

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Methodenvalidierung eines ELISA- Trockenblutkartenassays zur Bestimmung von Homoarginin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Susann Kiencke
Wismar

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 10.09.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Chi-un Choe

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Arbeitshypothese und Fragestellung	6
3	Einleitung	7
3.1	Homoarginin – biochemische Grundlagen	8
3.1.1	Eigenschaften von Homoarginin	8
3.1.2	Homoarginin-Stoffwechsel	8
3.1.2.1	Synthese von Homoarginin durch AGAT	9
3.1.2.2	Synthese von Homoarginin mittels Harnstoffzyklusenzymen.....	10
3.1.2.3	Homoarginin als Substrat für die Stickstoffmonoxidsynthese	11
3.1.2.4	Homoarginin als Inhibitor der Arginase	11
3.1.3	Interindividuelle Variation von Homoarginin.....	11
3.1.4	Intraindividuelle Variation von Homoarginin.....	13
3.1.5	Variation durch Probenmaterial	14
3.1.6	Physiologische Bedeutung von Homoarginin	14
3.1.7	Pathophysiologische Rolle von Homoarginin.....	15
3.1.8	Korrelation von Homoarginin mit laborchemischen und klinischen Phänotypen	16
3.2	Nachweismethoden und Messwerte für Homoarginin	18
3.2.1	HPLC zur Quantifizierung von Homoarginin	18
3.2.2	ELISA zur Quantifizierung von Homoarginin	19
3.2.3	Korrelation ELISA mit LC-MS/MS	20
3.2.4	LC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Homoarginin.....	21
3.2.5	GC-MS und GC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Homoarginin	23
3.3	Methodenvalidierung	23
3.4	Zusammenfassung	24
4	Material und Methoden.....	26
4.1	Anleitung zur Bestimmung von Homoarginin aus Trockenblutkarten (Standardanleitung).....	26
4.1.1	Laborgeräte, Materialien, Reagenzien, Software.....	26
4.1.2	Probandenrekrutierung und Eigenschaften	26
4.1.3	Probengewinnung und Präparation der Trockenblutkarten	27
4.1.4	Elution	27
4.1.5	ELISA-Assay.....	27
4.2	Vorversuche zur Methodenetablierung.....	28
4.2.1	Vergleich von Plasma und Vollblut	28
4.2.2	Einfluss von Arginase-Hemmstoffen.....	29
4.2.3	Einfluss von Proteaseinhibitoren.....	29
4.2.3.1	Einfluss von Proteaseinhibitoren mit ADMA Reagenz	30
4.2.3.2	Einfluss von Proteaseinhibitoren mit 1M TRIS-HCl (pH 1).....	30
4.2.4	Elutionslösungen.....	31
4.3	Methodenvalidierung	34
4.3.1	Messpräzision	34
4.3.2	Intraassay	34
4.3.3	Interassay	34
4.3.4	Personenvariabilität	35
4.3.5	Einfluss der Spotvariabilität.....	35
4.3.6	Verhältnis von venösem und kapillarem Blut.....	35
4.4	Robustheit der Methode	35
4.4.1	Einfluss von Hämolyse.....	36

4.4.2	Einfluss von Einfrieren und Auftauen.....	36
4.4.3	Einfluss der Blutmenge.....	36
4.4.4	Stabilität gegenüber Tageslicht.....	37
4.4.5	Klimatische Stabilität.....	37
4.4.6	Stabilität in der Lagerungsdauer.....	38
4.5	Methodenanwendung.....	39
4.5.1	Qualitätsbeurteilung der Trockenblutkarten.....	40
4.5.2	L-Homoargininkonzentration nach Höhenexposition.....	40
4.5.3	Laborchemische Parameter und Zusammenhang mit L-Homoarginin 41	
4.5.4	L-Homoargininkonzentration im Plasma im Vergleich zu Trockenblutkarten.....	41
5	Ergebnisse.....	42
5.1	Messung von Homoargininkonzentration.....	42
5.2	Ergebnisse der Vorversuche.....	43
5.2.1	Vergleich Vollblut und Plasma.....	43
5.2.2	Einfluss von Arginaseinhibitor Nor-NOHA.....	44
5.2.3	Einfluss von Proteaseinhibitoren.....	45
5.2.3.1	Proteaseinhibitoren im Elutionsreagenz des ADMA Card ELISA	45
5.2.3.2	Proteaseinhibitor im TRIS-HCl.....	47
5.2.4	Zusammenfassung der Vorversuche.....	49
5.2.5	Elutionslösungen.....	49
5.2.5.1	Auswahl der Elutionslösungen Stufe 1 und 2.....	49
5.2.5.2	Auswahl der Elutionslösungen Stufe 3.....	52
5.2.5.3	Auswahl der Elutionslösungen Stufe 4 - Vergleich zweier Lösungen.....	53
5.2.5.4	Zusammenfassung der Elutionslösungen.....	55
5.2.6	Einfluss der Spotvariabilität.....	56
5.2.7	Vergleich von kapillar und venös gewonnenem Blut.....	56
5.3	Ergebnisse der Methodenvalidierung.....	57
5.3.1	Messpräzision.....	57
5.3.2	Intraassay.....	58
5.3.3	Interassay.....	59
5.3.4	Personenspezifische Variation.....	60
5.4	Ergebnisse der Methodenrobustheit.....	61
5.4.1	Einfluss von Hämolyse.....	61
5.4.2	Einfluss von Einfrieren und Auftauen.....	62
5.4.3	Einfluss der Blutmenge.....	62
5.4.4	Stabilität gegenüber Tageslicht.....	64
5.4.5	Klimatische Stabilität.....	65
5.4.6	Stabilität der Lagerungsdauer.....	65
5.4.7	Zusammenfassung der Methodenrobustheit.....	68
5.5	Ergebnisse der klinischen Methodenanwendung.....	68
5.5.1	Einfluss der Qualität der Trockenblutkarte.....	68
5.5.2	Homoarginin nach 6monatiger Höhenbelastung.....	69
5.5.3	Korrelationsanalyse mit anthropometrischen Parametern.....	71
5.5.4	Vergleich der Homoargininkonzentration im Plasma und Vollblut der Teilnehmer der chilenischen Studie.....	72
6	Diskussion.....	74
6.1	Vorversuche.....	74

6.1.1	Vergleich von Homoargininkonzentrationen im Vollblut, Plasma und Serum	74
6.1.2	Enzyminhibitor Arginase	76
6.1.3	Enzyminhibitor Proteaseinhibitorgemisch	77
6.2	Methodenvalidierung	78
6.2.1	Messpräzision	78
6.2.2	Intraassay	79
6.2.3	Interassay	79
6.2.4	Intraindividuell	80
6.2.1	Stabilität von L-Homoarginin	81
6.2.2	Stabilität der Methode	82
6.3	Methodenanwendung	82
6.3.1	Referenzwerte gesunder Probanden	82
6.3.2	Geschlechtsabhängige Referenzwerte	85
6.3.3	Chilenische Kohorte	86
6.3.4	Korrelationsanalyse mit anderen Parametern	87
6.3.5	L-Homoargininstabilität in der chilenischen Kohorte	89
7	Zusammenfassung	90
8	Abkürzungsverzeichnis	94
9	Abbildungsverzeichnis	95
10	Tabellenverzeichnis	96
11	Formelverzeichnis	98
12	Literaturverzeichnis	99
	Danksagung	107
	Lebenslauf	108
	Eidesstattliche Erklärung	109
13	Anhang	110
13.1	Anleitung der Methode (Standardanleitung)	110
13.2	Materialien	113
13.3	Inhaltsstoffe des Protease-Inhibitorgemisches Fa. Sigma	117
13.4	Stabilität von L-hArg	118
13.5	Retest-Reliabilität von L-Homoarginin (Stabilität)	119
13.6	Qualitätsbeurteilung der chilenischen Kohorte	120
13.7	Korrelationsanalysen	122
13.7.1	Korrelationsanalyse zum Studienbeginn	122
13.7.2	Korrelationsanalysen nach 6-monatiger Höhenbelastung	123
13.7.3	Longitudinale Korrelationsanalysen	124

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Validierung eines Trockenblutkartenassays für L-Homoarginin (L-hArg). Die Konzentration der Aminosäure L-hArg ist mit der Mortalität und Morbidität kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert (März et al. 2010, Pilz et al. 2011b, Drechsler et al. 2011, Atzler et al. 2013, Atzler et al. 2014a). Die quantitative Messung von L-hArg ist derzeit mittels Gaschromatografie (Kayacelebi et al. 2014b, Hanff et al. 2016), Flüssigkeitschromatografie (Davids et al. 2012a, Atzler et al. 2014a, Atzler et al. 2014b, Jazwinska-Kozub et al. 2014 mit oder ohne Massenspektrometrie kombiniert und mit einem Enzym Immunoassay (ELISA) (DLD Diagnostika GmbH 2014) möglich.

In dieser Arbeit wird das Vollblut der Probanden auf ein Filterpapier getropft und anschließend getrocknet. Aus diesem Filterpapier werden Stanzlinge gewonnen und mit einer Elutionslösung gemischt. Das Eluat wird anschließend mittels ELISA gemessen.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit widmet sich der Herstellung einer geeigneten Elutionslösung und der Interferenz durch Enzyminhibitoren. Im zweiten Abschnitt wird die etablierte Methode validiert durch Bestimmung der Varianz des Intraassays und des Interassays. Zusätzlich erfolgt die Untersuchung von Einflussfaktoren in der Präanalytik, um die Methodenrobustheit zu ermitteln. Im dritten Abschnitt wird die etablierte Methode bei einer chilenischen Kohorte angewendet und mit Messungen in EDTA Plasma verglichen, um die klinische Anwendbarkeit zu prüfen.

3 Einleitung

Laut statistischem Bundesamt sind im Jahr 2015 über 350 Tausend Menschen in Deutschland an Herz-Kreislauf-Erkrankungen gestorben (RKI, n.d.; Statistisches Bundesamt 2014). Mit einem Anteil von 38,5% aller Todesursachen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt 2014). Zu den wichtigsten klinischen Risikofaktoren zählen "Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas sowie gesundheitsbeeinträchtigende Verhaltensweisen wie Rauchen, körperliche Inaktivität und ungesunde Ernährung" (RKI, n.d.). Diese Risikofaktoren führen auf zellulärer Ebene zu einer Dysbalance von gefäßprotektiven und gefäßschädigenden Botenstoffen. Der gefäßprotektive Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin (L-Arg) gebildet. In Endothelzellen wird diese Reaktion durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert. Durch Methylierung von L-Arg-Resten in Proteinen wird nach anschließender Hydrolyse asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) freigesetzt (Böger *et al.* 1998, Fleissner und Thum 2011).

Erhöhte ADMA-Konzentrationen inhibieren die NO Synthese und sind ein Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Sibal *et al.* 2010). Darüber hinaus weisen Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren erhöhte ADMA-Konzentration im Blut auf (Sibal *et al.* 2010). Ein Derivat des Arginins ist L-Homoarginin (L-hArg). L-hArg besitzt im Gegensatz zum Arginin eine Methylengruppe mehr (Atzler *et al.* 2016a). Es ist eine nicht essentielle, kationische Aminosäure und wird endogen durch die L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT) gebildet (März *et al.* 2010, Kleber *et al.* 2013). Studien zeigten, dass niedrige L-hArg-Konzentrationen mit schlechtem kardiovaskulärem Outcome und der Mortalität assoziiert sind (März *et al.* 2010, Tsikas 2015). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von L-hArg sollen im Folgenden die biochemischen Eigenschaften, Bedeutung für die Medizin und die Nachweismethoden und Referenzwerte von L-hArg dargestellt und zusammengefasst werden.

3.1 Homoarginin – biochemische Grundlagen

3.1.1 Eigenschaften von Homoarginin

L-hArg ist eine kationische, nicht essentielle und nicht proteinogene Aminosäure (Papageorgiou et al. 2015). Wie das Präfix "Homo-", verrät, handelt es sich um ein Argininhomolog mit einer zusätzlichen Methylengruppe (CH₂) an der Hauptkette (Hecker 1991, Moali et al. 1998, Bretscher et al. 2003, Papageorgiou et al. 2015). Bereits im Jahr 1955 wurde der toxische Effekt von L-hArg auf *Escherichia coli* und grünen Algen von Walker beschrieben (Walker 1955). Erst mit Beginn der 90er Jahre wurde L-hArg als Substrat der NOS durch Hecker und andere beschrieben (Hecker 1991, Moali et al. 1998, Bretscher et al. 2003, Kayacelebi et al. 2015) und seine Gefäßwirkung, d.h. Vasodilatation, (ED₅₀ 12,±1,3 µmol) experimentell nachgewiesen (Bhardwaj und Moore 1989). Im Gegensatz zu L-Arg ist L-hArg über mehrere Tage bei 4 °C im EDTA-Vollblut stabil. (Midttun et al. 2014). Wie auch Arginin, fungiert es als Substrat für die NO-Synthase (Hecker 1991, Moali et al. 1998, Bretscher et al. 2003, Kayacelebi et al. 2015).

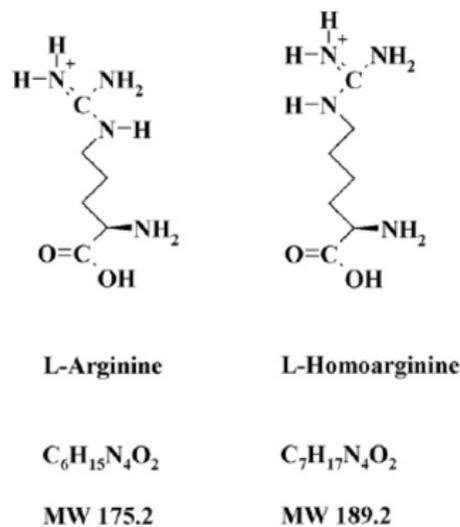


Abbildung 1 Strukturformel L-Arginin und L-Homoarginin (Martens-Lobenhoffer et al. 2009)

3.1.2 Homoarginin-Stoffwechsel

Der Stoffwechselweg von L-hArg wird in der Abbildung 2 (nach Davids et al. 2012b) zusammenfassend dargestellt. Die Synthese kann einerseits über das Enzym AGAT oder im Harnstoffzyklus über Ornithin-Transcarbamylase (OTC), Argininosuccinatsynthase (ASS) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) erfolgen (Cathelineau et al. 1974, Levin et al. 1974). Neben der Synthese von L-hArg

katalysiert das Enzym AGAT auch die Bildung von Guanidinoacetat, welches in einem weiteren katalytischen Schritt durch die Guanidinacetatmethyltransferase (GAMT) zu Kreatin umgesetzt wird.

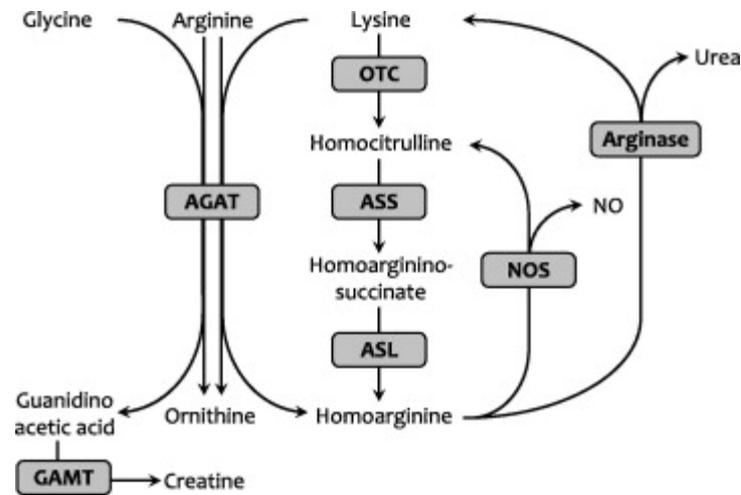


Abbildung 2: L-Homoarginin(L-hArg)-Synthese nach Davids et al. 2012b

Ornithin-Transcarbamylase (OTC), Argininosuccinatsynthase (ASS), Argininosuccinat-Lyase (ASL), Arginine:Glycin Aminidotransferase (AGAT), Guanidinacetatmethyltransferase (GAMT)

3.1.2.1 Synthese von Homoarginin durch AGAT

Die Vorstufe von L-hArg ist Lysin (Kayacelebi et al. 2015, Ryan und Wells 1964). Dies wusste man bereits 1964, als Ryan und Wells im Urin von Ratten nach einer oralen Gabe von ¹⁴C-markiertem Lysin eine erhöhte Ausscheidung von L-hArg und Homocitrullin feststellten (Ryan and Wells 1964). Auch bei Menschen konnte später gezeigt werden, dass eine orale Einnahme von Lysin zu einer erhöhten L-hArg-Ausscheidung im Urin führte (Davids et al. 2012b). Die Synthese erfolgt durch die AGAT (Davids et al. 2012b, Papageorgiou et al. 2015, Kayacelebi et al. 2015). Dabei wird eine Amidinogruppe vom L-Arginin auf eine Aminogruppe des L-Lysin transferiert, woraus Ornithin und L-hArg entstehen (Hernández-Guzmán and Alvarez-Morales 2001). Dies ist in der Abbildung 3 von Davids et al. dargestellt.

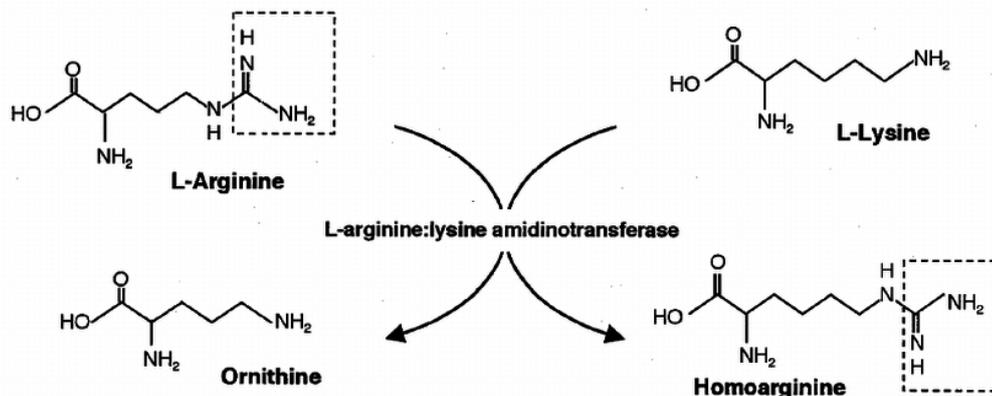


Abbildung 3: L-Homoarginin(L-hArg)-Synthese durch AGAT nach Davids et al. 2012b

Dasselbe Enzym katalysiert unter Verwendung eines anderen Substrates, Glycin anstatt Lysin, eine Reaktion, bei der Guanidinoacetat entsteht, eine Vorstufe des Kreatins (Davids et al. 2012b, Kayacelebi et al. 2015). Nach Methylierung des Guanidinoacetats durch die Guanidinoacetat-methyltransferase entstehen Kreatinin und Homocystein (Davids et al. 2012b). Davids et al. zeigten, dass homozygote AGAT-defiziente Lymphoblasten aus Stabil-Isotopen markiertem $^{15}\text{N}_2$ -Arginin und $^{13}\text{C}_6$ -Lysin kein markiertes Homoarginin bilden, während die Kontrolllymphoblasten $0,475 \text{ pmol } ^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-Homoarginin/min/mg}$ erzeugten (Davids et al. 2012b).

3.1.2.2 Synthese von Homoarginin mittels Harnstoffzyklusenzymen

Die Synthese ähnelt dem Harnstoffzyklus, bei dem die OTC die Reaktion von Ornithin und Carbamyl-phosphat zu freiem Phosphat und Citrullin katalysiert. Wenn anstelle des Ornithins Lysin umgesetzt wird, entsteht daraus stattdessen Homocitrullin. Die OTC hat dabei eine höhere Affinität zu Ornithin als zu Lysin (Papageorgiou et al. 2015). Homocitrullin wird wiederum durch die ASS in Homoargininosuccinat umgewandelt (Cathelineau et al. 1974). Die anschließende Reaktion zu L-hArg wird durch die ASL katalysiert (Cathelineau et al. 1974).

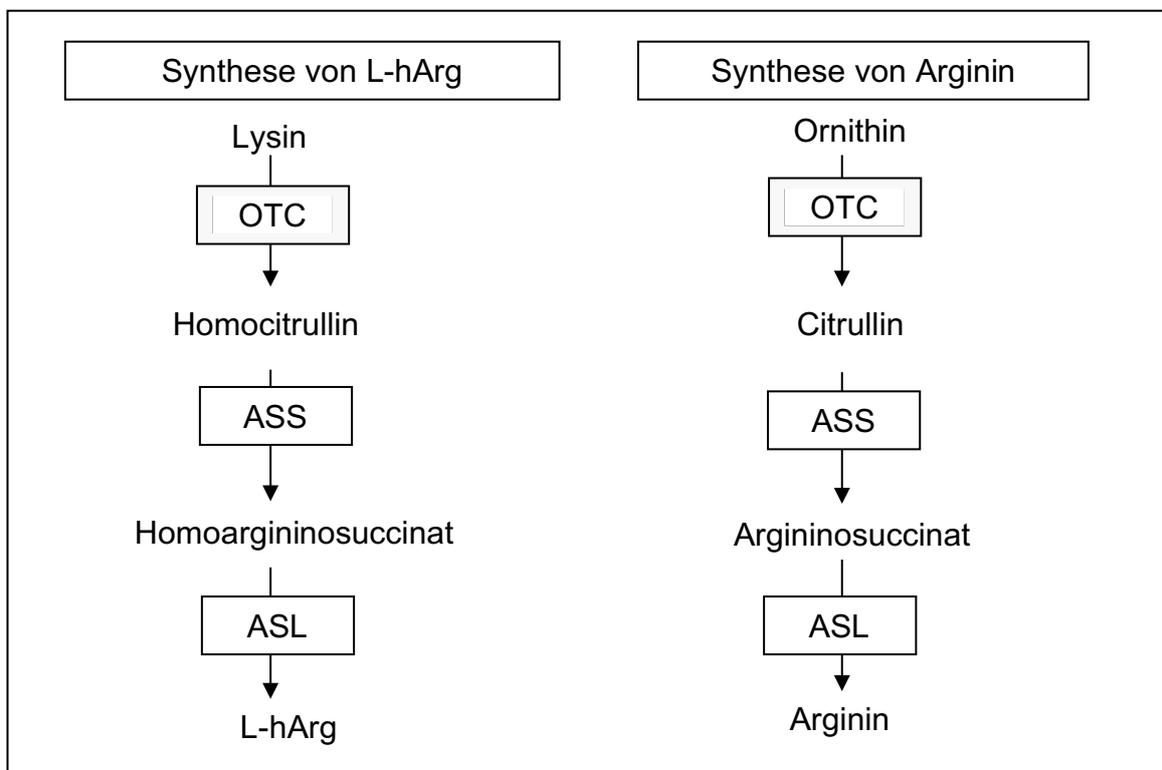


Abbildung 4: Vergleich der L-Homoarginin-Synthese (L-hArg) und der Argininsynthese
Ornithin-Transcarbamylase (OTC), Argininosuccinatsynthase (ASS), Argininosuccinatlyase (ASL)

Die vermehrte Bildung von Homoarginin zeigt sich in der Studie von Davids et al. Er untersuchte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) das Plasma von vier Tage alten Säuglingen, die unter Citrullinämie Typ I litten und eine genetische Mutation im Enzym ASS aufwiesen. Es zeigte sich eine 6-fach verminderte Argininkonzentration und eine 8-fach höhere L-hArg-Konzentration ($5.1 \mu\text{mol/l}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0.61 \pm 0.40 \mu\text{mol/l}$) (Davids et al. 2012b).

3.1.2.3 Homoarginin als Substrat für die Stickstoffmonoxidsynthese

Anstelle des L-Arginins, ist auch L-hArg ein Substrat für die NO-Synthese (Kayacelebi et al. 2015). Der Umsatz von L-hArg zu Homocitrullin erfolgt dabei nahezu vollständig (Moali et al. 1998). Dabei ist sowohl die Blutkonzentration, als auch die Affinität von L-hArg zu den NOS-Isoformen im Vergleich zu L-Arginin kleiner (Tsikas und Wu 2015). Außerdem ist der K_m Wert von L-hArg im Vergleich zu Arginin größer (Hecker et al. 1991, Moali et al. 1998). Dies bedeutet, dass die Effizienz der katalytischen Umsetzung des L-hArgs als Substrat durch die NOS viel geringer im Vergleich zu L-Arg ist (Hecker et al. 1991, Moali et al. 1998). Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Arginin und L-hArg kommt es somit zu einem kompetitiven Effekt (Kakoki et al. 2004).

3.1.2.4 Homoarginin als Inhibitor der Arginase

L-hArg ist sowohl ein Substrat, als auch ein schwacher Inhibitor der Arginase (Reczkowski und Ash 1994; Hrabák et al. 1994). Während L-Arginin ein Substrat der Arginase und kein Inhibitor ist, zeigt sich eine schwache Inhibition der Arginase durch L-hArg (Hrabák et al. 1994). Demgegenüber zeigten Substanzen wie L-Canavanin und L-Ornithin einen starken inhibitorischen Effekt auf die Arginase im Vergleich zu L-hArg (Hrabák et al. 1994). Die schwache Inhibition der Arginase durch L-hArg könnte zu einer erhöhten Verfügbarkeit von L-Arginin als Substrat für die NOS führen (Servillo et al. 2013). In der LURIC-Studie wurde beschrieben, dass L-hArg und ein erhöhter Quotient von Arginin/Ornithin im Verhältnis stehen und somit vermeintlich zur Messung Arginaseaktivität verwendet werden könne (März et al. 2010). Die schwache Korrelation zwischen L-hArg und der Arginaseaktivität (Arginin/Ornithin) wurde von Jazwinska-Kozuba in weiteren Kohortenstudien bestätigt ($r=0,31$, $p=0,048$) (Jaźwińska-Kozuba et al. 2013).

