

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

Η επίδραση της Ν-ακετυλοκυστεΐνης στα επίπεδα ασυμμετρικής διμεθυλαργινίνης και μονοξειδίου του αζώτου αιμοκαθαιρόμενων ασθενών

ΣΚΟΠΟΣ Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης της αντιοξειδωτικής ουσίας Ν-ακετυλοκυστεΐνης (NAC) στα επίπεδα της ασυμμετρικής διμεθυλαργινίνης (ADMA) και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) ορού αιμοκαθαιρόμενων ασθενών. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Εξετάστηκαν 48 ασθενείς, 25 άνδρες και 23 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας τα 56,9±9,3 έτη, σε θεραπεία με πρόγραμμα αιμοκάθαρσης, 3 φορές την εβδομάδα, οι οποίοι έλαβαν από του στόματος NAC σε δόση 1.200 mg ημερησίως, για 6 μήνες. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε έλεγχο αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων νεφρικής λειτουργίας και επιπέδων NO και ADMA ορού, σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην έναρξη και με την ολοκλήρωση της περιόδου μελέτης. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η λήψη της NAC σχετίστηκε με στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης, του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και της ποσοστιαίας αναλογίας ουδετεροφίλων, με σημαντική μείωση των επιπέδων CRP και με αύξηση των ολικών λευκωμάτων και των επιπέδων λευκωματίνης ορού. Ακόμη, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση τιμών της ADMA και αξιολογή αύξηση των επιπέδων NO. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Από τα αποτελέσματα της μελέτης προέκυψε πιθανή ευεργετική επίδραση της εξάμηνης λήψης NAC στα επίπεδα του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης NO και στα επίπεδα της ουραιμικής τοξίνης ADMA, ουσίας με δράση αναστολέα της NOS. Μένει να αποσαφηνιστεί αν οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι αποτέλεσμα κοινού αντιοξειδωτικού μηχανισμού ή προϊόντα ανεξάρτητων βιοχημικών οδών. Απαιτείται διεξοδικότερη έρευνα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σύμφωνα με μεγάλο όγκο δεδομένων, είναι πλέον σαφές ότι ασθενείς με νεφρικά νοσήματα παρουσιάζουν υψηλή θνητότητα και χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης. Ειδικότερα, ασθενείς με στάδιο 5 χρόνιας νεφρικής νόσου (XNN) σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση αντιμετωπίζουν υψηλό κίνδυνο πρόωρου θανάτου, γεγονός που αποδίδεται στο βαρύ φορτίο καρδιαγγειακής νόσου.

Ο επιπολασμός καρδιαγγειακών νοσημάτων σε νεφροπαθείς ανέρχεται σε ποσοστό >50%, ακόμη και πριν από την εγκατάσταση τελικού σταδίου και την ένταξη σε αιμοκάθαρση. Εκτιμάται ότι ο κίνδυνος αιμοκαθαιρόμενου ασθενούς 30 ετών είναι παρόμοιος με τον υπολογιζόμενο κίνδυνο ατόμου 70–80 ετών χωρίς διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας¹ και υπολογίζεται 10–20 φορές υψηλότερος

σε σχέση με άτομα του γενικού πληθυσμού, αντίστοιχων χαρακτηριστικών.¹

Οι παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα των Foley at al² αποτέλεσαν την αφετηρία για σειρά ερευνών με αντικείμενο τη βαρύτητα, τα χαρακτηριστικά της και το είδος της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας των αιμοκαθαιρόμενων. Βάσει αυτών, σημαντικό μέρος της καρδιαγγειακής νόσου φάνηκε να σχετίζεται με τη συνάθροιση γνωστών, παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου, όπως είχαν περιγραφεί στη μελέτη του Framingham.³ Ωστόσο, σε επόμενες αναλύσεις κατέστη σαφές ότι η έκφραση των κλασικών παραγόντων μόνο δεν επαρκούσε για την ερμηνεία της σημαντικής αύξησης της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας και της συνολικά κακής έκβασης των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014, 31(6):693–701
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2014, 31(6):693–701

Ι. Γιαννικουράς,¹
Χ. Πετρίχου,¹
Δ. Περρέα,²
Π. Αλιβάνης³

¹Μονάδα Χρόνιας Αιμοκάθαρσης, Ιατρικό Θεραπευτήριο Ιλίου, Ίλιον Αττικής

²Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας, «Ν.Σ. Χρηστέας», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

³Νεφρολογική Κλινική και Μονάδα Τεχνητού Νεφρού, Γενικό Νοσοκομείο Ρόδου «Ανδρέας Παπανδρέου», Ρόδος

The effect of N-acetylcysteine on the serum levels of asymmetric dimethylarginine and nitrogen oxide in patients on hemodialysis

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Αιμοκάθαρση
Ασυμμετρική διμεθυλαργινίνη
Μονοξείδιο αζώτου
Ν-ακετυλοκυστεΐνη

Υποβλήθηκε 16.3.2014

Εγκρίθηκε 29.3.2014

Έτσι, αναγνωρίστηκαν συμπληρωματικοί παράγοντες, οι λεγόμενοι μη κλασικοί (μη παραδοσιακοί), ειδικοί της ουραιμίας παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Στο πλαίσιο αυτό, ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των τοξινών, όπως η ασυμμετρική διμεθυλαργινίνη (ADMA), η πεντραξίνη-3, μόρια προσκόλλησης και άλλες.⁴ Ειδικότερα, η ADMA φαίνεται ότι διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου⁵⁻⁷ και στην εμφάνιση μυοκαρδιακής ίνωσης που παρουσιάζουν οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς.⁸ Εμπλέκεται στην απελευθέρωση και τη βιοδιαθεσιμότητα του –ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης– μονοξειδίου του αζώτου (NO), στη διαταραχή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και στο οξειδωτικό stress. Η ουσία τείνει να θεωρείται νεότερος παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου,⁹⁻¹³ καθώς και ουραιμική τοξίνη.¹⁴

Η ADMA παρουσιάζει δομική συγγένεια προς το αμινοξύ L-αργινίνη και εμπλέκεται στις μεταβολικές δράσεις αυτού, στη βιοσύνθεση του NO και στη λειτουργία του ενδοθηλίου. Ασκεί ανταγωνιστική αναστολή της συνθετάσης του NO (NOS),¹⁵ συντελώντας στην ατελή οξειδωση της L-αργινίνης προς NO και στην απελευθέρωση υπεροξειδικού ανιόντος. Οι συνέπειες των ανωτέρω δράσεων είναι πολλαπλές. Προκαλείται μείωση επιπέδων του NO και πυροδοτείται διαταραχή οξειδοαναγωγικού δυναμικού, οξειδωτικό stress, αντι-αγγειογενετική δράση και επαγωγή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στο αγγειακό ενδοθήλιο. Ακόμη, παρατηρείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, έναρξη και εξέλιξη αθηροσκληρωτικών διαδικασιών και τελικά διαταραχή της καρδιαγγειακής λειτουργίας.

