

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) jako nový nezávislý faktor přežití u hemodialyzovaných nemocných

Cibulka R.¹, Rajdl D.¹, Šíroková R.¹, Eiselt J.², Malánová L.³, Trefil L.¹, Racek J.¹

¹Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni

²1. interní klinika LF UK a FN v Plzni

³Dialyzační středisko B. Braun Avitum, Plzeň

SOUHRN

Cíl studie: Asymetrický dimethylarginin (ADMA) je endogenní inhibitor syntázy oxidu dusnatého a je považován za rizikový faktor aterosklerózy. Úloha ADMA v predikci přežití u hemodialyzovaných (HD) nemocných není objasněná. Rozhodli jsme se porovnat ADMA jako prognostický faktor s vybranými rizikovými faktory celkové mortality v této skupině pacientů.

Typ studie: Observační, prospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Ústav klinické biochemie a hematologie a 1. interní klinika, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni; Dialyzační středisko B. Braun Avitum v Plzni, Česká republika.

Materiál a metody: Analyzovali jsme sérové hladiny ADMA pomocí ELISA metody, C-reaktivní protein (CRP) ultrasenzitivní metodou, homocystein (hcy), albumin (alb), troponin I (cTnI) a natriuretický peptid B (BNP) u 202 chronicky hemodialyzovaných nemocných (77 žen, 125 mužů; medián věku [interkvartilové rozpětí] = 68 [60–74] let. V čase statistické analýzy bylo v naší studijní populaci zaznamenáno 44 úmrtí (medián času sledování byl 17,1 [10,4–17,3] měsíců). Testovali jsme každý měřený parametr jako prediktor přežití v Coxově modelu poměrného hazardu (s adjustací na věk, pohlaví a délku dialyzační léčby).

Výsledky: Relativní rizika (RR) celkové mortality s 95% konfidenčními intervaly (CI) pro všechny měřené parametry byla následující [data jsou uvedena v následujícím pořadí: hodnota cut-off; RR (CI)]: ADMA 1,14–1,3 $\mu\text{mol/l}$; 2,44 (1,24–4,79), hcy 34,1–41,8 $\mu\text{mol/l}$; 1,81 (0,89–3,68), CRP > 21,8 mg/l; 2,28 (1,17–4,43), alb < 35,4 g/l; 3,29 (1,63–6,63), cTnI > 0,04 $\mu\text{g/l}$; 2,18 (1,14–4,17) a BNP > 1485 ng/l; 1,23 (0,62–2,45).

Závěr: Ze všech měřených parametrů pouze ADMA, alb, CRP a cTnI statisticky významně predikovaly celkovou mortalitu u hemodialyzovaných nemocných. Nicméně ADMA se neukázal jako hodnotný klinický marker v predikci přežití u hemodialyzovaných nemocných.

Klíčová slova: asymetrický dimethylarginin, hemodialýza, přežití, troponin I, natriuretický peptid B.

SUMMARY

Cibulka R., Rajdl D., Šíroková R., Eiselt J., Malánová L., Trefil L., Racek J.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a novel prognostic factor for survival in hemodialysis patients

Objective: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and is considered as a risk factor for atherosclerosis. The role of ADMA in survival prediction of hemodialysis (HD) patients is not clear. We decided to compare ADMA as a prognostic factor with selected risk factors for overall mortality in this group of patients.

Design: Observational, prospective study.

Settings: Institute of Clinical Biochemistry and Hematology and 1st Department of Internal Medicine, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Pilsen; Dialysis Centre B. Braun Avitum in Pilsen, Czech Republic.

Material and Methods: We analyzed ADMA levels by ELISA method, C-reactive protein (CRP) measured by ultrasensitive method, homocysteine (hcy), albumin (alb), troponin I (cTnI) and brain natriuretic peptide (BNP) in serum of 202 chronically HD patients (77 females, 125 males; median age [interquartile range] = 68 [60–74] years). At the time of statistic analysis, there were 44 deaths in our study population (median [interquartile range] follow-time was 17.1 [10.4–17.3] months). We tested each measured parameter as a predictor of patients' survival in a Cox proportional hazard model (adjusted for age, sex and duration of HD treatment).

