

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Zbigniew Heleniak**

**Stężenie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA)  
u pacjentów z białkomoczem niecukrzycowym.**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych**

Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii  
i Chorób Wewnętrznych

Kierownik: prof. dr hab. Bolesław Rutkowski

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,  
Chorób Tkanki Łącznej i Geriatrii

Kierownik: prof. dr hab. Zbigniew Zdrojewski

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Zdrojewski

Gdańsk 2014

*Sktadam serdeczne podziękowania:*

*Panu Profesorowi Bolestawowi Rutkowskiemu  
za wsparcie i życzliwość,  
Panu Profesorowi Leszkowi Bieniaszewskiemu wraz z  
zespołem za pomoc w przeprowadzaniu badań,  
Pani Dr hab. Sylwii Matgorzewicz wraz z zespołem  
za pomoc w przeprowadzaniu oznaczeń.*

*Szczególnie dziękuję  
Panu Profesorowi Zbigniewowi Zdrojewskiemu  
za opiekę, wszechstronną pomoc i cierpliwość okazane  
podczas powstawania pracy.*

*Serdecznie dziękuję za gorliwe wsparcie jakie otrzymałem  
od moich Bliskich.*

# 1 Spis treści

<b>1</b>	<b>Spis treści</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Wykaz najczęściej używanych skrótów</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Wstęp</b> .....	<b>4</b>
3.1	Rola tlenu azotu w organizmie i jego metabolizm .....	4
3.2	Inhibitory syntazy tlenu azotu – rola i metabolizm .....	12
3.2.1	Efekt podaży ADMA zdrowym ludziom .....	15
3.2.2	ADMA a funkcja nerek.....	16
3.2.3	ADMA jako czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego .....	17
3.2.4	Podwyższenie poziomu ADMA w różnych stanach chorobowych.....	19
3.2.5	Poziom ADMA a leki .....	20
<b>4</b>	<b>Uzasadnienie wyboru tematu</b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Cele pracy</b> .....	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Charakterystyka badanej grupy</b> .....	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>Protokół badania</b> .....	<b>25</b>
<b>8</b>	<b>Metody badawcze wykorzystane w pracy</b> .....	<b>26</b>
8.1	Badanie podmiotowe i przedmiotowe .....	26
8.2	Badania biochemiczne .....	26
8.3	Badanie poziomu ADMA w osoczu .....	26
8.4	Badanie echokardiograficzne serca .....	26
8.5	Ocena kompleksu intima-media .....	29
8.6	Ocena podatności naczyń tętniczych.....	31
8.7	24-godzinny automatyczny pomiar ciśnienia tętniczego.....	32
8.8	Metody statystyczne .....	32
<b>9</b>	<b>Uwagi krytyczne dotyczące materiału i metod</b> .....	<b>34</b>
<b>10</b>	<b>Wyniki badań</b> .....	<b>35</b>
10.1	Dane kliniczne badanej grupy (n=37) .....	35
10.2	Kontrola ciśnienia tętniczego badanej grupy (n=37).....	35
10.3	Dane biochemiczne badanej populacji (n=37) .....	40
10.4	Stężenie ADMA w osoczu badanej populacji (n=37) .....	44
10.5	Dane echokardiograficzne badanej grupy chorych. ....	46
10.6	Grubość kompleksu śródbłonek - błona środkowa (IMT) i prędkość fali tętna (PWV) w badanej grupie chorych.....	49

10.7	Przebudowa lewej komory badanej grupy chorych.....	50
10.8	Zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wiekiem, płcią, nadciśnieniem tętniczym, parametrami biochemicznymi, naczyniowymi i echokardiograficznymi w badanej grupie. ....	53
10.9	Analiza wieloczynnikowa .....	55
<b>11</b>	<b>Dyskusja.....</b>	<b>57</b>
11.1	Stężenie ADMA we wczesnych stadiach PChN przebiegającej z białkomoczem .....	57
11.2	Stężenie ADMA, a nadciśnienie tętnicze .....	64
11.3	ADMA a parametry echokardiograficzne. ....	67
11.4	ADMA a prędkość fali tętna i grubość kompleksu błona środkowa- śródbłonek.....	71
11.5	Wpływ leczenia immunosupresyjnego i nefroprotektoryjnego na poziom ADMA .....	73
<b>12</b>	<b>Wnioski .....</b>	<b>77</b>
<b>13</b>	<b>Streszczenie.....</b>	<b>78</b>
<b>14</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>80</b>
<b>15</b>	<b>Wykaz rycin i tabel.....</b>	<b>83</b>
<b>16</b>	<b>Piśmiennictwo.....</b>	<b>85</b>

## 2 Wykaz najczęściej używanych skrótów

**A** - maksymalna prędkość napływu mitralnego w fazie późnej.

**ACE** – enzym konwertujący angiotensynę I, angiotensin converting enzyme.

**ADMA** – asymetryczna dimetylarginina, asymmetric dimethylarginine.

**ANG II** – angiotensyna II.

**AT1** – receptor AT1 dla angiotensyny II.

**CRP** – białko C reaktywne, C reactive protein.

**DBP**- dobowe rozkurczowe ciśnienie tętnicze, diastolic blood pressure.

**DDAH** – dimethylarginine dimethylaminohydrolase

**DUB** – dobowa utrata białka

**E** - maksymalna prędkość napływu mitralnego w fazie wczesnej

**e'** - wczesnorozkurczowy ruch pierścienia mitralnego

**EF** – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, ejection fraction

**eGFR** – oszacowana filtracja kłębuszkowa, estimated glomerular filtration rate

**IMT** – grubość kompleksu śródbłonek–błona środkowa naczyń,  
intima media thickness.

**IVSD** – grubość przegrody lewej komory serca, interventricular septal diameter.

**LVH** – przerost lewej komory serca, left ventricular hypertrophy.

**LVDD** – wymiar późnorozkurczowy lewej komory serca, left ventricular diastolic diameter.

**LVMI** – index masy lewej komory serca, left ventricular mass index.

**NO** – tlenek azotu, nitric oxide.

**NOS** – syntaza tlenku azotu, nitric oxide syntase.

**eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, endothelial nitric oxide syntase.

**iNOS** – indukowana syntaza tlenku azotu, inducible nitric oxide syntase.

**nNOS** – neuronalna syntaza tlenku azotu, neuronal nitric oxide syntase.

**PChN** – przewlekła choroba nerek

**PRMT** – metyltransferaza białkowa, protein metyltransferase.

**PWD** – grubość tylnej ściany lewej komory serca, posterior wall diameter.

**RAAS** – układ renina angiotensyna aldosteron, renin angiotensin aldosteron system.

**RWT** – względna grubość ściany lewej komory serca, relative wall thickness

**SBP** – dobowe skurczowe ciśnienie tętnicze, systolic blood pressure.

**PP**- dobowe ciśnienie tętna, pulse pressure

### 3 Wstęp

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią główną przyczynę zgonu w krajach rozwiniętych. Według Światowej Organizacji Zdrowia ponad 3 miliony ludzi umiera każdego roku z tego powodu [1]. Natomiast w Polsce umieralność z tej przyczyny wynosiła w 2005 roku 45,7%, zaś z powodu chorób nowotworowych była około połowę mniejsza [2]. Uważa się, że przynajmniej 25% pacjentów z chorobą wieńcową umiera z powodu nagłej śmierci sercowej lub rozwija zawał mięśnia sercowego bez wcześniejszych objawów [3]. Osoby bezobjawowe, charakteryzujące się obecnością powszechnie przyjętych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, należałoby ocenić przy pomocy wiarygodnych parametrów określających wczesne stadium tych chorób.

Do takich wskaźników należy ultrasonograficzna ocena struktury naczynia oraz pomiar stężenia substancji wskazujących na dysfunkcję śródbłonna (np. asymetryczna dimetylarginina (ADMA) – inhibitor syntazy tlenu azotu).

#### 3.1 Rola tlenu azotu w organizmie i jego metabolizm

Pierwsze dowody na to, iż śródbłonek odgrywa rolę w utrzymaniu napięcia naczyń przez produkcję wazoaktywnej substancji, pojawiły się w 1977 roku.

Zanim odkryto, że tlenek azotu jest produkowany w organizmie, istniało określenie na nieznaną substancję powodującą rozkurcz mięśniówki gładkiej – śródbłonkowy czynnik rozluźniający (*Endothelium-derived relaxing factor* -EDRF), który później okazał się być tlenkiem azotu (NO). EDRF odkrył i scharakteryzował Robert F. Furchgott, który razem ze swoimi współpracownikami: Louisem J. Ignarro i Feridem Muradem otrzymał za to Nagrodę Nobla w 1998 roku [4,5].

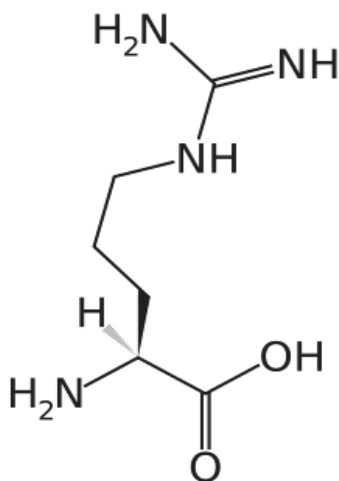
Tlenek azotu w temperaturze pokojowej jest bezbarwnym gazem o temperaturze topnienia  $-163,6^{\circ}\text{C}$  i temperaturze wrzenia  $-151,8^{\circ}\text{C}$ . Posiada jeden niesparowany elektron, więc jest rodnikiem. Z tego wynika jego niestabilność, nietrwałość oraz bardzo duża reaktywność biologiczna. Ze względu na niewielkie rozmiary cząsteczki i lipofilność, tlenek azotu łatwo przenika przez błony biologiczne bez pośrednictwa układów transportujących [6].

Endogenny tlenek azotu jest syntetyzowany z L-argininy. Najważniejszym źródłem tego aminokwasu, wykorzystywanego do syntezy NO w komórkach

śródbłonka naczyń krwionośnych jest osoczowa, pozakomórkowa arginina. Stanowi ona 54% argininy wykorzystywanej w syntezie NO, pozostała część prawdopodobnie pochodzi z endogennych źródeł, tj. degradacji białek i endogennej syntezy argininy w miejscach syntezy NO lub wewnątrzkomórkowego cyklu przemian cytrulina / NO , nazwanego również cyklem arginina / cytrulina [7,8].

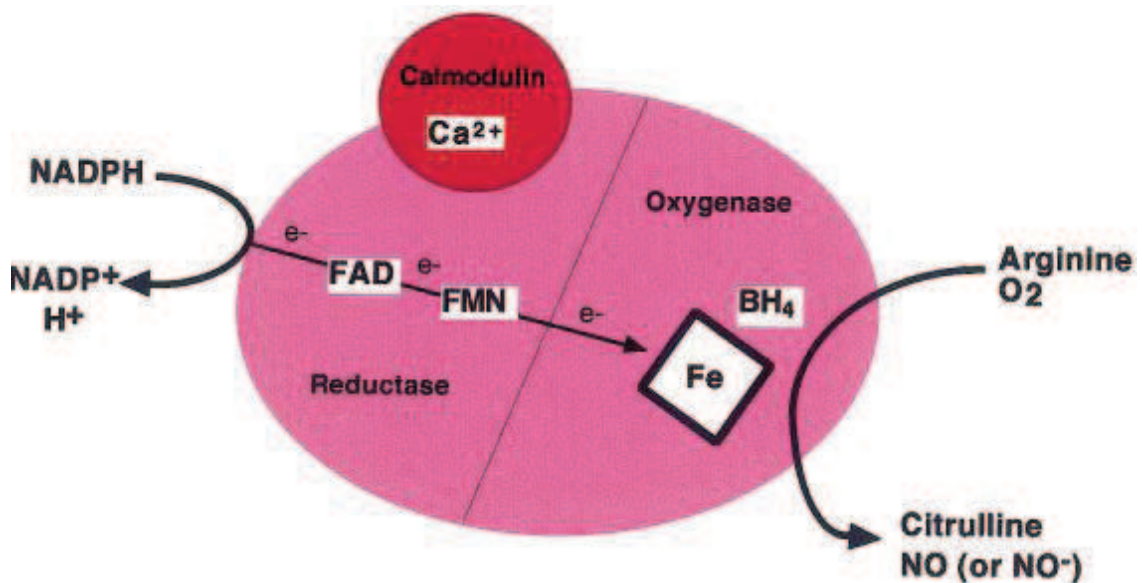
Arginina (rys.1) wchodzi w skład białek pokarmowych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Szczególnie białka roślinne są bogate w ten aminokwas. Dorosły człowiek spożywa prawie 5,4 g argininy na dobę [9]. Arginina zawarta w pokarmie uwalniana jest z białek w procesie trawienia i wchłaniania w jelicie cienkim. Głównym miejscem jej absorpcji jest jelito kręte i czcze. Uważa się, że około 50% argininy pochodzącej z diety trafia do układu krążenia [7,9]. 5-15 % argininy w osoczu krwi dorosłego człowieka to arginina zsyntetyzowana endogennie z cytruliny. Całkowite jej stężenie w osoczu ludzi i zwierząt waha się od 95-250  $\mu\text{mol/l}$  i zależy od etapu rozwojowego oraz stanu odżywienia [7]. Według Ścigora i wsp. homeostaza argininy w organizmie, w tym w układzie krwionośnym, zależy od jej ilości w pożywieniu, transportu do komórki, metabolizmu białkowego [10].

**Rycina 1. Wzór strukturalny L-argininy (9)**



Reakcja syntezy NO jest katalizowana przez syntazę tlenku azotu (NOS). W reakcji jest wymagana obecność argininy i  $\text{O}_2$  jako substratów oraz kofaktorów, takich jak : NADPH, FAD, FMN, hem i tetrahydrobiopteryna ( $\text{BH}_4$ ) (rycina 2) [4, 11,12].

Rycina 2. Schemat syntezy tlenku azotu (12)



NADPH – forma zredukowana fosforanu dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego

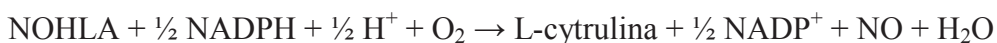
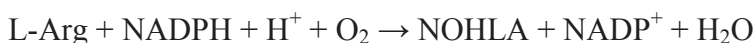
NADP<sup>+</sup> – kation fosforanowy dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego

FAD – dwunukleotyd flawinoadeninowy

FMN - mononukleotyd flawinowy

BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopteryna

Mechanizm reakcji przekształcenia argininy w NO polega na utlenieniu z udziałem tlenu cząsteczkowego (O<sub>2</sub>) grupy iminowej reszty guanidynowej L-argininy. Reakcja ta zachodzi dwuetapowo. W pierwszym etapie arginina jest hydroksylowana z udziałem O<sub>2</sub> i NADPH do pośredniego, stabilnego intermediatu N-ω-hydroksy-L-argininy (NOHLA), który następnie w drugim etapie jest utleniany do cytruliny i NO (rycina 3) [13].



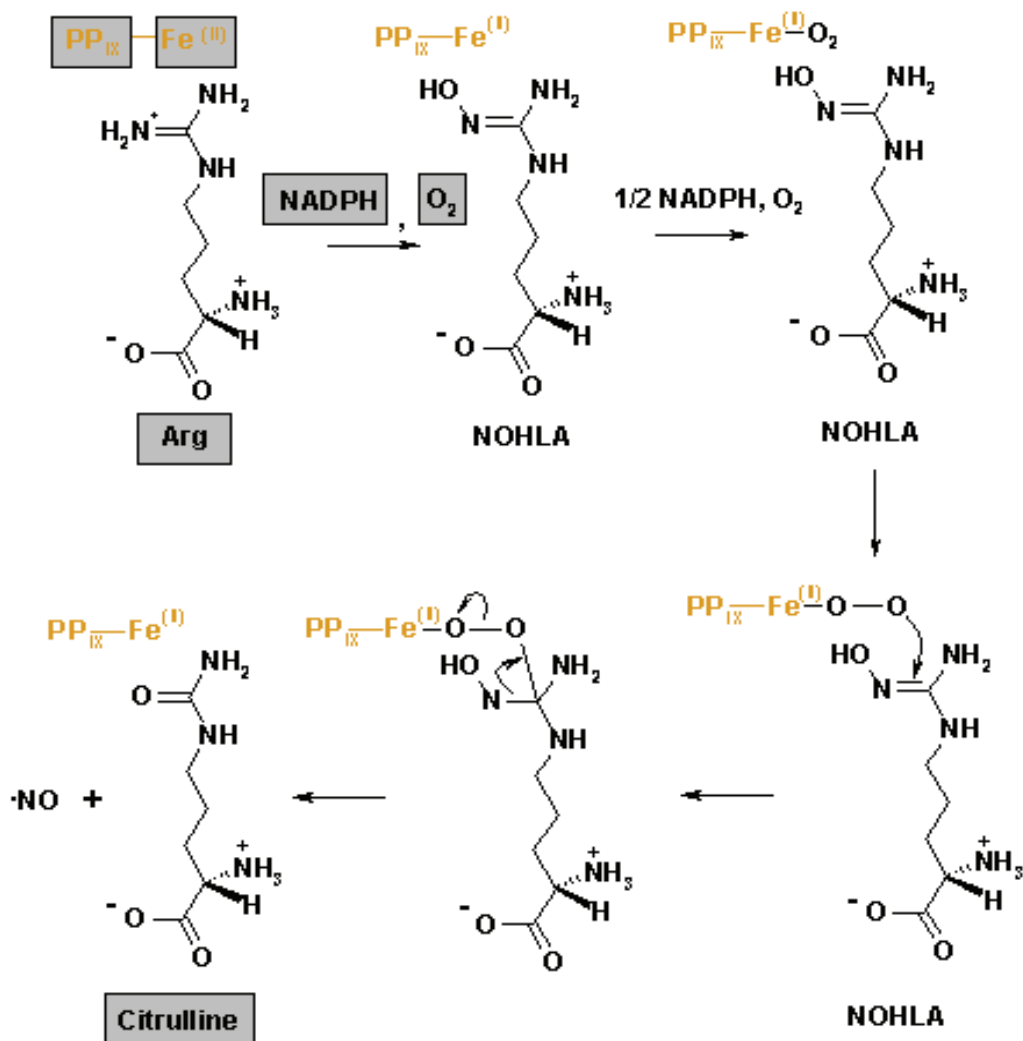
Syntezę NO w komórkach limituje dostępność wewnątrzkomórkowej argininy i kofaktorów reakcji [1].



NO może również powstawać w organizmie w wyniku redukcji azotynów i jest to droga syntezy niezależna od działania NOS.

Zdrowy człowiek dziennie jest w stanie wytworzyć około 1 mmol endogennego tlenu azotu [14].

Rycina 3. Synteza tlenu azotu (13)



Rodzina enzymów NOS jest najlepiej poznaną grupą enzymów uczestniczących w metabolizmie argininy. Są one dimerami o masie cząsteczkowej 125-155kDa. Arginina nie jest tylko substratem NOS, ale również uczestniczy w powstawaniu dimerów NOS [12].

Znane są trzy typy izoenzymów NOS kodowane przez różne geny: neuronalna NOS (nNOS, typ I NOS, ang. neuronal NOS), indukowana (iNOS, typ II NOS, ang. inducible NOS) i śródbłonkowa (eNOS, typ III NOS, ang. endothelial NOS). Enzymy te

różnią się masą cząsteczkową, lokalizacją w komórce i wymaganiami co do kofaktorów. Ich ekspresja podlega odmiennej regulacji [12].

nNOS i eNOS są konstytutywnie wytwarzane tylko w niektórych komórkach organizmu (neurony, płytki krwi, komórki śródbłonna naczyń, miocyty).

iNOS jest natomiast enzymem indukowanym w większości komórek. Ulega ekspresji w wyniku działania endotoksyn bakteryjnych (lipopolisacharydy-LPS) lub prozapalnych cytokin, szczególnie interferonu  $\gamma$  [15].

Wszystkie trzy izoformy enzymu (z których każda funkcjonuje jako homodimer) posiadają C-kończącą domenę o aktywności reduktazowej, homologiczną do białka reduktazy cytochromu P450. Na N-końcu znajduje się domena oksigenazowa zawierająca hem jako grupę prostetyczną, a w środku łańcucha polipeptydowego NOS znajduje się natomiast domena wiążąca kalmodulinę. Związanie kalmoduliny działa jak "molekularny przełącznik", umożliwiając przepływ elektronów z reszty flawinowej grupy prostetycznej na domenę reduktazową połączoną z hemem. Proces ten ułatwia przekształcenie  $O_2$  i L-argininy w NO i L-cytrulinę. Domena oksigenazowa każdej izoformy NOS zawiera jako grupę prostetyczną tetrahydrobiopterynę ( $BH_4$ ), niezbędną do wydajnej syntezy NO. Inaczej niż jest to w przypadku innych enzymów wykorzystujących  $BH_4$  jako źródło równoważników redukujących, co wymaga reakcji reduktazy dihydrobiopterynowej.  $BH_4$  w NOS ma za zadanie aktywować przyłączony do hemu tlen przez dostarczenie pojedynczego elektronu, który odzyskany później umożliwia uwolnienie zsyntetyzowanej cząsteczki NO [12,13].

W cytozolu komórek śródbłonna naczyń i układu nerwowego występują konstytutywne syntazy tlenu azotu typu eNOS i nNOS, których aktywność jest uzależniona od kompleksów kalmodulina – jony wapnia. Endogenne i egzogenne substancje zwiększające stężenie wapnia  $Ca^{2+}$  w tych komórkach (np. bradykinina, acetylocholina, histamina, serotonina, trombina, czynnik aktywujący płytki krwi i inne) aktywują eNOS i nNOS. Następuje ciągła synteza przez eNOS niewielkich ilości NO, który uczestniczy w utrzymaniu równowagi krew/ściana naczyń krwionośnych. Jest to możliwe, ponieważ NO aktywuje cyklazę guanylową związaną z błoną podstawną naczyń krwionośnych, dzięki czemu następuje zwiększenie stężenia cGMP odpowiedzialnego za modulację stężenia wapnia w mięśniówce gładkiej naczyń i jej relaksację. Ciągła synteza NO i wewnątrzkomórkowy mechanizm działania sprawia, że tętnice są zawsze w stanie częściowej relaksacji [12,16].

Uwalniany ze śródbłónka NO przechodzi nie tylko do mięśni, ale trafia też do naczyń krwionośnych, gdzie wiąże się z hemoglobina erytrocytów. Uważa się, że hemoglobina może być jednym z najważniejszych magazynów NO w organizmie [16,17].

nNOS, obecna w centralnym i obwodowym układzie nerwowym, jest również odpowiedzialna za stałą syntezę niewielkich ilości tlenku azotu, który pełni funkcję mediatora w układzie nerwowym. Powstający NO łatwo dyfunduje i działa parakrynnie na neurony, zwiększając w nich stężenie cGMP i wywołując określone efekty fizjologiczne ( np. regulację aktywności kanałów wapniowych) [12,17].

Indukowana izoforma syntazy NO (iNOS) występuje zarówno w cytozolu, jak i w błonach komórkowych wielu komórek naszego organizmu (np. makrofagów, neutrofilów, fibroblastów, komórek Kupfera, hepatocytów, astrocytów, komórek śródbłónka i mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych). Jej ekspresję indukują cytokiny (TNF $\alpha$ , IL-1) oraz egzotoksyny (lipopolisacharydy bakteryjne). iNOS ze względu na ściśle związaną z enzymem kalmodulinę, nie wymaga do swojej aktywności jonów wapnia [15,18].

NO produkowany przez iNOS w większych ilościach wykazuje działanie cytostatyczne i cytotoksyczne. Wzrost jej aktywności w odpowiedzi na stan zapalny wzmacnia reakcje obronne organizmu. Indukcja tej izoformy NOS jest również odpowiedzialna za rozszerzenie naczyń krwionośnych [17].

Dodatkowo NO działa jako cząsteczka sygnałowa poprzez aktywację cykazy guanylowej, która przekształca GTP w cGMP. Ponieważ cyklaza guanylowa jest hemoproteiną, mechanizm działania NO polega na kowalencyjnym wiązaniu się z grupą hemową enzymu, co prowadzi do wzrostu jego aktywności i zwiększenia syntezy wewnątrzkomórkowego cGMP [11,16].

cGMP jako przekaźnik II rzędu uczestniczy w aktywacji enzymów, wywołując w komórce określony efekt biologiczny np. w naczyniach krwionośnych dochodzi do rozkurczu mięśni gładkich. Odbywa się to na drodze aktywacji kinaz zależnych od cGMP lub kanałów jonowych bramkowanych przez ligandy. cGMP działa przez aktywowanie kinazy białkowej G (PKG), która występuje w postaci dwóch lizoforn cGK I i cGK II. W układzie krwionośnym zidentyfikowano dwie izoformy cGK I – cGK I $\alpha$  oraz cGK I $\beta$ . Cyliczny GMP aktywuje głównie formę cGK I $\alpha$  w komórkach naczyń krwionośnych i płytkach, a forma cGK I $\beta$  występuje w mózgu, nerkach i jelicie [17, 19].

Rozkurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych w odpowiedzi na działanie NO jest związany z aktywnością cGK I $\alpha$ . Napięcie tych mięśni jest regulowane przez fosforylację łańcucha lekkiego miozyny, którą katalizuje odpowiednia kinaza. Kinaza ta jest z kolei aktywowana przez odłączenie grupy fosforanowej z udziałem guanozyno-5'-fosfatazy RhoA. NO za pośrednictwem cGMP i cGK I $\alpha$  prowadzi do ufosforylowania RhoA, powodując w ten sposób utratę jej aktywności. Ostatecznym wynikiem działania NO jest brak fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny, a co za tym idzie rozkurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Dodatkowo cGMP-zależna kinaza białkowa fosforylując fosfolipazy beta-2 i beta-3, indukuje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca<sup>2+</sup> i tym samym podtrzymuje zjawisko rozkurczu mięśni [19,20].

W komórkach NO działa nie tylko na drodze aktywacji cykazy guanylowej, ale również przez S-nitrozylację białek. In vivo NO nitrozyluje w białkach głównie reszty cysteiny. Reakcja jest możliwa dzięki temu, że łańcuch boczny cysteiny ma bardzo reaktywną grupę sulfhydrylową (-SH) [11].

Powstawanie nitrozotiole jest możliwe dzięki temu, że NO reagując z tlenem lub kationami metali o właściwościach utleniających tworzy reaktywny jon nitrozoniowy NO<sup>+</sup>. Ten z kolei łącząc się z grupą -SH cysteiny, przekształca się w grupę nitrozotioleową -SNO. Reakcja ta możliwa jest pod warunkiem, że w sąsiedztwie cysteiny znajdują się odpowiednie sekwencje XYCys (Asp lub Glu), gdzie X może być każdym z następujących aminokwasów: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr lub Gln, Y mogą być następujące aminokwasy: Lys, Arg, His, Asp lub Glu [11,21, 22].

W warunkach fizjologicznych w reakcji nitrozylacji powstają stabilne nitrozotiole. Są to głównie S-nitrozoalbumina (SNO-Alb), S-nitrozohemoglobina (SNO-Hb) lub S-nitrozoglutation (GSNO). Ze względu na swoją stabilność pełnią funkcję magazynowania i transportowania tlenu azotu w organizmie [21,23].

W osoczu główną formą występowania tlenu azotu jest S-nitrozoalbumina, która stanowi 85% wszystkich nitrozotiole osocza i podobnie jak S-nitrozoglutation spełnia bardzo ważną rolę w przekazywaniu sygnałów i obronie komórek przed atakiem patogenów [21].

