

Dimetilarginina asimmetrica e diabete

Maurizio Marra

Dipartimento Ricerche Gerontologiche e Geriatriche, Unità Operativa Diabetologia, I.N.R.C.A, Ancona

ABSTRACT

Asymmetric dimethylarginine and diabetes. The endothelial dysfunction is a common aspect in the diabetic patients and play a role in diabetic vascular complications. This early event in the atherosclerotic process is due to a reduction of nitric oxide and of the activity of Nitric Oxide Synthase (NOS). An elevated concentration of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA), an endogenous NOS inhibitor, is *per se* considered a risk factor for endothelial dysfunction. Increased ADMA levels has been found in diabetic subjects (type 1 and type 2) and in subjects with insulin resistance syndrome. In all these conditions, elevated levels of ADMA are linked to the reduction of the activity of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH), the enzyme that degrade ADMA, and to the increase of oxidative stress. Moreover the relationships between ADMA levels and some of the main metabolic parameters involved in diabetic pathology and its complications are well clarified. However the role of DDAH polymorphisms in the modulation of ADMA levels must be clarified and deepen in the develop of diabetic vascular complications. New and more affordable analytical methods will be able to obtain these data.

IL DIABETE E LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Esiste ormai consenso generale nel considerare la disfunzione endoteliale come il processo che interrompe la naturale proprietà fisiologica dell'endotelio e precursore iniziale del processo aterosclerotico. Tale terminologia è frequentemente utilizzata per descrivere la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente, anche se più correttamente, tale fenomeno, includerebbe tutte quelle manifestazioni che conducono ad una attivazione endoteliale, con alterazione dei rapporti con i leucociti, le piastrine e le altre sostanze che regolano il tono vasomotorio.

Il più importante mediatore della vasodilatazione endotelio-mediata è l'ossido nitrico (NO), la cui riduzione risulta essere la causa ad oggi più studiata tra quelle che precedono lo sviluppo clinico dell'aterosclerosi e che contribuiscono alla progressione della malattia. Infatti nel soggetto sano avviene che l'acetilcolina induca vasodilatazione in rapporto ad un rilascio endoteliale di ossido nitrico, mentre, in condizioni patologiche, si assiste ad una ridotta biodisponibilità di NO e ad una aumentata attivazione delle cellule muscolari lisce con conseguente vasocostrizione. Quindi parte della disfunzione endoteliale, che si verifica nel processo aterosclerotico, appare connessa con una ridotta attività dell'ossido nitrico sintasi (NOS). Allo stesso modo, anche una iperglicemia prolungata (più di 6 ore) sembra in grado di inibire le risposte vasodilatanti¹.

Nei sistemi biologici, l'NO esercita numerose funzioni agendo come un importante messaggero intra- ed intercellulare regolando numerosissime funzioni, in primis quella già riportata di vasodilatatore dell'endotelio vasco-

lare, appunto battezzato come Fattore Rilassante Endotelio Derivato (EDRF)². Inoltre riduce l'aggregabilità delle piastrine³ e l'adesività dei leucociti all'endotelio⁴ ed inibisce l'ossidazione delle LDL⁵. Nel sistema immunitario l'NO ha poi la funzione di immunoregolatore. La sua sintesi è attivata da macrofagi citochino-attivati⁶ e risulta tossico sia per alcuni patogeni inclusi funghi e protozoi, sia per cellule neoplastiche⁷. Ha infine anche un ruolo nella regolazione della funzione dei linfociti⁸.

L'NO è prodotto, a partire dal precursore L-arginina, mediante l'attività della NOS, la quale effettua un trasferimento elettronico all'ossigeno, attraverso la cascata di cofattori, fino all'arginina producendo NO e citrullina. Questo avviene in condizioni catalitiche ideali (ottimali concentrazioni di L-arginina e dei cofattori). In caso di deficienza di substrato o in presenza di inibitori della NOS il meccanismo catalitico è incompleto o disaccoppiato e si osserva una perturbazione nel flusso normale di elettroni che risulta indirizzato sull'unico accettore di elettroni disponibile, la molecola di ossigeno. Si ottiene così la produzione di un radicale superossido ad opera della NOS⁹.