3.1.3 Interindividuelle Variation von Homoarginin

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass ein Unterschied der L-hArg-Konzentration zwischen Männern und Frauen besteht. So auch in der Dallas Heart Studie in welcher 3514 gesunde Probanden verschiedener Ethien untersucht wurden (Atzler et al. 2014a). Der Unterschied zwischen Männern und Frauen war im gemessenem EDTA-Plasma vorhanden ($p=0,01$) (Atzler et al. 2014a). Auch in der Gutenberg-

Gesundheitsstudie wurde die L-hArg-Konzentration von 786 gesunde Probanden aus EDTA-Plasma gemessen und zeigte ebenfalls einen geschlechtsspezifischen Unterschied ($p < 0,001$) (Atzler et al. 2016b) Auch bei Betrachtung einer älteren Population, wie der Hoorn-Studie zeigte sich ein Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Männern mit $1,63 \pm 0,51 \mu\text{mol/L}$ und Frauen $1,30 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$ (Pilz et al. 2014). Auch in der SHIP-Studie bestätigten Atzler et al. erneut einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen ($p < 0,01$) (Atzler et al. 2014b).

Tabelle 1: Geschlechtsspezifische Unterschiede für L-Homoarginin (L-hArg)

Studie	n Kohorte	Männer L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Frauen L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Quelle
Pomerania (Atzler et al.)	1359; davon 37,5% Männer 62,5% Frauen	Median: 2,72 <small>25./75.</small> Perzentile: 2,20-3,33	Median: 2,56 <small>25./75.</small> Perzentile: 1,99-3,32	(Atzler et al. 2014b)
Gutenberg (Atzler et al.)	786; gesunde	Median: 1,88 <small>25./75.</small> Perzentile: 1,47-2,41	Median: 1,77 <small>25./75.</small> Perzentile: 1,38-2,26	(Atzler et al. 2016b)
Hoornstudie (Pilz et al.)	606; davon 70,0 \pm 6,6 Jahre 48,7% Männer 51,3% Frauen	MW: 1,63 SD: 0,51	MW: 1,30 SD: 0,44	(Pilz et al. 2014)
Dallas Heart (Atzler et al.)	3514; davon Median 43 Jahre 44% Männer 56% Frauen	Median: 2,92 <small>25./75.</small> Perzentile: 2,29-3,62	Median: 2,70 <small>25./75.</small> Perzentile: 2,06-3,46	(Atzler et al. 2014a)

In der gleichen Studie zeigte sich eine Altersabhängigkeit der L-hArg-Konzentration. Die 1359 gesunden Probanden, im Alter 20-69 wurden in folgende Gruppen kategorisiert: 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 und 60-69 (Atzler et al. 2014b). Die L-hArg-Konzentration der Frauen nimmt zwischen dem 20. bis 40. Lebensjahr am meisten ab (Atzler et al. 2014b). Die L-hArg-Konzentration der Männer dagegen scheint zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr die höchste Konzentration zu erreichen, ehe eine Abnahme beginnt (Atzler et al. 2014b). Auch in der Gutenberg-Gesundheitsstudie mit 786 gesunden Probanden im Alter von 35-74 Jahren zeigt sich für beide Geschlechter ein Rückgang der L-hArg-Konzentration mit zunehmendem Alter (Spearman's rho -0,09 für Frauen und rho -0,11 für Männer; beide $p < 0,05$) (Atzler et al. 2016b). In einer kleiner angelegten Studie von 292 gesunden, männlichen Probanden im Alter von 20-75, die kategorisiert wurden (<35, 35-49- 50-64, >65), konnte kein signifikanter Unterschied abhängig vom Alter gefunden werden (Meinitzer et al. 2007). Bei 40 Kindern und Jugendlichen im Alter zwischen 3 und 18 Jahren zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Alter und L-hArg ($r=0,42$; $p=0,007$, Jaźwińska-Kozuba et al. 2013).

Des Weiteren zeigten sich abhängig von *der Ethnie* weitere Unterschiede (n=1032; p<0,001) (Atzler et al. 2014a). Hispanoamerikaner zeigten mit einem Median von 3,10 µmol/L die höchste Konzentration, gefolgt von Afroamerikanern mit 2,92 µmol/L und der weißen Bevölkerung mit 2,44 µmol/L (Atzler et al. 2014a):

Tabelle 2: Ethnien-spezifische Unterschiede für L-hArg (Atzler et al. 2014a)

Ethnie	Median	Spannweite	n
Hispanoamerikaner	3,10 µmol/L	2,43–3,95 µmol/L	596
Afroamerikaner	2,92 µmol/L	2,25–3,66 µmol/L	1812
Europäische Vorfahren	2,44 µmol/L	1,86–3,04 µmol/L	1032

Verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen stehen mit niedrigeren L-hArg-Konzentration in Zusammenhang (siehe 3.1.7). So liegt z.B. bei 389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall die L-hArg Konzentration im Median bei 1,07 µmol/L (Choe et al. 2013). Von diesen Patienten haben im weiteren Verlauf von durchschnittlich 7,4 Jahren Nachbeobachtungszeit 160 überlebt. Deren L-hArg-Werte lagen im Median bei 1,27 µmol/L, während die L-hArg-Ausgangswerte der 229 Patienten die im gleichen Zeitraum verstarben bei 0,96 µmol/L lagen (p<0,001) (Choe et al. 2013).

3.1.4 Intraindividuelle Variation von Homoarginin

Die Arbeitsgruppe (AG) Blackwell et al. befasste sich 2007 bereits mit der Ermittlung von L-hArg-Werten aus EDTA-Plasma (Blackwell et al. 2007). Dabei wurde zusätzlich das venöse Blut von zwölf freiwillige Probanden, 6 Frauen und 6 Männer, im Alter von 20-53 Jahren über 20 Wochen wöchentlich entnommen, um die Interindividuellen Schwankungen zu zeigen (Blackwell et al. 2007).

Tabelle 3: Variationskoeffizienten (VK) für HPLC (Blackwell et al. 2007)

Assay	Mittelwert	VK	
		1 Blutentnahme	20 Blutentnahmen Über 20 Wochen
Intraassay	1,79 µmol/L	1,8%	14,4%
Interassay	1,51 µmol/L	3,3%	37,8%

Der Interassay-Variationskoeffizient (VK) ist höher als der Intraassay-VK (Blackwell et al. 2007). Im zeitlichen Verlauf von 20 Wochen, werden zusätzlich die Intraindividuellen Schwankungen berücksichtigt und es ergibt sich eine höhere Variation: Die relativen VKs der Interassays zeigten dabei eine Spannweite von 19,1 bis 45,7% (Blackwell et al. 2007).

3.1.5 Variation durch Probenmaterial

Die Messung von Homoarginin ist bereits für diverse Proben beschrieben worden. In dieser Arbeit soll der Fokus auf Blutprodukte gelegt werden, wie Serum-, Plasma- und Kapillarblut. Die gleichzeitige Messung Serum und Plasma derselben Probanden ist von Kayacelebi et al. beschrieben worden: Bei den 10 Probanden zeigten 3 einen signifikanten Unterschied zwischen Plasma und Serum; dabei war die Konzentration im Plasma um durchschnittlich 12% höher (Kayacelebi et al. 2014b).

3.1.6 Physiologische Bedeutung von Homoarginin

L-hArg ist Bestandteil der Nahrung. Beim Menschen führte eine hochkalorische, proteinreiche Nahrung zu einer Erhöhung der L-hArg-Konzentration (Kayacelebi et al. 2015). Über das Trinkwasser supplementiert, führte 14 und 28 mg/mL L-hArg in Supplementationsstudien bei Mäusen zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration auf $328 \pm 40\%$ und $628 \pm 60\%$ im Vergleich zur nicht supplementierten Kontrollgruppe (Stockebrand et al. 2015). Wurden die Mäuse gleichzeitig mit einer Hochfett diät gefüttert, führte die Supplementierung mit 14 und 28 mg/mL L-hArg zu einem geminderten Anstieg der Plasmakonzentration auf $140 \pm 9\%$ und $206 \pm 14\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Stockebrand et al. 2015).

Die orale Supplementierung beim Menschen zeigte ebenfalls eine Plasmaerhöhung von L-hArg von $2,87 \pm 0,91 \mu\text{mol/L}$ auf $8,74 \pm 4,46 \mu\text{mol/L}$ nach einmaliger Gabe und auf $17,3 \pm 4,97 \mu\text{mol/L}$ nach 4-wöchiger oraler Gabe von 125 mg L-hArg einmal täglich. Dies entspricht einer Erhöhung der Plasmakonzentration auf 304% nach einmaliger Gabe und auf 603% nach 4-wöchiger Gabe (Atzler et al. 2016d).

In Mäusen zeigte sich, dass es unter einer Arginininfusion zu einer akuten Erhöhung der L-hArg-Konzentration im Plasma kommt (Kayacelebi et al. 2015). In Ratten konnte außerdem gezeigt werden, dass L-hArg bei L-hArg –Supplementierung von 19 g/kg für 4 Tage die Sekretion und Produktion exokriner Pankreasenzyme inhibiert (Hira et al. 2003). Zudem zeigten sich zwei Glukagonanaloga, die L-hArg enthalten, als sehr potente Antagonisten des Glukagonrezeptors. Zu diesen gehören [1-des-histidine][2-N alpha-trinitrophenylserine, 12-homoarginine]-glucagon und [1-N alpha-trinitrophenylhistidine, 12-homoarginine]-glucagon (THG) (Hruby 1982, Johnson et al. 1982). Die intravenöse Infusion von THG als Bolus führte zu einer Verringerung der Blutglukose um 20-35% in Ratten (Johnson et al. 1982). Mehrfache Infusionen zeigten sogar eine Blutglukoseerniedrigung um 30-65% (Johnson et al. 1982).

Für L-hArg zeigt sich ein Zusammenhang mit der Vasodilatation der Gefäße und der Endothelhomöostase (Hecker et al. 1991, Moali et al. 1998). Darüber hinaus ist L-hArg ein Inhibitor der leber- und knochenspezifischen alkalischen Phosphatase

(Lin und Fishman 1972). In der Schwangerschaft ändert sich die Endothelfunktion mit gleichzeitig gesteigerter Vasodilatation. Es zeigte sich, dass auch der L-hArg-Gehalt im 2. Trimenon ($4,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/L}$) und 3. Trimenon ($5,3 \pm 1,5 \mu\text{mol/L}$) in der Schwangerschaft signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2,7 \pm 1,0 \mu\text{mol/L}$) ansteigen ($p < 0,001$) (Pirjo Valtonen et al. 2008).

3.1.7 Pathophysiologische Rolle von Homoarginin

Eine ganze Reihe von Kohortenstudien zeigen einen Zusammenhang zwischen niedrigen L-hArg Konzentrationen und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bekannt (März et al. 2010, Pilz et al. 2011b, Drechsler et al. 2011, Atzler et al. 2013, Atzler et al. 2014a), ebenso wie zu Schlaganfall (siehe 3.1.3, Pilz et al. 2011a) und chronischer Nierenerkrankung (Ravani et al. 2013) und Tako-Tsubo-Kardiomyopathie (Kayacelebi et al. 2014a).

Im Gegensatz dazu ist höherer Blutdruck mit höheren Konzentrationen von L-hArg im Plasma assoziiert: Pro Standardabweichung (SD) Anstieg der L-hArg-Konzentration ($0,52 \mu\text{mol/l}$) erhöht sich der systolische Blutdruck um $3,9 \text{ mmHg}$ (Alters- und Geschlechtsadjustiert) (van der Zwan et al. 2013). Ebenso wurde in der Dallas Heart Studie eine positive Korrelation mit dem BMI gefunden (Atzler et al. 2014a).

Auch ein endokrinologischer Zusammenhang konnte gezeigt werden. Patienten mit einer Hyperthyreose wiesen einen um $18,5\%$ reduzierten L-hArg Spiegel und Patienten mit einer Hypothyreose einen um $14,8\%$ reduzierten der L-hArg Spiegel im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf ($p=0,05$) (Verhelst et al. 1997). Auch die Nebenschilddrüse scheint eine Rolle zu spielen: Patienten mit Hyperparathyreoidismus zeigten eine signifikant niedrigere der L-hArg-Konzentration ($p < 0,001$), welches sich auch nach Ausschluss von Patienten mit einer kleineren GFR als 60 ml/min ebenso signifikant blieb (Tomaschitz et al. 2015). Darüber hinaus zeigt sich bei Beobachtung chronisch Lebererkrankten über einen Zeitraum von $3,5$ Jahren für der L-hArg eine Korrelation mit dem MELD-Score (Pilz et al. 2015).

Auch für den Verlauf einer pathologischen Schwangerschaft zeigte sich ein Zusammenhang mit der L-hArg Konzentration. Die gemessenen der L-hArg-Werte in den Gestationswochen $11(+0)$ bis $13(+6)$ für 25 Frauen mit früher Präeklampsie waren niedriger und unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,006$) (Khalil et al. 2013). Als frühe Präeklampsie gilt die Ausprägung von Symptomen vor der 34. Schwangerschaftswoche (Khalil et al. 2013). Die Ausbildung einer Präeklampsie nach der 34. Schwangerschaftswoche war dagegen nicht mit der L-hArg assoziiert (Khalil et al. 2013). In einer weiteren Langzeitbeobachtung über durchschnittlich 10 Jahren von 89 Patientinnen mit Präeklampsie während der ersten Schwangerschaft wurde gezeigt, dass das gleichzeitige Vorliegen von

Präeklampsie in der ersten Schwangerschaft und ein niedriges Geburtsgewicht mit einem der L-hArg-Wert oberhalb der 75ten Perzentile vergesellschaftet war (Sandvik et al. 2013).

3.1.8 Korrelation von Homoarginin mit laborchemischen und klinischen Phänotypen

Im Tiermodell ist ein Zusammenhang von der L-hArg mit Blutzucker und Adipositas in Mäusen gezeigt worden (Stockebrand et al. 2015). Das Gewicht und die Glukosetoleranz waren dabei unverändert (Stockebrand et al. 2015). Beim Menschen wiesen folgende Laborwerte eine Korrelation mit der L-hArg Konzentration auf: Arginin, c-reaktives Protein (CRP), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Fibrinogen, Kreatinin, Kreatinin-Clearance, Lysin, N-terminales pro brain natriuretisches Peptid (NT-pro-BNP), von Willebrandfaktor (vWF), β -thromboglobulin, Endothelin-1.

Tabelle 4: L-Homoargininkorrelationen mit Laborparametern

Laborwert	Kohortenbeschreibung	Zusammenhang	Quelle
Arginase Aktivität (Arginin/Ornithin)	n=40 Gesunde Kinder (3-18 Jahre)	r=0,31; p=0,048	(Jaźwińska-Kozuba et al. 2013)
Arginin	n=40 Gesunde Kinder (3-18 Jahre)	r=0,43; p=0,005	(Jaźwińska-Kozuba et al. 2013)
Arginin	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	r=0,41; p<0,001	(Choe et al. 2013)
Arginin	3037 davon 31,5% mit akutem Koronarsyndrom	r=0,32; p<0,001	(Tomaschitz et al. 2014)
Arginin nach Supplementation von Vitaminen, FS und Spurenelementen	100 Patienten mit rheumatoider Arthritis (88% Frauen)	r=0,23; p=0,034	(Kayacelebi et al. 2014c)
CRP	100 Patienten mit rheumatoider Arthritis (88% Frauen)	Keine Korrelation	(Kayacelebi et al. 2014c)
CRP	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	r=0,38; p<0,001	(Choe et al. 2013)
CRP (hsCRP)	3037 davon 31,5% mit akutem Koronarsyndrom	r=-0,22; p<0,001	(Tomaschitz et al. 2014)

Tabelle 4: L-Homoargininkorrelationen mit Laborparametern Fortsetzung

Laborwert	Kohortenbeschreibung	Zusammenhang	Quelle
Cystatin C	3037 Patienten davon 31,5% mit akutem Koronarsyndrom	$r=-0,27$; $p<0,001$	(Tomaschitz et al. 2014)
eGFR	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	$r=0,19$; $p<0,001$	(Choe et al. 2013)
eGFR	3037 davon 31,5% mit akutem Koronarsyndrom	$r=0,20$; $p<0,001$	(Tomaschitz et al. 2014)
Fibrinogen	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	$r=0,25$; $p<0,001$	(Choe et al. 2013)
Kreatinin	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	$r=-0,19$; $p=0,001$	(Choe et al. 2013)
Kreatinin-Clearance (Frauen)	135 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (nicht dialysiert; 23-86 Jahre; 52%Frauen)	$r=0,32$; $p=0,025$	(Marescau et al. 1997)
Kreatinin-Clearance (Männer)	135 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (nicht dialysiert; 23-86 Jahre; 52%Frauen)	$r=0,33$; $p=0,003$	(Marescau et al. 1997)
Lysin	3037 Patienten davon 31,5% mit akutem Koronarsyndrom	$r=0,35$; $p<0,001$	(Tomaschitz et al. 2014)
NT-pro-BNP	2971 Kaukasier (LURIC Studie)	$r=-0,33$; $p<0,001$	(Pilz et al. 2011b)
NT-pro-BNP	108 Patienten mit unbehandelter pulmonalerterieller Hypertonie; 53±17 Jahre	$r =-0,21$; $p<0,05$	(Atzler et al. 2016c)
vWF	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	$r=0,31$; $p<0,001$	(Choe et al. 2013)
β-thromboglobulin	389 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall	$r=0,31$; $p<0,001$	(Choe et al. 2013)
Endothelin-1	108 Patienten mit unbehandelter pulmonalerterieller Hypertonie; 53±17 Jahre	$r=-0,31$; $p<0,05$	(Atzler et al. 2016c)

Tabelle 4: L-Homoargininkorrelationen mit Laborparametern Fortsetzung

Laborwert	Kohortenbeschreibung	Zusammenhang	Quelle
ADMA	108 Patienten mit unbehandelter pulmonalarterieller Hypertonie; 53±17 Jahre	Keine Korrelation	(Atzler et al. 2016c)

In einer Stufenweisen multiplen linearen Regressionsanalyse konnten Tomaschitz et al. folgende Vorhersagewerte, sortiert nach Ihrem Zusammenhang, für die der L-hArg-Konzentration ermitteln:

1. Arginin
2. NT-pro-BNP
3. Lysin
4. BMI (Body Maß Index)
5. Haemoglobin
6. eGFR
7. Geschlecht (Tomaschitz et al. 2014)

3.2 Nachweismethoden und Messwerte für Homoarginin

Derzeit ist die Messung von L-hArg mit folgenden Methoden möglich: HPLC, Enzym-linked Immunoassay (ELISA), Flüssigkeitschromatografie mit Massenspektrometrie (LC-MS), Gaschromatografie (mit Massenspektrometrie (GC-MS) und Ultra-Performance-Liquid-Chromatography Quadrupol time-of-flight Massenspektrometrie (UPLC-qTOF-MS) (Gellert 2017).

3.2.1 HPLC zur Quantifizierung von Homoarginin

Aufgrund der parallelen Messung der Argininderivaten: ADMA, SDMA, der L-hArg und L-Arginin, konnten bereits innerhalb von ADMA-Studien L-hArg-Werte ermittelt werden, welche durch folgende Arbeitsgruppen (AG) veröffentlicht wurden:

Tabelle 5: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels HPLC (Gellert 2017)

Methode (Probenmaterial)	n Kohorte	L-hArg in µmol/L	Quelle
HPLC (EDTA-Plasma)	100 23-65 Jahre Gesund 51% männlich	MW: 1,99 Median: 1,87 95%Konfidenzintervall: 0,30–3,68	(Blackwell et al. 2007)

Tabelle 5: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels HPLC (Gellert 2017) Fortsetzung

Methode (Probenmaterial)	n Kohorte	L-hArg in µmol/L	Quelle
HPLC (Heparinplasma)	30	MW: 2,15 SD: 0,75 Spannweite: 0,86-3,95	(Jones et al. 2010)
HPLC-MS/MS (Plasma)	12 gesunde Probanden	MW: 2,30 SD: 0,74	(Servillo et al. 2013)

Die Methodenpräzision, gekennzeichnet durch den VK, ist in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6: Methodenpräzision der HPLC Messung von L-Homoarginin (L-hArg) mit Variationskoeffizienten (VK) (Gellert 2017)

Methode (Probenmaterial)	Intra-assay VK	Inter-assay VK	Relative Wiederfindungsrate (Minimum-Maximum)	Quelle
HPLC (EDTA-Plasma)	1,8% (n=10)	3,3% (n=10)	-	(Blackwell et al. 2007)
HPLC (Plasma)	1,4% -	2,9% (n=10)	100% (-)	(Valtonen et al. 2005)

Tabelle 6: Methodenpräzision der HPLC Messung von L-Homoarginin (L-hArg) mit Variationskoeffizienten (VK) (Gellert 2017) Fortsetzung

Methode (Probenmaterial)	Intra-assay VK	Inter-assay VK	Relative Wiederfindungsrate (Minimum-Maximum)	Quelle
HPLC (Heparin-Plasma)	1,2% (n=10)	4,6% (n=30)	- (91,7- 98,1%)	(Jones et al. 2010)
HPLC-MS/MS (Plasma)	-	-	94-98% (-)	(Servillo et al. 2013)

Weitere Nachweismöglichkeiten von Homoarginin mittels HPLC aus Urin (Markowski et al. 2007) und Rattengewebe (Hou et al. 2015) wurden beschrieben.

3.2.2 ELISA zur Quantifizierung von Homoarginin

Zur Quantifizierung von L-hArg existiert ein kommerzieller ELISA der Firma DLD Diagnostika GmbH (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte

mbH 2014). Der Nachweis von Homarginin erfolgt aus 20 µl EDTA-Plasma, Serum oder Zellkulturüberstand (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Die Proben können nach bis zu 6 Stunden bei 2-8°C Lagerung und bis zu 18 Monate bei -20°C Lagerung gemessen werden (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Der Referenzbereich wird für EDTA-Plasma und Serum für MW±SD mit 2,0±0,7 µmol/L angegeben (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Als Grundlage diente die Messung von 252 gesunden Probanden (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Angaben zur Methodenpräzision werden nur für den Intraassay verschiedener Medien wie folgt angegeben:

Tabelle 7: DLD Diagnostika GmbH – Variationskoeffizienten (VK) für ELISA (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

Intraassay (Medium)	VK
Intraassay EDTA-Plasma	3,3-6,1%
Intraassay Serum	4,6-5,6%
Intraassay Zellkultur	4,7-6,2%

Es liegen keine Daten zur Interassay-Variabilität vor. Die Testung der Spezifität ergibt eine Kreuzreaktion mit Arginin von 0,025%, und mit ADMA, SDMA und NMMA von <0,025% (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Die Sensitivität für Homoarginin ist mit 0,5 µmol/L angegeben (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016). Die Wiederfindungsrate, auch Recovery genannt, beträgt im Durchschnitt 95% für EDTA-Plasma, 103% für Serum und 96% für Zellkulturmedium (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016).

3.2.3 Korrelation ELISA mit LC-MS/MS

Es liegen Korrelationsdaten von L-hArg-Werten, gemessen mit ELISA und LC-MS, für Kontrollproben (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014), als auch für Patientenproben vor (Cordts et al. 2015):

Tabelle 8: Korrelation der L-Homoarginin (L-hArg) Quantifizierung von ELISA und LC-MS/MS

Proben	Korrelation	N Kohortenbeschreibung	Quelle
Kalibratoren ELISA Kit DLD Diagnostika GmbH	$r^2=0,998$	25	(DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)
Kalibratoren ELISA Kit DLD Diagnostika GmbH	$r^2=0,99$	4-6	(Cordts et al. 2015)
Kalibratoren der LC- MS/MS	$r^2=0,97$	4-6	(Cordts et al. 2015)
Humanes Menschenplasma	$r^2=0,78$	144 davon: 13 gesunde 36 Angina Pectoris 95 akutes Koronarsyndrom	(Cordts et al. 2015)

Bei der Verwendung von humanen Plasmaproben zeigt sich eine 30% höhere L-hArg-Konzentration bei Messung mit LC-MS/MS im Vergleich zur Messung der humanen Plasmaproben mit dem ELISA (Cordts et al. 2015). Durch Lehmann et al. ist bereits bekannt, dass die Aminosäure Trimethyllysin isoboar zu Homoarginin ist und zu Interferenzen führen könne, da diese Aminosäure ebenso im humanen Plasma vorkommt (Lehman et al. 1987). Diese Art der Interferenz kann durch die Kombination mit MS/MS eliminiert werden, indem das spezifische Fragment für L-hArg gemessen wird (Cordts et al. 2015).