Główna rola NO produkowanego przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych polega na rozszerzeniu naczyń krwionośnych, co jest możliwe dzięki relaksacji mięśni gładkich ściany naczyń. Bierze on również udział w regulacji napięcia

ścian naczyń. Natomiast obniżając opór naczyniowy uczestniczy w regulacji ciśnienia tętniczego, a ponadto hamuje agregację płytek krwi. Dodatkowo NO działa przeciwzapalnie przez hamowanie adhezji monocytów i leukocytów do śródbłonna. Odbywa się to poprzez hamowanie ekspresji jądrowego czynnika kappa B (NFκB), regulującego ekspresję genów kodujących molekuly adhezyjne takie jak: VCAM-1, ICAM-1 [25]. Uważa się także, że NO może przyczyniać się do regeneracji uszkodzonych komórek śródbłonna poprzez uwalnianie komórek progenitorowych śródbłonna i promowanie w nich potencjału regeneracyjnego.

Ponadto NO hamuje proliferację mięśni gładkich naczyń krwionośnych jako jeden z etapów powstawania blaszki miażdżycowej. Inne działania NO to zmniejszenie stresu oksydacyjnego przez zmniejszenie produkcji rodników nadtlenkowych i hamowanie procesu oksydacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [25].

Również nitrozotiole: nitrozoalbumina i nitrozooglutation, podobnie jak i NO, mogą hamować agregację płytek krwi (rycina 4) [16,17].

**Rycina 4. Główne funkcje NO w organizmie (9)**



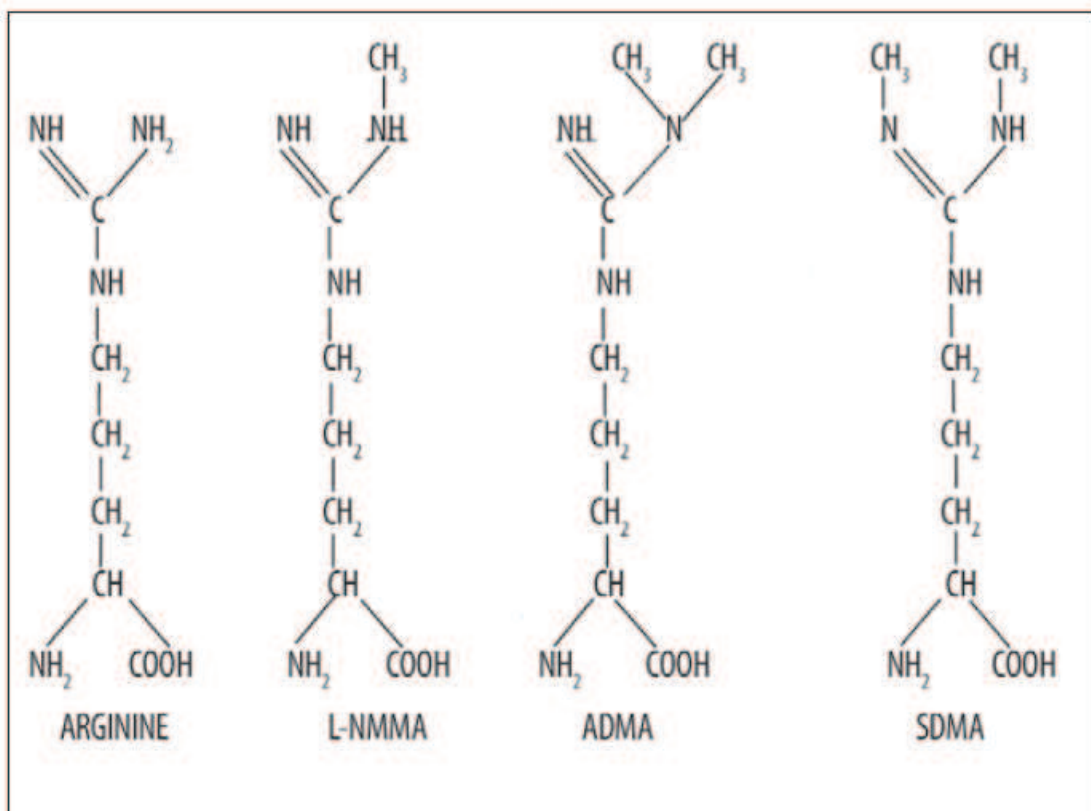
Uwalniany z komórek śródbłonna tlenek azotu zapobiega podziałom komórek mięśni gładkich oraz gromadzeniu się (adhezji) płytek krwi na powierzchni śródbłonna. Z kolei NO hamując aktywację płytek, zapobiega powstawaniu przyściennych zakrzepów. W przypadku uszkodzenia komórek śródbłonna, co ma miejsce bardzo często w powstawaniu miażdżycy, dochodzi do zaburzeń w syntezie NO. Powstaje wtedy mniej NO, a przy ścianach naczyń gromadzą się płytki krwi oraz makrofagi i rozpoczyna się proces tworzenia złożeń miażdżycowych. Wykazanie zarówno w

układach in vitro i in vivo, że w miażdżycy dochodzi do zaburzeń w syntezie NO wskazuje, że jego niedobór ma istotne znaczenie w rozwoju blaszki miażdżycowej, jej progresji oraz zwiększa ryzyko ostrej naczyniowej zakrzepicy [9,16,25].

### 3.2 Inhibitory syntazy tlenku azotu – rola i metabolizm

W 1992 roku w osoczu i moczu ludzi zostały zidentyfikowane analogi L-argininy (rycina 5) [24].

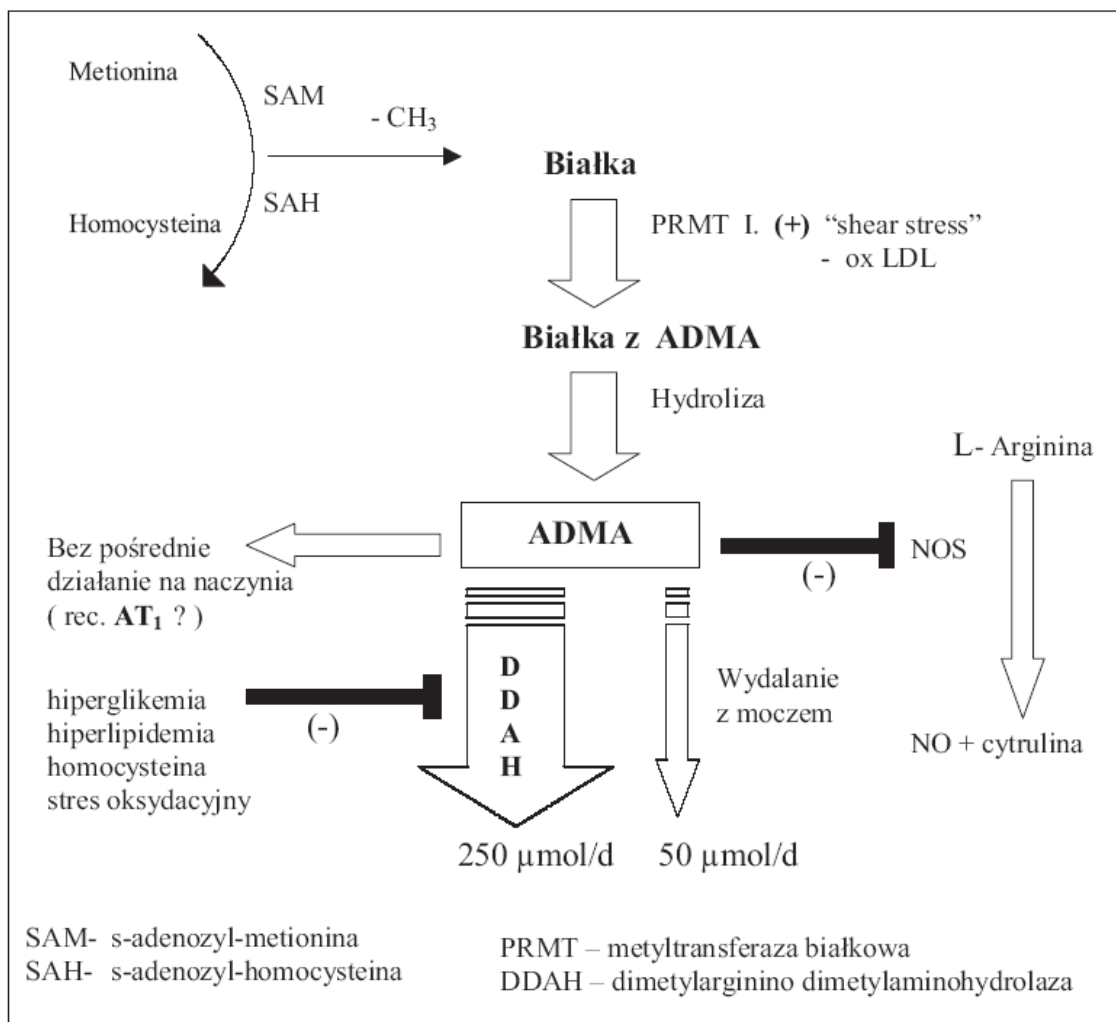
Rycina 5. Arginina oraz jej analogi (25)



Dwa z nich (L-N-mono-metylarżinina (L-NMMA), N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimetylarżinina (Asymetryczna dimetylarżinina ADMA) są endogennymi inhibitorami syntazy tlenku azotu. Natomiast inny analog argininy (symetryczna dimetylarżinina-SDMA) nie posiada zdolności hamowania syntazy tlenku azotu. Stężenia ADMA w osoczu ludzi jest 10 razy większe niż L-NMMA, a ADMA uważana jest za bardzo znaczący, endogenny inhibitor NOS. Przy jego wysokim stężeniu dochodzi do upośledzenia produkcji NO, co prowadzi do dysfunkcji śródbłonna, miażdżycy i chorób naczyń [25].

ADMA powstaje w czasie hydrolizy białek lub polipeptydów zawierających metylowaną argininę. Proces metylacji argininy zawartej w białkach jest katalizowany przez enzym PRMT (protein methyltransferase). Obecnie opisano 7 typów tego enzymu, w powstawaniu metyloarginin uczestniczą PRMT typu I, II i VII. Donatorem grupy metylowej w metylacji L-argininy jest S-adenozylometionina (SAM) – związek pośredni w metabolizmie homocysteiny; z którego powstaje S-adenozylhomocysteina (SAH) i ostatecznie homocysteina [26,27]. Enzym PRMT przenosi jedną lub więcej grup metylowych z SAM na reszty argininy w obrębie białek i polipeptydów. Schemat powstawania i metabolizmu ADMA przedstawiono na rycinie 6.

**Rycina 6. Metabolizm ADMA i jej patofizjologiczne działanie (28)**



W zależności od ilości przenoszonych grup metylowych przez PRMT typu I powstaje L-NMMA i ADMA. Strukturalny izomer ADMA, czyli SDMA powstaje przy udziale enzymu PRMT typu II i VII [29].

Obecność enzymu PRMT typu I wykazano w sercu, komórkach mięśni gładkich naczyń i śródbłonku [30]. Ponadto stwierdzono, że aktywność PRMT typu I w komórkach śródbłonka wzrasta w następstwie działania sił ścinania „shear stress”, a także pod wpływem oksydowanych form cholesterolu LDL [31,32].

Nie ustalono do tej pory, czy synteza ADMA jest stała oraz czy nasilenie aktywności enzymu PRMT prowadzi do istotnego podwyższenia jej poziomu w surowicy [30].

Nie wyjaśniono, również czy nasilony katabolizm białek ma wpływ na stężenie ADMA w surowicy. Można przypuszczać, że istnieje taki związek u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, u których poziom ADMA jest szczególnie wysoki [28].

ADMA i L-NMMA hamują w stopniu porównywalnym wszystkie trzy formy syntazy tlenu azotu tj. eNOS, nNOS, iNOS [33].

Metylowane argininy są wydalane z moczem, dlatego upośledzenie wydalania moczu, jest przyczyną podwyższonego stężenia ADMA i SDMA u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek.

W nerkach ma miejsce nie tylko wydalanie ADMA z moczem, lecz także wewnątrzkomórkowy metabolizm przy udziale enzymu DDAH (dimetylarginino dimetylaminohydrolaza) [28, 38]. Dlatego głównym mechanizmem prowadzącym do podwyższonego stężenia ADMA u chorych z niewydolnością nerek jest upośledzenie metabolizowania ADMA przez enzym DDAH.

Metylowane argininy podlegają dalszym przemianom metabolicznym. Główną drogą metabolizmu ADMA i L-NMMA (lecz nie SDMA) jest przemiana przy udziale enzymu DDAH do dimetylaminy i L-cytruliny [30,33]. SDMA nie hamuje NOS i jest prawie w całości wydalana przez nerki. Dlatego jej poziom w niewydolności nerek jest zdecydowanie wyższy niż ADMA [30]. Aktywność enzymu DDAH odgrywa decydującą rolę w utrzymaniu poziomu ADMA w surowicy.

Na podstawie oceny metabolizmu białek, szacuje się, że w organizmie człowieka powstaje dziennie około 300  $\mu$ moli (około 60g) ADMA. Z tej ilości około 250  $\mu$ moli są metabolizowane przez enzym DDAH, a około 50 $\mu$ moli jest wydalane z moczem [35].



Enzym DDAH jest obecny w komórkach śródbłonka naczyń, w wątrobie, trzustce i mózgu [36]. Jest on również obecny w nerkach, w komórkach endotelium kłębuszków nerkowych, w naczyniach oraz w obrębie komórek cewek nerkowych [37].

Dotychczas wyizolowano dwie izoformy enzymu DDAH; DDAH-1 kodowany w chromosomie 1 i DDAH-2 w chromosomie 6. Obydwie izoformy mają zbliżoną aktywność. DDAH-1 obecny jest w komórkach wykazujących aktywność nNOS, DDAH-2 przeważa w komórkach zawierających izoformę eNOS [30,36].

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na transgenicznym myszom DDAH<sup>+</sup>, u których aktywność enzymu DDAH jest zwiększona, uzyskano obniżenie ADMA w surowicy o 50% , dwukrotne zwiększenie wydalania z moczem azotanów (metabolitów NO) oraz obniżenie skurczowego ciśnienia krwi o około 15 mmHg. Model ten potwierdza decydujące znaczenie aktywności enzymu DDAH w utrzymaniu poziomu ADMA w surowicy [39].

### **3.2.1 Efekt podaży ADMA zdrowym ludziom**

Według Kielsteina i wsp. podanie zdrowym mężczyznom egzogennej ADMA powoduje wzrost stężenia ADMA w osoczu od 2-10  $\mu\text{mol/l}$  i znaczące obniżenie cGMP (drugi główny przekaźnik NO) [40]. Podaż ADMA spowodowała ponadto znaczące obniżenie pojemności minutowej serca, akcji serca, wzrost oporu obwodowego i naczyń nerkowych, zmniejszenie efektywnego przepływu krwi przez nerki. Natomiast nie zmieniła stężenia reniny i noradrenaliny w osoczu, co wskazuje na to, że ADMA nie wpływa na nerki poprzez układ współczulny lub układ renina-angiotensyna-aldosteron [35, 41].

Ponadto wykazano, iż wzrost stężenia ADMA w osoczu powoduje wzrost sztywności naczyń oraz zmniejszenie przepływu mózgowego krwi. Świadczy to o tym, że ADMA może odgrywać rolę w patogenezie chorób naczyniowych mózgu [42].

Ostatecznie na podstawie dostępnych badań należy stwierdzić, iż podaż ADMA zmniejszając syntezę NO, prowadzi do dysfunkcji śródbłonka w różnych narządach organizmu (nerki, serce, mózg).

### 3.2.2 ADMA a funkcja nerek

Nerki pełnią ważną rolę w metabolizmie ADMA. Z jednej strony ADMA jest wydalana przez ten narząd, a z drugiej również metabolizowana przy udziale DDAH znajdujących się w cewkach nerkowych i śródbłonku naczyń.

Zatem wzrost stężenia ADMA u pacjentów z chorobami nerek wynika z upośledzenia wydalania, jak i zmniejszonej aktywności DDAH. Przy czym zwiększenie stężenia ADMA związanego z upośledzonym wydalaniem z moczem, jest głównie zarezerwowane dla pacjentów z zaawansowaną i schyłkową niewydolnością nerek. Podczas gdy zmniejszenie aktywności enzymu DDAH występuje już we wczesnych stadiach przewlekłej choroby nerek [24, 43].

Podwyższony poziom ADMA u pacjentów z chorobą nerek wiąże się z wyższą zachorowalnością i śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych, a związane jest to z przyspieszonym procesem rozwoju miażdżycy w tej grupie chorych [44,45].

Zoccali i wsp. w ocenie prospektywnej grupy 225 osób hemodializowanych wykazali, że zwiększone stężenie ADMA było drugim (po wieku chorych) najsilniejszym czynnikiem śmiertelności ogólnej i śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, wśród czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [46].

Zwiększone stężenie ADMA nie tylko wiąże się z większym ryzykiem sercowo-naczyniowym, ale także uważane jest za czynnik powodujący szybszą progresję przewlekłych nefropatii. W badanej grupie z przewlekłą niewydolnością nerek, stężenie ADMA odwrotnie korelowało z wielkością filtracji kłębuszkowej. ADMA została również uznana za niezależny marker progresji do schyłkowej niewydolności nerek i wskaźnikiem zwiększonej śmiertelności [47]. Podobne spostrzeżenia możemy znaleźć w pracy Fliser i wsp. [48], którzy w grupie 227 chorych w średnim wieku, wykazali związek pomiędzy wyższym stężeniem ADMA, a szybszą progresją choroby nerek.

Na podstawie powyższych doniesień, należy przypuszczać, iż wysokie stężenie ADMA w osoczu wiąże się z szybszą progresją nefropatii, niezależnie od stadium przewlekłej choroby nerek.

### 3.2.3 ADMA jako czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego

Tradycyjne czynniki ryzyka miażdżycy prowadzą do uszkodzenia śródbłonka naczyń, w którym w sposób ciągły generowany jest NO. ADMA poprzez blokowanie jego powstawania inicjuje i podtrzymuje proces rozwoju miażdżycy. W literaturze istnieje wiele danych, wskazujących na rolę podwyższonego poziomu ADMA jako „wspólnej drogi” w uszkodzeniu funkcji śródbłonka przez wiele czynników ryzyka miażdżycy [49].

Wiele badań wykazało podwyższenie poziomu ADMA w surowicy w stanach zaliczanych do klasycznych czynników ryzyka, a także już w istniejących schorzeniach sercowo-naczyniowych (Tabela 1) [50].

**Tabela 1. Sytuacje kliniczne, w których stwierdzono podwyższenie poziomu ADMA (34)**

Rodzaj schorzenia, czynnika ryzyka	Podwyższenie poziomu ADMA (krotność)
Nadciśnienie tętnicze	2 x
Stan przedzucawkowy	2 x
Hipercholesterolemia	2 x
Hiperhomocysteinemia	2 x
Cukrzyca typu 2	2-3 x
Insulinooporność	2 x
Choroba niedokrwienna serca	2 x
Miażdżyca tętnic kończyn dolnych	2-3 x
Udar mózgu	2 x
Niewydolność serca	2-3 x
Nadczynność tarczycy	2 x
Niewydolność wątroby	2 x
Przewlekła niewydolność nerek	2-7 x

U pacjentów z hipercholesterolemią obserwuje się podwyższone stężenie ADMA. Mechanizm tego zjawiska polega na tym, że cholesterol frakcji LDL nasila powstawanie ADMA poprzez zwiększenie aktywności enzymu PRMT typu I oraz zmniejszenie degradacji ADMA przez zmniejszenie aktywności DDAH [51].

Ponadto monocyty wyizolowane od pacjentów z hipercholesterolemią i podwyższonym poziomem ADMA wykazują w hodowli znaczną adhezję do komórek śródbłonka w porównaniu z monocytami pacjentów z prawidłowym poziomem cholesterolu. Adhezja monocytów do komórek śródbłonka jest uważana za pierwszy etap w tworzeniu blaszki miażdżycowej, wywołując miejscową reakcję zapalną. Nadmierna adhezja monocytów do komórek śródbłonka, ulega normalizacji po 12 tygodniowej suplementacji L-argininą [51].

Pomiar kompleksu śródbłonek-błona środkowa (intima media thickness – IMT) tętnic szyjnych jest uznanym markerem wczesnych zmian miażdżycowych. W badaniu zdrowych ochotników stwierdzono ścisłą zależność między poziomem ADMA, a IMT tętnic szyjnych, co sugeruje, że ADMA uczestniczy w uszkodzeniu śródbłonka naczyń w tak wczesnym okresie zmian naczyniowych [52].

Wiele badań pokazuje, że poziom ADMA w surowicy pomaga w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z chorobą wieńcową, schyłkową niewydolnością nerek czy cukrzycą (Tabela 2) [25, 53].

**Tabela 2. ADMA a zdarzenia sercowo-naczyniowe (25)**

<b>Choroba</b>	<b>Poziom ADMA (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>Wzrost ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych</b>
stabilna choroba wieńcowa	> 0,62	5,3 x krotnie
niestabilna choroba wieńcowa (poziom ADMA stale podwyższony)	~ 0,8	3,4 x krotnie
stabilna i niestabilna choroba wieńcowa	> 0,89	1,81 x krotnie
schyłkowa niewydolność nerek	> 3,85	3,0 x krotnie
choroba naczyń obwodowych	> 0,64	1,7 x krotnie
cukrzyca typu 2	> 0,63	2,37 x krotnie

W wielu badaniach prospektywnych wykazano silną zależność pomiędzy zwiększonym stężeniem ADMA, a rozwojem chorób układu sercowo-naczyniowego. W badaniu Valkonena i wsp. wysoki poziom ADMA w surowicy wiązał się z wysokim ryzykiem ostrego incydentu wieńcowego w grupie niepalących mężczyzn w średnim wieku, a zwłaszcza u tych z chorobą wieńcową w wywiadzie [54].

W innym badaniu udowodniono częstsze incydenty sercowe (nagła śmierć sercowa, zawał mięśnia sercowego czy ponowna rewaskularyzacja) u chorych ze stabilną chorobą wieńcową, z towarzyszącym wysokim stężeniem ADMA poddawanych przezskórnej interwencji wieńcowej [55].

W przeprowadzonym wielośrodkowym badaniu CARDIAC wykazano zależność między stężeniem ADMA w surowicy, a ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej, zwłaszcza gdy u chorych z wysokim stężeniem ADMA, występowały inne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego (tj, nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, cukrzyca i palenie papierosów). Poziom ADMA we krwi powyżej 1,75  $\mu\text{mol/l}$  wpływał na znaczne zwiększenie ryzyka choroby wieńcowej. Pozwala to przyjąć hipotezę, że ADMA może być nowym markerem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [56]. Obecnie istnieje niewiele badań prospektywnych oceniających znaczenie ADMA jako nowego czynnika ryzyka i markera chorób sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej [6].

Wartości referencyjne dla ADMA w populacji ogólnej są dość wąskie (0,3 – 1,0  $\mu\text{mol/l}$ ), a nawet niewielki wzrost poziomu ADMA wskazuje na wysokie ryzyko sercowo-naczyniowe.

Dlatego do oznaczania poziomu ADMA we krwi należy stosować metody o dużej czułości i swoistości. Jedną z pierwszych metod była chromatografia (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), która do dziś pozostała metodą referencyjną [57]. Do innych sposobów oceny stężenia ADMA zaliczamy spektrometrię masową oraz szeroko dostępne zestawy ELISA pozwalające ocenić poziom ADMA zarówno w osoczu, jak i w surowicy [58].

### **3.2.4 Podwyższenie poziomu ADMA w różnych stanach chorobowych**

Podwyższone stężenie ADMA obserwuje się w wielu stanach chorobowych wymienionych w tabeli 1. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, zarówno u dzieci

jak i dorosłych stwierdzono podwyższony poziom ADMA i zmniejszone wydalanie metabolitów NO [59]. W miażdżycy tętnic kończyn dolnych poziom ADMA koreluje z ciężkością schorzenia mierzoną dystansem chromania przestankowego [60].

Również w schorzeniach mózgu o podłożu naczyniowym, będących po chorobie Alzheimera drugą przyczyną demencji występuje podwyższony poziom ADMA [34].

U chorych z cukrzycą, nietolerancją glukozy czy insulinoopornością występuje wysokie stężenie ADMA spowodowane hamowaniem enzymu DDAH przez glukozę. Ponadto u chorych z cukrzycą typu 2 posiłek bogatołuszczowy gwałtownie podwyższa poziom ADMA, co wiąże się ze zmniejszeniem rozkurczu naczyń zależnym od funkcji śródbłonna [61]. Zaburzenia lipidowe pod postacią hipercholesterolemii czy hipertrójglicydemii prowadzą do wzrostu ADMA we krwi.

Wykazano także podwyższony poziom ADMA w niewydolności serca wywołanej doświadczalnie u szczurów [61], a także u pacjentów z objawami zastoinowej niewydolności serca [62].

W czasie fizjologicznej ciąży poziom ADMA jest obniżony, ale wzrasta w stanie przedrzucawkowym. Wzrost stężenia ADMA występuje zanim rozwiną się objawy kliniczne rzucawki. Dlatego pomiar ADMA może służyć jako marker wczesnego zagrożenia rzucawką [63].

Podwyższony poziom ADMA również jest obserwowany u dzieci z wadami wrodzonymi serca i nadciśnieniem płucnym [64].

Pierwszą grupą chorych, u których podwyższenie poziomu ADMA wiązano z dysfunkcją układu L-arginina/NO i częstszym występowaniem nadciśnienia tętniczego i powikłań miażdżycowych, byli pacjenci z przewlekłą chorobą nerek. Dotyczy to zarówno wczesnych stadiów choroby nerek, jak i schyłkowej niewydolności nerek. W tej ostatniej poziom ADMA jest siedmiokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [65].

Obecnie ADMA jest zaliczana do toksyn mocznicowych, jest czynnikiem prognostycznym powikłań sercowo-naczyniowych i śmiertelności w tej grupie chorych, a także uważany jest za czynnik przyspieszający progresję choroby nerek [66,67].

### **3.2.5 Poziom ADMA a leki**

Szereg badań wykazało skuteczność leków działających na układ renina-angiotensyna-aldosteron (inhibitory enzymu konwertującego, antagoniści receptora

angiotensyny czy antagoniści aldosteronu) w obniżaniu poziomu ADMA. Mechanizm tego zjawiska jest niejasny. Dotychczas nie ustalono czy wynika to z efektu hipotensyjnego leków, a może również z działania bezpośredniego na metabolizm ADMA. Prawdopodobnym mechanizmem działania w/w leków jest także zmniejszenie stresu oksydacyjnego przez zmniejszenie powstawania angiotensyny II [6,34]

Działanie statyn na śródbłonek wynika z nasilenia uwalniania NO poprzez zwiększenie aktywności eNOS. Wykazano obniżenie ADMA przy stosowaniu jedynie rosuwastatyny, a nie było tego efektu podczas terapii simwastatyną, atorwastatyną, prawastatyną czy lovastatyną [25,34].

Fibraty stosowane w leczeniu hipertrójglicydemii wpływają na wzrost L-argininy w osoczu co skutkuje poprawą stosunku L-arginina/ADMA, a to z kolei pośrednio prowadzi do wzrostu produkcji NO i poprawy funkcji śródbłonka [25]. Według Yang i wsp. fenofibrat pośrednio powoduje zmniejszenie poziomu ADMA. Wynika to ze zmniejszenia stresu oksydacyjnego i stężenia cytokin pozapalnych przez ten lek, a co się z tym wiąże poprawą aktywności enzymu DDAH, odgrywającego istotną rolę w metabolizmie ADMA [68].

Wykazano, że metformina i tiazolidiendiony obniżają poziom ADMA. Tiazolidiendiony poprzez aktywację receptorów PPAR $\gamma$  zwiększają ekspresję DDAH-2. Mechanizm działania metforminy pozostaje nadal nieznan [34,69].

W celu wyjaśnienia szczegółowych mechanizmów działania leków na poziom ADMA konieczne są dalsze badania kliniczne na większych grupach chorych i trwające przez dłuższy okres czasu.

