

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Význam asymetrického dimethylargininu v ateroskleróze

Anna Runčíková

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

The importance of asymmetric dimethylarginine in atherosclerosis

Anna Runčíková

Bachelor Thesis

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna Runčíková**  
Osobní číslo: **C17209**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Význam asymetrického dimethylargininu v ateroskleróze**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Na základě informací z literatury uspořádejte základní informace o vlastnostech, významu a využití asymetrickém dimethylargininu.
2. Blíže se zaměřte na jeho roli v ateroskleróze a pokuste se přehledně zpracovat dostupné informace.
3. Věnujte pozornost také metodice stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě (séru), včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:


Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 7. 2019

Anna Runčíková

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Pavle Královcové, Ph.D. za odborné vedení a projevenou trpělivost při vypracování mé bakalářské práce.

Velké díky patří také mé rodině a přátelům za nepostradatelnou pomoc a podporu během celého studia.

## ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na asymetrický dimethylarginin a jeho roli v ateroskleróze. Práce se věnuje významu a vlastnostem asymetrického dimethylargininu, popisu aterosklerózy a následně propojení asymetrického dimethylargininu s aterosklerózou. V poslední části práce jsou popsány nejčastější metody stanovení asymetrického dimethylargininu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

asymetrický dimethylarginin, ateroskleróza, endothelová dysfunkce, oxid dusnatý

## TITLE

The importance of asymmetric dimethylarginine in atherosclerosis

## ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on asymmetric dimethylarginine and its role in atherosclerosis. The work deals with the importance and properties of asymmetric dimethylarginine, description of atherosclerosis and consequently the connection of asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis. The last part describes the most common methods of determination of asymmetric dimethylarginine.

## KEYWORDS

asymmetric dimethylarginine, atherosclerosis, endothelial dysfunction, nitric oxide

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>1 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ V ŠIRŠÍM KONTEXTU</b> .....	<b>12</b>
1.1 L-ARGININ A JEHO METABOLISMUS .....	12
1.2 SYNTÁZA OXIDU DUSNATÉHO.....	13
1.3 OXID DUSNATÝ.....	14
1.4 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ.....	14
1.5 SYNTÉZA ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU .....	15
1.6 DEGRADACE ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU .....	16
<b>2 ATEROSKLERÓZA</b> .....	<b>18</b>
2.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE.....	18
2.2 OBECNÁ STRUKTURA CÉVNÍ STĚNY .....	18
2.3 MORFOLOGIE .....	19
2.4 PATOGENEZE .....	21
2.4.1 <i>Endothelová dysfunkce</i> .....	21
2.4.2 <i>Porucha metabolismu lipidů</i> .....	21
2.4.3 <i>Zánět</i> .....	22
2.4.4 <i>Hladké svalové buňky cév</i> .....	24
2.4.5 <i>Remodelace extracelulární matrix</i> .....	24
2.4.6 <i>Genetika</i> .....	25
<b>3 ADMA V KONTEXTU ATEROSKLERÓZY</b> .....	<b>27</b>
3.1 ENDOTHELOVÁ DYSFUNKCE .....	27
3.2 POMĚR L-ARGININ/ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ .....	28
3.3 TVORBA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU.....	29
3.4 OXIDOVANÝ LDL.....	30
3.5 SNÍŽENÁ SIGNALIZACE KASKÁDY NO <sup>•</sup> -CGMP-PROTEINOVÁ KINÁZA G .....	30
3.6 AKTIVITA DIMETHYLARGININ DIMETHYLAMINOHYDROLÁZY .....	31
3.7 FIBROTIZACE.....	31
<b>4 STANOVENÍ ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU</b> .....	<b>33</b>



4.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	33
4.1.1	<i>HPLC s flourescenční detekcí</i> .....	34
4.1.2	<i>HPLC s hmotnostní detekcí</i> .....	35
4.1.3	<i>HPLC s elektrochemickou detekcí</i> .....	36
4.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	37
4.2.1	<i>GC s tandemovou hmotnostní detekcí</i> .....	38
4.2.2	<i>GC s hmotnostní detekcí</i> .....	38
4.3	ELISA .....	39
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>42</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Metabolické dráhy L-argininu, upraveno dle [2] .....	12
<b>Obrázek 2</b> Chemická struktura methylovaných L-argininů [4] .....	13
<b>Obrázek 3</b> Metabolismus ADMA, upraveno dle [4] .....	17
<b>Obrázek 4</b> Obecná stavba cévní stěny, upraveno dle [16] .....	19
<b>Obrázek 5</b> Morfologická stádia aterosklerózy, upraveno dle [13] .....	20
<b>Obrázek 6</b> Metabolické dráhy ovlivněné ADMA, upraveno dle [5] .....	30

## SEZNAM ZKRATEK

ADMA	asymetrický dimethylarginin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DDAH	dimethylarginin dimethylaminohydroláza
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GC	plynová chromatografie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
L-NMMA	NG-monomethyl-L-arginin
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
NO <sup>•</sup>	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoxid
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrit
PRMT	protein-arginin methyltransferáza
SDMA	symetrický dimethylarginin
TNF- $\alpha$	tumor nekrotický faktor $\alpha$

## ÚVOD

Asymetrický dimethylarginin je sloučenina, jejíž význam zkoumá vědecká společnost již řadu let. Jako kompetitivní inhibitor enzymu syntázy oxidu dusnatého je asymetrický dimethylarginin schopen snížit produkci oxidu dusnatého, který je důležitým přirozeným endogenním vazodilatátorem a podílí se na udržení cévní homeostázy. Jakmile je tato homeostáza narušena, může docházet k rozvoji patogeneze celé řady onemocnění, mimo jiné i aterosklerózy.

Ateroskleróza je dynamicky se vyvíjející patologický proces, který vede k ukládání látek tukové povahy, rozvoji zánětlivých změn a tkáňové přestavbě v cévní stěně. Předpokladem pro rozvoj tohoto onemocnění je narušení cévní homeostázy vedoucí k poškození endothelu a jeho dysfunkci. Ateroskleróza je onemocnění vyskytující se napříč všemi vyspělými zeměmi světa a je také jednou z hlavních příčin celosvětové úmrtnosti. I proto je výzkum asymetrického dimethylargininu, jako prediktivního markeru kardiovaskulárních onemocnění, potažmo aterosklerózy, tak důležitý.

Cílem bakalářské práce je uvést základní informace o vlastnostech, významu a využití asymetrického dimethylargininu a přiblížit jeho roli v patogenezi aterosklerózy. Pozornost je také věnována nejčastějším metodám stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě, včetně podmínek pro odběr a zpracování vzorku.

# 1 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ V ŠIRŠÍM KONTEXTU

## 1.1 L-arginin a jeho metabolismus

L-arginin je semiesenciální aminokyselina. Jeho endogenní syntéza de novo je v dospělosti dostatečná, avšak v období dospívání je potřeba ho přijímat i v potravě. Plazmatická koncentrace L-argininu závisí na dietním příjmu, endogenní produkci, katabolismu a transportu přes buněčné membrány. Fyziologické hodnoty plazmatické koncentrace se pohybují v rozmezí od 50 do 100  $\mu\text{mol/l}$ . Intracelulární koncentrace L-argininu je mnohonásobně vyšší, přibližně 1  $\text{mmol/l}$ . [1]

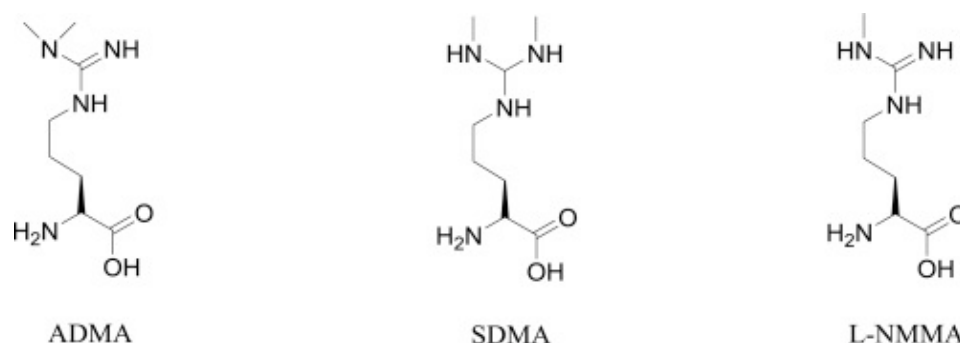
Hlavní metabolické reakce L-argininu jsou katalyzovány čtyřmi enzymy: argináza, syntáza oxidu dusnatého (NOS), arginin dekarboxyláza a arginin:glycin amidinotransferáza. Výslednými produkty reakce katalyzované arginázou jsou L-ornitin a močovina. NOS katalyzuje reakci, kdy vzniká L-citrulin a oxid dusnatý ( $\text{NO}^*$ ). Při metabolické reakci katalyzované arginin dekarboxylázou vzniká produkt agmatin, který může být dále metabolizován na polyaminy putrescin, spermidin a spermin. Enzym arginin:glycin amidinotransferáza katalyzuje vznik L-ornitinu a kreatinu. Všechny výše popsané reakce jsou schématicky znázorněny na obrázku 1. [1, 2]



Obrázek 1 Metabolické dráhy L-argininu, upraveno dle [2]

Významnou roli v metabolismu L-argininu hraje také skupina enzymů označovaná jako protein-arginin methyltransferázy (PRMT). Tyto enzymy katalyzují přenos methylových skupin na L-arginin, který je zabudovaný v proteinu. Tato reakce je

důležitou posttranslační modifikací, jejímž prostřednictvím dochází nejen k regulaci transkripce DNA, ale také regulaci funkce proteinů a buněčné signalizace. V savcích buňkách se skupina enzymů PRMT dělí ještě do dalších dvou podskupin PRMT I a PRMT II v závislosti na tom, jaký produkt při enzymatické reakci vznikne. Oba typy PRMT katalyzují tvorbu NG-monomethyl-L-argininu (L-NMMA) z L-argininu. Reakcí katalyzovanou PRMT I dochází další methylací L-NMMA k syntéze asymetrického dimethylargininu (ADMA) a reakcí katalyzovanou PRMT II je další methylací L-NMMA syntetizován symetrický dimethylarginin (SDMA), přičemž SDMA je strukturálním izomerem ADMA. Chemická struktura methylovaných L-argininů je znázorněná na obrázku 2 a reakce katalyzované PRMT ilustruje obrázek 3. Po transportu do cytoplazmy soutěží L-NMMA a ADMA s přirozeným substrátem NOS L-argininem o vazebné místo a působí tak jako kompetitivní NOS inhibitory. Zatímco SDMA přímo neinhibuje aktivitu NOS, může nepřímo potlačit funkci NOS inhibicí kationtových transportérů aminokyselin, kdy dojde k zamezení vstupu L-argininu do buňky. [3, 4, 5, 6]



*Obrázek 2 Chemická struktura methylovaných L-argininů [4]*

## 1.2 Syntéza oxidu dusnatého

Syntéza oxidu dusnatého je enzym, který katalyzuje tvorbu L-citrulinu a  $\text{NO}^\bullet$  z L-argininu jako substrátu. Tato chemická reakce je znázorněna na obrázku 1. Tento enzym tvoří tři izoformy, kterými jsou neuronální NOS, endotheliální NOS a indukovatelná NOS. Neuronální NOS je exprimována především v neuronálních buňkách a endotheliální NOS je exprimována především ve vaskulárních endoteliálních buňkách. Jelikož jsou endotheliální NOS i neuronální NOS konstitutivně exprimovány v nižších koncentracích i v mnoha jiných typech buněk, nazývají se také obecně

konstitutivní NOS. Indukovatelná NOS je exprimována za nepříznivých podmínek, jako zánětlivé a jiné stresové stavy především v makrofázích a T-lymfocytech. [5]

