

# АСИМЕТРИЧЕН ДИМЕТИЛАРГИНИН - ПРИРОДА, АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ И КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ

Гергана Чаушева

*Катедра по клинична лаборатория, Факултет по медицина,  
Медицински университет – Варна*

## ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE— NATURE, ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION, AND CLINICAL APPLICATIONS

Gergana Chausheva

*Department of Clinical Laboratory, Faculty of Medicine, Medical University of Varna*

### РЕЗЮМЕ

Асиметричният диметиларгинин (ADMA) е основен ендогенен и конкурентен инхибитор на синтеза на азотен оксид (NO). Ниските нива на NO се асоциират с ендотелна дисфункция (ЕД), която предхожда изявата на атеросклероза. ADMA се смята едновременно за надежден биомаркер и рисков фактор за развитие на сърдечносъдови заболявания (ССЗ). Повишени плазмени концентрации на ADMA са установени при редица ССЗ и метаболитни заболявания. Целта на тази статия е да се проучат настоящите познания за природата и клиничното приложение на ADMA като нов клас биомаркер. Направен е и обобщаващ анализ на валидираните към момента аналитични методи за определяне на ADMA в серум и плазма.

**Ключови думи:** ADMA, NO, ЕД, ССЗ

### ВЪВЕДЕНИЕ

2-Амино-5-[(амино-диметиламинометил)амино] пентанова киселина или NG, NG-диметил-аргинин, познат като ADMA, е специфичен ендогенен и конкурентен инхибитор на синтеза на NO (15). NO е основен регулатор на съдовата хомеостаза (14). Целта на тази статия е да се проучат настоящите познания за природата и клиничното приложение на ADMA като нов биомаркер. Направен е и обобщаващ анализ на ва-

### ABSTRACT

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a major endogenous and competitive inhibitor of nitric oxide (NO) synthesis. Reduced production and/or bioavailability of NO is considered the central mechanism responsible for endothelial dysfunction (ED) that precedes atherosclerosis manifestation. Asymmetric dimethylarginine is a promising biomarker and a risk factor for cardiovascular disease (CVD). Elevated plasma concentrations of ADMA are associated with numerous CVD and metabolic diseases. This study aimed to review the current knowledge about biology and clinical implication of ADMA as a new class biomarker. A summary analysis of currently validated analytical methods for the determination of serum and plasma ADMA was performed.

**Keywords:** ADMA, NO, ED, CVD

лидираните към момента аналитични методи за определяне на ADMA в серум и плазма.

#### **Биосинтез и транспорт на ADMA**

Метилирането на протеини е основен вид посттранслационна модификация с добавяне на метилови групи към протеините. Процесът се катализира от три различни класа протеинови аргинин метилтрансферази (PRMT) (5,14). PRMT от тип I катализира синтеза на асиметричен NG, NG-диметил-аргинин (ADMA), тип II PRMT - на симетричен NG, NG-диметил-аргинин (SDMA), а

Табл. 1. HPLC и LC-MS/MS методи за определяне на ADMA в плазма, серум и урина, публикувани след 2012 г.

