

Asymetrický dimethylarginin (ADMA)

Široká R.¹, Racek J.¹, Filipovský, J.²

¹Ústav klinické biochemie a hematologie

²2. interní klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni

SOUHRN

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) jako jeden z metabolitů L-argininu inhibuje nitroxidsyntázu (NOS) a tím nepřímo brzdí produkci oxidu dusnatého, respektive jeho radikálu (NO[•]). Snížená hladina NO je doprovázena známkami endotelové dysfunkce, mj. způsobuje vazokonstrikci a podporuje agregaci trombocytů a proliferaci hladké svaloviny cévní stěny. Hodnoty koncentrace ADMA v séru, plazmě a moči lze měřit několika metodami. Cílem této práce je přehledný souhrn, zhodnocení kvality a efektivnosti dosud aplikovaných metod – vysokoučinné kapalinové (HPLC) nebo plynové chromatografie (GC) a imunochemie (ELISA). Všechny dosud publikované typy detekcí jsou v článku podrobně probrány a výsledky popsanych metod porovnány s hodnotami získanými měřeními na našem pracovišti. **Klíčová slova:** asymetrický dimethylarginin, HPLC, GC, ELISA, derivatizace.

SUMMARY

Široká R., Racek J., Filipovský J.: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)

Asymmetric dimethylarginine (ADMA), one of the L-arginine metabolites, inhibits nitric oxide synthase and therefore indirectly influences the nitric oxide (NO[•]) production rate. Vascular smooth muscle cell proliferation, platelet aggregation and endothelial dysfunction are caused by decrease of NO. High performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and enzyme immunoassay (ELISA) are useful methods to monitor ADMA concentrations in serum, plasma and urine. The aim of this article is to review and discuss effectiveness of previous methods and compare our results with those of the other authors.

Key words: asymmetric dimethylarginine, HPLC, GC, ELISA, derivatization.

1 Úvod

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, respektive jeho radikál (NO), který vzniká dvoustupňovou reakcí z L-argininu působením nitroxidsyntázy (NOS), ale i bez jejího vlivu, a to působením superoxidu. Tyto reakce umožňují vznik NO i ve tkáních neobsahujících NOS. Jsou známy dva typy NOS – konstituční (cNOS, závisí na Ca²⁺ a kalmodulinu) a indukibilní (iNOS). NO způsobuje vazodilataci a je klíčovým inhibitorem adheze a agregace trombocytů. Inhibiči produkce tkáňového faktoru (TF) v monocitech brzdí NO iniciaci koagulační kaskády. Hojivé pochody a remodelace cévní stěny jsou rovněž kontrolovány NO (1). 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) (obr. 1). Koncentrace ADMA v krvi je desetkrát 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 ateroskleroze: homocystein inhibuje odbourávání ADMA a tím nepřímo vyvolává depleci oxidu dusnatého, a tedy i známky endotelové dysfunkce (4).

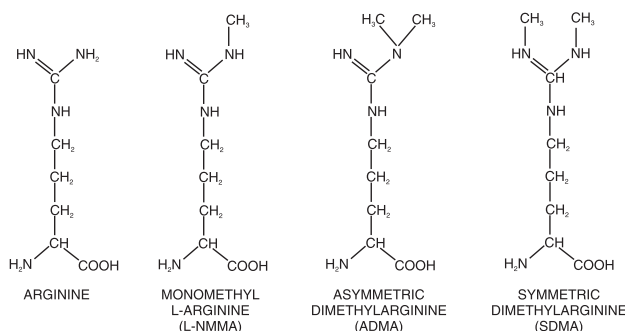


Fig. 1. Structure of L-arginine and endogenous methylarginines: N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N^G, N^G-dimethyl-L-arginine (asymmetric dimethylarginine, ADMA) and N^G, N^G-dimethyl-L-arginine (symmetric dimethylarginine, SDMA)

Metabolismus ADMA začíná metylací proteinů bohatých na L-arginin pomocí protein-arginin methyltransferázy typu I (PRMT I). PRMT I je zodpovědná za syntézu ADMA a NMA. Stereoizomer ADMA, N^G, N^G-dimethyl-L-arginin (symetrický dimethylarginin, SDMA) (viz obr. 1), vzniká působením PRMT typu II na stejný substrát; SDMA již nemá přímý vliv na inhibici NOS (5). Minoritně je ADMA vylučován ledvinami, ale hlavní metabolická degradace probíhá hydrolýzou na dimethylamin a L-citrulin pomocí enzymu dimethylarginin dimethylaminohydrolázy (DDAH) (obr. 2). Společná lokalizace DDAH a NOS v buňkách endotelu (6) 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 2–10 μmol/l (7).