### 1.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je signální plynná molekula, která se účastní mnoha kardiovaskulárních fyziologických procesů, včetně udržení normální funkce endotelu, či regulace angiogeneze a zánětu. NO• je produkován v endothelových buňkách reakcí katalyzovanou enzymem endotheliální NOS za buněčného redoxního stavu, který je známý jako redoxní signální transdukcce na bázi NO•. Oxidovaný LDL jako silný oxidant může tuto signální transdukcí významně narušit, což má za následek odpojení endotheliální NOS z reakce a zastavení syntézy NO•. Dále je produkce NO• regulována dostupností L-argininu, koncentrací NOS, aktivitou NOS, kofaktorem NOS tetrahydrobiopterinem a endogenními NOS inhibitory ADMA a L-NMMA. [5, 7]

Oxid dusnatý dále stimuluje rozpustnou guanylátcyklázu za vzniku cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). V přítomnosti cGMP následně dojde k aktivaci proteinové kinázy G, která je na cGMP závislá. Aktivace proteinové kinázy G vede k relaxaci buněk hladkého svalstva a snížení vaskulární rezistence. Výsledkem je vasodilatace cévy a zvýšení krevní perfuze ve tkáních. Celý tento proces je nazván kaskáda NO•-cGMP-proteinová kináza G. [5]

Další funkcí NO• je regulace prostřednictvím S-nitrosylace, jako posttranslační modifikace proteinů. Při S-nitrosylaci dochází ke kovaletnímu připojení nitrosylové skupiny ke specifické thiolové skupině cysteinu, který je zabudován ve struktuře proteinu. Tato modifikace chrání klíčové cysteinové zbytky bioaktivních proteinů před nevratným oxidačním poškozením a hraje klíčovou roli v regulaci aktivity enzymů, interakce proteinů a celkové stability kardiovaskulárního systému. Například S-nitrosylace vápníkových kanálů typu L snižuje ventrikulární arytmiie, S-nitrosylace ryanodinového receptoru snižuje únik diastolického vápníku a S-nitrosylace G-proteinu spřaženého s receptorem reguluje srdeční ischemické poškození. [5, 7]

### 1.4 Asymetrický dimethylarginin

2-amino-5-[(amino-dimethylaminomethylen)amino]pentanová kyselina nebo N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-arginin, také známý jako asymetrický dimethylarginin je derivát

semiesenciální aminokyseliny L-argininu. Chemický vzorec ADMA je zakreslen na obrázku 2. [8]

První zprávu o přirozeném výskytu methylovaného argininu v lidského organismu vytvořil Kakimoto a spolupracovníci. Ti identifikovali, purifikovali a charakterizovali ADMA ze vzorku moči 13 subjektů. Protože stanovené koncentrace byly relativně konstantní a nebyly výrazně ovlivněny stravou, byl učiněn závěr, že původ této nové sloučeniny je endogenní, a že ADMA byl pravděpodobně vytvořen methylací argininových zbytků proteinů, které se následně enzymaticky rozštěpily. Enzymatická methylace proteinových frakcí získaných z telecího thymu byla poprvé publikována Paikem a spolupracovníky. Konečně nejpozoruhodnějším závěrem bylo, že ADMA v moči může odrážet rychlost methylace tělních bílkovin, a že rychlost jeho obratu a stanovení této látky může být důležité pro studium několika patologických onemocnění. První důkaz, že ADMA souvisí s rozvojem nemocí byl spojen s Patrickem Vallancem a spolupracovníky a poukazuje na zvýšené množství ADMA v plazmě od pacienta s chronickým selháním ledvin. Ve stejném roce tato skupina zjistila, že endogenní ADMA inhibuje syntézu NO<sup>•</sup>. [8]

Dnes už je dobře známo, že ADMA je silný endogenní kompetitivní inhibitor, který soutěží o vazbu do aktivního místa NOS s přirozeným substrátem tohoto enzymu L-argininem. Po vazbě ADMA na NOS poklesne aktivita tohoto enzymu, což vede ke snížené produkci signálních molekul NO<sup>•</sup>. ADMA hraje klíčovou roli v patogenezi různých kardiovaskulárních onemocnění spojených s endotelovou dysfunkcí, kam řadíme mimo jiné dynamicky a dlouhodobě se vyvíjející onemocnění – aterosklerózu. [4, 5]

V současné době se plazmatická koncentrace ADMA pohybuje kolem hodnoty 0,5 μmol/l, avšak se stále lepší citlivostí metod se tato průměrná hodnota postupně spíše snižuje. [9, 10, 11, 12]

## **1.5 Syntéza asymetrického dimethylargininu**

Asymetický dimethylarginin je syntetizován intracelulárně z prekurzoru L-argininu v reakci katalyzované enzymem PRMT I. PRMT I katalyzuje syntézu jak ADMA, tak L-NMMA a obě tyto sloučeniny následně soutěží s přirozeným NOS substrátem L-argininem o vazebné místo a působí tak jako kompetitivní NOS inhibitory. Syntéza ADMA je znázorněná na obrázku 3. Plasmatická a intracelulární koncentrace ADMA je však asi desetkrát vyšší než koncentrace L-NMMA, a proto je ADMA



považován za hlavní typ endogenních NOS inhibitorů v lidském organismu. Enzym PRMT přenáší methylové skupiny na L-arginin v době, kdy je tato aminokyselina ještě vázána v polyptidovém řetězci bílkoviny a jedná se o posttranslační modifikaci tohoto proteinu. Po lýze a degradaci takového proteinu v proteasomu se do cytoplazmy uvolní samotný cytoplasmatický protein a volné methylargininy včetně ADMA. Do extracelulárního prostoru je ADMA následně přepraven pomocí kationtových transportérů aminokyselin. [4, 8]

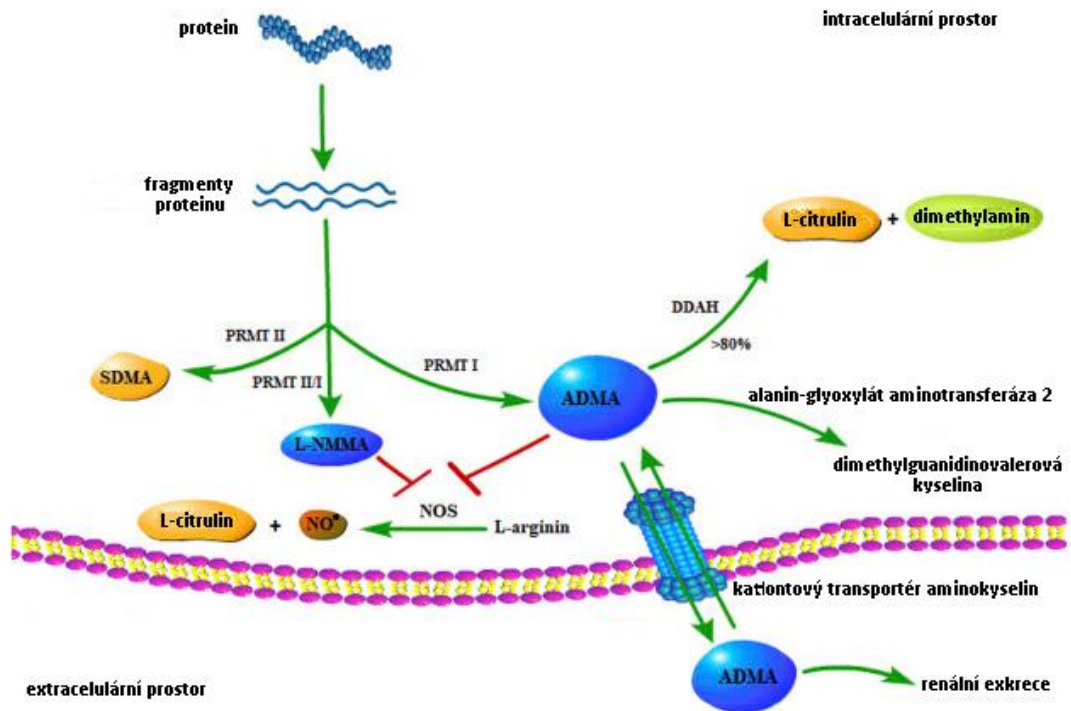
## 1.6 Degradace asymetrického dimethylargininu

Hlavními orgány pro degradaci ADMA a dalších methylargininů jsou ledviny a játra, přičemž degradační procesy, kterým ADMA podléhá, jsou katalyzovány intracelulárními enzymy dimethylarginin dimethylaminohydrolázou (DDAH) a alanin-glyoxylát aminotransferázou 2. Lidský enzym DDAH tvoří dvě izoformy DDAH1 a DDAH2, přičemž DDAH1 je hlavním enzymem zajišťujícím degradaci ADMA. Zdravý dospělý produkuje asi 300  $\mu\text{mol}$  ( $\sim 60$  mg) ADMA denně. DDAH1 katalyzuje hydrolýzu ADMA na L-citrulin a dimethylamin. Degradační produkt dimethylamin je následně vyloučen ledvinami. Touto cestou je degradováno přibližně 80% celkové denní koncentrace ADMA. Zbytek ADMA přechází z cytoplazmy do extracelulárního prostoru a zde opět směřuje k renální exkreci. Celý degradační proces je schématicky znázorněn na obrázku 3. [4, 8, 9]

Je třeba poznamenat, že DDAH je také aktivní vůči L-NMMA, ale nemůže metabolizovat SDMA. To částečně vysvětluje, proč jsou plazmatické koncentrace SDMA podobné koncentracím ADMA, a to navzdory tomu, že během metylace L-argininu vzniká pravděpodobně mnohem více ADMA. U lidí hrají ledviny důležitou roli v eliminaci dimethylargininů z těla vylučováním ADMA i SDMA do moči. Čistá renální extrakce z arteriálního zásobování byla však významně vyšší u ADMA ve srovnání s SDMA, což naznačuje, že u ADMA je do degradačního procesu zapojeno nejen renální vylučování, ale také aktivní metabolismus uvnitř ledvin, zprostředkovaný nejpravděpodobněji opět DDAH1. U SDMA, který není degradován DDAH, je hlavní vylučovací cestou pouze renální exkrece. [4, 8, 9]

Studie ukázaly, že dalším orgánem zapojeným do degradace a eliminace jak ADMA, tak SDMA jsou lidská játra. K degradaci dochází pomocí katalýzy enzymem alanin-glyoxylát aminotransferáza 2 za vzniku  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -dimethylguanidinovalerové

kyseliny, jak je patrné na obrázku 3. Bylo prokázáno, že hladiny ADMA v plazmě a moči jsou zvýšené u pacientů s terminálním onemocněním jater. Také se prokázalo, že u pacientů čekajících na transplantaci jater byly předoperační hladiny ADMA vysoce zvýšené, zatímco po transplantaci se významně snížily. [4, 8, 9]



Obrázek 3 Metabolismus ADMA, upraveno dle [4]