LA DIMETILARGININA ASIMMETRICA E LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Il meccanismo di inibizione competitiva per la NOS è dovuto alla presenza di un inibitore competitivo endogeno della NOS, la Dimetilarginina Asimmetrica (ADMA), identificata nel plasma e nelle urine, in concentrazione almeno 10 volte superiore all'altro già noto inibitore, la monometil arginina¹⁰. La Fig. 1 riporta, per comodità, le formule dell'ADMA e delle altre molecole metabolicamente correlate, come più avanti spiegato.

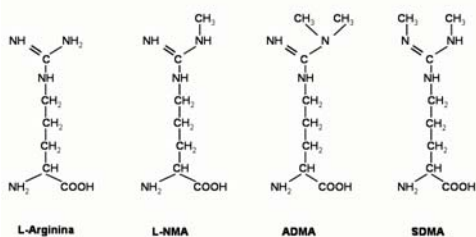


Figura 1

L-Arginina e omologhi mono- e di- metilati. L-NMA: N-monometil arginina; ADMA: N,N-dimetil arginina asimmetrica; SDMA: N,N'-dimetil arginina simmetrica

In letteratura sono disponibili numerose evidenze, in vitro ed in vivo, a conferma del meccanismo sopra citato. Nelle cellule endoteliali umane stimolate con il plasma di pazienti con danno renale cronico, l'inibizione della eNOS correla con i livelli di ADMA plasmatici¹¹. Inoltre, la concentrazione di ADMA correla inversamente con la vasodilatazione endotelio-dipendente in soggetti con ipercolesterolemia¹². In tali soggetti, l'infusione con L-arginina, substrato per la NOS, compensa l'effetto inibitorio dell'ADMA e normalizza la funzionalità endoteliale. E' stato anche suggerito che l'accumulo di ADMA aumenta la resistenza vascolare renale, riduce il flusso plasmatico renale e aumenta la pressione sanguigna¹³. Inoltre è stato dimostrato che nell'uomo l'infusione di ADMA riduce la frequenza cardiaca, la gittata e incrementa la pressione sanguigna¹⁴.

SINTESI E METABOLISMO DELL'ADMA

L'ADMA è sintetizzata quando i residui di arginina sono metilati per azione di specifici enzimi di metilazione detti arginine methyltransferases, PRMTs (Figura 2)¹⁵. La metilazione è una modificazione post-traslazionale che aggiunge 1 o 2 gruppi metilici all'azoto del gruppo guanidico dell'arginina. Le PRMTs usano la S-adenosilmetionina (SAM), sintetizzata da metionina e ATP, come gruppo metil donatore. Dopo il trasferimento di questo gruppo metilico la SAM è convertita a S-adenosilomocisteina (SAH). SAH è a sua volta enzimaticamente convertita in omocisteina metabolizzata nella via della trans-solfurazione o rimetilata in metionina. La sintesi di una molecola di ADMA richiede quindi due gruppi metilici e per ognuna di essa ne vengono prodotte due di omocisteina. L'aumento delle proteine metilate può portare quindi ad un incremento della produzione di ADMA e di omocisteina¹⁶. Esistono due classi di PRMTs: quelle di tipo I catalizzano la formazione di dimetil arginina asimmetrica ADMA (N,N-dimehyl-L-arginine) e l'NMA (N-monomethyl-L-arginine) mentre le PRMTs di tipo II producono una dimetil arginina simmetrica SDMA (Fig. 1). Entrambe le forme trasferiscono i gruppi metilici preferibilmente ai residui di arginina localizzate in proteine ricche di sequenze arginina-glicina. Un'alterata espressione delle PRMTs di tipo I porta ad una modificazione nel

rilascio di ADMA, suggerendo una regolazione in parte delle PRMTs nella generazione nei vasi¹⁷. Si è visto anche che l'espressione delle PRMTs di tipo I aumenta in seguito all'aumentare dell'espressione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) un effetto correlato anch'esso con un'alterata produzione di ADMA¹⁸.

