

Ο ρόλος των αναστολέων των συνθετασών του μονοξειδίου του αζώτου στην παθογένεια της αρτηριακής υπέρτασης και της χρόνιας νεφρικής νόσου

Β. Ράπτης
Α. Μπίκος
Σ. Καπούλας

Νεφρολογικό Τμήμα,
Α' Παθολογική Κλινική,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
ΑΧΕΠΑ,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεθυλαργίνινες είναι αμινοξέα που συντίθενται φυσιολογικά και εντοπίζονται στους ιστούς και τα κύτταρα, κυκλοφορούν στο πλάσμα και απεκκρίνονται στα ούρα. Ο κυριότερος εκηρόσωπός τους η ασύμμετρη διμεθυλαργίνη (ADMA) αναστέλλει τις συνθετάσες μονοξειδίου του αζώτου (NOs) και προκαλεί σημαντικές καρδιαγγειακές βιολογικές επιδράσεις. Αρκετές μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η συγκέντρωση ADMA στο πλάσμα συνιστά δείκτη κινδύνου ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και καρδιαγγειακής νόσου. Σύμφωνα με έρευνες που έγιναν σε ζώα και ανθρώπους, η ADMA συνδέεται με την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου (ΧΝΝ). Αρκετοί μηχανισμοί εμπλέκονται σε αυτόν τον συσχετισμό, για παράδειγμα η παρουσία της αρτηριακής υπέρτασης, η διαταραχή της ακεραιότητας του φραγμού σπειραματικής διήθησης και η ανάπτυξη νεφρικής ίνωσης. Η συγκεκριμένη ανασκόπηση συνοψίζει την υπάρχουσα βιβλιογραφία στη βιολογία και φυσιολογία της ADMA εστιάζοντας στο ρόλο της στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 2002 η Πρωτοβουλία Ποιοτικής Έκβασης Νεφρικής Νόσου (KDOQI) του Εθνικού Ιδρύματος Νεφρού (NKF) εισήγαγε ένα εννοιολογικό μοντέλο για τον ορισμό και την κατηγοριοποίηση της χρόνιας νεφρικής νόσου^{1,2}. Η χρόνια νεφρική νόσος ορίστηκε ως μία κατάσταση παρουσίας νεφρικής βλάβης ή ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) <60 ml/min ανά 1,73 m² για ≥3 μήνες, ανεξαρτήτως αιτίας, και κατηγοριοποιήθηκε σε πέντε στάδια αναλόγως του επιπέδου GFR. Το 2004 η οργάνωση Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) υιοθέτησε το πλαίσιο αυτό με ελάχιστες τροποποιήσεις³.

Τον Οκτώβριο του 2005 η KDIGO ξεκίνησε μία συνεργατική μεταανάλυση και συμφώνησε να διατηρήσει τον ισχύοντα ορισμό της χρόνιας νεφρικής νόσου GFR <60 ml/min ανά 1,73 m² ή λόγο λευκωματίνης προς κρεατινίνη στα ούρα (ACR) >30 mg/g και τροποποίησε την κατηγοριοποίηση προσθέτοντας το στάδιο λευκωματινουρίας, υποδιαίρεση του σταδίου 3, δίνοντας έμφαση στη κλινική διάγνωση⁴. Παρά το γεγονός ότι υπήρξαν συζητήσεις γύ-

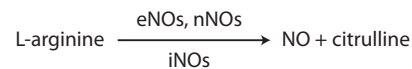
ρω από την προγνωστική σημασία του σταδίου 3, το οποίο καλύπτει 4,7% του πληθυσμού των ΗΠΑ, η αβεβαιότητα εστιάζεται τώρα στο στάδιο 3α του GFR (45-59 ml/min ανά 1,73 m²) με λόγο αλβουμίνης προς κρεατινίνη ούρων (ACR) <10 mg/g, που καλύπτει το 1,8% των Αμερικανών. Ωστόσο και αυτή η εξίσου σημαντική ομάδα, ιδίως στους ηλικιωμένους συνδέεται με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, επιπτώσεις στους νεφρούς (οξεία νεφρική βλάβη) και καρδιαγγειακή νόσο⁴. Παρόμοιες εκτιμήσεις επιπολασμού έχουν αναφερθεί παγκοσμίως και ορισμένες αναφορές σημειώνουν αυξημένο επιπολασμό με το πέρας του χρόνου^{5,6,7,8}.

Η αναγνώριση των προγνωστικών δεικτών που σχετίζονται με επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας μπορεί να βελτιώσει τις γνώσεις μας σχετικά με την παθογένεια και την εξέλιξη της ΧΝΝ και να περιορίσει τον αριθμό ατόμων που φτάνουν στο τελικό στάδιο νεφροπάθειας⁹ (0,2% του πληθυσμού των ΗΠΑ ή >500.000⁴). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα επίπεδα ADMA παρουσιάζονται αυξημένα σε ασθενείς με ΧΝΝ (ακόμα και σε στάδιο 1 ΧΝΝ)^{10,11,12,13,14} και σχετίζονται με αθηροσκληρωτικές αγγειακές επιπλοκές¹⁵. Επιπλέον, η συγκέντρωση ADMA στο πλάσμα μπορεί να προβλέψει τη νεφρική βλάβη σε ασθενείς με ΧΝΝ^{9,16,17}. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ίσως η ADMA συνιστά βιολογικό δείκτη της εξέλιξης της χρόνιας νεφρικής νόσου. Από την άλλη μεριά, η συμμετρική διμεθυλαργινίνη (SDMA), ισομερούς της ADMA, που δεν αναστέλλει τη σύνθεση NO, παρουσιάζεται επίσης αυξημένη σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Η SDMA έχει αναδειχθεί ως ενδογενής δείκτης της νεφρικής λειτουργίας, καθώς τα επίπεδά της συνδέονται στενά με το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, καλύτερα από της ADMA¹⁸. Η αυξημένη συγκέντρωση ADMA σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία ενδέχεται να οφείλεται στη νεφρική παρεγχυματική βλάβη, που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστηριότητα και έκφραση της διμεθυλαμινοϋδρολάσης της διμεθυλαργινίνης (DDAH), παρά στη μείωση της σπειραματικής διήθησης ADMA¹⁸.

Ενδοθηλιακή λειτουργία – NO και αγγειοδιαστολή

Το ενδοθήλιο είναι το εσώτατο μονόστιβο κάλυμμα όλων των αιμοφόρων αγγείων στο σώμα. Αναγνωρίζεται ως ο κύριος ρυθμιστής της αγγεια-

κής λειτουργίας, όπως του αγγειακού τόνου, της διαπερατότητας, της συγκόλλησης αιμοπεταλίων, της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων^{19,20}. Έχει την ιδιότητα να αντιδρά σε ποικίλα σωματικά ερεθίσματα όπως στη διαμητική τάση (shear stress)²¹. Τα αγγεία έχουν τη δυνατότητα να διαστέλλονται στη διαμητική τάση, μία διαδικασία που ρυθμίζεται από το NO του ενδοθηλίου²¹. Το NO παράγεται με στερεοειδική οξειδωση του αζώτου ακραίας γουανίνης της L-αργινίνης με τη μεσολάβηση συνθετασών του NO (eNOs, nNOs, iNOs)^{21,22,23} (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Παραγωγή του NO.

Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η αγγειοδιαστολή παρουσιάζεται μειωμένη σε μεγάλο αριθμό αρτηριών (αν όχι όλων) λόγω μειωμένης παραγωγής NO. Μηχανισμοί που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανεπάρκεια του συστήματος NO είναι οι ακόλουθοι: Α) Μηχανισμοί ανεπαρκούς παραγωγής NO: i) χαμηλή διαθεσιμότητα υποστρώματος (L-αργινίνη) είτε λόγω μειωμένης πρόσληψης πρωτεΐνης είτε λόγω μειωμένης σύνθεσης (η αργινίνη σχηματίζεται κυρίως στο νεφρό), ii) εκτροπή της αργινίνης σε άλλες μεταβολικές οδούς (όπως αργινάση, αλλά και αμινοτρανσφεράση και αποκαρβοξυλάση), iii) χαμηλή παροχή αργινίνης στις συνθετάσες νιτρικού οξειδίου (ανταγωνισμός κατά την ενδοκυτταρική μεταφορά του μέσω του μεταφορέα Y⁺ όπου πραγματοποιείται η παραγωγή NO), iv) αυξημένη δραστηριότητα ενδογενών αναστολών NOs (μεθυλαργινίνες και κυρίως ADMA)²⁴. Β) Μηχανισμοί ανεξάρτητοι από τη διαδικασία παραγωγής NO: i) καταστολή του NO από τις ελεύθερες ρίζες (σχηματισμός ONOO⁻), ii) μετατροπή υποδοχέων NO ή αλλαγές στη μεταγωγή σήματος, iii) περιορισμένη πρόσβαση NO στα όργανα στόχους λόγω απόθεσης προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε αυτά^{23,25,26}.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΥΛΑΡΓΙΝΙΝΩΝ

Η ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (ADMA) είναι ενδογενής αναστολέας της σύνθεσης NO, η οποία μπορεί να μειώσει την ικανότητα του NO για

αγγειοδιαστολή²¹. Αποτελεί αμινοξύ (MW: 202 Daltons), το οποίο συντίθεται κατά κανόνα ενδοκυτταρικά και κυκλοφορεί στο πλάσμα. Είναι σχετικώς σταθερό και έχει τη δυνατότητα διάχυσης μεταξύ των κυττάρων (εύκολη είσοδος-έξοδος). Επίσης, απεκκρίνεται στα ούρα και εντοπίζεται στους ιστούς και τα κύτταρα, ενώ αναστέλλει τις συνθετικές νιτρικού οξειδίου (NOs)^{27,28}.

Η ADMA συντίθεται όταν οργανικό υπόλειμμα πρωτεΐνης μεθυλιώνεται μέσω της καταλυτικής δράσης των μεθυλτρανσφερασών της αργινίνης των πρωτεϊνών (PRMTs τύπου 1 και 2)^{29,30}. Η S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) ενεργεί ως δότης ομάδων μεθυλίου, ενώ ταυτόχρονα μετατρέπεται σε S-αδενοσυλομοκυστεΐνη (SAH) και τελικά υδρολύεται σε ομοκυστεΐνη²³. Μετά την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών που περιέχουν τη μεθυλιωμένη αργινίνη, η ελεύθερη L-NMMA (N^G-μονομεθυλ-L-αργινίνη), καθώς και οι ADMA και SDMA (συμμετρική διμεθυλαργινίνη) εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα. Η PRMT τύπου 1 ευθύνεται για την ασύμμετρη μεθυλίωση και οδηγεί στο σχηματισμό ADMA και L-NMMA, ενώ η PRMT τύπου 2 ευθύνεται για τη συμμετρική μεθυλίωση και οδηγεί στο σχηματισμό SDMA και L-NMMA. Οι L-NMMA και ADMA είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς όλων των τριών ισομερών των συνθετασών του NO ακόμα και σε φυσιολογικά επίπεδα τιμών τους όπως φαίνεται και από τη χαμηλή ανασταλτική σταθερά τους για τις NOs (IC₅₀: 0,9 μmol/l για την ADMA και 0,4 μmol/l για την L-NMMA)¹⁸. Η SDMA δεν δρα ως αναστολέας²⁷ (Εικ. 2).

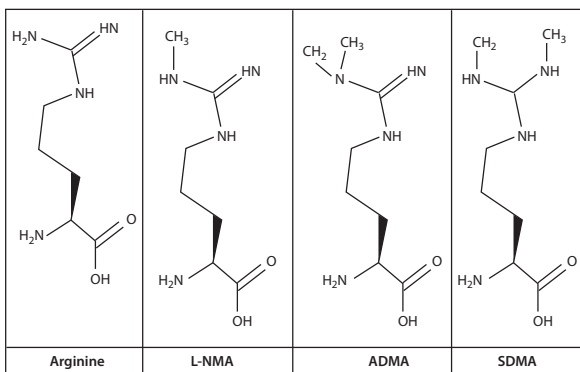
Μέχρι σήμερα, δεν έχει γίνει γνωστή καμία οδός σχηματισμού των ADMA, SDMA, L-NMMA από ελεύθερη αργινίνη^{24,31}. Η ποσότητα ADMA

που παράγεται ενδοκυτταρικά εξαρτάται από τη μεθυλίωση της ακραίας αργινίνης των πρωτεϊνών (κυρίως ιστόνες), καθώς επίσης από την κινητικότητα των πρωτεϊνών και την ισορροπία μεταξύ ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πρωτεϊνών (ενδοκυτταρική είσοδος αργινίνης μέσω του μεταφορέα Y⁺ – Μεταφορέας Κατιονικών Αμινοξέων)^{32,33}.

Η ενδοκυτταρική σύνθεση του NO είναι στενά συνδεδεμένη με την είσοδο της εξωκυτταρικής αργινίνης (ενδοκυτταρική αντιστοίχιση του Y + μεταφορέα με την eNOs) και η εξωκυτταρική ADMA καθώς και η L-NMMA είναι ανταγωνιστής της αργινίνης στο επίπεδο μεταφορέα^{34,35,36}. Ενδοκυτταρικά στα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα, τα επίπεδα ADMA είναι δέκα φορές υψηλότερα από τα επίπεδα στο πλάσμα³⁷. Επίσης οι συγκεντρώσεις ADMA είναι πολύ υψηλές στους νεφρούς και τον σπλήνα³⁸. Αυτά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ADMA είναι που ρυθμίζουν κυρίως τη δραστηριότητα των NOs, η οποία και ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων οργάνων²⁴.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΥΛΑΡΓΙΝΙΝΩΝ

Ο φυσιολογικός ρόλος της μεθυλίωσης της αργινίνης παραμένει ασαφής, ωστόσο, διάφοροι ρόλοι έχουν προταθεί, για παράδειγμα: ρύθμιση της σύνθεσης του RNA, ρύθμιση της μετάφρασης, επιδιορθώσεις του DNA, αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών και των σημάτων μετάφρασης²⁷. Ο τύπος 1 των PRMTs εκφράζονται στην καρδιά, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁷. Ο ακριβής τρόπος έκφρασης των PRMTs δεν έχει ακόμη καθοριστεί, ωστόσο όλα τα ισομερή τύπου 1 εκφράζονται στο αγγειακό τοίχωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται προς τα άνω ρύθμιση (upregulation) του τύπου 1 των PRMTs στα ενδοθηλιακά κύτταρα ως αντίδραση στη διατημητική τάση^{27,39} όπως αγγειακή βλάβη ή αύξηση της LDL (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας)^{39,40}. Σε καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, η οξειδωμένη LDL και η υψηλή συγκέντρωση γηγενούς LDL οδηγούν σε προς τα άνω ρύθμιση των PRMTs και σε αυξημένη κυτταρική σύνθεση μεθυλαργινών και κυρίως ADMA που δεν είναι δυνατό να προληφθεί με αντιοξειδωτικά⁴⁰. Η L-NMMA παρότι θεωρείται παραπροϊόν ατελούς μεθυλίωσης της αργινίνης, έχει βρεθεί σε πειραματικά πρότυπα σε επίμυες και ανθρώπους ότι αυξάνει



Εικόνα 2. Βιοχημική δομή της αργινίνης, της L-NMMA, της ADMA και της SDMA.

την απελευθέρωση νορεπινεφρίνης από τα νεύρα του συμπαθητικού συστήματος οδηγώντας σε υπερδραστηριότητα του τελευταίου¹⁸. Οι γνωστές δράσεις της ADMA, που αποτελεί και τον κυριότερο αναστολέα των συνθεσών του NO, διακρίνονται σε επιπτώσεις εξαρτώμενες από τις συνθετάσεις του NO και μη εξαρτώμενες από αυτές (βλ. πίνακα) και σε αυτή θα επικεντρωθούμε παρακάτω.