## **2 ATEROSKLERÓZA**

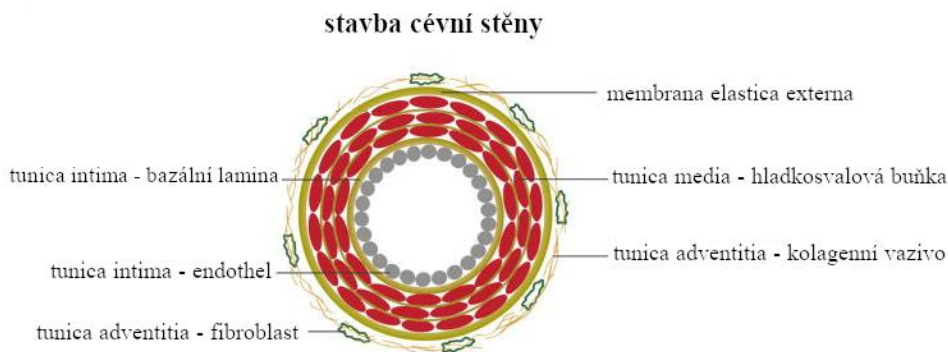
### **2.1 Základní informace**

Ateroskleróza je komplexní, dynamický a dlouhodobě se vyvíjející proces složený z faktorů buněčných, metabolických a zánětlivých. Skleróza, tedy kornatění je charakterizována tvorbou vazivových plátů lokalizovaných ve stěně velkých elastických a středně velkých svalových arterií. V těchto vazivových plátech se zpravidla hromadí látky tukové povahy tvořící v centru kašovitou hmotu. Odtud název ateroskleróza, z řeckého athera = kaše. Toto onemocnění tvoří patologický základ pro většinu periferních vaskulárních, koronárních a cerebrovaskulárních onemocnění a je jednou z hlavních příčin úmrtnosti po celém světě. Zatímco se do nedávna ještě předpokládalo, že jde o pasivní proces a nevyhnutelný aspekt stárnutí, nyní je jasné, že se ve skutečnosti jedná o souhru celé řady biologických procesů jako jsou endothelová dysfunkce, poruchy metabolismu lipidů, aktivace mnoha typů buněk a jejich interakce, zánět, remodelace matrixu, ale i genetika, a že je tedy do značné míry možné rozvoj aterosklerózy ovlivnit. V současné době se pracuje na vývoji a syntéze různých účinných látek, které například snižují hladinu cholesterolu a na osvětě v oblasti zdravého životního stylu. Přesto je však pozorován pouze mírný pokles míry aterosklerózy a jejích klinických následků. [13, 14, 15]

### **2.2 Obecná struktura cévní stěny**

Céva je dutá trubice, ve které jsou na kolmém průřezu charakterizovány tři základní vrstvy. Vnitřní vrstva vystylající lumen cévy se nazývá tunica intima. Tunica intima se skládá z vrstvy endothelových buněk, bazální laminy a subendothelové vrstvy. Jednovrstevný plochý epitel – endothel vystylá lumen cévy. Tato vrstva je ukotvena na bazální lamině, která je produktem endothelu. Bazální lamina dále nasedá na subendothelovou vrstvu, která je tvořena řídkým kolagenním vazivem a může obsahovat ojedinělé hladkosvalové buňky. Střední vrstva, tedy tunica media, se skládá z obvodově orientovaných buněk hladké svaloviny. Tyto buňky produkují látky glykosaminoglykany, chondroitinsulfát a proteoglykany a tvoří z nich mezibuněčnou matrix. Vrstvou tunica media procházejí také elastická a retikulární vlána, která na okrajích mohou kondenzovat v membrana elastica interna a externa. Vnější vrstva tunica adventitia, se skládá z kolagenního vaziva, které tvoří extracelulární matrix,

z fibroblastů a progenitorových buněk. Obecná stavba cévní stěny je schématicky znázorněna na obrázku 4. [16]



*Obrázek 4* Obecná stavba cévní stěny, upraveno dle [16]

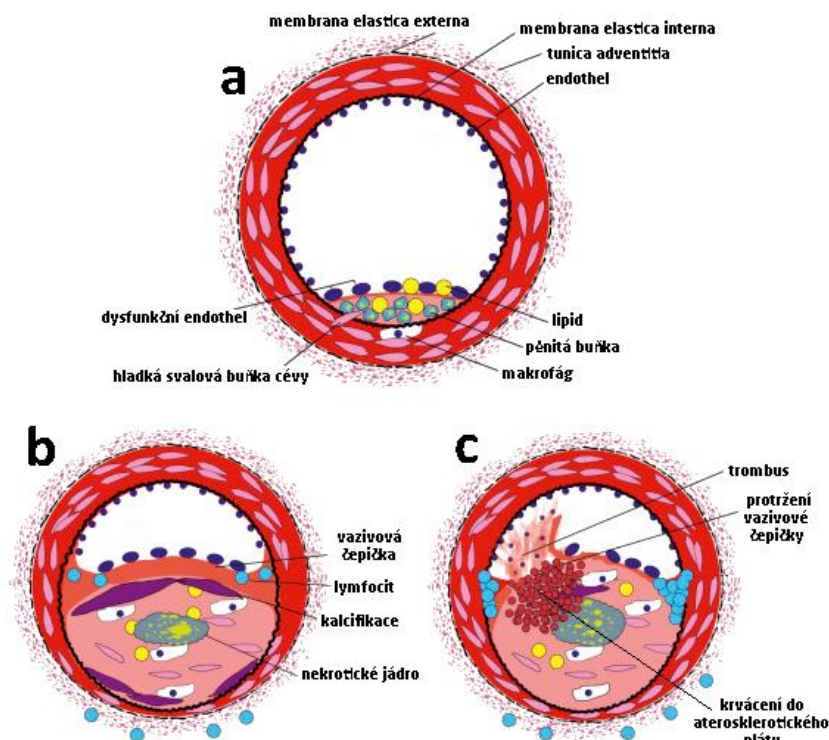
### 2.3 Morfologie

Morfologický obraz onemocnění se vyvíjí v určité posloupnosti. Jako první jsou patrné takzvané lipidní skvrny. Tyto skvrny vznikají nahromaděním pěníných buněk v tunica intima, mají žluté zabarvení a ve velkých elastických tepnách jako je aorta se mohou vyskytovat již od prvního roku života. Vlivem zvýšeného obsahu lipidních látek se v histologickém preparátu skvrny pozitivně barví tukovými barvivy. Vzhledem k tomu, že se tyto skvrny objevují i v populacích, kde se pokročilé formy aterosklerózy nevyskytují, například domorodé obyvatelstvo Afriky, převažuje názor, že se jedná o změnu reverzibilní. Předpokládá se tedy, že lipidní skvrna může být podkladem pro vznik aterosklerotického plátu, ale může také i vymizet. [15]

Dalším morfologickým stádiem aterosklerózy je aterosklerotický plát. Tato léze již vykazuje fibrotické změny a charakteristicky promínuje nad úroveň tunica intima. Aterosklerotický plát bývá tvořen vrstvou hyalinního vaziva s množstvím dalších buněk, jako jsou hladké svalové buňky cév, pěníné buňky a buňky imunitního systému. V centru takového plátu se nachází nekrotické kašovitě ložisko tvořené látkami tukové povahy, případně krystaly cholesterolu. Nad kašovitým ložiskem směrem do lumen cévy vzniká tenká vrstva hyalinního vaziva, která se nazývá vazivová čepička. Rozvojem aterosklerotické léze dochází také k útlaku svalové tunica media, která atrofuje a vazivově se mění. Z tunica adventitia prostupují do tunica media vasa vasorum a postupně prorůstají až do aterosklerotických lézí v tunica intima. Ve velkých elastických tepnách může celková přeměna a zeslabení tunica media, vlivem působení

krvního tlaku, vést až k vnějšímu vychlípění cévní stěny a vzniku aterosklerotické výdutě – aneuryzmatu. Aterosklerotický plát v raném a pozdním stádiu znázorňuje obrázek 5, část a,b. [15]

Posledním morfologickým stádiem aterosklerózy je komplikovaný plát. Tento plát podléhá dalším nežádoucím procesům, které mohou nakonec vést k fatálním následkům. Mezi takové komplikace patří zředovatění, vznik trombu, krvácení a dystrofická kalcifikace. Komplikovaný plát znázorňuje obrázek 5, část c. Podle velikosti vředu v aterosklerotické lézi dojde buď k obnažení subendothelového vaziva, které začne být náchylné ke vzniku trombů, nebo k úplnému prasknutí vazivové čepičky, kdy jednak může dojít ke krvácení z lumen do plátu a jednak k vylití kašovitého ložiska do lumen cévy, kdy hrozí jeho následná embolizace. Na obnaženém subendothelovém vazivu se může vytvořit trombus, který se buď zabuduje do cévní stěny, čímž zúží lumen cévy a způsobí následnou ischemii tkáně, nebo se trombus může utrhnout a putovat krevním řečištěm, až do tenkých cév, kde způsobí embolii. Další komplikací je protržení aterosklerotické výdutě a krvácení do tkání. Dystrofická kalcifikace je změnou nejpozdnější. Vápenné soli se vysrážejí v hyalinním vazivu či v kašovitém jádře a mohou tepnu změnit až v tuhý vápenatý váleček. [15]



**Obrázek 5** Morfologická stádia aterosklerózy, upraveno dle [13]

## **2.4 Patogeneze**

### **2.4.1 Endothelová dysfunkce**

Endothelová vrstva přichází přímo do styku s krví, je nesmáčivá a zajišťuje celou řadu funkcí. Mezi hlavní funkce patří pomoc při udržování cévní homeostázy, vylučování vazodilatačního NO•, jakož i vylučování vazokonstrikčních látek endothelinu a angiotensinu II. Sekrece NO• brání adhezi leukocytů k endotheliálním buňkám, udržuje hladkosvalové buňky cév v neproliferativním stavu a inhibuje agregaci destiček. Na zvířecích modelech s inhibovanou produkcí nebo sekrecí NO• došlo k následné vazokonstrikci a rozvoji hypertenze, ale také vznikly abnormality v interakcích leukocytů a trombocytů. Právě vazokonstrikční odezva a hypertenze patří k nejčasnějším patologickým stavům zaznamenaným u cévních onemocnění, které často předcházejí vzniku aterosklerotických lézí. Vazokonstrikce cévy a hypertenze totiž mění hemodynamiku krevního toku a výsledkem je změna laminárního proudění na proudění turbulentní. Na tyto změny proudění reagují endothelové buňky změnou genové exprese. Zatímco při laminárním proudění dochází k expresi Kruppel-like faktoru 2, který vykazuje ochranný účinek proti ateroskleróze prostřednictvím snížení zánětu, při turbulentním proudění dochází k aktivaci Nukleárního faktoru kappa B a k reorganizaci cytoskeletálních proteinů. [13,17]