Метод	Аналит	Дерва- тизация	CV%	LOD/LOQ	Линейност	Биологичен материал	Време	Лит. източник
HPLC-FD	ADMA, SDMA, ARG	OPA/ME	<5%	NA/0.01 µmol/L	12 nM – 0.5 µmol/L	Плазма	20 мин	Schou- Pedersen et al., 2018
HPLC-FD	ADMA, SDMA, NMMA, ARG	OPA/MPA	<5%	≤0.007 µmol/L/L/NA	0.007–150 µmol/l	Плазма	20 мин	Alkaitis et al., 2014
HPLC-FD	ADMA, CIT, ARG	OPA/ME	<7%	0.05 mM/NA	0.007–150 µmol/l	Плазма	66 мин	Rao et al., 2017
HPLC- PDA	ARG, HARG, ADMA, SDMA, HCY	PITC	1.37– 9.67%	17.6/53.3pmol	0.3–3.75 mM	Плазма Серум	30 мин	Ravula et al., 2018
ESI-LC-MS/ MS	ADMA, SDMA, HARG	APDS	2.53– 8.05%	NA/0.25 µmol/l	0.05–2 µmol/l	Плазма	19 мин	Arashida et al, 2017
ESI-LC-MS/ MS	ARG, MMA, HARG, ADMA, SDMA, CIT	DEPC	3.11–3.88	0.01–0.03 µmol/l	0.31–5 µmol/l	Плазма	10 мин	Sotgia et al., 2019
LC-QTOF- MS	ADMA, SDMA, methionine, ARG, HCY, SAM, SAH, betaine, creatinine, cysteine, glutathione	NA	1–12.4%	NA	159 n/mL–1.4 µg/mL	Плазма	19 мин	Benito et al., 2015
ESI-LC- QTOF-MS	ARG, CIT, ADMA, CAN, SDMA	PFBC	2.23– 12.4%	0.03–0.01 µmol/l	0.05–2.5 µmol/l	Серум	14.5 мин	Wisniewski et al., 2017
ESI-LC-MS/ MS	ARG, MMA, ADMA, SDMA	NA	2.5–3.6%	0.019–0.064 µmol/l	0–150 µmol/l в урина; 0–3 µmol/l в плазма	Плазма Урина	9.5 мин	Andradei et al., 2015
ESI-UPLC- MS/MS	ADMA, SDMA	HCL и п-бутанол	2–7.79%	7.9- 23.7 nM	0.1–4.94 µmol/l	Серум	10 мин	Boelaert et al., 2016
ESI-LC-MS/ MS	ADMA	NA	3.81– 8.81%	NA – 20 ng/ml в плазма NA – 50 ng/ mL в урина	20–1000 ng/ ml в плазма 50 – 2000 ng/ ml в урина	Плазма Урина	7 мин	Jing et al., 2015
LC-ESI- QTOF-MS	ADMA, SDMA, ARG, CIT	Бензоил хлорид	3.07– 14.9%	0.03–0.08 µmol/l	0.05–2.5 µmol/l	Серум	10 мин	Fleszar et al., 2018
ESI-LC-MS/ MS	DMG, ARG, ADMA, SDMA, HARG, methionine, choline, creatinine	NA	5.2–7.8 %	0.08–0.16 µmol/l	0.08–5 µmol/l	Плазма	4.2 мин	Midttun et al., 2013

Легенда: ARG – аргинин; HARG – хомоаргинин; CIT – цитрулин; ME –, меркаптоетанол; MPA – 3-меркаптопропионова киселина; PITC – феноллизотиоцинат; APDS – 3-аминопиридил, N – сукцинимидил карбамат; DEPC – диетилпиокарбонат; PFBC – пентафлуоробензоил  
Източник: <https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0150>

PRMT тип III - синтеза на NMMA. PRMT от тип I и тип II генерират NG-монометиларгинин междинни продукти (NMMA) (5). PRMTs използват S-аденозилметионин (SAM) като донор на метилови групи. ADMA, SDMA и NMMA показват структурна хомология с L-аргинин и са региоизомери. За разлика от SDMA свободните форми на ADMA и NMMA са ендогенни инхибитори на всички NOS-изоформи и модулатори на NO-синтеза предимно в сърдечносъдовата система (ССС) (15). ADMA инхибира NO-продукцията в степен, която е пропорционално зависима от плазмената концентрация на молекулата. Този ефект не се наблюдава при промени в концентрациите на другите два хомолога - SDMA и NMMA (15). NO се синтезира от аминокиселината L-аргинин под действието на NOS. Различават се три изоформи на NOS: ендотелна eNOS, невронална nNOS и индуцирана iNOS (2). Инхибирането на NOS води до ендотелна дисфункция (ЕД). Повишени плазмени нива на ADMA се асоциират с патологично потискане на NOS и последващо васкуларно възпаление, окисление на липопротеини с ниска плътност, пролиферация на гладкомускулни клетки, ендотелна клетъчна апоптоза, генериране на ROS и адхезия на тромбоцитите. По този начин се насърчава развитието на ЕД, която предшества изявата на атеросклероза (2).