A. Ενδοκυτταρική ADMA

Η ακριβής ενδοκυτταρική συγκέντρωση της ADMA δεν είναι ακόμη γνωστή, γνωρίζουμε, ωστόσο, ότι τα κύτταρα έχουν την τάση να αυξάνουν τη συγκέντρωση των μεθυλαργινινών. Συνεπώς, αν προσθέσουμε μεθυλαργινίνες σε ένα κυτταρικό καλλιερητικό μέσο, η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί έως και πέντε φορές σε σύγκριση με το μέσο⁴¹. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σύστημα μεταφοράς της μεθυλαργινίνης αναφερόμενο ως μεταφορέας Y + που μεταφέρει ενδοκυτταρικά αργινίνη, ορνιθίνη, λυσίνη και μεθυλαργινίνες^{24,41}. Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η ADMA συσσωρεύεται σε ορισμένους κυτταρικούς θύλακες σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις, παρόλα αυτά η παρατήρηση ότι η Km^{*} της DDAH για την ADMA είναι μάλλον υψηλή (>100 μmol/l), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η ADMA μπορεί να επιτύχει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις²⁷. Έχει αναφερθεί ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ADMA σε προσφάτως απομονωμένες τομές εγκεφάλου ήταν 10,7 ± 1,3 μmol/l⁴².

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν και τα δύο ενζυμικά συστήματα, PRMTs και DDAH⁴³, και η αναστολή DDAH μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική συσσώρευση ADMA⁴³. Η συνολική παραγωγή ADMA από ενδοθηλιακά κύτταρα πιθανόν να οφείλεται σε μία ισορροπία μεταξύ του ρυθμού μεθυλίωσης αργινίνης, του ρυθμού αποδόμησης των πρωτεϊνών που περιέχουν μεθυλωμένες αργινίνες, του μεταβολικού ρυθμού της ADMA από DDAH και του ρυθμού εξόδου της ADMA από τα κύτταρα²⁷.

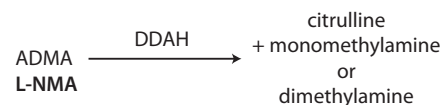
B. Κυκλοφορία της ADMA

Δεν είναι πλήρως σαφές αν τα κυκλοφορούντα επίπεδα της ADMA είναι βιολογικώς ενεργά ή συνιστούν απλώς δείκτη υψηλών ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα που βρέθηκαν τόσο σε υγιείς καταστάσεις (≈ 500 nmol/l-1,2 μmol/l, σε πλάσμα υγιών ατόμων ηλικίας 50-75 ετών είναι 0,43-0,56 μmol/l χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης⁴⁴, οι τιμές της ADMA σε ανθρώπινο ορό φαίνονται να είναι ελαφρώς υψηλότερες⁴⁵), όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (έως ≈ 3 μmol/l), είναι πολύ χαμηλά για να θεωρηθούν βιολογικά ενεργά^{23,27}. Τώρα το ενδιαφέρον εστιάζεται στη σχέση μεταξύ συγκέντρωσης ADMA και συγκέντρωσης αργινίνης. Τα επίπεδα αργινίνης στο πλάσμα ποικίλουν μεταξύ 30-100 μmol/l και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα μεταξύ 1-2 mmol/l²⁷.

Μέσα σε αυτή την τεράστια περίσσεια αργινίνης, θα αναμένονταν ότι η ADMA παραμένει πρακτικά ανενεργή και δεν αναστέλλει τις NOs. Σε συνέχεια αυτού του ευρήματος, όλοι οι ερευνητές συμπέραναν ότι η ADMA έχει ανταγωνιστική δράση προς τις NOs στο ίδιο υπόστρωμα αργινίνης, αλλά μόνο προς την αργινίνη που εισέρχεται στο κύτταρο μέσω του μεταφορέα Y⁺, υποθέτοντας την παρουσία της αργινίνης σε ενδοκυτταρικές αποθήκες^{27,46}.

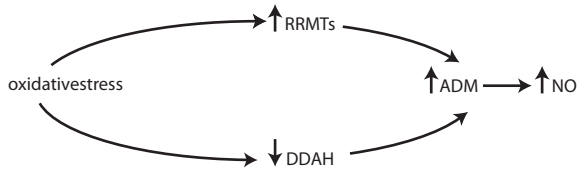
Γ. Απομάκρυνση της ADMA

Η απομάκρυνση των μεθυλαργινινών συντελείται εν μέρει μέσω νεφρικής απέκκρισης. Συνεπώς, ενώ η απέκκριση της SDMA (που δεν αναστέλλει συνθετάσεις του NO) συντελείται εξ ολοκλήρου μέσω νεφρικής απέκκρισης, οι ADMA και L-NMA εξαλείφονται κυρίως μέσω του μεταβολισμού^{47,48}. Η κύρια μεταβολική οδός της ADMA είναι η κιτρουλίνη και η διμεθυλαμίνη ή μονομεθυλαμίνη, μία αντίδραση που καταλύεται από την DDAH (διμεθυλανιμοϋδρολάση της διμεθυλαργινίνης)^{49,50} (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Μεταβολισμός της ADMA και της L-NMMA.

* Σταθερά Michaelis-Menten: εκφράζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος που απαιτείται για τη λειτουργία της ενζυμικής αντίδρασης στο 50% της μέγιστης ικανότητας.



Εικόνα 4. Οξειδωτικό στρες και PRMTs – DDAH δραστηριότητα – επίπεδα ADMA.

Η αντίδραση περιλαμβάνει την εξάλειψη της γουανιδίνης της ADMA από την κυστεΐνη της DDAH. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι η κυστεΐνη της DDAH είναι το ενεργό συστατικό, αφού η αντικατάστασή της με σερίνη καθιστά το μόριο ανενεργό^{50,51}.

Η κυστεΐνη είναι επιρρεπής στην οξειδωτική και ρυθμίζεται από την κυκλοφορία του NO⁵⁰. Αυξημένα επίπεδα NO αναστέλλουν τη δράση της DDAH με S-νιτροζυλίωση του ενεργού κυστεϊνικού συστατικού. Η αναστολή της DDAH οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης ADMA και ακολούθως σε αναστολή των NOs (παλίνδρομη ρύθμιση για τη διατήρηση της ισορροπίας ADMA / NO)²⁷. Δεν είναι ακόμη σαφές εάν το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμη αναστολή της δραστηριότητας της DDAH, ωστόσο η σύνδεση με την ομάδα νιτροζυλίου (S-νιτροζυλίωση) είναι πράγματι αναστρέψιμη²⁷ (Εικ. 4).

Η DDAH είναι πρωτίτως κυτταροπλασματικό ένζυμο. Στους ανθρώπους έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια DDAH: στο χρωμόσωμα 1 p22 (DDAH-1) και στο χρωμόσωμα 6 p21.3 (DDAH-2). Για το γονίδιο DDAH-1 έχουν ταυτοποιηθεί 8 πολυμορφισμοί του γονιδίου, ενώ για το γονίδιο DDAH-2, 6 πολυμορφισμοί^{52,53}. Τα δύο αυτά ισόενζυμα έχουν διαφορετική κατανομή ιστού, αλλά παρόμοια λειτουργία. Έχουν αναφερθεί μικρές διαφορές στην εκλεκτική λειτουργικότητά τους, για παράδειγμα DDAH-1 και nNOs, DDAH-2 και eNOs. Ωστόσο και τα δύο ισομερή κατανέμονται ευρέως στο καρδιαγγειακό σύστημα⁵³ και τους νεφρούς²⁴, ενώ εμφανίζονται επίσης σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα^{49,53}. Το γονίδιο DDAH-1 βρέθηκε να εμφανίζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφαλικές φλέβες²⁴, ενώ 3 από τους 8 πολυμορφισμούς του DDAH-1 σχετίστηκαν με προεκλαμψία και αυξημένες συγκεντρώσεις ADMA⁵⁴.

Τα αυξημένα επίπεδα ADMA στη ΧΝΝ αποτελούν ένδειξη ότι οι νεφροί παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμισή της. Ωστόσο, από τη στιγμή που

εμφανίζονται πολύ μικρές ποσότητες στα ούρα, ακόμη και σε φυσιολογική νεφρική λειτουργία^{55,56,57,58}, διαπιστώνεται ότι οι νεφροί λειτουργούν ως βασική οδός απομάκρυνσης της ADMA μέσω του μεταβολισμού από την DDAH²⁴.