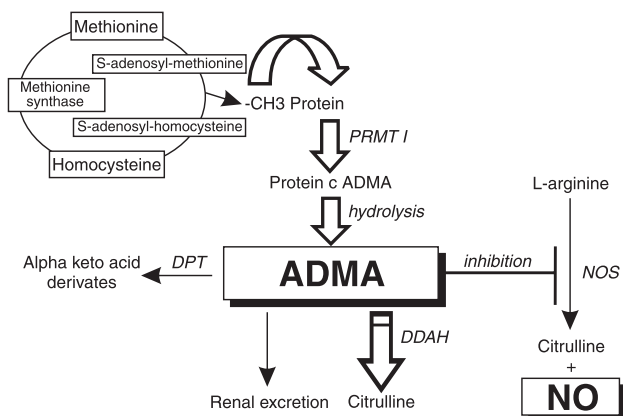


Fig. 2. Biochemical pathways for generation and degradation of asymmetric dimethylarginine (ADMA); according to (2)

2 Metody detekce derivátů L-argininu

2.1 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 ADMA a SDMA vysokotlakou kapalinovou chromatografií (8–14). Molekuly argininu a jeho derivátů je nutno extrahovat z krevní plazmy a poté derivatizovat na fluorescenčně aktivní látky (viz kap. 2. 1. 1–2. 1. 3). V literatuře je popsáno několik způsobů extrakce založených na principu kolonové chromatografie: cation-exchange column, solid-phase extraction (SPE) s různým stupněm aktivace sorbentu a následným několikanásobným promýváním kolony (9, 13). Absolutní návratnost, cca 85%, lze kompenzovat přidáním interního standardu, poté je relativní návratnost téměř 100% a výsledky kvantitativně odpovídají množství ADMA v analyzovaných extracelulárních tekutinách.

2.1.1 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-merkaptopropanolem (10–13) nebo 3-merkaptopropionovou kyselinou (9). Vzniklé produkty reakce jsou detekovány fluorescenčně (excitace 340 nm, emise 450 nm).

2.1.2 Derivatizace pomocí NDA

Marra et al. 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 (14).

2.1.3 Derivatizace pomocí AccQ-Fluor™

Heresztyn et al. použili po standardní extrakci aminů z plazmy (SPE kolony) vysoce stabilní reagentii Acc-Q-Fluor™ (6-aminochinoly-N-hydroxysukciny midylkarbamát). Stabilita vzniklých derivátů argininu se po týdnu prakticky nemění (zmenšená plocha píku do 5 %) (15). I tato metoda však při zlepšení stability vzorku posouvá délku analýzy o dalších 10 minut. Na rozdíl od derivátů OPA se čas analýzy posouvá až ke 45 minutám.

2.2 HPLC-MS (HPLC-Mass Spectrometry)

Detekce ADMA tandemovým zapojením kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru (MS) patří mezi nové metody (16). Použitím dvou detektorů lze obejít náročnou preanalytickou přípravu vzorku, která zahrnuje pouze precipitaci a zahuštění vzorku. Vzorek je po derivatizaci OPA a 2-merkaptopropanolem separován na RP18 koloně gradientovou elucí (mravenčano-vý 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 také pro monitorování aktivity enzymu DDAH.

2.3 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 limitem detekce jsou 2 fmol (17).

2.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Enzymatická imunoanalýza je nejnovější metodou použitou pro měření koncentrace ADMA v séru nebo plazmě. K dispozici jsou dva komerčně dostupné výrobky, a to ADMA® ELISA od firmy DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Německo a ADMA ELISA Kit® firmy Cardio Vasics, Medical Science Labs, Palo Alto, CA, USA.

Firma DLD Diagnostik užívá kompetitivní princip: ADMA z přidaného vzorku je acylován a soutěží s ADMA fixovaným na pevné fázi mikrotitrační destičky o vazebná místa limitovaného množství přidané králičí anti-ADMA protilátky. Po ukončení ekvilibrace jsou volný antigen a volné komplexy antigenprotilátka 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. Množství protilátky navázané na pev-

nou fázi (a tedy i měřená absorbance) je nepřímo úměrně koncentraci ADMA ve vzorku.

