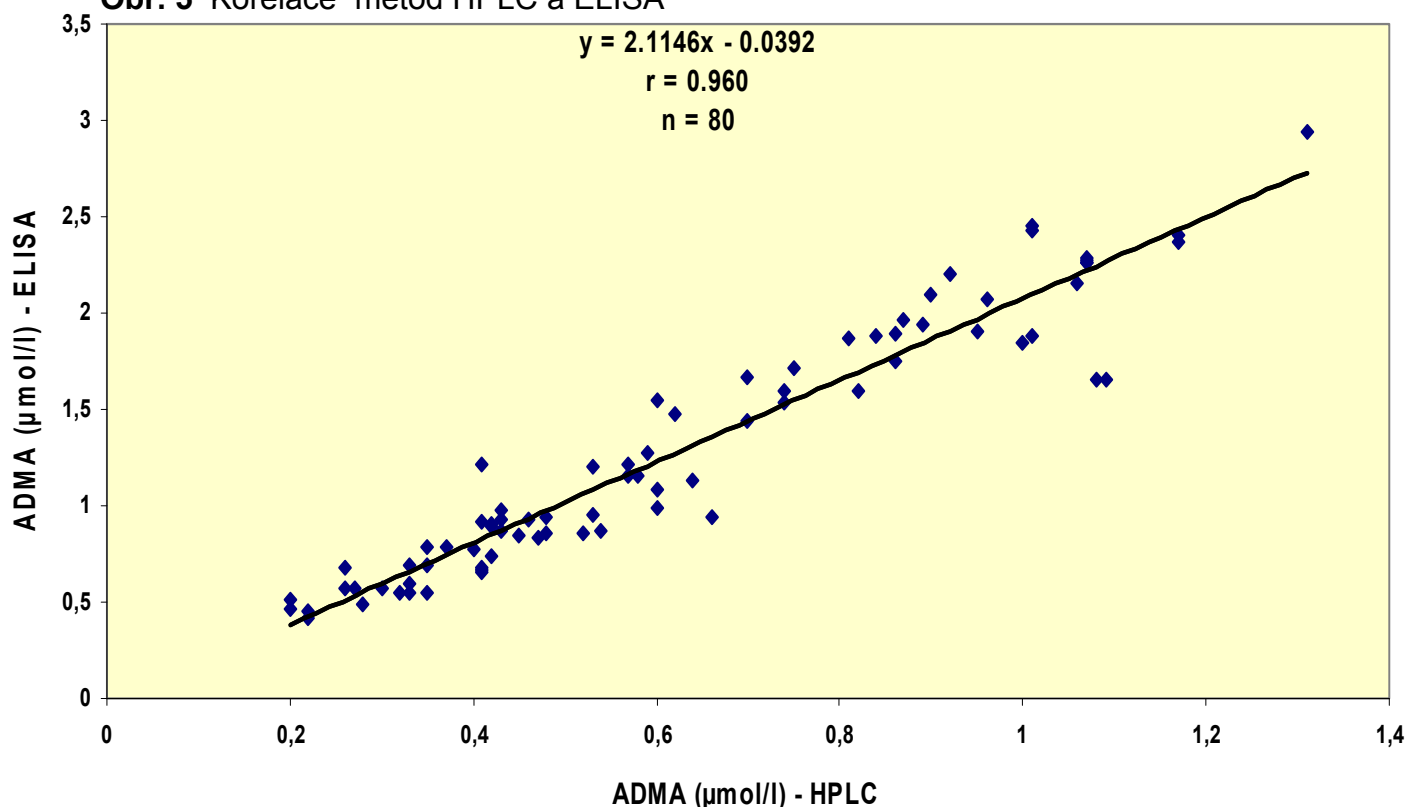
5.5. Srovnání dvou metod stanovení ADMA – HPLC a ELISA

Metodika detekce ADMA v plasmě pomocí různých HPLC technik byla již publikována[4-9], ale v současné době existuje nová imunochemická metoda detekce tzv. ELISA[10]. Jedním z dílčích cílů mé práce bylo porovnat kvalitu, přesnost a dostupnost jak cenovou tak přístrojovou obou metod. Pro účely srovnání těchto metod bylo použito 80 vzorků plazmy (40 zdravých dárců krve a 40 hemodialyzovaných pacientů, krev byla odebrána nalačno), které byly změřeny jak metodou HPLC tak ELISA. Odběr plasmy byl standardní a vzorky byly odebrány do EDTA zkumavek a centrifugovány (3600 g po dobu 5 minut) do 30 minut od odběru. Vzniklé alikvoty byly skladovány při -70°C . HPLC metoda vykazovala návratnost 92%, reprodukovatelnost 5.2 % (vzorek směsné plazmy $c = 0.45 \mu\text{M}$, měřeno 10x) a detekční limit 0.13 $\mu\text{mol/l}$ což odpovídá výsledkům publikovaných Valtonenem *et al.*

Metoda ELISA: Mez stanovitelnosti odpovídající hodnotám uvedeným v průvodním listu každého setu byla 0,05 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota variačního koeficientu (inter-assay) pro kontrolní sérum č.1 ($c(\text{ADMA}) = 0.510 \pm 0.086 \mu\text{mol/l}$, $n=5$) byla 14% a pro č.2 ($0.892 \pm 0.162 \mu\text{mol/l}$) 18%. Reprodukovatelnost byla vyjádřena jako variační koeficient intra-assay ($n=20$, směsná plazma o koncentraci ADMA 1,58 $\mu\text{mol/l}$) a měla hodnotu 11,8%. Opakovatelnost byla vyjádřena měřením 40 vzorků plazmy ve dvou sériích

(rozsah hodnot koncentrace ADMA 0.82 – 2.49 $\mu\text{mol/l}$, průměrná koncentrace ADMA 1.59 $\mu\text{mol/l}$) a byla získána hodnota 4,75%. Rozsah koncentrací vzorků byl od 0.3 – 3.0 $\mu\text{mol/l}$ a přestože obě metody se zakládají na rozdílných principech vykazují velmi dobrou vzájemnou korelaci (Pearsonův korelační koeficient $r = 0.944$, $p < 0.0001$). Regresní model dle Pasing-Babloka vykazuje příkrou směrnici křivky v závislosti na širokém rozpětí koncentrací na vyšších hladinách (Fig. 1). Konfidenční interval diferenciálního grafu Bland-Altmana vede k hypotéze, že u nízkých koncentrací ADMA metody HPLC a ELISA jsou srovnatelné (10). V poslední době byly publikovány dvě práce s konfliktními výsledky (Schulze, Valtonen) a naše práce potvrdila Schulzeho hodnoty ADMA. Přestože námi zjištěný korelační koeficient byl nižší než v jeho práci, lze konstatovat dobrou shodu ve výsledcích v oblasti nižších hodnot ADMA (rozsah měřených hodnot byl v naší práci 0,4 až 2,5 v.s. 0,5 až 1,0 v Schulzeho publikaci). Rozdílné hodnoty korelačních křivek mohlo způsobit několik faktorů: pouze nízké koncentrace v použitých vzorcích plazmy, dále různé sériové číslo u použitých setů ELISA a též různé způsoby zpracování vzorků v tzv. preanalytické fázi. Nicméně výsledky popsané v naší studii nás opravňují k tvrzení, že i přes její menší přesnost, měření ADMA metodou ELISA je použitelnější a dostupnější pro laboratoře bez speciálního technického vybavení na rozdíl od metody HPLC. Další předností je možnost měřit velké série o 200 vzorcích v poměrně krátkém časovém horizontu 2 dnů.

Obr. 5 Korelace metod HPLC a ELISA



6. Výsledky

6.1. Stanovení referenčních hodnot ADMA (HPLC, ELISA)

Referenční hodnoty koncentrace ADMA byly změřeny u skupiny zdravých jedinců – dárců krve z transfúzní stanice ve FN Plzeň. Referenční skupina byla složena ze 40 probandů (věk $31,16 \pm 9,78$ roků, 22 mužů a 18 žen). Hodnoty koncentrací ADMA v lidském séru, plazmě nebo moči se u zdravé populace najdeme v rozmezí 0,3 – 1,0 $\mu\text{mol/l}$ (18) a díky rozdílným podmínkám každé z metod se výsledky pohybují v takto širokém intervalu.

U metod HPLC s různým typem derivatizace se průměrné hodnoty $c(\text{ADMA})$ v krevní plazmě nacházejí v rozmezí 0,40 – 0,66 $\mu\text{mol/l}$ (9, 13 – 15, 19). Martens-Lobenhoffer pomocí metody HPLC-MS získal hodnoty $c(\text{ADMA})$ $0,453 \pm 0,128$ $\mu\text{mol/l}$ (16). U metody ELISA se průměrné hodnoty ADMA pohybovaly v rozmezí $0,82 \pm 0,29$ mol/l .

6.2. Korelace hladiny ADMA a homocysteinu u hemodialyzovaných nemocných

Vzorky EDTA plazmy skupiny I byly získány od 40 zdravých dárců krve z transfúzního oddělení FN v Plzni, skupina II zahrnovala 40 probandů s homocysteinem vyšším než 12 $\mu\text{mol/l}$ a normální funkcí ledvin a ve skupině III bylo 40 hemodialyzovaných pacientů; odběr krve byl proveden před dialýzou.

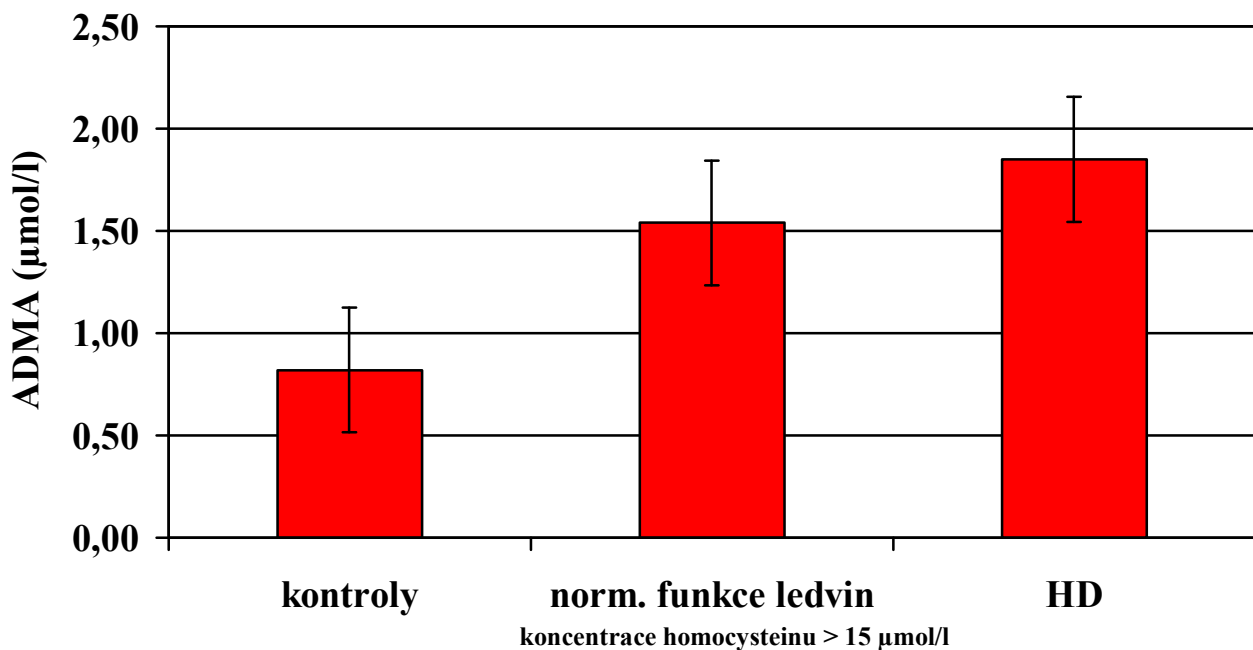
Homocystein byl stanoven plně enzymatickou metodou firmy Carolina (Brea, CA, USA) na analyzátoru Olympus AU 400. Homocystein je v první enzymové reakci přeměněn na cystathionin, ten je pak štěpen na homocystein, pyruvát a amoniak a pyruvát je stanoven optickým testem s laktátdehydrogenázou.

