

. V současné době je ateroskleróza považována 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 NH_2 skupiny a vylučováním močoviny

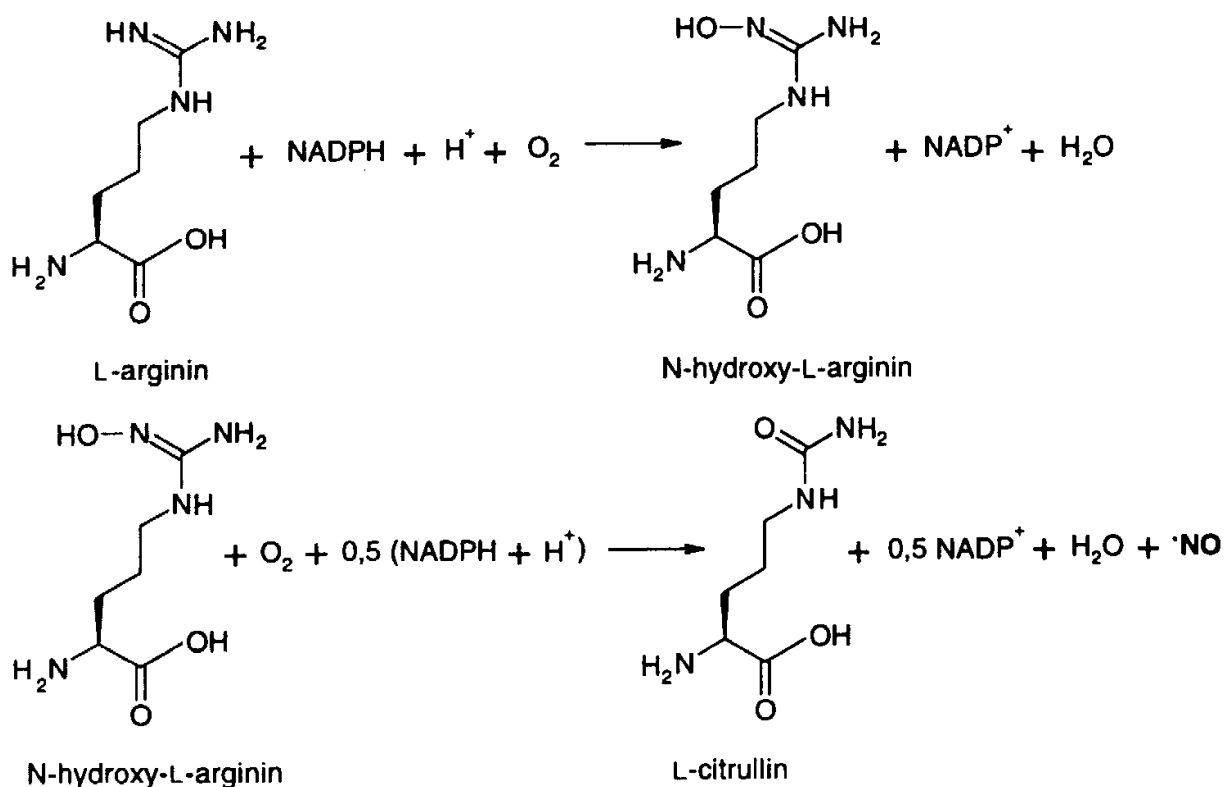
Jestliže je L-arginin přítomen v množství, které přesahuje metabolické potřeby, je jeho uhlíkový řetězec katabolizován na amfibolické intermediáty nebo na substráty sloužící k biosyntéze sacharidů a lipidů. Nejčastější počáteční reakcí jeho katabolismu je odstranění alfa-aminodusíku transaminací. V následujících 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 syntáza 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

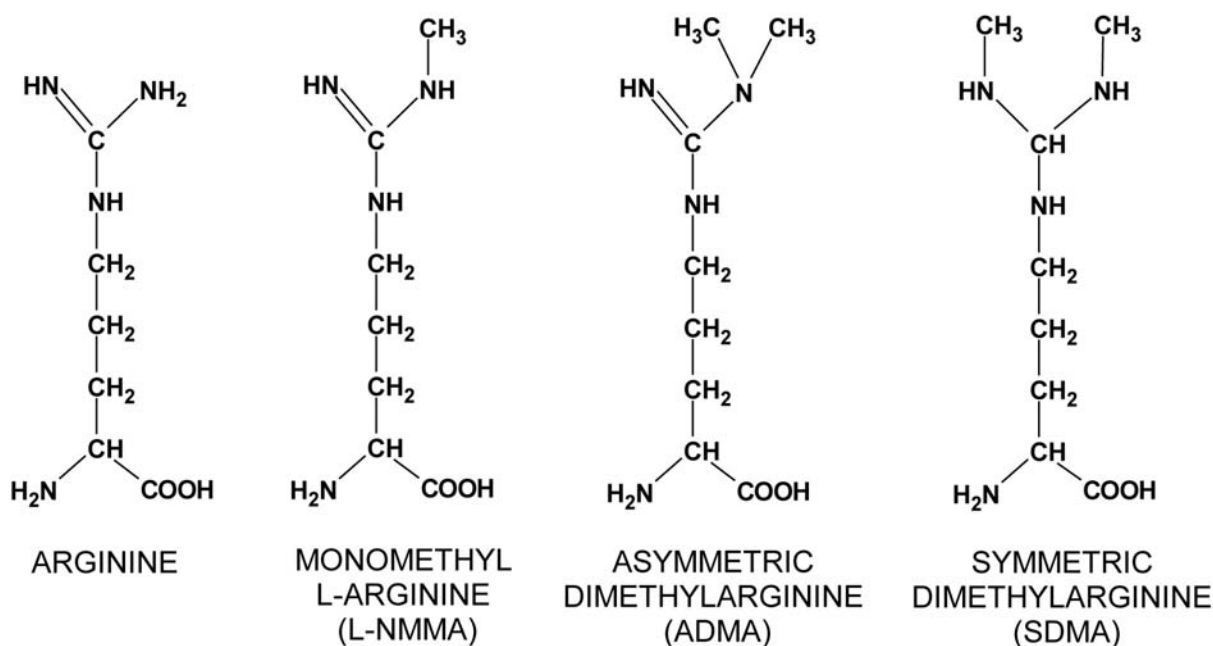
NO způsobuje vazodilataci a je klíčovým inhibitorem adheze a agregace trombocytů. Navíc tato molekula snižuje produkci superoxidového radikálu v cévách a působí jako inhibitor oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) zatímco ($\text{O}_2^{\cdot-}$) má účinek vazokonstrikční. Přitom některé typy buněk 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 blokadou 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