Le proteine modificate ad opera delle PRMTs sono implicate nella interazione con gli acidi nucleici e sono coinvolte in processi come lo splicing dell'RNA messaggero, nella sua trascrizione, nel trasporto nucleare citoplasmatico e nella trasduzione del segnale¹⁹.

Circa il 65% dell'ADMA è contenuto nelle proteine chiamate hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonuclear Proteins) la cui attività è regolata dalla metilazione. Le arginine metilate vengono rilasciate nel citosol quando tali proteine, esaurita la loro funzione, vanno incontro a degradazione per idrolisi.

Per prevenire l'accumulo di ADMA la cellula ha previsto due vie di eliminazione, una enzimatica e una escretoria. Circa l'80% dell'ADMA accumulato è degradato enzimaticamente dalla Dimetilarginina Dimetilaminoidrolasi (DDAH) che scinde l'ADMA in citrullina e dimetilamina. Il restante 20% viene trasportata dalla cellula nel plasma attraverso un trasportatore aminoacidico cationico (CAT) ed escreta poi nelle urine. Perciò una riduzione nell'attività del DDAH, combinata con una perdita dell'escrezione renale, conduce ad accumulo giornaliero di ADMA a livello plasmatico¹⁴.

La via escretoria per le arginine metilate era stata precedentemente dimostrata essere la via principale di eliminazione per l'SDMA mentre per l'ADMA si suggeriva la presenza di un pathway metabolico alternativo²⁰, successivamente identificato nel DDAH^{21,22}. Recentemente si è scoperto che il DDAH è molto sensibile allo stress ossidativo perchè contiene, nel sito attivo dell'enzima, un residuo di cisteina facilmente ossidabile, la cui integrità è essenziale per l'attività e la sua modificazione impedisce alla molecola di ADMA di adattarsi al sito attivo²³.

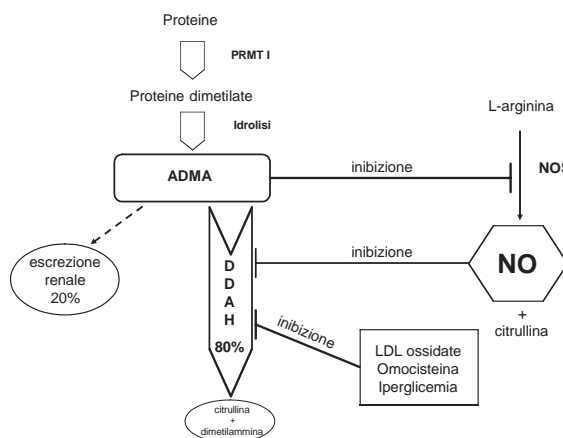


Figura 2
Biosintesi e degradazione dell'ADMA. DDAH: dimetilarginina ammino idrolasi; PRMT I: proteina-arginina metil transferasi di tipo I; NO: ossido nitrico; NOS: nitrossido sintasi

DETERMINAZIONE DELL'ADMA

La determinazione della concentrazione plasmatica dell'ADMA, fin dalla sua scoperta, è stata "croce e delizia" per ogni laboratorista per i notevoli problemi analitici che tale determinazione presenta. La concentrazione plasmatica di ADMA ha una distribuzione molto stretta e gli incrementi di concentrazione sono associati con aumentato rischio cardiovascolare⁹. Di conseguenza, la disponibilità di metodiche di alta precisione è di primaria importanza se si vogliono ottenere risultati utilizzabili nella ricerca clinica. Una metodica analitica con alto coefficiente di variazione può portare ad abbassare la potenza statistica del trial clinico e ad una sottostima degli effetti epidemiologici del risultato. Perciò i risultati ottenuti in passato sono discutibili perché frutto di metodiche poco affidabili ed effettuati su una numerosità campionaria bassa.