Enzymová imunoanalýza je nejnovější metoda měření koncentrace ADMA v séru nebo plazmě. Pro detekci ADMA v této práci byla použita souprava ADMA[®] ELISA od firmy DLD Diagnostika GmbH (Hamburg, Německo). Koncentrace kreatininu byla

měřena Jaffého metodou na analyzátoru Olympus AU 400.

Plazmatické koncentrace ADMA u zdravých dárců krve (skupina A) byly velmi nízké ($0,82 \pm 0,30 \mu\text{mol/l}$) a se nelišily v závislosti na pohlaví. Koncentrace homocysteinu v této skupině odpovídaly hodnotám uváděným v literatuře jako nezvýšené ($10,4 \pm 3,4 \mu\text{mol/l}$). U skupiny B – pacientů s normální funkcí ledvin a hyperhomocystinemií ($15,4 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$) – byly koncentrace ADMA o 50 % vyšší ($1,59 \pm 0,56 \mu\text{mol/l}$) ve srovnání s kontrolní skupinou I. Ve skupině C dialyzovaných pacientů se střední hyperhomocystinemií ($29,3 \pm 13,0 \mu\text{mol/l}$) hodnoty ADMA byly ještě výrazněji zvýšeny ($1,84 \pm 0,57 \mu\text{mol/l}$), i když se významně nelišily od hodnot nalezených u skupiny B. (Tab.2)

Graf č.2 Koncentrace ADMA pacientů s norm.funkcí ledvin, hemodialyzovaných a kontrol



Pozitivní korelace byly nalezeny mezi ADMA a homocysteinem ($r = 0,42$, $p < 0,0001$), ADMA a kreatininem ($r = 0,41$, $p < 0,0001$) a též homocysteinem a kreatininem ($r = 0,69$, $p < 0,0001$). Pro regresní analýzu byly spojeny výsledky všech tří skupin osob; vyřazeni byli dva nemocní ze skupiny III, jejichž koncentrace homocysteinu lze považovat za odlehlé (přesáhly hodnotu $100 \mu\text{mol/l}$).

Taulka č.2 Základní charakteristika a plazmatické koncentrace homocysteinu, ADMA a kreatininu (průměr \pm SD) tří skupin pacientů.

	Group A (n = 31) blood donors with normal homocysteine	Group B (n = 38) hyperhomocysteinemia normal kidney function	Group C (n = 38) hemodialysis patients
Age, years	31.16 \pm 9.78	60.47 \pm 8.75 ***	61.71 \pm 12.37 ***
Sex, count (male/female)	22/9	24/14	22/16
Hcy, $\mu\text{mol/l}$	9.01 \pm 1.70	15.58 \pm 4.27 ***	29.48 \pm 13.13 *** †††
ADMA, $\mu\text{mol/l}$	0.82 \pm 0.29	1.60 \pm 0.56 ***	1.81 \pm 0.57 ***
Creatinine, $\mu\text{mol/l}$	86.97 \pm 9.78	94.84 \pm 17.32	688.95 \pm 219.25 ****†††

Signifikantní rozdíl v porovnání se skupinou A: *** $p < 0.001$, a se skupinou B: ††† $p < 0.001$.

Tabuka č.3 Mohočetná lineární regresní analýza (koncentrace ADMA je závislou proměnou)

	β (SE)	p
group	2.82 (0.91)	0.003 **
age	0.03 (0.01)	0.002 **
sex	-0.07 (0.21)	0.74
creatinine	0.003 (0.006)	0.56
homocysteine	0.014 (0.019)	0.46
R ²	0.42	<0.001 ***

6.3. Význam stanovení ADMA pro prognózu nemocných léčených hemodialýzou. Srovnání s dalšími rizikovými faktory celkové úmrtnosti

6.3.1. Materiál a metody

Do studie (prospektivní, observační) jsme zařadili 202 chronicky hemodialyzovaných pacientů (77 žen, 125 mužů; bližší charakteristika je v Tabulce 1). V této práci publikujeme průběžné výsledky studie po 1 roce a 5 měsících. V době hodnocení studie jsme zaznamenali 44 úmrtí, 11 transplantací, 4 pacienti byli převedeni na peritoneální dialýzu a 3 ukončili studii z ostatních důvodů. Koncentrace ADMA jsme stanovili pomocí ELISA metody (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Německo) na čtečce mikrodestiček AUTO-EIA II (Labsystems Oy, Espoo, Finland) [Siroká *et al.*, 2006]. Na automatickém analyzátoru Olympus AU 400 (Mishima, Japonsko) byly určeny hladiny následujících analytů: homocystein (hcy) enzymatickou fotometrickou metodou (Carolina Liquid Chemistries, Brea, California, USA), C-reaktivní protein (CRP) imunoturbidimetricky ultrasenzitivní metodou (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) a pokud koncentrace CRP naměřená touto metodou přesáhla 10 mg/l, pak kitem kalibrovaným na koncentrace nad 10 mg/l (Kamyia Biomedical Company, Seattle, Washington, USA), albumin (alb) soupravou ALBUMIN liquicolor (Human Diagnostics, Wiesbaden, Germany). Natriuretický peptid typu B (BNP) pomocí soupravy AxSYM BNP Assay (mEIA) na imunochemickém analyzátoru AxSYM 2 (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), troponin I (cTnI) soupravou Access AccuTnI

na přístroji Access 2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Všechny vzorky žilní krve byly získány na začátku studie před plánovanou hemodialýzou, byly zpracovány do 30 minut po odběru a uchovány při -80°C až do doby analýzy. Všechny statistické údaje jsou vyjádřeny (pokud není uvedeno jinak) jako medián (interkvartilové rozpětí) a byly provedeny statistickým softwarem R 2.4.1 [R Development Core Team, 2006]. Při určování rozhodovacích hodnot pro jednotlivé parametry jsme použili následující jednoduchý algoritmus: pro každou z měřených veličin (ADMA, hcy, alb, CRP, BNP, cTnI) jsme vytvořili křivky přežití rozdělené dle kvartilů (Obrázek 1) a hodnotu kvartilu, ve kterém bylo přežití nejhorší jsme zvolili jako rozhodovací mez pro zařazení do rizikové skupiny. Takto vzniklé binární veličiny jsme vložili do Coxova modelu poměrného hazardu (s adjustací na věk, pohlaví a čas na hemodialýze).

Tabulka č.4. Základní charakteristika zkoumané populace. Data jsou vyjádřena mediánem (interkvartilovým rozpětím)

<i>age (years)</i>	68 (60 - 74)
<i>body mass index (kg/m²)</i>	26.4 (23.7 - 30.1)
<i>time on hemodialysis (months)</i>	16 (5 - 38)
<i>time of observation (months)</i>	17.1 (10.4 – 17.3)

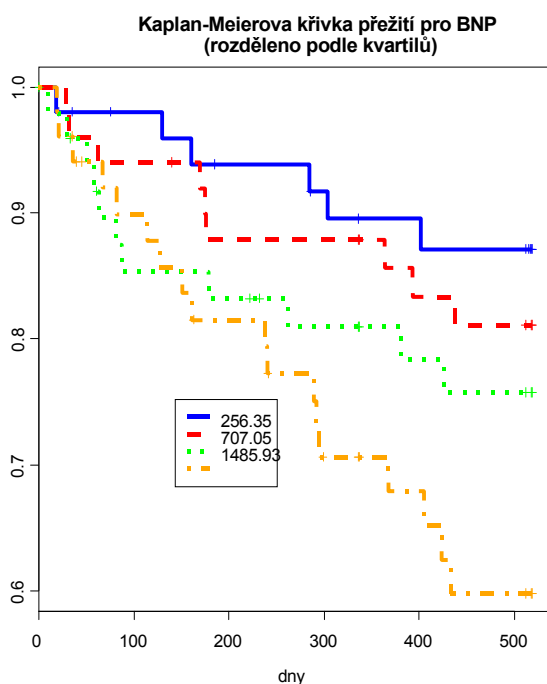
6.3.2. Výsledky

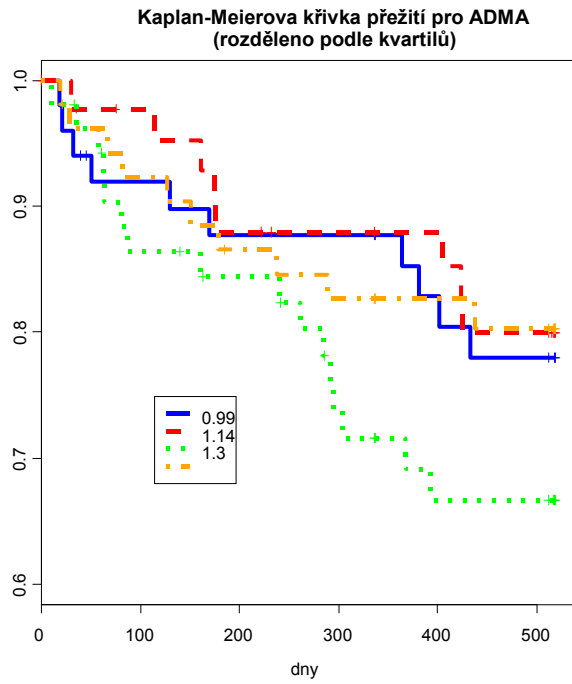
Obrázek 7 ukazuje, že nejhorší přežití vykazovali překvapivě pacienti s hodnotami ADMA a homocysteinu ve 3. kvartilu a (podle očekávání) dále pacienti s koncentracemi albuminu v 1. kvartilu, CRP, BNP a cTnI ve 4. kvartilu. Po vložení všech měřených parametrů do Coxova modelu poměrného hazardu se jako statisticky významné nezávislé prediktory celkové mortality jeví ADMA, albumin, CRP a cTnI (Tabulka 5).

Tabulka č.5. Coxův model poměrného hazardu zahrnující hodnoty ADMA, homocysteinu ve 3. kvartilu a koncentrace albuminu v 1. kvartilu, CRP, BNP a cTnl ve 4. kvartilu. Podle Kaplan-Meierova grafu byly rozděleny hodnoty koncentrací do jednotlivých kvartilů (Obrázek č.6,7,8,9), poté byl vybrán kvartil s nejvyšším rizikem úmrtí pacienta. RR = relativní riziko, CI = 95 % konfidenční interval RR.