3.2.4 LC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Homoarginin

In der Forschung ist die Quantifizierung von L-hArg bereits etabliert, weshalb mehrere Studien Aussagen zu Messwerten und Messpräzision bestehen:

Tabelle 9: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels LC-MS/MS Methoden (Gellert 2017)

Methode (Probenmaterial)	n	L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Quelle
UPLC-QToF-MS (EDTA-Plasma)	125 (≥ 60 Jahre)	MW: 0,99 SD: 0,04 Spannweite: 0,37-2,19 95% KI ¹ : 0,92-1,04	(van Dyk et al. 2015)
LC-MS/MS	3514	Median: 2,80 Interquartilabstand: 2,14-3,54 Hispanics Median: 3,10 Afroamerikaner Median: 2,92 Weiße Median: 2,44	(Atzler et al. 2014a)
LC-MS/MS (Serum)	1359 Gesund; 510 Männer (m); 849 Frauen (w)	Median: 2,63 95% KI: 2,08-3,32 Median m: 2,72 Median s: 2,56 95% KI w: 1,41-5,0 Spannweite: 2,08-3,32 95% KI m: 1,20-5,53	(Atzler et al. 2014b)
LC-MS/MS (Plasma)	136	Median: 1,41 Interquartilabstand: 1,14-1,82	(Jaźwińska-Kozuba et al. 2013)
LC-MS/MS (Heparinplasma)	27	MW: 2,01 SD: 0,65	(Davids et al. 2012a)
LC-MS/MS (Plasma)	136	MW: 2,5 SD: 1	(Atzler et al. 2011)

Die Präzision der Messung mittels LC-MS/MS ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 10: Methodenpräzision von LC-MS/MS Varianten (Gellert 2017); dargestellt mit Variationskoeffizienten (VK)

Methode (Probenmaterial)	Intra assay VK	Inter assay VK	Relative Wiederfindungs-rate (Minimum-Maximum)	Quelle
UPLC-QToF-MS (Plasma)	1,0% (n=6)	-	98% (-)	(van Dyk et al. 2015)
LC-MS/MS (Plasma)	4,5% (n=4)	7,5% (n=13)	- (-)	(Atzler et al. 2011)
LC-MS/MS (Heparinplasma)	1,9% (n=15)	3,1% (n=15)	97,6% (95,0-100,7%)	(Davids et al. 2012a)

¹ Konfidenzintervall (KI)

3.2.5 GC-MS und GC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Homoarginin

Folgende Messwerte für die L-hArg-Konzentrationen sind erhoben worden:

Tabelle 11: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels GC-MS (Gellert 2017)

Methode (Probe)	n	L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Quelle
GC-MS (Serum und Plasma)	10	MW: 1,87 SD: 0,67	(Kayacelebi et al. 2014b)
GC-MS (Plasma)	17 (männlich 19-35 Jahre)	MW: 1,70 SD: 0,62 Median: 1,50	(Hanff et al. 2016)

Bei der Methode von Hanff et al. wurden die Plasmaproben zunächst mit methanolischen HCl behandelt (Hanff et al. 2016). Dies führte zur Veresterung der Methylgruppen (Hanff et al. 2016). Selbiges Verfahren wurde auch bei dem internen Standard angewandt (Hanff et al. 2016). Der interne Standard enthält statt Wasserstoffatomen Deuteriumatome und ist somit markiert (Hanff et al. 2016). Die Methodenpräzision wird wie folgt zusammengefasst:

Tabelle 12: Methodenpräzision der GC-MS bzw. GC-MS/MS (Gellert 2017) dargestellt: Variationskoeffizient (VK)

Methode	Intraassay VK	Interassay VK	Relative Wiederfindungsrate (Minimum-Maximum)	Quelle
GC-MS	4,0% (2,2-5,8%)	4,0% (0,5-7,6%)	- (87,7- 99,2%)	(Kayacelebi et al. 2014b)
GC-MS/MS	3,1% (1,4-4,5%)	2,9% (0,9-5,8%)	- (99,6-108,8%)	(Kayacelebi et al. 2014b)
GC-MS	7,5% (2,4-10%)	-	- (92,6-109,1%)	(Hanff et al. 2016)

3.3 Methodvalidierung

Für die Einführung eines neuen Analyseverfahrens ist die systematische Bewertung des Verfahrens notwendig, um die Eignung und Zuverlässigkeit zu prüfen. Um die Zuverlässigkeit bewerten zu können, sollten Kenngrößen wie Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Wiederfindungsrate, Nachweisgrenze und Robustheit ermittelt werden. Auch der Vergleich mit einer bereits etablierten Methode wird empfohlen. (Wellnitz und Guschke 2005 U. S. Department of Health and Human Services, food and Drug Administration 2013, Kromidas 2016)

Die Validierung des ELISA zur Bestimmung der L-hArg Konzentration aus EDTA-Plasma oder Serum erfolgte bereits durch die Firma DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Produkte mbH 2014 auf die sich die nachfolgenden Testcharakteristika beziehen. Es zeigte sich ein Referenzbereich von $2,0 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$, eine untere Nachweisgrenze von $0,05$ $\mu\text{mol/L}$, eine Spezifität für Homoarginin von 100% bei einer Kreuzreaktivität für Arginin mit 0,025% und $<0,025\%$ getestet für ADMA, SDMA und NMMA. Die Wiederfindungsrate für EDTA-Plasma betrug 87-104%, im Mittel 95% in einem Messbereich von $0,66 - 6,70$ $\mu\text{mol/L}$. Die Wiederfindungsrate für Serum betrug 97-107%, im Mittel 103% in einem Messbereich von $1,51 - 5,10$ $\mu\text{mol/L}$. Die Linearität war für EDTA-Plasma (Mittelwert 99%; 89-105%) und Serum (Mittelwert 103%; 96-109%) gegeben. Die Reproduzierbarkeit wurde für EDTA-Plasma mit einem Intraassay-VK von 3,3-6,1% (Messbereich $0,83-2,23$ $\mu\text{mol/L}$) und für Serum mit 4,6-5,6% (Messbereich $1,30-2,73$ $\mu\text{mol/L}$) angegeben. Der Methodenvergleich mit der LC-MS zeigte eine Korrelation von $R=0,998$ ($n=25$) für EDTA-Plasma und eine Korrelation von $r=0,965$ ($n=12$) für Serum. (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

Durch die Erweiterung der Methode durch die Messung des Eluats aus Trockenblutkarten ist eine erneute Bewertung der Präzision dargestellt durch VK, und eine Bewertung der Robustheit in der neuen Präanalytischen Phase notwendig, zudem wird grundsätzlich empfohlen Laborinterne Referenzwerte zu ermitteln (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration 2013, DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014, Kromidas 2016).

Die Leitlinie für die Industrie des U.S. Departments of Health and Human Services, Food and Drug Administration von 2013 schreibt für Ligandenbindungsassays vor, dass die Variationkoeffizienten nicht über 20% sein sollten, während für die niedrigste Konzentration ein Grenzwert von 25% gilt. Diese Arbeit orientiert sich nachfolgend an dieser Leitlinie.

3.4 Zusammenfassung

Die nicht essentielle, kationische Aminosäure der L-hArg ist ein Derivat des Arginins mit einer weiteren Methylengruppe (Hecker et al. 1991, Moali et al. 1998, Bretscher et al. 2003, Papageorgiou et al. 2015, Kayacelebi et al. 2015). Zur Synthese von L-hArg dient das Substrat Lysin (Ryan und Wells 1964, Kayacelebi et al. 2015). Die endogene Synthese erfolgt einerseits durch das Enzym AGAT, als auch mit Hilfe der Enzyme des Harnstoffzyklusses (Ryan und Wells 1964, Cathelineau et al. 1974, Davids et al. 2012b, Papageorgiou et al. 2015, Kayacelebi et al. 2015). L-hArg interagiert mit der Arginase als Substrat und Inhibitor (Reczkowski und Ash 1994, Atzler et al. 2011, Davids et al. 2012b; Jaźwińska-Kozuba et al. 2013).

L-hArg selbst ist ein Substrat der Stickstoffmonoxidsynthese mit einer geringeren Affinität und Effektivität als Arginin (Hecker et al. 1991, Moali et al. 1998, Kayacelebi et al. 2015, Tsikas und Wu 2015). Es unterstützt die Vasodilatation der Gefäße und zeigt eine Bedeutung in der Endothelhomöostase (Lin und Fishman 1972, Hecker et al. 1991). Es sind klinische Zusammenhänge mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben worden (März et al. 2010; Pilz et al. 2011b; Drechsler et al. 2011; Atzler et al. 2013; Atzler et al. 2014a). Weitere bisher nachgewiesene Zusammenhänge bestehen mit Diabets mellitus, Adipositas und Präeklampsie (Tousoulis et al. 2010, Sandvik et al. 2013, Khalil et al. 2013, van der Zwan et al. 2013, Tsikas und Wu 2015).

Die Messwerte für heterogene Probanden zeigen methodenübergreifend im Durchschnitt eine L-hArg-Konzentrationen von 2,15 $\mu\text{mol/L}$ in gesunden Probanden. Dabei sind alters-, intraindividuelle-, ethnische- und geschlechtsspezifische Variationen vorhanden (Blackwell et al. 2007, Atzler et al. 2014). Von diesen lassen sich die der L-hArg-Konzentrationen von Patienten deutlich abgrenzen. Patienten mit akutem Schlaganfall zeigten im Median eine L-hArg-Konzentration von 1,07 $\mu\text{mol/L}$ (Choe et al. 2013).

Korrelationen von der L-hArg mit folgenden laborchemischen und klinischen Untersuchungsdaten bei Patienten sind beschrieben worden:

- Nierenparametern (eGFR, Kreatinin-Clearance, Kreatinin) (Marescau et al. 1997, Choe et al. 2013, Tomaschitz et al. 2014,)
- Entzündungsparametern (CRP, Fibrinogen) (Choe et al. 2013, Tomaschitz et al. 2014, Kayacelebi et al. 2014c)
- Homöostaseparametern (vWF, Fibrinogen, β -thromboglobulin) (Choe et al. 2013)
- Herzinsuffizienz (NT-pro-BNP, Ejektionsfraktion) (Pilz et al. 2011b)

Somit besteht eine zentrale Bedeutung für L-hArg als Prädiktor für kardiovaskulärer Ereignisse.

4 Material und Methoden

Die Methode zur Messung der L-hArg-Konzentration aus Trockenblutkarten gliedert sich in folgende drei Abschnitte:

1. Probengewinnung und Verarbeitung
2. Elution
3. Homoarginin ELISA der Firma DLD Diagnostika

Zunächst wird das grundlegende Verfahren dargestellt, nach deren Anleitung auch standardmäßig gearbeitet wurde. Die Abweichungen der einzelnen Versuche werden in dem jeweiligen Kapitel erläutert. Als Ausgangsprotokoll diente die Anleitung zur Elution von ADMA aus Trockenblutkarten (ADMA Card ELISA, DLD Diagnostika), die den Ergebnissen der Vorversuche zur Homoargininmessung angepasst wurden.

4.1 Anleitung zur Bestimmung von Homoarginin aus Trockenblutkarten (Standardanleitung)

4.1.1 Laborgeräte, Materialien, Reagenzien, Software

Die verwendeten Laborgeräte, Materialien, Reagenzien und Software sind tabellarisch im Anhang 13.2 dargestellt.

4.1.2 Probandenrekrutierung und Eigenschaften

Die verwendeten Blutproben stammen alle von gesunden Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Die Kodierung der Probanden erfolgte mit römischen Ziffern, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 13: Geschlechterverteilung der Probanden

Probandennummer	Geschlecht
I	weiblich
II	männlich
III	männlich
IV	weiblich
V	weiblich
VI	weiblich
VII	männlich
VIII	männlich
IX	weiblich
X	männlich
XI	weiblich
XII	männlich
XIII	männlich

4.1.3 Probengewinnung und Präparation der Trockenblutkarten

Die Trockenblutkarten, Filterpapier der Firma Sartorius stedim, werden mit je 50 µl gut gemischtem Vollblut eines unmittelbar vor Verarbeitung venös entnommenen EDTA-Röhrchens in die kreisrunden Markierungen getropft. Diese Markierungen auf der Trockenblutkarte sind im Durchmesser 1,1 cm aus diesen Spots werden die Stanzlinge zur Weiterverarbeitung ausgestanzt. Für eine Probe werden je 2 Stanzlinge benötigt und das Ergebnis mit 1,5 multipliziert. Alternativ können auch initial 3 Spots verwendet werden, sodass eine mathematische Adaption entfällt. In dieser Studie wurden, wenn nicht anders beschrieben, standardmäßig 2 Spots verwendet und das Ergebnis adaptiert. In Kapitel 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass sowohl 2 als auch 3 Spots äquivalent sind. Anschließend trocknete das Filterpapier für mindestens 24 h bei Raumtemperatur aufrechtstehend in einem Kartenständer.

Die Lagerung der Trockenblutkarten erfolgte in Plastiktüten der Größe 14x8 cm mit Siegelverschluss und einem 9x4 cm großen und 10 g schwerem Silikagelbeutel, um Einflüsse von Feuchtigkeit während der Lagerung zu vermeiden. Diese lagerten für bis zu zwei Wochen in einem lichtundurchlässigen und temperaturstabilen Karton. Abweichungen von diesem Protokoll werden in den jeweiligen Kapiteln genauer beschrieben.

4.1.4 Elution

Zur Elution wurden aus 2 Spots der Trockenblutkarten im Durchmesser 6 mm große Kreise ausgestanzt und in einem 2,0 ml Eppendorfgefäß für 15 Minuten mit 300 µl Elutionsmittel bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Für die Standards und Kontrollen werden statt Stanzlingen 15 µl der Standardlösungen oder Kontrolllösungen als Äquivalent eingesetzt. Im Anschluss werden die Gefäße für 5 Minuten bei 3.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zwei Elutionslösungen wurden dabei hauptsächlich verwendet:

Für die Vorversuche:

- Einfluss von Enzyminhibitoren [Kap. 2.2.2, 2.2.3]
- Vergleich Plasma und Vollblut [Kap. 2.2.1] und
- Auswahl einer Elutionslösung [Kap. 2.2.5]

wurde das Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs der Firma DLD verwendet, welches für die Hauptversuche durch eine selbst hergestellte Elutionslösung, 1 M TRIS-HCl gepuffert auf pH 1, ersetzt wurde.

4.1.5 ELISA-Assay

Für den ELISA wurden die Kits der Firma DLD Diagnostika verwendet mit folgender Modifikation in der Probevorbereitung. Vor dem eigentlichen ELISA findet eine

Acylierung statt, die in Doppelbestimmung durchgeführt wird, sodass zweimal je 75 µl des Eluats in eine Reaktionsplatte pipettiert werden. Im Anschluss werden 25 µl Acylierungspuffer und 50 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettiert und die Platte wurde für 10 Sekunden manuell geschüttelt. Danach wurden 25 µl des frisch angesetzten Acylierungsreagenz hinzugefügt und die Reaktionsplatte im Anschluss bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei 300-450 rpm unabgedeckt inkubiert.

Entsprechend der Anleitung wurden 25 µl der so vorbereiteten Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert und mit 50 µl Antiserum ergänzt, um für 90 Minuten mit einer Folie abgedeckt auf einem Horizontalschüttler bei 300-450 rpm bei Raumtemperatur zu inkubieren. Der 4-malige Waschvorgang wurde durch den MRW Waschautomat maschinell durchgeführt, bevor 100 µl Konjugat hinzugefügt und für 25 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert wurden. Nach einem erneuten 4-maligen Waschvorgang wurde das Substrat zugegeben und auf dieselbe Weise inkubiert. Nach Ergänzen der 100 µl Stopplösung erfolgte die Endpunktabsorptionsmessung bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm mittels Tecan Sunrise. Wurden für den Versuch 2 Spots eingesetzt, so wurde das Ergebnis mit 1,5 multipliziert.

4.2 Vorversuche zur Methodenetablierung

Der ELISA zur L-hArg-Quantifizierung im Plasma, Serum und Zellkulturproben ist bereits als Kit von DLD Diagnostika verfügbar. Als Vorversuche werden alle Prozesse in der Probenvorbereitung bezeichnet:

- Vergleich zwischen Vollblut und Plasma
- Präparation der Trockenblutkarten mit Arginase-Hemmstoffen
- Präparation der Trockenblutkarten mit Protease-Inhibitoren
- Wahl der Elutionslösung

Eine Modifikation am ELISA wurde nicht vorgenommen.

4.2.1 Vergleich von Plasma und Vollblut

Für den Vergleich der L-hArg-Werte aus Plasma und Vollblut wurden von 3 Probanden 2 EDTA Monovetten venös entnommen. Eine Abweichung vom Standardprotokoll erfolgte für die Plasmaprobe, wobei das für die Plasmamessung bestimmte Röhrchen bei 4500 rcf für 20 Minuten zentrifugiert und unmittelbar 50 µl des überstehenden Plasmas auf die Trockenblutkarte pipettiert wurden. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll. Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv mit Bestimmung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten. Statistische Signifikanzen wurden mittels einer ANOVA-Analyse nach Bonferroni ermittelt.

4.2.2 Einfluss von Arginase-Hemmstoffen

Um den Einfluss des Arginase-Inhibitors Nor-NOHA zu ermitteln, wurden 25 µl des Enzyminhibitors auf die Trockenblutkarten pipettiert, wobei der markierte Kreis bis zur Begrenzung vollständig benetzt war. Nach mindestens zweistündiger Trocknung wurden 50 µl Vollblut auf die Karten pipettiert und für mindestens 24 Stunden in einem Kartenständer stehend getrocknet. Diese wurden mit Proben verglichen, welche nicht zuvor mit Nor-NOHA vorbehandelt wurden. Um eine Interferenz durch den Hemmstoff auszuschließen, wurden Spots gemessen, die nur mit dem Arginase-Hemmstoff, ohne weitere humane Blutprodukte inkubiert wurden. Für eine schematische Darstellung siehe Abbildung 5. Die Messungen wurden von einem Probanden in sechsfacher Bestimmung durchgeführt, während die Eigenpositivität mit 2 Messungen ermittelt wurde. Die Auswertung erfolgte mit deskriptiver Statistik und bei Normalverteilung und Varianzhomogenität einem gepaarten t-Test.

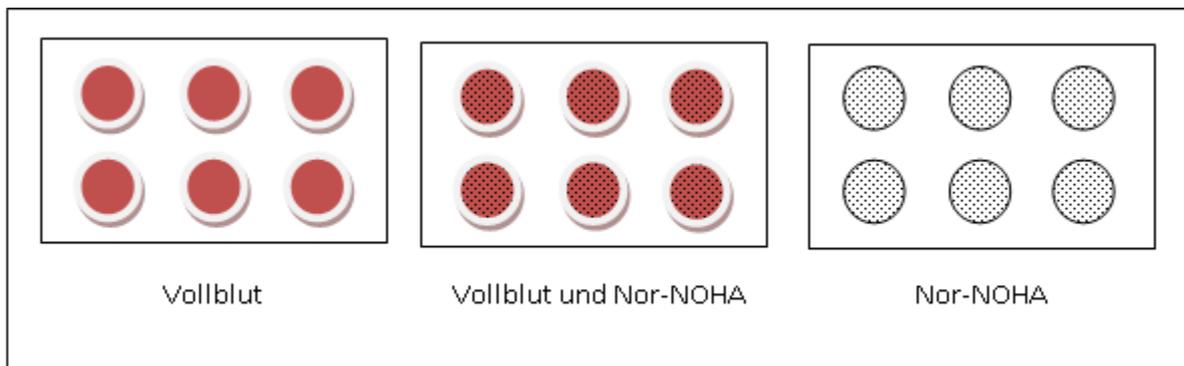


Abbildung 5: Trockenblutkartenpräparation für die Bewertung des Einflusses des Arginase-Hemmstoffes Nor-NOHA

4.2.3 Einfluss von Proteaseinhibitoren

Zur Testung des Einflusses von Proteaseinhibitoren wurde ein Gemisch der Firma Sigma Aldrich/Merck verwendet: Produktnummer P8340. Der Enzymcocktail enthält folgende Komponenten in folgender Konzentration im Überblick:

- 4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid (AEBSF) 104 mM
- Apoprotinin 80 µM
- Bestatin-hydrochlorid 4 mM
- E-64 1,4 mM
- Leupeptin 2 mM
- Pepstatin A 1,5 mM

Davon wurde für die Präparation der Trockenblutkarte 25 µL unverdünnter Proteaseinhibitormix aufgetragen und vor weiterer Verwendung getrocknet.

4.2.3.1 Einfluss von Proteaseinhibitoren mit ADMA Reagenz

Zur Erueierung des Protease-Inhibitor (PI) Einflusses wurden auf die Trockenblutkarten 25 µl je Spot eines Protease-Inhibitor Gemisches der Firma Sigma pipettiert. Nach mindestens zwei Stunden Trocknungszeit wurde in einem Versuch das Plasma und in einem weiteren Versuch das Vollblut entsprechend der Standardanleitung aufgetragen und weiterverarbeitet. Dabei wurden 5 Stichproben von drei Probanden für folgende Kombinationen gemessen:

- a) Vollblut ohne Proteaseinhibitor (PI)
- b) Vollblut mit PI
- c) Plasma ohne PI
- d) Plasma mit PI

Ebenso wurden 3 Messungen zur Eigenpositivität des PI-Gemisches gemessen. Als Elutionsreagenz wurde das ADMA Reagenz verwendet. In diesem wurden auch die Standardreihe und Kontrollen verdünnt. Zur Prüfung eines Unterschiedes bei Enzyminhibitoreinsatz wurde zusätzlich zur deskriptiven Statistik eine ANOVA nach bonferroni berechnet.

4.2.3.2 Einfluss von Proteaseinhibitoren mit 1M TRIS-HCl (pH 1)

Um den Einfluss der eigens hergestellten Elutionslösung auszutesten wurde der L-hArg-Wert von 3 Probanden aus Trockenblutkarten in folgender Konstellation in fünffacher Messwiederholung ermittelt:

- a) Vollblut ohne Proteaseinhibitor
- b) Vollblut mit Proteaseinhibitor
- c) Plasma ohne Proteaseinhibitor
- d) Plasma mit Proteaseinhibitor

Dazu wurden mit 25 µl Proteaseinhibitor vorpräparierte Trockenblutkarten mit 50 µl Vollblut aus EDTA-Monovetten oder 50 µl Plasma aus einer zweiten zeitgleich abgenommenen EDTA-Monovette auf die Spots pipettiert. Mit Hilfe dieser Messung konnten b) und d) ermittelt werden. Während für die L-hArg-Messung a) und c) keine vorpräparierten Trockenblutkarten verwendet wurden. Die Verarbeitung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll unter Verwendung von 1 M TRIS-HCl, pH 1, für die Elution der Trockenblutspots und zur Verdünnung der Standards und Kontrollen.

Ergänzend wurde die Eigenpositivität des Proteaseinhibitors ermittelt, indem in 5-maliger Messung die Lösung des PI-Cocktails im selben Verhältnis wie Standardlösungen, 25 µl direkt mit den 300 µl TRIS-HCl Puffer (pH 1) inkubiert wurden. Als zweites Verfahren wurden ebenfalls 5-malig 25 µl auf die Spots der Trockenblutkarten pipettiert ausgestanzt und mit 300 µl Elutionspuffer inkubiert. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung Anhang 13.1.

4.2.4 Elutionslösungen

Die Auswahl der Elutionslösungen erfolgte nach folgendem Schema:

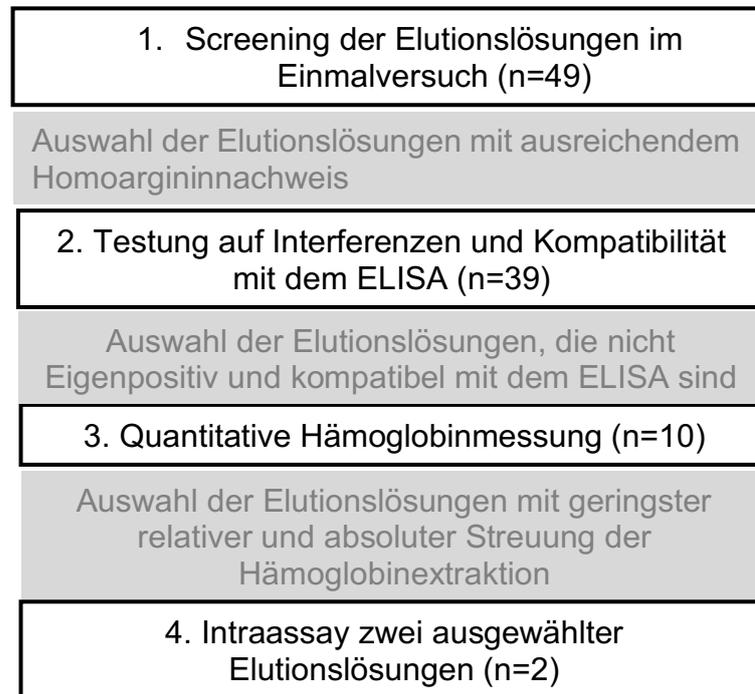


Abbildung 6: Auswahlverfahren für Elutionslösungen

Zunächst wurden aus der Literatur folgende Elutionslösungen ausgewählt und gescreent:

Tabelle 14: Übersicht der Elutionslösungen

Elutionslösungen	
Acetonitril	Methanol mit Salzsäure 0,001M
Ameisensäure 0,005M	Methanol mit Salzsäure 0,005M
CHAPS	Methanol mit Salzsäure 0,01M
Citrat-Phosphatpuffer (pH 2,6)	Methanol mit Salzsäure 0,1M
Citrat-Phosphatpuffer (pH 4)	Methanol mit Ameisensäure 0,001M
Citrat-Phosphatpuffer (pH 6)	Methanol mit Ameisensäure 0,005M
DMSO	Methanol mit Ameisensäure 0,01M
Ethanol 50%	Methanol mit Ameisensäure 0,1M
Methanol 100%	Methanol mit
Methanol 50%	Salzsäure und Ameisensäure
Methanol 80%/Acetonitril 20%	Jeweils 0,1M

Tabelle 14: Übersicht der Elutionslösungen Fortsetzung

Elutionslösungen	
1M PBS	Salzsäure 0,005M
1M PBS-HCl (pH 4)	Salzsäure 0,02M
1M PBS-HCl (pH 2)	Salzsäure 0,2M
1M PBS-HCl (pH 1)	Salzsäure 18%
1M PBS-HCl (pH 1) mit Aceton 0,1%	Sodiumdodecylsulfat
1M PBS-HCl (pH 1) mit Aceton 1%	Sulfosalicylsäure-dihydrat 0,5M
1M PBS-HCl (pH 1) mit Aceton 5%	Sulfosalicylsäure-dihydrat 1M
1M PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 5%	Trichloressigsäure 0,5M
1M PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 1%	Trichloressigsäure 1M
1M PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 0,1%	TRIS (pH 7,4) 1M
1M PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 0,001%	1M TRIS-HCl (pH 1)
1M PBS-HCl (pH 1) mit EDTA 0,5M	1M TRIS-HCl (pH 2)
1M PBS-HCl (pH 1) mit Formalin 1%	Tween 20
1M PBS-HCl (pH 1) mit N-succinyl-Hydroxid	Wasser destilliert
	Wasser 0,9% NaCl

Dazu wurde eine 20-minütige Elution bei Raumtemperatur in 300 µl der gelisteten Lösungen als Einfachbestimmung durchgeführt und der L-hArg-Wert bestimmt. Als Referenz diente dafür zunächst das Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs der Firma DLD Diagnostika GmbH. Dieses wurde ebenfalls für die Kalibrierung und dreimaliger L-hArg-Doppelbestimmung in Vollblut eines Probanden verwendet, sodass diese Probe in diversen Elutionslösungen mit der Elutionslösung des kommerziellen ADMA Card ELISAs verglichen werden konnte.

