

# METYLOARGININY – NIEKLASYCZNE CZYNNIKI RYZYKA CHOROBY SERCOWO-NACZYNIOWEJ W OSOCZU KRWI OSÓB NARAŻONYCH I NIENARAŻONYCH NA DYM TYTONIOWY

## PLASMA METHYLARGININES, NON-CONVENTIONAL RISK FACTORS OF CORONARY-ARTERY DISEASE AMONG SUBJECTS EXPOSED AND NON-EXPOSED TO TOBACCO SMOKE

*Andrzej Sobczak<sup>1,3</sup>, Izabela Szottysiek-Bołdys<sup>3</sup>, Edmund Anczyk<sup>1</sup>, Małgorzata Radek<sup>2</sup>, Adam Prokopowicz<sup>1</sup>, Marzena Zaciera<sup>1</sup>, Piotr Z. Brewczyński<sup>1</sup>*

*1 Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec. Dyrektor: dr Piotr Z. Brewczyński*

*2 Zakład Opieki Zdrowotnej, Laboratorium Centralne, Olkusz. Dyrektor: lek. med. Jerzy Niewiara*

*3 Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Sosnowiec. Kierownik: dr hab. Andrzej Sobczak*

**Praca naukowa finansowana ze środków MNiSW jako projekt badawczy N404 211837**

### Streszczenie

Od ponad dekady metylowe pochodne argininy cieszą się dużym zainteresowaniem wśród naukowców zajmujących się chorobami sercowo-naczyniowymi. Przyczyną są ich własności biologiczne. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) pełni funkcję inhibitora *syntazy tlenku azotu (NOS)* i postrzegana jest obecnie jako niezależny czynnik ryzyka choroby wieńcowej, natomiast symetryczna dimetyloarginina (SDMA) może być użytecznym biomarkerem, pozwalającym wykryć osoby we wczesnym stadium choroby nerek oraz określić u nich ryzyko rozwoju choroby sercowo-naczyniowej. W pierwszej części pracy opisano biosyntezę i katabolizm metyloarginin, w następnej części ich związek z chorobami sercowo-naczyniowymi oraz wpływ homocysteiny na ich osoczowe stężenie. W ostatniej części pracy dokonano przeglądu literatury związanej z wpływem dymu tytoniowego na stężenie ADMA i SDMA w osoczu.

**Słowa kluczowe:** asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), symetryczna dimetyloarginina (SDMA), dym tytoniowy, miażdżycza

### Abstract

The role of methylated derivatives of arginine in cardiovascular diseases has been studied for over a decade. The reason for this are their biological characteristics. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an inhibitor of *nitric oxide synthase (NOS)* and nowadays it is recognized as an independent risk factor of coronary artery disease. Application of symmetric dimethylarginine (SDMA) may be practical and useful for identifying subjects from early stage of renal disease and determining their risk of cardiovascular diseases. The first part of the paper shows biosynthesis and catabolism of methylarginines, the following part discusses their association with cardiovascular diseases and correlation between homocysteine plasma level. The third part of the paper is a review of studies that have evaluated the impact of tobacco smoke on ADMA and SDMA.

**Keywords:** asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), tobacco smoke, atherosclerosis

Nadesłano: 08.11.2010

Zatwierdzono do druku: 18.11.2010

## Wstęp

W Polsce, na początku bieżącej dekady liczba zgonów wśród mężczyzn i kobiet w wieku 35–69 lat przypisywana paleniu tytoniu wynosiła odpowiednio 38% i 13%. Połowa z nich spowodowana była chorobami układu krążenia (zawałem serca, udarem mózgu, miażdżycą naczyń obwodowych). Równie niepokojące dane dotyczą palenia biernego. Badania epidemiologiczne dowodzą, że narażenie na środowiskowy dym tytoniowy zwiększa ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych o 25–30% [1].

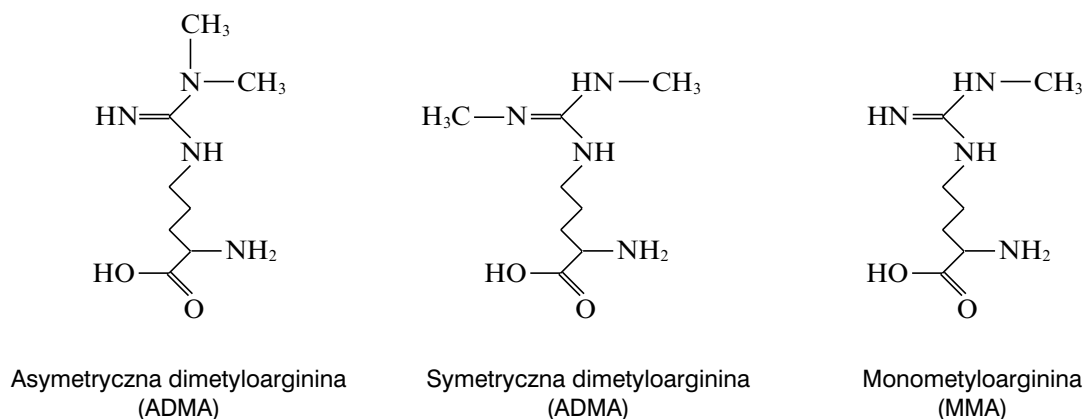
Według wytycznych Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia, dotyczących oceny ryzyka sercowo-naczyniowego, w prewencji tych chorób określenie indywidualnego ryzyka u badanych osób jest istotnym elementem tzw. strategii wysokiego ryzyka, która polega na aktywnym wyszukiwaniu osób zagrożonych zachorowaniem i objęciu ich właściwą opieką. Ryzyko ogólne można określić za pomocą testu SCORE (ang. *Systematic Coronary Risk Evaluation*), opartego na informacjach dotyczących wieku, płci, wartości skurczowego ciśnienia krwi, całkowitego cholesterolu, stężenia HDL-cholesterolu, palenia tytoniu i występowania cukrzycy. Może być ono jednak niedoszacowane, ponieważ test nie uwzględnia wpływu wielu innych czynników ryzyka chorób układu krążenia zaliczanych do tzw. czynników nieklasycznych (nowych) [2]. W tej grupie związków dużym zainteresowaniem cieszy się

ostatnio asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), endogenny inhibitor *syntazy tlenku azotu (NOS)*, często w literaturze nazywana „wschodzącym” czynnikiem ryzyka (ang. *emerging risk factor*) w chorobach układu sercowo-naczyniowego.