	RR	CI	p
<i>ADMA (3rd quartile)</i>	2.44	1.24 to 4.79	0.01
<i>Hcy (3rd quartile)</i>	1.81	0.89 to 3.68	0.10
<i>Albumin (1st quartile)</i>	3.29	1.63 to 6.63	0.001
<i>CRP (4th quartile)</i>	2.28	1.17 to 4.43	0.02
<i>BNP (4th quartile)</i>	1.23	0.62 to 2.45	0.56

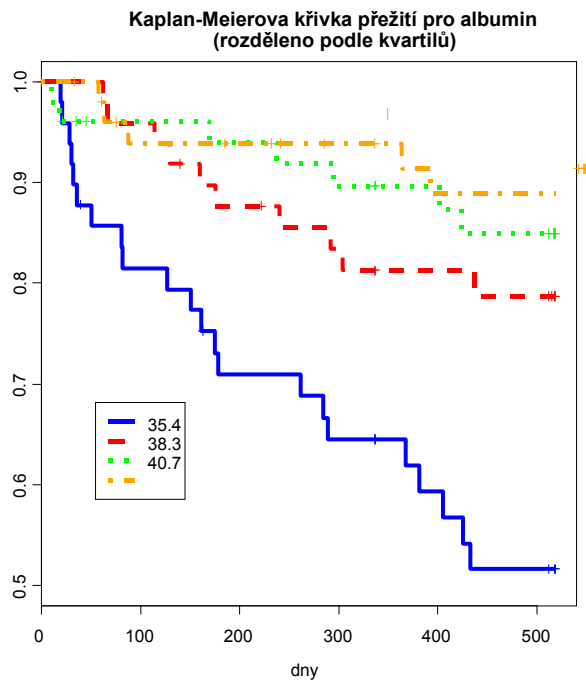
Obr. č. 6

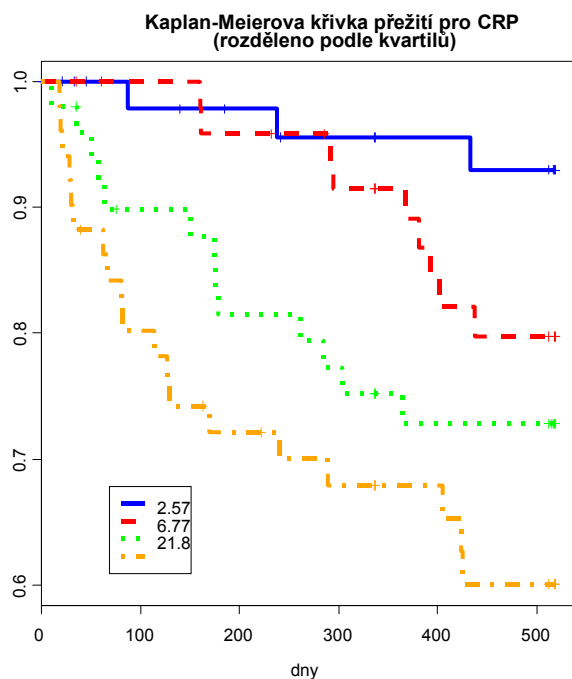




Obr. č. 7

Obr. č. 8





Obr. č.9

Zoccali et al. sledovali celkovou mortalitu a výskyt fatálních a nefatálních kardiovaskulárních příhod u HD pacientů 2 roky a 7 měsíců [Zoccali *et al.*, 2001]. V této studii se koncentrace ADMA jevila jako nezávislý prediktor celkové mortality i výskytu příhod. Přestože autoři použili pro stanovení ADMA stejnou modifikaci metody HPLC jako Kumagai et al. [Kumagai *et al.*, 2006], publikují u HD pacientů výrazně vyšší hodnoty a také větší rozdíly mezi nemocnými s kardiovaskulární příhodou a bez kardiovaskulární příhody (rozdíl mediánů = 0,75 $\mu\text{mol/l}$) než Kumagai et al. (rozdíl průměrů = 0,07 $\mu\text{mol/l}$).

My jsme použili ke stanovení ADMA metodu ELISA, která je s HPLC metodikou srovnatelná [Siroká *et al.*, 2006], nicméně, jak prokázal Teerling, již zvýšení variačního koeficientu (CV) na 5 % způsobí výrazné snížení pravděpodobnosti prokázat rozdíly mezi dvěma populacemi (např. přeživší a zemřelí) [Teerlink, 2005]. Většina publikovaných prací CV metody měření ADMA neuvádí, my jsme stanovili CV pro měření ADMA metodou HPLC 5,2 % a metodou ELISA 11,8 % [Siroká *et al.*, 2006]. Jelikož novější práce prokazují [Busch *et al.*, 2006; Kumagai *et al.*, 2006] mnohem menší rozdíly v koncentraci ADMA mezi pacienty s kardiovaskulární příhodou a bez ní, jsou tyto rozdíly dostupnými metodikami v klinické praxi těžko odhalitelné. Otázkou zůstává, zda nějaké rozdíly skutečně existují. Námi naměřené hodnoty pro to nesvědčí (prokázali jsme horší prognózu pouze u pacientů s koncentrací ADMA ve

3. kvartilu a koncentrace jak nižší, tak vyšší měly prognózu lepší), a dokonce se objevují i práce, které naopak považují vysoké hodnoty ADMA za protektivní faktor u pacientů s chronickou renální insuficiencí, HD nemocných a nemocných po transplantaci ledviny [Busch *et al.*, 2006].

Tabulka č.6 Základní charakteristika a výsledky zkoumané skupiny hemodialyzovaných pacientů. Výsledky jsou udávány jako hodnoty mediánu, r_{ADMA} (p) = korelační koeficient mezi hodnotami ADMA a dalšími parametry uvedenými v této tabulce (p-hodnota vyjadřuje rozdíl mezi 0 a korelačním koeficientem).

	Results	r_{ADMA} (p)
<i>Age (years)</i>	68 (60 to 75)	-0.08 (0.33)
<i>Sex (male/female)</i>	106/70	–
<i>Systolic blood pressure (mm Hg)</i>	145 (130 to 159.75)	0.08 (0.32)
<i>Diastolic blood pressure (mm Hg)</i>	75 (68 to 82.75)	-0.05 (0.51)
<i>Body mass index (kg/m²)</i>	25.52 (22.86 to 29.56)	-0.11 (0.14)
<i>Months on HD</i>	21.5 (8 to 46); 56	0.21 (0.02)
<i>Creatinine (μmol/l)</i>	622.5 (524 to 740.75)	0.03 (0.69)
<i>Glucose (mmol/l)</i>	6.09 (5.26 to 7.87)	0.03 (0.68)
<i>Albumin (g/l)</i>	38.7 (35.5 to 41.07)	-0.09 (0.23)
<i>C-reactive protein (mg/l)</i>	6.32 (2.58 to 19.09)	-0.11 (0.17)
<i>ADMA (μmol/l)</i>	1.14 (0.98 to 1.3)	–
<i>Homocysteine (μmol/l)</i>	34.05 (25.6 to 41.88)	-0.07 (0.39)
<i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	4.51 (3.73 to 5.15)	-0.04 (0.61)
<i>HDL-cholesterol (mmol/l)</i>	1.09 (0.94 to 1.29)	-0.07 (0.35)
<i>Apolipoprotein A I (g/l)</i>	1.03 (0.93 to 1.19)	-0.01 (0.86)
<i>Apolipoprotein B (g/l)</i>	0.8 (0.66 to 0.92)	-0.08 (0.28)
<i>Lipoprotein (a) (g/l)</i>	0.18 (0.09 to 0.36)	-0.13 (0.11)
<i>Triglycerides (mmol/l)</i>	1.77 (1.32 to 2.43)	-0.07 (0.35)
<i>Malondialdehyde – TBARS (μmol/l)</i>	1.82 (1.58 to 2.06)	-0.06 (0.42)
<i>Oxidized LDL-cholesterol (IU/l)</i>	58.39 (42.65 to 74.3)	-0.12 (0.12)

6.4. Hladiny ADMA u obézních osob po transplantaci ledviny a vztah k hladinám adipocytokinů

Mezi významné metabolity, jejichž hladina se podílí na ovlivnění endotheliální dysfunkce, patří *asymetrický dimethylarginin (ADMA)*, endogenní inhibitor NO syntázy a dále produkt tukové tkáně *adiponectin (ADN)*. Zvýšená hladina ADMA je prokazatelným markerem endotheliální dysfunkce u nefrologických nemocných (6,7,13). Dosud však není známo, zda zvýšená hladina ADMA závisí pouze na renální funkci či představuje zpětnovazebnou odpověď na další přítomné metabolické poruchy. ADN je adipocytokin produkovaný adipocyty, jehož snížená hladina je považována za rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění(3,14). ADN klesá u nemocných s obezitou, hypertenzí a diabetem. Ačkoliv je ve srovnání s běžnou populací relativně vyšší (podobně jako leptin) u nefrologicky nemocných, jeho snížená hodnota, i zde představuje zvýšené riziko. Po transplantaci ledviny zvýšená hladina ADN klesá, což nepochybně souvisí s funkcí ledvinné tkáně v procesu jeho biodegradace a/či eliminace. Cílem naší studie bylo sledování vztahu mezi plazmatickou koncentrací ADMA, ADN v plazmě a tukové tkáni a funkcí transplantované ledviny u nemocných s MS.

Metodika: Po dobu 12 měsíců jsme v prospektivní metabolické konsekutivní studii sledovali 68 obezních nemocných (M36/F32, BMI $\geq 30\text{kg/m}^2$, 22-70 roků) po I. kadaverozní transplantaci (sk. I). Kontrolní skupinu tvořilo 70 transplantovaných neobezních nemocných. Hodnoty ADMA i ADN v plazmě byly měřeny metodou ELISA, adipocytokiny v tukové tkáni mRNA-PCA. Všichni nemocní byli léčeni standardní imunosupresí FK 506 (takrolimus), CyA (Sandimmun Neoral, Consupren), MMF (Cellcept) a prednisonem. Renální funkce byla vyšetřena pomocí C_{kr} a C_{in} .

Nemocní byli vyšetřeni v clearancové laboratoři metabolického oddělení Kliniky nefrologie 12 a 24 měsíců po transplantaci ledviny. Protokol studie byl schválen Etickou komisí IKEM a všichni nemocní podepsali Informovaný souhlas. Vzorky tukové tkáně byly získány chirurgickým odběrem během

transplantace. Oba soubory se signifikantně nelišily ve výskytu rejekčních epizod, kumulativní dávce kortikoidů ani HLA shodě.

Výsledky: Tab. č. 7 udává v přehledu základní vyhodnocená data v plazmě v obou souborech na konci sledovaného údobí. Ze statistického hodnocení je zřejmé, že byly zjištěny signifikantní rozdíly (Sk.I vs.Sk.II) v následujících hodnotách: ADMA $3,65 \pm 0,47$ vs. $2,01 \pm 0,36$ ($\mu\text{g/ml}$), $p < 0,01$, ADN $15,4 \pm 6,6$ vs. $22,3 \pm 8,2$ ($\mu\text{g/ml}$), $p < 0,01$, leptin $51,3 \pm 11,2$ vs. $21,3 \pm 9,2$ (ng/l), $p < 0,01$, ObRe (solubilní leptinový receptor) $24,6 \pm 8,4$ vs. $46,6 \pm 11,4$ (U/ml), $p < 0,01$ a celkový homocystein (tHcy) $55,2 \pm 12,6$ vs. $37,2 \pm 12,4$ (mmol/l), $p < 0,025$.

Současně byly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách některých sérových lipidů. Na druhé straně se signifikantně nelišily hodnoty proteinurie, clearance inulinu a průměrný TK.