Sin dall'inizio, per misurare l'ADMA, si utilizzarono metodi basati sulla separazione cromatografica (cromatografia a fase mobile liquida ad alte prestazioni (HPLC)) per separare e determinare i due isomeri (SDMA ed ADMA), strutturalmente molto simili, ma altamente differenti dal punto di vista funzionale (Figura 1). Le arginine metilate possono essere rilevate, qualitativamente e quantitativamente, sia nel plasma che nelle urine. Tuttavia, l'approccio analitico è vincolato dal fatto che tali aminoacidi devono essere distinti e separati dalla L-arginina presente in concentrazione fino a 100 volte superiore. Tale risultato si ottiene solamente utilizzando tecniche di separazione cromatografica che presentano lo svantaggio di richiedere una preparazione laboriosa del campione, necessaria per rilevare l'esigua quantità di analiti presenti nei fluidi biologici, e anche dispendiosa sia a livello di risorse di personale che economiche. Di conseguenza, questi metodi furono, inizialmente, applicati in pochi laboratori specializzati e si dimostrarono da subito poco utili per uso clinico a causa del basso numero di campioni analizzabili al giorno. Questa necessità ha stimolato una parallela ricerca indirizzata al miglioramento della determinazione analitica delle arginine metilate. Perciò negli anni si è assistito ad un fiorire di metodi analitici basati prevalentemente su cromatografia ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore a fluorescenza (FL)^{24,25,26}, e poche e più esotiche metodiche, che prevedono lo spettrometro di massa (MS) come rivelatore (28), o metodi che realizzano l'analisi mediante gas-cromatografia con spettrometro di massa²⁹ o con elettroresi capillare³⁰.

Tutti i metodi prevedono l'uso di plasma eparinato, che sembra essere la scelta obbligata per la determinazione dell'ADMA, anche se a tutt'oggi non sono stati pubblicati lavori di comparazione tra diversi anticoagulanti a supporto di tale scelta. Il differente utilizzo di EDTA o eparina, come anticoagulante per il prelievo ematico dei campioni, non sembra influenzare i risultati della determinazione delle concentrazioni plasmatiche di arginina, SDMA e ADMA. L'utilizzo del siero invece non è consigliabile, dal momento che nei campioni di siero si osserva un aumento dei livelli di arginina probabilmente a

causa del rilascio di questa dalle piastrine, aumento che di conseguenza potrebbe influenzare i livelli di ADMA ed SDMA.

Prima di arrivare al risultato analitico, le metodiche prevedono dei passi la cui ottimizzazione è fondamentale per l'ottenimento di un corretto e affidabile risultato. Il punto cruciale dell'analisi HPLC-FL delle arginine metilate è rappresentato dalla separazione cromatografica degli isomeri ADMA e SDMA tra loro e dalla matrice biologica in cui sono contenuti. Il secondo punto è in genere risolto con un appropriato trattamento preliminare del campione che prevede la precipitazione delle proteine seguita da una fase di estrazione in fase solida su colonnine a scambio ionico.

I campioni così ottenuti vengono in genere derivatizzati prima di essere iniettati. Il primo approccio analitico prevedeva la derivatizzazione dei campioni estratti dalla matrice con o-phthaldialdehyde (OPA) ed immediatamente iniettati in HPLC a causa della loro scarsa stabilità intrinseca. I cromatogrammi ottenuti non eccellevano nella separazione tra i picchi di ADMA e SDMA²⁴. Nel tempo le varie metodiche si sono differenziate cercando di migliorare i due aspetti più critici: stabilità dei derivati e separazione cromatografica. Recentemente questi punti critici sono stati brillantemente risolti, con strategie diverse, e ora si hanno a disposizione delle metodiche HPLC-FL^{25,26,27} (Figura 3) più affidabili i cui risultati sono direttamente confrontabili, tra loro, e con quelli ottenuti da tecniche HPLC-MS²⁸. Esistono anche metodiche alternative che dosano solamente l'ADMA con tecnica ELISA³¹.

Nella Tabella 1 sono riassunte le informazioni disponibili sui livelli plasmatici basali di ADMA ottenute con i principali metodi disponibili in letteratura. I valori di "normalità" dei soggetti sani, derivano dai gruppi di controllo inclusi negli studi caso-controllo dei lavori citati.