Αύξηση στη συγκέντρωση της ADMA σε επίπεδα 2–3 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.¹⁶ Αυξημένα επίπεδα αναφέρθηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με νεφρική νόσο ήδη από το 1992,¹⁷ εύρημα που τεκμηριώθηκε σε επόμενες μελέτες.^{18,19} Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν για αύξηση της ADMA σε διπλάσια έως εξαπλάσια επίπεδα,²⁰ τα οποία δεν φαίνεται να υποχωρούν σημαντικά μετά από θεραπείες υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική νόσο (ΤΣΧΝΝ). Αποδίδονται στην υπέρμετρα αυξημένη παραγωγή της ουσίας, η οποία εντατικοποιείται σε έδαφος νεφρικών νοσημάτων, και στη μειωμένη απομάκρυνση, συνεπεία της αδρανοποίησης των ενζυμικών συστημάτων καταβολισμού και της ελαττωμένης νεφρικής αποβολής.²¹

Το NO έχει ταυτιστεί με το ενεργό μόριο του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης (endothelium-derived relaxing factor, EDRF). Η δραστηριότητά του ελέγχεται από κυτταροκίνες και από παράγοντες που επιδρούν και διασυνδέουν το ανοσοποιητικό σύστημα με το καρδιαγγεια-

κό, το νευρικό²² και το ενδοκρινικό σύστημα.²³ Σχηματίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό υπό τον έλεγχο ενός εκ των τριών ισομορφών του ενζύμου συνθετάση του NOS, της νευρωνικής (neuronal NOS, nNOS) τύπου I, της επαγόμενης (inducible NOS, iNOS) τύπου II και της ενδοθηλιακής (endothelial NOS, eNOS) τύπου III.²⁴ Η iNOS επάγεται στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα μακροφάγα μετά τη διέγερσή τους από κυτταροκίνες, λιποπολυσακχαρίτες και άλλους ανοσοολογικούς παράγοντες. Το ένζυμο φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων. Αυτές έχουν τη δυνατότητα να αδρανοποιούν το ανιόν του σουπεροξειδίου, το οποίο ασκεί αρνητική παλίνδρομη δράση στη NOS και κατά συνέπεια στη σύνθεση του NO.²⁵

Το NO απορροφά οξειδωτικό φορτίο κατά την αντίδραση με άλλες οξυγονούχες ρίζες, όπως το υποχλωριώδες οξύ²⁶ και την υδροξυλική ρίζα,²⁷ προκαλώντας την εξουδετέρωσή τους. Αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, έχει αντιπυροπλαστική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και πιθανόν διαμεσολαβεί στην οξειδωτική ιστική βλάβη, ενώ εμπλέκεται και στην ανοσορρύθμιση.

Η προσωρινή ελάττωση των επιπέδων ADMA μέσω αιμοκάθαρσης φαίνεται ότι βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία,²⁸ ενώ η λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών σχετίζεται με εμμένουσα μείωση και ευεργετική επίδραση στη μακροχρόνια έκβαση των αιμοκαθαιρόμενων. Το τελευταίο αναδείχθηκε σε μελέτες σχετικές με τη δράση της Ν-ακετυλοκυστεΐνης στα επίπεδα της ADMA.²⁹ Σε πρόσφατες δημοσιεύσεις,³⁰⁻³² τεκμηριώθηκε πιθανή ευεργετική επίδραση της λήψης NAC στη διατήρηση της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.

Με αφετηρία τα παραπάνω διεξήχθη η παρούσα μελέτη, η οποία σκοπό είχε την αξιολόγηση της επίδρασης της αντιοξειδωτικής ουσίας NAC στα επίπεδα της ADMA και του NO του ορού αιμοκαθαιρόμενων ασθενών. Για χρονικό διάστημα 6 μηνών, αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς έλαβαν από του στόματος NAC σε δόση 1.200 mg ημερησίως. Ακολούθησε συγκριτική μελέτη αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων, καθώς και της ADMA και του NO.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Για τις ανάγκες της μελέτης εξετάστηκαν 48 ασθενείς, 25 άνδρες και 23 γυναίκες, ηλικίας 31–80 ετών, με μέσο όρο ηλικίας τα 56,9±9,3 έτη (μέση τιμή και σταθερή απόκλιση), σε θεραπεία με πρόγραμμα αιμοκάθαρσης 3 φορές την εβδομάδα. Η διάρκεια της θεραπείας παρουσίασε διακύμανση από 12–138 μήνες και μέση

διάρκεια η οποία ανήλθε στους 43 ± 31 μήνες. Η επιλογή των ασθενών για την ένταξη στον υπό μελέτη πληθυσμό πραγματοποιήθηκε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια: Παρουσία χρόνιας νεφρικής νόσου τελικού σταδίου ανεξαρτήτως αιτιολογίας, διάρκεια θεραπείας με αιμοκάθαρση 12 μήνες τουλάχιστον, αποτελεσματικότητα αποδιδόμενης αιμοκάθαρσης σε πλήρη αντιστοιχία με τις κατευθυντήριες οδηγίες της K/DOQI αναφορικά με τη συχνότητα, τη διάρκεια και την επάρκεια αυτής, όπως προσδιορίζεται από το δείκτη $spKt/V$ και, συγκεκριμένα, πρόγραμμα αιμοκάθαρσης 3 φορές την εβδομάδα, τετράωρης διάρκειας (συνολικά 12 ώρες εβδομαδιαία), αποτελεσματικότητα βάσει δείκτη $spKt/V \geq 1,2-1,4$ και συμμόρφωση προς τη χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή. Δόθηκε έγγραφη συγκατάθεση κατόπιν ενημέρωσης των ασθενών.

Αντίθετα, κριτήρια αποκλεισμού ασθενών αποτέλεσαν τα παρακάτω: Διάρκεια θεραπείας υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και αιμοκάθαρσης <12 μήνες, διαγνωσμένη χρόνια φλεγμονώδης νόσος λοιμώδους ή ιδιοπαθούς αιτιολογίας, επιβεβαιωμένη βακτηριαμία ή και σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, ατομικό ιστορικό ή ενεργό πεπτικό έλκος, γνωστή υπερευαισθησία στη NAC και πλημμελής συμμόρφωση.