Tab. č. 7 Vybrané parametry v plazmě v obou souborech po 12 měsících sledování

Variable	Gr.I	Gr.II	Statistical significance
Number of pts	68	70	
Gender (M/F)	36/32	38/34	NS
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	3.65 ± 0.47	2.01 ± 0.36	$p < 0.01$
Adiponectin:ADN ($\mu\text{g/mL}$)	15.4 ± 6.6	22.3 ± 8.2	$p < 0.01$
Leptin (ng/L)	51.3 ± 11.2	21.3 ± 9.2	$p < 0.01$
Ob Re (U/mL)	24.6 ± 8.4	46.1 ± 11.4	$p < 0.01$
Resistin ($\mu\text{g/mL}$)	20.8 ± 10.1	14.6 ± 6.4	$p < 0.025$
tHcy ($\mu\text{mol/L}$)	55.2 ± 12.6	37.2 ± 12.4	$p < 0.025$

Cholesterol (mmol/L)	6.2±2.4	6.0±1.8	NS
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.8±1.2	3.1±1.1	p < 0.025
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.1±0.2	1.0±0.2	NS
Triglycerides (mmol/L)	3.9±1.6	2.8±1.6	p < 0.01
hsCRP (mg/L)	8.6±3.8	6.9±3.2	NS
Proteinuria (g/24 hrs)	1.5±0.2	1.1±0.4	NS
Inuline clearance (mL/min)	56±12	52±10	NS
Mean BP (torr) (mmHg)	135/85	130/85	NS

Při analýze odebrané tukové tkáně byly zjištěny významné rozdíly mezi obézními (sk. I) a neobézními (sk.II), jak ukazuje tab.č. 8). Z tabulky jsou zřejmé i signifikantní rozdíly mezi viscerálním a subkutánním tukem u adiponektinu a leptinu.

V další analýze celého souboru po transplantaci ledviny jsme zjistili pozitivní korelaci mezi ADMA a BMI (obr.č.1) $r = 0,520$, $p < 0,01$ a negativní korelaci mezi ADN a BMI (obr.č.2, $r = -0,57$, $p < 0,01$). Byla také prokázána pozitivní korelace mezi ADMA v plazmě a ADN ve viscerálním tuku, což je nepochybně velmi významný nález ($r = -0,504$, $p < 0,001$), obr. č.3. Dále byly prokázány pozitivní signifikantní korelace mezi ADMA a homocysteinem (obr.č.4, $r = 0,420$, $p < 0,001$), ADMA a leptinem (obr.č.5, $r = 0,242$, $p < 0,001$) a negativní korelace mezi ADN a leptinem (obr. č. 6, $r = 0,33$, $p < 0,01$). Vztah mezi ADMA a ADN v plazmě nebyl statisticky signifikantní. Rozdíly v hodnotách hs CRP, IL-6, IL-10 a TNF α taktéž nebyly signifikantní.

Tab. č. 8 Vybrané parametry v tukové tkáni v obou souborech

Ratio to HK gen/x 10²	Obese (gr.I)	Non-obese (gr. II)	Statistical significance
Adiponectin visc	23±8	32±10	p < 0.025
Adiponectin sc	27±7	36±11	p < 0.025
Leptin visc	22±6	18±5	p < 0.05
Leptin sc	40±12	24±7	p < 0.01
Resistin visc	0.06±0.81	0.06±0.01	NS
Resistin sc	0.11±0.08	0.075±0.02	p < 0.05

Teoreticky může docházet ke zvýšení ADMA čtyřmi mechanismy. 1) zvýšenou metylací proteinů enzymem PRMT 2) akcentovanou proteolýzou a vznikem preformovaných metylargininů, 3) porušenou renální exkrecí a 4) poruchou metabolismu DDAH (10).

Ke zvýšení ADMA může dojít po hypervolemických stavech jakou jsou srdeční a renální selhání či zvýšený přísun soli. Také hyperkatabolické stavy (např. endotoxemie, hyperparathyreosa či rhabdomyolýza) mají zjištěny zvýšené hodnoty plazmatické ADMA. Porušená renální eliminace vede k retenci a zvýšení hodnot ADMA při snížení funkce ledvin, ale může se také podílet na zvýšení ADMA při hemoragickém či septickém šoku. Zdá se však, že celkově je nejčastějším mechanismem vedoucím k akumulaci ADMA porušený metabolismus DDAH, na kterém se mohou podílet i aktivity proinflamačních cytokinů. NO produkovaný kontinuálně endoteliálními buňkami je základním antiaterogenním faktorem: inhibuje oxidaci LDL, redukuje adhezi monocytů k endoteliím a proliferaci buněk hladké svaloviny či snižuje aktivitu krevních destiček. Naopak ADMA stimuluje řadu procesů spojených s aterosklerózou, zvýšenou adhezivitou monocytů, expresí

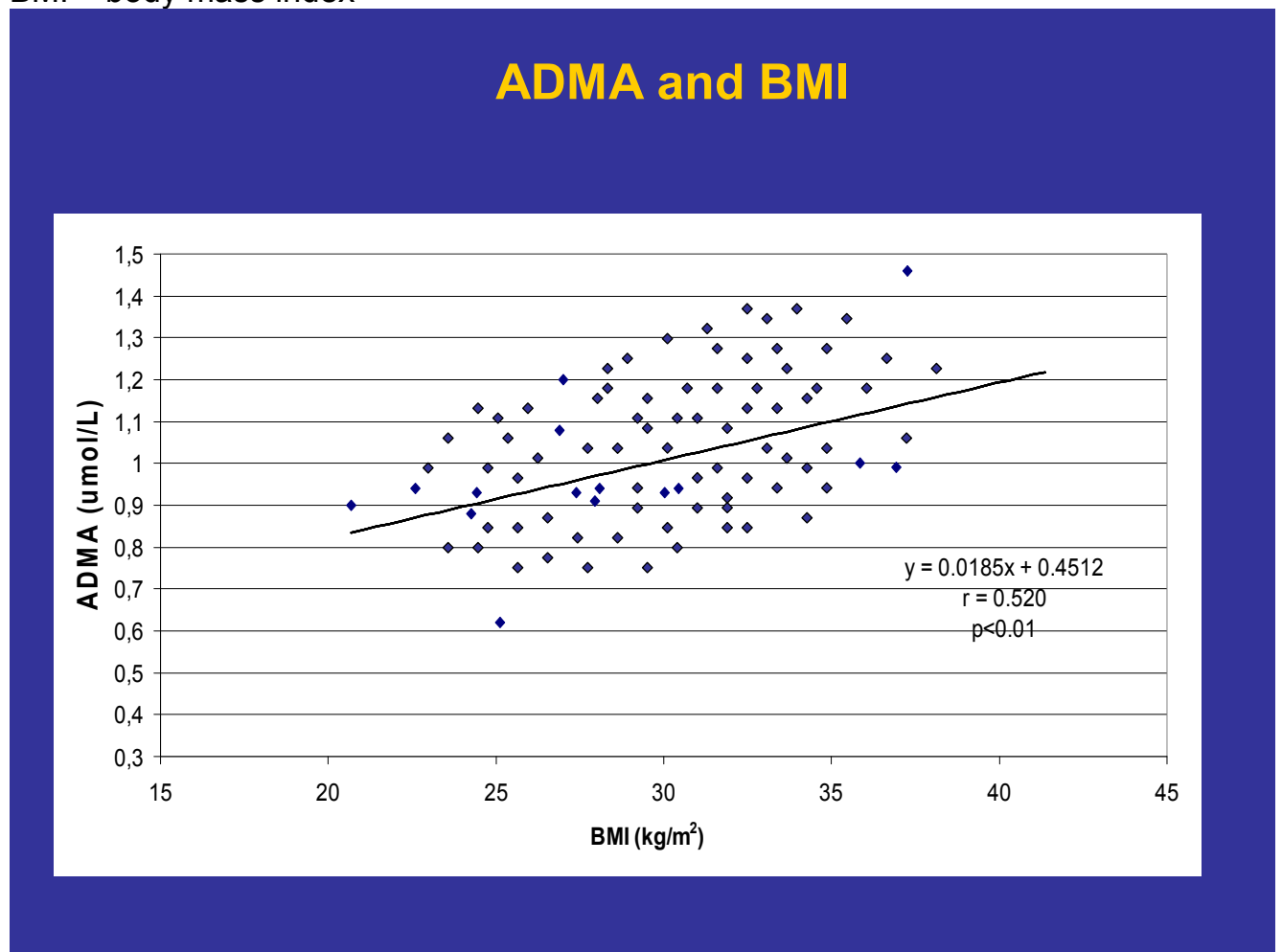
proinflamačních a chemotaktických faktorů, akumulací oxidovaných LDL v makrofázích ap. U nemocných v chronické renální insuficienci je zvýšení ADMA doprovázeno i zvýšením SDMA.