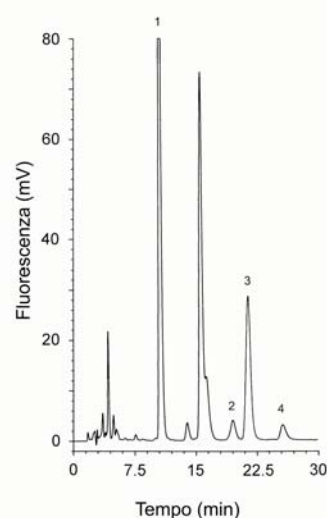


Figura 3

Cromatogramma di un campione di plasma umano. Identificazione dei picchi: 1, L-arginina; 2, SDMA; 3, standard interno N^o-Propil-L-arginina (N-PLA); 4, ADMA. Vedi riferimento 26

Tabella 1
Valori basali di ADMA nel plasma umano determinati con i metodi citati

Metodologia Analitica	Agente Derivatizzante	Concentrazione Plasmatica ^a	Limite Rilevabilità ^a	Rif.
HPLC				
fluorescenza	OPA	0.58±0.02 (n=10)	0.015	24
	OPA	0.42±0.06 (n=53)	0.01	25
	NDA	0.38-1.30 (range, n=50)	0.01	26
	AccQ-Fluor®	0.44±0.08 (n=12)	0.1	27
Elettroforesi Capillare				
Fluorescenza indotta da laser		0.34±0.02 (siero, n=5)	0.05	30
Spettrometria di Massa				
GC-MS	Metil-PFP	0.60±0.08 (n=10)	2 fmol	29
LC-MS (ESI)	OPA	0.45±0.13 (n=15)		28
ELISA		0.65±0.13 (n=10)	0.05	31

^aEspressa in µmol/L.

OPA, o-phthalaldehyde; NDA, naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde; AccQ-Fluor, 6-aminoquinolil-N-idrossisuccinimidil carbammato; Metil-PFP, metil-pentafluoropropionil; LC, cromatografia liquida; GC, gas cromatografia; MS, spettrometria di massa; ESI, ionizzazione elettro-spray

Ovviamente i dati ottenuti variano da studio a studio sia per la metodologia analitica utilizzata sia per i criteri di selezione adottati nella scelta dei soggetti di controllo, ma nonostante tutto i risultati ottenuti sono abbastanza comparabili.

ADMA E DIABETE MELLITO

La diminuzione della biodisponibilità di NO, associata al diabete di tipo 2, è attribuibile agli stessi fattori di rischio (LDL, trigliceridi, omocisteina, stress ossidativo) spesso associati alla malattia diabetica e alle sue complicanze vascolari (Figura 4)³². Tali complicazioni sono la maggior causa di mortalità e morbilità per milioni di individui nel mondo affetti da diabete mellito di tipo 2. La disfunzione endoteliale dovuta ad una riduzione dell'attività della NOS è un comune aspetto nei pazienti diabetici e gioca un ruolo fondamentale nelle complicazioni vascolari della patogenesi diabetica³³. Inoltre, nei diabetici, spesso si osserva una riduzione nella concentrazione di L-arginina che se associata ad un aumento dei livelli di ADMA porta alla diminuzione del rapporto L-arginina/ADMA e quindi alla riduzione dell'attività della NOS sia per la presenza dell'inibitore che alla deficienza del substrato³⁴. Similmente, nel periodo post-prandiale si verifica che l'ingestione di una dieta ricca di grassi induce una riduzione della risposta vasodilatatoria accompagnata da un significativo aumento della concentrazione plasmatica di ADMA. Questi cambiamenti avvengono in associazione con l'aumento di trigliceridi, VLDL e con riduzione di HDL. Negli stessi soggetti è stato osservato un rapporto L-arginina/ADMA più basso dopo il pasto anche se non c'erano variazioni nella concentrazione di L-arginina prima e dopo il pasto³⁵.