Τα παραπάνω αποτέλεσαν και κριτήρια απένταξης από τη μελέτη σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκειά της στην προσπάθεια να διασφαλιστεί η αποφυγή παραγόντων που ενδεχομένως θα είχαν επίπτωση στις παραμέτρους που επρόκειτο να προσδιοριστούν.

Η πρωτοπαθής νεφρική νόσος ήταν διαβητική νεφροπάθεια σε 19 ασθενείς (ποσοστό 40% επί του συνόλου), χρόνια σπειραματοπάθεια σε 9 ασθενείς, με ιστολογική τεκμηρίωση σε δύο περιπτώσεις (ποσοστό 18%), άγνωστη (πρώτη διάγνωση χρόνιας νεφρικής νόσου στο τελικό στάδιο αυτής) σε 13 ασθενείς (ποσοστό 27%), υπερτασική νεφροσκληρυνση σε 2 ασθενείς (ποσοστό 4%) και, τέλος, άλλες αιτίες (ανοσοπενική αγγειίτιδα, πολυκυστική νόσος νεφρών, νεφρεκτομή σε συγγενή μονόνεφρο και διαμεσοσωληνιακή νεφροπάθεια) σε 5 ασθενείς (ποσοστό 10%).

Ο τύπος της αγγειακής προσπέλασης ήταν η αυτόλογη αρτηριοφλεβική αναστόμωση (arteriovenous fistula, AVF) σε 32 ασθενείς (ποσοστό 67%), το αρτηριοφλεβικό μόσχευμα (arteriovenous graft, AVG) σε 4 ασθενείς (ποσοστό 8%) και ο μόνιμος κεντρικός φλεβικός καθετήρας (central venous catheter, CVC) σε 12 ασθενείς (ποσοστό 25%). Η αποτυχία και η αντικατάσταση της αγγειακής προσπέλασης σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή της περιόδου μελέτης αποτέλεσε αιτία απένταξης του συγκεκριμένου ασθενούς.

Η μέθοδος εξωνεφρικής κάθαρσης ήταν η κλασική αιμοκάθαρση (intermittent hemodialysis, IHD) σε 31 ασθενείς (ποσοστό 64%) και η αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration, HDF) με on-line παραγωγή υγρών αναπλήρωσης με τη μέθοδο της μεταραιωτικής έγχυσης σε 17 ασθενείς (ποσοστό 36%). Τα φίλτρα αιμοκάθαρσης που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν μόνο συνθετικές μεμβράνες αιμοκάθαρσης τριχοειδικής δομής και, συγκεκριμένα, πολυσουλφόνης και πολυαιθεροσουλφόνης, επιφάνειας με διακύμανση από $1,5-1,9 \text{ m}^2$ ($1,7 \pm 0,1 \text{ m}^2$). Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες χαμηλής διαπερατότητας (low flux, LF) για τους ασθενείς σε θεραπεία με

κλασική αιμοκάθαρση και υψηλής διαπερατότητας (high flux, HF) για εκείνους σε on-line αιμοδιαδιήθηση.

Η διάρκεια της συνεδρίας ήταν 240 min, η ταχύτητα της αντλίας αίματος (Q_b) $325 \pm 23 \text{ mL/min}$ για τις περιφερικές αγγειακές προσπελάσεις και $290 \pm 23 \text{ mL/min}$ για τους κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες και ο ρυθμός της ροής διαλύματος αιμοκάθαρσης (Q_d) 500 mL/min . Για τους ασθενείς σε θεραπεία με αιμοδιαδιήθηση ο ρυθμός έγχυσης υγρών αναπλήρωσης ήταν 150 mL/min . Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία διαλύματος και υγρών αναπλήρωσης ανερχόταν σε $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Στόχος ήταν η επίτευξη κατώτατου ορίου και ορίου στόχου-δείκτη μονοδιαμερισματικής κατανομής $spKt/V$ 1,2 και 1,4, αντίστοιχα, και ρυθμού μείωσης της ουρίας (urea reduction ratio, UUR) 65% και 70%, αντίστοιχα. Όλα τα παραπάνω παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης, η οποία καθορίστηκε στους 6 μήνες, χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι ασθενείς έλαβαν από του στόματος NAC σε δόση 600 mg ανά 12 ώρες, υπό τη μορφή διαλυμένων κοκκίων μίας δόσης για πόσιμο υγρό. Συστήθηκε η διάλυση του φαρμάκου σε 50 mL πόσιμου νερού και η λήψη του τουλάχιστον μία ώρα πριν από το μεσημβρινό και το βραδινό γεύμα.

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε έλεγχο των βιοχημικών παραμέτρων νεφρικής λειτουργίας (ουρίας, κρεατινίνης), των ηλεκτρολυτών (ασβεστίου, φωσφόρου, νατρίου, καλίου), των λιπιδίων, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του ουρικού οξέος, των ολικών λευκωμάτων, της λευκωματίνης, της φερίτινης και του σιδήρου ορού. Επίσης, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του NO και της ADMA στον ορό και κατά τον ίδιο τρόπο τα επίπεδα αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης, αιμοπεταλίων, λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και η ποσοστιαία αναλογία αυτών. Από δείγματα ουρίας ορού που ελήφθησαν στην έναρξη και στη λήξη της συνεδρίας αιμοκάθαρσης υπολογίστηκε ο δείκτης $spKt/V$ (single pool Kt/V) με βάση τον τύπο Daugirdas II και ο ρυθμός μείωσης της ουρίας URR.

Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν στην αρχή της περιόδου μελέτης και κατά την ολοκλήρωση αυτής, από δείγματα αίματος που ελήφθησαν με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα που προορίζονταν για τον έλεγχο των αιματολογικών και των βιοχημικών παραμέτρων νεφρικής λειτουργίας η λήψη έγινε από τη βελόνα αιμοκάθαρσης ή το αντίστοιχο σκέλος του κεντρικού φλεβικού καθετήρα, πριν από την έναρξη της συνεδρίας, στο μέσο της εβδομάδας. Καταβλήθηκε προσπάθεια ώστε οι διατροφικές συνήθειες, ο τρόπος ζωής αλλά και το σύνολο της από του στόματος φαρμακευτικής αγωγής που ελάμβαναν οι ασθενείς να παραμείνουν αμετάβλητα. Τέλος, το σύνολο της ενδοφλέβια χορηγούμενης αγωγής κατά τη συνεδρία αιμοκάθαρσης παρέμεινε σταθερό τόσο ως προς τη δοσολογία των φαρμάκων όσο και ως προς τον τύπο των εμπορικών σκευασμάτων, κατά το χρονικό διάστημα των 6 μηνών της μελέτης.