#### Елиминирание на ADMA

ADMA се разгражда метаболитно чрез ензима диметиларгинин диметиламинохидролаза (DDAH) до цитрулин и диметиламин (~80%), а в малка степен се елиминира чрез бъбречна екскреция (~20%) (5,12). SDMA не е субстрат за DDAH и изцяло се екскретира в урината (12). Описани са две изоформи на човешкия ензим DDAH. DDAH 1 се открива в бъбреци, черен дроб, панкреас, аорта, перитонеални неутрофили и макрофаги, а DDAH 2 преобладава в съдов ендотел, сърце, плацента и бъбреци (3,9). ADMA се метаболизира основно от DDAH 1. Установено е, че общото генерирано количество на ADMA при хората е приблизително 300  $\mu\text{mol}/\text{ден}$ , а пълното инхи-

биране на активността на DDAH води до увеличаване на ADMA с 5  $\mu\text{mol}/\text{ден}$  (12). Ензимната активност на DDAH зависи от сулфхидрилна група в активния център на ензима - участък, който е чувствителен към оксидативен стрес. Образването на окислени липопротеини с ниска плътност уврежда активността на DDAH (3). Следователно посредством механизмите, с които се контролира активността на DDAH, се регулира и концентрацията на ADMA в кръвта (9).

#### Аналитични методи за определяне на ADMA

Разработени са голям брой аналитични методи за определяне на метиларгинини в плазма, серум и урина: високоефективна течна хроматография (HPLC), газова хроматография - масспектрометрия (GC-MS), течна хроматография - масспектрометрия (LC-MS), течна хроматография - тандемна мас спектрометрия (LC-MS/MS), ензимно свързан имуносорбентен анализ (ELISA), капилярна електрофореза (CE) (13). HPLC технологията позволява използването на разнообразни методи за разделяне (обратнофазова, йонно-обменна, йонна хроматография), използване на различни елуиращи буфери и техники на детекция (13). HPLC и LC-MS/MS са широко прилагани аналитични методи за измерване на ADMA и свързани метаболити в плазма и урина. LC-MS/MS се характеризира с по-висока аналитична чувствителност и специфичност в сравнение с HPLC методите (11). В табл. 1 са включени някои от докладваните резултати през последните 10 години (13). Създаден е и специфичен имунологичен анализ - ELISA, който е широкодостъпен за големи клинични проучвания. Schulze и сътрудници за първи път въвеждат ELISA за количествено определяне на ADMA, като оценяват аналитичната надеждност на метода и неговата сравнимост с LC-MS/MS и GS-MS (10). Определена е граница на количествено определяне (LOD) - 0,05  $\mu\text{mol}/\text{l}$  и кръстосана реактивност: 1,2% със SDMA и <0,02% с L-аргинин. Изследователите установяват значима корелация между

Табл. 2. Референтни стойности на ADMA в плазма, определени чрез HPLC и ELISA – аналитични методи

	HPLC – флуоресценция	HPLC – LS/MSn	ELISA (DLDn)	ELISA (Immun diagnostic)
Референтен интервал	0.32 (0.28–0.37) – 1.14 (0.85–1.43) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.41 (0.28–0.53) – 0.87 (0.56–1.18) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.29 (0.20–0.39) – 1.03 (0.86–1.19) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.21 (0.12–0.65) – 0.82 (0.54–1.10) $\mu\text{mol}/\text{L}$
Средна стойност (при 95% доверителен интервал)	0.73 (0.56–0.89) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.64 (0.42–0.87) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.65 (0.55–0.74) $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.50 (0.34–0.65) $\mu\text{mol}/\text{L}$