Badania układu sercowo-naczyniowego prowadzone u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek wykazały, że w opisywanej grupie istnieje bardzo duże ryzyko wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego. Obecnie mamy rozbieżne dane o ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych z przewlekłą chorobą nerek we wczesnych stadiach.

Badania takie mogłyby się przyczynić do wykrycia wczesnych czynników ryzyka progresji zmian patologicznych, a jednocześnie do ustalenia zasad profilaktyki.

## 4 Uzasadnienie wyboru tematu

Stosowane nieinwazyjne metody badania układu krążenia umożliwiają ocenę funkcji śródbłonna (stężenie asymetrycznej dimetylargininy), zmian morfologicznych naczyń (grubość kompleksu błona środkowa-śródbłonek, prędkość fali tętna) oraz struktury i funkcji lewej komory (echokardiografia). W dotychczas opublikowanych pracach udowodniono, że ADMA odgrywa znaczącą rolę w rozwoju miażdżycy. Brak jest obecnie jednoznacznych danych wskazujących na rolę ADMA w tym procesie, we wczesnych stadiach przewlekłej choroby nerek. Wydaje się jednak, iż już przy  $eGFR > 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  dochodzi do wzrostu stężenia ADMA u wspomnianych pacjentów. Wiadomo również, że ta populacja chorych, u których stwierdza się różnego stopnia białkomocz, wymaga leczenia nefroprotekcijnego (inhibitory enzymu konwertującego, antagoniści receptora AT-I), a także u części z nich istnieją wskazania do włączenia leczenia immunosupresyjnego (glikokortykosteroidy, cyklofosfamid, cyklosporyna).

W związku z powyższym postanowiłem zbadać stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym oraz określić związek tego stężenia z grubością kompleksu błona środkowa-śródbłonek, prędkością fali tętna, dobową kontrolą ciśnienia tętniczego i parametrami struktury i funkcji lewej komory.



## **5 Cele pracy**

Celem niniejszej pracy było

- 1) Określenie stężenia ADMA w osoczu chorych z niecukrzycowym białkomoczem.
- 2) Próba oceny związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a parametrami charakteryzującymi układ sercowo-naczyniowy i zaburzeniami biochemicznymi.
- 3) Analiza wpływu leczenia immunosupresyjnego i blokującego układ renina-angiotensyna-aldosteron na stężenie ADMA w osoczu.

## 6 Charakterystyka badanej grupy

Badaniem objęto grupę 37 dorosłych chorych (M-26, K-11) w średnim wieku  $38,5 \pm 11,5$  lat z białkomoczem niecukrzycowym, zarówno nerczycowym (n-14), jak i subnerczycowym (n-23) hospitalizowanych w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

Na podstawie biopsji nerki rozpoznano u nich kłębuszkowe zapalenie nerek.

Cukrzyca i /lub choroba wieńcowa były czynnikami wykluczającymi z badania.

Grupę kontrolną stanowiło 29 zdrowych dorosłych (M-15, K-14) w średnim wieku  $36,4 \pm 9,5$  lat. W grupie tej żaden z ochotników nie przyjmował przewlekle jakichkolwiek leków oraz nie miał nigdy rozpoznanej jakiegokolwiek choroby układu sercowo-naczyniowego. Informacje te zostały zebrane na podstawie wywiadu lekarskiego.

Całość badanej grupy pacjentów do celów analizy została podzielona dodatkowo na dwie grupy.

Grupę A (n-17) stanowili chorzy, którzy byli leczeni lekami blokującymi układ renina-angiotensyna-aldosteron. Były to preparaty inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę i antagonistów receptora angiotensyny II. Leki te stosowano pojedynczo lub w terapii skojarzonej.

Grupę B (n-20) stanowili chorzy, u których oprócz leków blokujących układ renina-angiotensyna-aldosteron, stosowano dodatkowo zgodnie ze wskazaniami dla danego chorego, również leczenie immunosupresyjne. Były to głównie wlewy dożylnie (bolusy) metyloprednizolonu, a następnie podawano prednizon doustnie, a u części chorych podawano cyklofosfamid dożylnie lub cyklosporynę doustnie.

W obu grupach, jeżeli były wskazania związane z nadciśnieniem tętniczym, a nie uzyskano zadawalającej kontroli ciśnienia tętniczego, dołączono również  $\alpha$ -blokery (doksazosynę) i /lub antagonistę wapnia (amlodypina).

W obu grupach, w przypadku hipercholesterolemii chorzy otrzymywali statyny (simwastatyna, atorwastatyna).

## 7 Protokół badania

Projekt uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Akademii Medycznej w Gdańsku.

Ochotnicy i pacjenci po zapoznaniu się z protokołem badania, wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

U wszystkich chorych wykonano oznaczenie stężenia asymetrycznej dimetylargininy (ADMA) w osoczu oraz pomiar grubości kompleksu błona-środkowa-śródbłonek (IMT), pomiar prędkości fali tętna (PWV), badanie echokardiograficzne oraz dobowy pomiar ciśnienia tętniczego.

Dodatkowo w opisywanej grupie wykonano na wstępie następujące badania :  
dobową utratę białka z moczem, stężenie cholesterolu całkowitego, kreatyniny, azotu mocznika, elektrolitów, poziomu białka C-reaktywnego, glukozy, albuminy i fibrynogenu w surowicy.

Powyższe badania powtórzono po 6 i 12 miesiącach.

Po ustaleniu rozpoznania choroby nerek, zakwalifikowaniu chorego do badania i wykonaniu badań wstępnych „0”, włączono leczenie zgodnie ze wskazaniami dla danego chorego (immunosupresja – glikokortykosterydy, cyklofamid, cyklosporyna), farmakologiczna blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron (inhibitory enzymu konwertującego, antagoniści receptora AT-I). Schemat badania przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 3. Protokół badania**

Badanie	Wizyta 1.	Wizyta 2.	Wizyta 3.
	„ 0 „	6 mies.	12 mies.
Badanie podmiotowe i przedmiotowe	◆	◆	◆
Badania biochemiczne i poziom ADMA	◆	◆	◆
IMT - grubość kompleksu błona środkowa - śródbłonek	◆	◆	◆
PWV - prędkość fali tętna	◆	◆	◆
Echokardiograficzna ocena mięśnia sercowego	◆	◆	◆
ABPM - całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego	◆	◆	◆

## **8 Metody badawcze wykorzystane w pracy**

### **8.1 Badanie podmiotowe i przedmiotowe**

Wszyscy ochotnicy zostali poddani badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu z uwzględnieniem pomiarów antropometrycznych i ciśnienia tętniczego. Przeprowadzony wywiad służył wykluczeniu przewlekłych chorób sercowo-naczyniowych oraz ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego – palenie papierosów, wywiad rodzinny.

### **8.2 Badania biochemiczne**

W badanej grupie wykonane zostały następujące analizy biochemiczne:

- poziom kreatyniny, azotu mocznika i elektrolitów w surowicy
- poziom glukozy w pełnej krwi żyłnej na czczo
- poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL (high density lipoprotein), trójglicerydów
- poziom albuminy, fibrynogenu i białka C-reaktywnego
- białkomocz dobowy

### **8.3 Badanie poziomu ADMA w osoczu**

W badanej grupie podczas 12 miesięcznej obserwacji wykonano trzykrotny pomiar poziomu ADMA w osoczu. Ponadto badanie to przeprowadzono jednorazowo w grupie kontrolnej. Stężenie ADMA w osoczu oceniono za pomocą testu ELISA przy użyciu zestawów firmy Immunodiagnostik w Zakładzie Żywienia Klinicznego GUMed.

### **8.4 Badanie echokardiograficzne serca**

Badanie echokardiograficzne zostało wykonane w Zakładzie Fizjologii Klinicznej GUMed, przez doświadczonego echokardiografistę, przy użyciu aparatu Siemens Sonoline G60S, głowicą o częstotliwości 2,14-3,75 MHz. Pomiar wielkości jam serca i grubości ścian lewej komory dokonano wg Penn convention [70]. W projekcji przymostkowej podłużnej podczas obrazowania M-mode mierzono wymiary lewej komory serca. Na wysokości nici ścięgnistych zastawki mitralnej dokonano oceny

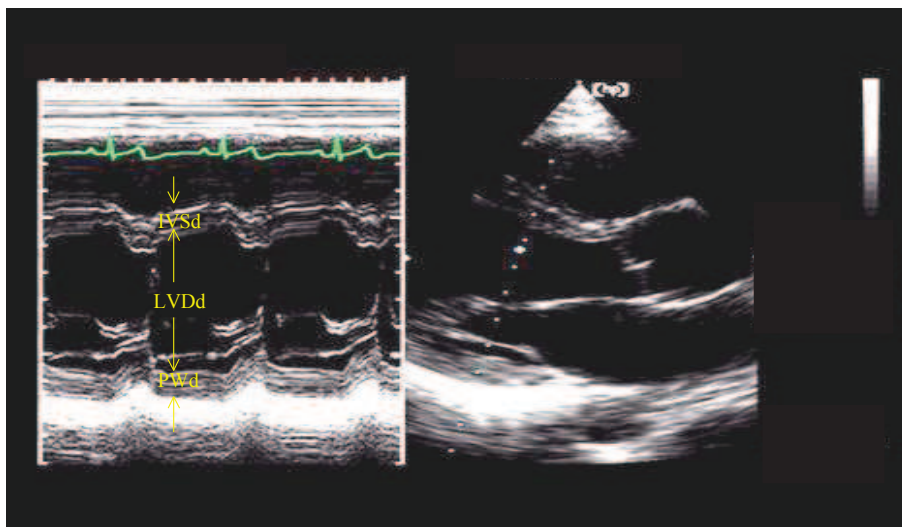
wymiaru późnorozkurczowego lewej komory (LVDD), grubości przegrody międzykomorowej (IVSD) i tylnej ściany serca (PWD) (rycina 7).

Wszystkie wyniki uśredniano na podstawie 3 pomiarów. W celu wyznaczenia masy lewej komory (LVM) stosowano wzór Devereux i Reicheka [71].

$$LVM[g] = 1,04 * ((LVDD + IVSD + PWD)^3 - LVDD^3) - 13,6$$

Wskaźnik masy lewej komory serca (LVMI) obliczano jako iloraz masy tej komory i powierzchni ciała.

**Rycina 7. Pomiary parametrów struktury lewej komory zgodnie z konwencją Penn**



Wymiar jamy lewej komory serca oceniano w późnej fazie rozkurczu (LVDD). Wzajemne proporcje grubości ścian do wymiaru lewej komory serca określano wskaźnikiem względnej grubości ścian (RWT – *relative wall thickness*). Wskaźnik ten obliczano jako stosunek sumy wymiarów ściany tylnej i przegrody międzykomorowej mierzonych na końcu rozkurczu do końcowo-rozkurczowego wymiaru lewej komory wg wzoru:

$$RWT = PWD + IVSD / LVDD.$$

Stosując kryteria Korena przy podwyższonej masie lewej komory i wskaźniku względnej grubości ścian  $\geq 0,45$  cm rozpoznawano przerost koncentryczny, zaś przy wartości  $\leq 0,45$  cm przerost ekscentryczny. Natomiast u chorych bez podwyższenia

masy lewej komory, a wykazujących  $RWT \leq 0,45$  cm rozpoznawano prawidłową geometrię lewej komory, a w przypadku  $RWT \geq 0,45$  cm koncentryczny remodeling lewej komory serca (LVR – *left ventricular remodeling*).

Funkcję skurczową lewej komory serca oceniano procentowym wskaźnikiem frakcji wyrzutowej (EF – *ejection fraction*) ocenianej wg Teicholza, jako stosunek objętości wyrzutowej do objętości rozkurczowej lewej komory.

Ocenę funkcji rozkurczowej lewej komory wykonano przy użyciu dopplerowskich technik napływu mitralnego (rycina 8). Analizowano wymienione poniżej parametry [72,73]:

Fala E - maksymalna prędkość napływu mitralnego w fazie wczesnej - (cm/s)

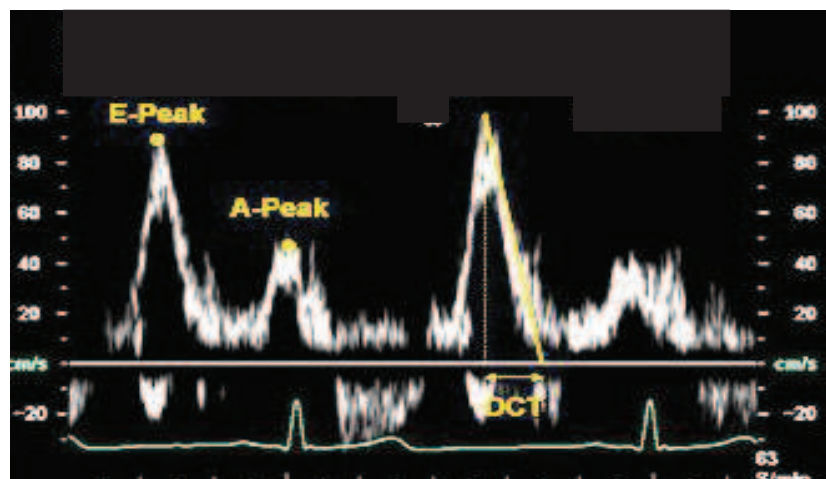
Fala A - maksymalna prędkość napływu mitralnego w fazie późnej - (cm/s)

Wskaźnik E/A - wzajemny stosunek fali E do fali A

decTime - czas deceleracji fali E - czas od szczytu fali E do czasu jej zaniku (ms)

Ocena napływu z żył płucnych do lewego przedsionka oraz propagacji fali E dostarczyła danych, pozwalających na wykluczenie pseudonormalizacji napływu mitralnego [74].

### Rycina 8. Ocena funkcji rozkurczowej – napływ mitralny



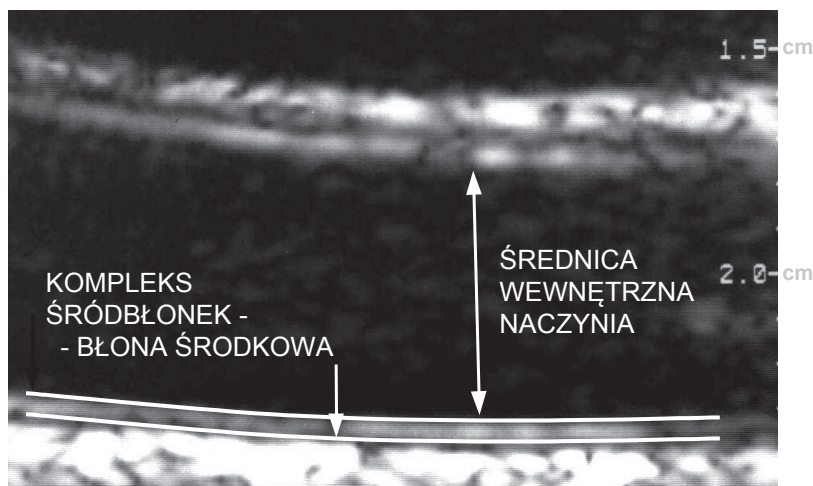
Dodatkowo jako wskaźnik funkcji rozkurczowej w badanej grupie oceniono parametr  $E/e'$ . W spektrum dopplerowskim dokonuje się przede wszystkim pomiaru maksymalnej prędkości wczesnorozkurczowego ruchu pierścienia mitralnego ( $e'$ ). Pomiaru  $e'$  dokonano po stronie bocznej oraz przyśrodkowej pierścienia i następnie

uśredniono. Uśredniona wartość  $e'$  posłużyła do obliczenia stosunku  $E/e'$  (śr.  $E/e'$ ), który jest bardzo istotny w szacowaniu ciśnienia napełniania lewej komory podwyższonego w zaawansowanych stadiach dysfunkcji rozkurczowej.

## 8.5 Ocena kompleksu intima-media

Ocenę kompleksu błona środkowa-śródbłonek (rycina 9) wykonano u osób badanych w pozycji leżącej na wznak z głową w osi ciała po 15 minutowym odpoczynku. Badanie przeprowadzono przy pomocy aparatu Siemens Sonoline G60S i użyciu głowicy liniowej o częstotliwości 10 MHz. Ustawienie ogniskowania było stałe. Wzmocnienie obrazu ultrasonograficznego dobierano według zasady uzyskiwania jak najmniejszych artefaktów w świetle naczynia. Tętnicę szyjną wspólną (*CCA ang. carotid communis artery*) uwidaczniano w projekcji podłużnej, w taki sposób, aby jej oś przebiegała prostopadłe do kierunku wiązki ultradźwięków. Ocenie poddano dalszą w stosunku do sondy ścianę tętnicy ze względu na mniejsze zakłócenia. Pomiaru IMT dokonywano w odległości od 1 do 3 cm od opuszki. W momencie wystąpienia załamka R w rejestrowanym podczas badania elektrokardiogramie zapisywano do pamięci urządzenia uzyskane obrazy, przy największym możliwym powiększeniu. Podstawą kwalifikacji zapisu do dalszego opracowania była odpowiednia dobra jakość obrazu kompleksu intima-media na odcinku co najmniej 1 cm. Obraz ścian tętnicy uwidaczniano w projekcji przedniej i boczno- tylnej.

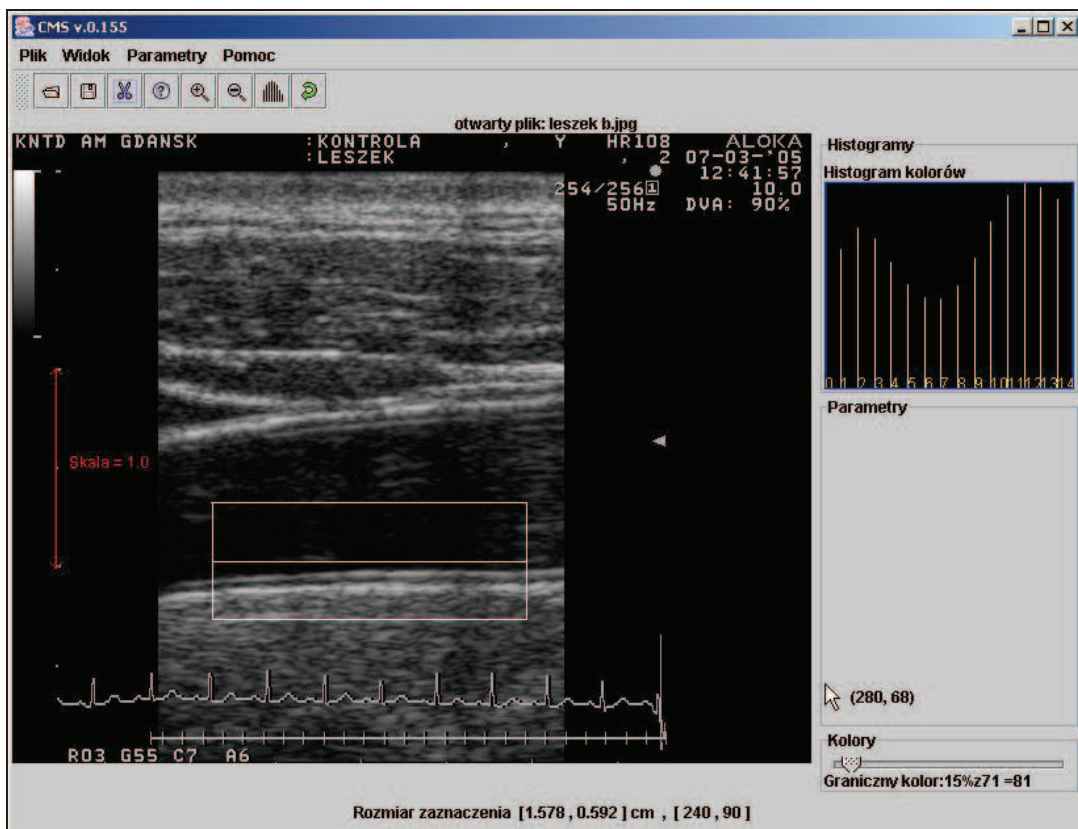
**Rycina 9. Ultrasonograficzny obraz kompleksu śródbłonek-błona środkowa**



Oceny grubości kompleksu intima-media dokonano przy użyciu specjalistycznego programu komputerowego (CMS), dzięki, któremu możliwa jest detekcja oraz pomiar IMT na podstawie analizy skali szarości wybranych przez badacza fragmentów obrazu ultrasonograficznego. Obrazy zostały zapisane w formacie DICOM. Użycie tego narzędzia pomiarowego pozwoliło na dokładną, szybką ocenę kompleksu błona środkowa-śródbłonek.

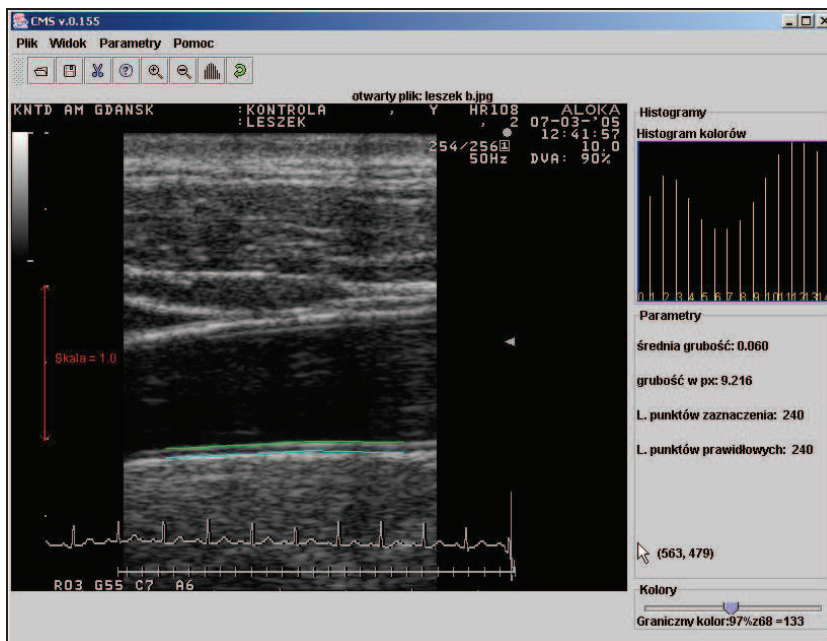
Badanie to zostało wykonane w Zakładzie Fizjologii Klinicznej (rycina 10, rycina 11).

**Rycina 10. Okno robocze programu CMS. Przykład zaznaczenia obszaru do automatycznej detekcji kompleksu błona środkowa-śródbłonek**





Rycina 11. Okno robocze programu CMS



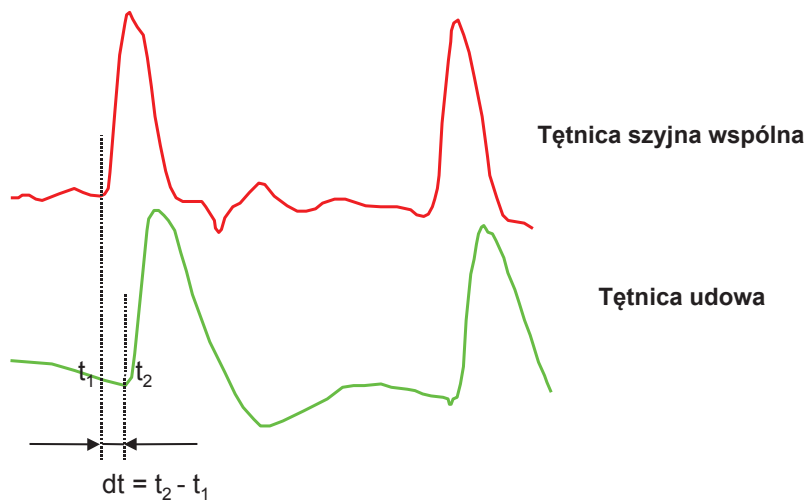
## 8.6 Ocena podatności naczyń tętniczych

W celu oceny podatności naczyń tętniczych mierzono prędkość fali tętna metodą opisaną przez Asmara [75]. Badanie przeprowadzono u pacjentów po 15 minutowym odpoczynku, w cichym pomieszczeniu w pozycji leżącej.

Jednocześnie rejestrowano dwie fale tętna znad prawej tętnicy szyjnej wspólnej i prawej tętnicy udowej. Obie tętnice wybrano ze względu na podobną budowę histologiczną. Do oceny fali tętna użyto przetworników ciśnieniowych TY-306 (Fukusa Co., Japan), które umieszczono prostopadle do ściany naczyń, w miejscach o dobrze wyczuwalnym tętnie. Prędkość fali tętna (PWV) obliczono przy pomocy wzoru  $PWV=L/dT$ , gdzie L to odległość między punktami przyłożenia przetworników, a T to czas potrzebny do przejścia fali tętna z jednego do drugiego miejsca pomiaru. W praktyce czas T był obliczany jako różnica czasu (dt) wystąpienia fali tętna w dwóch miejscach, w którym jednocześnie dokonano rejestracji (rycina 12).

Punkty krytyczne zostały wybrane zgodnie z zasadą, że punkt przegięcia ramienia wstępującego w najmniejszym stopniu jest podatny na wpływy zjawiska fali odbitej [76]. Wartość średnią obliczono na podstawie dwudziestu pomiarów.

**Rycina 12. Prędkość fali tętna- sposób określania opóźnienia czasowego**



### **8.7 24-godzinny automatyczny pomiar ciśnienia tętniczego.**

Ambulatoryjnego, dobowego pomiaru ciśnienia tętniczego dokonano przy pomocy aparatów SpaceLabs 90207. Dokładność tych urządzeń jest okresowo kontrolowana zgodnie z określoną procedurą. Wielkość mankietu dostosowano do ramienia osoby badanej. Każdy badany został poinformowany o przebiegu pomiaru i możliwych zakłóceniach w trakcie badania. Pomiaru w ciągu dnia (od 6:00 rano do 22:00) były wykonywane co 20 minut, natomiast w nocy (od 22:00 do 6:00 rano) były wykonywane co 30 minut. Analizie poddano zapis średniego dobowego ciśnienia tętniczego, a także osobno dziennego i nocnego średniego ciśnienia tętniczego oraz ciśnienia tętna (*PP-pulse pressure*).

Ciśnienie tętna obliczano wg wzoru:  $PP = SBP - DBP$ .

### **8.8 Metody statystyczne**

Sporządzono standardowe statystyki opisowe (średnia, odchylenie standardowe, mediana). Zgodność rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym oceniano analizując histogramy. Niektóre zmienne poddano transformacji logarytmicznej lub przy pomocy innej funkcji. Porównania międzygrupowe zmiennych o rozkładzie normalnym lub zbliżonym, porównywano przy pomocy testu t

Studenta lub analizy wariancji (uzupełnionej o test post-hoc wg Scheffego).

W przypadku, gdy rozkład znacznie odbiegał od normalnego, stosowano test U Manna-Whitneya. Korelacje pomiędzy zmiennymi oceniano metodą Pearsona lub metodą Spearmana. Związki pomiędzy zmiennymi o charakterze jakościowym oceniano przy pomocy tabel wielodzzielczych i testu chi-kwadrat wg Pearsona.

Do oceny wieloczynnikowej wykorzystywano regresję wieloczynnikową.

Zmienność poszczególnych parametrów w czasie oceniano metodą multilevel mixed-effects linear regression (metoda uwzględnia pomiary powtarzane u tych samych osób). Badano model zakładający zmienność liniową oraz model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej. Wybierano model lepiej dopasowany, a w przypadku porównywalnego stopnia dopasowania, wybierano model liniowy (czyli prostszy). Za istotne statystycznie przyjęto wartości  $p < 0.05$ . Obliczenia przeprowadzono przy pomocy oprogramowania komputerowego STATA 13.1 firmy StataCorp, LP (Stany Zjednoczone Ameryki Północnej, 2013).