Η αναλογία της κυκλοφορούσας ADMA που αποβάλλεται μέσω της νεφρικής απέκκρισης και αυτής που αποβάλλεται μέσω του μεταβολισμού από την DDAH φαίνεται να ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ειδών (π.χ. στους επίμυες, 90% μεταβολίζεται και 10% απεκκρίνεται μέσω των νεφρών)⁴⁸. Στους ανθρώπους εκτιμάται ότι 250-260 μμολ μεταβολίζονται καθημερινά και περίπου 50-60 μμολ απεκκρίνονται⁵⁹. Για την απέκκριση αυτής της ποσότητας ADMA, τα επίπεδα συγκέντρωσης στα ούρα αγγίζουν ως και 20-30 μμολ/l. Σε περίπτωση πλήρους αδυναμίας απέκκρισης της ADMA μέσω των ούρων, τα επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα θα πρέπει να αυξάνονται καθημερινά κατά 5 μμολ/l. Ωστόσο, η συγκέντρωση στο πλάσμα παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα, καθώς σπάνια υπερβαίνει τα 3 μμολ/l⁵⁹, ενώ κάποιες αιφνίδιες μεταβολές στα επίπεδα συγκέντρωσης είναι προσωρινές και πιθανότατα οφείλονται στην ξαφνική έξοδο της ADMA από τους ιστούς προς το πλάσμα²⁷. Συμπερασματικά, επομένως, σημειώνουμε το βασικό ρόλο του συστήματος της DDAH στην εξάλειψη της ADMA, ιδίως του DDAH-1. Βάσει της ενζυμικής κινητικής και χρησιμοποιώντας κεκαθαμένο ανασυνδυασμένο ανθρώπινο DDAH-2 από βακτηριακά έγκλειστα, όπως παρουσίασαν οι Pore και συν, ο φαινομενικός ρυθμός μεταβολισμού της ADMA από το DDAH-2 είναι σχεδόν 70 φορές μικρότερος από το DDAH-1⁶⁰.

Όπως αποδεικνύεται από τους Wang και συν, η αδρανοποίηση του γονιδίου DDAH-2 δεν επέφερε καμία επίπτωση στην ADMA, παρά μείωσε κατά 40% την επιθηλιακά εξαρτώμενη χάλαση των αγγείων στους επίμυες⁶¹. Μελέτες σε άλλα γενετικά τροποποιημένα ζώα (ποντίκια) έδειξαν ότι ο μεταβολισμός των ADMA και L-NMMA in vivo προϋποθέτει την παρουσία DDAH-1 ενώ δεν εντοπίστηκε κάποια συμβολή του DDAH-2 στην αποδόμηση των ADMA και L-NMMA⁶². Στον κινεζικό πληθυσμό Han μία παραλλαγή διαγραφής / εισαγωγής 4-νουκλεοτιδίων του προαγωγέα του DDAH-1 οδήγησε σε σημαντική μείωση του mRNA και εν συνεχεία σε αυξημένα επίπεδα ADMA στο πλάσμα⁶³.

Πιθανόν τα επίπεδα συγκέντρωσης κυκλοφορούσας ADMA ρυθμίζονται κυρίως από το DDAH-1 στο ήπαρ και τους νεφρούς, ενώ η ενδοθηλιακή λειτουργία διαμορφώνεται μέσω των τοπικών ενδοθηλιακών συγκεντρώσεων ADMA που με τη σειρά τους ρυθμίζονται από το ενδοθηλιακό DDAH-2¹⁸.

Η ADMA ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Τα επίπεδα συγκέντρωσης ADMA στο πλάσμα παρουσιάζονται αυξημένα σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, π.χ. σε αρτηριακή υπέρταση, στεφανιαία νόσο, πνευμονική υπέρταση, υπερομοκυστεϊναιμία, προεκλαμψία, σακχαρώδη διαβήτη, περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια και χρόνια νεφροπάθεια (στα στάδια 1-5 με ή χωρίς πρωτεϊνουρία)^{11,16,17,64,65}, στο τελικό στάδιο της νεφρικής νόσου (στάδιο 5D)^{15,64}. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει τη χρήση της συγκέντρωσης ADMA ως δείκτη για: i) ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ii) αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής θνησιμότητας και νοσηρότητας^{28,56,66,67}, iii) προογνωτικό δείκτη απώλειας της νεφρικής λειτουργίας^{17,24,68}. Πολλές μελέτες μέτρησαν τα επίπεδα ADMA χρησιμοποιώντας ELISA, ωστόσο πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε ότι οι μετρήσεις ELISA υπερεκτιμούσαν τα επίπεδα ADMA σε GFR < 30 ml/min σε σύγκριση με την αξιόπιστη μέθοδο γρήρης χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών. Παρόλα αυτά, η ELISA διαθέτει υψηλό βαθμό ακριβείας και με την κατάλληλη βαθμονόμηση, οι τιμές της ADMA μπορούν να διορθωθούν ως εξής: ADMA διορθωμένη = ADMA_{ELISA} × 0,577 + 0,14⁶⁹. Άλλες αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της ADMA ήταν η υψηλής απόδοσης γρήρη χρωματογραφία (HPLC) με ανίχνευση φθορισμού, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)⁴⁵.

Υπέρταση

Υπάρχει μεγάλος αριθμός στοιχείων που αποδεικνύουν ότι το NO συμβάλλει σημαντικά στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (AY)^{59,70}. Πράγματι, επίμυες Dahl ευαίσθητοι στο αλάτι παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ADMA στα ούρα, τα οποία συσχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης⁷¹. Εν αντιθέσει, επίμυες Dahl ανθεκτικοί στο αλάτι, με διατροφή πλούσια σε NaCl,

δεν παρουσίασαν μεταβολές στην AY ή στα επίπεδα ADMA στα ούρα⁷¹. Σε επίμυες με μονόπλευρη νεφρεκτομή, η χορήγηση ADMA, ακόμη και για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων, οδήγησε σε υπέρταση⁷². Αποτελέσματα γενετικών μελετών σε ποντίκια και επίμυες έδειξαν ότι η απάλειψη του γονιδίου ή η παρεμβολή στο mRNA του DDAH-1 συνδέεται με αύξηση των επιπέδων ADMA και οδηγεί σε καρδιαγγειακό φαινότυπο, δηλαδή την υπέρταση, που συνάδει με αναστολή των NOs⁷³.

Σε υγιείς ανθρώπους βρέθηκε ότι τα φυσιολογικά επίπεδα ADMA στα πλάσμα συνδέονται με μέσα επίπεδα αρτηριακής πίεσης⁶⁶. Αυξημένη συγκέντρωση ADMA παρατήθηκε σε ανθρώπους με ιδιοπαθή υπέρταση σε σύγκριση με νορμοτασικά υγιή άτομα⁷⁴. Έγκυση ενδογενούς ADMA σε υγιείς εθελοντές με ταυτόχρονη αύξηση συγκέντρωσης ADMA στον ορό από 0,95 μmol/l σε 23 μmol/l επηρέασε ως αναμενόμενο τη συστηματική ΑΠ⁷⁵. Επίσης, προκάλεσε σημαντική μείωση νεφρικής απέκκρισης νατρίου, σημαντική μείωση της δραστηρικής νεφρικής ροής πλάσματος (ERPF) και σημαντική αύξηση της αντίστασης των νεφρικών αγγείων (RVR)⁷⁵. Ακόμα έχει βρεθεί στενή συσχέτιση μεταξύ επιπέδων νορεπινεφρίνης και ADMA σε ασθενείς τελικού σταδίου ΧΝΝ¹⁸. Αυξημένα επίπεδα ADMA παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με «υπέρταση της λευκής μπλούζας»⁷⁶.