Източник: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177493.t001>

серумни нива на ADMA, определени с ELISA и LC-MS/MS ( $r=0.984$   $p<0.0001$ ) и респективно с GS-MS ( $r=0.991$   $p<0.0001$ ) (10). Според други изследователи ELISA - определените концентрации на ADMA в плазма и серум, са по-високи спрямо тези с HPLC метод, като установената разлика в измерените плазмени нива се увеличава пропорционално на концентрацията на ADMA (6). Представен е и сравнителен анализ между измерени стойности на ADMA в серум, хепаринова и EDTA плазма, определени чрез HPLC и ELISA аналитични методи. Не са установени сигнификантни различия между серумни нива на ADMA и тези в хепаринова плазма ( $0.57\pm 0.10\mu\text{M}$  спрямо  $0.56\pm 0.10\mu\text{M}$  за HPLC и  $0.73\pm 0.17\mu\text{M}$  спрямо  $0.72\pm 0.16\mu\text{M}$  за ELISA), а определените в EDTA плазма са докладвани сигнификантно по-ниски от тези в хепаринова плазма ( $0.52\pm 0.10\mu\text{M}$   $P<0.005$  за HPLC и  $0.65\pm 0.17\mu\text{M}$  за ELISA). (6) В табл. 2 са представени референтни граници за ADMA в плазма, определени чрез HPLC и ELISA аналитични методи (8).

#### **Клинично приложение**

Повишени плазмени концентрации на ADMA са установени при редица заболявания като: хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), хипертонична болест, хипертония при деца, преeklampсия, болест на коронарните артерии (КАБ), болест на периферните артерии, сърдечна недостатъчност, остър исхемичен инсулт, хипертиреоидизъм, хиперхолестеролемия, захарен диабет тип 1 (Т1ЗД) и тип 2 (Т2ЗД), еректилна дисфункция и др. (1,4,5,15). Изследванията сочат, че при различните заболявания плазмените концентрации на ADMA се покачват най-много до 2 пъти над горна референтна стойност с изключение на ХБН, където стойностите са повишени до 5-7 пъти (4,5,15). Следователно възниква въпросът как тези сравнително ниски различия в измерените концентрации на ADMA са причина за големи промени в синтеза на NO и последващи значими хемодинамични различия. ADMA е медиатор на ЕД, а механизмите, които го свързват с развитието на ССЗ, са обект на голям научен интерес през последните години. Въпреки това не е напълно уточнено дали ЕД води до повишаване на ADMA, или обратно. Ето затова ADMA се разглежда едновременно като обещаващ биомаркер и рисков фактор за развитие на ССЗ. Според някои автори ADMA има по-добра прогностична стойност спрямо установени биомаркери за ССЗ, а според други - допълваща роля в стратификацията на риска (4,5,15). Повишените плазмени нива на ADMA имат висока положителна

предсказваща стойност за ССЗ, но все още няма унифицирана отрязваща стойност (cut-off value) (5). Установена е и значима корелация между плазмени нива на ADMA и степен на албуминурия при диабетици (7,16). Според някои автори ADMA корелира значимо с "всички причини за смъртност" и КАБ при диабетици, докато при контроли без диабет тази зависимост не се установява (16). При Т2ЗД, високи плазмени нива на ADMA се асоциират предимно с тютюнопушене, ретинопатия и нефропатия, а при Т1ЗД - с понижена гломерулна филтрация и хипертония (7). ССЗ са основна причина за смъртност при рисковите групи като Т1ЗД и Т2ЗД. Лечебно-диагностичните подходи в тази посока са инсуфициентни, особено при Т1ЗД, където управлението на рисковите фактори за ССЗ се основа на доказателства, предимно екстраполирани от проучвания за Т2ЗД. Установено е и, че концентрациите на ADMA в кръвта са увеличени при жени със затлъстяване и доказана инсулинова резистентност, като нивата му спадат след редукция на телесното тегло (1). Следователно ADMA намира широко клинично приложение. Не на последно място ADMA се разглежда и като потенциален терапевтичен таргет (15). Експериментално е доказано, че статините модулират генната експресия на eNOS и при пациенти с повишени плазмени нива на ADMA подобряват ендотел-зависимата вазодилатация (1,15). Друга група медикаменти, които са проучени и се свързват с намаляване на плазмените нива на ADMA, са ACE-инхибитори, блокери на ангиотензинови рецептори, някои понижаващи кръвната глюкоза медикаменти, прием на естрогени, антиоксиданти и др (1,4,5,15). Все още не е докладвана субстанция, която да интерферира предимно метаболизма на ADMA. Това води до повишен научноизследователски интерес и провеждане на нови целенасочени проучвания.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