## 9 Uwagi krytyczne dotyczące materiału i metod.

Pomimo dołożenia wszelkich starań część pacjentów zakwalifikowana do badania przyjmowała preparaty inhibitorów enzymu konwertującego i/lub sartanów oraz statyny przed rozpoczęciem obserwacji. Odsetek ten wynosił odpowiednio 40% i 11% chorych. Badania laboratoryjne, w tym profil lipidowy były wykonane w dniu poszczególnych wizyt w godzinach rannych na czczo. Niestety nie możemy wykluczyć, że czas od ostatniego posiłku do momentu pobrania krwi był jednakowy u wszystkich badanych. Ponadto należy zauważyć, że ocenę białkomoczu przeprowadzono w moczu dobowym. Nie ma pewności, że wszyscy pacjenci podczas poszczególnych wizyt prawidłowo wykonali zbiórkę dobową moczu pomimo wcześniejszego szkolenia w tym zakresie. Funkcję nerek określono jedynie za pomocą stężenia kreatyniny oraz dostępne wzory (MDRD i CKD-EPI) służące do oszacowania przesączania kłębuszkowego. Nie przeprowadzono szczegółowej oceny w oparciu o klirens kreatyniny. Ciśnienie tętnicze mierzono za pomocą ABPM. Analizie poddano zapis średniego dobowego ciśnienia tętniczego, a także osobno dziennego (od godziny 6:00 do 22:00) i nocnego (od godziny 22:00 do 6:00) średniego ciśnienia tętniczego. Nie przeprowadzono analizy w oparciu o informację od chorego odnośnie czasu aktywności, odpoczynku czy snu, co mogło wpłynąć na niedokładność oceny ciśnienia, zwłaszcza okresu dziennego czy nocnego. Echokardiograficzna ocena wymiarów lewej komory przeprowadzona u chorych z białkomoczem nerczycowym, zwłaszcza podczas pierwszej wizyty mogła być obciążona błędem wynikającym z większej objętości śródnaczyniowej i tym samym zmiany objętości lewej komory serca. Zjawisko to związane jest ze znaczną hiperwolemią, często współistniejącą w momencie rozpoznania pełnoobjawowego zespołu nerczycowego. Zmiany te miały mniejszy wpływ na jakość badania przy kolejnych ocenach echokardiograficznych, ze względu na osiągnięcie remisji choroby. Stan przewodnienia mógł także zmieniać przepływ mitralny na podstawie, którego oceniana jest funkcja rozkurczowa lewej komory serca. Dlatego dodatkowo przeprowadzono ocenę funkcji rozkurczowej z zastosowaniem dopplera. Stężenie ADMA oceniano z zastosowaniem metody ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), wykorzystującej królicze przeciwciała anty – ADMA, wprowadzoną do użytku klinicznego w 2004 r. Oznaczenia stężenia ADMA wykonywane nową metodą ELISA były porównywalne z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem innych metod.

## 10 Wyniki badań

### 10.1 Dane kliniczne badanej grupy (n=37)

Charakterystykę kliniczną całej badanej populacji, grupy A (chorzy leczeni lekami blokującymi układ renina-angiotensyna-aldosteron) i grupy B (chorzy leczeni lekami blokującymi układ RAA i dodatkowo lekami immunosupresyjnymi) przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4. Charakterystyka kliniczna wszystkich pacjentów i grupy kontrolnej.**

	Badana populacja	Grupa A	Grupa B	Grupa kontrolna
Liczba chorych (n)	37	17	20	29
Mężczyźni n (%)	26 ( 70%)	12 ( 70%)	14 ( 70%)	15(52%)
Wiek (lata)	38,5 ± 11,5	38,2 ± 10,5	38,7 ± 12,6	36,4 ± 9,5
Palący papierosy n (%)	13 (35,1%)	4 (23%)	9 (45%)*	3 (10%)
Nadciśnienie tętnicze n (%)	15 (40,6%)	8 (47%)	7 (35%)*	0

\* **A vs B p<0,05**

W badanej populacji przeważali mężczyźni, którzy stanowili 70% chorych. Podobny rozkład płci był również w grupie A i B. Nie stwierdzono różnic wiekowych pomiędzy omawianymi grupami chorych i grupą kontrolną. Analizę przeprowadzono za pomocą testu t-studenta. W grupie A więcej chorych miało nadciśnienie tętnicze (47% vs 35%), a w grupie B więcej chorych paliło papierosy (45% vs 23%). Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy rekrutujący się z pracowników kliniki. 10% osób grupy kontrolnej zgłaszało czynne palenie tytoniu.

### 10.2 Kontrola ciśnienia tętniczego badanej grupy (n=37)

Dane dotyczące wartości średniego dobowego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, ciśnienia tętna i jego zmienności w trakcie obserwacji badanych pacjentów przedstawiono w tabeli 5 oraz dla poszczególnych grup A i B w tabeli 6 i 7.

**Tabela 5. Wartości średniego dobowego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w badanej populacji.**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
SBP (mm Hg)	122,8 ± 12,3	120	124,1 ± 12,5	121,5	123,1 ± 13,0	121	0,221
DBP (mm Hg)	75,1 ± 7,8	75	75,1 ± 8,1	74	74,1 ± 8,5	73	0,274
PP (mm Hg)	47,8 ± 8,3	48	49,4 ± 8,1	49	48,7 ± 8,5	48	<b>0,007**</b>
SBP <sub>d</sub> (mm Hg)	125,9 ± 12,1	124	127,2 ± 12,4	125	125,4 ± 15,2	124	0,190
DBP <sub>d</sub> (mm Hg)	77,8 ± 7,7	78,5	78,2 ± 8,0	79	77 ± 8,6	77,5	0,090
PP <sub>d</sub> (mm Hg)	47,2 ± 10,9	48	48,6 ± 17,1	48	48,4 ± 12,4	48	0,258
SBP <sub>n</sub> (mm Hg)	113,3 ± 14,8	110	114,6* ± 14,7	111	112,9 ± 17,7	110,5	0,384
DBP <sub>n</sub> (mm Hg)	66,9 ± 9,9	65,5	66,2 ± 9,8	64,5	65,9 ± 10,3	64	<b>0,037*</b>
PP <sub>n</sub> (mm Hg)	46,4 ± 9,6	44,5	49,8 ± 13,2	49	49,7 ± 13,8	48	<b>0,003*</b>
DIP (%)	10,2 ± 4,9	10,6	10,0 ± 4,7	10,5	10,3 ± 4,6	11	0,946

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

SBP – (*systolic blood pressure*) średnie dobowe skurczowe ciśnienie tętnicze

DBP- (*diastolic blood pressure*) średnie dobowe rozkurczowe ciśnienie tętnicze

PP- (*pulse pressure*) średnie dobowe ciśnienie tętna

DIP – wartość spadku SBP<sub>n</sub> w stosunku do SBP<sub>d</sub> (jako dipper przyjęto spadek SBP<sub>n</sub> w granicach 10-20%)

SBP<sub>d</sub> – (*daily systolic blood pressure*) średnie dzienne skurczowe ciśnienie tętnicze

DBP<sub>d</sub>- (*daily diastolic blood pressure*) średnie dzienne rozkurczowe ciśnienie tętnicze

PP<sub>d</sub>- (*daily pulse pressure*) średnie dzienne ciśnienie tętna

SBP<sub>n</sub> – (*nocturnal systolic blood pressure*) średnie nocne skurczowe ciśnienie tętnicze

DBP<sub>n</sub>- (*nocturnal diastolic blood pressure*) średnie nocne rozkurczowe ciśnienie tętnicze

PP<sub>n</sub>- (*nocturnal pulse pressure*) średnie nocne ciśnienie tętna

W badanej grupie ciśnienie było mierzone za pomocą metody ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia tętniczego (ABPM). W całym okresie obserwacji nie stwierdzono istotnej statystycznie zmienności wartości średniego dobowego ciśnienia tętniczego, zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego. Średnie dobowe ciśnienie tętna zmieniało się znamienne statystycznie w trakcie obserwacji. Statystyczne obliczenia dokonano za pomocą analizy wariancji ANOVA. Analizie poddano także wartości średniego dziennego i nocnego, skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz ciśnienia tętna dziennego i nocnego. Zaobserwowano istotną statystycznie zmienność w zakresie nocnej kontroli średniego nocnego rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego nocnego ciśnienia tętna.

W czasie badania w całej grupie obserwowano obniżenie nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego w stosunku do dziennego skurczowego ciśnienia tętniczego o ponad 10%, co kwalifikuje tych chorych jako pacjentów „dipper”. Obniżenie tego ciśnienia w poszczególnych punktach badań nie różniło się istotnie statystycznie.

Podsumowując, w badanej grupie ciśnienie tętnicze, zarówno w okresie dziennym i nocnym było dobrze kontrolowane za pomocą prowadzonej terapii farmakologicznej i u wszystkich pacjentów obserwowano fizjologiczne obniżenie nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego.

W grupie A w całym okresie obserwacji nie stwierdzono istotnej statystycznie zmienności wartości średniego dobowego ciśnienia tętniczego, zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego. Średnie dobowe ciśnienie tętna zmieniało się znamienne statystycznie w trakcie obserwacji. Podobnie jak dla całej grupy obliczenia dokonano za pomocą analizy wariancji ANOVA. Analizie poddano także wartości średniego dziennego i nocnego, skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz ciśnienia tętna dziennego i nocnego. Zaobserwowano istotną statystycznie zmienność w zakresie dziennej i nocnej kontroli średniego skurczowego ciśnienia tętniczego, dziennego rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego nocnego ciśnienia tętna.

W czasie badania w grupie A obserwowano średnie obniżenie nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego w stosunku do dziennego skurczowego ciśnienia tętniczego wynosiło ponad 10%. Obniżenie tego ciśnienia w poszczególnych punktach badań nie różniło się statystycznie.

**Tabela 6. Wartości średniego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w grupie A.**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
SBP (mm Hg)	121,1 ± 9,0	120	126,7 ± 6,2	125	120,8 ± 9,7	123,5	0,107
DBP (mm Hg)	76,3 ± 5,2	78	76,9 ± 4,8	78	75 ± 8,1	74	0,650
PP (mm Hg)	44,8 ± 6,6	44	51,0 ± 4,8	51,5	46,5 ± 7,5	47	<b>0,010**</b>
SBP <sub>d</sub> (mm Hg)	124,2 ± 9,1	124,5	129,4 ± 7,7	128	113,8 ± 28,5	121,5	<b>0,044**</b>
DBP <sub>d</sub> (mm Hg)	78 ± 5,5	79	80,3 ± 5,3	80,5	70,3 ± 7,9	70,5	<b>0,004**</b>
PP <sub>d</sub> (mm Hg)	46,2 ± 6,9	46	52,3 ± 30	52,5	58 ± 11,5	59	0,229
SBP <sub>n</sub> (mm Hg)	110,7 ± 10,2	109	115,7 ± 2,0	116	98,8 ± 26,3	104	<b>0,059**</b>
DBP <sub>n</sub> (mm Hg)	68,6 ± 8,2	69,5	66,6 ± 5,7	64,5	63,3 ± 7,5	63	0,211
PP <sub>n</sub> (mm Hg)	42,1 ± 7,3	41,5	56,4 ± 21,8	50	68,3 ± 37,4	53	<b>0,005*</b>
DIP (%)	10,8 ± 5,5	11,4	10,4 ± 5,1	10,2	13,4 ± 2,2	14,4	0,505

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

Skróty patrz tabela 5.

Podsumowując, w grupie A ciśnienie tętnicze, zarówno w okresie dziennym i nocnym ulegało ono istotnym statystycznie zmianom w czasie badania. U wszystkich pacjentów obserwowano fizjologiczne obniżenie nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego.

Z punktu widzenia klinicysty uzyskane wartości ciśnienia tętniczego z pomiarów metodą ABPM w grupie A świadczą o dobrej kontroli ciśnienia u omawianych pacjentów.



**Tabela 7. Wartości średniego, skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w grupie B.**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
SBP (mm Hg)	122,3 ± 9,7	119	123,1 ± 18,2	120,5	126,1 ± 15,5	121	0,749
DBP (mm Hg)	75,1 ± 7,3	75	75 ± 11,3	73	73,6 ± 9,0	71	0,356
PP (mm Hg)	47,3 ± 7,0	47	49,1 ± 11	49	52,50 ± 9,1	49	0,126
SBP <sub>d</sub> (mm Hg)	125,7 ± 9,9	123	126,2 ± 18,5	124	128,8 ± 14,7	125	0,813
DBP <sub>d</sub> (mm Hg)	78,2 ± 7,3	79	78,1 ± 11,1	77	76,6 ± 8,8	75	0,508
PP <sub>d</sub> (mm Hg)	47,5 ± 9,5	48	43,3 ± 18,5	46,5	52,2 ± 8,4	50	0,724
SBP <sub>n</sub> (mm Hg)	113 ± 12,2	111	114,3 ± 20,8	109	117 ± 20,1	111	0,885
DBP <sub>n</sub> (mm Hg)	66,7 ± 9,4	65	67,4 ± 11,9	63	63,9 ± 12,2	62	<b>0,019*</b>
PP <sub>n</sub> (mm Hg)	46,3 ± 7,1	45	46,9 ± 11,7	49	53,1 ± 12,3	48,5	<b>0,064*</b>
DIP (%)	10,2 ± 4,1	10,7	9,7 ± 4,6	9,7	9,6 ± 6,2	10,8	0,802

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

Skróty patrz tabela 5.

W grupie B w całym okresie obserwacji nie stwierdzono istotnej statystycznie zmienności wartości średniego dobowego oraz dziennego i nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego. Średnie dobowe oraz średnie dzienne rozkurczowe ciśnienie tętnicze nie zmieniało się znamienne statystycznie w trakcie obserwacji. Natomiast taką zmienność zaobserwowano dla średniego nocnego rozkurczowego ciśnienia tętniczego. Podobnie jak dla całej grupy obliczenia dokonano za pomocą analizy wariancji. Analizie poddano także wartości średniego ciśnienia tętna dobowego, dziennego i nocnego. Zaobserwowano jedynie istotną statystycznie zmienność w zakresie średniego nocnego ciśnienia tętna.

W czasie badania w grupie B obserwowano obniżenie średnie nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego w stosunku do dziennego skurczowego ciśnienia tętniczego o ponad 10% jedynie podczas pierwszej wizyty. Był to moment diagnostyki i włączenia odpowiedniej terapii. Podczas kolejnych dwóch wizyt wystąpiło nocne obniżenie

skurczowego ciśnienia tętniczego, lecz było ono tylko nieznacznie mniejsze w porównaniu z początkiem badania.

W opisywanych grupach A i B podczas obserwacji zauważono różnicę w kontroli ciśnienia tętniczego. W grupie B nie stwierdzono istotnie statystycznej zmienności w zakresie średniego dobowego ciśnienia tętna, średniego dziennego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego w porównaniu z istotną zmiennością tych parametrów w grupie A. Dodatkowo w grupie B średnie nocne rozkurczowe ciśnienie tętnicze zmieniało się istotnie statystycznie w czasie obserwacji, czego nie zaobserwowano w grupie A. Pozostałe parametry takie jak: średnie dobowe skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze oraz średnie dzienne i nocne ciśnienie tętna w obu grupach nie ulegało istotnym zmianom podczas badania. Nie obserwowano także w grupie B po włączeniu leczenia immunosupresyjnego obniżenia nocnego skurczowego ciśnienia tętniczego o  $\geq 10\%$ , jak to miało miejsce w grupie A. (Patrz tabela 6 i 7)

### **10.3 Dane biochemiczne badanej populacji (n=37)**

Badania biochemiczne badanych pacjentów przedstawiono w tabeli 8 dla całej populacji, a w tabeli 9 i 10 odpowiednio dla grupy A i B.

W badanej populacji stwierdzono zmienność statystyczną stężenia CRP i fibrynogenu w osoczu. Zmniejszenie tych parametrów można wiązać z przewlekłym leczeniem, które doprowadziło do remisji choroby podstawowej (kłębuszkowego zapalenia nerek). Podobną zależność stwierdzono również w stężeniu albuminy, cholesterolu całkowitego, trójglicerydów w surowicy oraz dobowej utraty białka z moczem. W czasie badania doszło do istotnego zwiększenia stężenia albuminy w surowicy, obniżenia dobowej utraty białka z moczem, obniżenia stężenia cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów w surowicy.

**Tabela 8. Charakterystyka biochemiczna badanej populacji pacjentów**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
CRP (mg/l)	1,66 ± 1,53	1,30	1,26 ± 1,02	1,0	1,19 ± 0,89	1,0	<b>0,020*</b>
Albumina (g/dl)	37,13 ± 9,16	39	42,88 ± 7,19	43	41,23 ± 5,45	42	<b>&lt;0,001**</b>
Fibrynogen (g/l)	4,93 ± 1,90	4,6	3,83 ± 1,10	3,55	3,79 ± 1,18	3,65	<b>&lt;0,001*</b>
Kreatynina (mg/dl)	1,14 ± 0,37	1,06	1,17 ± 0,44	1,05	1,15 ± 0,52	0,95	0,793
eGFR (MDRD) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	80,85 ± 26,57	81,5	80,74 ± 26,85	79	81,47 ± 27,17	79	0,126
eGFR (CKD-EPI) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	83,80 ± 26,1	85	83,68 ± 26,78	83,5	84,44 ± 27,03	84	<b>0,055*</b>
Cholesterol całkowity (mg/dl)	285,24 ± 110,79	252	219,00 ± 49,0	220	210,79 ± 52,71	198,5	<b>&lt;0,001*</b>
Trójglicerydy (mg/dl)	238,81 ± 247,46	151	195,73 ± 217,22	140	154,53 ± 107,74	115	<b>0,001*</b>
Cholesterol HDL (mg/dl)	51,73 ± 16,29	53	56,29 ± 24,25	49,5	52,68 ± 21,68	48	0,143
Dobowa utrata białka (g/dobę)	4,13 ± 4,34	2,40	1,76 ± 3,23	0,85	1,55 ± 1,91	0,65	<b>&lt;0,001*</b>
ADMA (μmol/l)	0,77 ± 0,26	0,83	0,56 ± 0,20	0,49	0,40 ± 0,14	0,37	<b>&lt;0,001*</b>

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

Należy zauważyć, że zastosowane leczenie nie miało wpływu na funkcję nerek wyrażoną stężeniem kreatyniny w całym okresie obserwacji. Natomiast stwierdzono istotną zmienność w zakresie eGFR obliczonego według wzoru CKD-EPI w czasie badania.

**Tabela 9. Charakterystyka biochemiczna grupy A**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
CRP (mg/l)	2,13 ± 1,85	1,70	1,17 ± 0,6	1,10	1,46 ± 0,95	1,35	<b>0,058*</b>
Albumina (g/dl)	43,88 ± 4,43	46	45,8 ± 5,48	46	43,75 ± 3,60	44	0,346
Fibrynogen (g/l)	4,26 ± 1,85	3,50	3,83 ± 1,0	3,60	3,61 ± 0,89	3,45	<b>0,028**</b>
Kreatynina (mg/dl)	1,20 ± 0,45	1,06	1,28 ± 0,59	1,10	1,25 ± 0,65	0,96	0,500
eGFR (MDRD) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	75,12 ± 26,47	78	73,80 ± 27,61	72	77,56 ± 29,70	74	0,328
eGFR (CKD-EPI) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	77,82 ± 24,97	82	76,47 ± 27,99	76	80,38 ± 29,81	78,5	0,302
Cholesterol całkowity (mg/dl)	239,47 ± 45,77	246	222,53 ± 34,53	223	211,40 ± 27,74	208	<b>0,012**</b>
Trójglicerydy (mg/dl)	192,12 ± 166,79	134	267,67 ± 315,27	139	177,22 ± 145,05	113,5	0,114
Cholesterol HDL (mg/dl)	45,82 ± 11,24	45	44,86 ± 14,26	44	47,87 ± 15,57	48	0,445
Dobowa utrata białka (g/dobę)	1,53 ± 0,96	1,70	1,23 ± 0,88	1,00	1,01 ± 0,86	0,70	<b>0,005*</b>
ADMA (umol/l)	0,76 ± 0,21	0,83	0,54 ± 0,18	0,50	0,42 ± 0,14	0,43	<b>&lt;0,001*</b>

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

W grupie A stwierdzono zmienność statystyczną stężenia CRP i fibrynogenu w osoczu. Zmniejszenie tych parametrów można wiązać z przewlekłym leczeniem, które doprowadziło do całkowitej lub częściowej remisji kłębuszkowego zapalenia nerek, podobnie jak obserwowano to w analizie całej badanej populacji. Podobną zmianę stwierdzono również w stężeniu cholesterolu całkowitego w surowicy i dobowej utracie białka z moczem.

Zmiany te należy tłumaczyć skutecznym leczeniem farmakologicznym prowadzącym do remisji choroby. Funkcja nerek pozostawała stabilna podczas badania.

**Tabela 10. Charakterystyka biochemiczna grupy B**

	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	p
CRP (mg/l)	1,27 ± 0,95	1,20	1,32 ± 1,10	0,80	0,98 ± 1,21	0,90	0,121
Albumina (g/dl)	31,40 ± 8,19	32	40,57 ± 7,66	42	39,00 ± 5,91	40,5	<0,001 **
Fibrynogen (g/l)	5,51 ± 1,79	5,40	3,82 ± 1,20	3,51	3,94 ± 1,39	3,85	<0,001 **
Kreatynina (mg/dl)	1,09 ± 0,29	1,05	1,09 ± 0,28	1,00	1,06 ± 0,36	0,92	0,376
eGFR (MDRD) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	81,4 ±28,65	76	80,95 ±23,56	84	85,56 ± 28,45	91	0,230
eGFR (CKD-EPI) ml/min/1,73m <sup>3</sup>	84 ± 27,55	81	84,84 ± 24,76	92	88,11 ± 28	96	0,102
Cholesterol całkowity (mg/dl)	324,15 ± 134,25	292	216,21 ± 58,80	203	209,94 ± 68,96	192	<0,001 **
Trójglicerydy (mg/dl)	278,50 ± 298,32	179	138,95 ± 38,47	141	134,33 ± 55,23	123,5	0,001*
Cholesterol HDL (mg/dl)	56,75 ± 18,40	58	65,31 ± 26,93	55	56,94 ± 25,65	48	0,053* *
Dobowa utrata białka (g/dobę)	6,3 ± 4,87	6,05	2,19 ± 4,26	0,60	2,04 ± 2,44	0,65	<0,001 *
ADMA (umol/l)	0,78 ± 0,30	0,86	0,59 ± 0,21	0,49	0,38 ± 0,15	0,35	<0,001 *

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

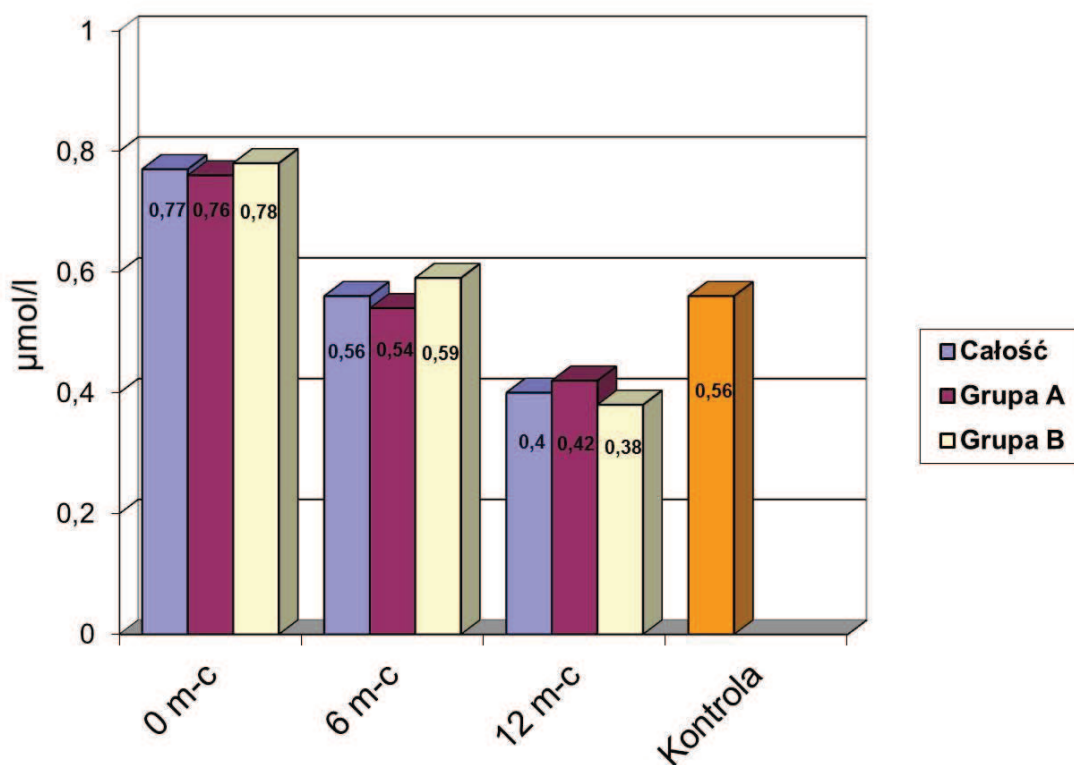
\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

W grupie B stwierdzono w okresie obserwacji zmniejszenie statystycznie stężenia fibrynogenu w osoczu, stężenia cholesterolu całkowitego, trójglicerydów w surowicy i dobowej utraty białka z moczem. Natomiast obserwowano istotne statystycznie zwiększenie stężenia albuminy w surowicy. Zmiany wymienionych parametrów należy wiązać z intensywnym, skutecznym leczeniem (blokada układu renina angiotensyna aldosteron oraz immunosupresja) chorych z aktywnym kłębuszkowym zapaleniem nerek przebiegającego u większości chorych z zespołem nerczycowym. Nie obserwowano zmiany w stężeniu CRP, ani w funkcji nerek.

## 10.4 Stężenie ADMA w osoczu badanej populacji (n=37)

Stężenie ADMA w osoczu badanej populacji, wraz z podziałem na grupy ( A i B) przedstawiono w tabeli 8, 9 i 10, a ponadto stężenie ADMA w osoczu chorych oraz w grupie kontrolnej przedstawia rycina 13.

**Rycina 13. Stężenie ADMA w osoczu w okresie obserwacji badanej populacji i grupy kontrolnej**



W całym okresie obserwacji zarówno w badanej populacji, jak i osobno w grupie A i B obserwowano statystycznie znaczne obniżenie stężenia ADMA w osoczu. Do obliczeń podobnie, jak dla innych powtarzanych parametrów, użyto metody analizy wariancji ANOVA.

Stężenie ADMA w poszczególnych punktach obserwacji nie różniły się statystycznie pomiędzy grupą A i B. Dane te przedstawiono w tabeli 11. Analizę przeprowadzono za pomocą testu t-studenta.

**Tabela 11. Ocena zmienności stężenia ADMA w okresie obserwacji pomiędzy grupami A i B**

Wizyta	A vs B
1	p=0,866
2	p=0,524
3	p=0,451

**Tabela 12. Różnice statystyczne w stężeniu ADMA pomiędzy poszczególnymi wizytami w populacji badanej oraz w grupach A i B**

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
Grupa badana	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Grupa A	p<0,001	p<0,001	p=0,052
Grupa B	p<0,001	p<0,001	p=0,003

W trakcie obserwacji zarówno w całej badanej populacji chorych, jak i w grupach A i B zaobserwowano spadek stężenia ADMA w osoczu pacjentów. Stężenie ADMA u pacjentów po pierwszych sześciu miesiącach leczenia było porównywalne ze stężeniem w grupie kontrolnej, a po kolejnych sześciu miesiącach farmakoterapii (łącznie 12 miesięcy) stężenia ADMA w osoczu było istotnie niższe, aniżeli w grupie kontrolnej. (Tabela 13)

**Tabela 13. Analiza stężeń ADMA w osoczu w badanej populacji i grupie kontrolnej w trakcie poszczególnych wizyt**

	1 vs K	2 vs K	3 vs K
Badana populacja	p<0,05	p=0,932	p<0,05
Grupa A	p<0,05	p=0,651	p<0,05
Grupa B	p<0,05	p=0,605	p<0,05

1- pierwsza wizyta (początek badania)

2- druga wizyta (po 6 miesiącach)

3- trzecia wizyta (po 12 miesiącach)

K- grupa kontrolna

## 10.5 Dane echokardiograficzne badanej grupy chorych.

Dane uzyskane w badaniu echokardiograficznym podczas całej obserwacji przedstawiono w tabeli 14 dla badanej populacji, a w tabeli 15 i 16, odpowiednio dla grup A i B.