Obr. č. 1 ADMA a BMI u nemocných po transplantaci ledviny

– regresní analýza

ADMA – asymetrický dimethylarginin

BMI – body mass index

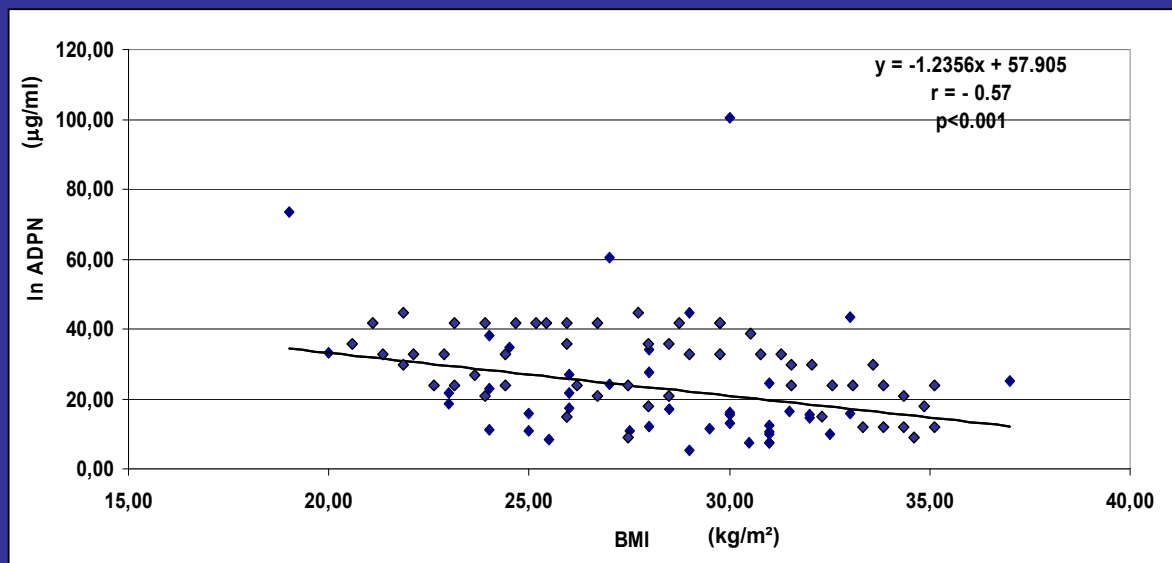


Obr. č.2 ADN a BMI u nemocných po transplantaci

ADN – adiponectin v plazmě

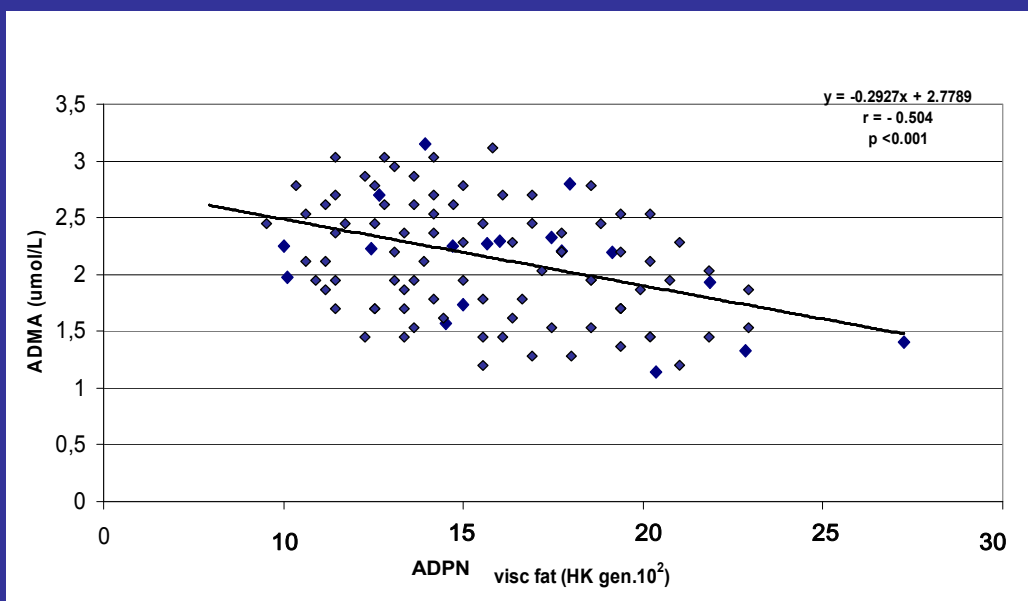
BMI – body mass index

ADN and BMI in renal transplant patients



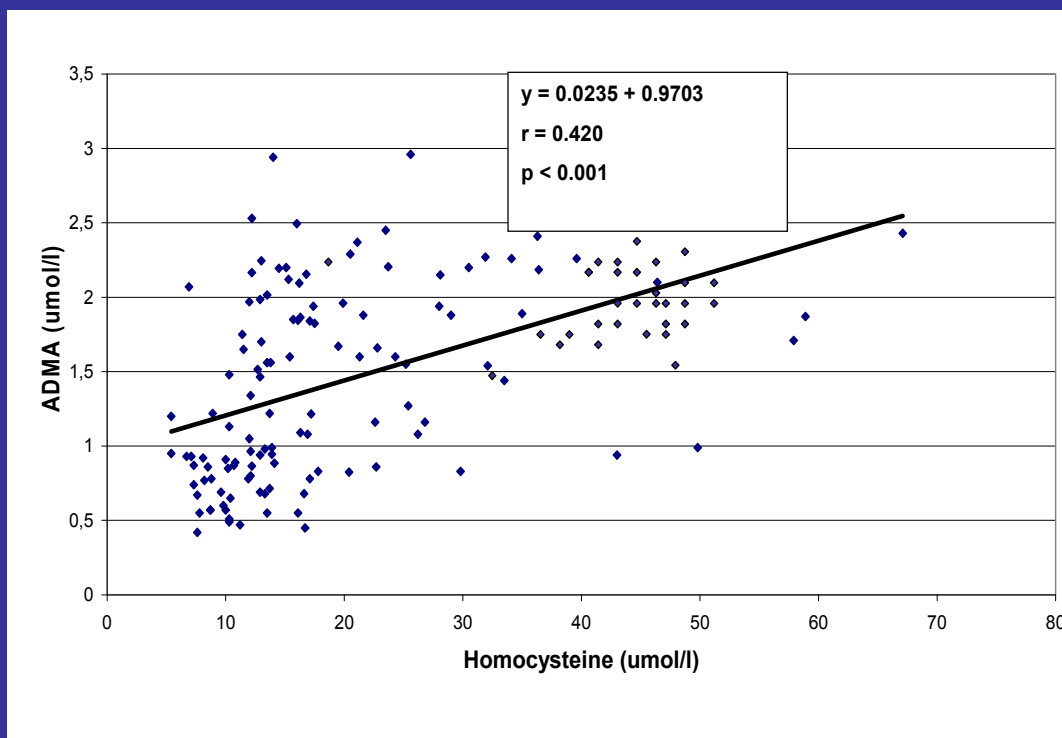
Obr. č. 3 ADMA a ADN ve viscerálním tuku v souboru nemocných po transplantaci ledviny

ADMA and ADN in visceral fat



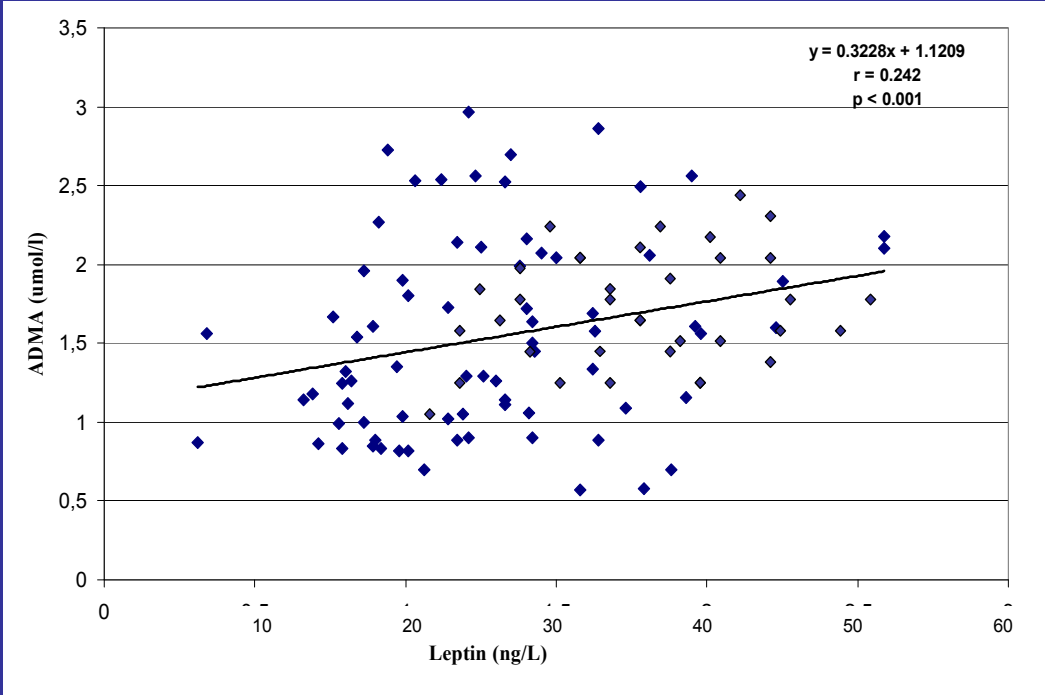
Obr. č. 4 ADMA a celkový homocystein v plazmě u nemocných po transplantaci ledviny

ADMA and Homocysteine

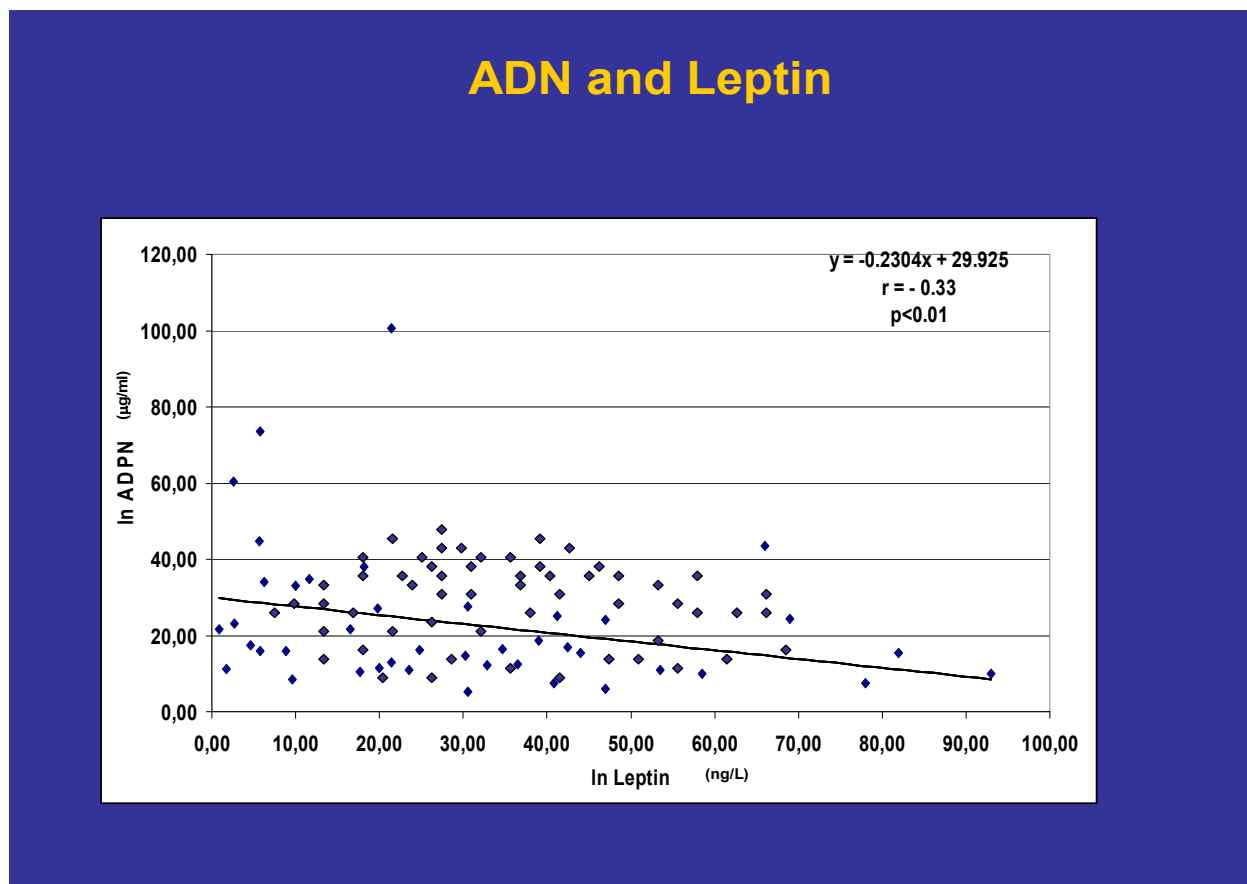


Obr. č. 5 ADMA a leptin u nemocných po transplantaci ledviny

ADMA and Leptin



Obr. č. 6 ADN a leptin u nemocných po transplantaci ledviny



6.5. Hladiny ADMA u nemocných léčených hemodialýzou, hemodiafiltrací a peritoneální dialýzou. Srovnání hladin a eliminace ADMA u jednotlivých metod

Akumulace ADMA u dialyzovaných nemocných souvisí kromě zhoršené renální exkrece též s porušenou enzymatickou degradací ADMA (Tojo et al. 2000). Vysoká hladina ADMA u hemodialyzovaných pravděpodobně souvisí se zhoršením aterosklerózy, jak bylo prokázáno například na karotidách (Zoccali 2002b). Mallamaci doporučuje na základě svých pozorování u 284 HD nemocných začlenit u dialyzovaných osob do diagnostických algoritmů trojici testů a to marker zánětu (CRP), marker funkce levé srdeční komory (natriuretický peptid B) a právě ADMA jako prediktor kardiovaskulárních komplikací (Mallamaci et al. 2005). Přestože převažují práce podporující souvislost ADMA s kardiovaskulární nemocností a úmrtností, výsledky nejsou jednoznačné. Fleck neprokázal souvislost mezi kardiovaskulárními komplikacemi a ADMA u nemocných s renální nedostatečností, u

hemodialyzovaných, ani u osob po transplantaci ledviny (Fleck et al. 2003). Analýza 7 prospektivních studií, které zahrnovaly kolem 1000 HD a 176 PD pacientů nedala jednotné výsledky. ADMA je podle některých prací vyšší u PD než u HD. Tento rozdíl představuje pro PD nemocné vyšší riziko kardiovaskulárních komplikací, a to zhruba o 15%. (Zoccali, 2005). Morimoto naopak zjistil nižší hladiny ADMA u PD nemocných než u HD (Morimoto, 2005). Dále ve své studii zjistil, že HD s polysulfonovou membránou modifikovanou vitaminem E snižuje, na rozdíl od nemodifikované membrány, při dlouhodobém užití predialyzační hladinu ADMA. Jediná studie, která porovnávala efekt HDF a HD na hladinu ADMA, byla provedena s polyamidovou dialyzační membránou a prokázala, že HDF je v eliminaci ADMA efektivnější (Schroder M, 2001). Jaký vliv má na hladinu ADMA dlouhodobá HD a HDF při použití polysulfonových membrán, není známo.