През последните години интересът към ADMA и ключовата ѝ роля в патофизиологията на редица ССЗ и метаболитни заболявания прогресивно се увеличават. ADMA се разглежда приоритетно като обещаващ биомаркер и рисков фактор за развитие на ССЗ. Повишените плазмени нива на ADMA имат висока положителна предсказваща стойност за ССЗ, но все още няма унифицирана отрязваща стойност (cut-off value). Към момента не е установен и лабораторен метод - „златен стандарт“, за определяне на ADMA в плазма, серум и урина. Ето затова се препоръч-

ва провеждането на нови целенасочени изследвания в рисковни групи, а предвид отчетената висока смъртност от ССЗ в световен мащаб въвеждането на ADMA като рутинен биомаркер е обосновано.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Колева Д., Обрецова М, Денева Т. Асиметричен диметил-аргинин - медиатор на ендотелна дисфункция и връзката му със синдроми на инсулинова резистентност. *Endocrinologia vol XVIII*, 2013; 33-40.
2. Николов П., Ендотелна дисфункция и коронарна болест, Пловдив, 2019.
3. Achan V et al, Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in huans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23, 1455-1459.
4. Alpoim PN, Sousa LP, Mota AP, Rios DR, Dusse LM. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular and renal disease. *Clin Chim Acta*. 2015 Feb 2;440:36-9.
5. Bouras G et al, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem*. 2013;13(2):180-200.
6. Horowitz J, Heresztyn T, An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations, *Journal of Chromatography B*, 2007; 851 (1-2):42-50.
7. Konya H, Miuchi M, Satani K, et al. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *World J Exp Med*. 2015;5(2):110-119. Published 2015 May 20.
8. Németh B, Ajtay Z, Hejjel L, Ferenci T, Ábrám Z, Murányi E, Kiss I. The issue of plasma asymmetric dimethylarginine reference range - A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017 May 11;12(5):e0177493.
9. Palm F. et al, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293, H3227-3245.
10. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(12):1377-83.
11. Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2007;851:211-9.
12. Teerlink T, ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med*, 2005, 10 Suppl 1, S73-81.
13. Unlu A et al, HPLC and LC-MS/MS measurement methods for the quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related metabolites, *Turkish Journal of Biochemistry*.2021;46: 4.
14. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
15. Winnica D, Scott J, Grasemann H., Holguin F., Chapter 19 - Asymmetric-Dimethylarginine, Editor(s): Louis J. Ignarro, Bruce A. Freeman, Nitric Oxide (Third Edition), Academic Press, 2017, Pages 247-254.
16. Zobel EH, von Scholten BJ, Reinhard H, Persson F, Teerlink T, Hansen TW, Parving HH, Jacobsen PK, Rossing P. Symmetric and asymmetric dimethylarginine as risk markers of cardiovascular disease, all-cause mortality and deterioration in kidney function in persons with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Jul 11;16(1):88

#### Адрес за кореспонденция:

Гергана Чаушева  
Катедра по клинична лаборатория  
ул. „Марин Дрнов“ 55  
Варна, 9000  
e-mail: Gergana.Chausheva@mu-varna.bg