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν περιλάμβαναν 4,5 mL ολικό αίμα σε σωλήνα με EDTA και 10 mL ολικό αίμα σε ξηρό σωλήνα για λήψη ορού. Αυτά που προορίζονταν για τον προσδιορισμό των αιματολογικών παραμέτρων και των τυπικών βιοχημικών εξετάσεων υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν την ημέρα της λήψης. Αντίθετα, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον

προσδιορισμό της ADMA και του NO αρχικά φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχρή φυγόκεντρο (-10 °C), ελήφθη ορός και ακολούθως αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -60 °C μέχρι την ανάλυσή τους. Σημειώνεται ότι σε όλα τα στάδια της διαδικασίας λήψης και κατεργασίας του δείγματος το δείγμα είχε ψυχθεί και κατεργάστηκε χωρίς σημαντική χρονική καθυστέρηση.

Οι αιματολογικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν αφορούσαν στην τιμή του αιματοκρίτη και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, στον αριθμό των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων και στην ποσοστιαία αναλογία των ουδετεροφίλων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων. Προσδιορίστηκαν σε δείγματα ολικού αίματος σε EDTA σωληνάρια, κατόπιν ανακίνησης, από ειδικό αναλυτή Sysmex Hematology Analyzer XT1800i (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Γερμανία).

Ο έλεγχος των βιοχημικών δεικτών συμπεριέλαβε το σάκχαρο, την ουρία, την κρεατινίνη, τους βασικούς ηλεκτρολύτες (ασβέστιο, φωσφορικά άλατα, νάτριο, κάλιο), τα ολικά λευκώματα, τη λευκωματίνη, το ουρικό οξύ, τους δείκτες ηπατικής λειτουργίας, τα λιπίδια και τις λιποπρωτεΐνες, την πρωτεΐνη CRP, καθώς και το σίδηρο και τη φερίτίνη. Τα παραπάνω προσδιορίστηκαν σε δείγματα ορού, κατόπιν φυγοκέντρωσης ολικού αίματος στις 5.000 στροφές/min για 10 min, από αναλυτή Olympus Chemistry Analyzer AU2700 (Olympus Corporation, Tokyo, Ιαπωνία).

Η ADMA προσδιορίστηκε σε δείγματα ορού βάσει μεθόδου ανοσοπροσδιορισμού ανταγωνιστικής ενζυμικής αναστολής. Χρησιμοποιήθηκε το ειδικό αντιδραστήριο enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for asymmetric dimethylarginine (ADMA) της εταιρείας USNC Life Science Inc (Wuhan, Κίνα) (κωδικός αντιδραστήριου CEB301Ge, LOT L130608185).

Ο προσδιορισμός NO σε δείγματα ορού πραγματοποιήθηκε με ειδική ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, με τεχνική sandwich. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Human Nitric Oxide (NO) ELISA kit της εταιρείας CUSABIO, (Wuhan, Κίνα) (κωδικός αντιδραστήριου CSB-E13209h, LOT N24074189).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων συμπεριέλαβε για την περιγραφή των παραμέτρων τον υπολογισμό της μέσης τιμής (mean value, MV) και της σταθερής απόκλισης (standard deviation, SD), καθώς και τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης (confidence interval, CI) της μέσης τιμής για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των παρατηρούμενων μεταβολών. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού Statistical Package for Social Sciences (SPSS®), version 12.0. Τα δεδομένα δεν παρουσίασαν ίσες διακυμάνσεις (variances) και κρίθηκαν μη παραμετρικά. Ο έλεγχος για την κανονικότητα ή μη της κατανομής κάθε παραμέτρου επιτεύχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Για τη σύγκριση των μεταβολών των δεικτών σε σχέση με τη θεραπεία και αναφορικά με τη στατιστική σημαντικότητα αυτών εφαρμόστηκε η μέθοδος Wilcoxon signed-rank test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, από τη σύγκριση των

τιμών των δεικτών spKt/V ($p=0,96$) και URR ($p=0,73$) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των δεικτών αποτελεσματικότητας κάθαρσης. Το εύρημα αυτό επιτρέπει να εξαχθεί με σχετική ασφάλεια το συμπέρασμα ότι η αποδοτικότητα της θεραπείας δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή κατά την περίοδο μελέτης. Έτσι, αποκλείστηκε η επίδραση της μεταβολής της αποτελεσματικότητας της αιμοκάθαρσης στα επίπεδα των υπό έλεγχο παραμέτρων.

Η λήψη της NAC σχετίστηκε με στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης από $11,7 \pm 1,0$ g/dL σε $12,0 \pm 0,7$ g/dL ($p < 0,05$) και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων από $8.003 \pm 2.223/\mu\text{L}$ σε $7.408 \pm 1.800/\mu\text{L}$ ($p < 0,01$), ιδιαίτερα της ποσοστιαίας αναλογίας ουδετεροφίλων (από $67,6 \pm 7,9\%$ σε $64,3 \pm 6,8\%$, $p < 0,01$) και λεμφοκυττάρων (από $21,7 \pm 6,4\%$ σε $23,0 \pm 6,3\%$, $p < 0,001$), χωρίς να μεταβληθεί η δόση της χορηγούμενης ερυθροποιητίνης. Διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή των επιπέδων ουρικού οξέος (από $5,8 \pm 1,0$ mg/dL σε $6,3 \pm 1,5$ mg/dL, $p < 0,01$), φωσφορικών αλάτων και γινομένου ασβεστίου και αλάτων φωσφόρου. Παρατηρήθηκε, επίσης, σημαντική μείωση των επιπέδων CRP (από $0,79 \pm 0,6$ mg/dL σε $0,56 \pm 0,4$ mg/dL, $p < 0,01$) και παράλληλη αύξηση των ολικών λευκωμάτων ορού, η οποία ήταν κυρίως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων λευκωματίνης (από $3,80 \pm 0,4$ g/dL σε $3,98 \pm 0,3$ g/dL, $p < 0,01$), καθώς, όπως φάνηκε, τα επίπεδα γ-σφαιρινών δεν μεταβλήθηκαν ουσιαστικά.

Διαπιστώθηκε, ακόμη, σημαντική αύξηση της ολικής χοληστερίνης και της LDL χοληστερίνης, καθώς και μείωση των επιπέδων τριγλυκεριδίων. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα σιδήρου και φερίτίνης ορού, καθώς δεν μεταβλήθηκε η δοσολογία του ενδοφλέβια χορηγούμενου σιδήρου (πίν. 1). Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης NO από $9,05 \pm 4,57$ ng/mL σε $13,48 \pm 4,9$ ng/mL ($p < 0,01$), που συνοδεύτηκε από παράλληλη και, αντίστοιχα, σημαντική μείωση των τιμών της ADMA από $5,20 \pm 3,39$ ng/mL σε $3,91 \pm 2,09$ ng/mL ($p < 0,05$) (πίν. 2).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ADMA σχηματίζεται ενδοκυττάρια κατά τη μεθυλίωση των υπολειμμάτων L-αργινίνης που προκύπτουν από την πρωτεόλυση πρωτεϊνών του πυρήνα. Η αντίδραση καταλύεται από ομάδα ενζύμων γνωστών ως S-αδενο-μεθειονικές-N-πρωτεϊνικές μεθυλτρανσφεράσες ή πρωτεϊνικές μεθυλτρανσφεράσες (S-adenosylmethionine protein N-methyltransferases, PRMTs).