**Tabela 14. Dane echokardiograficzne badanej populacji**

Badany parametr	Średnia ±SD 1wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	p
IVSD (mm)	10,54 ± 1,44	10,50	10,5 ± 1,36	10,40	10,76 ± 1,57	10,55	do 11mm	0,173
PWD (mm)	10,30 ± 1,11	10,40	10,15 ± 1,32	10,30	10,17 ± 1,35	10,10	do 11mm	0,213
LVDD (mm)	45,00 ± 4,39	44,50	46,36 ± 4,33	47,10	47,07 ± 4,44	46,75	do 56mm	0,078*
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	91,58 ± 22,31	89,0	90,84 ± 22	87,5	91,11 ± 22,03	87,5	M49-115 K43-95	0,200
RWT	0,45 ± 0,06	0,44	0,44 ±0,06	0,44	0,44 ± 0,06	0,44	<0,45	<b>0,008*</b>
EF %	64,88 ± 8,40	64,10	62,49 ± 9,66	63,78	61,85 ± 10,01	62,54	≥60%	0,171
E/A	1,20 ± 0,34	1,20	1,25 ± 0,39	1,21	1,34 ± 0,36	1,31	>0,8	<b>0,007*</b>
E/è	3,51 ± 0,74	3,60	3,83 ± 0,95	3,60	3,93 ± 0,66	4,00	<8	<b>0,004*</b>
IVRT (ms)	97,82 ± 23,45	96,00	97,50 ± 25,50	92,00	98,66 ± 27,69	96,00	<100ms	0,940
decTime (ms)	197,55 ± 47,38	184,00	194,42 ± 54,83	184,00	199,76 ± 50,03	184,00	160- 200ms	0,659
LA (mm)	35,14 ± 4,11	34,40	36,69 ± 4,02	37,40	37,07 ± 3,51	36,60	do 40mm	<b>0,007*</b>

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

W czasie 12 miesięcznej obserwacji stwierdzono zmiany geometrii lewej komory istotne statystycznie jedynie w zakresie parametrów LVEDD i RWT.

Funkcja skurczowa lewej komory (EF) nie zmieniała się istotnie w badanej populacji.

Dodatkowo funkcja rozkurczowa lewej komory ulegała znaczącej zmianie w zakresie



parametrów: E/A, E/è, LA. Parametry te pozostawały w zakresie wartości referencyjnych w trakcie badania.

Należy zauważyć, że u wszystkich pacjentów w wykonanych badaniach echokardiograficznych w trakcie obserwacji wartości prędkości wczesnorozkurczowej pierścienia mitralnego po stronie bocznej (septal e') i przegrodowej (lateral e') wynosiły odpowiednio  $\geq 10$  cm/s i  $\geq 8$  cm/s. Spełnienie tych kryteriów pozwala ocenić funkcję rozkurczową jako prawidłową. Szczegółowe dane dotyczące geometrii lewej komory zostaną przedstawione w rozdziale „Przebudowa lewej komory badanej grupy chorych”.

**Tabela 15. Dane echokardiograficzne grupy A**

Badany parametr	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	P
IVSD (mm)	10,43 ± 1,16	10,50	10,33 ± 1,09	10,45	10,64 ± 1,43	10,70	do 11mm	0,376
PWD (mm)	10,18 ± 1,27	10,40	10,13 ± 1,41	10,35	9,88 ± 1,27	10,15	do 11mm	0,409
LVDD (mm)	44,49 ± 5,12	45,50	44,38 ± 5,17	43,25	45,62 ± 4,22	45,85	do 56mm	0,257
LVMi (g/m <sup>2</sup> )	85,59 ± 21,08	91,0	80,64 ± 16,76	84,5	83,13 ± 18,65	86,0	M49- 115 K43-95	0,435
RWT	0,47 ± 0,08	0,46	0,45 ± 0,08	0,44	0,44 ± 0,06	0,45	<0,45	0,131
EF %	64,39 ± 8,99	65,18	57,60 ± 10,22	57,52	63,69 ± 8,20	63,40	≥60%	0,081*
E/A	1,18 ± 0,36	1,17	1,25 ± 0,43	1,19	1,34 ± 0,37	1,36	>0,8	<b>0,012*</b>
E/è	3,46 ± 0,63	3,55	3,83 ± 0,90	3,60	3,87 ± 0,66	4,00	<8	<b>0,023*</b>
IVRT (ms)	102,00 ± 14,16	104	94,77 ± 25,47	88	94,40 ± 24,60	88	<100ms	0,283
decTime (ms)	200,47 ± 50,71	216	194,28 ± 32,67	184	186,5 ± 49,64	172	160- 200ms	0,327
LA (mm)	35,58 ± 3,46	35,55	35,51 ± 4,01	35,75	36,56 ± 3,36	36,60	do 40mm	0,124

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

W grupie A nie stwierdzono, istotnej zmienności w zakresie geometrii lewej komory. Funkcja skurczowa określona za pomocą frakcji wyrzutowej (EF) nie zmieniała się w badanej grupie. Dodatkowo oceniona w badaniu funkcja rozkurczowa lewej komory za pomocą następujących parametrów E/A, E/è, LA, IVRT, decTime. W opisywanych

wynikach stwierdzono jedynie znaczącą statystycznie zmianę parametru E/A i E/è. Parametry te pozostawały w granicach wartości referencyjnych.

**Tabela 16. Dane echokardiograficzne grupy B**

Badany parametr	Średnia ±SD 1 wizyta	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD 2 wizyta	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD 3 wizyta	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	p
IVSD (mm)	10,64 ± 1,67	10,50	10,67 ± 1,54	10,40	10,87 ± 1,71	10,50	do 11mm	0,327
PWD (mm)	10,41 ± 0,96	10,20	10,16 ± 1,29	10,20	10,42 ± 1,41	10,00	do 11mm	<b>0,028**</b>
LVDD (mm)	45,47 ± 3,71	44,40	47,81 ± 2,95	47,50	48,36 ± 4,35	48,75	do 56mm	0,157
LVMi (g/m <sup>2</sup> )	89,53 ± 23,23	82,0	92,37 ± 19,50	90	98,56 ± 24,94	89	M49- 115 K43-95	<b>0,081*</b>
RWT	0,46 ± 0,05	0,46	0,42 ± 0,05	0,42	0,43 ± 0,06	0,42	<0,42	<b>0,003*</b>
EF %	65,31 ± 8,06	63,80	66,08 ± 7,63	66,55	60,22 ± 11,37	62,30	≥60%	0,094
E/A	1,22 ± 0,34	1,23	1,25 ± 0,37	1,21	1,33 ± 0,36	1,21	>0,8	0,109
E/è	3,56 ± 0,84	3,70	3,83 ± 1,01	3,60	3,95 ± 0,68	4,10	<8	<b>0,060*</b>
IVRT (ms)	94,31 ± 29,04	80,00	99,37 ± 26,03	80,00	102,22 ± 30,25	96,00	<100ms	0,393
decTime (ms)	194,95 ± 45,43	184,00	194,53 ± 67,62	184,00	211,55 ± 48,72	216,00	160- 200ms	0,239
LA (mm)	34,81 ± 4,60	34,00	37,57 ± 3,89	37,80	37,56 ± 3,68	36,60	do 40mm	<b>0,017*</b>

\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność liniową

\*\* metoda analizy wariancji ANOVA - model zakładający zmienność o charakterze funkcji kwadratowej

W grupie B stwierdzono, istotną zmienność geometrii lewej komory w zakresie parametrów PWT, LVMi i RWT.

Funkcja skurczowa określona przy pomocy frakcji wyrzutowej (EF) nie zmieniała się w trakcie badania. Funkcja rozkurczowa lewej komory oceniona została za pomocą następujących parametrów E/A, E/è, LA, IVRT, decTime. W opisywanych wynikach stwierdzono jedynie znaczącą zmianę parametru E/è i LA.

Parametry te pozostawały w zakresie wartości referencyjnych w trakcie badania.

Podsumowując należy zauważyć, że w grupie B stwierdzono istotną statystycznie zmienność geometrii lewej komory w porównaniu z grupą A. Funkcja skurczowa nie zmieniała się w obu grupach w trakcie badania. Ponadto funkcja rozkurczowa ulegała znaczącym zmianom zarówno w grupie A i B w czasie obserwacji.

## 10.6 Grubość kompleksu śród błonek - błona środkowa (IMT) i prędkość fali tętna (PWV) w badanej grupie chorych.

Ocena grubości kompleksu śród błonek - błona środkowa (IMT-intima media thickness) i prędkości fali tętna (PWV – pulse wave velocity), umieszczono w tabeli 17, 18 i 19.

**Tabela 17. Grubość kompleksu śród błonek - błona środkowa i prędkości fali tętna w badanej populacji**

Badany parametr	Średnia ±SD	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	p
	1 wizyta	2 wizyta	3 wizyta					
IMT (mm)	0,60 ± 0,15	0,56	0,59 ± 0,09	0,56	0,57 ± 0,11	0,54	<0,9mm	0,139
PWV (m/s)	8,88 ± 1,63	8,66	9,24 ± 1,28	9,00	8,53 ± 1,18	8,13	<10m/s	0,607

W badanej populacji wszystkie pomiary IMT były w zakresie normy. W przypadku PWV wartości powyżej normy podczas kolejnych wizyt występowały odpowiednio u 20%, 21% i 12% chorych. W okresie badania w całej grupie nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian żadnego parametru. Analizę zmienności parametrów oceniono za pomocą analizy wariancji.

**Tabela 18. Grubość kompleksu śród błonek - błona środkowa i prędkości fali tętna w grupie A.**

Badany parametr	Średnia ±SD	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	p
	1 wizyta	2 wizyta	3 wizyta					
IMT (mm)	0,57 ± 0,13	0,55	0,60 ± 0,10	0,56	0,57 ± 0,13	0,54	<0,9mm	0,884
PWV (m/s)	8,79 ± 1,78	8,69	8,93 ± 1,11	9,00	8,41 ± 1,28	7,91	<10m/s	0,663

W grupie A wszystkie pomiary IMT były w zakresie normy. W przypadku PWV wartości powyżej normy podczas kolejnych wizyt występowały odpowiednio u 20%, 18% i 8% chorych. W okresie obserwacji w grupie A nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie żadnego parametru. Analizę zmienności parametrów oceniono za pomocą analizy wariancji.

**Tabela 19. Grubość kompleksu śródblonek - błona środkowa i prędkości fali tętna w grupie B**

Badany parametr	Średnia ±SD	Mediana 1 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 2 wizyta	Średnia ±SD	Mediana 3 wizyta	Zakres normy	p
	1 wizyta	2 wizyta	3 wizyta					
IMT (mm)	0,63 ± 0,17	0,58	0,58 ± 0,08	0,56	0,57 ± 0,10	0,55	<0,9mm	0,069
PWV (m/s)	8,94 ± 1,55	8,64	9,46 ± 1,38	9,16	8,57 ± 1,12	8,54	<10m/s	0,834

W grupie B wszystkie pomiary IMT były w zakresie normy. W przypadku PWV wartości powyżej normy podczas kolejnych wizyt występowały odpowiednio u 21%, 25% i 20% chorych. W okresie obserwacji w grupie B nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie żadnego parametru. Analizę zmienności parametrów oceniono za pomocą analizy wariancji.

### 10.7 Przebudowa lewej komory badanej grupy chorych.

Ocenę geometrii i funkcji lewej komory serca na podstawie badania echokardiograficznego przedstawiono w tabeli 20 dla wszystkich pacjentów oraz odpowiednio w tabeli 21 i 22 dla grupy A i B.

**Tabela 20. Geometria i funkcja lewej komory serca ocenione na podstawie badania echokardiograficznego w badanej populacji**

	%chorych 1 wizyta	%chorych 2 wizyta	% chorych 3 wizyta
Prawidłowa geometria lewej komory serca	17	45,5	35
Remodeling koncentryczny	72	48,5	53
Przerost koncentryczny	8,3	3	3
Przerost ekscentryczny	2,7	3	9
Upośledzenie funkcji skurczowej EF < 45 %	2,7	2,9	5,9
Upośledzenie funkcji rozkurczowej E/A < 0,8	16,2	17,7	5,9

Po przeanalizowaniu danych z wykonanych badań echokardiograficznych w grupie badanej w trakcie obserwacji (dane w tabeli 14) oceniono dokładną geometrię lewej komory (tabela 20).

Podczas pierwszej wizyty w badanej populacji głównie występował remodeling koncentryczny (u 72% osób), a prawidłową geometrię lewej komory stwierdzono u 17% pacjentów. Podczas kolejnych badań (2 i 3 wizyta) wśród badanych osób także dominował remodeling koncentryczny i występował on odpowiednio u 48,5% i 53% osób.

Natomiast prawidłową geometrię lewej komory obserwowano podczas kolejnych wizyt odpowiednio u 45,5% i 35% chorych.

Odsetek ten był zdecydowanie większy, aniżeli podczas pierwszej wizyty.

Upośledzenie funkcji skurczowej lewej komory ( $EF < 45\%$ ) w całej grupie obserwowano u 2,7% osób podczas pierwszej wizyty. Natomiast podczas kolejnych wizyt  $EF < 45\%$  stwierdzono odpowiednio u 2,9% i 5,9% badanych.

Parametr funkcji rozkurczowej E/A był nieprawidłowy u 16,2% podczas pierwszej wizyty.

W kolejnych badaniach częstość upośledzenia funkcji rozkurczowej wystąpiła odpowiednio u 17,7% i 5,9% pacjentów. Ocena funkcji rozkurczowej przy użyciu parametrów ( $E/e'$ , septal i lateral  $e'$  została dokonana w rozdziale 7.5 dotyczącym analizy parametrów echokardiograficznych badanych osób.

**Tabela 21. Zaburzenia geometrii i funkcji lewej komory serca w badaniu echokardiograficznym (grupa A)**

	%chorych 1 wizyta	%chorych 2 wizyta	% chorych 3 wizyta
Prawidłowa geometria lewej komory serca	29	43	31
Remodeling koncentryczny	65	57	62,5
Przerost koncentryczny	6	0	0
Przerost ekscentryczny	0	0	6,5
Upośledzenie funkcji skurczowej $EF < 45\%$	5,9	6,7	0
Upośledzenie funkcji rozkurczowej $E/A < 0,8$	23,6	21,5	12,5

Po przeanalizowaniu danych z wykonanych badań echokardiograficznych w grupie badanej w trakcie obserwacji (dane w tabeli 15) oceniono dokładną geometrię lewej komory (tabela 21).

Podczas pierwszej wizyty w grupie A głównie występował remodeling koncentryczny (u 65% osób), a prawidłową geometrię lewej komory stwierdzono u 29% pacjentów. Podczas kolejnych badań (2 i 3 wizyta) wśród badanych osób także dominował remodelig koncentryczny i występował on odpowiednio u 57% i 62,5% osób.

Natomiast prawidłową geometrię lewej komory obserwowano podczas kolejnych wizyt odpowiednio u 43% i 31% chorych.

Upośledzenie funkcji skurczowej lewej komory ( $EF < 45\%$ ) w całej grupie obserwowano u 5,9% osób podczas pierwszej wizyty. Natomiast podczas kolejnych wizyt  $EF < 45\%$  stwierdzono odpowiednio u 6,7% i 0% badanych.

Parametr funkcji rozkurczowej E/A był nieprawidłowy u 23,6% podczas pierwszej wizyty.

W kolejnych badaniach częstość upośledzenia funkcji rozkurczowej wystąpiła odpowiednio u 21,5% i 12,5% pacjentów.

**Tabela 22. Zaburzenia geometrii i funkcji lewej komory serca w badaniu echokardiograficznym (grupa B)**

	<b>%chorych 1 wizyta</b>	<b>%chorych 2 wizyta</b>	<b>% chorych 3 wizyta</b>
Prawidłowa geometria lewej komory serca	5	48	39
Remodeling koncentryczny	80	42	44,5
Przerost koncentryczny	10	5	5,5
Przerost ekscentryczny	5	5	11
Upośledzenie funkcji skurczowej $EF < 45\%$	0	0	11,1
Upośledzenie funkcji rozkurczowej $E/A < 0,8$	10,5	10,5	0

Po przeanalizowaniu danych z wykonanych badań echokardiograficznych w grupie B w trakcie obserwacji (dane w tabeli 16) oceniono dokładną geometrię lewej komory (tabela 22).

Podczas pierwszej wizyty w grupie B głównie występował remodeling koncentryczny (u 80% osób), a prawidłową geometrię lewej komory stwierdzono u 5% pacjentów.

Podczas kolejnych badań (2 i 3 wizyta) wśród badanych osób także dominował remodelig koncentryczny i występował on odpowiednio u 42% i 44,5% osób.

Natomiast prawidłową geometrię lewej komory obserwowano podczas kolejnych wizyt odpowiednio u 48% i 39% chorych. Odsetek ten był zdecydowanie większy, aniżeli podczas pierwszej wizyty.

Upośledzenie funkcji skurczowej lewej komory ( $EF < 45\%$ ) w grupie B obserwowano jedynie u 11,1% osób podczas trzeciej wizyty.

Parametr funkcji rozkurczowej E/A był nieprawidłowy u 10,5% podczas pierwszej wizyty.

W kolejnych badaniach częstość upośledzenia funkcji rozkurczowej wystąpiła odpowiednio u 10,5% i 0% pacjentów.

Zaburzenia geometrii lewej komory pod postacią remodelingu koncentrycznego częściej występował w grupie B, aniżeli w grupie A podczas pierwszej wizyty. Natomiast w obu grupach zaobserwowano podczas 2 i 3 wizyty większą częstość występowania prawidłowej geometrii lewej komory.

### **10.8 Zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wiekiem, płcią, nadciśnieniem tętniczym, parametrami biochemicznymi, naczyniowymi i echokardiograficznymi w badanej grupie.**

Zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wiekiem, płcią, nadciśnieniem tętniczym, parametrami biochemicznymi, naczyniowymi i echokardiograficznymi badano przy użyciu testu Spearmana. Analizę tą przeprowadzono dla całej grupy, bez rozdzielania na grupę A i B ze względu na podobne stężenia ADMA w osoczu w obu grupach. Szczegółowe dane zostały zawarte w tabeli 23 oraz w tabeli 24.

W badanej grupie stwierdzono dodatnią istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a stężeniem fibrynogenu w osoczu, CRP i cholesterolu całkowitego w surowicy oraz dobową utratą białka z moczem. Nie wykazano natomiast znamiennej korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wiekiem, płcią, nadciśnieniem tętniczym, skurczowym i rozkurczowym ciśnieniem tętniczym, ciśnieniem tętna oraz stężeniem albuminy, kreatyniny, trójglicerydów i cholesterolu HDL w surowicy.

**Tabela 23. Ocena związku pomiędzy stężeniem ADMA, a danymi klinicznymi i laboratoryjnymi dla badanej populacji**

<b>Badany parametr</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
wiek	-0,119	0,483
pleć	0,980	0,327
nadciśnienie tętnicze	-0,323	0,816
SBP	-0,016	0,895
DBP	0,027	0,824
PP	0,035	0,774
CRP	0,266	<b>0,006</b>
albumina	-0,002	0,981
fibrinogen	0,402	<b>0,000</b>
eGFR (MDRD)	-0,210	0,123
eGFR (CKD-EPI)	-0,186	0,173
kreatynina	0,170	0,075
cholesterol całkowity	0,341	<b>0,000</b>
trójglicerydy	0,134	0,177
HDL	0,037	0,708
dobowa utrata białka	0,245	<b>0,012</b>

**Tabela 24. Ocena związku pomiędzy stężeniem ADMA, a danymi echokardiograficznymi i naczyniowymi dla badanej populacji**

<b>Badany parametr</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
IVSD	-0,023	ns
PWD	0,107	ns
LVMI	0,018	ns
RWT	0,002	ns
EF	0,111	ns
E/A	-0,032	ns
E/E'	-0,148	ns
IVRT	-0,044	ns
decTime	-0,007	ns
LA	-0,141	ns
PWV	-0,092	ns
IMT	-0,047	ns

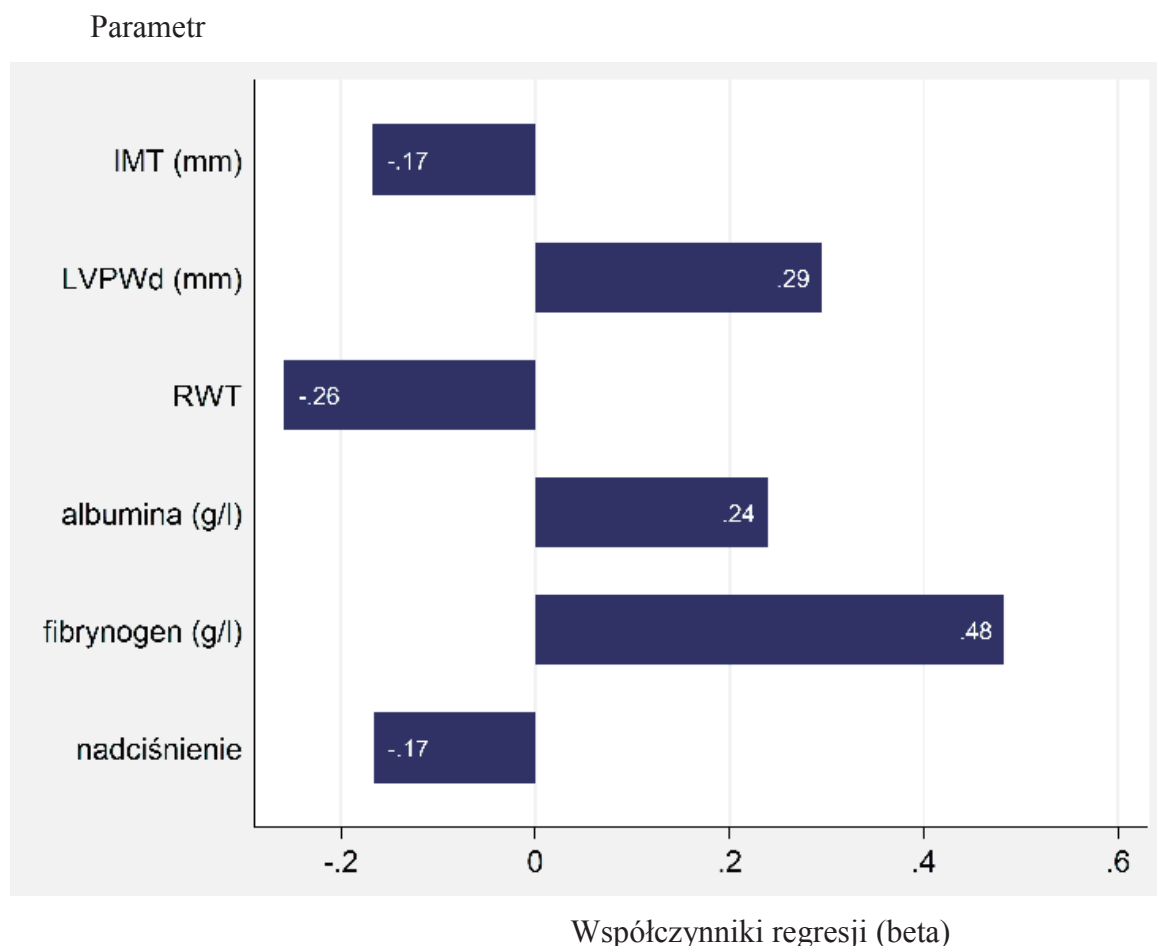


W badanej grupie nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wybranymi parametrami echokardiograficznymi określającymi geometrię lewej komory, funkcję skurczową lub rozkurczową oraz parametrami naczyniowymi.

## 10.9 Analiza wieloczynnikowa

Przy pomocy analizy wieloczynnikowej oceniono związek pomiędzy stężeniem ADMA, a danymi klinicznymi, laboratoryjnymi i echokardiograficznymi (rycina 14).

**Rycina 14. Zmienne w największym stopniu wpływające na stężenie ADMA w osoczu – wyniki analizy wieloczynnikowej. Rycina przedstawia standaryzowane współczynniki regresji (beta)**



Na podstawie analizy wieloczynnikowej stwierdzono istotne statystycznie zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a stężeniem fibrynogenem w osoczu (korelacja dodatnia), PWD (korelacja dodatnia), RWT (korelacja ujemna) oraz stężeniem albuminy w surowicy (korelacja dodatnia). Natomiast związek pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu a, nadciśnieniem tętniczym (korelacja ujemna) oraz IMT (korelacja ujemna) był na granicy istotności statystycznej. Na podstawie przedstawionej analizy, można przypuszczać, że stężenie ADMA w osoczu wpływa na geometrie lewej komory.

## 11 Dyskusja

Ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z PChN jest większe, aniżeli w populacji ogólnej i rośnie już w grupie chorych z wczesnymi stadiami PChN [70]. W literaturze znajdujemy dane mówiące, że niewielkie upośledzenie funkcji nerek i/lub obecność albuminurii jest związana ze wzrostem chorobowości i śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych [71,72]. Znalezione kilka potencjalnych czynników mogących tłumaczyć to zjawisko. Zaliczamy do nich między innymi: dysfunkcję śródbłonna, kalcyfikację naczyń, stres oksydacyjny i stan zapalny [73,74,75]. Dysfunkcja śródbłonna jest obecnie uważana za podstawowy proces odpowiedzialny za rozwój miażdżycy [76]. Natomiast albuminuria jest jednocześnie markerem uszkodzenia nerek i naczyń [77,78]. Paisley i wsp. wykazali, że dysfunkcja śródbłonna jest obecna u pacjentów z bezobjawowym białkomoczem i przypisuje się jej wpływ na proces powstawania tlenku azotu w śródbłonku naczyń [79]. Z drugiej strony, w tej grupie chorych z białkomoczem, zwłaszcza nerczycowym, współistnieją zaburzenia lipidowe (np. hipercholesterolemia), które mogą nasilać dysfunkcję śródbłonna.

### 11.1 Stężenie ADMA we wczesnych stadiach PChN przebiegającej z białkomoczem

ADMA jest endogennym inhibitorem syntazy tlenku azotu i jej wzrost we krwi wiąże się z dysfunkcją śródbłonna [80]. Wzrost ADMA obserwujemy w wielu schorzeniach takich jak: cukrzyca, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, niewydolność serca i niewydolność nerek. W chorobie nerek, wzrost ADMA nie tylko wynika z upośledzonej filtracji kłębuszkowej. Do jej wzrostu dochodzi przede wszystkim z powodu zmniejszonej aktywności enzymu DDAH, zwiększonej aktywności PRMT, a także u chorych z nasilonym białkomoczem, wzrost ADMA związany jest z dużym obrotem białkowym [81].

Na stężenie ADMA wpływa także wiele innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, np. hipercholesterolemia czy hiperglikemia, o czym wspomniano we wstępie rozprawy. Danych z piśmiennictwa dotyczących związku ADMA z białkomoczem i wpływu na ryzyko sercowo-naczyniowe jest niewiele. Podwyższony poziom ADMA wydaje się być „łącznikiem” pomiędzy białkomoczem, dysfunkcją śródbłonna i powikłaniami miażdżycy.

W analizowanej przez mnie pracy grupę badaną stanowili pacjenci z wczesnym stadium PChN z białkomoczem (średni białkomocz wynosił 4,13g/dobę).