## Metylowe pochodne L-argininy jako czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych

L-arginina jest jednym z aminokwasów niezbędnych do prawidłowego działania ludzkiego organizmu. Aminokwas ten jest bezpośrednim prekursorem takich związków sygnałowych jak NO i agmatyna (4-aminobutyloguanidyna) oraz pośrednim prekursorem glutaminianu i kwasu gamma aminomasłowego. Wykazano, że agmatyna, będąca produktem dekarboksylacji L-argininy, katabolizowana dalej przez specyficzny enzym, *agmantynazę*, do putrescyny, jest prekursorem poliamin, będących kluczowymi regulatorami procesów komórkowych, między innymi stymulującymi proliferację komórek [3].

W białkach arginina może ulegać posttranslacyjnej, enzymatycznej metylacji. Grupy metylowe łączą się z azotami grupy guanidynowej łańcucha bocznego argininy wiązaniem kowalencyjnym i reakcja ta jest nieodwracalna. W wyniku hydrolizy białka uwalniają się pochodne metylowe argininy: asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), symetryczna dimetyloarginina (SDMA) oraz monometyloarginina (MMA) (rycina 1).



Rycina 1. Struktury metyloarginin.

Figure 1. Structure of methylated form of arginine

Metylowe pochodne argininy obecne w osoczu nie pochodzą zatem z metylacji wolnej argininy, lecz z katabolizmu białek zawierających metylowane łańcuchy boczne argininy. ADMA i MMA, w odróżnieniu od SDMA, posiadają podobne efekty działania biologicznego i podobny metabolizm. Stężenie ADMA w osoczu jest około dziesięciokrotnie większe od stężenia MMA. Dlatego dla przeważają-

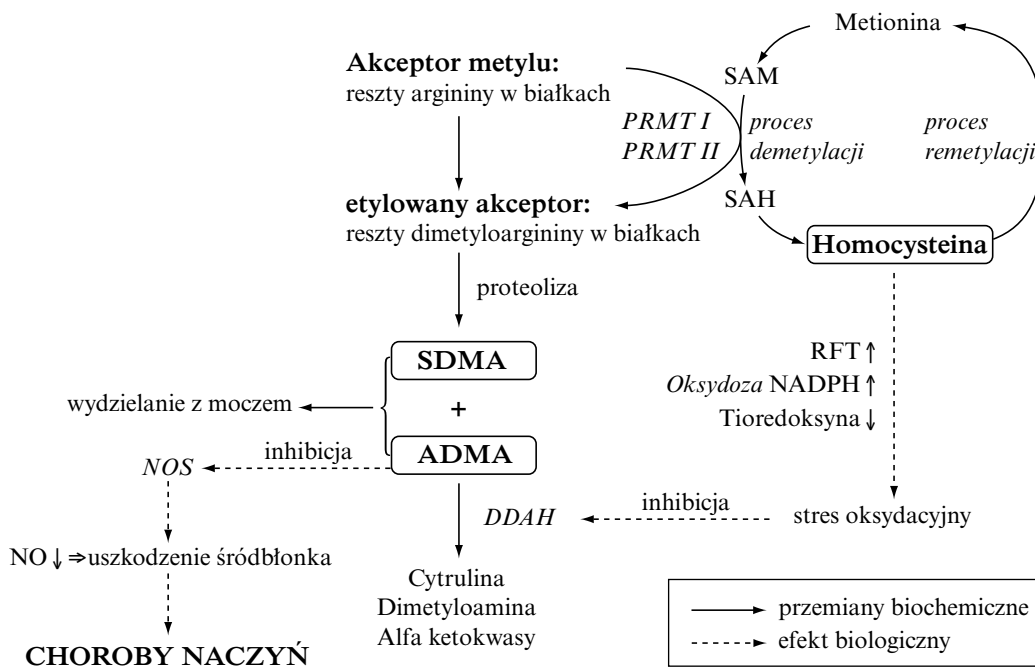
cej liczby badaczy ADMA jest potencjalnie ważniejszym czynnikiem diagnostycznym niż MMA [4]

ADMA jest endogennym inhibitorem *syntazy tlenku azotu (NOS)*. Jako metabolit została zidentyfikowana w latach 70. XX wieku, ale jej rola jako kompetycyjnego inhibitora *NOS* została po raz pierwszy opisana przez Patrica Vallanca u pacjentów ze schyłkową chorobą nerek [5].

## Biosynteza i katabolizm ADMA i SDMA

ADMA i SDMA są syntetyzowane przez różne komórki, w tym przez komórki śródbłonna naczyniowego [6]. Reszty argininy wbudowanej w łańcuch białkowy są metylowane przez rodzinę białkowych *N*-metylotransferaz (*PRMT*, ang. *protein N-methyltransferases*). Enzymy te przenoszą grupy metylowe

z *S*-adenozylometioniny (SAM) na atom azotu grupy guanidynowej argininy (rycina 2). Etap ten pośrednio jest związany z metabolizmem Hcy. Z przedstawionego schematu widać, że im wyższa wydajność procesu demetylacji metioniny, tym intensywniejsze mogą być procesy metylowania reszt argininy w białkach (rycina 2).



**Rycina 2.** Synteza i metabolizm homocysteiny (Hcy), asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) i symetrycznej dimetyloargininy (SDMA). SAM, *S*-adenozylometionina; SAH, *S*-adenozylhomocysteina; *PRMT*, *metylotransferaza białkowa*; RFT, reaktywne formy tlenu; *NOS*, *synteza tlenku azotu*; *DDAH*, *hydrolaza dimetyloarginino-dimetyloaminowa*.