Zur Beurteilung einer suffizienten L-hArg-Elution wurden die Messergebnisse gemäß der Formel 1 ins Verhältnis zu den L-hArg-Werten mit dem kommerziellen Elutionsreagenz gesetzt.

Formel 1: Berechnung des Homoargininertrages

$$\text{L-hArg [\%]} = \frac{\text{L-hArg (Elutionsmittel)} * 100}{\text{L-hArg (DLD Diagnostika als Elutionsmittel)}}$$

Wenn die L-hArg-Werte $\geq 60\%$ waren, wurde im nächsten Schritt die Kompatibilität mit dem ELISA getestet. Dazu wurde im ELISA, kalibriert mit dem DLD Reagenz, nur die Elutionslösung ohne Verwendung eines Spots eingesetzt.

Nach Auswahl der kompatiblen und nicht eigenpositiven Elutionslösungen erfolgte eine Hämoglobinmessung der verbleibenden Elutionsreagenzien mit dem „Haemoglobin Assay Kit“ der Firma Sigma-Aldrich. Zuerst wurde die Hämoglobinextraktion nach folgendem Schema makroskopisch beurteilt:

Tabelle 15: Beurteilung der Hämolyse

Kodierung	Makroskopisch sichtbare Hämolyse
0	Keine
1	Gering
2	Mäßig
3	Stark

Im Anschluss erfolgte eine quantitative Hämoglobinmessung mittels „Hemoglobin Assay Kit“ der Firma Sigma Aldrich. Dazu wurden 50 µL der Elutionslösung und oder einer Verdünnung der Elutionslösung mit dem Reagenz inkubiert und nach 5 Minuten die Absorption bei 400nm gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte aufgrund des mitgeführten Standards mit 100 mg/dL Hämoglobin. Die 10 verbliebenen Elutionslösungen der Phase 3 sind in der Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Elutionsmittel der Phase 3

Elutionsmittel
0,1M TRIS-HCl pH 1
1M PBS-HCl pH 1
1M PBS-HCl pH 1
1M PBS-HCl pH 1 mit Aceton 1%
1M PBS-HCl pH 1 mit Aceton 5%
1M PBS-HCl pH 3
1M TRIS-HCl pH 1
H ₂ O
HCl 0,05
HCl 0,2M
Zitronensäurephosphatpuffer

Von diesen 10 Elutionslösungen mit unterschiedlichem Grad der Hämoglobinelution wurden H₂O und TRIS-HCl, gepuffert bei pH 1, aufgrund Ihrer Eigenschaften, ausgewählt und beide in einem eigenständigen Intraassay gemessen, um die Maßzahlen als weiteres Auswahlkriterium zu eruieren. Es wurden 4 Probanden mit je 5 Messwiederholungen pro Elutionsmittel gemessen für:

- DLD Diagnostika
- 1M TRIS-HCl pH 1
- H₂O

Bei zwei Probanden [VI, VII] wurde die Kalibrierung und Qualitätskontrollen unter Verwendung des ADMA Card ELISAs durchgeführt. Bei den anderen zwei Probanden [I, II] erfolgte dies mit dem selbsthergestellten Elutionsmittel 1 M TRIS-

HCl pH 1. Für die endgültige Entscheidung des Elutionsmittels wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- a. Kompatibilität mit dem ELISA
- b. keine Falsch-positiven Werte im ELISA
- c. Kosten
- d. Aufwand der Herstellung
- e. Stabilität des Reagenzes
- f. Anwenderfreundlichkeit
- g. Maßzahlen (Standardabweichung, Variationskoeffizient)
- h. Geringste Variation der Hämoglobinelution

4.3 Methodenvalidierung

4.3.1 Messpräzision

Zur Ermittlung der Messpräzision wurden zwei Mikrotiterplatte nach Zugabe der Stopplösung 3-4 Mal hintereinander mit demselben Gerät gemessen. Für jede Mikrotiterplatte erfolgte eine Berechnung der Variationskoeffizienten der Standards und Kontrollen.

4.3.2 Intraassay

Für den Intraassayvergleich wurden je 5 Proben von 9 Probanden, 5 männliche und 4 weibliche, in dem beschriebenen regulären Verfahren in demselben Testansatz durchgeführt. Es wurde auf Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient geprüft und eine Spannweite mit dem Schwellenwert von 2,5 bis 98,5% der gesamten Messwerte eines Geschlechts ermittelt.

4.3.3 Interassay

Für den Interassayvergleich wurde in fünf verschiedenen Testansätzen jeweils eine Probe pro Proband getestet. Insgesamt wurden 8 Probanden mit jeweils 5 Proben gemessen. Im Unterschied zum Intraassayvergleich, in welchem die Proben alle auf derselben Mikrotiterplatte gemessen wurden, wurden die Proben beim Interassay in fünf verschiedenen Testansätzen gemessen. Diese fünf Testansätze wurden in einem Zeitraum von 3 Tagen durchgeführt und die Auswertung erfolgte wie bei dem Intraassayvergleich.

4.3.4 Personenvariabilität

Indem drei Probanden, I, X und XIV täglich für einen Zeitraum von fünf Tagen Kapillarblut entnommen wurde, wurde die Variabilität der Bestimmung von Proben einer Person in einem Wochenverlauf beurteilt. Die Blutmenge variierte dabei. Es gilt dabei die Vorgabe, unter desinfizierten Bedingungen einen Tropfen an der Fingerkuppe zu bilden, welcher von alleine auf die Trockenblutkarte fällt. Dieser Vorgang ist solange zu wiederholen, bis der schwarz markierte Kreis vollständig mit Blut betropft ist. Dies entspricht etwa 1-2 Tropfen. Die Messung der L-hArg-Konzentration erfolgte gemäß dem Standardprotokoll innerhalb von 14 Tagen.

4.3.5 Einfluss der Spotvariabilität

Die Blutprobe eines Probanden wurde entsprechend der Standardanleitung mit 50 µl pro Spot aufgetragen. Insgesamt 6 Trockenblutkarten wurden verwendet, um die L-hArg-Werte 6malig von einem, zwei und drei Spots zu ermitteln. Es erfolgte eine Korrelationsanalyse und die Ergebnisse wurden anschließend auf 3 Spots mathematisch umgerechnet, indem die Ergebnisse unter Verwendung eines Spots mit 3 multipliziert wurden und die Ergebnisse unter Verwendung zweier Spots mit 1,5 multipliziert wurden.

4.3.6 Verhältnis von venösem und kapillarem Blut

Die Fünffachmessung erfolgte sowohl von kapillar entnommenem Vollblut, als auch von venös entnommenem Vollblut dreier Probanden. Dabei entsprach die venöse Blutentnahme der Kontrollprobe und die Trockenblutkarte wurde mit 50 µl pro Spot betropft. Das venöse Blut wurde mittels Lanzettenstich aus den Fingerkuppen gewonnen. Durch sanfte Massage des Fingers wurde ein sich am Finger bildender Tropfen auf einen Spot der Trockenblutkarte fallen gelassen.

4.4 Robustheit der Methode

Die verschiedenen Modifikationen des Protokolls werden in dem jeweiligen Kapitel erläutert, während hier die Kontrollgruppe beschrieben wird. Die Kontrollproben lagerten in Plastiktüten der Größe 14 x 8 cm mit Siegelverschluss und einem 9 x 4 cm großen und 10 g schwerem Silikagel in einem lichtundurchlässigem und bei Raumtemperatur von 21°C temperaturstabilem Karton immer für denselben Zeitraum, wie die modifizierten Proben. Die zu vergleichenden Proben wurden immer vom selben Probanden am selben Tag entnommen und verarbeitet. Dabei wurde die Hypothese eines Unterschieds zwischen den Kontrollproben und der modifizierten Proben angenommen und mittels deskriptiver Statistik beschrieben. Bei einem Probanden, dessen Daten eine Normalverteilung und

Varianzhomogenität aufwiesen erfolgte die statistische Auswertung mit einem gepaarten t-Test. Bei nicht erfüllten Anforderungen für den t-Test erfolgte alternativ ein Wilcoxon Test. Widerum für Analysen mit mehreren Probanden erfolgte eine ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni.

4.4.1 Einfluss von Hämolyse

Die Blutentnahme eines Probanden erfolgte in zwei EDTA-Monovetten. Während die Kontrollproben gemäß der Anleitung verarbeitet wurde, erfolgte bei der modifizierten Methode eine vorherige mechanische Hämolyse. Diese wurde herbeigeführt, indem mit einer 20 ml Spritze und einer 22G x 1¹/₄ Kanüle der Größe 12 25-mal das geschüttelte Blut zügig aufgezogen und in das EDTA-Röhrchen zurückgespritzt wurde. Zwischen 10 Zügen wurde zudem kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Probe entsprechend der Anleitung weiterverarbeitet und die Ergebnisse deskriptiv ausgewertet.

4.4.2 Einfluss von Einfrieren und Auftauen

Um den Einfluss zu ermitteln, wurden 4 Trockenblutkarten eines Probanden mit Vollblut getropft und anschließend über 3 Tage getrocknet. Zwei dieser Trockenblutkarten wurden anschließend 5 Mal für 16 Stunden bei -20°C eingefroren und 5-mal für 8 Stunden aufgetaut. Zum Vergleich wurden 2 Trockenblutkarten temperaturstabil aufbewahrt. Unter Verwendung von je 2 Spots wurden 5 Kontrollproben und 5 modifizierte Proben gemessen.

4.4.3 Einfluss der Blutmenge

Um die Auswirkung verschiedener Blutmengen auszutesten wurden 5 Stichproben eines Probanden von vier verschiedenen Blutmengen [25 µl, 50 µl, 75 µl und 100 µl] mit der Elutionslösung 1 M TRIS-HCl (pH 1) eluiert und entsprechend der Anleitung der L-hArg-Wert bestimmt. Für eine Stichprobe wurden 2 Spots verwendet. Zur Veranschaulichung der Diffusionskapazität des Filterpapieres sind in der Abbildung die kleinste, größte und eine mittlere Menge dargestellt. Der ausgestanzte Spot war dabei immer vollständig mit Blut betropft, siehe dazu die nachstehende Abbildung.

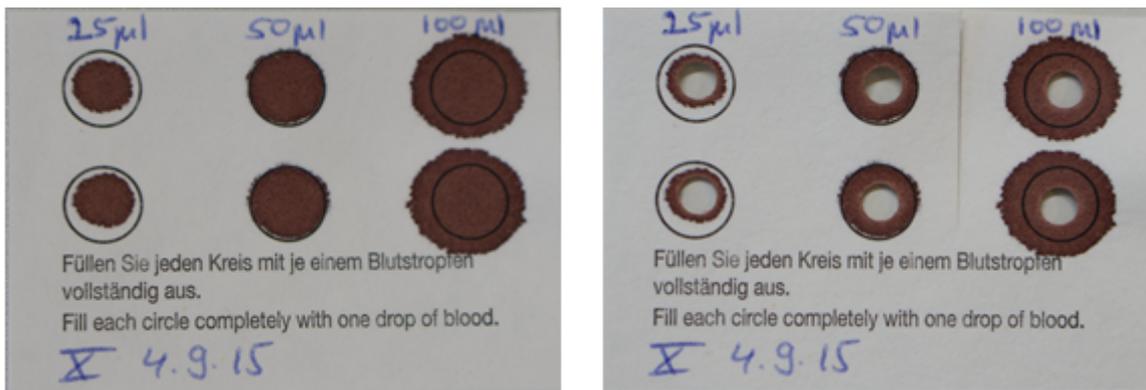


Abbildung 7: Trockenblutkarten bei verschiedenen Blutvolumina

4.4.4 Stabilität gegenüber Tageslicht

Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurden 2 Trockenblutkarten zweier Probanden für 6 Stunden pro Tag mit einer Tagesspektrumlampe „GLO Life-Glo 18“ beleuchtet. Die 46 cm lange Leuchtquelle hatte eine Leistung von 15 Watt T8 und beleuchtete die Trockenblutkarten in einem Abstand von 19 cm. Dabei waren die Karten in einem Terrarium auf einem leeren Karton, mit einer Höhe von 11,5 cm, flach aufgelegt worden. Mit dem integrierten Thermometer des 60 x 30 cm großen Terrariums konnte die Temperatur überwacht werden. Um weitere Lichteinflüsse zu vermeiden, wurde das Terrarium an einem sonnenfreien Ort platziert. Diese Proben wurden wiederum mit der Kontrollproben verglichen, welche trocken und lichtgeschützt gemäß Kapitel 2.4 beschrieben, gelagert wurde.

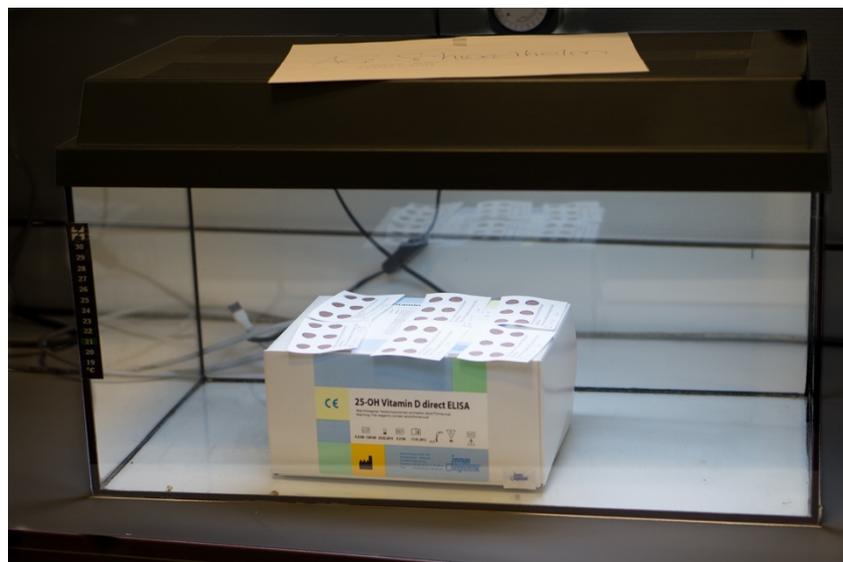


Abbildung 8: Versuchsaufbau für Stabilität gegenüber Tageslicht

4.4.5 Klimatische Stabilität

Die Proben wurden dazu in einer feuchten Kammer in einem Inkubator für 31 Tage bei 35°C gelagert. Dazu wurde ein kleines Gefäß zu 2/3 mit Leitungswasser befüllt

und die Karten oben auf dem kleineren Gefäß aufgelegt, sodass kein direkter Kontakt zum Wasser bestand. Dieses Konstrukt wurde wiederum in einem weiteren größeren Plastikgefäß verschlossen und im Inkubator gelagert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte deskriptiv und mit gepaartem t-Test für die Einzelnen Probanden.



Abbildung 9: Versuchsaufbau der klimatischen Stabilität

4.4.6 Stabilität in der Lagerungsdauer

Um die Stabilität von L-hArg zu ermitteln, wurden Proben von 5 verschiedenen Probanden verwendet. Davon 3 weibliche Probanden, die die höchste, niedrigste und eine mittlere L-hArg-Konzentration aufwiesen und 2 männliche Probanden, welche beide im mittleren selbstermitteltem Gesamtreferenzbereich liegen. Die Messwiederholungen und die Zeiträume sind der Tabelle zu entnehmen. Die unterschiedliche Anzahl der Messwiederholungen resultiert aus dem Ziel, Teilversuche zu kombinieren und Mikrotiterplatten ökonomisch auszunutzen. Die Auswertung erfolgte deskriptiv.

Tabelle 17: Versuchsaufbau Probenstabilität

Proband	Geschlecht	Probenalter in Tagen zum Messzeitpunkt	n
III	männlich	1	4
		6-8	9
		19	4
		32 (1 Monat)	5
		183 (6 Monate)	3
		277 (9 Monate)	3
IV	weiblich	1	4
		6-8	4
		19	4
		32 (1 Monat)	5
		183 (6 Monate)	3
		277 (9 Monate)	3
V	weiblich	1	5
		6-8	5
		19	4
		32 (1 Monat)	5
		182 (6 Monate)	3
		276 (9 Monate)	3
X	männlich	5-7	9
		20	4
		31 (1 Monat)	5
		91 (3 Monate)	3
		182 (6 Monate)	3
		276 (9 Monate)	3
I	weiblich	5	4
		8	4
		28 (1 Monat)	4
		42	3
		102 (3 Monate)	3
		193 (6 Monate)	3
		287 (9 Monate)	3

4.5 Methodenanwendung

Die etablierte Methode zur Messung von L-hArg wurde im Anschluss auf die Proben der Studie einer chilenischen Kohorte angewendet (Lüneburg et al. 2016).

Die Trockenblutkarten stammen von 40 chilenischen Männern, im Alter von 17-19, welche zur militärischen Grundausbildung eingezogen wurden. Die Grundausbildung erfolgte in 4000 m Höhe. Es wurden Trockenblutkarten der

Rekruten bei Beginn auf Höhe des Meeresspiegels und während der Ausbildung in 4000 m Höhe im Verlauf von 6 Monaten gewonnen.

4.5.1 Qualitätsbeurteilung der Trockenblutkarten

Es erfolgte eine Qualitätsbeurteilung der betroffenen Trockenblutkarten, um eine Fehlinterpretation aufgrund geringer Probenmenge ausschließen zu können. Beurteilt wurde der Durchmesser des Vollblutspots und die Vollständigkeit der Benetzung auf der Rückseite nach folgendem Schema:

Tabelle 18: Qualitätsbeurteilung der Chileproben

Kodierung	Durchmesser	Benetzung der Rückseite
1	Mindestens 5 mm	Vollständig (5 mm)
2	Mindestens 4 mm	Teilweise benetzt
3	Kleiner 4 mm	Gar keine Benetzung

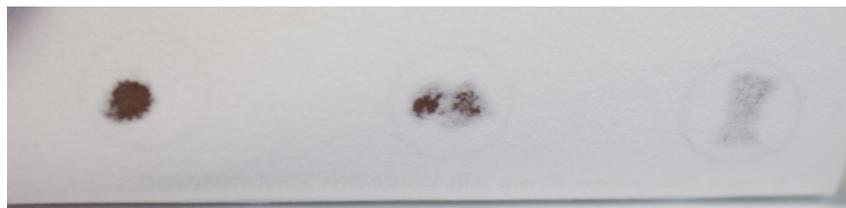


Abbildung 10: Benetzung auf der Rückseite: vollständig - teilweise - keine Benetzung

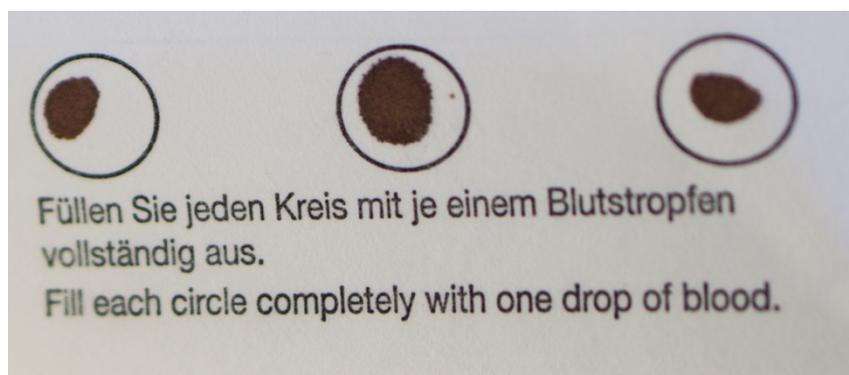


Abbildung 11: Spotdurchmesser: mind. 4 mm - mind. 5 mm - kleiner als 4 mm

Die Qualitätsbeurteilung der einzelnen Proben sind dem Anhang 13.7 zu entnehmen. Eine Rangkorrelation nach Kendall's Tau wurde angewendet, um einen Zusammenhang zwischen der Trockenblutkartenqualität und dem L-hArg-Wert zu ermitteln.

4.5.2 L-Homoargininkonzentration nach Höhenexposition

Die statistische Auswertung der L-hArg-Konzentration zum Zeitpunkt 0 und nach 6 Monaten erfolgte nach Prüfung der Normalverteilung mittels t-Test für die gesamte

Stichprobe (n=40). Eine erneute Anwendung des Testes wurde für eine nicht von der Qualität beeinflusste Ergebnisse des L-hArg-Wertes verwendet (n=19).

Ausgeschlossen wurden folgende Probandennummern: 4, 10, 32, 38, 42, 46, 50, 51, 53, 71, 76, 77, 80, 85, 86, 87, 89, 100, 107, die sowohl in Qualität, als auch mit dem L-hArg-Wertes gesunken sind und 44, 61 und 116, die sowohl in Qualität, als auch mit dem L-hArg-Wertes gestiegen sind.

4.5.3 Laborchemische Parameter und Zusammenhang mit L-Homoarginin

Bei den Studienteilnehmern der chilenischen Kohorte handelte es sich um männliche Rekruten im Alter von $18,5 \pm 1,3$ Jahren (MW \pm SD). Während der Hämatokrit nach 6-monatiger Höhenexposition von $45,0 \pm 1,6\%$ auf $48,9 \pm 2,3\%$ (MW \pm SD) und Hämoglobin von $15,1 \pm 0,7$ g/dL auf $16,2 \pm 0,8$ g/dL (MW \pm SD) stiegen, sanken die O₂-Sättigung von $98,1 \pm 0,6\%$ auf $90,3 \pm 4,9\%$ (MW \pm SD), Gewicht $76,8 \pm 16,6$ kg auf $74,2 \pm 13,1$ kg und der BMI von $25,9 \pm 4,2$ auf $25,3 \pm 3,7$ (MW \pm SD) (Lüneburg et al. 2017).

Die Korrelation mit laborchemischen Parametern erfolgte entsprechend der Normalverteilung und Varianzhomogenität der Daten mittels Pearsons Korrelation oder bei nicht vorhandener Normalverteilung und Varianzhomogenität nach Spearman's-Rho für intervallskalierte Daten. Die Analyse der ordinalskalierten Daten der Umfrageergebnisse wurden mittels Rangkorrelation nach Kendall's Tau geprüft. Die nominalen Daten, wie Leben in Höhe zuvor und Rauchen wurden im Chi-Quadrat-Test analysiert. Die detaillierte Zuordnung der Testverfahren für jeden Parameter sind dem Anhang 13.8 zu entnehmen.

4.5.4 L-Homoargininkonzentration im Plasma im Vergleich zu Trockenblutkarten

Die Konzentration von L-hArg aus Trockenblutkarten wurde wie im Kapitel 4 beschrieben nach entsprechender Elution mit dem ELISA gemessen. Die Trockenblutkarten wurden dabei über mehrere Jahre trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Im Vergleich dazu erfolgte die Messung der L-hArg-Konzentration aus dem Plasma direkt mit dem ELISA. Die Proben wurden bei -20°C ebenso über mehrere Jahre gelagert. Die Messung fand im Vergleich zu den Trockenblutkarten ein Jahr später statt. Neben einer deskriptiven statistischen Auswertung wurden die Daten mittels einer ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni ausgewertet. Zudem wurden die L-hArg-Konzentration des Plasmas und des Vollblutes in einer Regressionsanalyse gegenübergestellt. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Plasma und Vollblut mit und ohne Gruppierung der Daten nach Zeit und Qualität.

5 Ergebnisse

5.1 Messung von Homoargininkonzentration

Die Messung erfolgte mit Hilfe des ELISA Kits der Firma DLD Diagnostika. Die L-hArg-Konzentration wurde photometrisch mittels indirektem kompetitiven ELISAs bestimmt. Anhand von 6 Standardlösungen wurde eine Konzentrationsreihe gemessen und auf die L-hArg-Konzentration entsprechend des Absorptionsergebnisses der Probe, die Konzentration errechnet. Folgende Grafik zeigt die Standardkonzentrationsreihe:

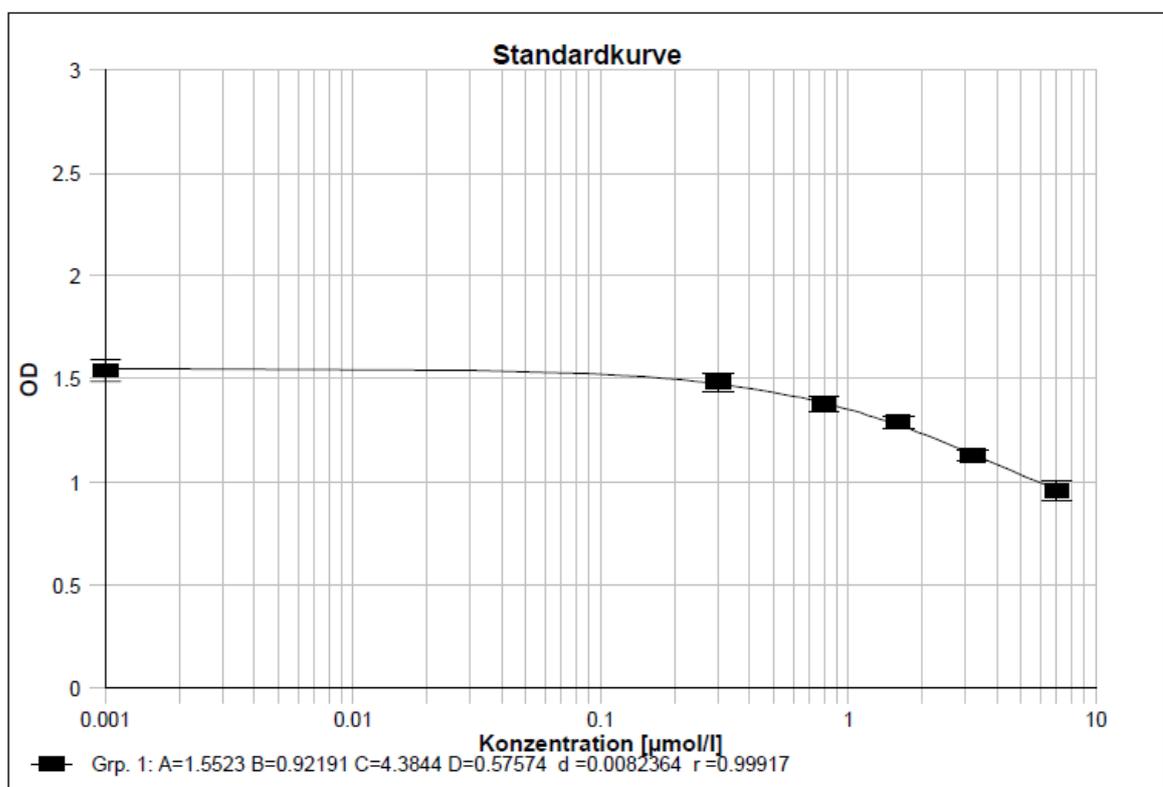


Abbildung 12: Standardkurve der ELISA Messung
(DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte GmbH 2014)

Die Messgrenzen der Methoden sind von 0,3 bis 7,0 $\mu\text{mol/L}$. Zwischen diesen Werten befindet sich auch der lineare Messbereich.