Numerosi lavori hanno evidenziato che ogni fattore,

stato patologico o alterazione metabolica che conduce o si associa ad un aumento dello stress ossidativo (infiammazione, iperomocitemia, iperglicemia, agenti infettivi, LDL ossidate) può ridurre l'attività del DDAH e permettere all'ADMA di accumularsi e coinvolgere l'endotelio vascolare³⁴. Studi in vitro ed in vivo hanno mostrato che l'aumento dello stress ossidativo nel diabete sia in relazione con l'aumento di ADMA. Ad esempio, nei ratti diabetici si è osservato che i livelli plasmatici di ADMA sono più alti rispetto ai ratti controllo e che questo fatto è in relazione con l'attività del DDAH. Infatti, analizzando l'espressione del DDAH aortico non si osservano differenze tra i ratti casi controllo e i diabetici, al contrario dell'attività del DDAH che risulta significativamente ridotta

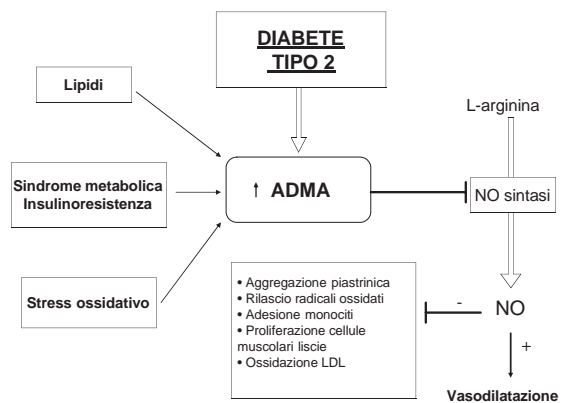


Figura 4
Relazione tra ADMA e disfunzione endoteliale nel diabete

nei ratti diabetici a confronto con quelli di controllo. Inoltre l'attività del DDAH, negli anelli di aorta, era negativamente correlata con i livelli di ADMA plasmatico. Analoga osservazione si ha nell'attività e l'espressione del DDAH in cellule muscolari lisce vascolari di ratto incubate in condizioni di normale o alto glucosio dove l'alto glucosio non modifica l'espressione del DDAH ma ne riduce significativamente l'attività.

La conferma del ruolo dello stress ossidativo associato all'iperglicemia nel regolare i livelli di ADMA viene dagli stessi autori che avevano esposto colture di una linea cellulare endoteliale umana a normale glucosio, a glucosio e mannosio (controllo osmotico), ad alto glucosio ed alto glucosio in presenza di un antiossidante. Essi avevano quindi notato che l'attività del DDAH era ridotta nelle cellule coltivate in presenza di alto glucosio e che la presenza di un antiossidante ne preservava l'attività, supportando l'ipotesi che l'attività del DDAH può essere danneggiata da stress ossidativo indotto da glucosio. Questo ripristino dell'attività del DDAH è associato quindi anche ad un corrispondente riduzione di ADMA endoteliale³⁶.

PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse attorno alla possibilità della modulazione dell'ADMA con la terapia farmacologica e come questa possa contribuire ad una maggiore biodisponibilità di NO e al miglioramento della funzionalità vascolare. Nel paziente diabetico la terapia principale è indirizzata, primariamente e principalmente, al compenso metabolico tipico della malattia e dei fattori di rischio aggiuntivo presenti. Recentemente si è visto che l'aumento di ADMA, accompagnato dal danneggiamento del rilassamento endotelio-dipendente, è legato allo scarso controllo metabolico nei ratti diabetici e che l'estensione dell'incremento di ADMA sia nei diabetici, sia nei ratti che nell'uomo, non è proporzionale alla durata della malattia ma piuttosto al suo controllo metabolico³⁷. Ne consegue che il miglioramento del controllo glicemico nei pazienti diabetici dovrebbe essere in grado di ridurre i livelli di ADMA. In effetti si osserva una riduzione della concentrazione di ADMA in associazione con il miglioramento del controllo glicemico nei pazienti con diabete di tipo 2 e la diminuzione nei pazienti trattati con metformina è simile se usato in monoterapia o in combinazione con sulfanilurea³⁸. Il controllo metabolico può venire anche da una corretta attività fisica. Gli elevati livelli di ADMA dei diabetici di tipo 1, che sono ad alto rischio di sviluppare malattia cardiovascolare, possono essere ridotti a quelli dei soggetti sani con il regolare esercizio fisico. Questo effetto favorevole su l'ADMA non è mantenuto quando si interrompe l'attività fisica³⁹.