**Figure 2.** Synthesis and metabolism of homocysteine (Hcy), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA). SAM, *S*-adenosylmethionine; SAH, *S*-adenosylhomocysteine; *PRMT*, *protein methyltransferase*; RFT, reactive oxygen species; *NOS*, nitric oxide synthase; *DDAH*, *dimethylarginine dimethylaminohydrolase*.

Znane są różne *proteinowe metylotransferazy*. Różnią się one swoistością substratową i produktami. ADMA i MMA są produktami reakcji z udziałem *PRMT* typu I, a produktem *PRMT* typu II, oprócz MMA, jest także SDMA. Ekspresja *PRMT I* w komórkach śródbłonna wzrasta w obecności LDL natywnych i zmodyfikowanych oksydacyjnie. Prawdopodobnie jest to mechanizm tłumaczący zwiększenie stężenia ADMA w hipercholesterolemii. Wytwarzanie ADMA przez ludzkie komórki śródbłonna wzrasta także w obecności metioniny lub Hcy, natomiast jest hamowane przez inhibitory *metylotransferaz*. Zaliczamy do nich *S*-adenozylhomocysteinę (SAH), dialdehyd adenozy, cykloleucynę [7].

W wyniku proteolizy białek, zawierających mety-

lowane pochodne argininy, zostają one uwalniane przez komórki i można wykazać ich obecność w osoczu i moczu.

Głównym enzymem uczestniczącym w katabolizmie ADMA i MMA (ale nie SDMA) jest *hydrolaza dimetyloarginino-dimetyloaminowa*. (*DDAH*, ang. *dimethylarginine dimethylaminohydrolase*). Produktami degradacji ADMA są cytrulina, dimetyloamina oraz niewielkie ilości ketokwasów. Aktywność *DDAH*, obok procesu metylacji grup guaninowych argininy zawartej w białkach i procesów proteolizy tych białek, determinuje stężenie ADMA wewnątrz komórki. Znane są dwie izoformy *DDAH*, obie związane głównie z frakcją cytozolową. *DDAH I* przeważa w tkankach wykazujących obecność neuronalnej *syntazy tlenku azotu (nNOS)*, natomiast *DDAH II*

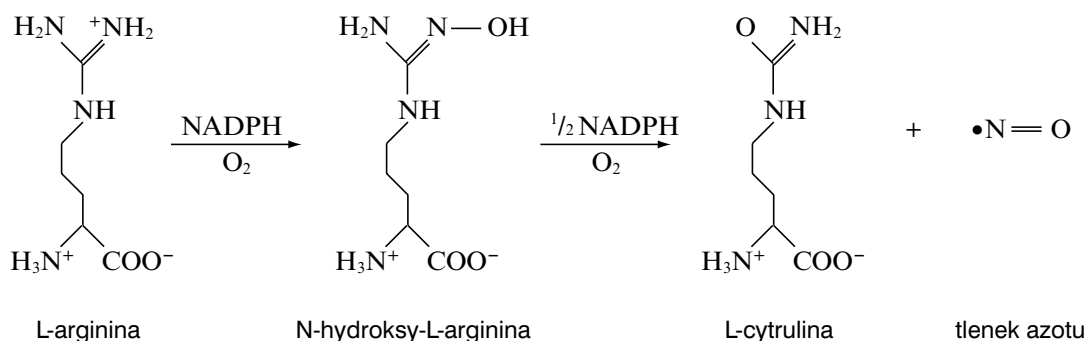
występuje w komórkach wykazujących ekspresję endotelialnej syntazy tlenku azotu (*eNOS*) [8].

Zmniejszenie aktywności *DDAH* zwiększa stężenie ADMA i powoduje dysfunkcję komórek śródbłonna, hamując relaksację naczyń krwionośnych, zależną od śródbłonkowego NO. W badaniach *in vitro* wykazano, że w obecności inhibitora *DDAH* (kwasu 2-amino-4[3-metyloguanino]butanowego, znanego pod symbolem 4124W) wzrasta stężenie ADMA, a izolowane segmenty naczyń kurczą się. Natomiast dodanie L-argininy do medium hodowlanego, w którym są one zawieszane, działa na nie rozkurczająco [9]. Obniżeniu aktywności *DDAH* i wzrostowi stężenia ADMA w hodowlach komórkowych zapobiegają antyoksydanty [10].

Podwyższone stężenie ADMA w osoczu występuje w różnych stanach patologicznych. Są nimi: przewlekła choroba nerek, nadciśnienie, hipercholesterolemia, stan przedrzucawkowy, insulinooporność, cukrzyca typu II oraz choroby układu krążenia i hiperhomocysteinemia [11]

## ADMA i SDMA a choroby układu krążenia

Głównym mechanizmem, poprzez który ADMA wywiera swój efekt biologiczny, jest niewątpliwie kompetencyjna inhibicja *NOS*. Wykryto trzy typy tego enzymu: neuronalny (*nNOS*) zależny od kalmoduliny  $Ca^{2+}$ , indukowany (*iNOS*) niezależny od jonów  $Ca^{2+}$  oraz endotelialny (*eNOS*) zależny od kalmoduliny  $Ca^{2+}$ . Enzymy występują w postaci homodimerów, z których każdy monomer składa się z dwóch domen: domeny N-terminalnej oksygenazy i C-terminalnej reduktazy. *NOS* katalizuje pięcioelektronową oksydację L-Argininy. Głównymi produktami tej reakcji są NO i cytrulina, a związkami przejściowymi – N-hydroksy-L-arginina (rycina 3) [12].



**Rycina 3.** Dwuetapowa reakcja powstawania tlenku azotu z argininy zachodzi poprzez związek przejściowy N-hydroksy-L-argininę. Na mol powstającego NO zostają zużyte 2 mole  $O_2$  i 1,5 mola NADPH.

**Figure 3.** Oxidation of L-arginine to L-citrulline occurs *via* two successive monooxygenation reactions producing N-hydroxyarginine as an intermediate. 2 mol of  $O_2$  and 1,5 mol of NADPH are consumed per mole of NO formed.