5.2 Ergebnisse der Vorversuche

Die separate Darstellung der Ergebnisse vom Vergleich von Vollblut mit Plasma, Einfluss von Enzyminhibitoren und Elutionslösungen erfolgt in den jeweiligen Unterkapiteln.

5.2.1 Vergleich Vollblut und Plasma

Die gemessene L-hArg-Konzentration in der Elutionslösung des ADMA Card ELISAs von DLD Diagnostik war bei allen drei Probanden im Vollblut deutlich höher als im Plasma. Das prozentuale Verhältnis ist der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Vollblutkonzentration entspricht im Durchschnitt (Mittel) der doppelten nachweisbaren Konzentration von Homoarginin im Plasma.

Tabelle 19: relative Homoargininkonzentration im Vollblut

Proband	Relative Homoargininkonzentration im Vollblut
I	230%
XI	150%
XIV	207%
Mittel ± SD	195%

Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, sind die Variationskoeffizienten im Durchschnitt betrachtet im Vollblut geringer.

Tabelle 20: Variationskoeffizient (VK) Vergleich Vollblut und Plasma

Proband	VK Vollblut	VK Plasma
I	9%	17%
XI	23%	20%
XIV	3%	7%
Mittel ± SD	12%	15%

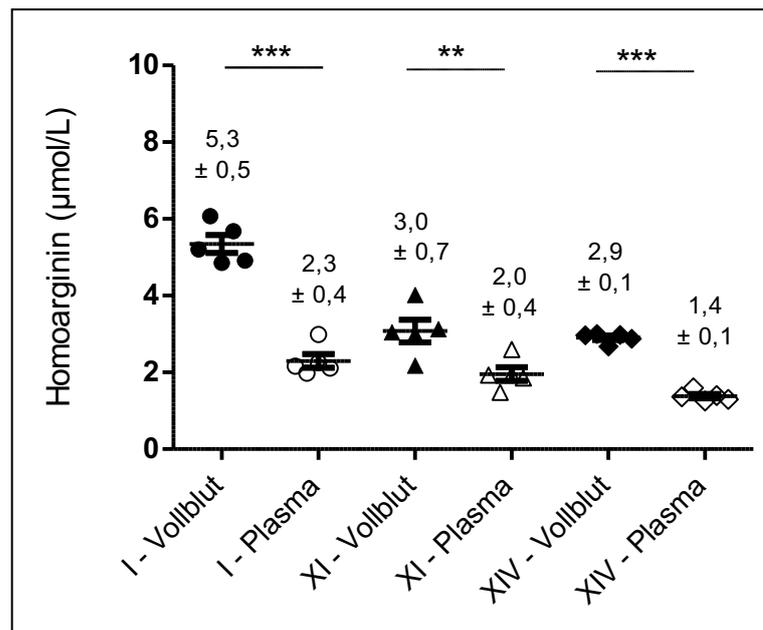


Abbildung 13: Vergleich Vollblut und Plasma

n=5; MW±SD; Probanden: I, XI, XIV; **p<0,01; ***p<0,001, ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni

Die Gesamtanalyse mittels ANOVA nach Bonferroni zeigte einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,0001$. Die Ergebnisse der Post-Hoc Analyse sind der Abbildung 14 zu entnehmen. Die Stärke der Evidenz wird wie folgt klassifiziert: * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$ und *** entspricht $p < 0,001$. Diese Klassifizierung gilt für die gesamte Arbeit.

5.2.2 Einfluss von Arginaseinhibitor Nor-NOHA

Die sechsfache Doppelbestimmung eines Probanden zeigt, dass die Verwendung des Arginaseinhibitors Nor-NOHA weder zu einer Erhöhung, noch zu einer Verminderung der Homoargininkonzentration führt. Auffallend ist die doppelt so große Streubreite unter Verwendung von Proteaseinhibitor. Die Testung des Inhibitors ohne Probe im ELISA ergibt eine Konzentration von $0,24 \mu\text{mol/L}$ und ist oberhalb der Messgrenze von $0,05 \mu\text{mol/L}$.

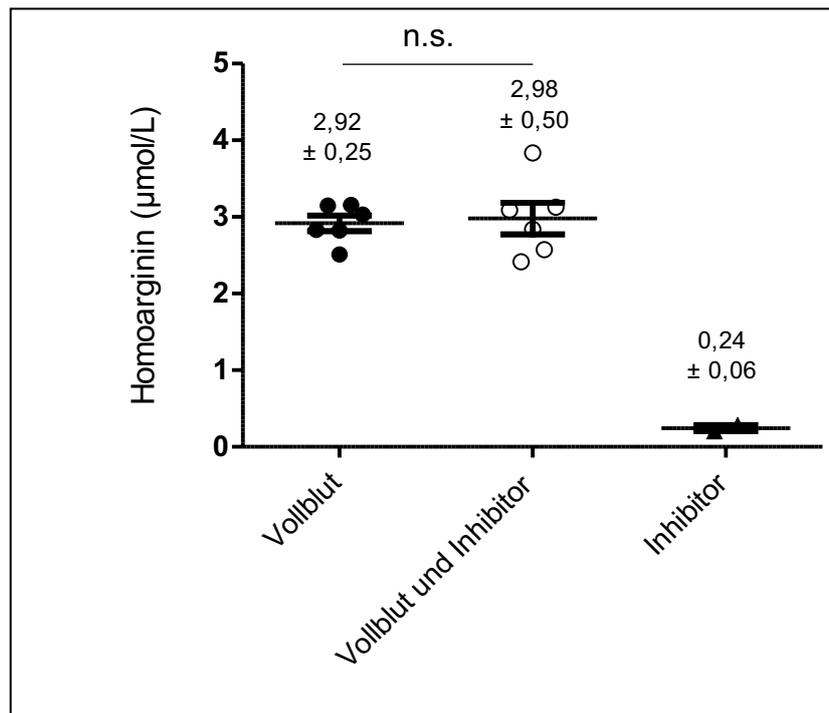


Abbildung 14: Einfluss von Arginaseinhibitor

n=6; MW±SD; n.s., gepaarter t-Test bei Normalverteilung und heterogener Varianz; Interferenz des Inhibitors mit dem ELISA da Inhibitor > 0,05 µmol/L

5.2.3 Einfluss von Proteaseinhibitoren

Der Einfluss des Proteaseinhibitorgemisches von der Firma Sigma wurde sowohl im Vollblut als auch im Plasma getestet. Um den Einfluss der Elutionslösung zu ermitteln, erfolgte die Versuchsreihe zunächst im ADMA-Reagenz der Firma DLD Diagnostik und anschließend erneut mit dem selbsthergestelltem Elutionsreagenz, der 1 M TRIS-HCl Lösung, gepuffert bei pH 1. Die Ergebnisdarstellung erfolgt getrennt entsprechend der Elutionslösung.

5.2.3.1 Proteaseinhibitoren im Elutionsreagenz des ADMA Card ELISA

Im Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs zeigte sich unter Verwendung des Proteaseinhibitormixes eine Erhöhung der gemessenen Homocysteinkonzentration um durchschnittlich +124% im Plasma und +47% im Vollblut.

Tabelle 21: Einfluss von Proteaseinhibitor im ADMA Reagenz

Proband	Erhöhung im Plasma	Erhöhung im Vollblut
I	+152%	+43%
XI	+100%	+53%
XIV	+121%	+45%
Mittel	+124%	+47%

Weiterhin wurde die Interferenz des Trockenblutkartenuates des Proteaseinhibitors getestet. Dazu wurden 25 µl der Proteaseinhibitoren (Konzentration der einzelnen Inhibitoren siehe 3.2.3. Material und Methoden sowie Anhang 13.3 Inhaltsstoffe des Protease-Inhibitorgemisches) auf eine Trockenblutkarte aufgetragen und zeigte einen Durchschnittswert von 0,35 µmol/L, welcher die untere Messgrenze von 0,05 µmol/L überschreitet und somit positiv ist. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Unterschied durch den Einsatz von Proteaseinhibitor auf zusätzlich mit Blut betropften Trockenblutkarten ($p < 0,0001$, ANOVA nach Bonferroni).

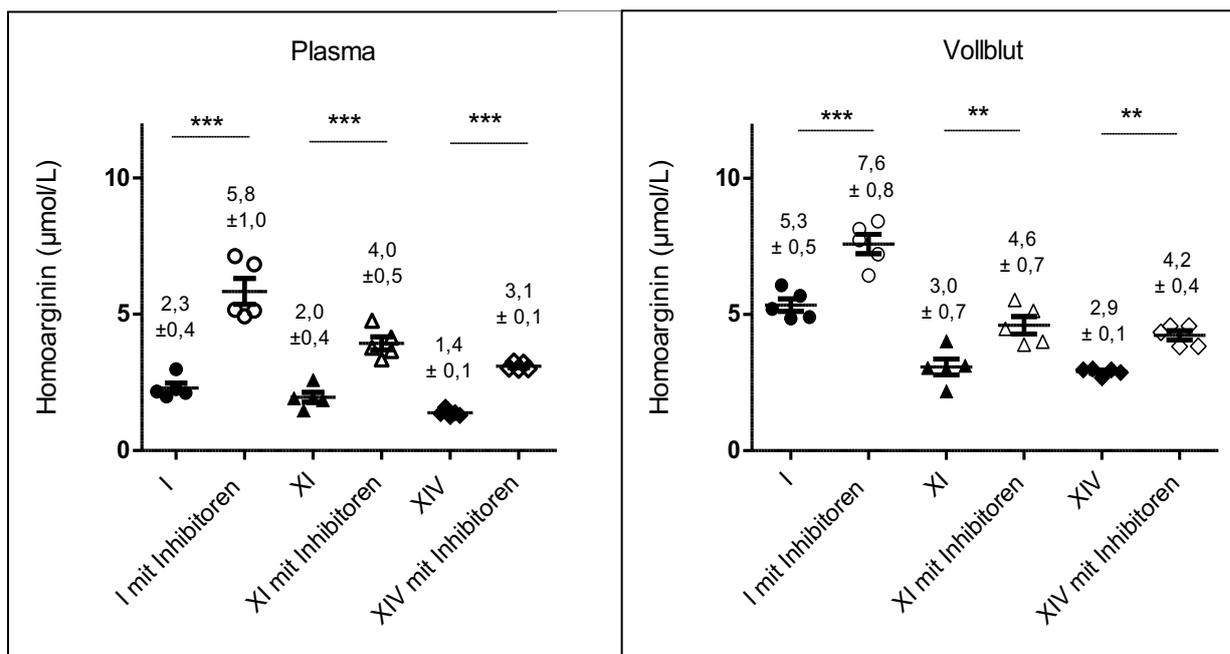


Abbildung 15: Einfluss der Proteaseinhibitoren im ADMA Card ELISA Elutionspuffer

n=5; MW±SD; getestete Probanden: I, XI und XIV, für Plasma (links): *** $p < 0,001$, ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni, für Vollblut (rechts): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni; Interferenz des Proteaseinhibitors 0,35 µmol/L

Im Elutionsmittel des ADMA Card ELISAs konnte gezeigt werden, dass der Variationskoeffizient unter Verwendung eines Proteaseinhibitorgemisches im Plasma etwas geringer wurde, im Vollblut jedoch unverändert blieb, siehe Tabelle 25.

Tabelle 22: Variationskoeffizient (VK) unter Einfluss des Proteaseinhibitorgemisches (PI)

Proband	VK Plasma	VK Plasma mit PI
I	17%	17%
XI	20%	13%
XIV	7%	3%
Mittel	15%	11%
Proband	VK Vollblut	VK Vollblut mit PI
I	9%	11%
XI	23%	15%
XIV	3%	10%
Mittel	12%	12%

Zusammenfassend ist die signifikante Erhöhung der gemessenen L-hArg-Konzentration im Vollblut um +47%, mehr noch im Plasma um +124% durch die Verwendung des Proteaseinhibitorgemisches bei Verwendung des ADMA Reagenzes zur Elution zu beobachten.

5.2.3.2 Proteaseinhibitor im TRIS-HCl

Derselbe Versuchsaufbau im selbst hergestellten Elutionsreagenz 1 M TRIS-HCl mit pH 1 zeigt im Vergleich folgende Ergebnisse: Der Einfluss des Proteaseinhibitors führt auch in der Elutionslösung TRIS-HCl zu höheren Messwerten von L-hArg. Diese L-hArg-Konzentrationen werden durch die Verwendung des Proteaseinhibitors um +244% im Plasma und +54% im Vollblut erhöht.

Tabelle 23: Einfluss des Proteaseinhibitors im TRIS-HCl

Proband	Erhöhung im Plasma	Erhöhung im Vollblut
I	+247%	+48%
XI	+228%	+78%
X	+257%	+76%
Mittel	+244%	+54%

Die Verwendung des Proteaseinhibitors führt zu einer signifikanten Veränderung der messbaren Homoargininkonzentration, ($p < 0,0001$, ANOVA nach Bonferroni) im Plasma als auch im Vollblut. Der Post-Hoc Test zeigte für alle Probanden signifikante Unterschiede, wie es die nachfolgende Abbildung darstellt. Die Erhöhung der Homoargininkonzentration durch den Proteaseinhibitor beträgt i.D. +244% im Plasma, und +54% im Vollblut.

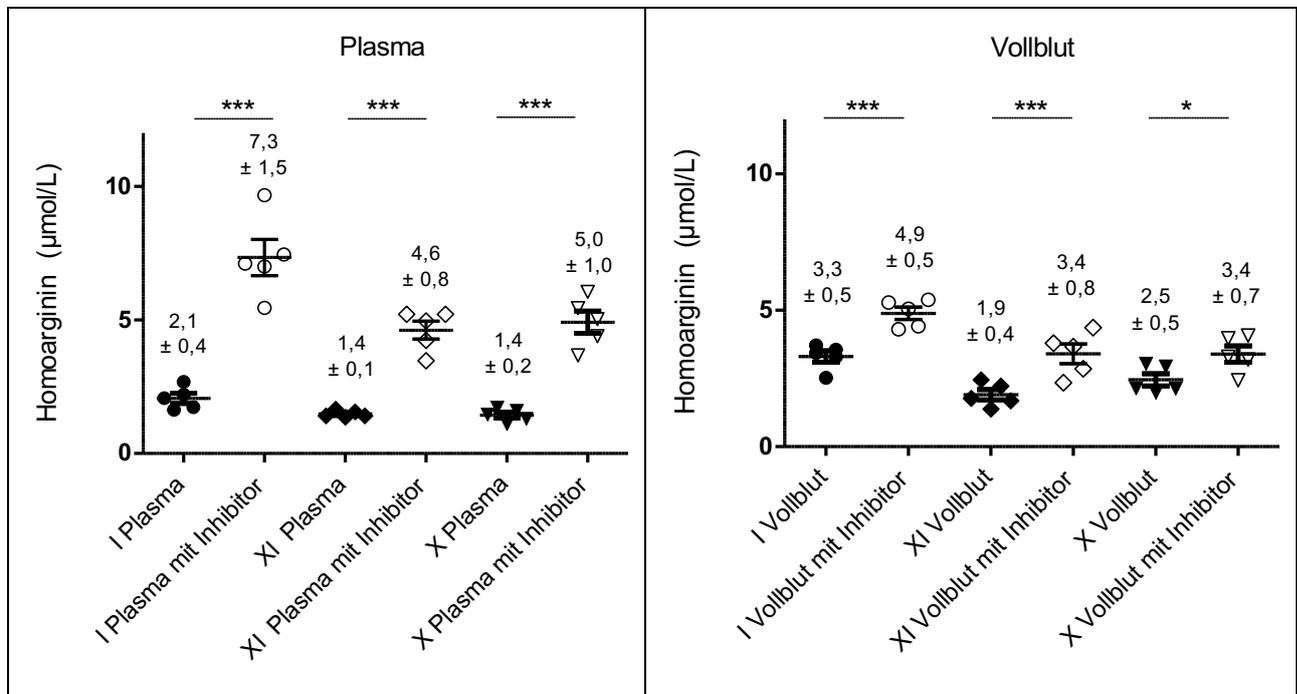


Abbildung 16: Einfluss der Proteaseinhibitoren im 1M TRIS-HCl pH1 Elutionspuffer

n=5; MW±SD; getestete Probanden: I, XI und X, für Plasma (links): *** $p < 0,001$, ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni, für Vollblut (rechts): *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ANOVA mit Post-hoc Test nach Bonferroni: keine Interferenz des PI

Werden nur 25 µL des Proteaseinhibitors auf die Trockenblukarte aufgetragen, kommt es zu keiner Interferenz bei der Verwendung von 1 M TRIS-HCl (pH 1) als Elutionslösung (MW±SD: $0,04 \pm 0,1$ µmol/; n=5). Die untere Messgrenze des ELISA beträgt 0,05 µmol/L und würde bei der Verwendung von 25 µL puren Proteaseinhibitorgemisches im ELISA bei Verwendung von von 1 M TRIS-HCl (pH 1) zu Interferenzen führen ((MW±SD: $0,16 \pm 0,0$ µmol/; n=5).

Die Variationskoeffizienten unter Verwendung des TRIS-HCl Elutionsreagenzes veränderten sich mit Zusatz des Proteaseinhibitors nicht (Tabelle 27).

Tabelle 24: Variationskoeffizient (VK) ohne und mit Proteaseinhibitor (PI) in TRIS-HCl

Proband	VK Plasma	VK Plasma mit PI
I	19%	21%
XI	7%	17%
X	14%	20%
Mittel	13%	19%
Proband	VK Vollblut	VK Vollblut mit PI
I	15%	10%
XI	21%	24%
X	20%	21%
Mittel	19%	18%

Zusammenfassend führt auch in der Elutionslösung TRIS-HCl pH 1 der Proteaseinhibitor zu deutlich höher gemessenen L-hArg-Konzentrationen. Die Variationskoeffizienten wurden durch den Einsatz von Proteaseinhibitor nicht verändert.

5.2.4 Zusammenfassung der Vorversuche

Die Versuche zeigten, dass sich der Nachweis von L-hArg im Vollblut und Plasma signifikant unterscheidet, sodass im Vollblut i.D. doppelt so viel nachweisbar war. Die Verwendung des spezifischen Arginaseinhibitors Nor-NOHA führt zu keiner signifikanten Veränderung der gemessenen L-hArg-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu führt der Proteaseinhibitor zu einer signifikanten Erhöhung der gemessenen L-hArg-Konzentrationen, sowohl im Plasma, als auch im Vollblut, unabhängig von der gewählten Elutionslösung. Die im Proteaseinhibitor selbst gemessene L-hArg-Konzentration kann diese Erhöhung nicht alleine erklären.

5.2.5 Elutionslösungen

Die Auswahl von geeigneten Elutionslösungen erfolgte in verschiedenen Stufen:

1. Screening der Elutionslösungen auf ausreichende L-hArg-Elution
2. Screening auf Kompatibilität mit dem ELISA
3. Auswahl der besseren Elutionsreagenzien verschiedener Variationen, inklusive quantitative Hämoglobinbestimmung des Eluats
4. Intraassay zweier Elutionslösungen im Vergleich

5.2.5.1 Auswahl der Elutionslösungen Stufe 1 und 2

Es wurden 49 Elutionslösungen auf Ihre Elutionsfähigkeit und Stabilisierung von L-hArg mit einem Probenumfang von n=1 pro Elutionslösung geprüft. Dabei zeigte

sich bei einigen Lösungen eine unzureichende Elution von L-hArg aus den Trockenblutkarten, sodass diese von weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden. Als Vergleich für die L-hArg-Konzentration diente das Elutionsreagenz des ADMA Card ELISA. Der L-hArg-Wert wurde prozentual an der Referenz in folgender Tabelle zuzüglich der Hämoglobinextraktionsfähigkeit dargestellt:

Tabelle 25: Ausschluss von Elutionslösungen mit zu geringem Homoargininnachweis

Ausgeschlossene Elutionslösung	L-hArg% zum Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs	Hämoglobinextraktion Kodierung 0-3 (keine – starke Extraktion)
MeOH	25,99%	0
ACN	18,14%	0
MEOH 80/ACN 20	26,61%	0
DMSO	42,83%	2-3
HCl 0,2M	47,53%	2-3
Citrat-Phosphat pH 2,6	53,02%	2-3
MeOH-HCl 0,01M	36,23%	2
MeOH-HCl 0,005M	38,14%	0
MeOH-HCl 0,001M	30,72%	1
MeOH-HCl-Ameisensäure 0,001M	42,64%	0
TRIS-HCl pH 2,0	57,86%	3
PBS-HCl Ameisensäure 1%	48,50%	2
PBS-HCl Formalin 0,1%	27,74%	2
PBS-HCl-N-succinyl-Hydroxid	0,07%	2

Im Gegensatz dazu, konnte bei folgenden Lösungen der nachfolgenden Tabelle eine sehr hohe, bis maximale L-hArg-Konzentration nachgewiesen werden. Diese Elutionslösungen wurden in einem weiteren Versuch ohne Zugabe einer Probe mit dem ELISA gemessen. Bei Überschreitung der unteren Nachweisgrenze von 0,3 µmol/L, wurden diese aufgrund einer falsch positiven Ergebnisdarstellung ausgeschlossen.

Tabelle 26: Nicht mit dem ELISA kompatible Elutionslösungen

Nicht kompatibel mit ELISA	L-hArg Messung ohne Probe
Trichloressigsäure (0,5M und 1M)	Beide Max
Sulfosalicylsäure-dihydrat (0,5M und 1M)	Max 1,08 µmol/L
Ethanol 50%	Max
Salzsäure 18%	Max
Salzsäure 1M	0,97 µmol/L
PBS-HCl (pH 1) mit Formalin 1%	Ma

Tabelle 26: Nicht mit dem ELISA kompatible Elutionslösungen
Fortsetzung

Nicht kompatibel mit ELISA	L-hArg Messung ohne Probe
PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 5%	0,97 µmol/L
PBS-HCl (pH 1) mit Ameisensäure 1%	0,27 µmol/L
MeOH-Ameisensäure + HCl 0,005% je	

Die Elutionslösungen, die weiteren Auswahltests unterliegen sind in der nächsten Tabelle zusammengefasst. Ergänzt wurde die Eigenschaft der Hämoglobinelution, welche makroskopisch beurteilt wurde.

Tabelle 27: Elutionslösungen mit ausreichender Homoarginin-Elution und Kompatibilität mit dem ELISA (Stufe 1 und 2)

Elutionslösung	Homoarginin% zum Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs	Hämoglobinelution
Citrat-Phosphat pH 6	78,6%	2-3
Citrat-Phosphat pH 5	76,99%	2-3
Citrat-Phosphat pH 4	63,83%	2-3
Citrat-Phosphat pH 3	62,45%	2-3
H ₂ O	106%	2-3
HCl 0,02M	69,55%	2-3
MeOH-Ameisensäure 0,1M	202,39%	3
MeOH-Ameisensäure 0,01M	155,05%	2
MeOH-Ameisensäure 0,005M	60,01%	1
MeOH-Ameisensäure 0,001M	81,02%	0
MeOH-HCl 0,1M	90,04%	3
MeOH-HCl-Ameisensäure 0,005M	90,04%	0
TRIS-HCl pH 1	71,00%	0-1
PBS-HCl pH 4,0	112,87%	2
PBS-HCl pH 2,0	115,42%	2
PBS-HCl pH 1,0	105,84%	1
PBS-HCl pH 1 Aceton 0,1%	82,29%	2
PBS-HCl pH 1 Aceton 1%	113,55%	2
PBS-HCl pH 1 Aceton 5%	116,63%	2
PBS-HCl pH 1 Ameisensäure 0,1%	113,55%	2
PBS-HCl pH 1 Ameisensäure 0,001%	64,30%	2
PBS-HCl pH 1 EDTA 0,5M	109,59%	3

5.2.5.2 Auswahl der Elutionslösungen Stufe 3

Die verbliebenen Elutionsreagenzien sind TRIS-HCl, PBS-HCl, H₂O und Zitronensäurephosphatpuffer in verschiedenen pH Stufen und mit oder ohne Zusatz von Aceton. In folgenden Variationen wurde Hämoglobin im Eluat quantitativ bestimmt. Tabelle 34 zeigt jene Elutionsreagenzien, die eine hohe Hämoglobinextraktion aufwiesen und keine falsch positiven Ergebnisse ohne Probe imitieren. Da sich aus den Ergebnissen schließen lässt, dass die Elutionsfähigkeit für Homoarginin in einem sauren Milieu von TRIS und PBS Puffern höher ist (Tabelle übernächste 35), wurden die alkalischen Varianten aus Tabelle 34 ebenso vorzeitig ausgeschlossen.

