

Asymetrický dimethylarginin, homocystein a funkce ledvin

Široká R.¹, Trefil L.¹, Rajdl D.¹, Racek J.¹, Rusňáková H.¹ a Eiselt J.²

¹Ústav klinické biochemie a hematologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni
²1. interní klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni

SOUHRN

Na nepříznivých účincích zvýšené hladiny homocysteinu se podílí i zvýšení koncentrace asymetrického dimethylargininu (ADMA), účinného inhibitoru syntázy oxidu dusnatého. Cílem studie bylo porovnat plazmatické koncentrace ADMA a homocysteinu ve třech skupinách po 40 probandech: I. dárce krve s normální hladinou homocysteinu (průměrná koncentrace homocysteinu $10,4 \pm 3,4 \mu\text{mol/l}$); II. pacienti s hyperhomocysteinémií a normální funkcí ledvin ($15,4 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$); III. hemodialyzovaní pacienti s vysokou hladinou homocysteinu ($29,3 \pm 13,0 \mu\text{mol/l}$). U všech tří skupin probandů byly měřeny koncentrace homocysteinu (enzymová metoda, Carolina, USA), ADMA (metoda ELISA, DLD Diagnostika, Německo) a kreatininu (Jaffého metoda) v EDTA plazmě. Plazmatické koncentrace ADMA byly signifikantně vyšší ve skupinách II. a III., tedy u pacientů s hyperhomocysteinémií ($1,59 \pm 0,56 \mu\text{mol/l}$, respektive $1,84 \pm 0,57 \mu\text{mol/l}$) ve srovnání s dárce krve ($0,82 \pm 0,30 \mu\text{mol/l}$; v obou případech $p < 0,001$). Dále byla nalezena významná korelace mezi výškou hladin ADMA a homocysteinu ($r = 0,42$, $p < 0,0001$), ADMA a kreatininu ($r = 0,41$, $p < 0,0001$) a též homocysteinu a kreatininu ($r = 0,69$, $p < 0,0001$). Naše práce prokázala zvýšené hodnoty ADMA u pacientů s hyperhomocysteinémií. Přestože existuje korelace mezi ADMA a kreatininem, významně zvýšené plazmatické koncentrace ADMA u pacientů s hyperhomocysteinémií a normální funkcí ledvin svědčí pro to, že homocystein je významnějším prediktorem koncentrace ADMA než funkce ledvin.

Klíčová slova: asymetrický dimethylarginin, homocystein, dialýza, hyperhomocysteinémie.

SUMMARY

Široká R., Trefil L., Rajdl D., Racek J., Rusňáková H., Eiselt J.: Asymmetric Dimethylarginine, Homocysteine and Kidney Function – is there a Relation?

The adverse effect of hyperhomocysteinemia on vascular wall can partially be explained by increasing plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA), a potent inhibitor of nitric oxide synthase. The aim of the study was to compare ADMA and homocysteine levels in three groups of 40 subjects: I) blood donors with normal homocysteine (mean homocysteine $10.4 \pm 3.4 \mu\text{mol/l}$), II) patients with hyperhomocysteinemia and normal kidney function (mean homocysteine $15.4 \pm 4.2 \mu\text{mol/l}$) and III) hemodialysis patients who are known to be hyperhomocysteinemic (mean homocysteine $29.3 \pm 13.0 \mu\text{mol/l}$). Homocysteine (enzymatic method, Carolina, USA), ADMA (ELISA, DLD Diagnostika, Germany) and creatinine (Jaffé method) in EDTA plasma were measured. Plasma ADMA levels were significantly higher in both groups with hyperhomocysteinemia ($1.59 \pm 0.56 \mu\text{mol/l}$ in group II, $1.84 \pm 0.57 \mu\text{mol/l}$ in group III) when compared with those in blood donors ($0.82 \pm 0.30 \mu\text{mol/l}$, $P < 0.001$ in both cases). Significant correlations were found between ADMA and homocysteine ($r = 0.42$, $P < 0.0001$), ADMA and creatinine ($r = 0.41$, $P < 0.0001$), homocysteine and creatinine ($r = 0.69$, $P < 0.0001$). Increased ADMA concentration in hyperhomocysteinemic patients was confirmed. Although there exists a positive correlation between ADMA and creatinine, markedly increased ADMA concentration in hyperhomocysteinemic patients with normal creatinine concentration shows that homocysteine determines ADMA levels rather than kidney function.

Key words: asymmetric dimethylarginine, homocysteine, hemodialysis, hyperhomocysteinemia.

Úvod

Oxid dusnatý (NO), respektive jeho radikál ($\cdot\text{NO}$), způsobuje vazodilataci a je klíčovým inhibitorem adheze a agregace trombocytů (1). Syntéza NO je selektivně inhibována kompetitivní blokadou aktivního centra NO syntázy (NOS) dvěma deriváty L-argininu: N^G -monomethyl-L-argininem (L-NMMA) a N^G, N^G -dimethyl-L-argininem (asymetrický dimethylarginin – ADMA). Koncentrace ADMA v krvi je 10krát vyšší než koncentrace druhého derivátu (L-NMMA) a tím je určena i jeho role hlavního inhibitoru NOS (2, 3). Existuje i vztah ADMA a hyperhomocysteinémie, která je považována za nezávislý rizikový faktor aterosogeneze: homocystein inhibuje odbourávání ADMA a tím nepřímo vyvolává depleci oxidu dusnatého a tedy i známky endotelové dysfunkce (4).