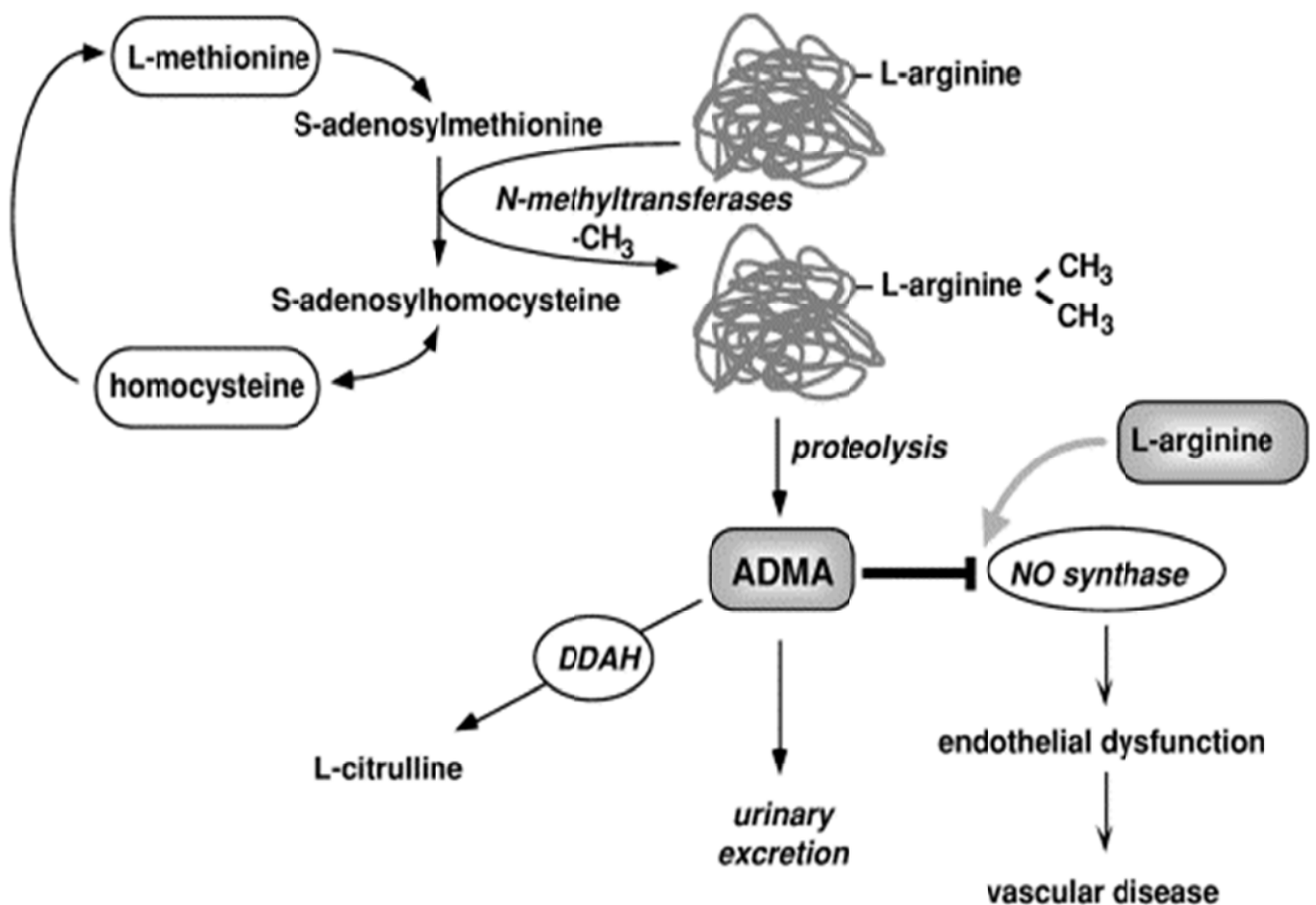


3.5. Vznik a odbourávání asymetrického dimethylargininu

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]