Tabelle 28: Ausgeschlossene aufgrund zu hoher Hämoglobinextraktion

Elutionsreagenz	Hämoglobin (mg/dL)
TRIS-HCl pH 6,5	787,71 (n=3)
PBS-HCl pH 6 Aceton 1%	881,26 (n=2)
PBS-HCl pH 3 Aceton 1%	496,12 (n=1)
TRIS-HCl pH 6 Aceton 1%	867,53 (n=2)
TRIS-HCl pH 3 Aceton 1%	833,30 (n=1)

In den weiterhin eingeschlossenen Elutionslösungen der folgenden Tabelle wurde zusätzlich das Hämoglobin quantitativ bestimmt:

Tabelle 29: Ausgewählte Elutionsreagenzien in Stufe 3

Elutionsreagenz	Hämoglobin (mg/dL)	Hämoglobin (mg/dL) in Verdünnung	Homoarginin% zum Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs (n)
TRIS-HCl pH 1	5,0		71% (3)
HCl 0,05	231,9	264,0	70% (1)
PBS-HCl pH 3	341,8	571,4	112% (2)
PBS-HCl pH 1 Aceton 5%	417,9		116% (1)
PBS-HCl pH 1 Aceton 1%	510,6	508,6	113% (1)
PBS-HCl pH 1	552,9	527,0	105% (2)
H ₂ O	949,8	829,2	91% (2)
Citronensäurephosphatpuffer	1011,2	867,4	79% (1)
TRIS-HCl pH 3		711,2	57% (1)

Es erfolgte eine weitere Auswahl der Elutionsreagenzien anhand minimaler Schwankungen des Hämoglobins:

- Die geringsten relativen Schwankungen von Hämoglobin ließen sich in Lösungen mit hohem Hämoglobingehalt nachweisen. Dies betrifft H₂O und Citronensäurephosphatpuffer.
- Die geringsten absoluten Schwankungen von Hämoglobin, sind Lösungen mit geringen Hämoglobinwerten, wie TRIS-HCl pH 1 und TRIS-HCl pH 1 mit Aceton 1%.

Jene Lösung, mit dem geringeren Herstellungsaufwand und geringerer Arbeitsplatzbelastung wurden dabei ausgewählt und in einem Intraassay getestet, um weitere Entscheidungskriterien zu ermitteln. Diese sind TRIS-HCl pH 1 und H₂O.

5.2.5.3 Auswahl der Elutionslösungen Stufe 4 - Vergleich zweier Lösungen

Dafür wurden die L-hArg-Konzentration von 2 Probanden, mit je 5 Stichproben in jeder Elutionslösung gemessen. Die Ergebnisse wurden mit dem DLD Elutionsreagenzes des ADMA Card ELISA kalibriert und zeigen folgendes:

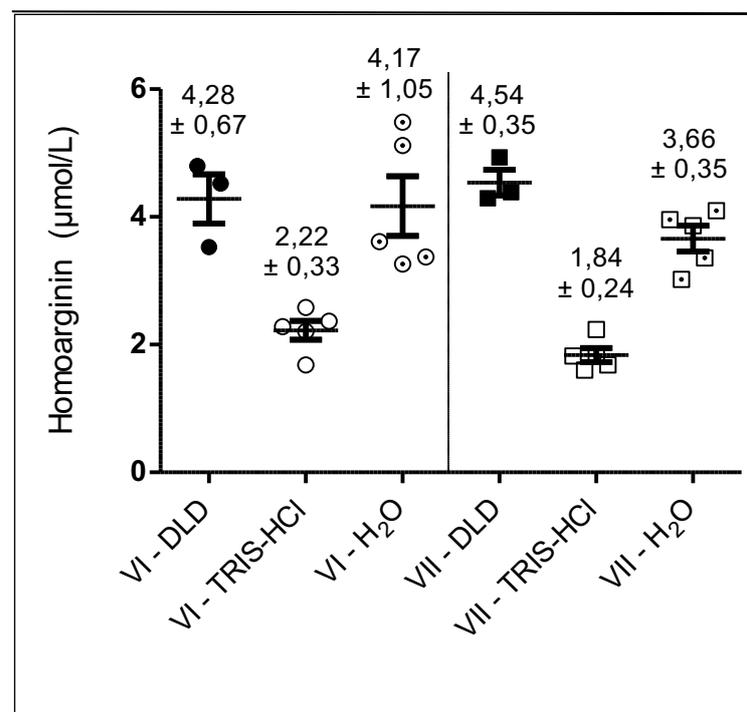


Abbildung 17: Elutionslösungsvergleich - Kalibration mit ADMA Card ELISA Elutionspuffer

n=5; MW±SD; getestete Probanden: VI (links in der Grafik), VII (rechts in der Grafik); Elutionslösungen: DLD, TRIS-HCl und H₂O; DLD = Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs

Die Homocysteinewerte sind bei beiden Probanden in der TRIS-HCl Lösung geringer als in der DLD-Lösung, in welcher für dieses Experiment kalibriert wurde. Die

Variationskoeffizienten zeigen für die Elution mit Wasser die größte Streuung, siehe Tabelle 36.

Tabelle 30: Variationskoeffizienten (VK) der Elutionslösungen in Stufe 4 - kalibriert mit ADMA DLD Elutionslösung

Proband	VK DLD	VK TRIS-HCl	VK H ₂ O
VI	16%	15%	25%
VII	8%	13%	10%
Durchschnitt	12%	14%	17,5%

Es folgte derselbe Versuchsaufbau zweier anderer Probanden. Diese wurden mit TRIS-HCl pH 1 kalibriert und die Ergebnisse in der untenstehenden Grafik dargestellt.

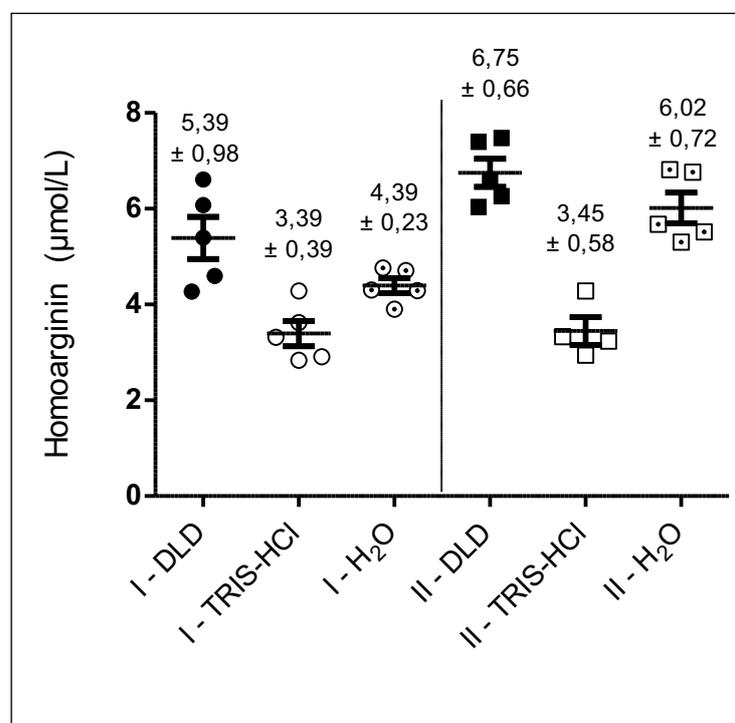


Abbildung 18: Elutionslösungsvergleich - Kalibration mit 1 M TRIS-HCl pH 1

n=5; MW±SD; getestete Probanden: I (links in der Grafik), II (rechts in der Grafik); Elutionslösungen: DLD, TRIS-HCl und H₂O; DLD= Elutionsreagenz des ADMA Card ELISAs

Auch für die Kalibration in 1 M TRIS-HCl zeigt sich eine geringere L-hArg-Konzentration im Vergleich zum DLD Reagenz, Abbildung 18.

Tabelle 31: Variationskoeffizient (VK) in Elutionslösungen in Stufe 4 - kalibriert mit TRIS-HCl

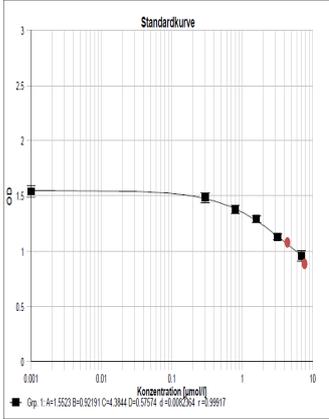
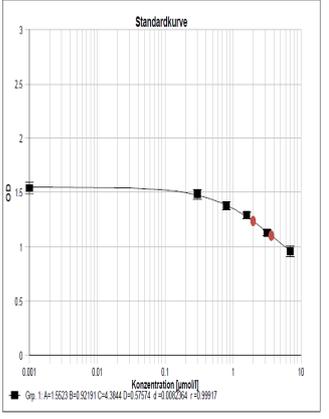
Proband	VK DLD	VK TRIS-HCl	VK H ₂ O
I	18%	10%	5%
II	10%	17%	12%
Mittel	14,0%	13,5%	8,5%

Neben den statistischen Kriterien sind außerdem die Arbeitsbedingungen der Elutionslösungen zu beurteilen: Aufgrund der Elutionsfähigkeit von Hämoglobin bei Wasser und somit einer Trübung und Färbung des Eluats werden die Farbwechsel der ELISA Schritte überdeckt und sind somit zusätzlich Anwenderunfreundlich.

5.2.5.4 Zusammenfassung der Elutionslösungen

Zunächst erfolgte eine grobe Auswahl der Elutionslösung anhand der Kriterien: Kompatibilität und ausreichender L-hArg-Elutionsfähigkeit. Die verbliebenen Lösungen wurden in ihrer Fähigkeit zur Hämoglobinelution genauer beschrieben. Innerhalb der verbliebenen Elutionslösungen zeigten H₂O die geringsten relativen und TRIS-HCl pH 1 die geringsten absoluten Schwankungen in der Hämoglobinelution. Unter den Elutionslösungen mit denselben Eigenschaften, überzeugten diese allerdings durch den geringeren Herstellungsaufwand, bei gleichem Ergebnis.

Tabelle 32: Kontextkriterien der Elutionslösungen Stufe 4

Kriterien d. Kontextes	H ₂ O	TRIS-HCl pH 1
Hämoglobinelution	ja	nein
Farbumschlag ELISA	-	+
Anwenderfreundlichkeit	-	+
Herstellung	+	+/-
Mittleres Messniveau		
Statistische Kriterien		
VK (DLD)–VI/VII	17,5%	14%
VK (TRIS-HCl)–I/II	8%	13,5%

Die deskriptiv statistischen Werte, Streuung und MW, ergeben keine klaren Vorteile einer Elutionslösung. Wohingegen sich klare Unterscheidungskriterien in der Hämoglobinelutionsfähigkeit ergeben, der dadurch verdeckten Farbumschläge und somit einer fehlenden Kontrollmöglichkeit des Analyseschrittes.

5.2.6 Einfluss der Spotvariabilität

Im Anschluss der Messung von einem, zwei und drei Spots desselben Probanden in separaten Messungen erfolgte im Anschluss eine mathematische Angleichung. So wurden die Ergebnisse des zwei-Spot-Versuches mit 1,5 multipliziert und die Ergebnisse des ein-Spot-Versuches mit 3, um die Ergebnisse mit dem drei-Spot-Versuch anzupassen. Dieses Vorgehen ist bereits aus dem ADMA-Card ELISA für zwei und drei verwendete Spots bekannt. Die statistische Auswertung erfolgte mit den adaptierten Werten und zeigte keinen signifikanten Unterschied (n.s., ANOVA) Dabei wird deutlich, dass die Messungen mit zwei und drei Spots sich sehr gut annähern. Im Gegensatz zu einem Vergleich mit Ergebnissen, die nur mit einem Spot ermittelt wurden.

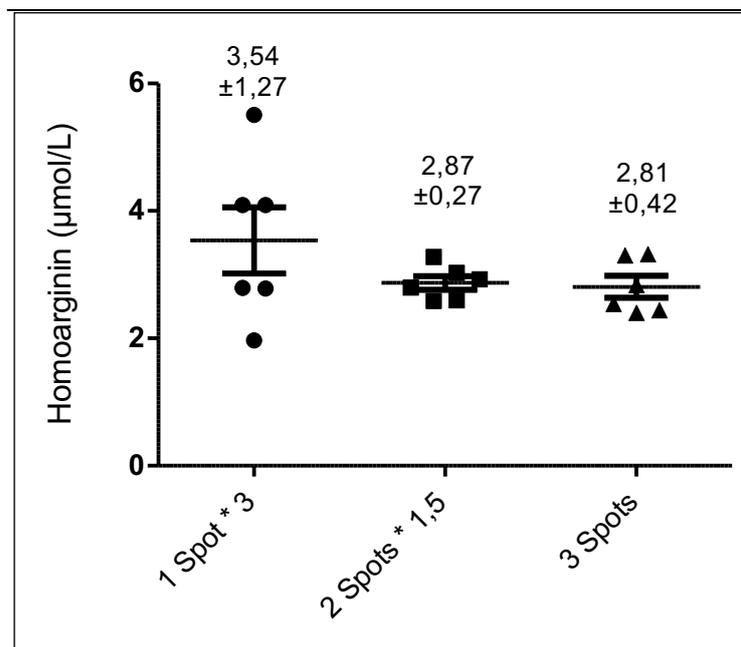


Abbildung 19: Einfluss der verwendeten Spotanzahl

n=5; MW±SD; n.s., ANOVA; Darstellung der Homoargininkonzentration nach mathematischer Adaptation

Der Variationskoeffizient für Ein-Spot-Messungen beträgt 36,0% und ist somit zu hoch für eine semiquantitative Messung. Im Vergleich dazu beträgt der Variationskoeffizient für Zwei-Spot-Messungen 9,3% und für Drei-Spot-Messungen 14,9%.

5.2.7 Vergleich von kapillar und venös gewonnenem Blut

Die folgende Abbildung zeigt, dass bei drei Probanden und einer jeweiligen Stichprobenzahl von 5 kein signifikanter Unterschied zwischen kapillar und venös entnommenem Blut besteht. Während auf die Spots der Trockenblutkarten mit dem venös entnommenen Blut mit exakt 50 µl pipettiert wurden, ist die Menge des

kapillar entnommenen Blutes unbekannt. Lediglich die Beurteilung einer ausreichenden Menge, aufgrund der Tropfenbildung am Finger bei Entnahme und der optischen Beurteilung des Spots konnte erfolgen.

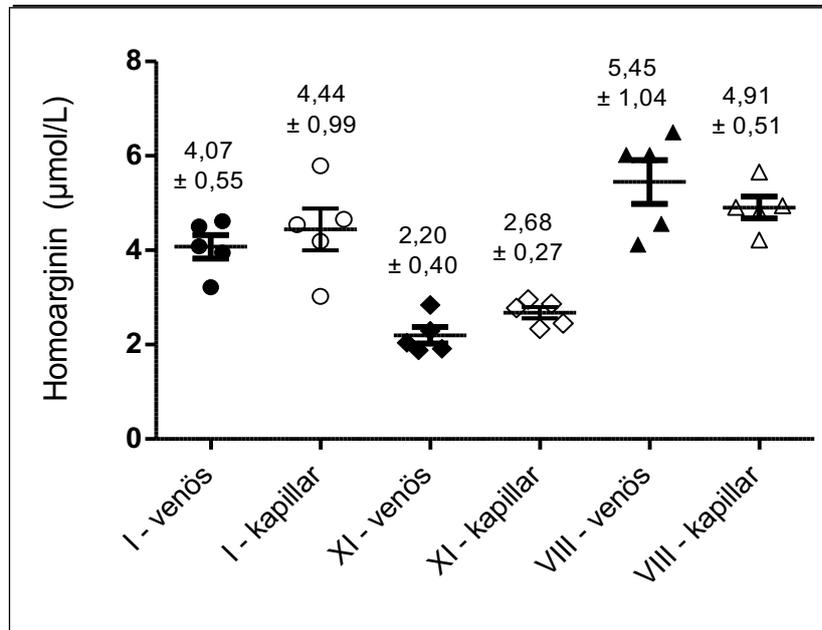


Abbildung 20: Einfluss der Blutentnahmetechnik

n=5; MW±SD; Probanden: I, XI und VII; n.s., ANOVA

Statistisch betrachtet ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen venös und kapillar entnommenem Blut ($p < 0,0001$, ANOVA nach Bonferroni).

Tabelle 33: Vergleich von kapillar und venös entnommenem Blut

Proband	ANOVA	VK venös	VK kapillar
I	n.s.	13,6%	22,4%
XI	n.s.	18,0%	10,0%
VIII	n.s.	19,0%	10,5%

5.3 Ergebnisse der Methodvalidierung

5.3.1 Messpräzision

Die Mehrfachmessung zweier Mikrotiterplatten zeigt für die Standards und Kontrollen im Durchschnitt eine Variation von 9,8% die sich aus folgenden Ergebnissen zusammensetzt:

Tabelle 34: Ergebnisse der Messpräzision

Probe	Variationskoeffizient (VK) Mikrotiterplatte 1	Variationskoeffizient (VK) Mikrotiterplatte 2
Standard 1	32,2%	8,7%
Standard 2	8,5%	4,9%
Standard 3	11,6%	2,8%
Standard 4	9,0%	3,7%
Standard 5	1,8%	0,9%
Kontrolle 1	30,7%	6,6%
Kontrolle 2	12,1%	4,0%
Mittel	15,1%	4,5%

5.3.2 Intraassay

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der neun getesteten Probanden sind in der Abbildung 21 dargestellt. Es zeigt sich eine mittlere Homoargininkonzentration von 2,80 bis 6,77 $\mu\text{mol/L}$. Die männlichen Probanden [II, III, VII, VIII, X] hatten im Gegensatz zur Literatur keine höheren L-hArg-Konzentration im Vergleich zu den weiblichen Probandinnen [I, IV, V, VI], ($p=0,822$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Beide Geschlechter zusammen wiesen im Durchschnitt eine L-hArg-Konzentration von 4,9 $\mu\text{mol/L}$ im auf. Die 95% Spannweite der L-hArg-Ergebnisse erstrecken sich für die Frauen von 2,34–6,50 $\mu\text{mol/L}$ und für Männer von 3,03–7,66 $\mu\text{mol/L}$.

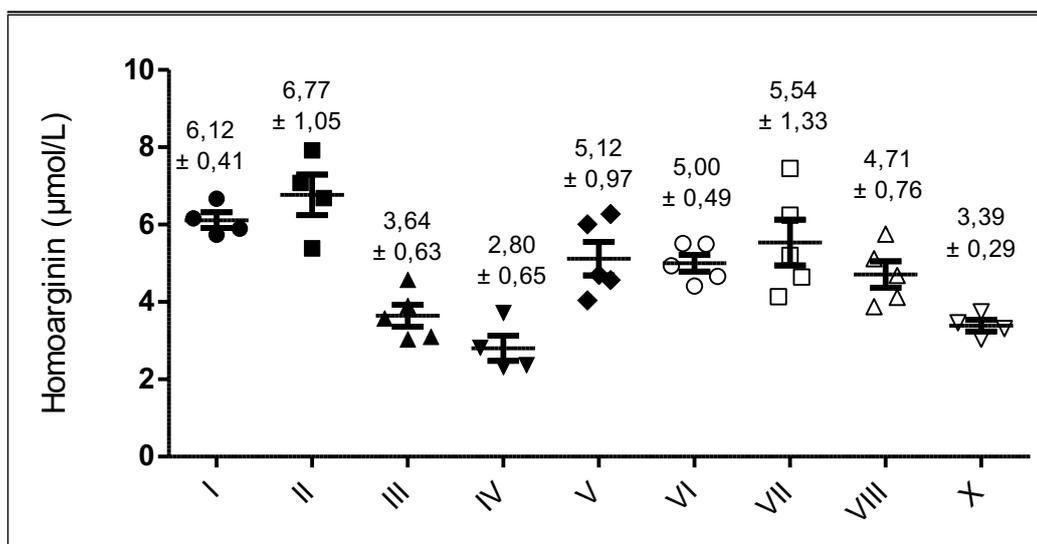


Abbildung 21: Intraassay

n=4-5; MW \pm SD; Probanden I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII,

Dabei zeigten sich Schwankungen des Variationskoeffizienten von 6,7–24,0%. Der durchschnittliche Variationskoeffizient beträgt 15,6%. Die einzelnen Variationskoeffizienten sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 35: Intraassay Variationskoeffizienten (VK)

Proband	VK
I	6,7%
II	15,5%
III	17,4%
IV	23,2%
V	18,9%
VI	9,8%
VII	24,0%
VIII	16,1%
X	8,6%
Mittel	15,6%

5.3.3 Interassay

Die acht getesteten Probanden zeigten im Vergleich zum Intraassay eine niedrigere Spannweite von L-hArg, welche im Durchschnitt sich von 1,70-3,18 $\mu\text{mol/L}$ erstreckte. Die männlichen Probanden [III, X, XII, XIII] hatten eine L-hArg-Konzentration von 2,61 $\mu\text{mol/L}$ im Durchschnitt und die weiblichen Probandinnen [IV, V, VI, IX, XI] von 2,56 $\mu\text{mol/L}$ und somit kein signifikanter Unterschied ($p=0,831$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Es zeigte sich eine 95% Spannweite der L-hArg-Konzentration von 1,58–3,72 $\mu\text{mol/L}$ für Frauen und 1,80–3,85 $\mu\text{mol/L}$ für Männer.

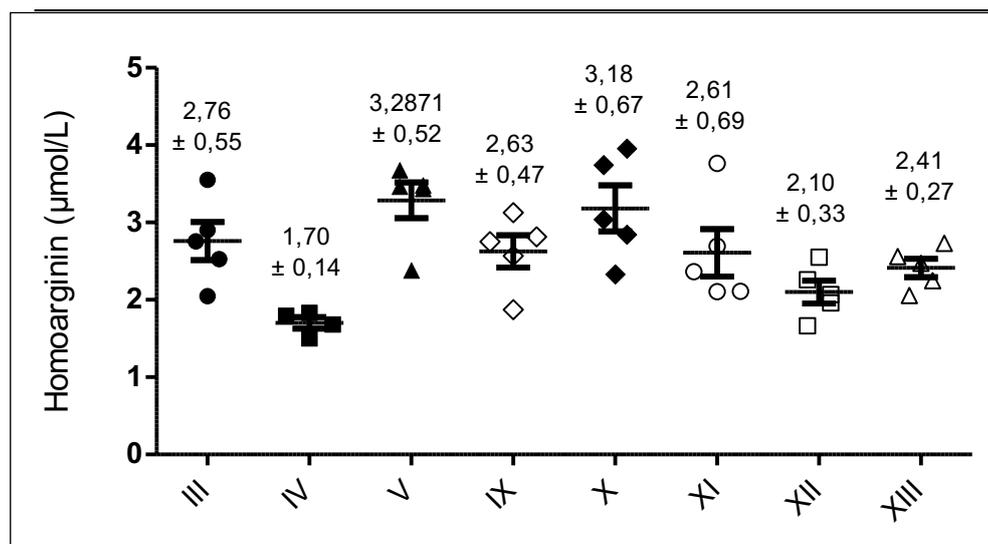


Abbildung 22: Interassay

n=4-5; MW±SD; Probanden III, IV, V, IX, X, XI, XII, XIII

Dabei streuten die Ergebnisse mit einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten 17,0% von 8,2% bis 26,4%, wie nachstehende Tabelle zeigt.

Tabelle 36: Interassay Variationskoeffizienten (VK)

Proband	VK
III	19,9%
IV	8,2%
V	15,8%
IX	17,9%
X	21,1%
XI	26,4%
XII	15,7%
XIII	11,2%
Mittel	17,0%

5.3.4 Personenspezifische Variation

Die Messung der Trockenblutspots von 3 Probanden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen aus kapillarem Blut zeigt folgende Ergebnisse:

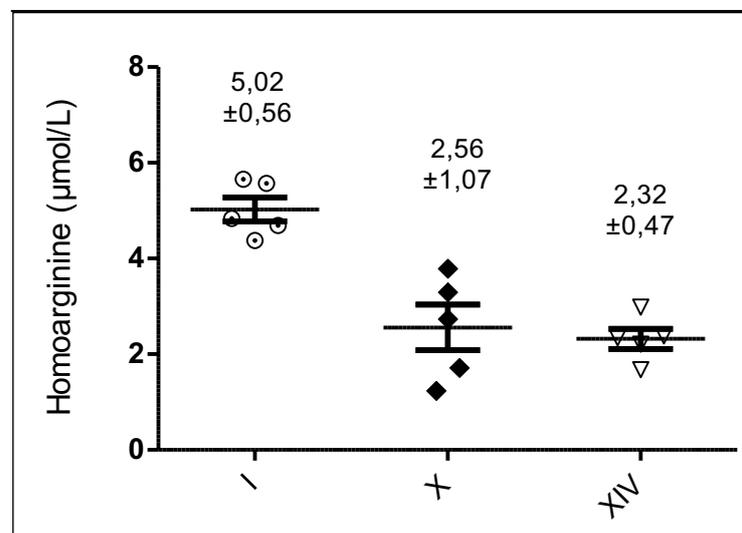


Abbildung 23: Intraindividuelle Variation über den Verlauf von 5 Tagen

n=5; MW±SD; Probanden: I, X, XIV; eine kapillare Blutentnahme pro Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Vergleicht man die Varianz und die Mittelwerte der Probanden im Verlauf einer Woche mit einer 5-fachen Messung einer venös entnommenen Vollblutprobe eines Tages, so Tabelle 43, zeigt sich ein deutlich geringerer Variationskoeffizient. Die 1-Tages Messungen stammen aus dem Intraassay für die Probanden I und X und aus den Vorversuchen, Kapitel 3.2.1, für den Proband XIV.

Tabelle 37: Intraindividuelle Variation der Homoargininkonzentration

Proband	5 Tage (kapillar)		1 Tag (venös)	
	MW \pm SD	VK	MW \pm SD	VK
I	5,02 \pm 0,56 μ mol/L	11,2%	6,12 \pm 0,41 μ mol/L	6,7%
X	2,56 \pm 1,07 μ mol/L	41,8%	3,39 \pm 0,29 μ mol/L	8,6%
XIV	2,32 \pm 0,47 μ mol/L	18,4%	2,90 \pm 0,1 μ mol/L	3,4%
Mittel	3,30\pm0,70 μmol/L	23,8%	4,13\pm0,26 μmol/L	6,2%

5.4 Ergebnisse der Methodenrobustheit

5.4.1 Einfluss von Hämolyse

Die zwei getesteten Probanden zeigten keinen signifikanten Einfluss durch eine vorherige mechanische Hämolyse der Probe ($p=0,60$, ANOVA).