### **2.4.2 Porucha metabolismu lipidů**

Poruchy metabolismu lipidů jsou obecně považovány za rizikový faktor pro rozvoj aterosklerózy. Je známo, že vysoké plazmatické koncentrace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) jsou aterogenní a na druhé straně lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) mají ateroprotekční účinky. Funkce HLD totiž spočívá ve zpětném transportu cholesterolu z periferních tkání do jater, kde dochází k jeho degradaci. Plazmatickou koncentraci HDL zvyšují statiny, ale také úprava dietního režimu a cvičení. Funkce statinů spočívá v inhibici enzymu HMG-CoA reductázy. Tento enzym katalyzuje syntézu cholesterolu a jeho inhibicí tedy dojde ke snížení hladiny LDL. Pokud se zvýší hladiny LDL v cirkulaci, začnou se ukládat a akumulovat v intimě cév. Naakumulované LDL částice obsahující cholesterol a fosfolipidy jsou náchylné k oxidaci enzymy myeloperoxidázou, lipoxygenázou, oxidázou NADPH a NOS. Oxidovaný LDL nadále významně narušuje redoxní stav v endothelových buňkách, který nazýváme redoxní signální transdukce na bázi NO•. Pokud je tato redoxní signální transdukce narušena, dojde k odpojení

endotheliální NOS a přeruší se syntéza NO<sup>•</sup>. Pokles aktivity endotheliální NOS a pokles tvorby NO<sup>•</sup> vedou opět k rozvoji endothelové dysfunkce a řadí se mezi jedny z hlavních faktorů podporujících rozvoj aterosklerózy. Při oxidaci vznikají nejen oxidované LDL částice, ale také reaktivní formy kyslíku. Tyto reaktivní formy jsou toxické a indukují dysfunkci endotelu, zánět a zvýšenou permeabilitu cév, což způsobí následnou migraci lymfocytů a makrofágů do stěny cévy. Makrofágy pohlcují částice LDL prostřednictvím endocytózy a následně je transportují do lysozomů, kde za normálních okolností podléhají degradaci. Protože jsou ale LDL částice oxidované, jsou k degradaci méně náchylné, a tak makrofág neustále pohlcuje nové LDL částice, aniž by je zvládal degradovat a mění se na pěnítu buňku. [13, 18]

### **2.4.3 Zánět**

Od pozorování Rudolfa Virchowa v padesátých letech 19. století je nyní dobře známo, že ateroskleróza není jen výsledkem akumulace lipidů, ale že především endothelová dysfunkce hraje klíčovou roli v rozvoji vrozených i získaných zánětlivých reakcí lokalizovaných v tunica intima. Při zánětu dochází k aktivaci endothelových buněk a buněk imunitního systému, které začnou produkovat celou řadu prozánětlivých molekul. Monocyty a leukocyty, které cirkulují v krevním oběhu, se začnou vázat na povrch aktivovaného endotelu, který produkuje molekuly buněčné adheze. Po adhezi na povrch endotelu působí na monocyty a leukocyty další molekuly – chemokiny, které tyto buňky přitahují do subendothelového prostoru cévy. Právě v tomto prostoru se začínají tvořit prvotní aterosklerotické léze. Mezi nejčastěji exprimované chemokiny v těchto lézích patří monocytární chemotaktický protein-1, faktor stimulující kolonie makrofágů a interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Monocytární chemotaktický protein-1 aktivuje integrin leukocytů a tím zajistí počáteční pevnou adhezi monocytů. Produkci faktoru stimulujícího kolonie makrofágů je podpořena syntéza scavenger receptoru a diferenciaci monocytů na tkáňové makrofágy. IFN- $\gamma$  dále podporuje zrání makrofágů, pohlcování oxidovaného LDL a jejich přeměnu na pěnítu buňky. I samy makrofágy produkují celou řadu cytokinů, jako interleukin 1, interleukin 6 a interleukin 12, podporujících zánět a rozvoj aterosklerotických lézí. Interleukin 1 zvyšuje expresi molekul buněčné adheze a reguluje aktivaci makrofágů a lymfocytů. Interleukin 6 se podílí na novotvorbě cév a indukuje expresi C-reaktivního proteinu a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Interleukin 12 se podílí na aktivaci T-lymfocytů. Dalším produktem makrofágů jsou enzymy metaloproteinázy, které remodelují extracelulární matrix, tedy subendothelový

prostor tvořený řídkým kolagenním vazivem a mohou tak oslabit stabilitu aterosklerotické léze. [13, 17, 19]

Přesto, že se neutrofilům v minulosti dostávalo jen malé pozornosti, nedávné pokroky v chápání mechanismů aterosklerózy dnes už řadí neutrofilů mezi jedny z důležitých faktorů přispívajících k rozvoji aterosklerózy. Tyto buňky tvoří první obrannou linii zánětu. Podobně jako monocyty jsou neutrofilů přitahovány do aterosklerotických lézí pomocí chemotaxe, zejména chemokiny produkovanými aktivovanými trombocyty. Kromě toho neutrofilů uvolňují granulované proteiny, jako je azurocidin, katepsin G a  $\alpha$ -defensiny. Tyto proteiny přitahují monocyty z krevního řečiště, podílejí se na aktivaci makrofágů a podporují jejich následnou přeměnu na pěníte buňky. [13, 17, 19]

Další zánětlivé buňky podporující vznik aterosklerotických lézí jsou T-lymfocyty. Většina T-lymfocytů exprimuje na svém povrchu znak CD-3 a T-buněčný receptor. Podle funkce a podle dalších exprimovaných CD znaků se dále T-lymfocyty dělí na pomocné T-lymfocyty, cytotoxické T-lymfocyty, supresorové T-lymfocyty a NK buňky. Pomocné T-lymfocyty exprimují znak CD-4<sup>+</sup> a cytotoxické T-lymfocyty exprimují znak CD-8<sup>+</sup>. Prostřednictvím T-buněčného receptoru interagují T-lymfocyty s antigen prezentujícími buňkami, kterými jsou makrofágy, dendritické buňky a B-lymfocyty. T-lymfocyty jsou producenty IFN- $\gamma$  a tumor nekrotického faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Tyto molekuly aktivují makrofágy, které následně prostřednictvím svých receptorů vychytávají oxidovaný LDL. Mohou ale také indukovat apoptózu makrofágů. Odumřelé makrofágy potom vytvářejí nekrotické jádro a snižují tím stabilitu aterosklerotické léze. TNF- $\alpha$  také zvyšuje expresi molekul buněčné adheze a stimuluje migraci buněk hladkého svalstva cév. [13, 17, 19]

Naproti T-lymfocytům je úloha B-lymfocytů, jako představitelů humorální imunity, v ateroskleróze spíše protektivní. Záleží však na početním zastoupení jednotlivých buněčných podtypů známých jako B1 a B2 buňky. Buňky B1 produkují převážně IgM protilátky, u kterých bylo prokázáno, že hrají ochrannou úlohu proti ateroskleróze tím, že rozpoznávají oxidované LDL částice. Na druhé straně většina studií ukázala, že buňky B2 produkující IgG a IgE protilátky aterosklerózu podporují. [13, 17, 19]

Potlačení zánětu na různých úrovních může tedy být novou terapeutickou strategií pro léčbu aterosklerózy v klinické praxi. Je však zapotřebí opatrnosti, protože utlumení zánětu může vyvolat i nežádoucí účinky jako například rozvoj infekce. [13, 17, 19]



#### **2.4.4 Hladké svalové buňky cév**

Stejně tak jako endothelové buňky přítomné ve stěně cévy se mohou aktivovat i hladké svalové buňky cév. V klidovém stádiu si hladké svalové buňky cév udržují kontraktilní fenotyp. To znamená, že dochází k expresi kontraktilních molekul aktinu a myosinu hladkého svalstva. Aktivované hladké svalové buňky cév však expresi těchto molekul redukují a vstupují do tzv. syntetického stavu, kdy proliferují a produkují proteiny extracelulární matrix. Touto činností se zvětšuje aterosklerotická léze, která je však strukturně stabilní. Aktivované hladké svalové buňky cév mohou, stejně jako makrofágy, přijímat lipidy a vytvářet pěníte buňky. Také pohlcování oxidovaných LDL částic potlačuje kontraktilní fenotyp, avšak naproti makrofágům mají hladké svalové buňky cév menší fagocitující kapacitu. Proliferaci a aktivaci hladkých svalových buněk cév podporují různé cytokiny a růstové faktory. Mezi ty nejdůležitější patří růstový faktor odvozený od krevních destiček, transformující růstový faktor  $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a základní fibroblastický růstový faktor. Opět platí, že hladké svalové buňky cév mohou podléhat apoptóze či nekróze a odumřelé buňky potom spoluúčastí na tvorbě nekrotického jádra snižují stabilitu aterosklerotické léze. Umírající hladké svalové buňky cév také snižují syntézu zánětlivého interleukinu 1, který dále podporuje zánět a endotelovou dysfunkci. [13]

#### **2.4.5 Remodelace extracelulární matrix**

Buněčné složky nacházející se uvnitř aterosklerotických lézí spolu interagují a aktivně se podílejí na remodelaci extracelulární matrix. Tato přestavba přitom může mít ochrannou i patologickou vlastnost. Záleží na tom, v jakém stádiu se onemocnění nachází. Například, zatímco kalcifikace snižuje pružnost tepen a přispívá ke stenóze, může také zajistit posílení aterosklerotického plátu a snížení rizika jeho prasknutí. Dokonce velké plochy kalcifikace, zejména v oblasti víčka aterosklerotického plátu, mohou být spojeny s lepší stabilitou. Degradaci extracelulární matrix katalyzuje rodina 23 strukturně příbuzných enzymů zvaných matrixové metaloproteinázy. Jedná se o proteolytické enzymy – endopeptidázy, které ke své aktivitě potřebují zinek. Významným producentem matrixových metaloproteináz jsou makrofágy. Předpokládá se, že klíčovou úlohu v rozvoji aterogeneze hrají především matrixové metaloproteinázy 1, 2, 8, 9 a 12. Kromě proteolytické aktivity zřejmě matrixové

metaloproteinázy podporují akumulaci makrofágů uvolněním růstových faktorů zachycených v extracelulární matrix. [13, 20, 21]

Další důležitou úlohu v remodelaci extracelulární matrix plní skupina proteinů zvaná kostní morfogenetické proteiny. Kostní morfogenetické proteiny patří do rodiny transformujícího růstového faktoru  $\beta$  a řídí jak fyziologickou, tak patologickou aktivaci osteogenní diferenciaci a kalcifikaci. Kostní morfogenetické proteiny 2 a 4 jsou detekovány v arteriálních stěnách jak v endothelu, tak v tunica intima a media. Aktivitu kostních morfogenetických proteinů reguluje matrixový GLA protein, který váže vápník, a tak zabraňuje kalcifikaci měkkých tkání včetně cév. Dokazují to i pokusy na myších, u kterých byla prokázána rozsáhlá arteriální kalcifikace při deficitu matrixového GLA proteinu. [13, 20, 21]

Vaskulární kalcifikaci stimuluje také hyperfosfatémie. Je známo, že enzym nukleotid pyrofosfatáza/fosfodiesteráza 1 hydrolyzuje fosfodiesterové vazby a tím brání i kalcifikaci měkkých tkání včetně cév. [13, 20, 21]

V neposlední řadě se uplatňuje signální dráha RANK/RANKL, která reguluje aktivitu osteoklastů, buněk resorbujících kosti a je také faktorem vaskulární kalcifikace. RANKL je molekula exprimovaná na povrchu osteoblastů a slouží jako ligand, který se váže na receptor RANK na povrchu prekurzorů osteoklastů. Po vazbě těchto dvou molekul se osteoklasty aktivují. V rámci této cesty se předpokládá, že osteoprotegerin blokuje vazbu RANKL k RANK a tím inhibuje odbourávání kostní tkáně, a tedy nepřímou vaskulární kalcifikaci. [13, 20, 21]