Wytworzony NO jest ważnym mediatorem, uczestniczącym w kontroli napięcia mięśni gładkich. Powstaje w komórkach śródbłonna, przenika do mięśni gładkich, gdzie aktywuje cytosolową cykliczną guanylanową. W efekcie reakcji katalizowanej przez ten enzym powstaje cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP), który powoduje relaksację mięśni gładkich przez aktywację kinazy białkowej G, a fosforyluje kinazę lekkich łańcuchów miozyny i czyni ją nieaktywną [13].

Stężenie ADMA w osoczu wzrasta u ludzi i zwierząt z miażdżycą tętnic oraz pod wpływem czynników ryzyka miażdżycy, takich jak: dyslipidemie, nadciśnienie, hiperglikemia, oporność insulinowa. Ponadto wykazuje lepszą korelację z dysfunkcją komórek śródbłonna tętnic niż stężenie cholesterolu. Wzrost stężenia ADMA w osoczu wykazano u chorych z klinicznie zaobserwowanymi zmianami w tę-

nicach obwodowych oraz w neointymie, tworzącej się po uszkodzeniu ściany naczyniowej, np. podczas angioplastyki [14] Zwiększone stężenie ADMA i zmniejszone stężenie argininy zaobserwowano w zregenerowanych komórkach śródbłonna, 6 tygodni po balonikowym uszkodzeniu błony wewnętrznej tętnicy szyjnej królika [15].

Pierwsze prospektywne badania dotyczące roli ADMA jako czynnika ryzyka chorób sercowo-naczyniowych wykonano w szpitalu uniwersyteckim Hamburg-Eppendorf. Badaniu poddano 225 hemodializowanych pacjentów. W ciągu 34 miesięcy odnotowano 120 incydentów sercowo-naczyniowych oraz 83 zgony, z czego 53 nastąpiły z powodu chorób sercowo-naczyniowych. Za pomocą analizy regresji wieloczynnikowej Coxa, pozwalającej na wyliczenie prawdopodobieństwa przeżycia określonego czasu jako funkcji wybranych parametrów wyka-

zono, że stężenie ADMA w osoczu oraz wiek były najsilniejszymi predyktorami przyszłych zdarzeń wieńcowych i umieralności [16].

Lu i wsp. [17] badali, czy stężenie ADMA w osoczu może prognozować przyszłe incydenty wieńcowe u osób ze stabilną dusznicą bolesną po zabiegu przeszłokrotnej interwencji wieńcowej. Badania trwały 16 miesięcy i objęły 153 pacjentów. Wykazano ponad pięciokrotny wzrost ryzyka przyszłych incydentów wieńcowych, związanych z podwyższonym poziomem ADMA w osoczu, niezależny od takich czynników jak wiek, hipercholesterolemia, palenie papierosów.

W roku 2008 ukazała się w czasopiśmie *Clinical Chemistry* praca, prezentująca dane uzyskane podczas pięcioletnich badań, w ramach programu LURIC (*The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study*) [18]. Autorzy oceniali ADMA jako biomarker układu sercowo-naczyniowego u 3238 pacjentów. W tej grupie za pomocą angiografii wieńcowej zidentyfikowano 2543 pacjentów z chorobą wieńcową oraz 695 bez znaczących zmian chorobowych. Autorzy stwierdzili, że stężenie ADMA w osoczu jest niezależnym czynnikiem zapowiadającym umieralność ogólną oraz umieralność z przyczyn sercowo-naczyniowych. Ponadto prognostyczna moc ADMA okazała się niezależna od tradycyjnych czynników.

Ostatnie doniesienia wskazują, że pomiar stężenia ADMA w osoczu mógłby być również użyteczny w masowych przeglądach populacji, mających na celu ujawnienie wczesnych stadiów miażdżycy [19].

Meta-analiza obejmująca 13 badań wykonanych w okresie od 2001 do 2009 roku wykazała, że w każdym z tych badań podwyższone stężenie ADMA w osoczu było predykatorem incydentu wieńcowego, umieralności z powodu chorób sercowo-naczyniowych lub umieralności ogólnej [20]. W dalszym jednak ciągu pozostaje sprawą otwartą pytanie, czy ADMA jest jedynie markerem procesów miażdżycowych czy też aktywnym związkiem biorącym w nich udział [21].

W przeciwieństwie do znacznego zainteresowania naukowców zagadnieniami związanymi z rolą, jaką w różnych stanach patologicznych odgrywa ADMA, zainteresowanie drugą z metylowych pochodnych argininy, a mianowicie SDMA, jest zdecydowanie mniejsze. Do maja 2010 roku w bazie danych PubMed cytowanych było 1094 prac związanych z ADMA i tylko 228 prac dotyczących SDMA. Tymczasem ostatnie doniesienia wskazują, że SDMA może być użytecznym biomarkerem, pozwalającym wykryć osoby we wczesnym stadium choroby nerek oraz określić u nich ryzyko rozwoju choroby sercowo-naczyniowej [22].

Prace, które ukazały się w ostatniej dekadzie wykazują głównie związek pomiędzy stężeniem SDMA w osoczu a współczynnikami przesączania kłębuszkowego oraz z klirensem kreatyniny. Obok tych zależności wykazano, że zwiększone stężenie osoczkowego SDMA powoduje wzrost produkcji reaktywnych form tlenu przez monocyty, jest natomiast skorelowane ze stężeniem N-końcowego mózgowego peptydu natriuretycznego i z parametrami echokardiograficznymi typowymi dla uszkodzeń lewej komory [20]. We wspomnianej powyżej meta-analizie jedynie w jednej pracy odnotowano związek podwyższonego stężenia SDMA ze śmiertelnością z powodu choroby sercowo-naczyniowej i incydentu wieńcowego i wykazano podobne właściwości predykcyjne SDMA i ADMA. Badania te prowadzono przez okres 5 lat i objęły one grupę 572 osób. [23].