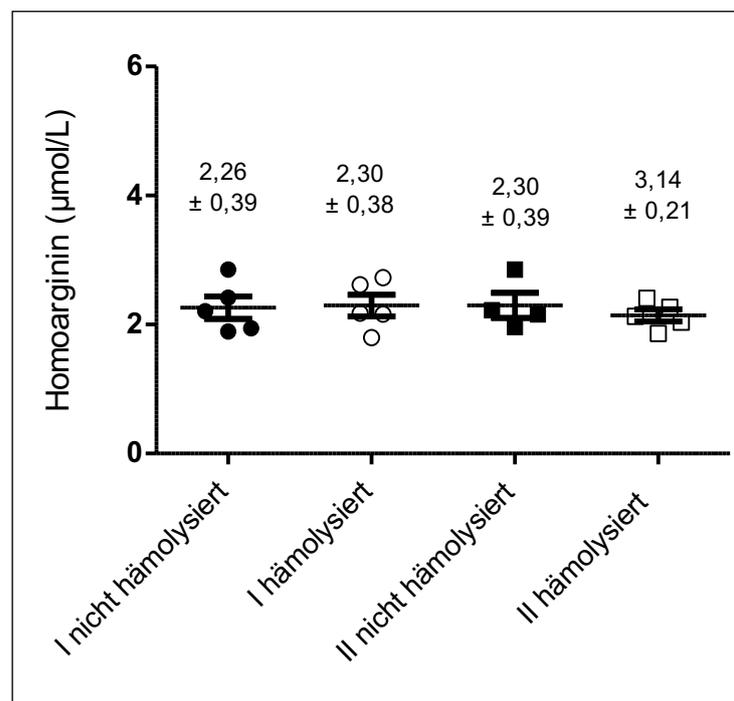


Abbildung 24: Einfluss mechanischer Hämolyse

$n=5$; MW \pm SD; Probanden I und II; n.s., ANOVA

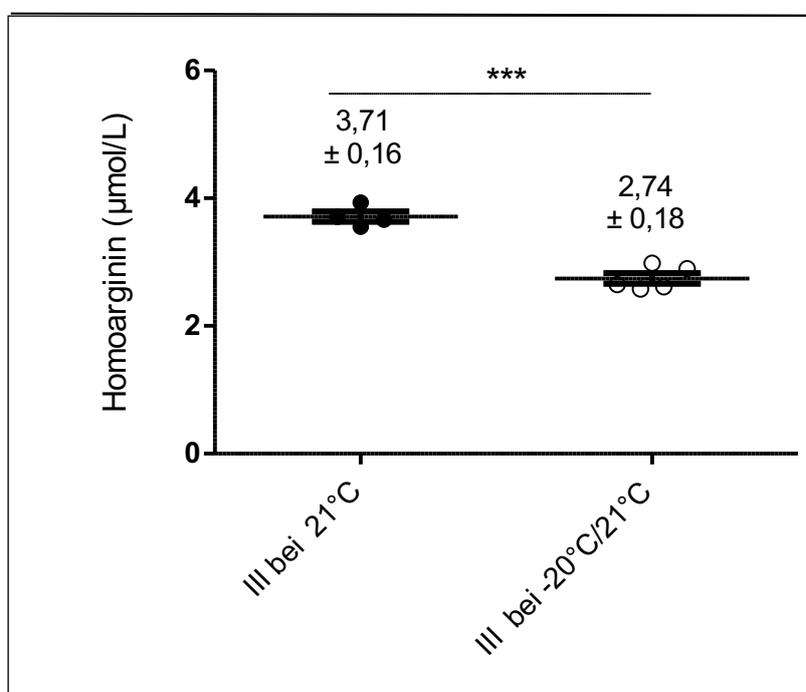
Die ermittelten Variationskoeffizienten der zuvor mechanisch hämolysierten Proben zeigten sich als geringer im Vergleich zu unhämolysierten Proben (Tabelle 44).

Tabelle 38: Hämolyseeinfluss; dargestellt Variationskoeffizienten (VK)

	VK Kontrollprobe	VK mechanisch hämolysierte Probe
Proband I	17,3%	16,5%
Proband II	17,0%	6,7%

5.4.2 Einfluss von Einfrieren und Auftauen

Ein fünfmaliges Einfrieren und Auftauen der betroffenen Trockenblutkarten innerhalb von fünf Tagen führt bereits zu einem signifikanten Unterschied der L-hArg-Konzentration ($p=0,003$, gepaarter t-Test). Die Variationskoeffizienten erwiesen sich sowohl in der Kontrollgruppe mit 4,3% und in der Interventionsgruppe mit 6,7% als sehr niedrig.

**Abbildung 25: Einfluss von Einfrieren und Auftauen**

$n=5$; $MW \pm SD$; Proband III; $***p < 0,001$; gepaarter t-Test bei Normalverteilung und Varianzhomogenität

5.4.3 Einfluss der Blutmenge

Die verschiedenen Blutmengen eines Probanden, die auf einer Trockenblutkarte aufgetragen und gemessen wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied; ($p=0,45$, ANOVA). Die Post Hoc Analyse nach Bonferroni bestätigte, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Blutmengen besteht.

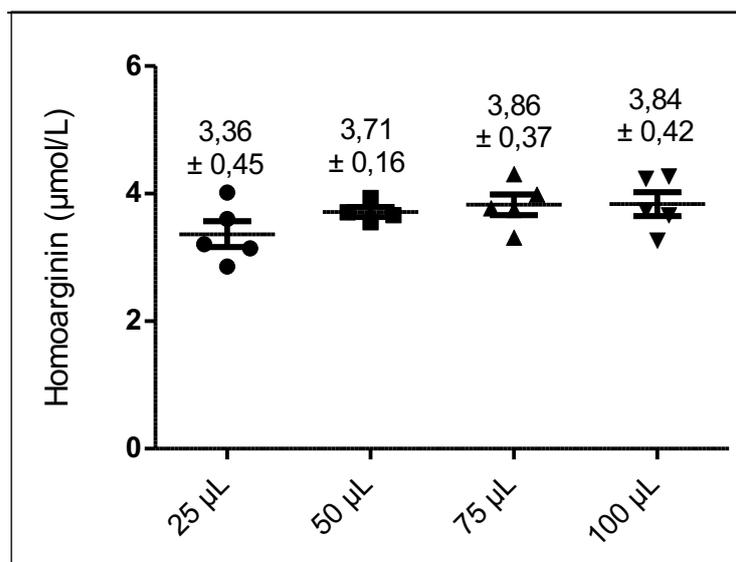


Abbildung 26: Einfluss der Blutmenge

n=5; MW±SD; verschiedene Blutmenge auf der Trockenblutkarte: n.s., ANOVA

Die Schwankungen der Messergebnisse, als Variationskoeffizient dargestellt, sind bei diesem Probanden für jede Blutmenge <15%.

Tabelle 39: Messschwankungen verschiedener Blutmengen

Blutmenge	VK (%)
25 µl	13,4%
50 µl	4,3%
75 µl	9,5%
100 µl	11%

Von Bedeutung ist hierbei, dass unabhängig von der Blutmenge, die Spots makroskopisch von vorne und hinten betrachtet vollständig mit Blut benetzt waren, wie es der Abbildung 27 zu entnehmen ist. Erkennbar ist ebenso, dass die mit 25 µl betropften Spots einen Randwall erkennen lassen (linke Grafik), in welcher der ausgestanzte Spot hineinragt (rechte Grafik).

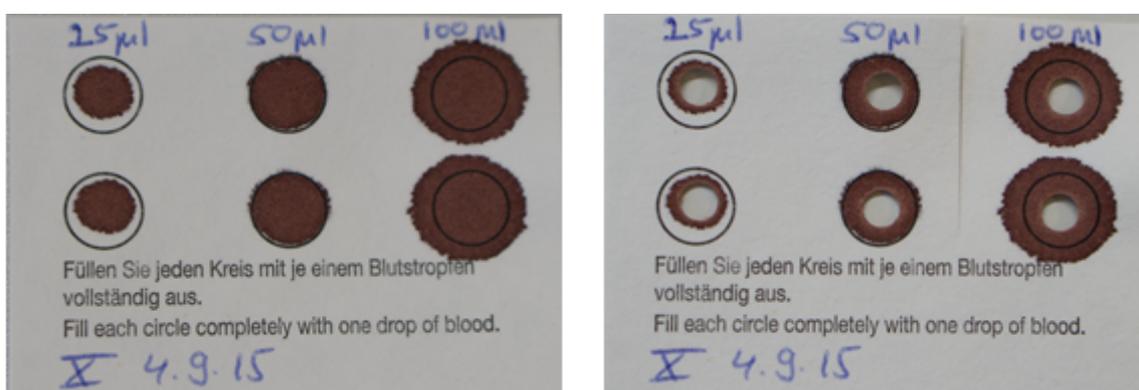


Abbildung 27: Blutmenge im Vergleich

5.4.4 Stabilität gegenüber Tageslicht

Die L-hArg-Konzentration der Trockenblutkarten unter Tageslicht für 30 Tage unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrolle (ANOVA nach Bonferroni), wie die nachfolgende Abbildung zeigt.

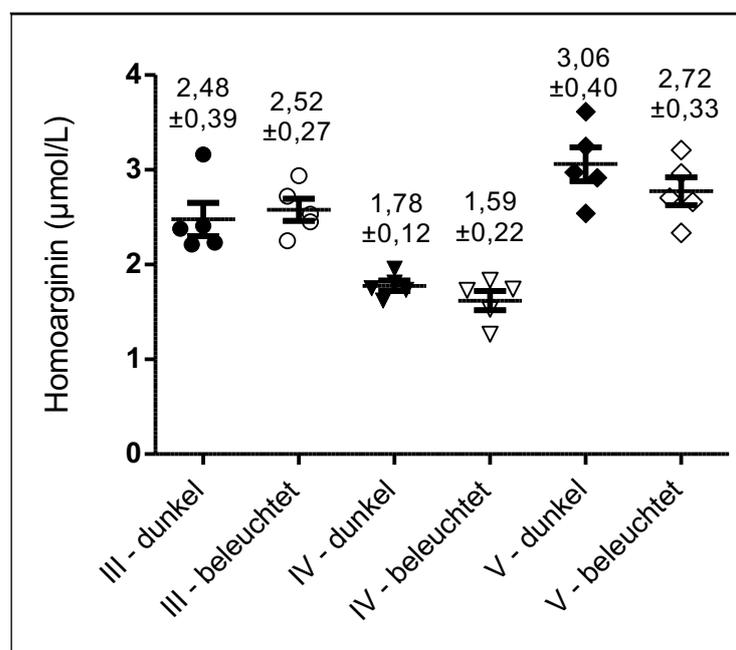


Abbildung 28: Einfluss von Tageslicht

n=5; MW±SD; Proband III, IV und V hell und dunkel gelagert im Vergleich; n.s.; ANOVA

Der Einfluss von 30 Tagen Tageslicht mit einer Beleuchtungsdauer von 6 h pro Tag hat keinen signifikanten Einfluss auf die L-hArg-Konzentration. Ebenso sind auch die Veränderungen der Variationskoeffizienten unauffällig.

Tabelle 40: Einfluss von Tageslicht; dargestellt Variationskoeffizient (VK)

Proband	ANOVA	VK dunkel	VK beleuchtet
III	n.s.	16%	11%
IV	n.s.	7%	14%
V	n.s.	13%	12%
Mittel		12%	12%

5.4.5 Klimatische Stabilität

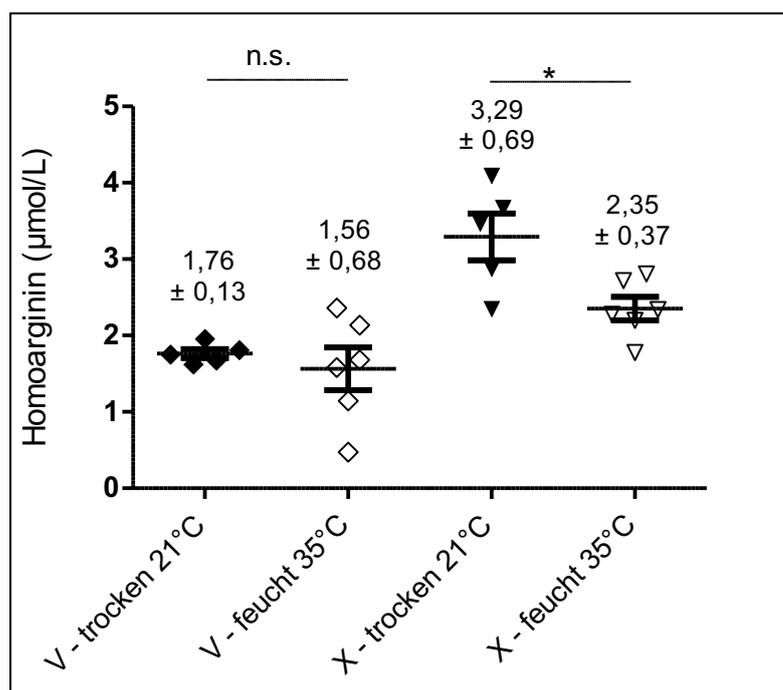


Abbildung 29: Einfluss des Klimas

n=5; MW±SD; Probanden V und X tropisch und mediterran gelagert im Vergleich; *p<0,05; ANOVA Post-hoc Test nach Bonferroni; n.s. nicht signifikant

Der Einfluss von Hitze und Feuchtigkeit führte zu einem signifikanten Unterschied der L-hArg-Konzentration (p=0,0011, ANOVA nach Bonferroni). Beim Post Hoc Test war der Unterschied bei Proband X signifikant, obwohl dieser keine feuchten und zerlaufenen Flecken innerhalb des Spots zeigte, im Gegensatz zu Proband V, welcher sich als nicht signifikant erwies. Jedoch kam es bei Proband V zu einer Zunahme der Streuung, sodass der Variationskoeffizient auf 43,8% zunahm, wie die nachfolgende Tabelle zusammenfasst.

Tabelle 41: Klimaeinfluss

	VK trocken 21°C	VK feucht 35°C	ANOVA nach Bonferroni Post Hoc Test
Proband V	7,4%	43,8%	n.s.
Proband X	20,9%	15,9%	*

5.4.6 Stabilität der Lagerungsdauer

Die Ergebnisse der 5 getesteten Probanden über einen Zeitraum von 9 Monaten sind mit Mittelwert und Standardabweichung in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 42: Stabilität der L-Homoarginin(L-hArg)-Konzentration über eine 9-monatige Lagerungsdauer

Wochen/Monat: Tagen: Probennummer:	1.Woche 1.-6.Tag	2.Woche 7.-13. Tag	3.Woche 14.-20. Tag	1.Monat 28.-42. Tag	3.Monat 91.- 102.Tag	6.Monat 182.- 193.Tag	9.Monat 276.- 287.Tag
L-hArg Konzentration in $\mu\text{mol/L}$ MW\pmSD							
I	4,45 \pm 0,83	7,09 \pm 1,64	4,47 \pm 1,08	5,91 \pm 1,0	4,22 \pm 0,50	2,86 \pm 0,36	3,51 \pm 1,21
III	3,64 \pm 0,63	3,18 \pm 0,64	2,42 \pm 0,64	2,48 \pm 0,39	-	2,03 \pm 0,13	1,52 \pm 0,5
IV	2,81 \pm 0,65	1,70 \pm 0,15	1,49 \pm 0,13	1,78 \pm 0,12	-	2,11 \pm 0,29	1,53 \pm 0,52
V	5,12 \pm 0,97	3,29 \pm 0,52	3,22 \pm 0,41	3,06 \pm 0,40	-	2,44 \pm 0,39	2,05 \pm 0,42
X	3,39 \pm 0,30	3,18 \pm 0,67	2,43 \pm 0,11	3,29 \pm 0,69	2,83 \pm 0,07	2,19 \pm 0,12	2,35 \pm 0,35

Dabei zeigt sich eine Erniedrigung der Mittelwerte zum Ausgangswert, wie sie in der nachstehenden Tabelle in Relation zum Ausgangswert zusammengefasst sind:

Tabelle 43: relative Veränderung der L-Homoarginin(L-hArg)-Konzentration zum Ausgangswert

Wochen/Monat: Probennummer:	Nach 2 Wochen	Nach 3 Wochen	Nach 1 Monat	Nach 3 Monaten	Nach 6 Monaten	Nach 9 Monaten
I	+59%	\pm 0%	+32%	-5%	-36%	-22%
III	-13%	-34%	-32%	-	-45%	-59%
IV	-40%	-47%	-37%	-	-35%	-46%
V	-36%	-38%	-40%	-	-52%	-60%
X	-7%	-28%	-3%	-17%	-35%	-31%
Mittel	-7,4%	-29%	-16%	-	-40%	-44%

Die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert von allen Probanden zusammengefasst zeigt die nachstehende Abbildung:

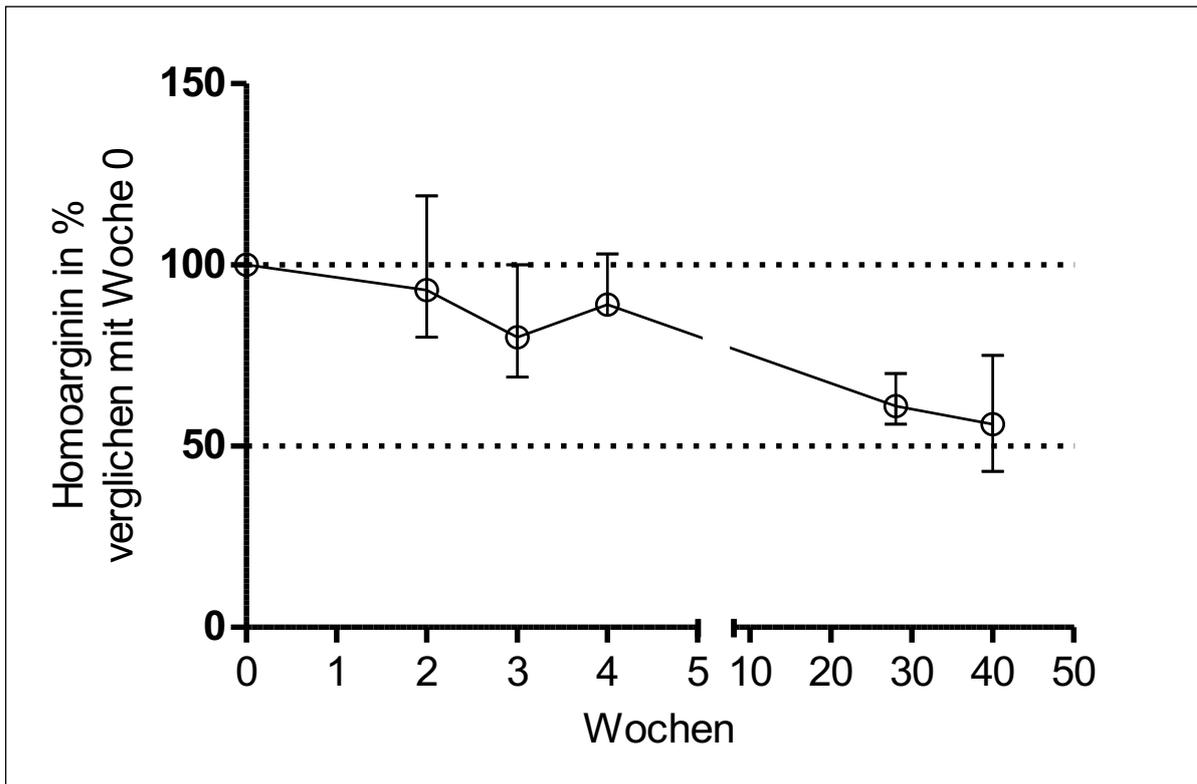


Abbildung 30: Homoargininstabilität relativ zum Ausgangswert

L-Homoargininkonzentration in prozentualer Relation zum Ausgangswert dargestellt; Mittelwert und Standardabweichung aller 5 Probanden (I, III, IV, V, X) über einen Zeitraum von 9 Monaten zusammengefasst

Es zeigt sich eine negative Korrelation des Probenalter mit den ermittelten Homoarginin werten:

Tabelle 44: Korrelation LHomoarginin (L-hArg) mit Probenalter

Proband:	Korrelationskoeffizient Spearmanns-Rho	Signifikanz (p)
I (n=24)	-0,481**	0,017
III (n=29)	-0,724**	<0,001
IV (n=23)	-0,376	0,077
V (n=25)	-0,812**	<0,001
X (n=27)	-0,532*	0,004

Eine weitere Analyse der Stabilität von L-hArg ist die Retest-Reliabilität. Die Korrelationen der L-hArg-Werten sollten dabei mindestens 0,8 betragen. Nur in Einzelfällen ist eine ausreichende Retest-Reliabilität gegeben. Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang 13.4 und 13.5 dokumentiert, für eine valide Aussage aber nicht von ausreichendem Stichprobenumfang.

5.4.7 Zusammenfassung der Methodenrobustheit

Die Methode der L-hArg-Messung aus mit Vollblut betropften Trockenblutkarten zeigt zusammenfassend einen Variationskoeffizienten von 14% im Intraassay und von 17% im Interassay. Unterschiede in der Konzentration, abhängig vom Geschlecht wurden in dieser Kohorte nicht beobachtet. Des Weiteren zeigten sich intraindividuelle Schwankungen innerhalb einer Person, mit einem Variationskoeffizienten von 23% im Verlauf von 5 Tagen.

Die Verwendung von hämolysierten Proben, kapillaren und venösem Blut, verschiedenen Blutvolumina ab 25 µl und Tageslicht zeigten keinen Einfluss auf den Nachweis von L-hArg. Ebenso verhält es sich mit der Anzahl der verwendeten Spots nach mathematischer Adaptation.

Andererseits führt ein fünfmaliges Einfrieren und Auftauen der betropften Trockenblutkarte bei -20°C zu niedrigeren L-hArg-Werten. Auch Wärme und Feuchtigkeit kann sowohl den L-hArg-Wert als auch die Streuung bei der Messung nachteilig beeinflussen. Eine deutliche Abnahme der L-hArg-Konzentration ist auch im zeitlichen Verlauf zu beobachten.

5.5 Ergebnisse der klinischen Methodenanwendung

Für die Methodenanwendung wurden Trockenblutkarten einer Studie mit chilenischen Rekruten verwendet. (Lüneburg et al. 2017) Zunächst wurde die Qualität der Trockenblutkarten beschrieben und anschließend erfolgte die L-hArg-Messung entsprechend der Anleitung aus Anhang 13.1. Eine zusätzliche Korrelationsanalyse mit bereits erhobenen Parametern wurde ergänzt.

5.5.1 Einfluss der Qualität der Trockenblutkarte

Die Qualität der Trockenblutkarten ist im Anhang 13.6 detailliert verzeichnet. Die Rangkorrelation nach Kendalls Tau wurde für die Differenz der L-hArg-Werte und der Differenz der Qualitätsmerkmale: Durchmesser, Benetzung der Rückseite und Gesamtheit in Punkten berechnet:

Tabelle 45: Einfluss der Trockenblutkartenqualität in der chilenische Studie

Vergleichsparameter	Korrelation nach Kendalls Tau
Spotgröße	-0,280* (p=0,022)
Benetzung der Rückseite	- 0,439** (p=0,000)
Gesamtheit	-0,352** (p=0,003)

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Probenqualität und der L-hArg-Konzentration. Die Qualität der beimpften Trockenblutkarten ist vom Startzeitpunkt bis zum 6. Monat in 21 Probanden gesunken, in 11 Probanden gestiegen und in 8 Probanden gleichgeblieben. Die Verteilung der L-hArg-Veränderung ist in allen Trockenblutqualitäten verteilt, wie das nachstehende Diagramm verdeutlicht.

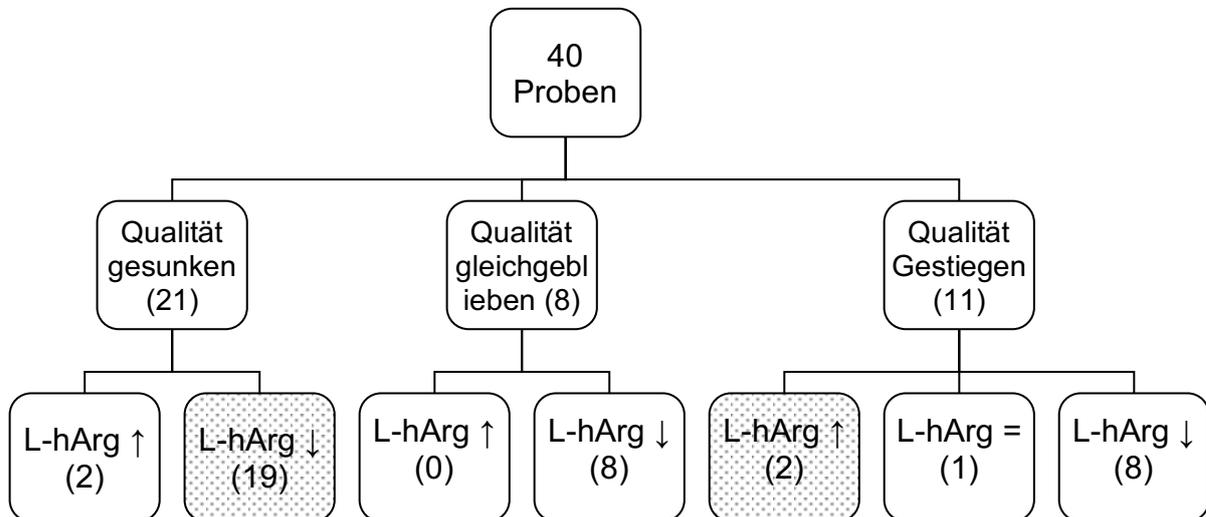


Abbildung 31: Chileproben Qualitätsverteilung

Entwicklung der Qualität der 40 Proben aus der chilenischen Studie (von Monat 0 zum Monat 6) in 3 Kategorien eingeteilt; weitere Unterteilung der Entwicklung der L-hArg-Konzentration (von Monat 0 zu Monat 6)

Eine erneute Analyse unter Ausschluss der im Diagramm gepunkteten Werte wurde vorgenommen, um den Einflussfaktor, der sich verändernden Qualität zu umgehen. Es zeigt sich, dass entsprechend dem Wilcoxon-Test für die weiß gefärbten Felder im Diagramm weiterhin ein signifikanter Unterschied besteht ($p=0,001$, $n=19$). Somit zeigt sich sowohl eine gute Korrelation der Qualität der Trockenblutkarten, als auch ein hoher signifikanter, qualitätsunabhängiger Unterschied der L-hArg-Spiegel vor und nach Belastung in 4000 m Höhe.