6.5.1. Materiál a metody

Do studie byly zařazeny dvě skupiny nemocných. Bylo to jednak 19 pacientů léčených kontinuální peritoneální dialýzou (CAPD) a dále 16 nemocných z hemodialyzačního střediska FN Plzeň. Polovina z nich byla po dobu 8 týdnů léčena hemodialýzou (HD), druhá polovina byla po stejnou dobu léčena hemodiafiltrací (HDF). Poté byly léčebné procedury mezi skupinami zaměněny a studie pokračovala dalších 8 týdnů. Jako kontrolní skupina bylo zvoleno 20 osob s normální funkcí ledvin (kreatininová clearance vyšší než 1,3 ml/s). Pacienti všech tří skupin (Hemo, CAPD, Controls) byli srovnatelní věkem, pohlavím a BMI. Pouze jeden pacient v kontrolní skupině byl diabetik. V ostatních skupinách byla polovina probandů s diabetes mellitus (**Tab. 9**). Venózní krev byla získána kubitální venepunkcí a do 1 hodiny osběru zamražena na -80 °C až do okamžiku analýzy. U nemocných léčených HD či HDF byla krev odebrána před procedurou a po ní. Pacientům léčeným CPAD byl proveden jeden náběr krve. V průběhu HD či HDF byl sbírán dialyzát a koncentrace ADMA byla měřena ve dvou fázích: v dialyzátu za prvních 15 minut, kdy jsme očekávali vyšší koncentraci ADMA, a v dialyzátu sbíraném kontinuálně po celou čtyřhodinovou HD (HDF). Koncentrace v dialyzátu za celou proceduru byla vzata za podklad pro výpočet odpadu ADMA během očišťovací procedury. U nemocných léčených peritoneální dialýzou byla koncentrace ADMA měřena v dialyzátu vypuštěném z peritoneální dutiny. Protože HD i HDF probíhají třikrát týdně, zatímco CAPD je kontinuální procedura, byl odpad ADMA přepočten na jeden den, aby bylo umožněno srovnání jednotlivých metod.

Koncentrace ADMA byla měřena imunometricky (kit ADMA® ELISA, DLD

Diagnostika GmbH, Hamburg, Germany) AUTO-EIA II microplate reader (Labsystems Oy, Espoo, Finland), homocysteine enzymatickou metodou (Carolina, Brea, CA, USA). Koncentrace ADMA v dialyzátu byla změřena po zahuštění na rotačním vakuovém koncentrátoru RVC 2-18 (Christ, Osterode, Germany) pro získání měřitelné koncentrace analytu. Dialyzáty byly zkoncentrovány 10 – 20krát po dobu 3 až 6 hodin za teploty 60°C. AGE byly změřeny fluorescenčně a AOPP fotometricky [Kalousova *et al.*, 2002].

Pro statistické výpočty byl použit program R 2.2.0 [R Development Core Team, 2005]. Data jsou vyjádřena jako medián (interkvartilové rozpětí). Dále byl použit párový a nepárový Wilcoxonův test, pro porovnání dvou a více proměnných (mezi HEMO, CAPD a kontrolní skupinou) ANOVA a TukeyHSD testy. **For count data comparisons Fisher's exact test was used.** Vztah mezi jednotlivými naměřenými hodnotami byl vyjádřen Spearmanovým korelačním koeficientem.

Tabulka č. 9 Základní charakteristika studované populace

	Hemo (n = 16)	CAPD (n = 19)	Controls (n = 20)
<i>age (years)</i>	69 (62.25 to 72.5)	66 (60 to 73)	67 (59.75 to 72)
<i>sex (male/female)</i>	8/8	13/6	8/12
<i>diabetes</i>	5	10	1
<i>BMI (kg/m²)</i>	26.07 (24.93 to 28.13)	25.82 (23.43 to 28.74)	25.32 (23.37 to 27.52)
<i>diuresis (ml/24 hrs)</i>	128.5 (0 to 558)	1100 (625 to 1450)	2100 (1812.5 to 2650)
<i>RRF (ml/s)</i>	0.01 (0 to 0.03) ^{***}	0.11 (0.05 to 0.15) ^{***}	2.02 (1.69 to 2.31)
<i>days of treatment</i>	1731 (744 to 2453) ^{##}	800 (266 to 1267.5)	
<i>erythropoietin dose (units/week)</i>	5000 (2018.75 to 10500) ^{##}	0 (0 to 3000)	
<i>ACEI (count [percent])</i>	8 [50 %] ^{***}	13 [68.4 %] ^{***}	1 [5 %]
<i>ARB (count [percent])</i>	2 [12.5 %]	3 [15.8 %]	3 [15 %]
<i>statins (count [percent])</i>	6 [37.5 %] ^{***, #}	13 [68.4 %] ^{***}	2 [10 %]

* statisticky signifikantně odlišné od kontrol (p<0.001)

#, ## statisticky signifikantně odlišné od kontrol CAPD (p<0.05, p<0.01 resp.)

6.5.2. Výsledky

We observed a significant decrease of ADMA concentration after HD ($p < 0.001$, CI = 0.34 to 0.79) and HDF ($p < 0.001$, CI = 0.38 to 0.64; Table 2). Similar decrease was in homocysteine concentrations (HD: $p < 0.001$, CI = 9.9 to 16.5; HDF: $p < 0.001$, CI = 10.2 to 17.4) and an increase was in AOPP (HD: $p < 0.01$, CI = 6.94 to 25.18; HDF: $p < 0.01$, CI = 6.4 to 27.8). We weren't able to detect any changes in concentrations of ADMA, homocysteine, AGE and AOPP after 8 weeks of either HD or HDF treatment. There were also no significant differences in ADMA, Hcy, AGE and AOPP values between HD and HDF procedures in each measure point (before, after, 8 weeks).

Tabulka č. 10 Changes before and after HF or HDF and after 8 weeks of HF or HDF treatment. Values of AGE and AOPP after blood purification procedure were adjusted for protein change before and after HD or HDF.

	HD (n = 16)			HDF (n = 16)		
	before	after	8 weeks	before	after	8 weeks
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	1.25 (0.97 to 1.33)	0.66 *** (0.57 to 0.73)	1.21 (1.02 to 1.4)	1.26 (0.98 to 1.39)	0.64 *** (0.54 to 0.8)	1.25 (1.14 to 1.33)
Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	28 (23.03 to 39.08)	13.78 *** (12 to 19.84)	28.1 (21.8 to 33.18)	32.1 (24.73 to 35.9)	14.46 *** (13.57 to 16.14)	23.9 (20.1 to 31.22)
AGE (FU/g)	8.88 (7.86 to 10.36)	9.68 (8.6 to 10.8)	9.39 (8.08 to 11.19)	9.18 (7.79 to 10.22)	9.74 (7.87 to 11.09)	9.82 (7.88 to 10.4)
AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	61.3 (54.68 to 71.28)	76.99 ** (62.69 to 94.59)	66.35 (61.48 to 74.2)	63.4 (61.4 to 67.55)	77.2 ** (69.2 to 95.34)	61.5 (51.35 to 67.32)

*, **, *** - statistically significantly different from predialysis values ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ resp.)

Controls showed lower values of ADMA ($p < 0.01$, CI = 0.14 to 0.66), homocysteine ($p < 0.001$, 16.5 to 20.9), AGE ($p < 0.001$, CI = 4.17 to 6.17) and AOPP ($p < 0.001$, 13.6 to 37.7) in comparison with hemodialyzed patients before the study start (**Tab. 11**). Similarly, when compared to peritoneally dialyzed patients, controls indicated insignificantly lower concentrations of ADMA ($p = 0.26$), significantly lower levels of homocysteine ($p < 0.001$, CI = 6.9 to 20.6), AGE ($p < 0.001$, CI = 2.4 to 4.3) and AOPP ($p < 0.001$, 17.2 to 40.3).

Peritoneally dialyzed patients, compared to hemodialyzed patients before the study start, had insignificantly lower concentrations of ADMA ($p = 0.09$, CI = -0.03 to 0.50), significantly lower levels of homocysteine ($p < 0.01$, CI = 2.7 to 17.2) and AGE ($p < 0.001$, CI = 0.78 to 2.8).

The highest net daily excretion of ADMA to dialysates was in HD and HDF groups (with no significant difference between them, Tab. 12), whereas the CAPD group showed significantly lower excretion to dialysates (in comparison with HD + HDF groups, $p < 0.001$, Tab. 12).

Tabulka č. 11 Rozdíly mezi jednotlivými skupinami probandů před začátkem studie.

	Hemo before (n = 16)	CAPD (n = 19)	Controls (n = 20)
<i>ADMA (μmol/l)</i>	1.26 †† (1.01 to 1.45)	0.96 (0.88 to 1.28)	0.89 (0.77 to 0.98)
<i>Homocysteine (μmol/l)</i>	33.4 ††† (27.15 to 39.93)	21.8 ** (17.7 to 27.35)	11.45 (9.65 to 13.6) §§§
<i>Hemoglobin (g/l)</i>	114 (108.75 to 119.75) †††	114 (105 to 127)	139 (132 to 144.25) §§§
<i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	4.64 (4.27 to 4.89)	4.4 (3.73 to 4.89)	5.12 (4.46 to 5.9)
<i>AGE (FU/g)</i>	2.53 ††† (2.02 to 2.7)	1.89 *** (1.74 to 2.23)	0.86 (0.77 to 0.96) §§§
<i>AOPP (μmol/l)</i>	62 ††† (57.4 to 65.45)	69.7 (61.2 to 72.75)	36.7 (32.87 to 43.45) §§§

, * - statistically significantly different from hemo values ($p < 0.01$, $p < 0.001$ resp.)

††, ††† - statistically significantly different from controls ($p < 0.01$, $p < 0.001$ resp.)