### **Czy zmiana stężenia homocysteiny w osoczu wpływa na poziom metylowych pochodnych argininy?**

Zakres prawidłowego stężenia Hcy w osoczu ludzi zdrowych mieści się zwykle między 5 a 15  $\mu\text{mol/l}$ , chociaż niektórzy badacze uważają, że stężenia około 12  $\mu\text{mol/l}$  stanowią już górną granicę normy. Hiperhomocysteinemia to stężenie Hcy w osoczu osób dorosłych powyżej 15  $\mu\text{mol/l}$ , przy stężeniach > 100  $\mu\text{mol/l}$  mówi się o ciężkiej jej postaci. W świetle rekomendacji grupy ekspertów, opublikowanych w 2004 r., zakres referencyjny stężenia Hcy powinien być osobno ustalany dla poszczególnych populacji z uwzględnieniem wieku, płci, czynników etnicznych, rodzaju diety, przyjmowania witamin, stylu życia [24]. Stężenie Hcy wzrasta z wiekiem i u ludzi starych jest około dwukrotnie wyższe niż u dzieci. Po okresie dojrzewania stężenie Hcy jest większe u płci męskiej średnio o około 2  $\mu\text{mol/l}$ , a różnica ta zmniejsza się z wiekiem. W szeregu badań wykazano znamienne podwyższenie osoczkowego stężenia Hcy u osób narażonych na dym tytoniowy w porównaniu do osób nienarażonych [25].

Szereg badań wskazuje na związek pomiędzy hiperhomocysteinemią a podwyższonym stężeniem ADMA w osoczu osób z miażdżycą naczyń wieńcowych, obwodowych, udarem. Wpływ Hcy na poziom ADMA w organizmie wynika z zamięszania się szlaków metabolicznych obu związków (rycina 2). Proces metylowania reszt argininowych występujących w białkach dokonuje się przy udziale SAM, a produktem obok metylowanego białka jest SAH, następnie hydrolizowana do Hcy. Jest to jedyna reakcja prowadząca do pojawienia się w organizmie Hcy. Wydaje się zatem, że podwyższony poziom SAH powinien być związany ze zwiększonym stęże-

nium Hcy oraz ADMA. Taką hipotezę potwierdzają badania *in vitro* oraz *in vivo*.

Inkubacja komórek śródbłonna w obecności metioniny lub Hcy prowadzi do wzrostu stężenia ADMA w medium komórkowym, przy czym wzrost ten znamienne dodatnio koreluje z ilością dodanego aminokwasu [7].

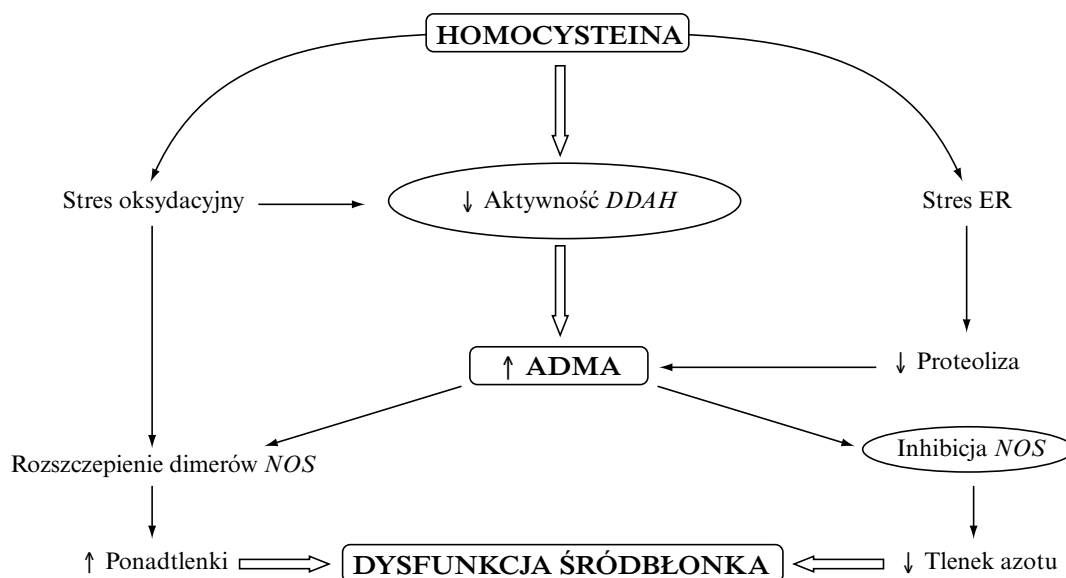
W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na małpach stwierdzono, że doświadczalna hiperhomocysteinemia wywołana dietą bogatą w metioninę, a ubogą w foliany, powodowała około trzykrotny wzrost stężenia Hcy i ADMA w osoczu zwierząt [26].

Szczególnie przekonujące są badania *in vivo*, przeprowadzone wśród osób zdrowych poddanych testowi metioniny (jednorazowe doustne podanie metioniny w ilości 100 mg/kg masy ciała). Osiem godzin po podaniu metioniny stwierdzono wzrost stężenia Hcy o ponad 400%, czemu towarzyszył wzrost stężenia ADMA o ponad 40% i obniżenie o 80% rozszerzalności tętnicy ramiennej [27].

W piśmiennictwie pojawiają się też inne sugestie związane z oddziaływaniem Hcy na ADMA. Hcy zawierająca reaktywne grupy tiolowe łatwo tworzy

mostki dwusiarczkowe, co może zaburzać tworzącą się w siateczce śródplazmatycznej strukturę białek. W konsekwencji może nastąpić przyspieszona degradacja nowo tworzącego się (niewłaściwego) białka, połączona z uwalnianiem metylowych pochodnych argininy. Dla komórki oznacza to stres w obrębie siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum stress pathway*, *ER stres*). Dodatkowo pod tym pojęciem rozumie się rozregulowanie metabolizmu lipidów, aktywację szlaku zapalnego i apoptozę komórki. Wykazano, że apoptoza komórek w hodowlach komórek śródbłonna powodowana przez Hcy, odbywa się właśnie na drodze stresu ER [28].