Metabolismus ADMA začíná metylací proteinů bohatých na L-arginin, a to protein-arginin methyltransfe-

rázou typu I (PRMT I). PRMT I je zodpovědná za syntézu ADMA a NMA. Minoritně je ADMA vylučován ledvinami, ale hlavní metabolická degradace probíhá hydrolyzou na dimethylamin a L-citrulin enzymem dimethylarginin dimethylaminohydrolázou (DDAH). Společná lokalizace DDAH a NOS v buňkách endotelu (5) podporuje hypotézu o přímém vlivu koncentrace ADMA na buňky tvořící NO.

Faraci et al. experimentálně určili patologickou koncentraci ADMA v lidské plazmě, která signifikantně inhibovala NOS v buňkách cévního endotelu a tím snižovala množství měřeného NO, na $2\text{--}10 \mu\text{mol/l}$ (6).

Materiál a metody

Vzorky EDTA plazmy skupiny I byly získány od 40 zdravých dárců krve z transfuzního 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 enzymovou 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), 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 úměrně koncentraci ADMA ve vzorku.

Koncentrace kreatininu byla měřena Jaffého metodou na analyzátoru Olympus AU 400.

Výsledky

Plazmatické koncentrace ADMA u zdravých dárců krve (skupina I, 29 mužů, 11 žen, věkové rozmezí: 22 až 45 let) byly velmi nízké ($0,82 \pm 0,30 \mu\text{mol/l}$) a nelišily se 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 II (26 mužů, věkové rozmezí 48–78 let; 14 žen, věkové rozmezí: 48–76 let) – pacienti s normální funkcí ledvin a hyperhomocysteinémií ($15,4 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$) – byly koncentrace ADMA o 50 % vyšší ($1,59 \pm 0,56 \mu\text{mol/l}$) ve srovnání s kontrolní skupinou I. Ve skupině III (23 mužů, věkové rozmezí: 24–78 let; 17 žen, věkové rozmezí: 52–84 let) dialyzovaných pacientů se střední hyperhomocysteinémií ($29,3 \pm 13,0 \mu\text{mol/l}$) 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 II. (obr. 1).

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. Vyřazení byli dva nemocní ze skupiny III, jejichž koncentrace homocysteinu lze považovat za odlehle, protože přesáhly hodnotu 100 $\mu\text{mol/l}$ (obr. 2).

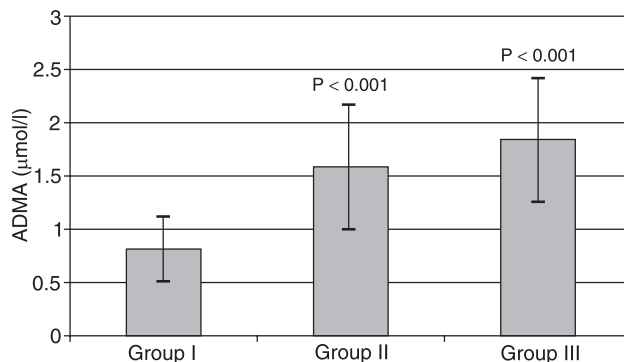


Fig. 1. ADMA concentration in three different groups of patients. I. blood donors with normal homocysteine (mean homocysteine $10.4 \pm 3.4 \mu\text{mol/l}$); II. with hyperhomocysteinemia and normal kidney function (mean homocysteine $15.4 \pm 4.2 \mu\text{mol/l}$); III. hemodialysis patients who are known to be hyperhomocysteinemic (mean homocysteine $29.3 \pm 13.0 \mu\text{mol/l}$).

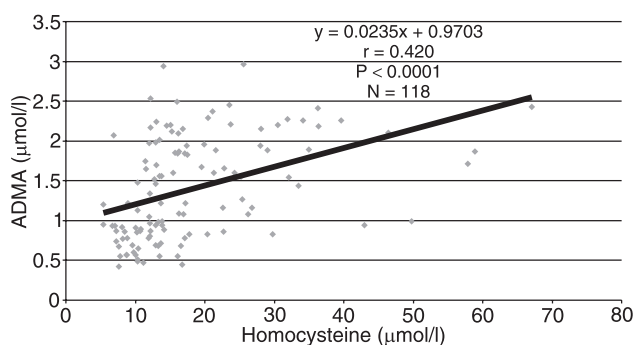


Fig. 2. Linear regression analysis of measurements of homocysteine and ADMA (ELISA method) in 118 plasma samples

Diskuse a závěr

Vzhledem k nové – u nás v republice dosud nepublikované – tematické – mají výsledky naší studie pilotní charakter a lze očekávat, že v nejbližší době dojde k rozšíření počtu probandů a následnému zpracování do obsáhlejší studie.