§§§ - statistically significantly different from CAPD ($p < 0.001$)

Tabulka č. 12 Hodnoty koncentrace ADMA v dialyzátu

	HD		HDF		CAPD
	15 min (n=15)	total (n=16)	15 min (n=15)	total (n=14)	total (n=19)
<i>ADMA (μmol/l)</i>	0.163 (0.130 to 0.208)	0.131 (0.104 to 0.150)	0.213 (0.167 to 0.246)	0.135 (0.87 to 0.145)	0.330 (0.240 to 0.406)
<i>ADMA excretion (μmol)</i>		17.3 (14.3 to 20.5)		17.3 (11.6 to 19.2)	2.1 (1.2 to 2.2)
<i>ADMA excretion (μmol/day)</i>		7.4 (6.1 to 8.8)		7.4 (4.9 to 8.2)	2.1 (1.2 to 2.2)***

*** - statistically significantly lower than HD and HDF values together ($p < 0.001$)

7. Závěry a doporučení

7.1. Zavedení metody detekce ADMA

7.2. ADMA a homocystein u hemodialyzovaných nemocných

7.3. ADMA a prognóza nemocných léčených hemodialýzou. Srovnání s dalšími rizikovými faktory celkové úmrtnosti.

Tato studie porovnávala koncentrace ADMA, homocysteinu, albuminu, CRP, BNP a troponinu I jako prediktivních faktorů celkové mortality ve skupině HD nemocných. Jedná se o průběžné výsledky po 1 roce a 5 měsících sledování naší studijní populace. Z výsledků plyne, že ADMA ve srovnání s ostatními faktory plní pouze podružnou roli. K tomuto závěru jsme dospěli na základě porovnání hodnot ADMA u přeživších [1,14 (0,98-1,31) $\mu\text{mol/l}$] a zemřelých [1,16 (1,02-1,27) $\mu\text{mol/l}$] HD nemocných. Mediány těchto hodnot jsou téměř stejné a z klinického hlediska prakticky nerozlišitelné. Ze sledovaných parametrů se jako statisticky významné prediktory přežití jeví hladiny albuminu, CRP a troponinu I. Koncentrace u přeživších a zemřelých HD nemocných byly následující: albumin 38,9 (36,5-41,1) g/l a 35,4 (30,3-38,4) g/l; CRP 5,22 (2,03-15,3) mg/l a 15,7 (5,99-35,52) mg/l; troponin I 0,02 (0,001-0,03) $\mu\text{g/l}$ a 0,04 (0,01-0,06) $\mu\text{g/l}$. Praktická klinická významnost měření těchto parametrů jako prediktorů přežití u HD nemocných bude předmětem dalších analýz.

7.4. ADMA u obézních osob po transplantaci ledviny a vztah k hladinám adipocytokinů

Výzkum v problematice ADMA probíhá již téměř 15 let nicméně, zvláště u nemocných v renální insuficienci není zcela jasné, zda ADMA je pouze retenčním produktem při snížené renální funkci a tedy jeho metabolizaci, či je přímo uremickým toxinem ovlivňujícím rozvoj kardiovaskulárních komplikací.

Studie u nemocných po transplantaci ledviny ukázaly, že s rozvojem renální funkce původně velmi zvýšená hladina ADMA klesá, ale při výborné funkci transplantované ledviny zůstává 2-3x vyšší než u zdravých jedinců. (Podobné nálezy zjišťujeme i u některých dalších adipocytokinů, jako je leptin či adiponectin a u homocysteinu). Nepochybně zde tedy hrají roli další ne dosud objasněné faktory jako je např. inzulinorezistence, hypertenze, obezita a pravděpodobně též užívání imunosupresivních léků. Také samotné stanovení ADMA v plasmě neodpovídá jeho koncentraci v buňkách a významnou roli hraje i přísun či rozpad proteinů (arginin). Výsledky naší studie u obezních nemocných po transplantaci ledviny prokázaly rozdíly mezi markery endotheliální dysfunkce ve srovnání se skupinou neobezních nemocných, a to i při současném vlivu imunosuprese. Významné změny byly především zachyceny při analýze tukové tkáně, která by mohla sloužit již bezprostředně po transplantaci jako možný prediktor rozvoje či nerozvoje rizikové obezity. Velmi významná je pozitivní korelace mezi ADMA a BMI při současné negativní korelaci mezi ADN a BMI. Při analýze v našem souboru nemocných nebyla prokázána přímá korelace mezi ADMA a ADN v plasmě. Velmi významný je však nález negativní korelace mezi ADMA v plasmě a ADN ve viscerálním tuku. Význam stanovení ADMA umožňuje i prokázání pozitivní korelace mezi ADMA a leptinem a ADMA a homocysteinem, zatímco mezi ADN a leptinem byla korelace negativní. Z našich nálezů je zřejmé, že metabolický syndrom spojený s obezitou představuje po transplantaci ledviny významný rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních komplikací. Je spojen se zvýšenými hodnotami ADMA, leptinu, homocysteinu a rezistinu a současně sníženou hodnotou ADN. Za velmi významné lze považovat signifikantní vztah mezi hodnotou ADMA a ADN ve viscerální tukové tkáni, neboť bezprostřední analýza tukové tkáně odebrané v čase operace by umožňovala především rozvoj rizikové viscerální obezity a metabolického syndromu.

Výsledky naší studie mají zatím své limity dané velikostí souboru a ne zcela identickým, schématem imunosupresivní léčby. Nelze tak odlišit ev. možné rozdíly v metabolickém vlivu cyklosporinu A a takrolimu, Naproti tomu,

dlouhodobé monitorování příjmu energie a proteinů v potravě potvrdilo vyšší přísun u obezních nemocných.

7.5. ADMA u nemocných léčených hemodialýzou, hemodiafiltrací a peritoneální dialýzou.

Although the aim of this study was not to assess causes for differences in ADMA levels between Hemo and CAPD patients, we made an attempt to understand this difference. We used a stepwise backward algorithm for a linear regression model with ADMA as dependent variable and age, sex, BMI, diabetes, total cholesterol, weekly erythropoietin dose, hemoglobin and homocysteine concentrations, residual renal function, statins use and type of renal replacement treatment (Hemo or CAPD) as independent variables. The resulting model is summarized in Table 4. It seems that the strongest predictor of ADMA values is presence of diabetes, followed by RRT type, statins use and BMI. However, this model should be interpreted cautiously due to small number of patients and design of the study.

8. Souhrn

9. Summary

poděkování

Literatura

Příloha – seznam publikovaných prací, přednášek a posterových sdělení

a) Publikace v časopisech s IF (full text)

1. Šídová-Široká R., Stránský K., Kasal A., Slavíková B., Kohout L.: **Long-range effect of 17-substituents in 3-oxosteroids on 4,5-double bond hydrogenation.** [Collect. Czech. Chem. C.](#) 1998, 68(10), p.1528 – 1542 (IF 0,545)
2. Chodounská H., Buděšínský M., Šídová-Široká R., Kasal A., Kohout L.: **Simple NMR determination of 5 α /5 β configuration of 3-oxosteroids.** [Collect. Czech. Chem. C.](#) 2001, 66(10), p.1529 – 1544 (IF 0,778)
3. Stránský K., Šídová-Široká R., Kohout L.: **Gas Chromatography of Esters of Dihydrotestosterone and Dihydroepitestosterone,** HRC-J. High Res. Chrom. 1998, 21(7), p. 417 – 420 (IF 1,570)

od roku 2003:

4. Siroka R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusnakova H., Cibulka R., Eiselt J., Filipovsky J.: **Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function – is there a relation?** Clin. Chem. Lab. Med., 2005, 43(10): 1147-1150. (IF 1,918, r. 2005)
5. Cibulka R, Siroka R, Trefil L, Racek J, Vesela E.: **Measurement of carnitine in hemodialysis patients – adaptation of an enzymatic photometric method for an automatic analyzer.** Clin. Chem. Lab. Med., 2006; 44(8):.983-986. (IF 1,918, r. 2005)
6. Široká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Cibulka R.: **Asymmetric dimethylarginine – comparison of chromatography and immunometric methods.** J. Chromatography B, 850, 2007: 586-587 (IF 2,391, r. 2005)

b) Publikace v časopisech bez IF (full text)

7. Široká R., Racek J., Filipovský, J. **Asymetrický dimethylarginin (ADMA).** Klin. Biochem. Metab, 2005, 13(3): 131-134.
8. Široká R., Cibulka R., Rajdl D., Racek J. **Asymetrický dimethylarginin**

– **nový rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění.** Vnitř. Lék., 2006, 52(3): 167 – 173.

9. Šíroká R., Trefil L., Racek J., Cibulka R.: **Comparison of asymmetric dimethylarginine detection – HPLC and ELISA methods (technical brief).** Klin. Biochem. Metab., 2006, 14(2): 111-113
10. Teplan V., Schüick O., Racek J., Šíroká R., Kudla M., Haluzík M., Štollová M., Vítko Š.: **Metabolický syndrom po transplantaci ledviny: asymetrický dimethylarginin a adipocytokiny.** Aktuality v nefrologii, 12(3), 2006: 79-84
11. Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J., Trefil L., Eiselt J.: **Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in haemodialysis patients.** Klin. Biochem. Metab., 2007, 15(1): 39-42

c) **Abstrakta posterů**

1. Siroka R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusnakova H. and Eiselt J.: Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and kidney fuction – is there a relation? Clin. Chem. Lab. Med, 2005, 43: A31, 4th Conference on Hyperhomocysteinemia, 14. – 16. 4. 2005 Saarbruecken (Germany)
2. Siroka R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Eiselt J. and Filipovsky J.: Asymmetric dimethylarginine – comparison of HPLC and ELISA method. Clin. Chem. Lab. Med., 2005, 43: A32, 4th Conference on Hyperhomocysteinemia, 14. – 16 .4. 2005 Saarbruecken (Germany)
3. Racek J., Siroka R., Trefil L., Rajdl D., Rusnakova H.: Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and kidney fuction – is there a relation? Clin. Chim. Acta, 2005, 355: S103, 16th IFCC – FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine – EUROMEDLAB, 8. – 12. 5. 2005, Glasgow (UK)
4. Siroka R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusnakova H., Eiselt J.: Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and kidney fuction – is there a relation? VII. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, 11. – 13. 9. 2005, Olomouc
5. Hromádka M., Šíroká R., Filipovský J., Mayer O. jr., Racek J., Cífková R., Kučerová J., Dolejšová M.: Asymetrický dimethylarginin – nový

rizikový faktor aterosklerózy? 22. konference České společnosti pro hypertenzi, Český Krumlov 6. – 8. 10 2005

6. Teplan V., Racek J., Šíroká R., Štollová M., Hanzal V. and Czech Keto Group: Asymmetric Dimethylarginine in Chronic Renal Failure Patients with metabolit Syndrome: Long-Term Keto Acids study. Nutrition and metabolism in Renal Disease, 2006, XIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease, Merida (Mexico), 28. 2. – 4. 3. 2006
7. Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients. XX. biochemický zjazd, 12.-16.9.2006, Piešťany, SR
8. Šíroká R., Trefil L., Racek J., Cibulka R.: Comparison of asymmetric dimethylarginine detection – HPLC and ELISA methods. XX. biochemický zjazd, 12.-16.9.2006, Piešťany, SR
9. Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Cibulka R. Asymmetric dimethylarginine – Comparison of chromatographic and immunometric methods, XVI. International Symposium of Atherosclerosis, Řím, Itálie, 18. – 22.6. 2006, International conference of Chromatography, Kodaň, Dánsko, 21. – 23.8. 2006
10. Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J., Trefil L., Eiselt J. Asymmetric dimethylarginine as a novel independent risk factor for cardiovascular disease in haemodialysis patients, XVI. International Symposium of Atherosclerosis, Řím, Itálie, 18. – 22.6. 2006
11. Teplan V., Racek J., Šíroká R., Kudla M., Haluzík M., Štollová M., Vítko Š.: Zvýšený asymetrický dimetylarginin u obézních pacientů po transplantaci ledviny. Vnitř. Lék., 52, 2006, č. 12, s. 1230. X. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 7. – 9. 12. 2006
12. Cibulka R., Rajdl D., Šíroká R., Eiselt J., Malánová L., Trefil L., Racek J.: Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients. 17th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Euromedlab), Amsterdam (The Netherlands), 3. – 7. 6. 2007 (přijátý poster)