W całej badanej populacji pacjentów na początku badania stwierdzono podwyższone stężenie ADMA w osoczu (średnie stężenie 0,77 $\mu$ mol/l) w porównaniu z grupą kontrolną (0,56 $\mu$ mol/l). Wykazany został także związek pomiędzy stężeniem ADMA, a białkomoczem ( $r=0,245$ ,  $p<0,05$ ).

Istotna dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem ADMA, a białkomoczem została zauważona przez Flisera i wsp. u pacjentów z PChN z niewielkim upośledzeniem filtracji kłębuszkowej i białkomoczem rzędu 1g/dobę [82]. Natomiast Caglar i wsp. stwierdzili w swojej pracy także istotny związek pomiędzy stężeniem ADMA, a białkomoczem u pacjentów z białkomoczem niecukrzycowym i prawidłową funkcją nerek [83].

Na podstawie tych danych można wysnuć wniosek, że białkomocz jest niezależnym czynnikiem wpływającym na stężenie ADMA u chorych z PChN we wczesnych stadiach i nie wiąże się to z upośledzeniem funkcji filtracyjnej nerek. Wyniki przedstawianej pracy są zgodne z danymi z piśmiennictwa wykazującymi na związek pomiędzy stężeniem ADMA, a białkomoczem we wczesnych stadiach PChN.

Utrzymujący się białkomocz związany jest ze stanem zwiększonego obrotu białkowego u danego chorego. W takiej sytuacji białka ulegają proteolizie, co wiąże się z większym uwalnianiem metyloarginin (ADMA, SDMA) [89]. Należy w tym miejscu, podkreślić, że nerki są podstawowym narządem, w którym ADMA w stanie niezmienionym jest wydalana z organizmu, lecz droga ta stanowi jedynie 20% całej puli usuwanego ADMA [28]. Zasadnicze usuwanie zachodzi w wyniku metabolizmu, który odbywa się przy udziale enzymu DDAH. Ekspresja tego enzymu zachodzi w śródbłonku naczyń oraz w komórkach cewek nerkowych [85]. Nadmierny ładunek białka dostarczany do cewek nerkowych powoduje ich uszkodzenie, co może wpływać na zmniejszenie aktywności enzymu DDAH rozkładającego metyloargininę. Skutkuje to zwiększeniem stężenia ADMA w tkankach i we krwi. Kielstein i wsp. wykazali, że podwyższenie stężenia ADMA wiąże się z pogorszeniem perfuzji nerek [86]. Dlatego w tej sytuacji obserwujemy ciąg zdarzeń prowadzących do wzrostu ADMA i dalszego uszkodzenia nerek. Białkomocz uszkadza nerki, powodując wzrost ADMA, a następnie wobec tego dochodzi do zaburzenia perfuzji nerek, prowadzącego do dalszego uszkodzenia nerek i wzrostu ADMA, a także wzrostu ciśnienia tętniczego.

Leki rutynowo stosowane u chorych z białkomoczem wykazują jednocześnie działanie nefroprotecyjne zmniejszając białkomocz, obniżając ciśnienie tętnicze i redukując stężenie ADMA.

W przedstawionej pracy zastosowane leczenie (blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron) po pierwszych 6 miesiącach wiązało się z obniżeniem stężenia ADMA do poziomu ADMA porównywalnego ze stężeniem w grupie kontrolnej, a po kolejnych 6 miesiącach obserwowano dalsze obniżenie ADMA u badanych chorych (rycina 12).

Reasumując, w przedstawianej grupie chorych z białkomoczem niecukrzycowym wykazano związek pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a białkomoczem dobowym. Ponadto zarówno nadciśnienie tętnicze i białkomocz są uważane za niezależne czynniki progresji PChN, natomiast ADMA odgrywa także znaczącą rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego [82]. Dane te pozwalają stwierdzić, że ADMA może wpływać na progresję PChN poprzez mechanizmy zależne od nadciśnienia tętniczego i białkomoczu.

W przedstawianej dysertacji zależność pomiędzy ADMA, a stężeniem kreatyniny w surowicy była na granicy istotności statystycznej. Zaznaczyć jednak należy, że przez cały okres obserwacji poziom kreatyniny pozostawał w normie. Filtracja kłębuszkowa (eGFR) obliczona z zastosowaniem wzoru MDRD, nie zmieniała się istotnie w trakcie badania, natomiast określana przy użyciu równania CKD-EPI zmienność była na granicy istotności statystycznej. Nie wykazałem znaczących korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a poziomem kreatyniny w surowicy czy eGFR.

Doniesienia te zostały potwierdzone w dwóch badaniach epidemiologicznych, w których wykazano, że wysokie stężenie ADMA sprzyjało szybkiej progresji PChN [82,87].

Pierwszym badaniem wskazującym na związek ADMA z progresją PChN jest praca Fliser'a i wsp., w której poddano obserwacji chorych z PChN we wczesnych stadiach, spowodowaną w większości kłębuszkowym zapaleniem nerek przebiegającym z białkomoczem [82].

W badaniu tym zaobserwowano istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem ADMA, a białkomoczem, stężeniem kreatyniny, PTH i kwasu moczowego w surowicy.

Punktem końcowym badania był czas w jakim dojdzie do podwojenia kreatyniny i/lub konieczności rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego w badanej grupie chorych. Ostatecznie wykazano, iż w przypadku gdy stężenie ADMA wynosiło  $<0,44 \mu\text{mol/l}$  to czas do osiągnięcia założonego punktu końcowego wynosił 71,6 miesięcy. W

przypadku gdy stężenie ADMA wynosiło  $\geq 0,44\mu\text{mol/l}$  to progresja choroby postępowała znacznie szybciej, bo w ciągu 52,8 miesiąca. Na podstawie tych danych, należy zauważyć, że stężenie ADMA jest predyktorem szybkości progresji PChN. Natomiast leczenie powodujące zmniejszenie stężenia ADMA u chorych z PChN pozwoli na spowolnienie progresji choroby nerek.

Ravani i wsp. wykazali, że stężenie ADMA wpływa na progresję PChN i śmiertelność w badanej grupie [87]. W pracy analizowano chorych z PChN (średni eGFR wynosił 31ml/min, średni stężenie kreatyniny 2,4 mg/dl, białkomocz 0,2 g/l, stężenie ADMA we krwi oznaczane metodą ELISA wynosiło 0,78  $\mu\text{mol/l}$ ). Wykazano istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem ADMA, a eGFR. Założonym punktem końcowym pracy było zmniejszenie o połowę eGFR lub/i konieczność rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego. Obserwację prowadzono przez 27 miesięcy. U 22,1% pacjentów doszło do założonej progresji PChN. 23,6% chorych zmarło, głównie z przyczyn sercowo-naczyniowych nie osiągając znacznej progresji PChN. Dodatkowo w analizie statystycznej udowodniono, iż u pacjentów ze stężeniem ADMA poniżej 0,76 $\mu\text{mol/l}$  rzadziej dochodziło do progresji choroby nerek do stadium schyłkowej niewydolności.

W przedstawianej dysertacji nie wykazano bezpośredniego związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a progresją PChN. Z pewnością był to zbyt krótki czas obserwacji, aby dokonała się znaczna progresja PChN. Warto, jednak zauważyć, że byli to głównie chorzy z wczesnym stadium PChN przebiegającej z białkomoczem, u których stężenie ADMA przed rozpoczęciem badania wynosiło 0,77  $\mu\text{mol/l}$ . W trakcie rocznej obserwacji po zastosowanym leczeniu (blokada układu RAA) stężenie ADMA w osoczu obniżyło się do 0,4 $\mu\text{mol/l}$ . Stężenie to było niższe niż w grupie kontrolnej (0,56  $\mu\text{mol/l}$ ). Aby wykazać związek pomiędzy ADMA, a progresją PChN i zastosowanym leczeniem w przedstawianej grupie, konieczne wydaje się przeprowadzenie wieloletniej obserwacji tych chorych.

Wyniki prac Flisera i wsp. oraz Ravani i wsp. wskazują wyraźnie na rolę ADMA w progresji PChN. Uważa się, że w ocenie progresji choroby nerek dużą rolę odgrywa uszkodzenie/zanik cewek proksymalnych i włóknienie śródmiąższu, a dopiero w dalszej obserwacji stwardnienie kłębuszków nerkowych. Podkreśla się, że hipoksja może odgrywać istotną rolę w dalszej progresji włóknienia cewkowo-śródmiąższowego i stwardnienia kłębuszków (88,89).

Nerkowa hipoksja jest wywoływana między innymi przez takie czynniki jak: utrata kapilar okołocewkowych, zmniejszony przepływ krwi przez te kapilary, obniżoną

produkcję lub biodostępność tlenku azotu (NO) oraz aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron. Mechanizmy te zostały potwierdzone na modelu zwierzęcym przez Kang i wsp.[90,91]. W modelu tym hamowanie syntazy tlenku azotu wiązało się z większą utratą kapilar okołocewkowych. Proces ten nasilał hipoksję, czego wynikiem było niedokrwienie przestrzeni cewkowo-śródmiaższowej, co powodowało jej włóknienie. Dodatkowo w wyniku opisanych zmian dochodziło do uszkodzenia pozostałego mięszu nerkowego. Z danych z piśmiennictwa wiadomo, że NO jest nie tylko czynnikiem wazodilatacyjnym, ale także mediatorem w procesie angiogenezy [92]. Dlatego też wzrost ADMA, który powoduje zmniejszenie syntezy NO, jest związany z utartą lub zmniejszeniem przepływu krwi w kapilarach okołocewkowych. Przyczynia się to do niedokrwienia cewek i włóknienia śródmiaższu. Doniesienia te zostały potwierdzone przez Matsumoto i wsp., którzy wykazali, że wzrost stężenia ADMA był związany z utratą naczyń okołocewkowych, nasileniem włóknienia śródmiaższu i postępowaniem progresji PChN [93].

Można więc stwierdzić, że badania eksperymentalne i obserwacje kliniczne wskazują na istotny wpływ podwyższonego stężenia ADMA na progresję PChN.

W przedstawianej pracy stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a stężeniem cholesterolu całkowitego (T-Ch) ( $r=0,341$ ,  $p<0,05$ ). Po dokładnej analizie danych, należy zauważyć, iż pacjenci w momencie kwalifikacji do badania mieli podwyższony poziom cholesterolu całkowitego (średni poziom w badanej grupie T-Ch wynosił 285,24mg/dl). Po zastosowanym leczeniu (blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron, statyny, immunosupresja) doszło do znamiennego zmniejszenia stężenia T-Ch (198,5mg/dl) po okresie 12 miesięcznej obserwacji.

Böger i wsp. po raz pierwszy wykazali istotną, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem ADMA, a hiperlipidemią u pacjentów z bezobjawową hipercholesterolemią i bez żadnej innej współchorobowości [94]. W cytowanej pracy badano stężenia ADMA u dorosłych chorych z hiperlipidemią oraz w grupie zdrowych ochotników z prawidłowymi parametrami charakteryzującymi gospodarkę lipidową. Stężenie ADMA w grupie osób z hiperlipidemią było wyższe, aniżeli w grupie kontrolnej (2,17umol/l vs 1,03umol/l  $p<0,05$ ). W badaniu wykazano ponad dwukrotnie wyższe stężenie ADMA u osób z hiperlipidemią, co wskazuje na znaczne upośledzenie syntezy NO w tej grupie osób. Wzrost stężenia ADMA w hiperlipidemii może wynikać z wielu mechanizmów opisanych poniżej.

Metyloargininy powstają w wyniku degradacji metylowanych białek. Reakcja metylacji jest katalizowana przez enzym PRMT. Aktywność tego enzymu wzrasta między innymi pod wpływem oxLDL. Natomiast degradacja i eliminacja metyloarginin odbywa się dwiema drogami. Pierwszą z nich jest degradacja metyloarginin przez enzym DDAH, co prowadzi do redukcji stężenia ADMA o ponad 80%. Natomiast pozostałe 20% wydalane jest w formie niezmienionej przez nerki [28]. W przypadku hipercholesterolemii dochodzi do zmniejszenia aktywności DDAH co prowadzi do zwiększenia stężenia ADMA w surowicy. W cytowanym badaniu funkcja nerek opisywanych chorych była prawidłowa, co pozwala przypuszczać, że wzrost stężenia ADMA był związany z upośledzeniem jej degradacji.

W populacji dziecięcej przedstawionej w pracy Hasanoğlu i wsp., u dzieci z rodziną hipercholesterolemią ( $LDL > 155 \text{ mg/dl}$ ) stwierdzono wyższe stężenie ADMA w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną (2,20 vs 1,72  $\mu\text{mol/l}$ ). Dodatkowo zaobserwowano dodatnią, istotną korelację pomiędzy stężeniem ADMA, a poziomem cholesterolu LDL [95].

Obserwacja ta jest zbieżna z innymi danymi z literatury dotyczącymi zależności pomiędzy stężeniem ADMA, a hiperlipidemią oraz wynikami prezentowanej przeze mnie pracy.

W grupie uczestników mojego projektu poddanych analizie wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniem ADMA, a stężeniem CRP i fibrynogenu w surowicy.

Dane dotyczące zależności pomiędzy stężeniem ADMA, a wskaźnikiem stanu zapalnego (CRP) zostały potwierdzone u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i przewlekłą infekcją cytomegalowirusową [96,97].

W literaturze znajdujemy wiele dowodów wykazujących związek pomiędzy dysfunkcją śródbłonna, a przewlekłym stanem zapalnym [98,99]. Zależność tą potwierdzono między innymi w badaniu prospektywnym w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2, w którym wykazano związek pomiędzy wskaźnikiem stanu zapalnego (CRP), a stężeniem ADMA [100]. Związek ten występuje także w innych chorobach takich jak: nieleczone nadciśnienie tętnicze, nietolerancja glukozy, gorączka śródziemnomorska czy choroby zapalne jelit [101,102,103,104]. W populacji chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, także stwierdzono zależność pomiędzy ADMA i CRP, a ponadto udowodniono, iż parametry te są niezależnymi predyktorami incydentów sercowo-naczyniowych w tej grupie chorych [105,106].

Tripepi i wsp. wykazali w grupie chorych ze schyłkową niewydolnością nerek



obserwowanych przez 13 lat, iż jednoczesny wzrost ADMA i CRP (lub IL-6) powoduje podwyższenie ryzyka śmierci oraz incydentów sercowo-naczyniowych zakończonych lub niezakończonym zgonem [107]. Ryzyko było zdecydowanie wyższe, aniżeli wynikałoby to z synergizmu obu tych czynników. Dane te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których w grupie pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, wykazano wpływ ADMA i CRP na progresję miażdżycy [108].

W badaniach *in vitro* udowodniono, że ADMA indukuje produkcję  $TNF\alpha$  poprzez wzrost stężenia reaktywnych form tlenu oraz aktywację szlaku  $NF\kappa B$  [109]. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że reaktywne formy tlenu, które powodują indukcję stanu zapalnego, hamują także aktywność enzymu DDAH rozkładającego ADMA i ułatwiają kumulację ADMA w tkankach. Z kolei ADMA nasila także adhezję monocytów do komórek śródbłonna [110].

W cytowanej pracy udowodniono wpływ ADMA i stanu zapalnego (charakteryzujący się wzrostem w surowicy CRP lub IL-6), u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, na znaczący wzrost śmiertelności z jakiegokolwiek przyczyny i spowodowanej incydentami sercowo-naczyniowymi, a także na wzrost częstości incydentów sercowo-naczyniowych nie zakończonych zgonem [107]. Wyniki te wskazują, iż stosując leczenie farmakologiczne wpływające na zmniejszenie stanu zapalnego i ADMA, można zmniejszyć ryzyko sercowo-naczyniowe tych chorych. Natomiast w pracy Schepers i wsp. w warunkach hodowli monocytów badano wpływ dimetyloarginin (SDMA i ADMA) na indukcję stanu zapalnego [111]. Potwierdzono znaczny wpływ SDMA na wzrost  $TNF\alpha$  i IL-6 poprzez szlak  $NF\kappa B$ . Nie udowodniono tak silnej korelacji dla ADMA. Dodatkowo wykazano, iż dodanie do hodowli komórkowej N-acetylocysteiny wiązało się z mniejszym nasileniem odpowiedzi zapalnej (mniejsza aktywacja szlaku  $NF\kappa B$ ) [111]. W części klinicznej tego badania oceniono związek pomiędzy ADMA i SDMA, a parametrami stanu zapalnego ( $TNF\alpha$  i IL-6) u chorych z PChN w stadium 2-5D. W grupie tej wraz z gorszą funkcją nerek pacjentów, obserwowano zwiększenie stężenia ADMA i SDMA. Wyniki te wskazywały na związek pomiędzy stanem zapalnym, a stężeniem obu dimetyloarginin. Ponadto w analizie stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem ADMA i SDMA, a stężeniem albuminy w surowicy [111]. Podobny związek wykazano pomiędzy stężeniem SDMA, a wskaźnikiem BMI. Zjawisko to pośrednio może tłumaczyć zależność pomiędzy stanem zapalnym, a niedożywieniem w tej grupie chorych.

Cagler i wsp. wykazali także związek pomiędzy stężeniem ADMA, a poziomem CRP w surowicy pacjentów z prawidłową funkcją nerek i białkomoczem niecukrzycowym. Wskazuje to bezpośrednią zależność pomiędzy stężeniem ADMA i nasileniem procesu zapalnego w tej grupie osób [83].

Istnieją również dane z literatury świadczące o związku pomiędzy stanem zapalnym i stężeniem ADMA u chorych z przewlekłymi chorobami zapalnymi przebiegającymi z prawidłową funkcją nerek i bez współistniejącego białkomoczu. Kwaśny-Krochin i wsp. opisali grupę chorych z aktywnym reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), w której stwierdzono znamienne wyższe stężenie ADMA niż w grupie kontrolnej (0,56 vs 0,46  $\mu\text{mol/l}$ ) [112]. W badaniu tym poziom ADMA korelował pozytywnie ze stężeniem fibrynogenu i CRP w surowicy ( $p < 0,05$ ) oraz aktywnością choroby ocenianą za pomocą skali DAS28. Analiza wieloczynnikowa wykazała także, że stężenie CRP było niezależnym czynnikiem wpływającym na stężenie ADMA u chorych z aktywnym RZS.

Wyniki prezentowanej pracy są zbieżne z danymi Caglara i wsp. oraz Kwaśny-Krochin i wsp., w których stwierdzono zależność pomiędzy stężeniem ADMA, a stężeniem CRP czy fibrynogenu.

## **11.2 Stężenie ADMA a nadciśnienie tętnicze**

Nadciśnienie tętnicze jest najczęściej współistniejącą chorobą w populacji chorych z PChN, a zarazem niezależnym predyktorem śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych. W tej grupie pacjentów nadciśnienie tętnicze ma niekorzystny wpływ na progresję PChN [113]. Obecnie znajdujemy coraz więcej dowodów na to, że tlenek azotu odgrywa rolę w regulacji napięcia naczyń i wartości ciśnienia tętniczego [114,115]. Istnieją dwa mechanizmy poprzez, które endogenne inhibitory syntazy tlenku azotu ADMA bierze udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Po pierwsze ADMA może wywoływać efekt wazokonstrykcyjny poprzez hamowanie syntazy tlenku azotu. Po drugie może hamować wydalanie sodu przez nerki poprzez inhibicję syntezy NO w nerkach [116,117]. W badaniach na zwierzętach zaobserwowano, że zwiększone wydalanie ADMA z moczem u sodo-wrażliwych szczurów wiązało się ze wzrostem ciśnienia tętniczego [118]. Ponadto w badaniach na myszach transgenicznym ze zwiększoną aktywnością enzymu DDAH stwierdzono niższe wartości ciśnienia tętniczego, aniżeli w grupie zwierząt z niemodyfikowaną aktywnością enzymu [119]. U

ludzi udowodniono, że stężenie ADMA w surowicy korelowało ze średnim ciśnieniem tętniczym w grupie zdrowych ochotników [120].

W przedstawionej pracy grupę badaną stanowili chorzy we wczesnym stadium PChN. Ciśnienie tętnicze mierzono za pomocą ABPM przy każdej wizycie. W każdym punkcie obserwacji średnie dobowe ciśnienie tętnicze u wszystkich pacjentów, jak również w poszczególnych grupach A i B, było prawidłowe. W ciągu dnia wartości nie przekraczały 135/85mmHg, a w nocy 120/70mmHg. W trakcie 12 miesięcznej obserwacji w całej grupie chorych zastosowane leczenie dobrze regulowało ciśnienie tętnicze. Natomiast obserwowano znaczące zmniejszenie stężenia ADMA w osoczu pod wpływem zastosowanej terapii. Poziom ADMA w okresie obserwacji nie korelował ani ze średnim dobowym ciśnieniem tętniczym, ani ze skurczowym czy rozkurczowym ciśnieniem tętniczym.

W modelu doświadczalnym PChN wywołaną częściową nefrektomią, stężenie ADMA korelowało istotnie z ciśnieniem tętniczym, dodatkowo w tym modelu nadekspresja DDAH wiązała się ze zmniejszeniem stężenia ADMA w surowicy i zapobiegała wzrostom ciśnienia tętniczego [121]. Dane te wskazują na istotną rolę ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego w PChN. W pracy Wanga i wsp. analizującej grupę pacjentów z prawidłową funkcją nerek i albuminurią, stwierdzono istotną korelację pomiędzy ADMA i ciśnieniem tętniczym [122]. Jak wiadomo mikroalbuminuria jest również wykładnikiem dysfunkcji śródbłonna, a ponadto wskaźnikiem wczesnego uszkodzenia nerek. Nie można w tej sytuacji wykluczyć, zaburzeń w degradacji ADMA przez enzym DDAH w nerkach wykazujących wczesne uszkodzenie.

Związek pomiędzy ADMA, a nadciśnieniem tętniczym, był również badany u chorych z cukrzycą. W badaniu Tanera i wsp. w grupie chorych z cukrzycą typu 2 z dobrze kontrolowanym ciśnieniem tętniczym i prawidłową funkcją nerek wykonano badanie ABPM i zbadano stężenie ADMA w surowicy pacjentów [123]. U 24,4% osób na podstawie ABPM rozpoznano ukryte nadciśnienie tętnicze. Dodatkowo w całej grupie wykazano związek pomiędzy ADMA, a wartościami średniego dobowego ciśnienia tętniczego, średniego dziennego i nocnego ciśnienia tętniczego. Na tej podstawie wysunięto wniosek o przydatności oznaczania ADMA w diagnostyce ukrytego nadciśnienia tętniczego w tej grupie chorych.

Zaznaczyć jednak należy, że nie wszyscy badacze potwierdzają zależności pomiędzy podwyższonym stężeniem ADMA, a występowaniem nadciśnienia tętniczego. Kielstein i wsp. wykazali w swojej pracy, że konieczne jest podanie dużej ilości egzogennej

ADMA u zdrowych ochotników, aby uzyskać znaczący wzrost ciśnienia tętniczego [124]. W związku z tym, można przypuszczać, że u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wyższe stężenie ADMA, związane jest z upośledzeniem metabolizmu ADMA w różnych narządach, zwłaszcza w nerkach, aniżeli per se z nadciśnieniem tętniczym.

W pracy Fujimi-Hayashida i wsp. u chorych z nefropatią IgA analizowano związek ADMA z nasileniem progresji choroby nerek [125]. W tej grupie pacjentów poziom ADMA korelował z białkomoczem, niestety nie wykazano takiej zależności z zarówno skurczowym, jak i rozkurczowym ciśnieniem tętniczym. Dodatkowo wykazano istotny związek pomiędzy ADMA, a wskaźnikiem uszkodzenia kłębuszków i śródmiąższu ocenianym w biopsji nerki.

Dane te potwierdzają wpływ ADMA na progresję uszkodzenia nerek w nefropatii IgA bez wpływu na kontrolę ciśnienia tętniczego.

Z kolei Fujii i wsp. w pracy obejmującej chorych z pierwotnym kłębuszkowym zapaleniem nerek, potwierdzonym biopsyjnie, przebiegającym z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, białkomoczem (średni UPCR 1,22g/g kreatyniny) (urine protein to creatinine ratio) nie wykazali związku ADMA z kontrolą ciśnienia tętniczego [126]. W badanej grupie funkcja nerek była prawidłowa, a stężenie ADMA było istotnie wyższe w grupie badanych, aniżeli w grupie kontrolnej (0,46 vs 0,32  $\mu\text{mol/l}$ ). Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie stężenia ADMA pod wpływem leczenia przez 3 miesiące lekami blokującymi układ RAA. Leczenie to nie miało wpływu na wartości ciśnienia tętniczego. Doniesienia te są zgodne z własnymi obserwacjami.

Natomiast w pracy Caglara i wsp, u chorych z białkomoczem niecukrzycowym, prawidłową funkcją nerek nie wykazano korelacji pomiędzy ADMA, a ciśnieniem tętniczym [83].

Wśród chorych na nadciśnienie tętnicze bez współtowarzyszących schorzeń układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy i PChN nie zawsze stwierdzano podwyższone stężenie ADMA. Takie dane przytacza Klima i wsp. gdzie nie wykazano różnicy w stężeniu ADMA pomiędzy grupą osób z prawidłowym i podwyższonym ciśnieniem tętniczym (0,58 vs 0,56  $\mu\text{mol/l}$ ) [127].

U wszystkich badanych osób nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem ADMA, a nadciśnieniem tętniczym oraz wartościami skurczowego i rozkurczowego dobowego ciśnienia tętniczego.

W przedstawionej dysertacji brak korelacji pomiędzy stężeniem ADMA, a ciśnieniem tętniczym jest zgodny z wieloma danymi z piśmiennictwa cytowanymi powyżej.

W pracy wśród wszystkich badanych oceniono także ciśnienie tętna (PP), które zmieniało się istotnie statystycznie w okresie trwania obserwacji. W analizie statystycznej nie wykazano związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a ciśnieniem tętna.

W cytowanej powyżej pracy Klima i wsp. w analizie wieloczynnikowej wykazano istotną dodatnią korelację ADMA z ciśnieniem tętna jedynie w grupie osób z wieloletnim nadciśnieniem tętniczym [127]. W piśmiennictwie brak jest dokładnych danych dotyczących zależności pomiędzy stężeniem ADMA, a ciśnieniem tętna w populacji chorych z PChN.

Ostatecznie można stwierdzić, że niektóre dane świadczące o istnieniu zależności pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wartościami ciśnienia tętniczego. Brak takiej zależności w prezentowanej pracy jest wynikiem dobrej kontroli zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego.

### **11.3 ADMA a parametry echokardiograficzne.**

Pacjenci z PChN należą do grupy chorych o zwiększonym ryzyku sercowo-naczyniowym. Dotyczy to przede wszystkim osób z  $eGFR < 60\text{ml/min/1,73m}^2$ . Istnieją jednak dane, iż u chorych z  $eGFR < 90\text{ml/min/1,73m}^2$  ryzyko to również wzrasta [128]. Większa częstość incydentów sercowo-naczyniowych, nie wynika tylko z obecności klasycznych czynników ryzyka, o czym już pisałem we wstępie, lecz również część zgonów z przyczyn sercowych, zwłaszcza w późnych stadiach PChN, związana jest z nagłą śmiercią sercową, zaburzeniami rytmu serca lub zastoinową niewydolnością serca [128]. Zaburzenia struktury serca, zwłaszcza przerost lewej komory, uważane są za istotne czynniki wystąpienia w przyszłości incydentów sercowo-naczyniowych w populacji chorych z PChN, zarówno w stadiach zaawansowanych, jak i we wczesnych etapach choroby.

Przerost lewej komory (left ventricle hypertrophy, LVH) występuje u ponad 70% osób ze schyłkową niewydolnością nerek [129]. W przypadku pacjentów z wcześniejszymi stadiami PChN, dane te nie są dokładnie poznane. Szacuje się, że LVH występuje u 34-78% chorych w tej grupie, a częstość jego wzrasta wraz z pogorszeniem funkcji nerek.