#### **2.4.6 Genetika**

Genetický podklad aterosklerózy není ještě zcela objasněn. S onemocněním je sice spojována celá řada jednonuleotidových polymorfismů, avšak jejich výzkum ještě není zdaleka dokončen. Nejpodrobněji prozkoumaný jednonuleotidový polymorfismus se nachází v chromozomu 9p21.3 lokusu a je spojen s časným nástupem ischemické choroby srdeční a s tvorbou aneuryzmatu lokalizovaného v aortě. Je zajímavé, že lokus 9p21.3 je umístěn vedle clusteru genů pro regulaci nádorových supresorů buněčného cyklu, které jsou zodpovědné za apoptózu, buněčnou proliferaci a stárnutí. Bylo prokázáno, že lidské aterosklerotické léze vykazují inverzní vztah mezi expresí těchto proteinů a proliferací hladkých svalových buněk cév ve variantě 9p21, což indikuje vazbu mezi tímto jednonuleotidovým polymorfismem a náchylností k ateroskleróze. [13, 17]

Dobře známé je, že některá dědičná onemocnění spojená s poruchou metabolismu lipidů, jako například familiární hypercholesterolemie, značně přispívají k rozvoji aterosklerózy. Dalším geneticky podmíněným faktorem mohou být vrozené či získané mutace, které postihnou endothelové buňky, hladké svalové buňky cév, či buňky celé škály imunitního systému na jakékoli úrovni diferenciace. Ke vzniku genetických mutací je také relevantní přidružení tradičních rizikových faktorů, jako jsou mužské pohlaví, věk, obezita, diabetes, kouření a hypertenze. Ačkoliv je většina z těchto rizikových faktorů, které spolu často koexistují, spíše prediktivní k ateroskleróze, je důležité brát na ně patřičný zřetel. [13, 17]

## 3 ADMA V KONTEXTU ATEROSKLERÓZY

### 3.1 Endothelová dysfunkce

Četné studie prokázaly, že endothelová dysfunkce je zásadním faktorem pro rozvoj aterosklerózy. Endothel totiž jako takový hraje klíčovou roli v udržení vaskulární homeostázy a cévního tonu. [22]

Jedním z hlavních mediátorů derivovaných z endothelu je silný endogenní vazodilatátor  $\text{NO}^\bullet$ , který vzniká při reakci katalyzované endotheliální NOS, z prekursoru L-argininu a je uvolňován jako odezva na smykové napětí uvnitř cévy. Kromě vazodilatace plní  $\text{NO}^\bullet$  celou řadu dalších významných funkcí. Inhibuje agregaci krevních destiček, inhibuje adhezi monocytů a leukocytů k endothelu, inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk cév, inhibuje oxidaci LDL a v neposlední řadě inhibuje také vaskulární zánět tím, že potlačuje expresi a aktivitu adhezivních molekul a chemokinů. Tyto funkce dělají z  $\text{NO}^\bullet$  velmi významnou molekulu bránící rozvoji aterosklerózy. [22]

Produkce  $\text{NO}^\bullet$  však může být výrazně negativně ovlivněna zvýšenou koncentrací ADMA, který je kompetitivním inhibitorem NOS. Pokud se koncentrace ADMA v poměru ku L-argininu neúměrně zvýší, ADMA vyhraje soutěž o vazebné místo na endotheliální NOS, dojde k inhibici tohoto enzymu a produkce  $\text{NO}^\bullet$  se zastaví. Snížená produkce  $\text{NO}^\bullet$  následně naruší cévní homeostázu a endothel se stane dysfunkčním. Takto narušená funkce endothelu je poté podkladem pro rozvoj patogeneze aterosklerózy. [22]

Nedávná studie se zaměřila na dysfunkci a indukci apoptózy u endothelových progenitorových buněk a jejich souvislost se zvýšenou koncentrací ADMA. Endothelové progenitorové buňky jsou odvozeny z kmenových buněk kostní dřeně. Odtud mohou putovat do periferního oběhu a v něm proliferovat a diferencovat se do zralých endothelových buněk. Tyto zralé endothelové buňky následně mohou nahrazovat poškozený endothel a bránit tak efektivně rozvoji aterosklerózy. [23]

Pro analýzu byla odebrána čerstvá pupečnicková krev od zdravých matek. Následně byly endothelové progenitorové buňky z krve izolovány, kultivovány a spočítány pod mikroskopem. V další fázi analýzy byly k buňkám přidány koncentrace ADMA v rozmezí 5-50  $\mu\text{mol/l}$  a po kultivaci se kvantifikovaly dysfunkční endothelové

progenitorové buňky, a buňky které podlely apoptóze. Jako kontrolní vzorek se použily endothelové progenitorové buňky neošetřené ADMA. [23]

Plazmatická koncentrace ADMA se u zdravých jedinců pohybuje přibližně do 1  $\mu\text{mol/l}$  v závislosti na zvolené metodě detekce. Provedenou analýzou bylo zjištěno, že ADMA v závislosti na koncentraci ve zvoleném rozmezí 5-50  $\mu\text{mol/l}$  indukuje dysfunkci a apoptózu endothelových progenitorových buněk in vitro. Toto zjištění koresponduje s jinou studií, která prokázala, že zvýšená koncentrace ADMA u pacientů s ischemickou chorobou srdeční přímo souvisela se sníženým počtem endothelových progenitorových buněk, nebo s jejich dysfunkcí. [23]

Základním mechanismem apoptózy a dysfunkce vyvolané zvýšenou plazmatickou koncentrací ADMA může být buněčný stres s poruchou funkce endoplazmatického retikula. Buněčný stres může nastat při dlouhodobé akumulaci nefunkčních proteinů v endoplazmatickém retikulu, která zapříčiní aktivaci stresových faktorů, které jsou za normálních okolností v neaktivní formě vázány v endoplazmatickém retikulu k chaperonu GRP78. Účinek ADMA může spočívat v rozpojení vazby mezi chaperonem GRP78 a stresovými faktory, jejich následné aktivaci a spuštění kaskády reakcí vedoucích k dysfunkci buňky nebo až k její apoptóze. [23]

### **3.2 Poměr L-arginin/asymetrický dimethylarginin**

Vzájemným vlivem koncentrací L-argininu a ADMA se zabývala studie z roku 2014, která změny poměru L-argininu/ADMA manifestovala změnami tloušťky tunica intima a media karotidových tepen. Studie se zúčastnilo 785 japonských obyvatel (306 mužů a 479 žen) žijících v komunitě bez závažných zdravotních problémů. Pohovorem byla získána historie kouření, hypertenze, diabetes mellitus a hypercholesterolemie, protože se jednalo o rizikové faktory, které vedle ADMA podporují rozvoj aterosklerózy. Podle poměru L-arginin/ADMA byla populace rozdělena do 4 skupin Q1-Q4, přičemž skupina Q1 vykazovala nejnižší poměr L-arginin/ADMA a skupina Q4 nejvyšší poměr L-arginin/ADMA. Plazmatická koncentrace L-argininu a ADMA ve vzorku žilní krve byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tloušťka vrstvy tunica intima a media byla měřena v bilaterální karotidové tepně ultrasonografií. Provedenou analýzou bylo zjištěno, že poměr L-arginin/ADMA vykazuje vysokou korelaci s tloušťkou tunica intima a media. Tedy, že čím nižší poměr L-arginin/ADMA studovaná populace vykazuje, tím dochází k většímu patologickému ztluštění stěny karotických

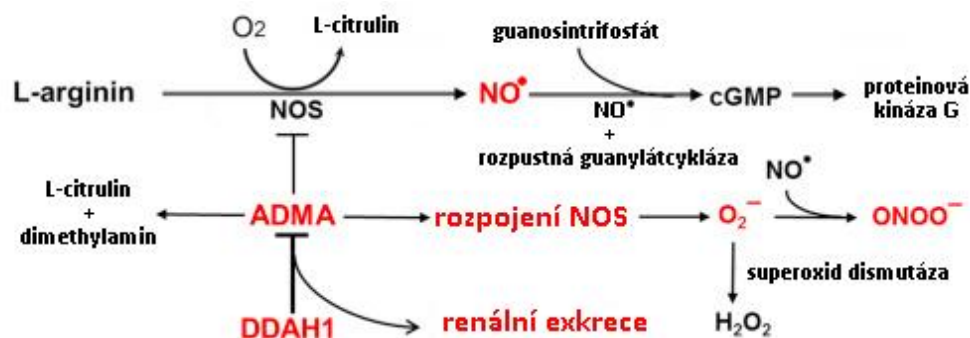
tepen. V dalších analýzách bylo zjištěno, že ani samotný L-arginin, ani ADMA nevykazují významnou korelaci s tloušťkou tunica intima a media. Tyto informace nakonec vedly k závěru, že poměr L-arginin/ADMA je lepším biomarkerem ztlustění stěny karotidové tepny ve srovnání se samostatným stanovením ADMA a bylo zároveň potvrzeno, že snížený poměr L-arginin/ADMA je důležitým prediktivním a rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy. [24]

Zvýšení poměru L-arginin/ADMA lze dosáhnout suplementací L-argininu, nebo případně L-citrulinu, jako substrátu pro syntézu L-argininu. S aplikací intravenózní infuze L-argininu byly prováděny mnohé randomizované studie a bylo prokázáno, že se po aplikaci L-argininu jednak sníží poměr L-arginin/ADMA a jednak se normalizuje funkce endothelu. [22]

Stále většího významu nabývá také léčba pomocí statinů, především hydrofilních jako pravastatin, rosuvastatin a fluvastatin, kdy byl prokázán jejich účinek na snížení plazmatické koncentrace ADMA. [8]

### **3.3 Tvorba reaktivních forem kyslíku**

Endogenní inhibitory NOS jako jsou ADMA a L-NMMA mohou svou vazbou do aktivního místa NOS také indukovat produkci reaktivních kyslíkových radikálů. Strukturně je NOS tvořena dvěma bílkovinnými podjednotkami, které jsou za normálních okolností propojeny v přítomnosti redukované formy kofaktoru tetrahydrobiopterinu. Za těchto podmínek NOS katalyzuje reakci, při níž vzniká  $\text{NO}^\bullet$ . Po navázání ADMA do aktivního místa na NOS se indukuje oxidační stres a převáží oxidace kofaktoru tetrahydrobiopterinu za vzniku dihydrobiopterinu. V přítomnosti oxidovaného dihydrobiopterinu dojde k rozpojení podjednotek NOS a začne být produkován radikál superoxid ( $\text{O}_2^-$ ).  $\text{O}_2^-$  poté může spontánně reagovat s  $\text{NO}^\bullet$  za vzniku daleko nebezpečnějšího radikálu peroxynitritu ( $\text{ONOO}^-$ ), nebo být enzymem superoxid dismutázou přeměněn na peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Všechny výše popsané reakce jsou zakresleny na obrázku 6. [5, 6, 25]



*Obrázek 6 Metabolické dráhy ovlivněné ADMA, upraveno dle [5]*

Studie prokázaly, že přidání ADMA nebo L-NMMA k purifikovanému NOS proteinu podpořilo tvorbu O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Purifikovaný NOS protein byl extrahován z in vitro kultivovaných lidských endoteliálních buněk, z izolovaných arteriál potkanů a z myši plicní epiteliální buněčné linie LA-4. Ve všech případech přidavek ADMA a L-NMMA způsobil zvýšenou tvorbu O<sub>2</sub><sup>-</sup>. [5]