13. Malánová L., Racek J., Šíroká R., Rajdl D., Cibulka R., Trefil L., Eiselt J., Veselá E.: Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients. XLIV. ERA-EDTA Congress, Barcelona (Spain), 21. – 24. 6. 2007 (přijatý poster)
14. Racek J., Eiselt J., Malánová L., Rajdl D., Šíroká R., Cibulka R., Trefil L.: Asymmetric dimethylarginine as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients. AACC Annual Meeting, San Diego (CA, USA), 15. – 19. 7. 2007 (přijatý poster)

d) Abstrakta přednášek

1. Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Eiselt J.: **Asymetrický dimethylarginin (ADMA), homocystein a funkce ledvin.** Plzeň 19. 5. 2005, 45. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni. Sborník abstrakt s. 31
2. Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Eiselt J.: **Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and kidney function – is there a relation?** Atherosklerosa 2005, Praha 14. – 16. 9. 2005. Sborník abstrakt s. 114-116 Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Eiselt J.: **Asymetrický dimethylarginin (ADMA),** 46. studentská vědecká konference, 11.5. 2006, Plzeň, ČR
3. Šíroká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Eiselt J., **ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ (ADMA) - NEZÁVISLÝ RIZIKOVÝ FAKTOR ATEROSKLERÓZY U HEMODIALYZOVANÝCH PACIENTŮ?** Atherosklerosa 2006, Praha 13.9. 2006.
4. Cibulka R., Šíroká R., Rajdl D., Racek J., Trefil L., Eiselt J., Rubášová L., Schejbalová M., Michálková R.: **Asymetrický dimethylarginin u hemodialyzovaných nemocných.** Sympozium klinické biochemie FONS, 17.-19.9.2006, Pardubice, ČR
5. Racek J., **Asymetrický dimethylarginin jako nový nezávislý faktor přežití u hemodialyzovaných nemocných.** VIII. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, České Budějovice, 23. – 25. 9. 2007
6. Racek J., Rajdl D., Eiselt J., Šíroká R., Cibulka R., Malánová L., Trefil L.: **Asymetrický dimethylarginin jako nový nezávislý faktor přežití u**

hemodialyzovaných nemocných. 28. imunoanalytické dny, České Budějovice, 1. – 3. 4. 2007

7. Široká R ,Racek J., Rajdl D., Eiselt J., Cibulka R., Malánová L., Trefil L.:
Asymetrický dimethylarginin (ADMA) – nový nezávislý faktor přežití nemocných léčených hemodialýzou, 47. studentská vědecká konference, 23.5. 2007, Plzeň, ČR
8. Racek J., Rajdl D., Eiselt J., Široká R., Cibulka R., Malánová L., Trefil L.:
Asymetrický dimethylarginin (ADMA) – nový nezávislý faktor přežití nemocných léčených hemodialýzou. 28. imunoanalytické dny, České Budějovice, 1. – 3. 4. 2007. Sborník abstrakt s. 22

e) Grantové projekty (hlavní řešitelka)

Široká R., Racek J., Cibulka R., Rajdl D., Eiselt J., Mukenšabl P.: **Asymetrický dimethylarginin – vztah k dalším rizikovým faktorům aterosklerózy a prognóza u hemodialyzovaných pacientů.** Grant GAUK 78/2005/C/LFP, r. 2005 – 06

Souhlas se zapůjčením dizertační práce

Tímto souhlasím se zapůjčováním dizertační práce

Mgr. Romana Široká

Literatura

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS: Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus.. *Am J Cardiol* **2001**, 88: 1201-1203.

Achan V, Tran CTL, Arrigoni F, Whitley GSJ, Leiper JM, Vallance P: all-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase.. *Circ Res* **2002**, 90: 764-769.

Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, Obayashi S: Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells.. *Br J Pharmacol* **1995**, 115: 1001-1004.

Boger RH, Lenzen H, Hanefeld C et al.: Asymmetric dimethylarginine: an endogenous inhibitor of NO synthase is a predictor of the risk for coronary heart disease - Result of multicentre CARDIAC study . *Circulation* **2003**, 108: IV-25652.

Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P: Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases?. *Am J Physiol* **1995**, 269: C750-6.

Busch M, Fleck C, Wolf G, Stein G: Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology?. *Amino Acids* **2006**, 30: 225-232.

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia.. *Circulation* **1998**, 98: 1842-1847.

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC: Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease.. *J Am Coll Cardiol* **1998**, 32: 1336-1344.

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease.. *Circulation* **1997**, 95: 2068-2074.

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-

Böger SM: LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases.. *Circ Res* **2000**, 87: 99-105.

Böger RH, Zoccali C: ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease.. *Atheroscler Suppl* **2003**, 4: 23-28.

Ceremuzyński L, Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K: Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris.. *Am J Cardiol* **1997**, 80: 331-333.

Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE: Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension.. *Am J Hypertens* **2002**, 15: 590-593.

Dobashi Y, Santa T, Nakagomi K, Imai K: An automated analyzer for methylated arginines in rat plasma by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence reaction.. *Analyst* **2002**, 127: 54-59.

Faraci FM, Brian JEJ, Heistad DD: Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase.. *Am J Physiol* **1995**, 269: H1522-7.

Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ: Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes.. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20: 2039-2044.

Goonasekera CD, Shah V, Rees DD, Dillon MJ: Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma?. *Blood Press* **2000**, 9: 16-21.

Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE: Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension.. *J Cardiovasc Pharmacol* **2001**, 37: 489-492.

Hermenegildo C, Medina P, Peiró M, Segarra G, Vila JM, Ortega J, Lluch S: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients.. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87: 5636-5640.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS: Plasma concentrations of

asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia.. *Am J Obstet Gynecol* **1998**, 178: 551-556.

Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS: Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects.. *Br J Nutr* **2003**, 89: 359-363.

Hornig B, Arakawa N, Böger RH et al: Plasma levels of ADMA are increased and inversely related to endothelium-mediated vasodilatation in patients with chronic heart failure: a new predictor of endothelial dysfunction?. *Circulation* **1998**, 98(Suppl.): I-318.

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A: Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus.. *Circ J* **2002**, 66: 811-815.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP: Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase.. *Circulation* **1999**, 99: 3092-3095.

Jiang J, Jiang D, Tang Y, Li N, Deng H, Li Y: Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor.. *Acta Pharmacol Sin* **2004**, 25: 893-901.

Kalousova M, Zima T, Tesar V, Skrha J, Stipek S: Estimation of advanced glycation end products and advanced oxidation protein products;[Stanoveni produktu pokrocile glykace a oxidace]. *Klinicka Biochemie a Metabolismus* **2002**, 10: 11-16.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC: Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease.. *J Am Soc Nephrol* **1999**, 10: 594-600.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Kopp H, Wolzt M, Schernthaner G: Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women.. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89: 6277-6281.

Kumagai H, Sakurai M, Takita T, Maruyama Y, Uno S, Ikegaya N, Kato A, Hishida A: Association of homocysteine and asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis and cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients.. *Am J Kidney Dis* **2006**, 48: 797-805.

Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN: Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules.. *Am J Physiol* **1995**, 268: H2224-31.

Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P: S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase.. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99: 13527-13532.

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P: Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases.. *Biochem J* **1999**, 343 Pt 1: 209-214.

Lu T, Ding Y, Leu H, Yin W, Sheu WH, Chu K: Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia.. *Am J Cardiol* **2004**, 94: 157-161.

Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P: Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine.. *J Am Coll Cardiol* **2001**, 38: 111-116.

MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS, Vallance P: Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis.. *Br J Pharmacol* **1994**, 112: 43-48.

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.. *Br J Pharmacol* **1996**, 119: 1533-1540.

Maxwell AJ, Anderson BE, Cooke JP: Nutritional therapy for peripheral arterial disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial of HeartBar.. *Vasc Med* **2000**, 5: 11-19.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM: The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA).. *Clin Nutr* **2003**, 22: 17-22.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MPC, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM: Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality.. *Clin Nutr* **2003**, 22: 23-30.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K: Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats.. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**, 148: 671-677.

Pi J, Kumagai Y, Sun G, Shimojo N: Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography.. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2000**, 742: 199-203.

R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing.. **2005**, : .

R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. **2006**, : .

Racek J. HV: Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy* **1999**, 93: 774 - 780.

Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure.. *Circulation* **1996**, 93: 2135-2141.

Saran R, Novak JE, Desai A, Abdulhayoglu E, Warren JS, Bustami R, Handelman GJ, Barbato D, Weitzel W, D'Alecy LG, Rajagopalan S.: Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study.. *Nephrol Dial Transplant*. **2003**, 18: 2415-2420.

Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides KH: Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia.. *Lancet* **2003**, 361: 1511-1517.

Siroká R, Cibulka R, Rajdl D, Racek J: [Asymmetric dimethylarginine--a novel cardiovascular risk factor]. *Vnitr Lek* **2006**, 52: 249-255.

Siroká R, Trefil L, Rajdl D, Racek J, Rusnáková H, Cibulka R, Eiselt J, Filipovský J: Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function--is there a relation?. *Clin Chem Lab Med* **2005**, 43: 1147-1150.

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS: Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor.. *JAMA* **2002**, 287: 1420-1426.

Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP: Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine.. *Circulation* **2001**, 104: 2569-2575.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC: Effects of acute euglycemic hyperinsulinemia on urinary nitrite/nitrate excretion and plasma endothelin-1 levels in men with essential

hypertension and normotensive controls.. *Metabolism* **1999**, 48: 887-891.

Sydow K, Hornig B, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Münzel T, Böger RH: Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA.. *Vasc Med* **2004**, 9: 93-101.

Sydow K, Münzel T: ADMA and oxidative stress.. *Atheroscler Suppl* **2003**, 4: 41-51.

Teerlink T: Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance.. *Clin Chem Lab Med* **2005**, 43: 1130-1138.

Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PAM: Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography.. *Anal Biochem* **2002**, 303: 131-137.

Tousoulis D, Davies GJ, Tentolouris C, Crake T, Goumas G, Stefanadis C, Toutouzas P: Effects of L-arginine on flow mediated dilatation induced by atrial pacing in diseased epicardial coronary arteries.. *Heart* **2003**, 89: 531-534.

Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frölich JC: Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF₂α in end-stage liver disease.. *Hepatology* **2003**, 38: 1063-1064.

Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure.. *Life Sci* **1998**, 62: 2425-2430.

Valkonen V, Laakso J, Päivä H, Lehtimäki T, Lakka TA, Isomustajärvi M, Ruukonen I, Salonen JT, Laaksonen R: Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels?. *Atheroscler Suppl* **2003**, 4: 19-22.

Vetrovsky P, Stoclet JC, Entlicher G: Possible mechanism of nitric oxide production from N(G)-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion.. *Int J Biochem Cell Biol* **1996**, 28: 1311-1318.

Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG: Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2000**, 748: 157-166.

Yoo JH, Lee SC: Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke.. *Atherosclerosis* **2001**, 158: 425-430.

Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R: Plasma concentration of

asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study.. *Lancet* **2001**, 358: 2113-2117.

Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Böger R: Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients.. *Kidney Int* **2002**, 62: 339-345.

Široká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H. a Eiselt J.: Asymetrický dimethylarginin, homocystein a funkce ledvin.. *Klin.Biochem.Metab.* **2005**, 13: 184-186.