Results: Relative risks (RR) of overall mortality with their 95% confidence intervals (CI) for all measured parameters were [data are presented as follows: cut-off point; RR (CI)]: ADMA 1.14 to 1.3 $\mu\text{mol/l}$; 2.44 (1.24–4.79), hcy 34.1 to 41.8 $\mu\text{mol/l}$; 1.81 (0.89–3.68), CRP > 21.8 mg/l; 2.28 (1.17–4.43), alb < 35.4 g/l; 3.29 (1.63–6.63), cTnI > 0.04 $\mu\text{g/l}$; 2.18 (1.14–4.17) and BNP > 1485 ng/l; 1.23 (0.62–2.45).

Conclusion: From all measured variables ADMA, alb, CRP and cTnI statistically significantly predicted overall mortality in HD patients. Nevertheless, ADMA doesn't seem to have a clinical value in survival prediction of HD patients.

Key words: asymmetric dimethylarginine, hemodialysis, survival, troponin I, brain natriuretic peptide.

Úvod

Asymetricky methylované metabolity argininu [NG-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) a NG, N' G-dimethyl-L-arginin (ADMA)] působí jako kompetitivní inhibitory syntázy oxidu dusnatého (NOS), a proto negativně ovlivňují

produkci oxidu dusnatého (NO). Jelikož plazmatická koncentrace ADMA je přibližně 10krát vyšší než koncentrace L-NMMA, je ADMA považován za hlavní endogenní inhibitor NOS [1]. Je známo, že NO má významné vazodilatační účinky, dále působí antiagregačně a inhibuje proliferaci a migraci buněk hladké cévní svaloviny. Snižená

produkce NO vede k endotelové dysfunkci, která může mít za následek postižení kardiovaskulárního systému [2].

Nemocní v terminální fázi onemocnění ledvin léčení hemodialýzou (HD) mají zvýšené kardiovaskulární riziko. Částečně se na tom podílejí tradiční rizikové faktory jako např. arteriální hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidémie, anémie aj. Zánětlivé procesy, zvýšená aktivace symptomatiky a akumulace inhibitorů NOS (zejména ADMA) jsou faktory, kterým se v tomto ohledu také připisuje nemalý význam [3]. ADMA je považován za nezávislý rizikový faktor rozvoje aterosklerózy [4]. Úloha ADMA v predikci úmrtí u hemodialyzovaných pacientů není doposud vyjasněna [5]. Naším cílem bylo porovnat koncentrace ADMA jako prediktivního faktoru s vybranými rizikovými faktory celkové mortality ve skupině HD nemocných.

Materiál a metody

Koncentrace ADMA jsme stanovili pomocí ELISA metody (DLG Diagnostika GmbH, Hamburg, Německo) na čtečce mikrodestiček AUTO-EIA II (Labsystems Oy, Espoo, Finland) [6]. Na automatickém analyzátoru Olympus AU 400 (Mishima, Japonsko) byly určeny hladiny následujících analytů: homocystein (hcy) enzymatickou fotometrickou metodou (Carolina Liquid Chemistries, Brea, California, USA), C-reaktivní protein (CRP) imunoturbidimetricky ultrasenzitivní metodou (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) a pokud koncentrace CRP naměřená touto metodou přesáhla 10 mg/l, pak kitem kalibrovaným na koncentrace nad 10 mg/l (Kamya Biomedical Company, Seattle, Washington, USA), albumin (alb) soupravou ALBUMIN liquicolor (Human Diagnostics, Wiesbaden, Germany). Natriuretický peptid typu B (BNP) byl určen pomocí soupravy AxSYM BNP Assay (mEIA) na imunochemickém analyzátoru AxSYM 2 (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), troponin I (cTnI) soupravou Access AccuTnI na přístroji Access 2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Všechny vzorky žilní krve byly získány na začátku studie před plánovanou hemodialýzou, byly zpracovány do 30 minut po odběru a uchovány při -80 °C až do doby analýzy.