### 3.4 Oxidovaný LDL

Bylo prokázáno, že uvolňování ADMA z endoteliálních buněk je zvýšeno v přítomnosti oxidovaného LDL. Oxidovaný LDL významně narušuje redoxní signální transdukcii na bázi NO•, což má za následek odpojení endoteliální NOS a zastavení syntézy NO•. Navíc aktivací S-nitrosylace arginázy a potlačením S-nitrosylace DDAH dojde ke snížení tvorby NOS substrátu L-argininu, což zapříčiní zvýšení koncentrace endogenních NOS inhibitorů, jako je ADMA. [7, 22]

Několik studií navrhlo kardioprotektivní úlohu aspirinu. Ve studii na potkanech byla použita nízká dávka aspirinu (30 mg/kg) a následně byl hodnocen jeho účinek na LDL indukovanou endoteliální dysfunkci. Výsledky této studie naznačují, že aspirin v nižší dávce (30 mg/kg) chrání endotel před poškozením vyvolaným LDL in vivo a že ochranný účinek aspirinu na endotel souvisí se snížením koncentrace ADMA zvýšením aktivity DDAH. [22]

### 3.5 Snížená signalizace kaskády NO•-cGMP-proteinová kináza G

Snížená syntéza NO• způsobená inhibicí aktivity NOS po navázání ADMA také oslabuje následnou kaskádu NO•-cGMP-proteinová kináza G. NO• se váže s rozpustnou guanylátcyklázou, která katalyzuje vznik cGMP z guanosinetrifosfátu. Následně cGMP

aktivuje proteinovou kinázu G a dojde k relaxaci hladkých svalových buněk cév a vazodilataci cévy. Schéma celé kaskády je znázorněno na obrázku 6. Snížená signalizace kaskády NO<sup>•</sup>-cGMP-proteinová kináza G může také narušit angiogenezi, růst a proliferaci vaskulárních endothelových buněk, desagregaci krevních destiček, spotřebu kyslíku myokardem a opravu poškozených cév. Pokud je tato protektivní funkce narušena, dochází k rozvoji celé řady kardiovaskulárních onemocnění, jako je hypertenze, koronární onemocnění, ateroskleróza, diabetes, mrtvice, plicní hypertenze, chronické srdeční selhání a chronické selhání ledvin. [5]

### **3.6 Aktivita dimethylarginin dimethylaminohydrolázy**

Aktivita DDAH byla zjištěna v ledvinách, slinivce, játrech, mozku a aortě s imunoexpresí také v neutrofilech a makrofázích. Zvýšené plazmatické hladiny glukózy, oxidovaného LDL a homocysteinu jsou spojené se sníženými hladinami DDAH. Některé konvenční kardiovaskulární rizikové faktory mohou navíc snížit aktivitu DDAH zvýšením oxidačního stresu. Farmakologická inhibice DDAH zvyšuje koncentrace ADMA a snižuje produkci NO<sup>•</sup>. Naopak nadměrná exprese DDAH snižuje hladiny ADMA a zvyšuje hladiny NO<sup>•</sup>. Ve studiích na zvířatech bylo prokázáno, že nadměrná exprese DDAH podporuje reparaci endothelu po vaskulárním poranění. [22]

Při studii na myších bylo dále prokázáno, že po inhibici DDAH1 dojde ke chronické akumulaci ADMA a L-NMMA, což mělo za následek hypertenzi, sníženou vaskulární produkci NO<sup>•</sup> a poškození endothelu, přičemž vznikaly důsledky podobné, jako u studie na myších s deficitem endotheliální NOS. Inhibice DDAH1 dále zmírnila angiogenezi a vrůstání mikrocév do gelových zátek u myší. Jiná studie prokázala, že inhibice DDAH1 zmírnila angiogenezi v zadní končetině u myší po permanentním podvázání femorální arterie. Chronická akumulace ADMA a L-NMMA při inhibici DDAH1 u myší také způsobila hypertenzi a kardiální hypertrofii související se stárnutím bez snížení funkce levé komory. Kromě toho akutní infuze ADMA způsobila zvýšení krevního tlaku a snížení endothelem závislé vazodilatace u lidských subjektů i pokusných zvířat. [5]

### **3.7 Fibrotizace**

ADMA může přímo nebo nepřímo podněcovat diferenciaci fibroblastů, epiteliálních buněk, endotelových buněk nebo hladkých svalových buněk cév na myofibroblasty.



Jedná se o takzvanou epitelovo-mezenchymální přeměnu nebo endothelovo-menezchymální přeměnu, kdy jsou v aktivovaných myofibroblastech exprimována stresová  $\alpha$ -aktinová vlákna hladké svaloviny. Aktivované myofibroblasty syntetizují velké množství fibrilárního kolagenu a nestrukturních proteinů v extracelulární matrix, což spolu s produkcí dalších profibrotizujících molekul jako například transformující růstový faktor  $\beta$ , matrixové metaloproteinázy, angionzin II a endothelin 1, vede k přestavbě a útlaku původní tkáně, a nakonec k selhání celého orgánu. Fibrotizací bývají nejčastěji postiženy ledviny, játra, plíce a kardiovaskulární systém. [4]

Úloha ADMA v tkáňové fibróze však ještě není podrobně prozkoumána. Budoucí studie by se měly zaměřit na regulační a pracovní mechanismy ADMA v tkáňové fibróze a na převedení těchto poznatků k identifikaci a syntéze nových a účinných terapeutických látek. [4]

## 4 STANOVENÍ ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU

Pouze menší část ADMA je z buňky transportována přes cytoplazmatickou membránu do krevní plazmy, a proto malé změny plazmatických koncentrací ADMA odrážejí mnohem větší změny koncentrací intracelulárních. Měření intracelulární koncentrace ADMA by bylo relevantnější, protože jak tvorba ADMA, tak i inhibice syntézy NO• a velká část degradačních procesů jsou lokalizovány intracelulárně. V epidemiologických studiích je však bohužel prakticky nemožné měřit intracelulární koncentrace ADMA u velkého počtu subjektů a doposud bylo smysluplných výsledků dosaženo pouze měřením plazmatické koncentrace ADMA. [9]

### 4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro analýzu ADMA a SDMA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se využívají především vzorky plazmy získané odběrem venózní krve. K plazmě se přidávají antikoagulační činidla ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), nebo heparin. Po odběru vzorku je nutné zkumavky zcentrifugovat a získanou plazmu zamrazit na teplotu -70 ° C nebo nižší až do analýzy. [9, 10, 11]

Plazmatické koncentrace methylargininů se pohybují řádově v mikromolárním rozmezí jak u zdravých jedinců, tak u nemocných. Koncentrace jiných aminokyselin jsou o dva až tři řády vyšší, a proto je kvantifikace methylovaných analogů L-argininu v plazmě značně náročná. Tradičně se aminokyselinová analýza provádí iontově výměnnou chromatografií s následnou flourescenční detekcí, méně častá je detekce elektrochemická nebo hmotnostní. Iontově výměnná HPLC je vhodná nejen pro analýzu dvaceti základních aminokyselin vyskytujících se v proteinech, ale také pro analýzu velkého počtu nebílkovinných aminokyselin a posttranslačně modifikovaných aminokyselin, jako je ADMA a SDMA. Jedná se však o stanovení velmi časově náročné. Proto se často pro zkrácení analýzy používá derivatizace vzorků s následnou rozdělovací HPLC s obrácenou fází. [9]

Derivatizace slouží hned k několika účelům. Za prvé, reakcí se sledovanými analyty zajistí jejich přeměnu na deriváty, které mohou být následně detekovány s vysokou citlivostí. Zadruhé, derivatizace obvykle zvyšuje hydrofóbnost velmi polárních aminokyselin, což usnadní separaci pomocí reverzní fáze. Za třetí, reaktivní skupiny

v postranním řetězci mohou být selektivně značeny vhodným derivatizačním činidlem, čímž se opět zvýší citlivost detekce. [9]

Prvotním krokem pro analýzu pomocí HPLC je čištění vzorku. Čištění probíhá extrakcí pevnou fází a zahrnuje kroky promývací a eluční. Složení pevné fáze je nejčastěji na bázi oxidu křemičitého nebo polymeru. Kolony, či jamky mikrotitrační destičky jsou nejprve promyty methanolem a vodou, případně puftrem a poté je nanesen vzorek plazmy. Plazma se před čištěním obvykle deproteinuje přidáním kyseliny chloristé, aby se odstranily sloučeniny s vysokou koncentrací aminů, jako je lanin a taurin, které by mohly rušit stanovení. Vzniklá sraženina se následně odstraní a plazma se poté zneutralizuje uhličitánem draselným. Po nanesení vzorku jsou sérií promývacích kroků z kolony nejprve odstraněny neutrální a kyselé aminokyseliny a následně se pak eluují bazické aminokyseliny včetně sledovaných methylargininů. Cíleného promývání a eluce analytů je dosaženo použitím vhodných rozpouštědel a pufrů o specifickém pH. [9, 10]

#### **4.1.1 HPLC s flourescenční detekcí**

HPLC s flourescenční detekcí zpravidla předchází krok derivatizace. Mezi nejčastěji uváděné derivatizační činidlo pro flourescenční analýzu patří ortho-phthalaldehyd, případně naftalen-2,3-dikarboxaldehyd. Hlavní předností ortho-phthalaldehydu je téměř okamžitá reakce při pokojové teplotě a skutečnost, že samotný ortho-phthalaldehyd je neflourescenční, což vede k vytvoření relativně čistých chromatogramů. Reakce mezi ortho-phthalaldehydem a aminoskupinami závisí na přítomnosti thiolu. Pro tento účel bývají použity sloučeniny s thiolovou skupinou jak 2-merkapt ethanol, tak kyselina 3-merkaptopropionová. [9, 10]

Při rozdělovací HPLC s obrácenou fází se používá izokratická i gradientová eluce. Nejčastěji používanými kolonami jsou kolona C<sub>18</sub>, případně fenylová kolona. ADMA a SDMA jsou si strukturně velmi podobné, a proto je obtížné tuto dvojici sloučenin vzájemně odlišit. Při použití ortho-phthalaldehydu jako derivatizačního činidla se na koloně C<sub>18</sub> derivát ADMA obvykle eluuje před derivátem SDMA. Celkový čas separace se pohybuje kolem 30 minut a daří se ho nově snížit použitím monolitické kolony na bázi oxidu křemičitého. [9, 10]

Akumulace ADMA byla identifikována jako biomarker a potenciální mediátor endothelové dysfunkce a kardiovaskulárních onemocnění. Z toho vyplývá, že rutinní měření plazmatických koncentrací ADMA by mohlo poskytnout klinicky užitečné

informace. Jelikož inhibice aktivity NOS je kompetitivního charakteru, souvisí zvýšená koncentrace ADMA také s koncentrací L-argininu, jako soupeře v této soutěži. Je proto vhodné současně kvantifikovat jak ADMA, tak L-arginin. Taková současná kvantifikace je možná pomocí HPLC, nikoliv metodou ELISA, což může být vnímáno jako značná výhoda HPLC analýzy. [10]