Η ADMA ασκεί αυτοκρινή ρυθμιστική δράση στα ενδο-

Πίνακας 1. Μη ειδικοί αιματολογικοί και βιοχημικοί δείκτες (μέση τιμή και σταθερή απόκλιση) κατά την έναρξη και με τη συμπλήρωση του διαστήματος λήψης NAC με τις αντίστοιχες τιμές του Wilcoxon test.

Δείκτες	Έναρξη	Λήξη	Wilcoxon paired test	Τιμή p
Αιματοκρίτης (%)	37,2±3,3	38,3±2,5	-1,606	0,108
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	11,7±1,0	12,0±0,7	-2,178	0,029
Λευκά αιμοσφαίρια (/μL)	8.003±2.223	7.408±1.800	-3,050	0,002
Ουδετερόφιλα (%)	67,6±7,9	64,3±6,8	-4,121	0,000
Λεμφοκύτταρα (%)	21,7±6,4	23,0±6,3	-2,643	0,008
Μονοκύτταρα (%)	6,7±1,8	6,1±1,9	-1,729	0,084
Ηωσινόφιλα (%)	4,5±3,3	4,6±3,7	-0,018	0,986
Αιμοπετάλια (/μL)	223.600±58.100	218.600±47.000	-0,919	0,358
Σάκχαρο (mg/dL)	106±40	105±35	-1,348	0,178
Ουρία (mg/dL)	165±38	161±34	-0,625	0,532
Κρεατινίνη (mg/dL)	9,5±1,9	9,8±2,0	-1,014	0,311
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5,8±1,0	6,3±1,5	-2,660	0,008
Νάτριο (mEq/L)	139±3,0	139±3,1	-0,321	0,748
Κάλιο (mEq/L)	5,4±0,8	5,3±0,7	-0,206	0,837
Ασβέστιο (mg/dL)	9,0±0,7	9,1±0,5	-0,036	0,971
Φωσφορικά άλατα (mg/dL)	6,3±1,9	5,7±1,3	-2,605	0,009
Γινόμενο ασβεστίου φωσφόρου (mg ² /dL ²)	56,8±16,5	51,3±10,1	-2,456	0,014
CRP (mg/dL)	0,79±0,6	0,56±0,4	-3,156	0,002
Ολικά λευκώματα (g/dL)	6,55±0,6	6,71±0,4	-2,958	0,003
Λευκωματίνη (g/dL)	3,80±0,4	3,98±0,3	-4,083	0,000
γ-σφαιρίνες (g/dL)	2,75±0,6	2,69±0,4	-0,827	0,408
Ολική χοληστερίνη (mg/dL)	154±35	164±34	-3,283	0,001
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	242±102	222±80	-2,113	0,035
HDL (mg/dL)	38±9	39±9	-1,941	0,052
LDL (mg/dL)	77±27	82±26	-2,459	0,014
Σίδηρος (μg/dL)	86,3±43,7	86,1±41	-0,458	0,647
Φερίτινη (ng/mL)	743,5±277,4	776,3±320,2	-0,884	0,376
iPTH (pg/mL)	379±362	314±297	-4,556	0,000
URR (%)	69,9±5,1	69,5±5,5	-1,824	0,068
spKt/V	1,44±0,19	1,44±0,21	-0,660	0,509

Πίνακας 2. Ειδικοί δείκτες (μέση τιμή και σταθερή απόκλιση) πριν και μετά από την εξάμηνη θεραπεία με NAC με τις αντίστοιχες τιμές του Wilcoxon test.

Δείκτες	Έναρξη	Λήξη	Wilcoxon paired test	Τιμή p
NO (ng/mL)	9,05±4,57	13,48±4,97	-4,426	0,000
ADMA (ng/mL)	5,20±3,39	3,91±2,09	-2,144	0,032

θηλιακά κύτταρα και ακολούθως απελευθερώνεται στη συστηματική κυκλοφορία, παρουσιάζει ηπατικό μεταβολισμό, καθώς και νεφρική απέκκριση. Το μέγεθος της βιολογικής δράσης εξαρτάται από τα επίπεδά της, την ισορροπία ADMA

και L-αργινίνης, καθώς και των συγκεντρώσεων NO, διά μέσου αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Μεταβολίζεται υπό τη δράση του ενζύμου διμεθυλαμινοϋδρολάση της διμεθυλαργινίνης (dimethylarginine dimethylaminohydrolyase, DDAH) σε L-κιτροουλίνη και διμεθυλαμίνη.³³

Η δραστηριότητα της DDAH καθορίζει τα επίπεδα της ADMA, η οποία με τη σειρά της παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Σύμφωνα με *in vitro* και *in vivo* μελέτες, αυξημένο οξειδωτικό stress προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου, συσώρευση ADMA η οποία επιφέρει αναστολή της οδού L-αργινίνης/συνθετάσης του NO, μείωση στην απελευθέρω-

ση NO και εκτροπή προς σχηματισμό ελευθέρων ριζών.^{33,34} Η κατάσταση αυτή υπό παθολογικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε φαύλο κύκλο και κατάρρευση του συστήματος DDAH-ADMA-NOS, με ιδιαίτερα δυσμενείς συνέπειες.³⁵ Η συνεχής συσσώρευση ADMA προκαλεί αναστολή της NOS, μείωση της απελευθέρωσης NO, αύξηση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αναστολή της DDAH, ενώ το μέγεθος της διαταραχής εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ADMA.³⁶ Στην πράξη, η παθοφυσιολογική διαδικασία εκδηλώνεται κυρίως με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε συνδυασμό με την έκφραση μορίων προσκόλλησης και κατάσταση αυξημένου οξειδωτικού stress.³⁷