Hcy może ponadto zmniejszać aktywność enzymatyczną *DDAH* (Hcy wiąże się z centrum aktywnym enzymu, które stanowi grupa tiolowa cysteiny), co prowadzi do zaburzenia katabolizmu ADMA i jej akumulacji. [29]. Aktywność enzymatyczna *DDAH* może być również obniżona w wyniku stresu oksydacyjnego, wywołanego przez Hcy. Prawdopodobny mechanizm dysfunkcji śródbłonna wywołany przez Hcy oraz rolę ADMA w tym procesie przedstawiono na rycinie 4.



**Rycina 4.** Schemat indukowanej przez Hcy dysfunkcji śródbłonna. Hcy może hamować aktywność enzymatyczną *DDAH* bezpośrednio lub pośrednio poprzez stres oksydacyjny, co prowadzi do wzrostu stężenia ADMA. Alternatywnie Hcy może podwyższać stężenie ADMA przez indukcję stresu w obrębie siateczki śródplazmatycznej (stres ER), który zwiększa proteolizę białek zawierających metylowe pochodne argininy. Akumulacja ADMA w komórkach śródbłonna hamuje aktywność syntazy tlenku azotu (*NOS*). W konsekwencji obniża się stężenie NO. ADMA oraz inne oksydanty może powodować rozszczepienie homodimerów *NOS*, co sprzyja powstawaniu ponadtlenków i dalszy spadek dostępności biologicznej NO [30].

**Figure 4.** Model of homocysteine-induced endothelial dysfunction and the possible role of ADMA. Homocysteine may inhibit *DDAH* activity directly or indirectly by inducing oxidative stress which ends up in increase of ADMA concentration. Alternatively, homocysteine may increase ADMA concentration through stress induction within intraplasmatic reticulum (ER stress) which increases proteolysis of arginine. ADMA accumulation in endothelium cells controls activity of nitrogen oxide sintasis. Finally runs to reduction of NO concentration. ADMA and other oxidants may cause spitting (fission) of homodimers what attracts formation of superoxides and further decrease of biological accessibility of NO [30].

## Wpływ dymu tytoniowego na stężenie ADMA w osoczu

Żeby zaakceptować ADMA jako szeroko używany czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, należy dokładnie określić wpływ na jej poziom czynników egzogennych. Takie badania są w fazie wstępnej i dotyczą m. in. wpływu dymu tytoniowego. Doniesienia literaturowe dotyczące omawianego zagadnienia są bardzo nieliczne i rozbieżne. Sporo

trudności nastęrcza ponadto porównanie opublikowanych wyników między sobą. Przyczyną jest fakt, że publikacje te dotyczą głównie populacji ludzi chorych. W większości przypadków są to ludzie starsi obojga płci. Dlatego w tabeli I zamieszczono kolumnę „Uwagi”, w której opisano obiekt badań. Zawarto w niej wszystkie prace zarejestrowane w bazie PubMed do połowy 2010 roku, przytaczające liczbowe wartości stężenia ADMA w osoczu osób niepalących i palących.

**Tabela I.** Dane literaturowe dotyczące stężenia ADMA w osoczu krwi osób niepalących i palących  
**Table I.** Literature data on plasma ADMA levels changes in non-smokers and smokers.

Pierwszy autor [rok publikacji]	Liczba badanych (płeć, wiek <sup>1</sup> )	Stężenie ADMA niepalący $\mu\text{mol/l}$	Stężenie ADMA palący $\mu\text{mol/l}$	Zróżnicowanie [%]	p	Uwagi
Eid, 2004	563 (M, 70)	1,42	1,32	-7,0	0,037	Pacjenci z wysokim profilem ryzyka choroby wieńcowej; po skorygowaniu stężenia ADMA ze względu na ciśnienie, BMI, kreatyninę, insulinę p=0,14
Schnabel, 2005	1874 (K/M, 61)	0,61	0,64	4,9	0,002	Pacjenci z chorobą wieńcową, przed i po incydentach wieńcowych
Zhang, 2006	22 (M, 39)	0,61	1,10	80,3	0,01	Zdrowi mężczyźni, palacze wypalali $\geq 20$ papierosów/dzień
Wang, 2006	108 (K/M, 62)	0,43	0,47	9,3	0,03	Pacjenci skierowani na angioplastykę z powodu bólu w klatce piersiowej, do badań zakwalifikowano również pacjentów z chorobą trójnaczyńową.
Mass, 2007	88 (M, 61) 254 (M, 62)	0,88 0,80	0,69 0,74	-21,6 -7,5	<0,001 NS	Pacjenci z przypadkami incydentów wieńcowych (zawałem serca, również ze skutkiem śmiertelnym, oraz nagłą śmiercią sercową). Osoby bez incydentów wieńcowych będące grupą kontrolną
Meinitzer, 2008	3238 (K/M, 63)	0,815	0,840	3,1	0,001	2543 pacjentów ze stwierdzoną chorobą sercowo-naczyniową, 695 bez stwierdzonej choroby, dane dotyczą 1165 nigdy nie palących i 632 palaczy czynnych, pozostali badani to byli palacze
Sobczak, 2009	120 (M, 37)	0,39	0,42	7,7	NS	Osoby zdrowe

K – kobiety; M – mężczyźni; p – poziom istotności; 1) średnia wieku;  
F – female; M – male; p – significance level; 1) mean age;

Spośród pozycji zamieszczonych w tabeli I wyróżnia się praca Zhanga i wsp. [31]. Zróżnicowanie stężenia ADMA w osoczu osób palących i niepalących różnicuje się o ponad 80%, co znacznie odbiega od pozostałych wyników. Do pracy tej ustosunkował się zespół dr Kielsteina [32]. W liście do redakcji zarzuca autorom brak nawiązania do wyników badań klinicznych oraz zwraca uwagę na nieliczną grupę osób badanych. Rzeczywiście, w świe-

tle uzyskanych wyników i danych literaturowych te rezultaty badań wydają się mało wiarygodne.