Per concludere è da citare che esiste un'intrigante relazione tra resistenza insulinica e ADMA. I livelli di ADMA aumentano nei soggetti insulino-resistenti indipendentemente dall'ipertensione e il trattamento farmacologico volto al miglioramento della sensibilità insulinica riduce la concentrazione di ADMA. Quindi aumentati livelli di ADMA possono contribuire alla disfunzione

endoteliale osservata nei pazienti insulino-resistenti⁴⁰ e questi sono positivamente correlati con l'insulino resistenza nei soggetti non diabetici e normotesi⁴¹. Tra gli altri fattori di rischio è da ricordare l'omocisteina che è legata all'ADMA attraverso la sua via metabolica di produzione. Recenti lavori suggeriscono una relazione tra questi due fattori mentre sembra che l'ADMA sia associata con la malattia cardiovascolare indipendentemente dall'omocisteina e dai tradizionali fattori di rischio nei pazienti con diabete di tipo 2⁴².

CONCLUSIONI

Dopo circa tre lustri di ricerca ci sono pochi dubbi sul fatto che l'ADMA è sintetizzata nelle cellule e che è in grado di modulare l'attività della NOS in condizioni fisiologiche e patologiche. Sebbene aumentati livelli di ADMA sono presenti in molte malattie dove è coinvolta una ridotta biodisponibilità di NO, molti quesiti attendono ancora una risposta.

La maggior parte degli studi prevede solo la determinazione plasmatica dell'ADMA e poco si conosce sulla concentrazione intracellulare che è più importante per la funzionalità della NOS. La comprensione dei meccanismi che conducono all'aumento di ADMA e lo sviluppo di terapie mirate specificamente alla riduzione di ADMA sembra essere la strada intrapresa e nuove conoscenze arriveranno quando verrà chiarito il ruolo dei polimorfismi del DDAH nella modulazione dei livelli di ADMA in tale patologia.

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento per il suo aiuto alla Dott.ssa Michela Cucchi.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-8.
2. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042-7.
3. Tsao PS, Theilmeier G, Singer AH, Leung LL, Cooke JP. L-arginine attenuates platelet reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1529-33.
4. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-5.
5. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993;334:170-4.
6. Hibbs JB Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumor and antimicrobial activity. *Res Immunol* 1991;142:565-9.
7. Vallance P, Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 1994;309:453-7.
8. Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, et al. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the

- induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 1991;21:2489-94.
9. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.
 10. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 Suppl 12:S60-2.
 11. Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C. Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2001;59:1466-72.
 12. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
 13. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, et al. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003;107:1891-5.
 14. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-9.
 15. Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:977-83.
 16. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75.
 17. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023-30.
 18. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, 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.
 19. Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;61:65-131.
 20. McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976;154:179-84.
 21. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG-and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 1987;252:526-37.
 22. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *J Biol Chem* 1990;265:20938-45.
 23. 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;99:13527-32.
 24. Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692:257-62.
 25. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131-7.
 26. Marra M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, Coppa G. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal Biochem* 2003;318:13-7.
 27. Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:325-9.
 28. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;798:231-9.
 29. Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Boger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809:59-65.
 30. Causse E, Siri N, Arnal JF, Bayle C, Malatray P, Valdiguié P, Salvayre R, Couderc F. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;741:77-83.
 31. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Boger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1377-83.
 32. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190:244-54.
 33. Rabin RA, Staffolani R, Fumelli P, Mutus B, Curatola G, et al. Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. *Diabetologia* 1998;41:101-4.
 34. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-5.
 35. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039-44.
 36. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-92.
 37. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sci* 2005;77:149-59.
 38. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002;51:843-6.
 39. Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, Wiesinger GF, Francesconi M, et al. Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 2005;117:816-20.
 40. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor.

- JAMA 2002;287:1420-6.
41. Sydow K, Mondon CE, Cooke JP. Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S35-43.
 42. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W, Schnack C, Hofer M, et al. Asymmetric dimethylarginine is associated with macrovascular disease and total homocysteine in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006; in press.