Η απώτερη συνέπεια είναι η έναρξη και η εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής αγγειακής νόσου,³⁸ καθιστώντας την αύξηση της ADMA σημαντικό μηχανισμό και παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου,³⁹⁻⁴¹ ενώ, σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών, ενοχοποιείται ή, τουλάχιστον, εμπλέκεται στην παθοφυσιολογική εξέλιξη νοσημάτων και καταστάσεων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η ΧΝΝ κάθε σταδίου, η αρτηριακή υπέρταση, η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, η στεφανιαία νόσος, οι δυσλιπιδαιμίες, η υπερομοκυστεϊναιμία, η καρδιακή και η ηπατική ανεπάρκεια και η προεκλαμψία. Ειδικότερα σε ό,τι αφορά στα καρδιαγγειακά νοσήματα, έχει πλέον αποδειχθεί στατιστικά σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ μειζόνων συμβαμάτων ή θανάτου και επιπέδων της ουσίας.⁴²

Το NO έχει ταυτιστεί με το ενεργό μόριο του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης. Το NO συνδέεται με την αίμη του μορίου της γουανυλικής κυκλάσης, ενεργοποιώντας το ένζυμο και καθοδηγεί το σχηματισμό κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP). Η τελευταία, με τη σειρά της, ρυθμίζει τη λειτουργία πρωτεϊνικών κινασών, φωσφοδιεστερασών, ιοντικών καναλιών και άλλων βιολογικά σημαντικών στόχων. Έτσι, η ρύθμιση της λειτουργίας συγκεκριμένης πρωτεϊνικής κινάσης χάλασης των αγγειακών λείων μυϊκών ινών, η οποία προκαλεί φωσφορυλίωση αγγειακής τοιχωματικής αντλίας καλίου, είναι υπεύθυνη για την ισχυρή αγγειοδιασταλτική και ενδεχομένως την ανασταλτική της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων δράση του NO. Φαίνεται ότι μόνιμη σύνθεση NO σε χαμηλές συγκεντρώσεις από το ενδοθήλιο αποτελεί βασικό ρυθμιστή του αγγειακού τόνου και ενδεχομένως αντιοξειδωτικό σχηματισμό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.⁴³

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του NO και της ADMA αιμοκαθαίρομενων ασθενών, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση και στις μεταβολικές δράσεις του NO, διά μέσου της ανταγωνιστικής αναστολής της NOS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εξάμηνη θερα-

πεία με NAC σχετίστηκε με στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων NO και αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της ADMA. Παρατηρήθηκε δηλαδή, κατά τη γνώμη μας, θετική ανταπόκριση του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης NO και του καταστρεπτικού για την ενδοθηλιακή λειτουργία παράγοντα ADMA, στη λήψη NAC.

Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, αναφορικά με την ανταπόκριση των επιπέδων της ADMA και του NO στις θεραπείες υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας (αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση), είναι αντικρουόμενα. Οι Uzun et al⁴⁴ έδειξαν ότι οι αιμοκαθαίρομενοι ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ADMA και χαμηλότερα επίπεδα NO σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Οι Anderstam et al⁴⁵ υποστήριξαν ότι τα επίπεδα της ADMA ήταν υψηλότερα σε νεφροπαθείς ασθενείς σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά μεταξύ αιμοκαθαίρομενων ασθενών και ασθενών σε περιτοναϊκή κάθαρση. Τέλος, σύμφωνα με τα ευρήματα των μελετών των Erdem et al,⁴⁶ των Oner-Lyidogan et al⁴⁸ και των Eiselt et al,⁴⁹ οι αιμοκαθαίρομενοι ασθενείς εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ADMA τόσο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό όσο και σε σχέση με ασθενείς υπό περιτοναϊκή κάθαρση, με δυσμενείς επιπτώσεις για τη μακροχρόνια έκβαση.⁴⁹

Φαίνεται ότι η προσωρινή ελάττωση των επιπέδων ADMA μέσω αιμοκάθαρσης υψηλής αποτελεσματικότητας βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, καθώς αυξάνει την εξαρτώμενη από τη ροή αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilatation, FMD). Αυτό ενδεχομένως προκύπτει από την απομάκρυνση της ADMA με τις θεραπείες υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.²⁸ Συγκεκριμένα, παρατηρείται παροδική μείωση των επιπέδων ADMA, που αποδίδεται σε κάθαρση του μορίου, όπως προέκυψε από τον προσδιορισμό της ουσίας σε δείγματα διηθήματος περιτοναϊκών υγρών ή διηθήματος αιμοκάθαρσης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα, η κάθαρση της ADMA είναι υψηλότερη στην περιτοναϊκή κάθαρση σε σχέση με την αιμοκάθαρση, ενώ κατά τη σύγκριση των μεθόδων αιμοκάθαρσης η αιμοδιαδιήθηση δείχνει να υπερτερεί έναντι της κλασικής αιμοκάθαρσης.²⁸ Επομένως, καθώς η διόρθωση των επιπέδων ADMA και NO κατά τη συνεδρία αιμοκάθαρσης αποδεικνύεται προσωρινή και πλημμελής, προέκυψε η ανάγκη διαμόρφωσης στρατηγικών αποτελεσματικότερης απομάκρυνσης στην ΤΣΧΝΝ.

Η λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών φαίνεται ότι σχετίζεται με εμμένουσα μείωση των επιπέδων της ADMA και ευεργετική επίδραση στη μακροχρόνια έκβαση των αιμοκαθαίρομενων. Η άποψη αυτή αναδείχθηκε σε μελέτες σχετικές με τη δράση του α-λιποϊκού οξέος⁵⁰ και της ακετυλοκυστεΐνης²⁹ στα επίπεδα της ADMA. Πρόσφατα, σε τυχαίοποιημένη,

διπλή-τυφλή μελέτη, τα επίπεδα ADMA 20 αιμοκαθαριζόμενων που έλαβαν ενδοφλέβια δόση 5 g φαρμάκου κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας αιμοκάθαρσης (one-off dose) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικότερη μείωση σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των 20 ασθενών της ομάδας ελέγχου που έλαβαν εικονικό φάρμακο (placebo).²⁹

Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ευεργετική επίδραση της NAC στην αντιμετώπιση της λευκωματουρίας μη διαβητικής αιτιολογίας σε 40 ασθενείς με σταδίου 1–4 ΧΝΝ.⁵¹ Με βάση τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση της ADMA και μεγαλύτερη μείωση της λευκωματουρίας σε ασθενείς που έλαβαν NAC και ανασταλτές του μετατρεπτικού ενζύμου (αΜΕΑ) ή ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης-II (ARB) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε αΜΕΑ ή και ARB, αλλά όχι NAC. Το εύρημα αποδόθηκε στην αποκατάσταση του άξονα των ενζύμων PRMTs-DDAH και των επιπέδων NO, ως αποτέλεσμα του περιορισμού του οξειδωτικού stress στο πλαίσιο της θεραπείας με τη NAC.⁵¹

Ενδιαφέρον παρουσίασε πρόσφατη μελέτη, στην οποία η χορήγηση NAC σε δόση 1.200 mg/ημέρα για δύο εβδομάδες σε 20 αιμοκαθαριζόμενους ασθενείς σχετίστηκε με βελτίωση της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας.³⁰ Διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις της υπολειπόμενης ημερήσιας διούρησης, του νεφρικού εβδομαδιαίου Kt/V και του μετρούμενου GFR, οι οποίες αποδόθηκαν σε αύξηση της νεφρικής αιματικής ροής και σχετίστηκαν με αποκατάσταση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και μείωση της ADMA. Στην ίδια κατεύθυνση κινήθηκαν και τα ευρήματα μελέτης ασθενών σε περιτοναϊκή κάθαρση.³¹ Σε αυτούς διαπιστώθηκε θετική επίδραση της NAC ως προς τη διατήρηση της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας και την αύξηση της ημερήσιας υπολειπόμενης διούρησης, διά μέσου της επίδρασης της ουσίας στα επίπεδα ADMA και NO.