Studie z roku 2015 se zabývala analýzou plazmatické koncentrace ADMA pomocí HPLC s fluorescenční detekcí na základě dřív publikovaných postupů a její snahou bylo analýzu dále vylepšit. K zásadním pokrokům došlo hned v několika krocích. Při extrakci pevnou fází bylo dosaženo vysokých absolutních (>95%) a relativních (>93%) výtěžků, což ukazuje na téměř úplnou retenci a eluci cílových metabolitů. Předchozí publikované metody uváděly absolutní výtěžnost v rozmezí 85% s použitím stejné techniky od stejného výrobce a za podobných podmínek. Tohoto zlepšení výtěžnosti bylo zřejmě dosaženo vytvořením nízkého vakua při zavádění vzorku a promývání, což prodloužilo dobu nasycení pevné fáze vzorky a rozpouštědly. Bylo dosaženo také lepšího spodního limitu detekce a linearitu křivek. Dále byl pro metodu použit minimální objem vzorku 12  $\mu\text{l}$ , což bylo výrazné zmenšení objemu oproti dříve publikovaným metodám, kde bylo třeba 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  a v některých případech dokonce až 500  $\mu\text{l}$  vzorku. Pro zpřesnění metody byl dále použit neendogenní vnitřní standard monoethyl-L-arginin. Předchozí metody používaly jako vnitřní standard L-NMMA, což jednak vyloučilo následnou kvantifikaci L-NMMA, a navíc mohlo dojít k nepřesnostem stanovení ostatních methylargininů způsobených patofyziologickou změnou plazmatické koncentrace L-NMMA. [10]

Nevýhodou této metody byly především vysoké nároky na zpracování vzorků a relativně dlouhá doba pro provedení metody, která činila 55 minut. Analýzou byla získána plazmatická koncentrace ADMA 0,53  $\mu\text{mol/l}$ . [10]

#### **4.1.2 HPLC s hmotnostní detekcí**

Jinou metodou analýzy může být kvantifikace L-argininu a jeho methylovaných derivátů v lidské plazmě pomocí HPLC s hmotnostní (HPLC-MS) či s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS-MS). U většiny validovaných metod byla příprava vzorků plazmy omezena pouze na vysrážení proteinů a případně odpaření rozpouštědla, zatímco krok derivatizace odpadnul úplně. Oproti HPLC s fluorescenční detekcí se tak výrazně zkrátila doba přípravy vzorku před samotnou analýzou. Pro vlastní separaci byla

většinou použita metoda rozdělovací HPLC s normální nebo obrácenou fází. Následná hmotnostní detekce byla provedena ionizací elektrosprejem nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Oba typy ionizace jsou se řadí mezi měkké ionizační techniky a produkují převážně protonované nebo deprotonované ionty bez fragmentace. Výsledné chromatogramy však vykazovaly vysokou hladinu šumu a píky nebyly dobře odděleny od endogenních interferencí. Pro zpřesnění analýzy a potlačení účinků matrice byly poté zavedeny komerční vnitřní standardy značené izotopem, pro L-arginin sloučenina [ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arg a pro ADMA sloučenina [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA, která vznikla reakcí komplexu med<sup>1</sup>-[ $^2\text{H}_6$ ]-ornitin s dimethylaminem na bromkyanoagaróze. Zavedením komerčních vnitřních standardů značených izotopem pro L-arginin a ADMA v kombinaci s hmotnostní spektrometrií bylo nakonec dosaženo velmi přesné, citlivé a selektivní analýzy. Při použití tandemové hmotnostní spektrometrie analýza vykazovala selektivitu ještě o něco vyšší. [12, 26]

Další výhodou této metody je možnost kvantifikovat ve stejném cyklu kromě L-argininu a jeho methylovaných derivátů také aminokyselinu L-citrulin, která se podílí na metabolické dráze L-argininu. To bylo nemožné v analýze pomocí HPLC s fluorescenční detekcí, kdy byl L-citrulin odstraněn při čištění vzorku extrakcí pevnou fází. [26]

Průměrná hodnota plazmatické koncentrace ADMA u zdravých lidí vypočítaná z výsledků několika validovaných metod HPLC s hmotnostní detekcí činila 0,4  $\mu\text{mol/l}$ . Navzdory tomu, že je analýza pomocí HPLC s hmotnostní detekcí nákladnější a náročnější na instrumentaci, jedná se o metodu poměrně rychlou, citlivější a selektivnější v porovnání s HPLC s fluorescenční detekcí. [12, 26]

#### **4.1.3 HPLC s elektrochemickou detekcí**

Studie Kleparnika a kolektivu popisuje jednoduchou metodu pro současné stanovení ADMA, SDMA a L-argininu pomocí rozdělovací HPLC s obrácenou fází a s izokratickou elucí v lidské plazmě. Jako vnitřní standard byl použit L-NMMA. Vzorky plazmy byly vyčištěny extrakcí pevnou fází a derivatizovány pomocí ortho-phthalaldehydu s kyselinou 3-merkaptopropionovou. HPLC analýza byla provedena na koloně Synergi Hydro RP s následnou elektrochemickou detekcí pomocí coulometrického detektoru. Jako mobilní fáze byl použit pufr fosforečnanu draselného o koncentraci 50 mmol/l a pH 6,1. Coulometrická detekce byla provedena při potenciálu +320 mV, kdy tato

hodnota potenciálu zajistila vysokou citlivost a také selektivitu detekce. Celkový čas analýzy byl 32 minut. [27]

Získané hodnoty ADMA ve vzorcích lidské plazmy se pohybovaly v rozmezí od 0,29 do 1,05  $\mu\text{mol/l}$ . Výsledky analýzy byly porovnávány s metodami HPLC s fluorescenční detekcí a ELISA. Mezi HPLC s elektrochemickou detekcí a HPLC s fluorescenční detekcí byla vypočítána velmi dobrá korelace  $R^2 = 0,967$ . Porovnáním metod HPLC s elektrochemickou detekcí a ELISA byla získána korelace velmi špatná  $R^2 = 0,185$  a podobně dopadlo i srovnání metod HPLC s fluorescenční detekcí a ELISA s korelací  $R^2 = 0,242$ . Vysvětlení těchto nesrovnalostí by mohlo spočívat v matricových účincích, které doprovázejí komerční test ELISA. [27]

Studie Katsuhiko Suzuki a kolektivu také prováděla analýzu ADMA a dalších methylovaných argininů pomocí HPLC se současnou fluorescenční a elektrochemickou detekcí ze vzorků plazmy. Jako vnitřní standard byl tentokrát použit  $N^{\omega}$ -propyl-L-arginin. Vzorky byly opět očištěny extrakcí pevnou fází a derivatizovány pomocí ortho-phthalaldehydu s 2-merkptoethanolem. Vzniklé derivatizační produkty však byly nestálé a musely být analyzovány při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Pro přesnější stanovení tedy bylo použito ještě jiné derivatizační činidlo 6-Ferrocenyl-1-hexanethiol, který vytvořil stabilní deriváty, které mohly být analyzovány při pokojové teplotě. Pro separaci byla použita kolona Wako Combi ODS. Jako mobilní fáze byl zvolen pufr fosforečnanu draselného o koncentraci 100 mmol/l a pH 7,0. Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu +1000mV a fluorescenční analýza při vlnových délkách 340 a 455 nm. [28]

Naměřené plazmatické koncentrace ADMA se pohybovaly v rozmezí 0,49 - 0,75  $\mu\text{mol/l}$ . Získané hodnoty byly poté porovnávány s metodou ELISA. Porovnáním HPLC s fluorescenční detekcí a ELISA byl vypočítán korelační koeficient  $R^2 = 0,91$  a porovnáním HPLC s elektrochemickou detekcí a ELISA byl vypočítán korelační koeficient  $R^2 = 0,88$ . Díky současné fluorescenční a elektrochemické detekci bylo dosaženo vysoké selektivity i citlivosti. [28]

## 4.2 Plynová chromatografie

Pro stanovení L-argininu, ADMA, jakožto i dalších methylovaných argininů se užívá metoda plynové chromatografie (GC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), nebo v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS-MS). [12, 26, 29]

L-arginin a jeho methylované deriváty včetně ADMA jsou polární molekuly, a tedy jako takové jsou pro analýzu pomocí plynové chromatografie nevhodné. Aby mohla být analýza pomocí GC uskutečněna, musí se nejprve derivatizovat všechna polární centra molekul. Derivatizace probíhá ve dvou krocích. Nejprve jsou kyselé karboxylové skupiny esterifikovány kyselým methanolem a poté se přemění bazické aminoskupiny pomocí anhydridu pentafluorpropionové kyseliny na amidy pentafluorpropionové kyseliny. Vzniklé deriváty už jsou vhodné pro separaci pomocí GC a výsledné chromatogramy vykazují na kapilární koloně Optima-17 symetrické a ostré píky. [26]

#### **4.2.1 GC s tandemovou hmotnostní detekcí**

Metodu GC-MS-MS popsal Tsikas a kolektiv. Jako vzorek byla použita lidská plazma. Vzorek plazmy se nejprve očistil ultrafiltrací, díky které došlo k odstranění nežádoucích proteinů a následně se provedlo odpaření kapaliny. V dalším kroku následovala derivatizace popsaná v předchozím odstavci. Protože SDMA reagovala v procesu derivatizace na produkt velmi odlišný od ADMA, vznikly dva strukturní izomery, které mohly být jednoduše odděleny. Pro kvantitativní analýzu byl pro L-arginin použit komerční vnitřní standard, stabilní izotop [ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arg. Pro ADMA však stabilní vnitřní standard nebyl doposud vytvořen. Proto byla zvolena metoda dvoukrokové derivatizace analogická k derivatizaci vzorku, kdy byla v prvním kroku místo kyselého methanolu použita sloučenina  $\text{CD}_3\text{OD}$  za vzniku derivátu ADMA- [ $\text{D}_3$ ] -methylesteru. [26]

Pomocí metody GC-MS-MS byla změřena plazmatická koncentrace ADMA u zdravých jedinců  $0,6 \pm 0,076 \mu\text{mol/l}$ . [26]

#### **4.2.2 GC s hmotnostní detekcí**

Metodu GC-MS popsal Albsmeier a kolektiv a opět pro analýzu použili vzorek lidské plazmy. Čištění vzorku bylo provedeno proteinovou precipitací s acetonem. Následovala opět dvoukroková derivatizace popsaná výše a získané deriváty byly separovány a nakonec detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. V chromatogramech nebyly pozorovány žádné interference dalších endogenních látek a ADMA i SDMA byly opět zřetelně odděleny, protože při procesu derivatizace vznikly dva odlišné produkty. Jako vnitřní standard pro L-arginin byla použita komerčně dostupná sloučenina [ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arg. I pro ADMA byl tentokrát dostupný stabilní komerční standard značený izotopem [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA, který vznikl reakcí komplexu med' [ $^2\text{H}_6$ ]-ornitin

s dimethylaminem na bromkyanoagaróze. Tento postup publikoval Pundak a Wilchek. [26, 29]

Pomocí metody GC-MS byla změřena plazmatická koncentrace ADMA u zdravých jedinců  $0,39 \pm 0,062 \mu\text{mol/l}$ . [26, 29]

Hmotnostní spektrometrie spojená s plynovou chromatografií poskytuje vysokou senzitivitu a selektivitu, což může tyto testy stavět do popředí oproti běžnějším metodám závislým například na fluorescenční detekci. Nevýhodou je však náročná a zároveň nákladná instrumentace. [26, 29]