Οι πιθανοί μηχανισμοί, με τους οποίους η ενδογενής ADMA εμπλέκεται στην παθογένεση της υπέρτασης, είναι: i) Η μείωση του NO από την ADMA και η αύξηση του O₂⁻ μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογική επαναπορρόφηση των NaCl και H₂O (ακόμη και με χαμηλή δόση ADMA⁷⁷), οδηγώντας σε υπέρταση^{72,78}, ii) η ADMA μπορεί να προκαλέσει αγγειοσύσπαση και αύξηση της αρτηριακής πίεσης, παρεμποδίζοντας την ενδοθηλιακά εξαρτώμενη χάλαση και αυξάνοντας την ικανότητα προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων^{59,79}, i-ii) Επιπλέον, διαταράσσεται η ενδοσπειραματική αιμοδυναμική ισορροπία, ενώ η σωληναριοσπειραματική παλίνδρομη ρύθμιση και η νεφρική προσαρμογή σε συμπαθητική δραστηριότητα εξασθενούν (συμπαθητική υπερδραστηριότητα)⁸⁰. iv) Η διατημητική τάση αυξάνει την εκδήλωση και δραστηριότητα των PRMTs και διεγείρει την παραγωγή του ADMA σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα³⁹. Η διατημητική τάση ενδέχεται να συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων ADMA που παρατηρούνται

σε υπερογκαιμικές καταστάσεις, όπως σε μία δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας άλατος⁸¹.

Φαίνεται ότι υψηλότερα επίπεδα ADMA μπορούν να προκαλέσουν υπέρταση αλλά και να εμφανιστούν μετά από υπέρταση ως αντίδραση σε διατημητική τάση.

Πρωτεΐνουρία

Η πρωτεΐνουρία, ακόμη και η μικρολευκωματινουρία, αποτελεί έναν κλασικό παράγοντα εξέλιξης της νεφρικής βλάβης με ή χωρίς διαβήτη ή υπέρταση⁹. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός στοιχείων που αποδεικνύουν ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συνδέεται με την πρωτεΐνουρία^{82,83}. Η εξασθενημένη παραγωγή NO είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και τα επίπεδα ADMA συνδέονται με την πρωτεΐνουρία^{11,84}.

Πράγματι υπάρχει αναφορά για βλάβη του σπειραματικού φραγμού εξαρτώμενη από τη δόση της ADMA καθώς και για αύξηση της διαπερατότητας της λευκωματινής με αποτέλεσμα την πρωτεΐνουρία σε *in vitro* πειραματικό μοντέλο (απομονωμένα σπειράματα). Τα επίπεδα συγκέντρωσης ADMA που εφαρμόστηκαν ήταν παρόμοια με τα κυκλοφορούντα επίπεδα συγκέντρωσης ADMA σε ασθενείς με XNN⁸⁴.

Σε διαβητικούς επίμυες με διαμεσοσκληνωτική ισχαιμία προκαλούμενη από στρεπτοζοτοκίνη, υπερέκφραση DDAH (με χορήγηση ανασυνδυασμένου φορέα αδενοϊού που κωδικοποιεί το DDAH-1) οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων ADMA και μείωση των επιπέδων απέκκρισης της λευκωματινής στα ούρα σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου. Μία ακόμη επίπτωση ήταν η μείωση διαμεσοσκληνωριακής υποξίας⁸⁵. Σε επίμυες με υφολική νεφρεκτομή (5/6) αυξημένη έκφραση DDAH προκάλεσε μείωση των επιπέδων ADMA, το οποίο συνδέθηκε με μείωση της πρωτεΐνουρίας, σε σύγκριση με επίμυες που έλαβαν υδραλαζίνη αποσκοπώντας στην ίδια αποκατάσταση της αρτηριακής πίεσης⁸⁶. Επίσης, σε άλλους επίμυες (Munich-Wistar), μία πρότυπη διατροφή σε αλάτι (0,5% Na) σε συνδυασμό με τον αναστολέα συνθετασών του NO L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester) για 30 μέρες είχε ως αποτέλεσμα μέτρια λευκωματουρία. Η κλασματική κάθαρση ουδέτερης δεξτράνης 70kDalton σημείωσε μέτρια αύξηση. Επίμυες που έλαβαν L-NAME και ακολούθησαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας άλατος

(3,1% Na) για 30 μέρες παρουσίασαν έντονη λευκωματουρία, ενώ η κλασματική κάθαρση ουδέτερης δεξτράνης 70kDalton σχεδόν τριπλασιάστηκε. Βλάβη της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (GBM) σε ανιονικές θέσεις παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες⁸².

Πρόσφατη μελέτη σε μη διαβητικούς ασθενείς με XNN σταδίου 1 υπέδειξε σημαντική σύνδεση μεταξύ ADMA και επιπέδων πρωτεΐνουρίας¹¹. Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη, τα επίπεδα ADMA παρουσιάζονταν υψηλότερα σε ασθενείς νεφρωσικής πρωτεΐνουρίας σε σύγκριση με ασθενείς μη νεφρωσικού επιπέδου πρωτεΐνουρίας με τον ίδιο ρυθμό σπειραματικής διήθησης⁸⁷. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα ADMA εντοπίστηκαν σε παιδιά με κορτικοανθεκτικό νεφρωσικό σύνδρομο λόγω σποραδικής εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης, σε σύγκριση με υγιή άτομα ίδιας ηλικίας⁸⁸. Σε μία μελέτη παρατήρησης πληθυσμού διαβητικών ασθενών τύπου 2 με νορμολευκωματινουρία ή μικρολευκωματινουρία, εκείνοι με υψηλότερα επίπεδα ADMA κατέληγαν πιο συχνά σε προχωρημένο στάδιο λευκωματουρίας σε σύγκριση με εκείνους με τα χαμηλότερα επίπεδα ADMA⁸⁹. Οι Yilmaz και συν εντόπισαν σε ασθενείς με XNN σταδίου 1 με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 τα κυκλοφορούντα επίπεδα μυοστατίνης και SFas, δύο διαμεσολαβητές κυτταρικού θανάτου ότι σχετίζονται ανεξάρτητα με τον βαθμό πρωτεΐνουρίας, καθώς επίσης με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και με την κυκλοφορούσα ADMA (Υπόθεση Yilmaz: μία διαρροή από τον ενδοκυτταρικό χώρο προκαλούμενη από νέκρωση ή/και ελαττωματική απόπτωση κατά τη διάρκεια πρωτεΐνουρίας θα μπορούσε να συμβάλλει σε αύξηση των επιπέδων ADMA, καθώς η ADMA είναι κυρίως ενδοκυτταρική)⁹⁰.

Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η ADMA και άλλοι αναστολείς NOs εμπλέκονται στην παθογένεση πρωτεΐνουρίας, είναι: i) Η εξασθένιση του σπειραματικού μεγέθους και της εκλεκτικότητας φορτίου της GBM. Οι επιπτώσεις αντανakλούν πιθανότατα λειτουργικές περισσότερο παρά δομικές διαταραχές του σπειραματικού τοιχώματος⁸². ii) Η ADMA διακυβεύει την ακεραιότητα του φραγμού διήθησης μεταβάλλοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του NO και του υπεροξειδίου του οξυγόνου O₂⁻ (ανταγωνισμός του NO με ενεργές ρίζες οξυγόνου-ROS και O₂⁻)⁸⁴. iii) Η σύνδεση μεταξύ ADMA και πρωτεΐνουρίας φαίνεται να οφείλεται

σε μεταβολές στην ανακύκλωση των πρωτεϊνών ή δραστηριότητα PRMT⁹¹ ή άλλους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (αποκλεισμός του RAS με χρήση ραμπρίλης οδηγεί σε μείωση των επιπέδων ADMA, ελάττωση της πρωτεϊνουρίας και των κυκλοφορούντων διαμεσολαβητών κυτταρικού θανάτου)^{90,92}. Από την άλλη, η σωληναριακή δραστηριότητα της DDAH μπορεί να αδρανοποιηθεί λόγω οξειδωτικού στρες προκαλούμενου από πρωτεϊνουρία οδηγώντας σε αύξηση της συσσώρευσης ADMA σε ασθενείς με XNN σταδίου 1 και πρωτεϊνουρία⁹³.