Επιβεβαιωτική της συσχέτισης οξειδωτικού stress, ADMA και NO ήταν η μελέτη των Feldman et al,³² στην οποία βρέθηκε ότι η βελτίωση της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας αιμοκαθαριζόμενων ασθενών μετά από λήψη NAC για δύο εβδομάδες ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με ημισυνθετικές LF μεμβράνες σε σχέση με εκείνους που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με συνθετικές HF μεμβράνες. Κατά τους συγγραφείς, το εύρημα αποδόθηκε στο υψηλότερο οξειδωτικό φορτίο που σχετίζεται με τις λιγότερο βιοσυμβατές ημισυνθετικές μεμβράνες, επιβεβαιώνοντας την ευεργετική επίδραση της NAC στα επίπεδα ADMA και NO σε συνθήκες υψηλού οξειδωτικού stress.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα μελέτη προέκυψε πιθανή ευεργετική επίδραση της εξάμηνης λήψης NAC στα επίπεδα του ενδοθηλιακά παραγόμενου παράγοντα χάλασης NO, καθώς διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών, και στα επίπεδα της ADMA, ουσίας με δράση αναστολέα της NOS, τα οποία παρουσίασαν σημαντική μείωση. Η παρατηρούμενη μεταβολή θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας συνεπεία της μείωσης του οξειδωτικού φορτίου από τη θεραπεία με NAC και πιθανόν οφείλεται στην αποκατάσταση της ισορροπίας των ενζύμων σύνθεσης (PRMTs) και μεταβολισμού (DDAH) της ADMA, η δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται από τα επίπεδα οξειδωτικού stress, με αποτέλεσμα την επανεκκίνηση του συστήματος ADMA-NOS, την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας NO και την περαιτέρω μείωση του οξειδωτικού stress. Ωστόσο, μένει να αποσαφηνιστεί αν οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι αποτέλεσμα κοινού αντιοξειδωτικού μηχανισμού ή προϊόν ανεξάρτητων βιοχημικών οδών.

ABSTRACT

The effect of N-acetylcysteine on the serum levels of asymmetric dimethylarginine and nitrogen oxide in patients on hemodialysis

I. GIANNIKOURIS,¹ C. PETRICHOU,¹ D. PERREA,² P. ALIVANIS³

¹Maintenance Hemodialysis Unit, Ilion Medical Center, Ilion, Attiki, ²"N.S. Christeas" Laboratory of Experimental Surgery and Surgical Research, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School, Athens,

³Nephrology Clinic and Hemodialysis Unit, "Andreas Papandreou" General Hospital of Rhodes, Rhodes, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2014, 31(6):693–701

OBJECTIVE To investigate the effect of oral administration of the antioxidant drug N-acetylcysteine (NAC) on the serum levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and nitrogen oxide (NO) in patients on maintenance hemodialysis. **METHOD** The study was conducted on 48 patients, 25 males and 23 females, aged 56.9±9.4 years, who were on maintenance hemodialysis. The patients received NAC in an oral dose of 600 mg twice daily for a study period of 6 months. Various hematological and biochemical parameters and the serum levels of ADMA and NO were de-

terminated prior to and on completion of the study period. **RESULTS** The white blood cell count, the percentage of neutrophils and the serum levels of C-reactive protein (CRP) were significantly lower, while the levels of uric acid, albumin and hemoglobin were significantly higher at the end of the study period than before treatment with NAC. In addition, statistically significant increase in NO and decrease in ADMA were observed after treatment. **CONCLUSIONS** It appears that treatment with NAC is related to a favorable effect on the levels of the uremic retention molecule ADMA and the endothelial derived relaxant factor, NO, in patients on hemodialysis. Further study will be needed to confirm these findings.

Key words: Asymmetric dimethylarginine, Hemodialysis, N-acetylcysteine, Nitrogen oxide

Βιβλιογραφία

1. FOLEY RN, HERZOG CA, COLLINS AJ. Smoking and cardiovascular outcomes in dialysis patients: The United States Renal Data System Wave 2 study. *Kidney Int* 2003, 63:1462–1467
2. RAINE AE, MARGREITER R, BRUNNER FP, EHRICH JH, GEERLINGS W, LANDAIS P ET AL. Report on management of renal failure in Europe, XXII, 1991. *Nephrol Dial Transplant* 1992, 7(Suppl 2):7–35
3. STENVINKEL P, PECOITS-FILHO R, LINDHOLM B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: No longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:1927–1939
4. KANNEL WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease – six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961, 55:33–50
5. STENVINKEL P, CARRERO JJ, AXELSSON J, LINDHOLM B, HEIMBÜRGER O, MASSY Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: How do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008, 3:505–521
6. MITTERMAYER F, SCHALLER G, PLEINER J, VYCHYTIL A, SUNDERPLASSMANN G, HÖRL WH ET AL. Asymmetrical dimethylarginine plasma concentrations are related to basal nitric oxide release but not endothelium-dependent vasodilation of resistance arteries in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:1832–1838
7. ZOCCALI C, BODE-BÖGER S, MALLAMACI F, BENEDETTO F, TRIPEPI G, MALATINO L ET AL. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: A prospective study. *Lancet* 2001, 358:2113–2117
8. RAVANI P, TRIPEPI G, MALBERTI F, TESTA S, MALLAMACI F, ZOCCALI C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: A competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:2449–2455
9. LU TM, DING YA, LIN SJ, LEE WS, TAI HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003, 24:1912–1919
10. RAVANI P, TRIPEPI G, MALBERTI F, TESTA S, MALLAMACI F, ZOCCALI C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: A competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:2449–2455
11. BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, THIELE W, JUNKER W, ALEXANDER K, FRÖLICH JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997, 95:2068–2074
12. COOKE JP. ADMA: Its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005, 10(Suppl 1):S11–S17
13. COOKE JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:2032–2037
14. BREZIS M. Forefronts in nephrology: Summary of the newer aspects of renal cell injury. *Kidney Int* 1992, 42:523–539
15. VALLANCE P, MONCADA S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz* 1993, 1:77–86
16. LEIPER J, MURRAY-RUST J, McDONALD N, VALLANCE P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: Further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13527–13532
17. VALLANCE P, LEIPER J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:1023–1030
18. VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992, 339:572–575
19. BÖGER RH, ZOCCALI C. ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003, 4:23–28
20. BÖGER RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006, 38:126–136
21. KIELSTEIN JT, FRÖLICH JC, HALLER H, FLISER D. ADMA (asymmetric dimethylarginine): An atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 2001, 16:1742–1745
22. 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
23. PLEINER J, MITTERMAYER F, SCHALLER G, MARSIK C, McALLISTER RJ, WOLZT M. Inflammation-induced vasoconstrictor hyporeactivity is caused by oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42:1656–1662
24. SCHECHTER AN, GLADWIN MT. Hemoglobin and the paracrine