Należy również zauważyć, że często wraz z postępem PChN pojawia się u opisywanych chorych nadciśnienie tętnicze, co zwiększa ryzyko powstania zaburzeń struktury lewej komory, w tym LVH. Zmiany te prowadzą do wzrostu śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych u tych pacjentów.

Podstawowym narzędziem służącym do diagnozowania przerostu i funkcji lewej komory jest echokardiografia [130,131]. Mogą być to tego używane inne metody takie jak: elektrokardiografia, tomografia komputerowa czy ocena za pomocą rezonansu magnetycznego.

Duże badania kohortowe obejmujące populacje pacjentów z PChN wykazały związek pomiędzy eGFR i albuminurią, a wystąpieniem incydentów sercowo-naczyniowych [128,132]. Ostatecznie dane wskazały, że eGFR 30-59ml/min/1,73m<sup>2</sup> jest granicą istotnego zwiększenia ryzyka śmiertelności sercowo-naczyniowej u chorych z PChN. Stwierdzono także, że albuminuria koreluje z częstością incydentów sercowo-naczyniowych w tej grupie osób. Dlatego KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) dokonała podziału 3 stadium PChN na 3a (eGFR 59-45 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) i 3b (eGFR 44-30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) oraz do każdego stadium PChN dodała 3 stopnie albuminurii (A1 - <30 mg/g kreatyniny, A2- 30-300 i A3 >300 mg/g kreatyniny) [133].

W prezentowanej dysertacji oceniono funkcję i strukturę lewej komory przy pomocy echokardiografii.

Zaburzenia funkcji skurczowej (EF<45%) zaobserwowano u 2,7% i 2,9% chorych odpowiednio podczas pierwszej i drugiej wizyty. Natomiast przy wykonywaniu badania po 12 miesiącach obserwacji zaburzenie to stwierdzono u 5,9% badanych (tabela 17). Dane te różniły się pomiędzy grupą A i B (tabela 18 i 19). Opisane różnice mogły wynikać z błędu związanego z samym pomiarem (błąd metody lub/i osoby badającej). Nie można także wykluczyć progresji ewentualnej choroby wieńcowej. Oceny funkcji rozkurczowej dokonano przy użyciu parametrów E/A i E/è. Zaburzenia rozkurczu w opisywanej populacji wykazano u 16,2% i 17,7% chorych odpowiednio podczas pierwszej i drugiej wizyty przy użyciu parametru E/A. Po 12 miesiącach zaburzenie to występowało u 5,9% pacjentów. Odsetek chorych z dysfunkcją rozkurczową różnił się pomiędzy grupą A i B (Tabela 17,18,19). W przypadku analizy przy użyciu parametru E/è, zaburzeń funkcji rozkurczowej nie wykazano.

Zwiększony odsetek osób z zaburzeniami funkcji rozkurczowej ocenianej poprzez wskaźnik E/A, zwłaszcza podczas pierwszej wizyty, mógł wynikać z przewodnienia tych chorych, a także z możliwych błędów metody. Natomiast użycie parametru E/è

dotkowo zwiększyło czułość wykrycia ewentualnej dysfunkcji rozkurczowej w badanej grupie. Na podstawie opisanych wyników, można przypuszczać, że wskaźnik funkcji rozkurczowej E/e' jest bardziej wiarygodnym narzędziem badawczym w tej grupie pacjentów.

Nie wykazałem związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a parametrami charakteryzującymi strukturę lewej komory.

Prawidłową geometrię lewej komory stwierdzono podczas pierwszej wizyty jedynie u 17% pacjentów. W kolejnych punktach obserwacji (po 6 i 12 miesiącach) odsetek chorych wynosił odpowiednio 45,5% i 35%.

Głównym zaobserwowanym zaburzeniem geometrii serca był remodeling koncentryczny, który wystąpił u 72% badanych podczas pierwszej wizyty. Podczas kolejnych wizyt zaburzenie to stwierdzono odpowiednio u 48,5% i 53% chorych.

Obecne były różnice w występowaniu zaburzeń geometrii serca pomiędzy grupami A i B. Szczegółowe dane zawarto w tabeli 17, 18 i 19.

W okresie obserwacji stwierdzono zmiany w zakresie geometrii lewej komory w badanej grupie. Na podstawie opisanych danych, można zauważyć, że pod wpływem zastosowanego leczenia doszło u części chorych do normalizacji geometrii lewej komory.

W pracy Lieb i wsp, przeanalizowano związek pomiędzy stężeniem ADMA i strukturą lewej komory. Grupę badaną stanowiły osoby dorosłe bez istotnej choroby sercowo-naczyniowej, u których zwiększony LVMI stwierdzono u 17,5 % badanych. Autorzy nie wykazali korelacji pomiędzy stężeniem ADMA, a parametrami charakteryzującymi strukturę lewej komory [134].

W pracy Nardi i wsp. analizie poddano dorosłych chorych z nadciśnieniem tętniczym i z PChN w stadium od 2 do 5 [135]. W tej grupie pacjentów średnie LVMI było powyżej normy, natomiast parametry funkcji i struktury lewej komory były w normie. Dodatkowo w tym badaniu do analizy wyodrębniono podgrupę pacjentów z PChN w stadium 2 i 3, u których nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości w badaniu echokardiograficznym.

Grabysa i wsp. u osób z wieloletnim nadciśnieniem i PChN w stadium 2 i 3 przeprowadzili ocenę funkcji i struktury lewej komory [136]. W badaniu echokardiograficznym nie stwierdzono zaburzeń funkcji skurczowej i rozkurczowej, a jedynie nieznaczny przerost mięśnia lewej komory. U 44,1% pacjentów geometria lewej komory była prawidłowa. Remodeling koncentryczny występował u 13,7%, a przerost

ekscentryczny i przerost koncentryczny odpowiednio u 25,4% i 16,8% badanych. Analiza statystyczna w tej pracy wykazała, że u chorych z  $eGFR < 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$  częściej występował przerost mięśnia serca (głównie ekscentryczny), w porównaniu z chorymi z wyższym eGFR.

Warto tutaj wspomnieć, że poza klasycznym przezklatkowym badaniem echokardiograficznym, strukturę i funkcję serca można ocenić za pomocą tkankowej echokardiografii dopplerowskiej (tissue doppler imaging, TDI).

Metoda ta została wykorzystana w pracy Edwards i wsp. w grupie chorych z PChN w stadium 2 i 3 bez współistniejącej cukrzycy i poważnych schorzeń układu sercowo-naczyniowego [137]. W grupie pacjentów z PChN większość (ponad 80% chorych) miała nadciśnienie tętnicze, ale było ono dobrze kontrolowane. W trakcie klasycznego badania echokardiograficznego oceniono parametry struktury i funkcji lewej komory, które były w normie. Natomiast na podstawie wykonanych badań techniką TDI wykazano niejawne klinicznie zaburzenia funkcji skurczowej, przy prawidłowych parametrach klasycznego badania echokardiograficznego. Obserwowane zmiany u chorych z wczesnym stadium PChN mogą być predyktorem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w tej populacji pacjentów. Konieczne są z pewnością dalsze badania na większej populacji pacjentów, które wyjaśniły by rolę TDI w ocenie struktury i funkcji serca w tej grupie osób.

Niestety brak jest danych w literaturze dotyczących zależności pomiędzy ADMA a geometrią i funkcją lewej komory u chorych z wczesnymi stadiami PChN. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że w początkowych stadiach PChN metodami klasycznymi nie wykrywa się istotnych zaburzeń w strukturze i funkcji serca, jak to zostało opisane powyżej. Dlatego przytoczę tutaj dane z pracy Napory i wsp., w której oceniano zależność między stężeniem ADMA, a strukturą i funkcją lewej komory u chorych hemodializowanych [138]. Średnie stężenie ADMA w surowicy w grupie chorych dializowanych wynosiło  $2,39 \mu\text{mol/l}$  i było znamienne większe niż w grupie kontrolnej ( $0,55 \mu\text{mol/l}$ ). Na podstawie badania echokardiograficznego wyróżniono następujące kategorie chorych: z prawidłową geometrią serca (17,8%), z remodelingiem koncentrycznym (8,9%), przerostem koncentrycznym (35,7%), przerostem ekscentrycznym (37,5%) oraz z upośledzoną funkcją skurczową (10,7%) i upośledzoną funkcją rozkurczową (71,4%). W badanej grupie ADMA korelowało z LVMI i RWT ( $p < 0,05$ ), natomiast nie korelowało z wykładnikami funkcji skurczowej i rozkurczowej lewej komory. Wyniki te wskazują na związek ADMA z nieprawidłowościami



geometrii lewej komory u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializami.

W prezentowanej dysertacji otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami z piśmiennictwa dotyczącego oceny struktury i funkcji lewej komory u chorych z wczesnymi stadiami PChN. W przeciwieństwie do danych Napory i wsp. nie stwierdziłem korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a wskaźnikami geometrii mięśnia sercowego lewej komory. Wynika to z pewnością z odmienności badanych grup chorych.

Geometria lewej komory w opisywanej pracy zmieniała się w czasie obserwacji.

Różnica ta była widoczna, zwłaszcza w grupie B (chorzy z białkomoczem nerczykowym), gdzie podczas pierwszej wizyty remodeling koncentryczny wystąpił u prawie 79% badanych. Wyniki te różnią się od danych Grabasa i wsp., gdzie u analizowanych chorych dominowała prawidłowa geometria lewej komory. Należy jednak zauważyć, że podczas kolejnych badań w przeprowadzonym przeze mnie badaniu wzrastał odsetek chorych z prawidłową geometrią lewej komory. Wskazane powyżej różnice mogły wynikać najprawdopodobniej z większego przewodnienia chorych, zwłaszcza podczas pierwszej wizyty. Ponieważ był to najczęściej moment pojawienia się objawów choroby, w tym często znacznych obrzęków oraz rozpoczęcia diagnostyki i włączenia odpowiedniego leczenia farmakologicznego, w tym terapii diuretykami. Nie można również wykluczyć dopuszczalnego błędu stosowanej metody echokardiograficznej.

#### **11.4 ADMA a prędkość fali tętna i grubość kompleksu błona środkowa-śródbłonek**

Dotychczasowe doniesienia wskazują na wpływ ADMA na grubość kompleksu śródbłonek – błona środkowa (IMT) i przerost lewej komory (LVH) u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek. Świadczy to o roli ADMA w patogenezie miażdżycy w populacji chorych z PChN w stadium 5 i jej roli w rozwoju incydentów sercowo-naczyniowych w tej grupie chorych [139].

W prezentowanej pracy wartości IMT ocenione w badanej grupie na wszystkich wizytach były prawidłowe. Nie wykazałem korelacji pomiędzy ADMA, a IMT.

W metaanalizie Bai i wsp. autorzy wykazali związek pomiędzy stężeniem ADMA, a IMT w grupie obejmującej 6168 pacjentów [140]. Korelacja ta była silniejsza w

przypadku chorych z PChN, aniżeli w kohorcie osób z prawidłową funkcją nerek. Wskazuje to na rolę ADMA jako markera wczesnej miażdżycy i predyktora rozwoju jej powikłań, zwłaszcza u pacjentów z PChN.

Furuki i wsp. w grupie osób dorosłych, bez istotnej choroby sercowo-naczyniowej stwierdzili, że stężenie ADMA koreluje z IMT, niezależnie od wieku, płci czy wartości ciśnienia tętniczego [141]. Natomiast Klima i wsp. ocenili prędkość fali tętna (PWV) i IMT u osób z nadciśnieniem tętniczym i normotensją [127]. Autorzy zauważyli istotną różnicę w wartościach parametru PWV oraz IMT pomiędzy grupą z hipertensją a normotensją. Badacze wykazali również w analizie wieloczynnikowej związek pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego, a IMT. A dodatkowo w grupie zdrowych ochotników udowodniono związek pomiędzy stężeniem ADMA, a IMT. Doniesienia te wskazują na rolę ADMA jako markera wczesnego uszkodzenia naczyń w grupie osób zdrowych.

Należy wspomnieć, że zależność pomiędzy ADMA i IMT wykazano również w populacji dziecięcej. Hasanoğlu i wsp. w grupie dzieci z hipercholesterolemią, w średnim wieku 10 lat, wykazali istotną różnicę w grubości IMT w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami w podobnym wieku [95]. W tej pracy IMT korelowała ze stężeniem całkowitym cholesterolu, trójglicerydów i poziomem cholesterolu LDL. Autorzy Ci po raz pierwszy wskazali na związek pomiędzy stężeniem ADMA, a IMT w populacji pediatrycznej. Należy więc sądzić, że ADMA jest czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy w populacji dziecięcej obciążonej hipercholesterolemią. Połączenie pomiaru stężenia ADMA z badaniem IMT może odegrać istotną rolę w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego w tej grupie pacjentów. Odmienne wyniki dotyczące zależności pomiędzy ADMA i IMT w przedstawianej pracy własnej mogą być związane ze zbyt krótkim czasem obserwacji (12 miesięcy) , liczebnością badanej grupy i zastosowaną terapią.

Zwiększona sztywność naczyń, mierzona za pomocą parametru PWV (prędkość fali tętna) jest częstym objawem u pacjentów z PChN. Parametr ten służy do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego w tej populacji chorych, a także jest on predyktorem śmiertelności i przeżycia pacjentów dializowanych [142,143].

Nie wykazałem w prezentowanej pracy korelacji pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a PWV.

Wiele badań dotyczących sztywności naczyń zostało przeprowadzonych u chorych dializowanych oraz u pacjentów z licznymi chorobami współistniejącymi (cukrzyca,

choroby sercowo-naczyniowe), w których wykazano związek pomiędzy sztywnością naczyń, a występowaniem tych chorób [144,145].

W dostępnej literaturze, szereg doniesień wskazuje na dysfunkcję śródbłonna i zwiększoną sztywność naczyń u chorych z wczesnymi stadiami PChN. Prędkość fali tętna zwiększa się wraz ze spadkiem eGFR [146].

W pracy Lilitkarntakul i wsp. w grupie osób z PChN w stadium od 1 o 5, bez istotnej współchorobowości (bez cukrzycy, choroby naczyń obwodowych, choroby płuc, chorób tkanki łącznej) wykazano, że sztywność naczyń zwiększała się wraz z pogorszeniem funkcji nerek [146]. Jednak w analizie statystycznej nie udowodniono, aby stopień uszkodzenia nerek był niezależnym predyktorem sztywności naczyń. Natomiast wykazano związek pomiędzy ciśnieniem tętniczym, stężeniem CRP i ADMA.

Powyższe dane dotyczące zależności sztywności naczyń od funkcji nerek zostały również potwierdzone w pracy Wanga i wsp., którzy po raz pierwszy wykazali wyższą wartość PWV u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek w porównaniu z chorymi z wczesnymi stadiami PChN [147]. Natomiast w pracy Matsuda i wsp. wykazano podobne zależności pomiędzy funkcją nerek i PWV u pacjentów z niecukrzycową chorobą nerek [148].

Wyniki prezentowanej pracy własnej nie potwierdzają doniesień z literatury, co może być wynikiem małej grupy chorych, krótkiego okresu obserwacji i zastosowanego leczenia.

## **11.5 Wpływ leczenia immunosupresyjnego i nefroprotekcijnego na poziom ADMA**

Zastosowanie leczenia nefroprotekcijnego, zwłaszcza u chorych z PChN przebiegającą z białkomoczem jest obowiązkowe. Postępowanie to ma na celu spowolnienie progresji choroby nerek. Dzięki stosowaniu tego rodzaju terapii dochodzi do obniżenia stężenia ADMA co może służyć prewencji wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych i zmniejszenia śmiertelności w tej grupie chorych. Kluczowym enzymem rozkładającym ADMA jest DDAH, co zostało potwierdzone w warunkach in vitro oraz na modelach zwierzęcych [139]. Leki powszechnie stosowane w nefroprotekcji, które obniżają także stężenie ADMA o 10-24%, są to inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę oraz sartany [149]. Mechanizm ich działania polega na zwiększeniu aktywności DDAH (111).

W przedstawianej pracy własnej nie wykazałem różnicy w stężeniu ADMA pomiędzy grupą leczoną immunosupresyjnie, a grupą bez tego leczenia. Poziomy ADMA w obu grupach w poszczególnych punktach obserwacji były porównywalne. W omawianej dysertacji zastosowanie leków blokujących układ RAA, wpłynęło znacząco na obniżenie ADMA w badanej grupie (rycina 12). Należy zauważyć, że po pierwszych 6 miesiącach, stężenie ADMA u badanych chorych zmniejszyło się do poziomu stwierdzanego u zdrowych ochotników, a kontynuacja stosowania tych leków doprowadziła do dalszego istotnego zmniejszenia stężenia ADMA. Należy więc przyjąć, że leczenie immunosupresyjna nie ma wpływu na stężenie ADMA. Badanie to jest pierwszym, w którym jednocześnie analizowano zmienność stężenia ADMA u osób leczonych immunosupresyjnie i jednocześnie przyjmujących blokadę układu RAA w porównaniu z grupą leczoną tylko inhibitorami enzymu konwertującego lub/i sartanami. Park i wsp. wykazali w swojej pracy eksperymentalnej, że zastosowanie losartanu zwiększa ekspresję mRNA DDAH w hodowli komórkowej, wcześniej zahamowaną przez albuminę, co wpływa na obniżenie ADMA [150]. Inne dane pokazują, że Angiotensyna II poprzez receptor AT1 i wzrost reaktywnych form tlenu w mięśniach gładkich powoduje wzrost stężenia ADMA w komórce [151]. Natomiast losartan zwiększa także aktywność DDAH, uprzednio obniżonej poprzez angiotensynę II [152]. Ponadto wykazano, że ekspozycja komórek cewek proksymalnych nefronu na albuminę powoduje nasilenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w tych komórkach. Zmiany te powodują obniżenie aktywności DDAH, a po zastosowaniu losartanu dochodzi do redukcji stresu oksydacyjnego w komórkach cewek proksymalnych i zwiększania aktywności DDAH. Pokazuje to, że poza możliwym bezpośrednim działaniem tych leków na DDAH, dochodzi do zmniejszenia stresu oksydacyjnego, co dodatkowo zwiększa aktywność enzymu DDAH [150].

U wielu chorych, zwłaszcza z białkomoczem nerczycowym oprócz leczenia nefroprotekcijnego za pomocą inhibitorów konwertazy angiotensyny i/lub sartanów oraz statyn, bardzo często konieczne jest stosowanie immunosupresji w celu osiągnięcia remisji choroby. Najczęściej stosowanymi lekami są: glikokortykosterydy, a także leki alkilujące (cyklofosfamid), inhibitory kalcyneuryny (takrolimus, cyklosporyna) lub inne leki immunosupresyjne i przeciwaproliferacyjne (mykofenolan mofetilu).

W piśmiennictwie brak jest dokładnych danych o wpływie immunosupresji na poziom ADMA u chorych z białkomoczem niecukrzycowym. Doniesienia na ten temat

pochodzą głównie z prac oceniających wpływ leczenia immunosupresyjnego na stężenie ADMA u chorych po transplantacji narządów (nerki, wątroby).

W pracy Sahin i wsp. analizowano wpływ immunosupresji u chorych po przeszczepieniu nerki z prawidłową funkcją graftu i dobrze kontrolowanym ciśnieniem tętniczym [153]. 32% badanych przyjmowało ACE inhibitor lub sartan. W schemacie immunosupresji zastosowano glikokortykosterydy (metyloprednizolon lub prednizon), mykofenolan mofetilu lub sodu oraz odpowiednio cyklosporynę lub takrolimus. W podgrupie osób z cyklosporyną zaobserwowano nieznacznie wyższe stężenie ADMA, aniżeli w podgrupie z takrolimusem [153]. Istnieją dane z literatury, że cyklosporyna indukuje dysfunkcję śródbłonna, poprzez nasilenie stresu oksydacyjnego, powoduje nadciśnienie tętnicze, dyslipidemię, cukrzycę, a także generuje nadrzepliwość krwi co może mieć wpływ na zwiększenie stężenia ADMA u osób stosujących ten lek [153,154].

Zwiększone stężenie ADMA, również zostało wykazane u chorych po transplantacji wątroby. Jako przyczynę tego zjawiska uznano współtowarzyszącą niewydolność nerek, a także stosowanie takrolimusu w schemacie immunosupresji [155].

W pracy Bultink i wsp. u chorych z toczniem układowym leczonych lekami immunosupresyjnymi (w tym u 81% stosowano glikokortykosterydy), wykazano znamienne wyższe stężenia ADMA w porównaniu z grupą kontrolną [156]. Podobną zależność znajdujemy u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów [112].

Wyniki prezentowanej dysertacji są zgodne z danymi wskazującymi na wpływ leków blokujących układ RAA na stężenie ADMA. Natomiast nie wykazałem wpływu leczenia immunosupresyjnego na poziom ADMA.

Można przypuszczać, że blokada RAA maskowała niekorzystny wpływ immunosupresji na stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem nerczycowym.

U chorych z zespołem nerczycowym bardzo często współlistnieje hiperlipidemia, która dodatkowo wpływa na zwiększenie stężenia ADMA u tych pacjentów.

W tej sytuacji często zostaje włączona terapia hipolipemizująca statynami, które obniżają stężenie cholesterolu, ale powodują także zmniejszenie stężenia ADMA w surowicy.

W przedstawianej pracy, jak już wyżej wspomniano wykazano zależność pomiędzy stężeniem ADMA, a stężeniem cholesterolu w surowicy pacjentów. Stężenie całkowitego cholesterolu w całym okresie obserwacji zmieniało się istotnie statystycznie. Bardzo znaczące obniżenie obserwowano, zwłaszcza w grupie B, w której

dominowali chorzy z zespołem nerczycowym. Leczenie statynami podczas pierwszej wizyty włączono u 65% chorych, natomiast na końcu badania lek ten przyjmowało 54% pacjentów. W terapii stosowane były głównie preparaty simwastatyny i atorwastatyny. Doniesienia z piśmiennictwa w tym zakresie są niejednoznaczne. Nie wykazano wpływu wielu preparatów statyn na stężenie ADMA w surowicy [70,157]. Jedynie po zastosowaniu rosuwastatyny oraz wolno uwalniającej się formy fluwastatyny obserwowano nieznaczne obniżenie stężenia ADMA [139,158]. Powyższe obserwacje wskazują na brak efektu klasy poszczególnych statyn na stężenie ADMA w surowicy [159]. Podobne dane znajdujemy w pracy Kurtoglu i wsp., gdzie wykazano wpływ leczenia statynami (atorwastatyna i rosuwastatyna) na stężenie ADMA. W tym badaniu zaobserwowano znacznie większy spadek stężenia ADMA po zastosowaniu rosuwastatyny w porównaniu z atorwastatyną [160].

Należy jednak podkreślić, iż kompleksowe leczenie chorych z białkomoczem, zwłaszcza nerczycowym (blokada układu RAA i immunosupresja) spowodowało remisję choroby nerek, co wpłynęło istotnie na poprawę profilu lipidowego u tych osób. Ostatecznie w moim badaniu nie można bezpośrednio stwierdzić jednoznacznego wpływu leczenia statynami na poziom ADMA w surowicy.

W literaturze znajdujemy wiele danych dotyczących wpływu innych klas leków na poziom ADMA. Jednym z tych substancji jest pentoksyfilina. W pracy Park i wsp. udowodniono w hodowli komórek zwiększenie aktywności DDAH, po zastosowaniu tego leku, co prowadziło do zmniejszenia ADMA [150].

Natomiast w pracy Dhaun i wsp. wykazano, że zastosowanie antagonisty receptora endoteliny ET<sub>A</sub> sitaxentanu spowodowało znaczące obniżenie stężenia ADMA u chorych z białkomoczem [161].

Fujiwara i wsp. donoszą, że zastosowanie erytropoetyny u pacjentów z PChN w okresie predializacyjnym wiązało się z istotnym obniżeniem ADMA w okresie 6 miesięcy leczenia [162].

Wszystkie te dane pochodzą z pojedynczych prac i wymagają one weryfikacji w badaniach randomizowanych z udziałem odpowiedniej liczby uczestników.

## 12 Wnioski

1. Stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym przed leczeniem jest istotnie wyższe aniżeli w grupie kontrolnej.
2. Istnieje związek między stężeniem ADMA w osoczu chorych z białkomoczem i tylko nieznacznie upośledzoną funkcją nerek, a stężeniem CRP, fibrynogenu i cholesterolu całkowitego w surowicy.
3. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem ADMA, a parametrami geometrii i funkcji lewej komory, prędkością fali tętna i grubością kompleksu błona śródkowa-śródbłonek w badanej grupie chorych.
4. Zastosowanie leczenia blokującego układ renina-angiotensyna-aldosteron było związane ze znaczącym obniżeniem ADMA w osoczu chorych w czasie 12 miesięcznej obserwacji.
5. Nie wykazano wpływu leczenia immunosupresyjnego na stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym.

### 13 Streszczenie

Dysfunkcja śródbłonna związana jest z ograniczoną dostępnością tlenku azotu (NO) na wczesnym etapie miażdżycy naczyń. NO jest syntetyzowany z aminokwasu L- argininy przy udziale syntazy NO, której aktywność jest hamowana przez endogenne inhibitory syntazy tlenku azotu - asymetryczną dimetyloargininę (ADMA). ADMA jest naturalnie występującym aminokwasem w osoczu i różnych typach tkanek. Poziom ADMA w osoczu związany jest z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego takimi: jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i przewlekła choroba nerek.