Εξέλιξη νεφρικής βλάβης

Τόσο η υπέρταση όσο και η πρωτεϊνουρία αποτελούν αποδεδειγμένους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη της XNN⁹. Πέρα από την υπέρταση και την πρωτεϊνουρία υπάρχουν επίσης στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ADMA θα μπορούσε να εμπλέκεται άμεσα στην εξέλιξη της XNN.

Πράγματι, σε επίμυες με μονόπλευρη νεφρεκτομή ή χορήγηση ADMA για 8 εβδομάδες σε μία ομάδα και η σύγκρισή της με μία δεύτερη ομάδα που δεν έλαβε ADMA έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: i) αυξημένα επίπεδα ADMA σε ορό συνδέονται με αυξημένο νεφρικό οξειδωτικό στρες, καθώς σημειώθηκαν επίσης αυξημένα επίπεδα ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻) στους νεφρούς⁷², ii) η χορήγηση ADMA προκάλεσε διέγερση της σπειραματικής ίνωσης (ενίσχυση της σύνθεσης της ενδοαγγειακής ουσίας), καθώς και αγγειακή ίνωση που γίνεται εμφανής από το αυξημένο κολλαγόνο τύπου I και II και την εναπόθεση φμπρονεκτίνης⁷², iii) σε επίμυες που έλαβαν ADMA, παρατηρήθηκε μείωση του περισωληναριακού τριχοειδικού δικτύου⁷², iv) η έκφραση του mRNA κολλαγόνου τύπου I και η νεφρική συγκέντρωση TGF-β1 (Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγων-β1) παρουσιάστηκαν υψηλότερες σε επίμυες που έλαβαν ADMA⁷², v) τα αυξημένα επίπεδα TGF-β1 συσχετίστηκαν με τα υψηλά επίπεδα αγγειοτενσίνης II καθώς και με την αυξημένη έκφραση του HIF-1α (Παράγοντας Επαγόμενος από την Υποξία-1α) και ενδοθηλίνης 1 (περίπου τρεις φορές υψηλότερα από τα κανονικά επίπεδα)⁷². Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η χρόνια νεφρική υποξία ενδέχεται να εμπλέκεται σημαντικά στην εξέλιξη της διαμεσοσωληναριακής ίνωσης σε XNN⁹⁴, καθώς η διαμεσοσωληναριακή ίνωση διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο από τη

σπειραματοσκλήρυνση όσον αφορά στη νεφρική πρόγνωση^{94,95}.

Η χορήγηση ενός ανασυνδυασμένου φορέα α-δενοϊού που κωδικοποιεί το DDAH-1 και προκαλεί αυξημένη έκφραση DDAH σε επίμυες με υφολική νεφρεκτομή (5/6), μοντέλο που θεωρείται επί του παρόντος ως το πλέον αντιπροσωπευτικό της νεφρικής βλάβης σε ανθρώπους^{86,96}, έχει οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων συγκέντρωσης ADMA και έχει επιβραδύνει την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης, καθώς περιορίστηκε η διαμεσοσωληναριακή ίνωση. Αυτό συνέβη σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι σε επίμυες με νεφρεκτομή που έλαβαν υδραλαζίνη με σκοπό την αποκατάσταση της αρτηριακής πίεσης, υποστηρίζοντας έτσι ότι υπάρχει ένας μηχανισμός για την εξέλιξη της βλάβης του νεφρού εντελώς ανεξάρτητος από την αρτηριακή υπέρταση⁸⁶. Συνεπώς προτείνεται ότι η βελτίωση των επιπέδων ADMA περιορίσει την περισωληναριακή ισχαιμία και οδήγησε σε μείωση εμφάνισης TGF-β1. Επίσης, σε φυσιολογικούς επίμυες, η χρόνια αναστολή NOs προκαλεί αρτηριακή υπέρταση και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση⁹⁷.

Σύμφωνα με δύο μελέτες, υπάρχει ταχύτερη επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με XNN που παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση ADMA στον ορό, προτείνοντας ότι αυτό θα μπορούσε να δρα ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου^{16,17}. Σε μία προοπτική μελέτη παρακολούθησης ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια τύπου 1, αυξημένα επίπεδα ADMA τείνουν να συμβάλλουν στην αύξηση του ποσοστού μείωσης του GFR και ανάπτυξη XNN τελικού σταδίου⁹⁸. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις ADMA στον ορό βρέθηκαν να συνιστούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τον διπλασιασμό των επιπέδων της κρεατινίνης ορού σε λήπτες νεφρικού μοσχεύματος⁹⁹. Επιπλέον, μία μελέτη μικρής κλίμακας εντόπισε αυξημένα επίπεδα ADMA σε ασθενή με ADPKD (αυτοσωματική επικρατούσα πολυκυστική νόσος νεφρών) και αρχικά στάδια XNN¹⁴. Ο περιορισμός του νεφρικού NO συνοδεύει τη χρόνια νεφρική νόσο από τα πρώτα στάδια, πράγμα που πιθανόν να οφείλεται στην αναστολή των NOs από τα αυξημένα επίπεδα ADMA¹¹.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τη σημασία των επιπέδων ADMA του ορού στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης, σύμφωνα με τους Carlin και συν, η αυξημένη έκφραση του

Πίνακας 1. Δράσεις της ADMA.

Εξαρτώμενες από τις NOs	Μη εξαρτώμενες από τις NOs
Αναστέλλει και τα τρία ισομερή NOs και προκαλεί ισοδύναμη αναστολή με το L-NMA ^{55,102}	Προκαλεί στεφανιαία μικροαγγειακή δυσλειτουργία ¹⁰³
Αναστέλλει το σχηματισμό NO προκαλώντας περιορισμό του σχηματισμού του υπεροξειδίου του αζώτου (ONOO ⁻) σε φλεγμονή, όπου υπάρχει υπερδραστικότητα iNOS ^{104,105}	Προκαλεί προς τα άνω ρύθμιση του μεταρρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) ^{61,103}
Σε υψηλές συγκεντρώσεις, Αυξάνει την παραγωγή υπε-η ADMA (και η L-NMA) θα μπορούσε να δρα ανταγωνιστικά προς την αργινίνη στο σύστημα του μεταφορέα Y ⁺ ενώ η αυξημένη ενδοκυτταρική είσοδος της ADMA μπορεί να προκαλέσει μείωση της παραγωγής ενδοθηλιακού NO ²⁴	Αυξάνει την παραγωγή υπε-ροξειδίου ¹⁰³
Σε μικρή συγκέντρωση, τα γουανιδικά μόρια θα μπορούσαν να προκαλέσουν αναστολή της Na-K-ATPάση σε μικροσωμάτια κεφαλού ¹⁰⁶	Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της φωσφορυλίωσης eNOS σε Ser 1177 επαγόμενη από τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου ¹⁰⁷ Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της φωσφορυλίωσης της ERK1/2, μίας από τις θεωρούμενες σημαντικές κινάσες για φωσφορυλίωση eNOs, επαγόμενη από τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου ¹⁰⁷

mRNA του DDAH-1, ενός γενετικού πολυμορφισμού, συσχετίστηκε με απότομη μείωση της νεφρικής λειτουργίας σε δύο ξεχωριστές ομάδες ασθενών με XNN, πράγμα που σημαίνει ότι οι συγκεντρώσεις ADMA στο πλάσμα ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τα τοπικά επίπεδα στο νεφρικό ιστό. Ενδιαφέρον προκαλεί το εύρημα ότι οι αυξήσεις των ενδογενών μεθυλαργινινών μπορεί να έχουν προστατευτική δράση εκτός από τον παθολογικό τους ρόλο που εξαρτάται από το συγκεκριμένο σύστημα οργάνων⁷³. Οι ίδιοι προσπάθησαν επίσης να μας προβληματίσουν για το πώς μελέτες σε τρωκτικά όσον αφορά στην έκφρα-