Všechny statistické údaje jsou vyjádřeny (pokud není uvedeno jinak) jako medián (interkvartilové rozpětí) a byly provedeny statistickým softwarem R 2.4.1 [7]. Do studie (prospektivní, observační) jsme zařadili 202 chronicky hemodialyzovaných pacientů (77 žen, 125 mužů; bližší charakteristika je v tabulce 1). V této práci publikujeme průběžné výsledky studie po 1 roce a 5 měsících. V době hodnocení studie jsme zaznamenali 44 úmrtí, 11 transplantací, 4 pacienti byli převedeni na peritoneální dialýzu a 3 ukončili studii z ostatních důvodů. Při určování rozhodovacích hodnot pro jednotlivé parametry jsme použili následující jednoduchý algoritmus: pro každou z měřených veličin (ADMA, hcy, alb, CRP, BNP, cTnI) jsme vytvořili křivky přežití rozdělené podle kvartilů (obrázek 1) a hodnotu kvartilu, ve kterém bylo přežití nejhorší jsme zvolili jako rozhodovací mez pro zařazení do rizikové skupiny. Takto vzniklé binární veličiny jsme vložili do Coxova modelu poměrného hazardu (s adjustací na věk, pohlaví a čas na hemodialýze).

Table 1. Basic characteristics of study population

Age (years)	68 (60–74)
Body mass index (kg/m ²)	26.4 (23.7–30.1)
Time on hemodialysis (months)	16 (5–38)
Time of observation (months)	17.1 (10.4–17.3)

Data are expressed as median (interquartile range).

Výsledky

Obrázek 1 ukazuje, že nejhorší přežití vykazovali překvapivě pacienti s hodnotami ADMA a homocysteinu ve 3. kvartilu a (podle očekávání) dále pacienti s koncentracemi albuminu v 1. kvartilu, CRP, BNP a cTnI ve 4. kvartilu. Po vložení všech měřených parametrů do Coxova modelu poměrného hazardu se jako statisticky významné nezávislé prediktory celkové mortality jeví ADMA, albumin, CRP a cTnI (tab. 2).

Table 2. Cox proportional hazard model of overall mortality predicted by inclusion to 3rd ADMA quartile, 3rd homocysteine quartile, 1st quartile of albumin, 4th quartiles of CRP, BNP and cTnI

	RR	CI	p
ADMA (3 rd quartile)	2.44	1.24 to 4.79	0.01
Hcy (3 rd quartile)	1.81	0.89 to 3.68	0.10
Albumin (1 st quartile)	3.29	1.63 to 6.63	0.001
CRP (4 th quartile)	2.28	1.17 to 4.43	0.02
BNP (4 th quartile)	1.23	0.62 to 2.45	0.56

The quartile selection is based on Kaplan-Meier plots (Figure 1), the quartile with the worst survival was selected. RR = relative risk, CI = 95 % confidence interval of RR.

Diskuse

Tato studie porovnávala koncentrace ADMA, homocysteinu, albuminu, CRP, BNP a troponinu I jako prediktivních faktorů celkové mortality ve skupině hemodialyzovaných nemocných. Jedná se o průběžné výsledky po 1 roce a 5 měsících sledování naší studijní populace. Z výsledků plyne, že ADMA ve srovnání s ostatními faktory plní pouze podružnou roli. K tomuto závěru jsme dospěli na základě porovnání hodnot ADMA u přeživších [1,14 (0.98–1.31) μmol/l] a zemřelých [1,16 (1.02–1.27) μmol/l] HD nemocných. Mediány těchto hodnot jsou téměř stejné a z klinického hlediska prakticky nerozlišitelné.

Zoccali et al. sledovali celkovou mortalitu a výskyt fatálních a nefatálních kardiovaskulárních příhod u hemodialyzovaných pacientů 2 roky a 7 měsíců [8]. V této studii se koncentrace ADMA jevila jako nezá-