Celem pracy była ocena związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym, a wybranymi parametrami: biochemicznymi (poziom kreatyniny, CRP, cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, albuminy, fibrynogenu w surowicy oraz dobowym wydalaniu białka z moczem (DUB)), echokardiograficznymi, ciśnieniem tętniczym, prędkością fali tętna (PWV) i grubością kompleksu śródbłonek-błona środkowa (IMT) oraz wpływu leczenia na stężenie ADMA po 6 i 12 miesiącach okresu leczenia z zastosowaniem inhibitorów konwertazy angiotensyny, sartanów, statyn i leków immunosupresyjnych. Do badania zostało zakwalifikowanych trzydziestu siedmiu pacjentów (11K, 26M) w średnim wieku 38,5 lat z białkomoczem niecukrzycowym. Średni poziom kreatyniny w momencie rozpoczęcia badania wynosił 1,15mg/dl. Schemat leczenia pacjentów został ustalony według wskazań medycznych dla danego chorego. Na początku badania oraz po upływie 6 i 12 miesięcy dokonano pomiaru stężenia ADMA w osoczu, parametrów biochemicznych, echokardiograficznych, IMT, PWV i ciśnienia tętniczego. Pomiaru ciśnienia tętniczego dokonano metodą ABPM. Badaną populację podzielono na grupę A i B w zależności od stosowanego leczenia. Grupa B charakteryzowała się istotnie większym białkomoczem dobowym w porównaniu z grupą A (6,3g/dobę vs 1,53g/dobę). Także poziom cholesterolu całkowitego był znamienne wyższy u chorych w grupie B, aniżeli w grupie A (324mg/dl vs 239mg/dl). Pierwsza z nich leczona była lekami blokującymi układ renina angiotensyna aldosteron oraz statynami, a druga poza stosowaniem wyżej wymienionych leków, otrzymywała dodatkowo leczenie immunosupresyjne. Leczenie to wiązało się z zastosowaniem następujących preparatów: glikokortykosterydy, cyklofosfamid i cyklosporyna. W momencie rozpoczęcia badania stężenie ADMA w osoczu populacji badanej wynosiło 0,77 $\mu$ mol/l, a w grupach A i B odpowiednio 0,76  $\mu$ mol/l i 0,78  $\mu$ mol/l. Różnica w stężeniu ADMA pomiędzy grupami nie była



znamienna statystycznie. Stężenie ADMA w osoczu grupy kontrolnej (zdrowi ochotnicy) wynosiło 0,56  $\mu\text{mol/l}$ . Po 6 miesiącach leczenia zaobserwowano obniżenie stężenia ADMA w populacji badanej do 0,56  $\mu\text{mol/l}$ . Stężenie to w grupach A i B wynosiło odpowiednio 0,54  $\mu\text{mol/l}$  i 0,59  $\mu\text{mol/l}$ . Natomiast po 12 miesiącach terapii uzyskano dalsze obniżenie stężenia ADMA u uczestników badania do 0,4  $\mu\text{mol/l}$ . W grupie A poziom ADMA wynosił 0,42  $\mu\text{mol/l}$ , a w grupie B 0,38  $\mu\text{mol/l}$ . Stężenie ADMA u osób badanych po 12 miesiącach leczenia było znamienne niższe w porównaniu z grupą kontrolną. W żadnym punkcie obserwacji nie było istotnej różnicy w stężeniu ADMA pomiędzy grupą A i B. W trakcie badania stwierdzono, istotnie statystycznie zmiany stężenia cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, albuminy, fibrynogenu i DUB. Nie zauważono istotnych statystycznie zmian w stężeniu kreatyniny w badanych grupach, ani w eGFR obliczonym według wzoru MDRD i CKD-EPI. Stwierdzono zależność między poziomem ADMA, a stężeniem CRP, fibrynogenu i cholesterolu całkowitego ( $p < 0,05$ ). Nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy stężeniem ADMA w osoczu, a pozostałymi parametrami biochemicznymi, parametrami echokardiograficznymi, ciśnieniem tętniczym, PWV i IMT.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym przed leczeniem jest istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.
2. Istnieje związek między stężeniem ADMA w osoczu chorych z białkomoczem i tylko nieznacznie upośledzoną funkcją nerek, a stężeniem CRP, fibrynogenu i cholesterolu całkowitego w surowicy.
3. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem ADMA, a parametrami geometrii i funkcji lewej komory, prędkością fali tętna i grubością kompleksu śródbłonek-błona środkowa w badanej grupie chorych.
4. Zastosowanie leczenia blokującego układ renina-angiotensyna-aldosteron było związane ze znaczącym obniżeniem ADMA w osoczu chorych w czasie 12 miesięcznej obserwacji.
5. Nie wykazano wpływu leczenia immunosupresyjnego na stężenie ADMA w osoczu chorych z białkomoczem niecukrzycowym

## 14 Abstract

Endothelial dysfunction is related to the limited availability of nitric oxide (NO) in the early stages of atherosclerosis. NO is synthesized from the amino acid L-arginine with the participation of NO synthase, the activity of which is inhibited by an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase - asymmetric dimethylarginine (ADMA). ADMA is a naturally occurring amino acid in the plasma and tissues of various types. ADMA levels in plasma is associated with risk factors for cardiovascular such: as arterial hypertension, diabetes mellitus and also chronic kidney disease. The aim of this study was to assess the relationship between plasma ADMA levels in patients with non-diabetic proteinuria, and selected parameters: biochemical (serum creatinine, CRP, total cholesterol, triglycerides, albumin, fibrinogen levels and daily excretion of protein in the urine), echocardiography, pressure arterial pulse wave velocity (PWV) and intima-media thickness (IMT) and the effect of treatment on plasma ADMA after 6 and 12 months of treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors, ARB, statins and immunosuppressants. Thirty seven patients (11F, 26M) in mean age 38,5 years old with non-diabetic proteinuria were enrolled to the study. The average level of creatinine at baseline was 1.15 mg / dL. Treatment schedule (ACE inhibitors, sartans, steroids, cyclophosphamid or cyclosporine) was adjusted according medical indications. At baseline and after 6 and 12 months ADMA concentrations in plasma, biochemical parameters, echocardiographic, IMT, PWV and blood pressure were measured. Blood pressure measurement was made using ABPM. The study population was divided into group A and B, depending on the applied treatment. Group B was characterized by daily proteinuria significantly higher compared to group A (6.3 g / day vs. 1.53 g / day). Also, total cholesterol was significantly higher in patients in group B than in group A (324mg/dl vs. 239mg/dl). The former was treated with drugs blocking the renin angiotensin aldosterone system and statins, and the latter was treated with the same medicines, received additional immunosuppressive therapy ( glucocorticoids, cyclophosphamide, and cyclosporine). At baseline plasma ADMA concentration in the study population was 0.77 mmol / l in groups A and B respectively 0.76 mmol / l and 0.78 mmol / l. ADMA concentration difference between the groups was not statistically significant. Plasma ADMA concentration in the control group (healthy volunteers) was 0.56 mmol / l. After 6 months of treatment was observed decrease in the concentration

of ADMA in the study population to 0.56 mmol / l This concentration in groups A and B was respectively 0.54 mmol / l and 0.59 mmol / l. However, after 12 months of therapy there was a further reduction in the concentration of ADMA in study participants to 0.4 mmol / l. In group A, the level of ADMA was 0.42 mmol / l and in group B 0.38 mmol / l. ADMA concentration in subjects at 12 months was significantly lower compared with the control group. At no time point there was no significant difference in the concentration of ADMA between group A and B. During the study, it was found statistically significant changes in total cholesterol, triglycerides, albumin, fibrinogen and daily excretion of protein in the urine . There were no significant statistical changes in the concentration of creatinine in study groups or in eGFR calculated by the MDRD formula and CKD-EPI. The relationships between the level of ADMA and CRP, fibrinogen and total cholesterol were statistical significant ( $p < 0.05$ ). There was no significant association between plasma ADMA levels and other biochemical parameters, echocardiographic parameters, blood pressure, PWV and IMT.

#### Conclusions:

1. ADMA concentration in plasma of patients with non-diabetic proteinuria before treatment is significantly higher than in the control group.
2. There is a relationship between the concentration of ADMA in the plasma of patients with proteinuria and only mildly impaired renal function and the concentration of CRP, fibrinogen, and serum total cholesterol.
3. There was no relationship between the concentrations of ADMA and parameters of geometry and left ventricular function, pulse wave velocity and intima-media thickness in the study group.
4. Treatment with blocking the renin-angiotensin-aldosterone system was associated with a significant reduction of ADMA in the plasma of patients during the 12-month follow-up.

5 There was no effect of immunosuppressive therapy on plasma ADMA concentration in patients with non-diabetic proteinuria.

## 15 Wykaz rycin i tabel

### Wykaz rycin

Rycina 1. Wzór strukturalny L-argininy (9) .....	5
Rycina 2. Schemat syntezy tlenku azotu (12).....	6
Rycina 3. Synteza tlenku azotu (13) .....	7
Rycina 4. Główne funkcje NO w organizmie (9) .....	11
Rycina 5. Arginina oraz jej analogi (25).....	12
Rycina 6. Metabolizm ADMA i jej patofizjologiczne działanie (28).....	13
Rycina 7. Pomiary parametrów struktury lewej komory zgodnie z konwencją Penn ....	27
Rycina 8. Ocena funkcji rozkurczowej – napływ mitralny .....	28
Rycina 9. Ultrasonograficzny obraz kompleksu śródbłonek-błona środkowa .....	29
Rycina 10. Okno robocze programu CMS. Przykład zaznaczenia obszaru do automatycznej detekcji kompleksu błona środkowa-śródbłonek .....	30
Rycina 11. Okno robocze programu CMS.....	31
Rycina 12. Prędkość fali tętna- sposób określania opóźnienia czasowego .....	32
Rycina 13. Stężenie ADMA w osoczu w okresie obserwacji badanej populacji i grupy kontrolnej .....	44
Rycina 14. Zmienne w największym stopniu wpływające na stężenie ADMA w osoczu – wyniki analizy wieloczynnikowej. Rycina przedstawia standaryzowane współczynniki regresji (beta) .....	55

### Wykaz tabel

Tabela 1. Sytuacje kliniczne, w których stwierdzono podwyższenie poziomu ADMA (34) .....	17
Tabela 2. ADMA a zdarzenia sercowo-naczyniowe (25).....	18
Tabela 3. Protokół badania .....	25
Tabela 4. Charakterystyka kliniczna wszystkich pacjentów i grupy kontrolnej.....	35
Tabela 5. Wartości średniego dobowego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w badanej populacji.....	36
Tabela 6. Wartości średniego skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w grupie A. ....	38
Tabela 7. Wartości średniego, skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętna w grupie B.....	39
Tabela 8. Charakterystyka biochemiczna badanej populacji pacjentów .....	41
Tabela 9. Charakterystyka biochemiczna grupy A .....	42
Tabela 10. Charakterystyka biochemiczna grupy B .....	43
Tabela 11. Ocena zmienności stężenia ADMA w okresie obserwacji pomiędzy grupami A i B .....	45
Tabela 12. Różnice statystyczne w stężeniu ADMA pomiędzy poszczególnymi wizytami w populacji badanej oraz w grupach A i B .....	45
Tabela 13. Analiza stężeń ADMA w osoczu w badanej populacji i grupie kontrolnej w trakcie poszczególnych wizyt.....	45
Tabela 14. Dane echokardiograficzne badanej populacji .....	46
Tabela 15. Dane echokardiograficzne grupy A .....	47
Tabela 16. Dane echokardiograficzne grupy B .....	48
Tabela 17. Grubość kompleksu śródbłonek - błona środkowa i prędkości fali tętna w badanej populacji.....	49

Tabela 18. Grubość kompleksu śródbronek - błona środkowa i prędkości fali tętna w grupie A. ....	49
Tabela 19. Grubość kompleksu śródbronek - błona środkowa i prędkości fali tętna .....	50
Tabela 20. Geometria i funkcja lewej komory serca ocenione na podstawie badania echokardiograficznego w badanej populacji.....	50
Tabela 21. Zaburzenia geometrii i funkcji lewej komory serca w badaniu echokardiograficznym (grupa A).....	51
Tabela 22. Zaburzenia geometrii i funkcji lewej komory serca w badaniu echokardiograficznym (grupa B).....	52
Tabela 23. Ocena związku pomiędzy stężeniem ADMA, a danymi klinicznymi i laboratoryjnymi dla badanej populacji.....	54
Tabela 24. Ocena związku pomiędzy stężeniem ADMA, a danymi echokardiograficznymi i naczyniowymi dla badanej populacji.....	54

## 16 Piśmiennictwo

1. Yellon DM, Hausenloy DI. Myocardial reperfusion injury. *N Eng J Med.* 2007; 357: 1121-1135.
2. Zdrojewski T, Broda G, Goryński P, i wsp. Wybrane elementy epidemiologii chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. In: Podolec P, Podręcznik Polskiego Forum Profilaktyki. eds. *Medycyna Praktyczna Kraków* 2007: 89-94.
3. Myerburg RJ, Kessler KM, Castellanos A. Sudden cardiac death: epidemiology, transient risk and intervention assessment. *Ann Intern Med.* 2005;119:1187-1197.
4. Ingarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 1987; 61: 866-879.
5. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.
6. Paes Landim MB, Casella-Filho A, Palandri Chagas AC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics.* 2009; 64: 471-478.
7. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 336: 1-17.
8. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 61-86.
9. Ścibor D, Czeczot H. Arginina- metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Postępy Hig Med Dośw.* 2004; 58: 321-332.
10. Ścibor D, Czeczot H. Arginina- metabolizm i funkcje w układzie sercowo-naczyniowym. *Adv Clin Exp Med.* 2005; 14: 1041-1050.
11. Raghavan SAV, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacol Res.* 2004; 49: 387-414.
12. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357: 593-615.
13. Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.
14. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem.* 2004; 4: 823-832.

15. Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, et al. From molecules to mammals: What's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand.* 2003; 179: 123-135.
16. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
17. Davis KL, Martin E, Turko IV, et al. Novel effects of nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 203-236.
18. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, et al. Translational control of inducible Nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *PNAS* 2003; 100: 4843-4848.
19. Fischmeister R, Mery PF. Regulation of cardiac calcium channels by cGMP and NO in Molecular physiology and pharmacology of cardiac ion channels and transporters. In: Morad M, Ebashi S, Trautwein W, Korachi U, eds. Kluwer Academic Publishers, London 1997: 93-105.
20. Sawada N, Itoh H, Yamashita J, et al. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 26: 798-805.
21. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S- nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9:160-168.
22. Hogg N. The biochemistry and physiology of s- nitrosothiols. *Ann. Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42: 585-600.
23. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, Błaszczak i wsp. Metabolizm tlenku azotu. *Wiadomości Lekarskie* 2006; LIX: 889-893.
24. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
25. Colonna De Gennaro V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit.* 2009; 15: RA91-101.
26. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001; 104: 2569-2575.
27. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2003; 108: 933-938.



28. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: A cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis.* 2005; 46: 186-202.
29. Lee JH, Cooke JR, Yang ZH, et al. A new protein arginine methyltransferase that synthesized symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem.* 2005; 280: 3656-3664.
30. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the symmetric dimethylarginine, dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1023-1030.
31. Osnai T, Saitoh M, Sasaki S, et al. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2003; 42: 985-990.
32. 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
33. Cook JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032-2037.
34. Napora M, Zdrojewski Z. Znaczenie asymetrycznej dimetyloargininy ( ADMA) w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. *Nefrol Dial Pol.* 2006; 10: 95-100.
35. Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric Dimethylarginine Causes Hypertension and Cardiac Dysfunction in Humans and Is Actively Metabolized by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1455-1459.
36. Leiper J, Mac Allister R, Whitley G, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deaminases. *Biochem J.* 1999; 343: 209-214.
37. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Marked increased of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13. 170-176.
38. Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, et al. Net renal extraction of asymmetrical ( ADMA) and symmetrical ( SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 1999-2002.
39. Dayoub H, Achan V, Adimoolam SI, et al. DDAH regulates NO synthesis, genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108: 3042-3047.

40. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, et al. Cardiovascular effect of systemic Nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*. 2004;109:1455-1459.
41. 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: 143-147.
42. Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S, et al. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke*. 2006; 37: 2024-2029.
43. Mac Allister RJ, Rambašek MH, Vallnce R, et al. Concentration dimethylarginine in the plasma of patients with end stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 2449-2452.
44. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1997; 51: 1678-1695.
45. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*. 2000; 356; 147-152.
46. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci 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.
47. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, et al. 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: 2449-2445.
48. 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.
49. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine. The über marker? *Circulation* 2004; 109: 1813-1818.
50. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of Nitric Oxide Synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1557-1564.
51. Chan JR, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemia humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1040-1046.
52. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous Nitric Oxide Synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999; 99: 1141-1146.

53. Napora M, Zdrojewski Z. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) jako czynnik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. *Nefrol Dial Pol.* 2007; 11: 121-125.
54. Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, et al. Risk of acute coronary event and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001; 358: 2127-2128.
55. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, et al. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular event after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003; 24: 1912-1919.
56. Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, et al. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the influence of ADMA concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J.* 2006; 152 : e1 – 8.
57. Teerlink T. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43: 1130-1138.
58. Schulze F, Wasemann R, Schwedheim R, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 1377-1383.
59. Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, et al. Nitric Oxide Synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens.* 1997; 15: 901-909.
60. Böger RH, Bode- Böger SM., Thiele W, et al. Biochemical evidence for impaired Nitric Oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1997; 95: 2068-2074.
61. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevation of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2039-2044.
62. Usui M, Matsuo H, Miyazaki H, et al. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci.* 1998; 62: 25-30.
63. Savvidou M, Hingorani A, Tsikas D, et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentration of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet.* 2003; 361: 1511-1517.
64. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, et al. Plasma level of asymmetrical dimethylarginine in patients with congenital heart disease and pulmonary

- hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 37: 489-492.
65. Zoccali C, Bode- Böger SM, Mallamaci F, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet.* 2001; 358: 2113-2117.
66. Hörl WH. Uremic toxins. New aspects. *J Nephrol.* 2000; 13 Suppl: s83-88.
67. Napora M, Zdrojewski Z. Rola asymetrycznej dimethylargininy (ADMA) w chorobach nerek. *Nefrol Dial Pol.* 2007; 11: 70-73.
68. Yang TL, Chen MF, Xia X, et al. Effect of fenofibrate on the level of asymmetric dimethylarginine in individuals with hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62: 179-184.
69. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains „L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *Nutr.* 2004; 134: 2842-2847.
70. 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.
71. Jee SH, Boulware LE, Guallar E, et al. Direct, progressive association of cardiovascular risk factors with incident proteinuria: results from the Korea Medical Insurance Corporation (KMIC) study. *Arch Intern Med.* 2005; 165: 2299–2304.
71. Tanihara S, Hayakawa T, Oki I, et al. NIPPON DATA Research Group. Proteinuria is a prognostic marker for cardiovascular mortality: NIPPON DATA 80, 1980–1999. *J Epidemiol.* 2005; 15: 146–153.
73. Festa A, D’Agostino R, Howard G, et al. Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects: the insulin resistance atherosclerosis study. *Kidney Int.* 2000; 58: 1703–1710.
74. Barzilay JI, Peterson D, Cushman M, et al. The relationship of cardiovascular risk factors to microalbuminuria in older adults with or without diabetes mellitus or hypertension: the cardiovascular health study. *Am J Kidney Dis.* 2004; 44: 25–34.
75. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia.* 1989; 32: 219–226.
76. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 168–175.

77. Stehouwer CD, Henry RM, Dekker JM, et al. Microalbuminuria is associated with impaired brachial artery, flow-mediated vasodilation in elderly individuals without and with diabetes: further evidence for a link between microalbuminuria and endothelial dysfunction – the Hoorn Study. *Kidney Int.* 2004; 92: S42–S44.
78. Jawa A, Nachimuthu S, Pendergrass M, et al. Impaired vascular reactivity in African American patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria or proteinuria despite angiotensin converting enzyme inhibitor therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 31–35.
79. Paisley KE, Beaman M, Tooke JE, et al. Endothelial dysfunction and inflammation in asymptomatic proteinuria. *Kidney Int.* 2003; 63: 624–633.
80. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032–2037.
81. Zoccali C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: A new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 314–320.
82. 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.
83. 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.
84. Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, et al. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006; 49: 351–359.
85. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis.* 2005; 46: 186–202.
86. 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.
87. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, et al. 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.
88. Fine LG, Orphanides C, Norman JT. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl.* 1998; 65: S74–S78.

89. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 17-25.
90. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, et al. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol.* 2002; 161: 239-248.
91. Kang DH, Joly AH, Oh SW et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: Part I: potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 1434-1447.
92. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2567-2578.
93. Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 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
94. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction Its Role in Hypercholesterolemia *Circulation.* 1998; 98: 1842-1847.
95. Hasanoğlu A, Okur I, Ören AC, et al. The levels of asymmetric dimethylarginine, homocysteine and carotid intima-media thickness in hypercholesterolemic children. *The Turkish Journal of Pediatrics.* 2011; 53: 522-527.
96. Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.* 1987;138: 550-565.
97. MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int.* 1994; 45: 737-742.
98. Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, et al. Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients: relation to vessel wall morphology. *Circulation.* 1994; 89: 1615-1623.
99. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20: S60 –S62.
100. Krzyżanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, et al. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30: 1834 -1839.

101. Terekeci HM, Oktenli C, Ozgurtas T, et al. Increased asymmetric dimethylarginine levels in young men with familial Mediterranean fever (FMF): Is it early evidence of interaction between inflammation and endothelial dysfunction in FMF? *J Rheumatol.* 2008; 35: 2024–2029.
102. Tsioufis C, Dimitriadis K, Andrikou E, et al. ADMA, C-reactive protein, and albuminuria in untreated essential hypertension: A cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* 2010; 55: 1050–1059.
103. Konukoglu D, Firtina S, Serin O. The relationship between plasma asymmetrical dimethyl-L arginine and inflammation and adhesion molecule levels in subjects with normal, impaired and diabetic glucose tolerance. *Metabolism.* 2008; 57: 110-115.
104. Owczarek D, Cibor D, Mach T. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), arginine, and 8-iso-prostaglandin F2alpha (8-iso-PGF2alpha) level in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16: 52-57.
105. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci 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.
106. Aucella F, Maas R, Vigilante M, et al. Methylarginines and mortality in patients end stage renal disease: a prospective cohort study. *Atherosclerosis* 2009; 207: 541– 545.
107. Tripepi G, Raso FM, Sijbrands E, et al. Inflammation and Asymmetric Dimethylarginine for Predicting Death and Cardiovascular Events in ESRD Patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 1714–1721.
108. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, et al. CREED Investigators. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 490–496.
109. Zhang GG, Bai YP, Chen MF, et al. Asymmetric dimethylarginine induces TNF alpha production via ROS/NF-kappaB dependent pathway in human monocytic cells and the inhibitory effect of reinoside C. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48: 115-121.
110. Chen MF, Xie XM, Yang TL, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J Vasc Res.* 2007; 44: 391–402.

111. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, et al. Symmetric Dimethylarginine as a Proinflammatory Agent in Chronic Kidney Disease Clin J Am Soc Nephrol. 2011; 6: 2374 -2383.
112. Kwaśny-Krochin B, Głuszko P, Undas A. Plasma asymmetric dimethylarginine in rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation Pol Arch Med Wewn. 2012; 122: 270-276.
113. Bakris GL, Williams M., Dworkin L, e. Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group. Am J Kidney Dis. 2000; 36: 646-661.
114. Dominiczak AF, Bohr DF. Nitric oxide and its putative role in hypertension. Hypertension. 1995; 25: 1202-1211.
115. Arnal J-F, Michel J-B, Harrison DG. Nitric oxide in the pathogenesis of hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1995; 4: 182-188.
116. Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23: 1455-1459.
117. MacAllister R, Vallance P. Nitric oxide in essential and renal hypertension. J Am Soc Nephrol. 1994; 5: 1057-1065.
118. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, et al. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. Hypertension. 1997; 29: 242-247.
119. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. Circulation. 2003; 108: 3042-3047.
120. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. Circulation. 1999; 99: 1141-1146
121. Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, et al. Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 2176-2183.



122. Wang D, Strandgaard S, Iversen J et al. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296: R195-200.
123. Taner A, Unlu A, Kayrak M, et al. The value of serum asymmetric dimethylarginine levels for determination of masked hypertension in patients with diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013; 228: 432-437.
124. 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.
125. Fujimi-Hayashida A, Ueda S, Yamagishi S, et al. Association of asymmetric dimethylarginine with severity of kidney injury and decline in kidney function in IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2011; 33: 1-6.
126. Fujii H, Kono K, Nakai K, et al. Renin Angiotensin System Inhibitors Reduce Serum Asymmetric Dimethylarginine Levels and Oxidative Stress in Normotensive Patients with Chronic Kidney Disease. *Nephron Extra*. 2014; 4: 18–25.
127. Klima Ł, Kawecka-Jaszcz K, Stolarz-Skrzypek K, et al. Structure and function of large arteries in hypertension in relation to oxidative stress markers *Kard. Pol*. 2013; 71: 917–923.
128. Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1296–1305.
129. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end stage renal disease therapy. *Kidney Int*. 1995; 47: 186–192.
130. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Hypertension (ESH). *J Hyperten*. 2007; 25: 1105–1187.
131. Devereux RB, Alonso D, Lutas EM, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy, comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*. 1986; 57: 450–455.
132. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* 2010; 303: 423–429.

133. Eknoyan G, Lameire N, Eckardt E. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease *Kidney Int.* 2013; 3: 1-163.
134. Lieb W, Benndorf RA, Benjamin E, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine, l arginine and left ventricular structure and function in a community-based sample *Atherosclerosis* 2009; 204: 282–287.
135. Nardi E, Palermo A, Mule G, et al. Left ventricular hypertrophy and geometry in hypertensive patients with chronic kidney disease *J Hyperten.* 2009, 27: 633–641.
- 136 Grabysa R, Wańkiewicz Z. Echocardiographic markers of left ventricular dysfunction among men with uncontrolled hypertension and stage 3 chronic kidney disease. *Med Sci Monit.* 2013; 19: 838-845.
137. Edwards NC, Hirth A, Ferro CJ et al. Subclinical Abnormalities of Left Ventricular Myocardial Deformation in Early-Stage Chronic Kidney Disease: The Precursor of Uremic Cardiomyopathy? *J Am Soc Echocardiogr.* 2008; 21: 1293 1298.
138. Napora M, Graczykowska A, Próchniewska K, et al. Relationship between serum asymmetric dimethylarginine and left ventricular structure and function in patients with end stage renal disease treated with hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn.* 2012; 122: 226-234.
139. Lu TM, Ding YA, Leu HB, et al. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2004; 94: 157– 161.
140. Bai Y, Sun L, Du L, et al. Association of circulating levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with carotid intima-media thickness: evidence from 6168 participants. *Ageing Res Rev.* 2013;12: 699-707.
141. Furuki K, Adachi H, Matsuoka H, et al. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery: an epidemiological study. *Atherosclerosis.* 2007; 191: 206–210.
142. Guerin AP, Pannier B, Metivier F, et al. Assessment and significance of arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008; 17: 635–641.

143. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 1999; 99: 2434–2439.
144. Van Guldener C, Lambert J, Janssen MJ, et al. Endotheliumdependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl.* 1997; 12(Suppl. 2): 14–18.
145. Van Guldener C, Janssen MJ, Lambert J, et al. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transpl.* 1998; 13: 1782–1786.
146. Lilitkarntakul P, Dhaun N, Melville V, et al. Blood pressure and not uraemia is the major determinant of arterial stiffness and endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease and minimal co-morbidity *Atherosclerosis.* 2011; 216: 217–225.
147. Wang MC, Tsai WC, Chen JY, et al. Stepwise increase in arterial stiffness corresponding with the stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2005; 45: 494–501.
148. Matsuda N, Takei T, Fujiu A, et al. Arterial stiffness in patients with non-diabetic chronic kidney disease (CKD). *J Atheroscl Thromb.* 2009; 16: 57–62.
149. Maas R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc.Med.* 2005; 10: S49-57.
150. Park SH, Hyun SH, Ryu HM, et al. Effects of losartan and pentoxifylline on renal dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 expression in proteinuric nephropathy. *Am J Nephrol.* 2013; 37: 491-500.
151. Luo Z, Teelink T, Griedling K, et al. Angiotensin II and NADPH oxidase increase ADMA in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2010; 56: 498-504.
152. Chen MF, Xie XM, Yang TL, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *Vasc Res.* 2007; 4: 391-402.
153. Sahin G, Akay OM, Bal C. The effect of calcineurin inhibitors on endothelial and platelet function in renal transplant patients. *Clin Nephrol.* 2011; 76: 218-225.
154. Graff J, Klinkhardt U, Harder S, et al. Immunosuppressive therapy regimen and platelet activation in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72: 411-418.
155. Wnuk Z, Kokot F, Kunsdorf-Wnuk A. Diagnostic value of plasma asymmetric and symmetric dimethylarginine levels in liver transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn.* 2012 ;12: 367-373.

156. Bultink IEM, Teerlink T, Heijst JA, et al. Raised plasma levels of asymmetric dimethylarginine are associated with cardiovascular events, disease activity, and organ damage in patients with systemic lupus erythematosus  
*Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 1362-1365.
157. Päivä H, Laakso J, Lehtimäki T, et al. Effect of high-dose statin treatment in plasma concentration of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 41: 219–222.
158. Oguz A, Uzunlulu M. Short term fluvastatin treatment lowers serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with metabolic syndrome. *Int Heart J.* 2008; 49: 303–311.
159. Beltowski J, Kędra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep.* 2006; 58: 150–178.
160. Kurtoglu E, Balta S, Sincer I, et al. Comparison of Effects of Rosuvastatin Versus Atorvastatin Treatment on Plasma Levels of Asymmetric Dimethylarginine in Patients With Hyperlipidemia Having Coronary Artery Disease. *Angiology* 2013; Oct 24
161. Dhaun N, Vanessa Melville V, Blackwell S. Endothelin-A Receptor Antagonism Modifies Cardiovascular Risk Factors in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24: 31-36.
162. Fujiwara N, Nakamura T, Sato E, et al. Renovascular Protective Effects of Erythropoietin in Patients with Chronic Kidney Disease. *Intern Med.* 2011; 50: 1929-1934.