ση DDAH-1 αντικατοπτρίζουν επαρκώς την επίδραση μεταβολής των επιπέδων DDAH-1 σε ανθρώπους υγείς και ασθενείς¹⁰⁰. Παραταύτα αναγνώρισαν ότι υπήρχαν αρκετοί περιορισμοί στη μελέτη τους (το μέγεθος του ανθρώπινου δείγματος προς ανάλυση ήταν μικρό, καθώς επίσης διαφορετικές πτυχές αυτής της μελέτης διεξήχθησαν σε πληθυσμούς με διαφορετικά χαρακτηριστικά αναφοράς)¹⁰⁰. Επίσης, έχουν περιγραφεί λεπτομερώς οι ομοιότητες και διαφορές ως προς τις μεταβολικές οδούς της ADMA και τα επίπεδα νεφρικής απέκκρισης σε ανθρώπους, επίμυες και ποντίκια, ενώ έχουν εξεταστεί και συγκριθεί οι μεταβολές που παρουσίασαν σε νεφρική ανεπάρκεια¹⁰¹.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η ADMA είναι ένας ισχυρός ενδογενής αναστολέας των NOs και η συσσώρευσή της μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Έως τώρα θεωρούνταν ως προγνωστικός δείκτης καρδιαγγειακών επεισοδίων, ωστόσο πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν τη συσχέτισή της με την αρτηριακή υπέρταση καθώς και την επίπτωση που έχει στη βλάβη του σπειραματικού τριχοειδούς, την πρωτεϊνουρία, τη διάμεση και σπειραματική ίνωση και το οξειδωτικό στρες. Όλα τα παραπάνω αποτελούν βασικούς παράγοντες που σχετίζονται και εμπλέκονται με τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Δεν είναι ακόμη σαφές εάν πρόκειται για ανερχόμενο δείκτη εξέλιξης, νέο παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου ή και τα δύο. Η ADMA ενδέχεται να κατέχει αιτιολογικό ρόλο στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου^{16,86,96}. Παρόλα αυτά, τυχόν στοιχεία που προκύπτουν από παρατήρηση για οποιαδήποτε αιτιώδη σχέση της ADMA με την εξέλιξη της XNN είναι δύσκολο να ερμηνευθούν, δεδομένου του αριθμού των δυνητικών παραγόντων συννοσηρότητας (ηπατική νόσος, αγγειακή νόσος, υπέρταση, γήρανση, δυσλιπιδαιμία, υπερομοκυστεϊναιμία κ.λπ.) που επηρεάζουν επίσης τα επίπεδά της, όπως και η πιθανότητα αντίστροφης αιτιώδους σχέσης¹⁰⁰.

SUMMARY

Raptis V, Bikos A, Kapoulas S. The role of nitric oxide synthases inhibitors on the pathogenesis of ar-

terial hypertension and chronic kidney disease.
Arterial Hypertension 2013; 22: 121-134.

Methylarginines are naturally occurring amino-acids found in tissues and cells that circulates in plasma and is excreted in urine. The most important representative is asymmetric dimethylarginine (ADMA) which inhibits nitric oxide synthetases (NOs) and produces considerable cardiovascular biological effects. Several studies have suggested that plasma concentrations of ADMA provide a marker of risk for endothelial dysfunction and cardiovascular disease. In animal and in population studies ADMA has been associated with progression of CKD. Several mechanisms may be involved in this association, such as presence of arterial hypertension, compromise of the integrity of the glomerular filtration barrier and development of renal fibrosis. This review summarizes the existing literature on the biology and physiology of ADMA focusing on its role in the progression of renal disease.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *National Kidney Foundation.* K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1-266.
2. *Levey AS, Stevens LA, Coresh J.* Conceptual model of CKD: applications and implications. *Am J Kidney Dis* 2009; 53: S4-16.
3. *Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al.* Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67: 2089-2100.
4. *Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al.* The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011; 80(1): 17-28.
5. *Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al.* Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007; 298: 2038-2047.
6. *Hallan SI, Coresh J, Astor BC, et al.* International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2275-228.
7. *Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, et al.* Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S131-S138.
8. *Imai E, Matsuo S.* Chronic kidney disease in Asia. *Lancet* 2008; 371: 2147-214.
9. *Kronenberg F.* Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 677-689.
10. *Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, et al.* Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 170-176.
11. *Caglar K, Yilmaz MI, Sonmez A, et al.* ADMA, proteinuria, and insulin resistance in non-diabetic stage I chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; 70: 781-787.
12. *Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Vollmer S, Bode-Boger SM.* L-Arginine, ADMA, SDMA, creatinine, MDRD formula: detour to renal function testing. *J Nephrol* 2008; 21: 959-961.
13. *Panichi V, Mantuano E, Paoletti S, et al.* Effect of simvastatin on plasma asymmetric dimethylarginine concentration in patients with chronic kidney disease. *J Nephrol* 2008; 21: 38-44.
14. *Wang D, Strandgaard S, Borresen ML, et al.* Asymmetric Dimethylarginine and Lipid Peroxidation Products in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *AJKD.* 2008; 51(2): 184-191.
15. *Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, et al.* Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 490-496.
16. *Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, et al.* Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2456-2461.
17. *Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C.* Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2449-2455.
18. *Schwedhelm E, Böger RH.* The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(5): 275-8.
19. *Davignon J, Ganz P.* Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III27-III32.
20. *Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ.* Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; 115: 1285-1295.
21. *Mohler ER III.* Endothelial dysfunction. UpToDate- [Internet] 2006; [[updated 2012, cited 2012Jan 18]http://www.uptodate.com/contents/endothelial-dysfunction.
22. *Gokce N.* L-Arginine and hypertension. *J Nutr* 2004; 134: 2807S-2811S.
23. *Landim MBP, Filho AC, Chagas ACP.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: Implications for atherogenesis. *Clinics* 2009; 64 (5): 471-478.
24. *Baylis C.* Arginine, arginine analogs and nitic oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2(4): 209-220.

25. *Himmelfarb L.* Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 2004; 17: 449-454.
26. *Zatz R, Baylis C.* Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-964.
27. *Vallance P, Leiper J.* Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:DimethylarginineDimethylaminohydroxylase Pathway. *ArteriosclerThrombVasc Biol* 2004; 24: 1023-1030.
28. *Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolaemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847.
29. *Clarke S.* Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 977-983.
30. *McBride AE, Silver PA.* State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106: 5-8.
31. *Devés R, Boyd CAR.* Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998; 78: 487-545.
32. *Casellas P, Jeanteur P.* Protein methylation in animal cells. I. Purification and properties of Sadenosyl-L-methionine: protein (arginine) N-methyltransferase from Krebs II ascites cells. *BiochimBiophysActa* 1978; 519: 243-254.
33. *Casellas P, Jeanteur P.* Protein methylation in animal cells. II. Inhibition of S-adenosyl-L-methionine: protein (arginine) N-methyltransferase by analogs of Sadenosyl-L-homocysteine. *BiochimBiophysActa* 1978; 519: 255-268.
34. *Leiper J, Vallance P.* Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 542-548.
35. *Closs E, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U.* Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the γ -carrier hCAT-2B. *NitricOxide* 1997; 1: 65-73.
36. *Brunini T, Moss M, Siqueira M, et al.* Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and Nmonomethyl- L-arginine: Effects of arterial hypertension. *ClinExpPharmacolPhysiol* 2004; 31: 738-40.
37. *Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Täger M, Bode-Böger SM.* Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylargininedimethylaminohydroxylase. *J Am SocNephrol* 2005; 16: 892-898.
38. *Ueno S, Sano A, Kotani K, Kondoh K, Kakimoto Y.* Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain. *J Neurochem* 1992; 59: 2012-2016.
39. *Osnai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K.* Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003; 42: 985-990.
40. *Böger RH, 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.
41. *Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P.* Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibitor of NO synthases? *Am J Physiol* 1995; 269: C750-756.
42. *Cardounel AJ, Zweier JL.* Endogenous methylarginines regulate neuronal nitric-oxide synthase and prevent excitotoxic injury. *J Biol Chem* 2002; 277: 33995-4002.
43. *MacAllister R, Parry H, Kimoto M, et al.* Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylargininedimethylaminohydroxylase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-1540.
44. *Teerlink T.* HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci* 2007; 851 (1-2): 21-9.
45. *Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, et al.* Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *ClinChem Lab Med* 2004; 42(12): 1377-83.
46. *Tong BC, Barbul A.* Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 823-32.
47. *McDermott JR.* Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976; 154: 179-184.
48. *Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K.* Metabolism of NG NG-dimethylarginine and NG NGdimethylarginine in rats. *Arch BiochemBiophys* 1987; 252: 526-537.
49. *Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T.* Detection of NG, NG-dimethylargininedimethylaminohydroxylase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem (Tokyo)* 1995; 117: 237-238.
50. *Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P.* S-nitrosylation of dimethylargininedimethylaminohydroxylase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydroxylase. *ProcNatlAcadSci U S A.* 2002; 99: 13527-13532.
51. *Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Tilley S, et al.* Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylargininedimethylaminohydroxylase. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 679-683.
52. *Tran CTL, Fox MF, Vallance P, Leiper J.* Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000; 68: 101-105.