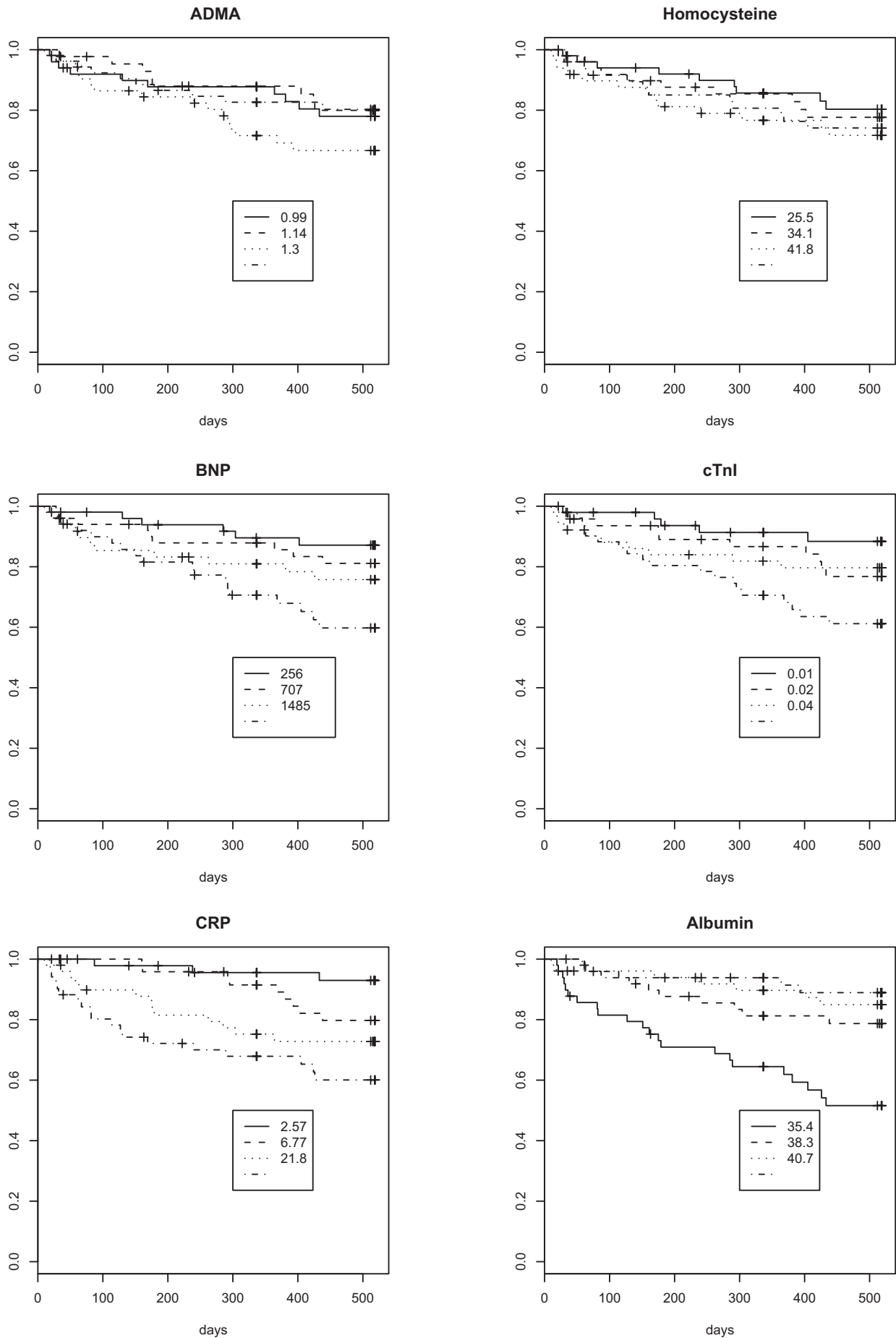


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, B-type natriuretic peptide (BNP), cardiac troponin I (cTnI), C-reactive protein (CRP) and albumin divided by quartiles
 Legend to each plot shows limits of (top to bottom) 1st, 2nd and 3rd quartiles of appropriate variable.

vislý prediktor celkové mortality i výskytu příhod. Přestože autoři použili pro stanovení ADMA stejnou modifikaci metody HPLC jako Kumagai et al. [9], publikují u HD pacientů výrazně vyšší hodnoty a také větší rozdíly mezi nemocnými s kardiovaskulární příhodou a bez kardiovaskulární příhody (rozdíl mediánů = 0,75 $\mu\text{mol/l}$) než Kumagai et al. (rozdíl průměru = 0,07 $\mu\text{mol/l}$).