Wyniki badań zamieszczone w drugim wierszu tabeli I, na które warto zwrócić uwagę, pochodzą z artykułu Meinitzera i wsp. [18]. Zawiera on najobszerniejsze, jak do tej pory, badania oznaczenia stężenia ADMA w osoczu. Wieloczynnikowa regresja liniowa wykazała, że czynniki predykcyjne stężenia ADMA układały się w kolejności: szybkość przesączania

kłębkowego ⇒ Hcy ⇒ wiek ⇒ CRP ⇒ HDL-C ⇒ płeć ⇒ triacyloglicerydy ⇒ palenie tytoniu. Zatem według tych badań palenie tytoniu jest jednym z najsłabszych czynników prognostycznych stężenia ADMA.

Wyniki uzyskane w naszym ośrodku wskazują, że czynniki predykcyjne stężenia ADMA w osoczu palaczy czynnych układają się w kolejności: Hcy ⇒ wiek ⇒ kotynina ⇒ BMI, ale są nieznamienne. Tak sama kolejność występuje w grupie palaczy biernych, tutaj jednak własności predykcyjne Hcy są znamienne. W żadnej z przytaczanych powyżej prac nie wyodrębniano grupy palaczy biernych [33].

Oprócz pozycji cytowanych w tabeli I opublikowano kilka prac, w których autorzy odnoszą się do relacji ADMA vs. palenie papierosów, jednak bez podawania wartości liczbowych. Jednym z pierwszych takich doniesień była praca Lu i wsp. [17]. Szukając odpowiedzi na pytanie, czy ADMA może być czynnikiem predykcyjnym wyniku angioplastyki u pacjentów cierpiących na przewlekłą dusznicę bolesną, autorzy przebadali 153 osoby. Stwierdzili wzrost poziomu ADMA niezależny od innych potencjalnych czynników występujących w wieloczynnikowej regresyjnej analizie Coxa, takich jak: wiek, hipercholesterolemia, używanie stentów i palenie papierosów.

W 2003 roku Schiel i wsp. [34] przebadali 554 pacjentów z cukrzycą typu I i niewydolnością nerek. Uzyskane wyniki wykazały wyższe stężenia Hcy, ADMA i SDMA w osoczu pacjentów w porównaniu do kontroli, ale w żadnej z badanych grup nie stwierdzono znamiennego wpływu palenia tytoniu na mierzone parametry.

W programie określonym akronimem CARDIAC (*Coronary Artery Risk Determination Investigating the Influence of ADMA Concentration*) przebadano 816 osób pod kątem zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu a ryzykiem choroby wieńcowej [35]. Zanotowano znamienne niższe stężenie ADMA w osoczu palaczy czynnych w stosunku do osób nigdy niepalących. Jednakże w grupie byłych palaczy stężenie ADMA było wyższe w odniesieniu do niepalących.

Tonstad i wsp., [36] wytypowali grupę 207 kobiet i mężczyzn w wieku 18–39 lat z wysokim ryzykiem choroby wieńcowej (dyslipidemia, obciążający wywiad rodzinny w kierunku choroby wieńcowej). W analizie wieloczynnikowej stwierdzili, że stężenie ADMA związane jest tylko z BMI, natomiast niezwiązane jest z wiekiem, płcią i liczbą wypalanych papierosów.

W celu zaprezentowania pełnego obrazu badań, związanych z wpływem palenia tytoniu na poziom ADMA, należy przedstawić doniesienia, opisujące doświadczenia ze zwierzętami lub prowadzone

w oparciu o hodowlę komórkową. Przed ponad dekadą Hamasaki i wsp. [37] stwierdzili wzrost stężenia wewnątrzkomórkowej ADMA po długotrwałej ekspozycji królików na działanie nikotyny. W 2006 roku Jiang i wsp. [38] zaobserwowali znamienne wzrost stężenia ADMA w osoczu szczurów, po czterotygodniowym podawaniu zwierzętom nikotyny w dawce 5 mg/kg/dzień. Autorzy sugerują, że nikotyna moduluje szlak metaboliczny ADMA w komórkach śródbłonna poprzez aktywację receptorów  $\alpha$ -7-nikotynowoacetylocholinowych.

Inkubacja komórek ludzkiego endotelium (komórki EAhy 926) przez 48 godzin z kondensatem dymu papierosowego o stężeniu 1,0 i 10,0 mg/l prowadziła do podwyższenia stężenia ADMA w medium komórkowym odpowiednio o 28,2% i 24,8%. Niższe stężenia dodawanego kondensatu (0,1 mg/l) nie wywierały żadnego efektu [39]. Używając tego samego typu komórek ludzkiego śródbłonna, Zhang i wsp. [28] zanotowali w medium komórkowym aż 128% wzrost stężenia ADMA po dodaniu do medium 10% ekstraktu dymu tytoniowego.

## Wpływ dymu tytoniowego na stężenie SDMA w osoczu

Powyższy temat w piśmiennictwie traktowany jest w sposób marginalny. Jedynie w dwóch z omówionych powyżej pozycji pojawia się ocena wpływu dymu tytoniowego na stężenie SDMA. Wang i wsp. [40] zaobserwowali nieznamiennie ( $p=0,58$ ) większe o 2,7% stężenie SDMA w osoczu palaczy w porównaniu do niepalących (odpowiednio 0,38 vs. 0,37  $\mu\text{mol/l}$ ). Natomiast w hodowli ludzkich komórek śródbłonna, po dodaniu do medium hodowlanego 10% ekstraktu dymu tytoniowego, zaobserwowano nieznamienny wzrost stężenia SDMA o 43,7% (odpowiednio 0,102 vs. 0,071 nmol/mg białka) [31].

Równoległe przeprowadzone badania w Śląskim Uniwersytecie Medycznym, wskazują na większe stężenie SDMA w osoczu palaczy biernych (o 13,5%) oraz osoczu palaczy czynnych (o 8,1%), jednakże obie zmiany są nieznamienne. Dodatkowo nie odnotowano korelacji pomiędzy stężeniem SDMA a stężeniem kotyniny w osoczu, z czego wynika, że dym tytoniowy prawdopodobnie nie wpływa na stężenie SDMA w osoczu [33].