Naproti tomu ELISA souprava americké firmy Cardio Vasics využívá sendvičový princip s dvojí protilátkou; měřený produkt peroxidázové reakce je přímo úměrný koncentraci ADMA ve vzorku.

Nevýhodou metod ELISA je relativně vysoká cena jednoho stanovení, výhodou je kratší doba analýzy při více stanoveních v sérii.

3 Očekávaná koncentrace ADMA u zdravých jedinců

3.1 Souhrn výsledků výše popsaných studií

Hodnoty koncentrací ADMA v lidském séru, plazmě nebo moči najdeme u zdravé populace 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 metodou HPLC-MS získal hodnoty $c(\text{ADMA})$ 0,453 \pm 0,128 $\mu\text{mol/l}$ (16).

Pouze dvě firmy dodávají metodou ELISA a pouze jedna z nich (Cardio Vasics, Palo Alto, CA, USA) popisuje výsledky koncentrace ADMA u zdravých probandů v USA, které jsou nižší než hodnoty získané výše uvedenými chromatografickými metodami: na souboru 20 zdravých dobrovolníků bez známek kardiovaskulárního onemocnění a s negativním koronárním rizikem byla zjištěna $c(\text{ADMA})$ 0,225 \pm 0,098 $\mu\text{mol/l}$. Zdravé osoby s pozitivní rodinnou anamnézou a dalšími rizikovými faktory aterosklerózy měly téměř čtyřnásobnou průměrnou koncentraci ADMA; k vyšetření však bylo vzato jen 10 jedinců.

3.2 Koncentrace ADMA v plazmě zdravých jedinců (HPLC metoda) – vlastní výsledky

Na našem pracovišti byla zavedena metoda detekce ADMA pomocí HPLC s derivatizací OPA. Po extrakci vzorků na pevné fázi (SPE – solid-phase extraction) na polymerní kation-exchange koloně a následné derivatizaci pomocí OPA obsahujícího 3-merkaptopropionovou kyselinu byly vzorky podrobeny izokratické analýze na C 18 koloně (mobilní fáze 8,7% acetonitril, 50 mmol/l fosfátový pufr, pH 6,5) s tandemově zapojeným fluorescenčním detektorem (emise při vlnové délce 380–450 nm). Jako interní standard (IS) byl použit N^G -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 % a limit detekce 0,02 $\mu\text{mol/l}$ ADMA pro objem vzorků 0,2 ml. Separace obou stereoizomerů byla kvantitativní, rozdíl v retenčních časech odpovídal 1,1 minuty. Zjištěná koncentrace ADMA z EDTA plazmy zdravých dárců krve ($n = 42$, věk: 22–45 let) z transfuzního oddělení FN v Plzni byla 0,42 \pm 0,10 $\mu\text{mol/l}$ (průměr \pm SD), což odpovídá hodnotám citovaných v literatuře (9, 16, 19). Mezi plazmatickou koncentrací ADMA u mužů a u žen nebyl zjištěn rozdíl (tab. 1).

Table 1. ADMA concentrations in EDTA plasma of healthy volunteers (expressed as mean \pm SD)

Subjects	ADMA (mmol/l)
All (N = 42)	0.42 \pm 0.100
Male (N = 27)	0.43 \pm 0.079
Female (N = 15)	0.42 \pm 0.059

4 Diskuse a závěr

Vzhledem k rostoucímu množství nových publikací pojednávajících o detekci asymetrického dimethylargininu (ADMA) a jeho stereoizomeru (SDMA) za posledních několik let je patrná snaha nalézt optimální postup izolace a detekce těchto nových látek, a pomoci tak objasnit roli ADMA jako endogenního inhibitoru NOS, popř. jeho vliv na dysfunkci endotelu. Objasnění metabolismu ADMA se jeví jako další zásadní krok k ovlivnění rizikových faktorů aterosklerózy a nalezení účinných léčebných opatření.