Pacienti s chronickou renální insuficiencí byli první skupinou s vysokou hladinou ADMA, kdy získané výsledky byly publikovány a potvrzeny mnoha dalšími studii (7, 8, 9). Zvýšení hladiny ADMA u hemodialyzovaných pacientů je částečně způsobeno zhoršenou eliminací ADMA během dialýzy (8). Takto chronicky zvýšená hladina ADMA může částečně souviset s vysokým výskytem kardiovaskulární morbidity a mortality u pacientů s chronickou renální insuficiencí (7). 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 3 let, kdy byli sledováni. Např. celková úmrtnost pacientů během 33 měsíců sledování byla o 72 % vyšší u pacientů s hodnotou ADMA nad mediánem ($2,52 \mu\text{mol/l}$) (9). Přestože je díky filtraci vysoká hladina ADMA u hemodialyzovaných obvyklá, lze kvantifikovat koncentrace ADMA na

skupiny s vysokým a nízkým rizikem, podle kterých bude možné terapeuticky dále ovlivnit průběh kardiovaskulárních onemocnění.

Průměrné koncentrace ADMA měřené metodou ELISA u zdravých probandů jsou jen nesignifikantně vyšší, než uvádí Schulze et al. (10). Významná pozitivní korelace byla zjištěna mezi hladinou ADMA na jedné straně a koncentrací kreatininu i homocysteinu na straně druhé. Statisticky nevýznamný rozdíl v hodnotách koncentrace ADMA u pacientů se selháním ledvin a pacientů s hyperhomocysteinémií a normální funkcí ledvin však ukazuje, že určujícím faktorem pro zvýšení koncentrace ADMA je spíše hyperhomocysteinémie než porucha funkce ledvin.

Literatura

1. Racek, J., Holeček, V. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy*, 1999, 93, s. 774–780.
2. Kielstein, J. T., Frelich, J. C., Haller, H., Fliser, D. ADMA: an atherosclerotic disease mediating agent in patient with renal disease? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2001, 16, p. 1742–1745.
3. Miyazaki, H., Matsuoka, H., Cooke, J., Michiaki, U., Ueda, S., Okuda, S., Imaizumi, T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Circulation*, 1999, 99, p. 1141–1146.
4. Stuhlinger, M. C., Tsao, P. S., Jeng-Horng, H., Kimoto, M., Balian, R. F., Cooke, J. P. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 2001, 104, p. 2569–2575.
5. Leiper, J. M., Santa, M. J., Chubb, A., MacAllister, R. J., Charles, I. G., Whitley, G. S., Vallance, P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.*, 1999, 343, p. 209–214.
6. Faraci, F. M., Brian, J. E. J., Heistad, D. D. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.*, 1995, 269, p. 1522–1527.
7. Boger, R. H., Zoccali C. ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patient with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, 2003, 4, Suppl., p. 23–28.
8. Kielstein, J. T., Boger, R. H., Bode-Boger, S. M. et al. 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, p. 594–600.
9. Zoccali C., Bode-Boger S. M., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.*, 2001, 358, p. 2113–2117.
10. Schulze, F., Wesemann, R., Schwedhelm, E., Sydow, K., Albsmeier, J., Cooke, J. P., Boger, R. H. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 42, p. 1377–1383.

Do redakce došlo 26. 5. 2005.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Romana Šírká

Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN

Alej Svobody 80

304 60 Plzeň

e-mail: srokar@fnplzen.cz

Tematický plán kurzů Katedry klinické biochemie IPVZ pro období říjen 2005 – červen 2006 (část 7)

211023 Odborná stáž k problematice přípravy laboratoře k akreditaci, využití systému SLP k práci s programem ČLP nebo k Datovému standardu MZ ČR

Určeno pro pracovníky laboratoří klinické biochemie, hematologie, imunologie a mikrobiologie.

Předběžný program: Příprava laboratoře k akreditaci, využití systému SLP, práce s programem ČLP a Datový standard MZ ČR. Podrobnější zaměření po dohodě se školitelem.

Školitel: ing. M. Zámečník

Termín konání: podle dohody se školitelem.

Místo konání: podle dohody se školitelem.

Kurzovné: 300,- Kč/den

Přihlášky na akce zasílejte alespoň 6 týdnů před zahájením akce, současně přesně specifikujte požadavky na ubytování. Na každou akci posílejte samostatnou přihlášku.

Uvádějte vždy: číslo akce, název akce, své rodné číslo, přesnou adresu a telefonní číslo.

Přihlášky zasílejte na adresu:

PhDr. Eva Morávková: Realizační centrum, kolej IPVZ, Budějovická 15/743, 145 00 Praha 4-Michle, e-mail: prihlasky@ipvz.cz, telefon: 261 092 456, fax: 261 211 247

Podrobné programy jednotlivých kurzů jsou průběžně doplňovány na webové stránce ČSKB: www.cskb.cz.