Reasumując fakty opisane w wyżej cytowanych artykułach oraz badania własne można stwierdzić, że wpływ dymu tytoniowego na poziom ADMA i SDMA w osoczu jest w chwili obecnej niedostatecznie rozpoznany. Obserwowane zmiany osoczowego stężenia tych związków pod wpływem dymu tytoniowego są nieznaczne. Trzeba jednak pamiętać, że chociaż wpływ pojedynczego czynnika na ryzyko ogólne może być niewielki, to rośnie znacznie



w przypadku współistnienia innych czynników ryzyka. Dlatego wydaje się celowym badanie, w miarę możliwości, stężeń metylowych pochodnych argininy szczególnie w grupach osób zawodowo narażonych na czynniki miażdżycogenne.

## Wykaz piśmiennictwa

1. Sobczak A.: Kotynina, homocysteina i alfa-tokoferol jako markery przewlekłego narażenia na dym tytoniowy. *Ann Acad Med. Siles* 2005; 59, Supl.92: 1-56.
2. Podolec P., Kopec G., Pajak A., i wsp.: Wytyczne Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia dotyczące oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. *Kardiologia Pol* 2007; 65: 100-104.
3. Grillo M.A., Colombatto S.: Arginine revisited: minireview article. *Amino Acids* 2004; 26: 345-351.
4. Cooke J.P.: Asymmetrical dimethylarginine: the über marker? *Circulation* 2004; 109: 1813-1818.
5. Vallance P., Leone A., Calver A., et al.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
6. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tsao P.S., et al.: An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll. Cardiol* 2000; 36: 2287-2295.
7. Böger R.H., Sydow K., Borlak J., et al.: LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87: 99-105.
8. Leiper J.M., Santa Maria J., Chubb A., et al.: Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343: 209-214.
9. MacAllister R.J., Parry H., Kimoto M., et al.: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-1540.
10. Cooke J.P.: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.
11. Böger R.H.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006; 38: 126-136.
12. Liu Q., Gross S.S.: Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* 1996; 268: 311-324.
13. Bańkowski E.: *Biochemia. Podręcznik dla studentów medycyny.* Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004: 584.
14. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Thiele W., et al.: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95: 2068-2074.
15. Azuma H., Sato J., Hamasaki H., et al.: 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.
16. Böger R.H.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med* 2005; 10: 19-25.
17. Lu T.M., Ding Y.A., Lin S.J., et al.: Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003; 24: 1912-1919.
18. Meinitzer A., Seelhorst U., Wellnitz B., et al.: Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007; 53: 273-283.
19. Stühlinger M.: Asymmetrische dimethyl arginin (ADMA): a novel cardiovascular risk factor? *Wien Med Wochenschr* 2007; 157: 57-60.
20. Mangoni A.A.: The emerging role of symmetric dimethylarginine in vascular disease. *Adv Clin Chem* 2009; 48: 73-94.
21. Surdacki A.: L-arginine analogs – inactive markers or active agents in atherosclerosis? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 302-311.
22. Bode-Böger S.M., Scalera F., Kielstein J.T., et al.: Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1128-1134.
23. Kiechl S., Lee P., Santer G., et al.: Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* 2009; 205: 261-265.
24. Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M., et al.: Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32.
25. Sobczak A.: The effects of tobacco smoke on the homocysteine level – a risk factor of atherosclerosis. *Addict Biol* 2003; 8: 147-158.
26. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Sydow K., et al.: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1557-1564.
27. Böger R.H., Lentz S.R., Bode-Böger S.M., ET AL.: Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100: 161-167.
28. Zhang C., Cai Y., Adachi M.T., et al.: Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001; 276: 35867-35874.
29. Stühlinger M.C., Tsao P.S., Her J.H., ET AL.: Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569-2575.
30. Dayal S., Lentz S.R.: ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005; 10: 27-33.
31. Zhang W.Z., Venardos K., Chin-Dusting J., et al.: Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006; 48: 278-285.
32. Kielstein J.T., Peter C., Adams M.C.: Cigarettes and ADMA: the smoke hasn't cleared yet. *Hypertension* 2006; 48: 20.
33. Sobczak A., Goniewicz M., Szołtysek-Bojdos I.: ADMA and SDMA levels in healthy men exposed to tobacco smoke. *Atherosclerosis* 2009; 205: 357-359.
34. Schiel R., Franke S., Busch M., et al.: Effect of smoking on risk factors for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus and renal insufficiency. *Eur J Med Res* 2003; 8: 283-291.
35. Lenzen H., Tsikas D., Böger R.H.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the risk for coronary heart disease: the multicenter CARDIAC study. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 45-49.
36. Tonstad S., Thorsrud H., Torjesen P.A., et al.: Do novel risk factors differ between men and women aged 18 to 39 years with a high risk of coronary heart disease? *Metabolism* 2007; 56: 260-266.
37. Hamasaki H., Sato J., Masuda H., et al.: Effect of nicotine on the intimal hyperplasia after endothelial removal of the rabbit carotid artery. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 653-659.
38. Jiang D.J., Jia S.J., Yan J., et al.: Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 683-693.

39. Maas R., Schulze F., Baumert J., et al.: Asymmetric dimethylarginine, smoking, and risk of coronary heart disease in apparently healthy men: prospective analysis from the population-based Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease/Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg study and experimental data. Clin Chem 2007; 53: 693-701.
40. Wang J., Sim A.S., Wang X.L., et al.: Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. Atherosclerosis 2006; 184: 383-388.

*Adres do korespondencji*

*Dr hab. Andrzej Sobczak  
Zakład Szkodliwości Chemicznych  
i Toksykologii Genetycznej  
Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego  
ul. Kościelna 13, 41-200 Sosnowiec,  
e-mail: a.sobczak@imp.sosnowiec.pl  
tel. 607755688*