53. *Leiper J, MacAllister R, Whitley G, et al.* Identification of two human dimethylargininedimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343: 209-214.
54. *Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen TP, Salonen JT.* Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 73-77.
55. *Vallance P, Leone A, Calver A, et al.* Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-576.
56. *Böger RH, Zoccali C.* ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2003; (Suppl 4): S23-S28.
57. *Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G.* Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S14-S18.
58. *Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T.* Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1999-2002.
59. *Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al.* Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylargininedimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1455-1459.
60. *Pope AJ, Karuppiah K, Cardounel AJ.* Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *PharmacolRe* 2009; 60(6): 461-5.
61. *Wang D, Gill SP, Chabrashvili T, et al.* Isoform-Specific Regulation by NG,NG-DimethylarginineDimethylaminohydrolase of Rat Serum Asymmetric Dimethylarginine and Vascular Endothelium-Derived Relaxing Factor/NO. *CircRes* 2007; 101(6): 627-35.
62. *Hu X, Atzler D, Xu X, et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(7): 1540-6.
63. *Ding H, Wu B, Wang H, et al.* A novel loss-of-function DDAH1 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to thrombosis stroke and coronary heart disease. *Circ Res* 2010; 106(6): 1145-52.
64. *Zoccali C, Kielstein JT.* Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *CurrOpinNephrolHypertens* 2006; 15: 314-320.
65. *Young JM, Terrin N, Wang X, et al.* Asymmetric dimethylarginine and mortality in stages 3 to 4 chronic kidney disease. *Clin J Am SocNephrol* 2009; 4(6): 1115-20.
66. *Miyazaki h, Matsuoka H, Cooke JP, et al.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146.
67. *Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamci F, et al.* Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-2117.
68. *Vallance P, Leiper J.* ADMA and kidney disease – marker or mediator. *J Am SocNephrol* 2005; 16: 2254-2256.
69. *Pecchini P, Malberti F, Mieth M, et al.* Measuring asymmetric dimethylarginine (ADMA) in CKD: a comparison between enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *JNephrol* 2012; 0.doi:10.5301/jn.5000085.
70. *Arnal J-F, Michel J-B, Harrison DG.* Nitric oxide in the pathogenesis of hypertension. *CurrOpinNephrolHypertens* 1995; 4: 182-188.
71. *Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, et al.* Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 242-247.
72. *Mihout F, Shweke N, Bigé N, et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces chronic kidney disease through a mechanism involving collagen and TGF-β1 synthesis. *J Pathol* 2011; 223: 37-45.
73. *Caplin B, Leiper J.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators, and regulators? *ArteriosclerThrombVasc Biol* 2012; 32(6): 1343-53.
74. *Perticone F, Sciacqua A, Maio R, et al.* Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol* 2010; 142(3): 236-41.
75. *Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, et al.* Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-177.
76. *Curgunlu A, Uzun H, Bavuno lu I, Karter Y, Genç H, Vehid S.* Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens* 2005; 19(8): 629-33.
77. *Kielstein JT, Simmel S, Bode-Böger SM, et al.* Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27(3): 143-7.
78. *Cabral PD, Garvin JL.* Luminal flow regulates NO and O₂(-) along the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300(5): F1047-53.
79. *Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP.* An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes.

- J Am CollCardiol 2000; 36: 2287-2295.
80. *Mount PF, Power DA.* Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187(4): 433-46.
 81. *Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K.* Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000; 101(8): 856-61.
 82. *Arcos MI, Fujihara CK, Sesso A, et al.* Mechanisms of albuminuria in the chronic nitric oxide inhibition model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F1060-F1066.
 83. *Sharma M, McCarthy ET, Savin VJ, Lianos EA.* Nitric oxide preserves the glomerular protein permeability barrier by antagonizing superoxide. *Kidney Int* 2005; 68: 2735-2744.
 84. *Sharma M, Zhou Z, Miura H, et al.* ADMA injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 1386-1395.
 85. *Shibata R, Ueda S, Yamagishi S, et al.* Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in tubulointerstitialischaemia in the early phase of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(4): 1162-9.
 86. *Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, et al.* Dimethylargininedimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1525-1533.
 87. *Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al.* ADMA levels correlate with proteinuria, secondary amyloidosis, and endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 388-395.
 88. *Lücke T, Kanzelmeyer N, Chobanyan K, et al.* Elevated asymmetric dimethylarginine (ADMA) and inverse correlation between circulating ADMA and glomerular filtration rate in children with sporadic focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 734-740.
 89. *Hanai K, Babazono T, Nyumura I, et al.* Asymmetric dimethylarginine is closely associated with the development and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(6): 1884-8.
 90. *Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al.* Reduced proteinuria using ramipril in diabetic CKD stage 1 decreases circulating cell death receptor activators concurrently with ADMA. A novel pathophysiological pathway? *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(10): 3250-6.
 91. *Kielstein JT, Fliser D.* Lowering asymmetric dimethylarginine: a new mechanism mediating the renoprotective-effects of reninangiotensin system inhibitors in proteinuric patients? *Blood Purif* 2007; 25: 324-326.
 92. *Yilmaz MI, Saglam M, Sonmez A, et al.* Improving proteinuria, endothelial functions and asymmetric dimethylarginine levels in chronic kidney disease: ramipril versus valsartan. *Blood Purif* 2007; 25: 327-335.
 93. *Ueda S, Yamagishi S, Okuda S.* New pathways to renal damage: role of ADMA in retarding renal disease progression. *J Nephrol* 2010; 23(4): 377-86.
 94. *Nangaku M.* Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 17-25.
 95. *Fine LG, Orphanides C, Norman JT.* Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl* 1998; 65: S74-S78.
 96. *Kielstein JT, Zoccali C.* A New Perspective for the Treatment of Renal Diseases? *JASN* 2007; 18(5): 1365-1367.
 97. *Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R.* Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hyperension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1996; 27(5): 1165-72.
 98. *Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving HH, Rossing P.* Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008; 31(4): 747-52.
 99. *Abedini S, Meinitzer A, Holme I, et al.* Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2010; 77: 44-50.
 100. *Caplin B, Nitsch D, Gill H, et al.* Circulating methylarginine levels and the decline in renal function in patients with chronic kidney disease are modulated by DDAH1 polymorphisms. *Kidney Int* 2010; 77(5): 459-67.
 101. *Al Banchaabouchi M, Marescau B, Possemiers I, D'Hooge R, Levillain O, De Deyn PP.* NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflugers Arch* 2000; 439(5): 524-31.
 102. *MacAllister R, Whitley G, Vallance P.* Effect of guanidine and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 1994; 45: 737-742.
 103. *Osamu Suda, Masato Tsutsui, Tsuyoshi Morishita, et al.* Asymmetric Dimethylarginine Produces Vascular Lesions in Endothelial Nitric Oxide Synthase – Deficient Mice. Involvement of Renin-Angiotensin System and Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1682-1688.
 104. *Olken NM, Marletta MA.* NG-methyl-L-arginine functions as an alternative substance and mechanism-

- based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1993; 32: 9677-9685.
105. *Pou S, Keaton L, Surichamom W, Rosen GM.* Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 9573-9580.
106. *Matsumoto M, Mori A.* Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na⁺-K⁺ ATPase activity. *J Neurochem* 1976; 27: 635-636.
107. *Kajimoto H, Kai H, Aoki H, et al.* Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. *Kidney Int* 2012; 81(8): 762-8.