### 4.3 ELISA

Ve studii z roku 2016 byl zkoumán vliv terapie oxidem uhličitým na dráhu  $\text{NO}^\bullet$  pomocí analýzy plazmatických koncentrací ADMA metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Terapie oxidem uhličitým spočívá v transkutánní aplikaci oxidu uhličitého, který volně prochází membránami a má dobře známý vazodilatační účinek. Po aplikaci tohoto plynu se zvýší průtok krve cévou a parciální tlak kyslíku ve tkáních, pH krve naopak poklesne. Také bylo zjištěno, že se oxid uhličitý podílí na odstraňování volných radikálů a tím potlačení oxidačního stresu, jehož markerem a mediátorem je právě ADMA. Snížený oxidační stres následně vede ke zvýšené účinnosti DDAH1, což zajistí snížení hladin ADMA. Tato nenákladná léčba se provádí už od roku 1932 především u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními. [30]

Pro analýzu byla odebrána žilní krev do zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA. Následovala centrifugace a získaná plazma byla uskladněna při teplotě  $-70^\circ\text{C}$  až do analýzy. Analýza byla provedena metodou kvantitativní dvojité sendvičové ELISA následujícím způsobem. Stěny jamek mikrotitrační destičky byly potaženy lidskou monoklonální protilátkou proti AMDA. Do těchto jamek byl napipetován vzorek plazmy, destička se nechala inkubovat a poté se promyla. V dalším kroku byly přidány polyklonální protilátky s navázaným biotinem a opět následovala inkubace a promytí. Následně byl přidán komplex avidin-peroxidáza. Avidin se specificky váže s biotinem přes avidin-biotinový můstek a připojí tak peroxidázu k analyzovanému komplexu. V posledním kroku byl přidán substrát 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin a proběhla enzymatická reakce s výsledným žlutým zbarvením. Mikrotitrační destičky nakonec



byly proměřeny spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm a následná kvantitativní analýza byla provedena metodou kalibrační křivky. [30, 31, 32]

Naměřené plazmatické koncentrace ADMA se pohybovaly v rozmezí 0,078 - 5,0  $\mu\text{mol/l}$ , přičemž kontrolní vzorek od zdravého mladého dárce vykazoval plazmatickou koncentraci ADMA 0,35  $\mu\text{mol/l}$ . Pacienti s kardiovaskulárním onemocněním měly vždy vyšší naměřené plazmatické koncentrace ADMA než zdraví dárce a zároveň bylo prokázáno, že plazmatická koncentrace ADMA poklesla po podání dávky oxidu uhličitého. [30]

Analýza pomocí metody ELISA má dobrou reprodukovatelnost a je vhodnější pro větší sérii vzorků. Nevýhodou je naopak analýza pouze ADMA, kdy není možná simultánní analýza L-argininu a jeho dalších methylovaných derivátů. [32]

## 5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala významem asymetrického dimethylargininu a jeho rolí v ateroskleróze.

Na začátku byly představeny základní vlastnosti, metabolické dráhy a význam asymetrického dimethylargininu v širším kontextu. Dále se práce věnovala popisu aterosklerózy z hlediska morfologických změn a patogeneze. Získané informace byly následně propojeny a uspořádány. Ukázalo se, že asymetrický dimethylarginin hraje významnou roli v narušení cévní homeostázy a rozvoji endothelové dysfunkce, která je podkladem pro počátek aterosklerotických změn. Také se potvrdilo, že asymetrický dimethylarginin se podílí na tvorbě kyslíkových radikálů a tkáňové přestavbě cévní stěny. Na základě těchto informací byl asymetrický dimethylarginin stanoven jako prediktivní a rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, včetně aterosklerózy.

V poslední části se bakalářská práce věnovala nejčastěji prováděným metodám stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě, včetně odběru a zpracování vzorků. Nejčastěji používanými metodami pro analýzu jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a ELISA. Nejběžněji používaná je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, která je však náročná na zpracování vzorku a délku samotné separace. Zvýšenou selektivitu a značné urychlení samotné analýzy představuje elektrochemická detekce u vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Hmotnostní detekce je potom nejvíce selektivní, citlivá a přesná a dá se použít jak pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, tak pro plynovou chromatografii. Nevýhodou hmotnostní detekce jsou vysoké náklady na potřebné vybavení. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie mohou být vedle asymetrického dimethylargininu stanoveny souběžně i další látky ze vzorku. Metoda ELISA je komerčně dostupná a dobře reprodukovatelná metoda, která se rutinně používá pro stanovení plazmatických koncentrací asymetrického dimethylargininu ve větších sériích vzorků. Nevýhodou je pak možnost stanovení pouze asymetrického dimethylargininu, nikoliv souběžně dalších látek ve vzorku.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J. Szeffel, A. Danielak, and W. J. Kruszewski, “Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors,” *Adv. Med. Sci.*, vol. 64, no. 1, pp. 104–110, Mar. 2019.
- [2] A. Hariharan, Y. Jing, N. D. Collie, H. Zhang, and P. Liu, “Altered neurovascular coupling and brain arginine metabolism in endothelial nitric oxide synthase deficient mice,” *Nitric Oxide*, vol. 87, pp. 60–72, Jun. 2019.
- [3] A. J. Pope, K. Karuppiyah, and A. J. Cardounel, “Role of the PRMT–DDAH–ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production,” *Pharmacol. Res.*, vol. 60, no. 6, pp. 461–465, Dec. 2009.
- [4] W.-C. Zhao, G. Li, C.-Y. Huang, and J.-L. Jiang, “Asymmetric dimethylarginine: An crucial regulator in tissue fibrosis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 854, pp. 54–61, Jul. 2019.
- [5] X. Liu, X. Xu, R. Shang, and Y. Chen, “Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease,” *Nitric Oxide*, vol. 78, pp. 113–120, Aug. 2018.
- [6] J. Chen *et al.*, “Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 97, pp. 423–428, Jan. 2018.
- [7] X. Xu *et al.*, “The protein S-nitrosylation of splicing and translational machinery in vascular endothelial cells is susceptible to oxidative stress induced by oxidized low-density lipoprotein,” *J. Proteomics*, vol. 195, pp. 11–22, Mar. 2019.
- [8] D. E. Winnica, J. A. Scott, H. Grasemann, and F. Holguin, “Asymmetric-Dimethylarginine,” *Nitric Oxide*, pp. 247–254, Jan. 2017.
- [9] T. Teerlink, “HPLC analysis of ADMA and other methylated l-arginine analogs in biological fluids,” *J. Chromatogr. B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 21–29, May 2007.
- [10] M. S. Alkaitis, G. Nardone, J. H. Chertow, and H. C. Ackerman, “Resolution and quantification of arginine, monomethylarginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in plasma using HPLC with internal calibration,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 30, no. 3, pp. 294–300, Mar. 2016.
- [11] C. E. Jones, C. J. Darcy, T. Woodberry, N. M. Anstey, and Y. R. McNeil, “HPLC

- analysis of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, homoarginine and arginine in small plasma volumes using a Gemini-NX column at high pH,” *J. Chromatogr. B*, vol. 878, no. 1, pp. 8–12, Jan. 2010.
- [12] D. Tsikas, B. Schubert, F.-M. Gutzki, J. Sandmann, and J. C. Frölich, “Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography–tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative,” *J. Chromatogr. B*, vol. 798, no. 1, pp. 87–99, Dec. 2003.
- [13] T. Wang and J. Butany, “Pathogenesis of atherosclerosis,” *Diagnostic Histopathol.*, vol. 23, no. 11, pp. 473–478, Nov. 2017.
- [14] T. Wang, D. Palucci, K. Law, B. Yanagawa, and J. Yam, “Atherosclerosis: pathogenesis and pathology,” *Diagnostic Histopathol.*, vol. 18, no. 11, pp. 461–467, Nov. 2012.
- [15] POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie. 2.*, dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-494-2.
- [16] R. Mazurek, J. M. Dave, R. R. Chandran, A. Misra, A. Q. Sheikh, and D. M. Greif, “Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease.,” *Adv. Pharmacol.*, vol. 78, pp. 323–350, 2017.
- [17] M. Mahmoudi, “The pathogenesis of atherosclerosis,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 46, no. 9, pp. 505–508, Sep. 2018.
- [18] W. Wang *et al.*, “eNOS S-nitrosylation mediated OxLDL-induced endothelial dysfunction via increasing the interaction of eNOS with  $\beta$ -catenin,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 7, pp. 1793–1801, Jul. 2019.
- [19] J. Moriya, “Critical roles of inflammation in atherosclerosis,” *J. Cardiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 22–27, Jan. 2019.
- [20] S.-Y. Lee and C. E. Müller, “Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors.,” *Medchemcomm*, vol. 8, no. 5, pp. 823–840, May 2017.
- [21] J. H. Park, N. K. Lee, and S. Y. Lee, “Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation.,” *Mol. Cells*, vol. 40, no. 10, pp. 706–713, Oct. 2017.

- [22] L. Sibal, S. C. Agarwal, P. D. Home, and R. H. Boger, "The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease.," *Curr. Cardiol. Rev.*, vol. 6, no. 2, pp. 82–90, May 2010.
- [23] S. Ye, X. Zhou, J. Lin, and P. Chen, "Asymmetric Dimethylarginine Induced Apoptosis and Dysfunction of Endothelial Progenitor Cells: Role of Endoplasmic Reticulum Stress Pathway.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, p. 6395601, 2017.
- [24] Y. Notsu, S. Yano, H. Shibata, A. Nagai, and T. Nabika, "Plasma arginine/ADMA ratio as a sensitive risk marker for atherosclerosis: Shimane CoHRE study," *Atherosclerosis*, vol. 239, no. 1, pp. 61–66, Mar. 2015.
- [25] V. Gebhart, K. Reiß, A. Kollau, B. Mayer, and A. C. F. Gorren, "Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions," *Nitric Oxide*, vol. 89, pp. 14–21, Aug. 2019.
- [26] J. Martens-Lobenhoffer and S. M. Bode-Böger, "Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of l-arginine and its methylated metabolites in biological fluids," *J. Chromatogr. B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 30–41, May 2007.
- [27] M. Kleparnik, M. Tomandlova, Z. Glatz, and J. Tomandl, "Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in human plasma by HPLC with electrochemical detection," *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 23, pp. 3696–3701, Dec. 2013.
- [28] K. Suzuki *et al.*, "The stable o-phthalaldehyde-ferrocene/6-ferrocenyl-1-hexanethiol pre-column derivatization high-performance liquid chromatography of dimethylarginine by novel dual fluorescence and electrochemical detector.," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 27, no. 4, pp. 535–8, Apr. 2013.
- [29] J. Albsmeier, E. Schwedhelm, F. Schulze, M. Kastner, and R. H. Böger, "Determination of NG,NG-dimethyl-l-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography–mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, vol. 809, no. 1, pp. 59–65, Sep. 2004.
- [30] B. NEMETH *et al.*, "Angiotensin-converting Enzyme Inhibition Improves the Effectiveness of Transcutaneous Carbon Dioxide Treatment," *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 31, no. 3, pp. 425–428, Apr. 2017.

- [31] Human Asymmetric dimethylarginine ELISA Kit: Human Asymmetric dimethylarginine ELISA Kit. Mybiosource.com [online]. San Diego [cit. 2019-07-01]. Dostupné z: <https://www.mybiosource.com/adma-human-elisa-kits/asymmetric-dimethylarginine-adma/264847>
- [32] R. Šíroká, L. Trefil, D. Rajdl, J. Racek, and R. Cibulka, “Asymmetric dimethylarginine—comparison of HPLC and ELISA methods,” *J. Chromatogr. B*, vol. 850, no. 1–2, pp. 586–587, May 2007.