My jsme použili ke stanovení ADMA metodu ELISA, která je s HPLC metodikou srovnatelná [6], nicméně, jak prokázal Teerling, již zvýšení variačního koeficientu (CV) na 5 % způsobí výrazné snížení pravděpodobnosti prokázat rozdíly mezi dvěma populacemi (např. přeživší a zemřelí) [10]. Většina publikovaných prací CV metody měření ADMA neuvádí, my jsme stanovili CV pro měření ADMA metodou HPLC 5,2 % a metodou ELISA 11,8 % [6]. Jelikož novější práce prokazují mnohem menší rozdíly v koncentraci ADMA mezi pacienty s kardiovaskulární příhodou a bez ní, jsou tyto rozdíly dostupnými metodikami v klinické praxi těžko odhalitelné [9, 11]. Otázkou zůstává, zda nějaké rozdíly skutečně existují. Námi naměřené hodnoty pro to nesvědčí (prokázali jsme horší prognózu pouze u pacientů s koncentrací ADMA ve 3. kvartilu a koncentrace jak nižší, tak vyšší měly prognózu lepší); dokonce se objevují i práce, které naopak považují vysoké hodnoty ADMA za protektivní faktor u pacientů s chronickou renální insuficiencí, HD nemocných a nemocných po transplantaci ledviny [11].

Ze sledovaných parametrů se jako statisticky významné prediktory přežití jeví hladiny albuminu, CRP a troponinu I. Koncentrace u přeživších a zemřelých HD nemocných byly následující: albumin 38,9 (36,5 až 41,1) g/l a 35,4 (30,3–38,4) g/l; CRP 5,22 (2,03–15,3) mg/l a 15,7 (5,99–35,52) mg/l; troponin I 0,02 (0,001 až 0,03) $\mu\text{g/l}$ a 0,04 (0,01–0,06) $\mu\text{g/l}$. Praktická klinická významnost měření těchto parametrů jako prediktorů přežití u hemodialyzovaných nemocných bude předmětem dalších analýz.

Delší doba sledování by mohla přispět k objasnění významu měřených parametrů v souvislosti s dlouhodobou (pětileté přežití) prognózou hemodialyzovaných pacientů.

Závěr

Ze všech měřených parametrů pouze ADMA, alb, CRP a cTnI statisticky významně predikovaly celkovou mortalitu u hemodialyzovaných nemocných. ADMA se však u nich neukázal jako hodnotný klinický marker v predikci přežití.

Literatura

1. Tran, C. T. L., Leiper, J. M., Vallance, P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl.*, 2003, 4, 4, p. 33–40.
2. Lüscher, T. F., Wenzel, R. R., Noll, G. Local regulation of the coronary circulation in health and disease: role of nitric oxide and endothelin. *Eur. Heart J.*, 1995, 16 Suppl. C, p. 51–58.
3. Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int. Suppl.*, 2003, 85, p. S105–S110.
4. Böger, R. H., Maas, R., Schulze, F., Schwedhelm, E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, 43, 10, p. 1124–1129.
5. Mallamaci, F., Tripepi, G., Maas, R., Malatino, L., Böger, R., Zoccali, C. Analysis of the relationship between norepinephrine and asymmetric dimethyl arginine levels among patients with end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, 15, 2, p. 435–441.
6. Siroka, R., Trefil, L., Rajdl, D., Racek, J., Cibulka, R. Asymmetric dimethylarginine-comparison of HPLC and ELISA methods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006.
7. R Development Core Team R A language and environment for statistical computing. 2006.
8. Zoccali, C., Bode-Böger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, 2001, 358, 9299, p. 2113–2117.
9. Kumagai, H., Sakurai, M., Takita, T., Maruyama, Y., Uno, S., Ikegaya, N. et al. Association of homocysteine and asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis and cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2006, 48, 5, p. 797–805.
10. Teerlink, T. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, 43, 10, p. 1130–1138.
11. Busch, M., Fleck, C., Wolf, G., Stein, G. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease – possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids*, 2006, 30, 3, p. 225–232.

Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 78/2005/C/LFP a výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. MSM 0021620819.

Do redakce došlo 23. 2. 2007.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Roman Cibulka

Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN Plzeň

Alej Svobody 80

304 60 Plzeň

e-mail: cibulka@fnplzen.cz