Popis dosud známých chromatografických a imunochemických metod charakterizuje současný stav výzkumu detekce dimethylargininů. Většina metod poskytuje reprodukovatelné, kvantitativní výsledky a dostupnost jednotlivých stanovení je limitována přístrojovým vybavením a cenou kitů. Při interpretaci výsledků je přesto třeba vždy přihlídnout k typu metody. HPLC s derivatizací OPA je rychlá a reprodukovatelná metoda s výborným limitem detekce (0,01–0,02 $\mu\text{mol/l}$ ADMA), která poskytuje výsledek analýzy do 30 minut od nástřiku vzorku. Při použití metody LC-MS, jak uvádějí Martens-Lobenhoffer a Bode-Boger (16), je limit kvantifikace 0,2 μM . Další práce popisují limit kvantifikace až 0,05 μM ADMA (8). Imunochemická metoda ELISA dosahuje identických výsledků a na rozdíl od chromatografických metod se lépe hodí pro rutinní použití; její nevýhoda spočívá v singularitě měření, nelze detekovat další deriváty L-argininu současně během jediné analýzy.

Náš další výzkum v této oblasti bude zaměřen na porovnání výsledků jednotlivých metod u zdravých i patologických skupin probandů s důrazem na vliv vysokých koncentrací ADMA jako prediktoru rozvoje aterosklerózy a s ní souvisejících onemocnění.

Literatura

1. Racek, J., Holeček, V. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy*, 1999, 93, s. 774–780.
2. Kielstein, J. T., Fręlich, 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. et al. 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. **Tang, J., Kao, P. N., Herschman, H. R.** Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, p. 866–876.
6. **Leiper, J. M., Santa, M. J., Chubb, A., MacAllister, R. J., Charles, I. G. Et al.** Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.*, 1999, 343, p. 209–214.
7. **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.
8. **Vishwanathan, K., Tackett, R. L., Stewart, J. T., Bartlett, M. G.** Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 748, 2000, p. 157–166.
9. **Teerlink, T., Nijveldt, R. J., De Jong S., van Leeuwen, P. A.** Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 303, 2002, p. 131–137.
10. **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, p. 54–59.
11. **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.*, 742, 2000, p. 199–203.
12. **Chen, B. M., Xia, L. W., Zhao, R. Q.** Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, 692, 1997, p. 467–471.
13. **Pettersson, A., Ubyla, L., Backman, V.** Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 692, 1997, p. 257–262.
14. **Marra, M., Bonfigli, A. R., Testa, R., Testa, I., Gambini, A., Coppa, G.** High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal. Biochem.*, 318, 2003, p.13–17.
15. **Heresztyn, T., Worthley, M. I., Horowitz, J. D.** Determination of L-arginine and NG, NG- and NG, NG'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 805, 2004, p. 325–329.
16. **Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Boger, S. M.** Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Life Sci.*, 798, 2003, p. 231–239.
17. **Albsmeier, J., Schwedhelm, E., Schulze, F., Kastner, M., Boger, R. H.** Determination of NG, NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 809, 2004, p. 59–65.
18. **Leiper, J., Vallance, P.** Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 1999, 43, p. 542–548.
19. **Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M., Stein, G.** Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin. Chim. Acta.*, 336, 2003, p. 1–12.

Do redakce došlo 20. 12. 2004.

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Romana Široká
ÚKBH FN Plzeň
Alej Svobody 80
304 60 Plzeň
e-mail: sirokar@fnplzen.cz

Tematický plán kurzů Katedry klinické biochemie IPVZ pro období říjen 2005 – červen 2006 (část 2)

211003 Specializační kurz v klinické biochemii – 7. lékařská část

Určeno pro lékaře před atestací z klinické biochemie.

Předběžný program: Farmakokinetická podpora terapie. Toxikologie. Klinická biochemie nádorového bujení. Analýzy nukleových kyselin. Analytická instrumentace a hodnocení přístrojů. Vitaminy a stopové prvky. Základy statistiky I.

Vedoucí kurzu: doc. MUDr. Antonín Jabor, CSc.

Termín konání: 10.–14. 10. 2005

Místo konání: Praha 4, Budějovická 15

Kurzovné: 1000,- Kč

211013 Kurz – Aktuality pro zdravotní laboranty

Určeno pro zdravotní laboranty.

Předběžný program: Doporučení ČSKB – aktuální stav a novinky.

Vyšetření diabetika. Vyšetření u endokrinopatií.

Vedoucí kurzu: doc. MUDr. Antonín Jabor, CSc.

Termín konání: 25. 10. 2005

Místo konání: Praha 4, Budějovická 15

Kurzovné: 400,- Kč

(pokračování na s. 150)