- and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 2003, 348:1483–1485
25. BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996, 271:C1424–C1437
 26. MITSUMIZO S, NAKASHIMA M, HAMADA T, TOTOKI T. NOS II inhibition restores attenuation of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery exposed to lipopolysaccharide. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004, 43:589–594
 27. GAO Y. The multiple actions of NO. *Pflügers Arch* 2010, 459:829–839
 28. WINK DA, HANBAUER I, KRISHNA MC, DeGRAFF W, GAMSON J, MITCHELL JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:9813–9817
 29. ZHANG DL, LIAO H, WEI YY, ZHANG Y, ZHANG QD, WANG ZG. Elevation of serum apelin-13 is positively correlated with ADMA in patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol* 2009, 71:405–412
 30. THAHA M, WIDODO, PRANAWA W, YOGIANTORO M, TOMINO Y. Intravenous N-acetylcysteine during hemodialysis reduces asymmetric dimethylarginine level in end-stage renal disease patients. *Clin Nephrol* 2008, 69:24–32
 31. FELDMAN L, HAMAD RA, EFRATI S, ASHKER A, BEBERASHVILI I, SHANI M. Effect of N-acetylcysteine on residual renal function in chronic haemodialysis patients treated with high-flux synthetic dialysis membranes: A pilot study. *ISRN Nephrol* 2013, article ID 636208, 1–4
 32. FELDMAN L, SHANI M, EFRATI S, BEBERASHVILI I, YAKOV-HAI I, ABRA-MOV E ET AL. N-acetylcysteine improves residual renal function in peritoneal dialysis patients: A pilot study. *Perit Dial Int* 2011, 31:545–550
 33. FELDMAN L, SHANI M, SINUANI I, BEBERASHVILI I, WEISSGARTEN J. N-acetylcysteine may improve residual renal function in hemodialysis patients: A pilot study. *Hemodial Int* 2012, 16:512–516
 34. TEERLINK T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005, 10(Suppl 1):S73–S81
 35. SCHNABEL R, BLANKENBERG S, LUBOS E, LACKNER KJ, RUPPRECHT HJ, ESPINOLA-KLEIN C ET AL. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: Results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005, 97:e53–e59
 36. ARRIGONI F, AHMETAJ B, LEIPER J. The biology and therapeutic potential of the DDAH/ADMA pathway. *Curr Pharm Des* 2010, 16:4089–4102
 37. BAI Y, HUI R. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) – a critical regulator of hypertensive left ventricular hypertrophy? *Med Hypotheses* 2008, 70:962–966
 38. SYDOW K, MÜNDEL T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003, 4:41–51
 39. BÖGER RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004, 134(Suppl 10):2842S–2847S
 40. ACHAN V, BROADHEAD M, MALAKI M, WHITLEY G, LEIPER J, McAL-LISTER R 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
 41. VALKONEN VP, PÄIVÄ H, SALONEN JT, LAKKA TA, LEHTIMÄKIT, LAAK-SO J ET AL. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001, 358:2127–2128
 42. NIJVELDT RJ, TEERLINK T, VAN DER HOVEN B, SIROEN MP, KUIK DJ, RAU-WERDA JA ET AL. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: High plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003, 22:23–30
 43. BÖGER RH, VALLANCE P, COOKE JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl* 2003, 4:1–3
 44. DENICOLA A, SOUZA JM, RADI R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:3566–3571
 45. UZUN H, KONUKOGLU D, BESLER M, ERDENEN F, SEZGIN C, MUDER-RISOGLU C. The effects of renal replacement therapy on plasma, asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and C-reactive protein levels. *Clin Invest Med* 2008, 31:E1–E7
 46. ANDERSTAM B, KATZARSKI K, BERGSTRÖM J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997, 8:1437–1442
 47. ERDEM SS, YERLIKAYA FH, TONBUL Z, TÜRKMEN K, ERDUR FM, TANNER A ET AL. Asymmetric dimethylarginine and homocysteine levels in dialysis patients. *Eur J Gen Med* 2013, 10:90–95
 48. ONER-IYIDOGAN Y, ONER P, KOCAK H, GURDOL F, BEKPINAR S, UN-LUCERCI Y ET AL. Dimethylarginines and inflammation markers in patients with chronic kidney disease undergoing dialysis. *Clin Exp Med* 2009, 9:235–241
 49. EISELT J, RAJDL D, RACEK J, SIROKÁ R, TREFIL L, OPATRNÁ S. Asymmetric dimethylarginine in hemodialysis, hemodiafiltration, and peritoneal dialysis. *Artif Organs* 2010, 34:420–425
 50. ZOCCALI C, ENIA G, TRIPEPI G, PANUCCIO V, MALLAMACI F. Clinical epidemiology of major nontraditional risk factors in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2005, 25(Suppl 3):S84–S87
 51. CHANG JW, LEE EK, KIM TH, MIN WK, CHUN S, LEE KU ET AL. Effects of alpha-lipoic acid on the plasma levels of asymmetric dimethylarginine in diabetic end-stage renal disease patients on hemodialysis: A pilot study. *Am J Nephrol* 2007, 27:70–74
 52. THAHA M, WIDODO, YOGIANTORO M, WENNY, YUSUF M, TOMINO Y. Action of N-acetylcysteine on asymmetric dimethylarginine and albuminuria in stage 1–4 non diabetic chronic kidney disease patients. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* 2010, 1:146–150

Corresponding author:

I. Giannikouris, 9 Kos street, GR-171 23 Nea Smyrni, Greece
e-mail: giannik15@yahoo.gr