5.5.2 Homoarginin nach 6monatiger Höhenbelastung

Die 40 gemessenen Proben chilenischer Studienteilnehmer im Alter von 17-19 sind in nachstehender Abbildung in der gesamten Verteilungsbreite dargestellt. Die Messung mittels t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied ($p<0,001$) zu Beginn der Studie auf Meereshöhe und einem 6-monatigem Aufenthalt in 4000 m Höhe.

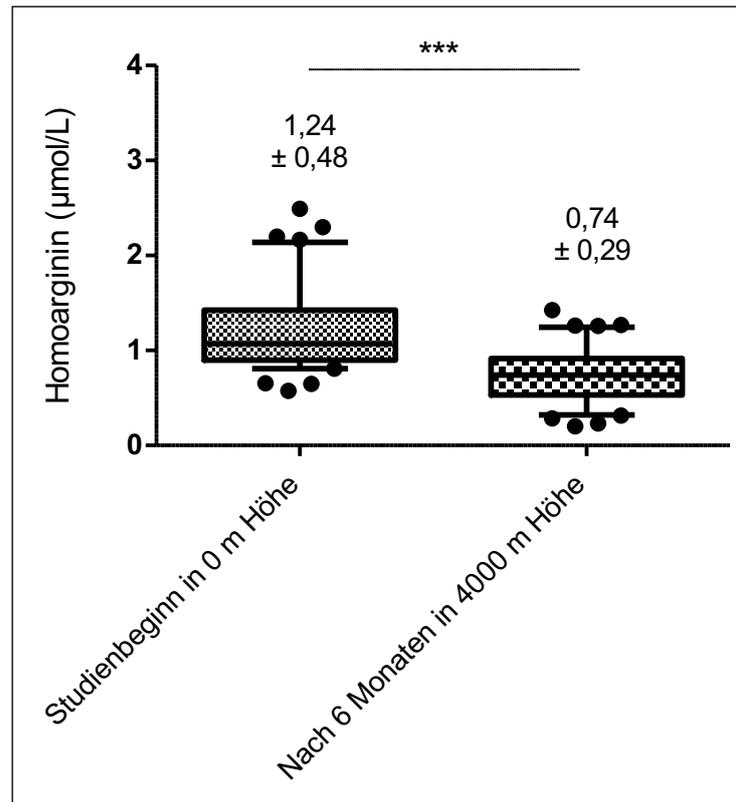


Abbildung 32: Homoarginin vor und nach 6-monatiger Höhenbelastung 4000m

n=40; MW±SD; grafisch dargestellt 95% Intervall; ***p<0,001; gepaarter t-Test bei Normalverteilung und Varianzhomogenität

Wie sich bereits im vorigen Kapitel zeigte, hat die Qualitätsveränderung Einfluss auf die Veränderung der gemessenen L-hArg-Konzentration. Nach Ausschluss von 21 Probanden erfolgte eine neue Analyse mit 19 Probanden. Es zeigte sich ein weiterhin bestehender signifikanter Unterschied (p=0,003, t-Test). Diese sind in der nachfolgenden Grafik dargestellt:

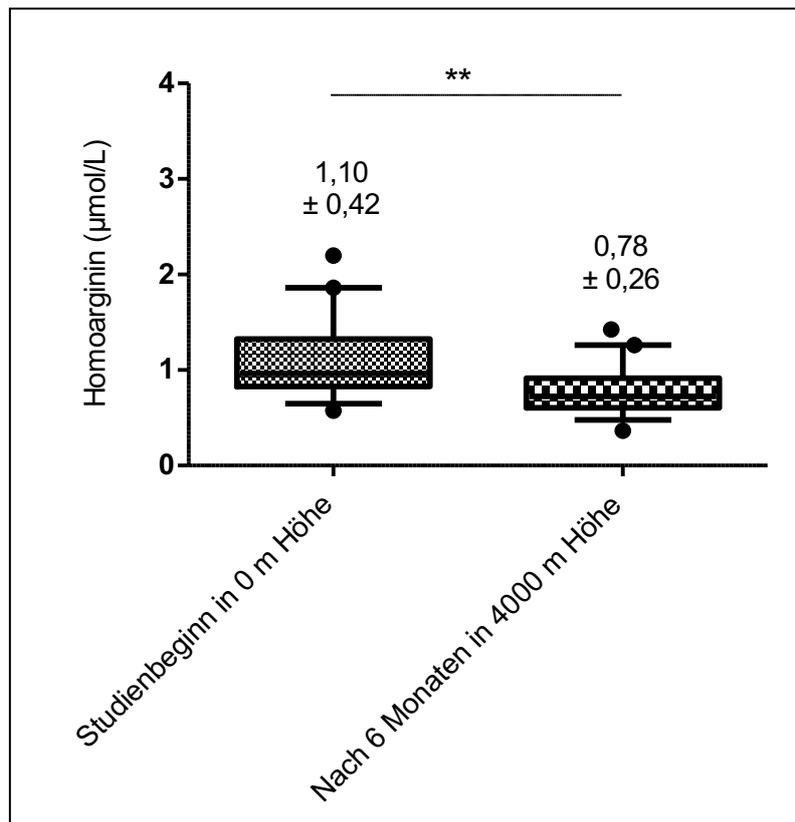


Abbildung 33: Homocystein vor und nach 6-monatiger Höhenbelastung von 4000m ohne Einfluss der Trockenblutkartenqualität

n=19; nach Ausschluss der Proben mit Qualitätsverminderung der Trockenblutkarte im Zeitverlauf; MW±SD; grafisch dargestellt 95% Intervall; **p<0,01; gepaarter t-Test bei Normalverteilung und Varianzhomogenität

5.5.3 Korrelationsanalyse mit anthropometrischen Parametern

Beim Vergleich mit anthropometrischen Parametern der Studienteilnehmer, zeigten sich zu Studienbeginn keine signifikanten Korrelationen. Nach 6-monatiger Höhenexposition zeigte sich ein Zusammenhang des Gewichtes (Korrelationskoeffizient 0,361*, p=0,026, Pearson r) und des BMIs (Korrelationskoeffizient 0,447**, p=0,005, Pearson r). Longitudinale Analysen zeigten keine signifikante Korrelation. Die Auswahl des Testverfahrens war bedingt durch die Normalverteilung der Daten.

Unter der Annahme, dass die L-hArg-Konzentration von dem Verhältnis von Blutzellen und Plasma beeinflusst sein könnte, erfolgte die zusätzliche Korrelationsanalyse mit dem Hämatokrit. Die Analyse aller Datenpaare beider Zeiträume (n=73) zeigte eine Normalverteilung, sodass die Korrelationsanalyse nach Pearson erfolgte. Der Hämatokrit korrelierte mit L-hArg (Korrelationskoeffizient -0,320) bei einer Signifikanz von p=0,006. Die Korrelationsanalysen bei Gruppierung der Daten nach Qualität und Zeitpunkt zeigte keine weiteren signifikanten Korrelationen.

5.5.4 Vergleich der Homoargininkonzentration im Plasma und Vollblut der Teilnehmer der chilenischen Studie

Es zeigte sich unter der Exposition von 4000m Höhenexposition für 6 Monate ein signifikanter Unterschied der L-hArg-Konzentration, sowohl für Messungen aus dem Plasma als auch aus Trockenblutkarten mit Vollblut. Dabei verringerte sich die hArg-Konzentration signifikant, wie die folgende Grafik zeigt:

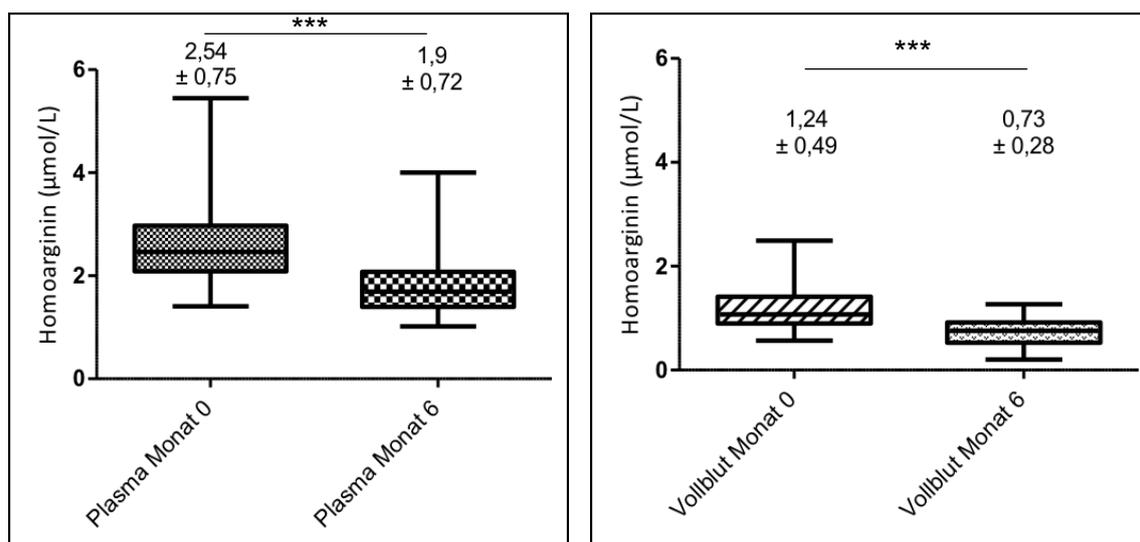


Abbildung 34: Vergleich von Plasma und Vollblut im zeitlichen Verlauf nach Exposition in 4000m Höhe

Plasma: n=37; MW±SD; grafisch: Minimum-Maximum dargestellt; ***p<0,001; gepaarter t-Test bei Normalverteilung und Varianzhomogenität

Vollblut: n=37; MW±SD; grafisch: Minimum-Maximum dargestellt; ***p<0,001; gepaarter t-Test bei Normalverteilung und Varianzhomogenität

Folgende absolute und relative Reduktionen waren zu beobachten:

Tabelle 46: Vergleich L-Homoarginin (L-hArg)-konzentration im Plasma und Vollblut

	Plasma	Vollblut
Monat 0 (MW ± SD)	2,54±0,75 µmol/L	1,24±0,49 µmol/L
Monat 6 (MW ± SD)	1,90±0,72 µmol/L	0,73±0,28 µmol/L
Absolute Reduktion im Mittel	-0,64 µmol/L	-0,51 µmol/L
Relative Reduktion im Mittel	-25,2%	-41,1%
Relative L-hArg-Konzentration nach Exposition	74,8%	58,9%

Die Korrelationsanalyse für alle Datenpaare ohne zeitliche oder qualitätsbezogene Gruppierung ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

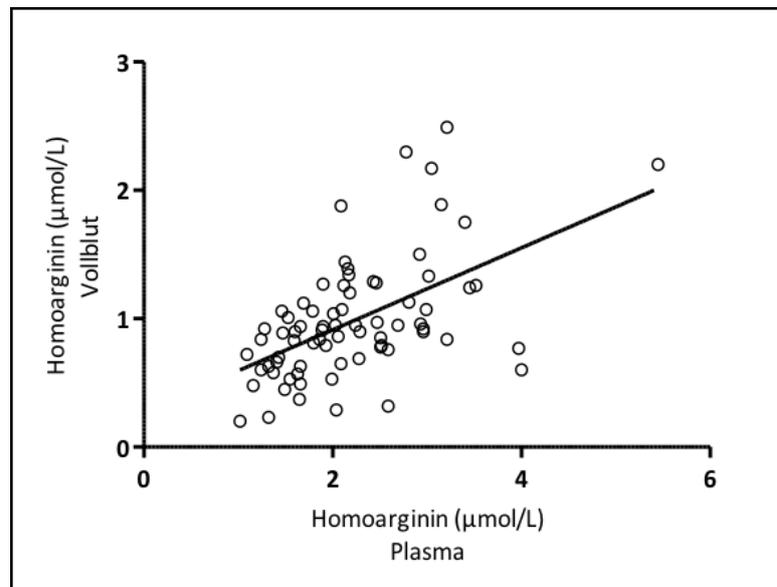


Abbildung 35: Korrelationsanalyse Homocystein-Plasma und Homocystein-Vollblut

n=74, Datenpaare für Monat 0 und Monat 6, Korrelationsanalyse: $y = 0,3191x + 0,2751$, $R^2 = 0,2948$

Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen L-hArg-Plasma und L-hArg-Vollblut von $r=0,543$ mit einer Signifikanz von $p<0,001$. Bei Gruppierung der Datenpaare zeigten sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 47: Korrelationsanalysen der Untergruppen

Datengruppe	n	Bestimmtheitsmaß	Korrelation nach Pearson's	Signifikanz
Gesamt	74	$R^2=0,2948$	0,543**	$p<0,001$
Monat 0	37	$R^2=0,3145$	0,561**	$p<0,001$
Monat 6	37	$R^2=0,0417$	0,205	$p=0,223$
Alle ohne starke Qualitätsveränderung	32	$R^2=0,6099$	0,781**	$p<0,001$
Monat 0 ohne starke Qualitätsveränderung	16	$R^2=0,6913$	0,831**	$p<0,001$
Monat 6 ohne starke Qualitätsveränderung	16	$R^2=0,1396$	0,375	$p=0,152$

Es zeigte sich, dass für die Datenwerte nach Exposition in 4000m Höhe (Monat 6) keine signifikanten Korrelationen zwischen L-hArg im Plasma und Vollblut mehr bestehen.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer Methode, um L-hArg aus mit Vollblut beimpften Trockenblutkarte zu messen. Mittels 1 M TRIS-HCl pH 1 ist eine L-hArg-Extraktion bei geringster Varianz der Ergebnisse gegeben. Ebenso wird die Elution von Hämoglobin verhindert, wodurch die Farbumschläge der Pipettierschritte des kommerziellen ELISAs der Firma DLD Diagnostika als Pipettierhilfe erhalten bleiben.

Bei einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von unter 20% wurden die Anforderungen entsprechend der „Empfehlung für bioanalytische Methodvalidierung für Ligandenbindenden Assay [...]“ (DeSilva et al. 2003) erfüllt: 15% Intraassay, 17% Intraassay. Die Stabilität der Methode ist durch extreme Kälte (-20°C), Hitze (35°C) und Feuchtigkeitseinflüsse auf die Trockenblutkarten beschränkt. Während die Blutentnahmetechnik, das Blutvolumen, die Anzahl der Spots, hämolysierte Proben und 180 Stunden Sonnenlicht keinen Einfluss auf das Messergebnis zeigen. Aufgrund der langsamen Abnahme der L-hArg-Konzentration ist die Messung unter Einbeziehung der Lagerungsdauer zu einem späteren Zeitpunkt möglich.

6.1 Vorversuche

6.1.1 Vergleich von Homoargininkonzentrationen im Vollblut, Plasma und Serum

Bisher veröffentlichte Studien geben Anhaltspunkte für die L-hArg-Konzentration in Serum und Plasma. In den nachstehenden Tabellen sind die Werte gesunder Erwachsener Probanden verschiedener Studien zusammengefasst.

Tabelle 48: L-Homoarginin (L-hArg)-konzentration gesunder Erwachsener im Plasma

Plasma		
L-hArg In $\mu\text{mol/L}$	n (Methode)	Quelle
MW: 1,99 Median: 1,87	100 (HPLC)	(Blackwell et al. 2007)
MW: 2,15 \pm 0,75 $\mu\text{mol/L}$	30 (HPLC)	(Jones et al. 2010)
Median: 1,88	786 (HPLC-MS/MS)	(Atzler et al. 2016a)
MW: 2,3 SD: 0,74	12 (HPLC-ESI-MS/MS)	(Servillo et al. 2013)

Tabelle 48: L-Homoarginin (L-hArg)-konzentration gesunder Erwachsener im Plasma Fortsetzung

Plasma		
L-hArg In $\mu\text{mol/L}$	n (Methode)	Quelle
MW: 1,70 SD: 0,62	17 (GC-MS)	(Hanff et al. 2016)
MW: 2,0 SD: 0,7	252 ¹ (ELISA)	(DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte GmbH 2014) ¹ (Cordts et al. 2015)
MW: 2,01 SD: 0,65	27 (LC-MS/MS)	(Davids et al. 2012a)

Tabelle 49: L-Homoarginin(L-hArg)-konzentration gesunder Erwachsener im Serum

Serum		
L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	n (Methode)	Quelle
MW: 2,52 SD: 0,23	11 (GC-MS/MS)	(Haghikia et al. 2015)
Median: 2,63	1359 (LC-MS/MS)	(Atzler et al. 2014b)
Median 1,62	92 (HPLC)	(Tomaschitz et al. 2015)

Vergleicht man die L-hArg-Konzentrationen der Studien mit der höchsten Probandenzahl, ist festzustellen, dass der Median der L-hArg-Plasmakonzentration bei 1,88 $\mu\text{mol/L}$, der L-hArg-Serumkonzentration bei 2,63 $\mu\text{mol/L}$ und damit höher ist.

Kayacelebi et al. detektierten bereits, dass keine vollständige Übereinstimmung der Homoargininkonzentration zwischen Plasma und Serum besteht ($r^2=0,6997$) (Kayacelebi et al. 2014b). Hierbei wurde das EDTA Plasma mit Serum von 10 Probanden verglichen und es ergab sich ein Plasma-Serum-Verhältnis von $1,12 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$, sodass Plasmakonzentrationen etwa 12% höhere Messwerte als Serumkonzentrationen hatten (Kayacelebi et al. 2014b). Bei drei von 10 Probanden zeigte sich ein signifikanter Unterschied der L-hArg-Konzentration bedingt durch die Probenart (Kayacelebi et al. 2014b).

Serumröhrchen enthalten lediglich Gerinnungsaktivatoren: Silikapartikel ohne Kontamination. Durch die Oberflächenvergrößerung mittels der Silikapartikel wird die Gerinnung über die negative Ladung der Oberfläche im extrinsischen Weg aktiviert. Folglich ist der Überstand, das Serum, frei von Gerinnungsfaktoren. Da es gleichzeitig zur Aktivierung der Plättchenaggregation kommt, enthält das Serum Boten- und Inhaltsstoffe aktivierter Plättchen.

Die EDTA Monovetten enthalten 1,6mg Ethylendiamintetraessigsäure pro 1ml Blut (Sarstedt Produkte n.d.). Das EDTA ist ein Anion und bildet einen Chelatkomplex mit positiv geladenen Ionen, vor allem Calcium, wodurch die Gerinnung verhindert wird. In EDTA Monovetten sind Gerinnungsfaktoren enthalten. Ebenso führt EDTA zur Inhibierung von Metallproteasen durch die Bindung von Schwermetallen.

Bisherige L-hArg-Messungen aus dem Vollblut liegen nicht vor. In diesem Versuch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Vollblut und Plasma bei jedem gesunden Probanden ($p < 0,0001$, ANOVA). Für beide Varianten wurden EDTA-Röhrchen verwendet. Der Unterschied lässt sich durch den höheren Proteingehalt und den höheren Zellgehalt erklären, welcher in den Vollblutproben höher ist als in den Plasmaproben:

1. Ein intrazelluläres Vorkommen von Arginin ist bereits beschrieben worden (Escobales et al. 2000, Davids und Teerlink 2013). Ein intrazelluläres Vorkommen von L-hArg in Monozyten ist ebenfalls beschrieben worden: 2,37 $\mu\text{mol/L}$ in Monozyten und 2,01 $\mu\text{mol/L}$ L-hArg in Plasma (Davids und Teerlink 2013). Aufgrund des Pipettierens von Vollblut auf die Trockenblutkarte und anschließender Trocknung kommt es zur Hämolyse/Zytolyse und zur Freisetzung intrazellulärer Aminosäuren.
2. Proteingebundene Aminosäuren im Extrazellularraum, die mit dem Zentrifugieren aus dem Plasma sedimentiert werden und somit nur beim Nachweis aus Vollblutproben erhalten bleiben.
3. Aufgrund des höheren Proteinspektrums in den Vollblutproben ist nicht auszuschließen, dass Blutbestandteile eine Kreuzreaktivität zeigen, die von der Firma DLD Diagnostika GmbH noch nicht auf Ihre Kreuzreaktivität getestet wurden. Die Spezifität des ELISAs wurden neben L-hArg für Arginin, ADMA, SDMA und NMMA bestimmt (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014).

6.1.2 Enzyminhibitor Arginase

Die Arginase setzt L-hArg zu Lysin und Harnstoff um (Reczkowski und Ash 1994, Atzler et al. 2011, Davids et al. 2012b, Jaźwińska-Kozuba et al. 2013). L-hArg hat dabei eine viel geringere Affinität als L-Arginin, wodurch es ein kompetitiver Inhibitor auf die Arginase ist (Hrabák et al. 1994). Bei der Messung von L-Arginin zeigte die Inhibition der Arginase durch Nor-NOHA einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) (Roskam 2015). Aufgrund der geringeren Affinität zu L-hArg, ist keine

oder eine sehr geringfügiger Anstieg für L-hArg durch den Enzyminhibitor Nor-NOHA zu erwarten. Dies hat sich im Experiment bestätigt: Die Konzentration von L-hArg ohne Inhibitor betrug $2,92 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}$ und der Konzentration von $2,98 \pm 0,05 \mu\text{mol}$ mit Inhibitor unverändert.

6.1.3 Enzyminhibitor Proteaseinhibitorgemisch

Die Verwendung des Proteaseinhibitormixes (PI) auf Trockenblutkarten führt zu einer Erhöhung der gemessenen L-hArg-Konzentration. Es ist eine Steigerung auf 344% im Plasma (von $1,6 \mu\text{mol/L}$ ohne PI auf $5,6 \mu\text{mol/L}$ mit PI) und auf 154% im Vollblut (von $3,0 \mu\text{mol/L}$ ohne PI auf $3,9 \mu\text{mol/L}$ mit PI) zu beobachten. Der Effekt des Proteaseinhibitormixes ist im Plasma stärker als im Vollblut. Zudem entspricht der Effektanteil im Vollblut etwa der Hälfte des Effektes im Plasma, welches dem physiologischen Hämatokriten, Zell-Plasma-Verhältnis, entspricht und vermuten lässt, dass der Proteaseinhibitormix vorrangig mit Substraten aus dem Plasma reagiert.

Folgende Ursachen für erhöhte L-hArg-Messwerte durch den Proteaseinhibitormix werden berücksichtigt und nachstehend diskutiert:

- A. Bildung von L-hArg/Abspaltung aus PI
- B. Hemmung des Abbaus von L-hArg durch PI
- C. Spezifische Interferenzen
- D. Unspezifische Interferenzen
- E. Wechselwirkung mit anderen Produkten
- F. Geänderte Verteilung auf der Trockenblutkarte

A) Die Endopeptidase Trypsin führt zu einer Hydrolyse von Arginin- und Lysinbindungen in Peptiden. Dieser Vorgang findet in einer langsameren Geschwindigkeit auch bei L-hArg modifizierten Proteinen statt (Chowdhury et al. 2014, Witkowska et al. 2004). Weitere im Proteaseinhibitormix enthaltene Endopeptidasen sind Pepsin, Plasmin und Chymotrypsin. Bei einer weiteren Verdauung mit Exopeptidasen würden freie Aminosäuren als Produkte entstehen. Eine Hemmung sollte daher zu niedrigeren L-hArg-Werten führen.

B) L-hArg ist als Substrat für die Stickstoffsynthese bekannt. Von den bekannten Isoformen sind die eNOS an Endothelien und die nNOS an Neurone gebunden. Lediglich die iNOS in Makrophagen oder bakterielle NO-Synthase können in den Proben zu einem Abbau von L-hArg führen. Bei der Langzeitbeobachtung der L-hArg-Konzentration in Kapitel 3.4.8 ist ersichtlich, dass der Abbau von L-hArg auf den Trockenblutkarten sehr langsam voranschreitet, sodass selbst die Inhibierung eines abbauenden Enzyms keine großen Auswirkungen in den getesteten Zeiträumen zeigen würde.

C) Die Eigenpositivität des PI variiert von dessen Konzentration. Während PI kombiniert mit dialysiertem Plasma und/oder auf der Trockenblutkarte pipetiert unterhalb der Nachweisgrenze von $<0,05 \mu\text{mol/L}$ ist, zeigt er mit Wasser verdünnt und direkt im ELISA eingesetzt eine geringe Eigenpositivität von $0,16 \mu\text{mol/L}$. Dies erklärt allerdings nicht den umfangreichen Anstieg der L-hArg-Konzentration um durchschnittlich $0,9 \mu\text{mol/L}$ im Vollblut und um durchschnittlich $4 \mu\text{mol/L}$ im Plasma.

D) Des Weiteren ist eine Interferenz einer anderen Substanz zu diskutieren. Von der Firma DLD Diagnostika GmbH ist bereits eine Interferenz von Arginin, ADMA, SDMA und NMMA im ELISA ausgeschlossen worden. Dagegen könnte eine zu L-hArg isobare Aminosäure (ϵ)-Trimethyllysin im ELISA zu höheren Messwerten von L-hArg führen (Lehman et al. 1987, Cordts et al. 2015)

E) Je nach Zusammensetzung der Blutprobe und deren Viskosität kommt es zu einer unterschiedlichen Verteilung bei demselben pipettierten Volumen. Während beim Plasma $25 \mu\text{L}$ bereits zu einer vollständigen Benetzung der vorgedruckten Fläche auf der Trockenblutkarte führte, waren beim Vollblut dafür $50 \mu\text{L}$ notwendig.

Der Proteaseinhibitormix bewirkt eine höhere Messung von L-hArg, die sich vorrangig durch Interaktion im Plasma ergibt. In einem ähnlichen Versuchsaufbau bei der Arginin gemessen wurde, wurde die höhere Argininkonzentration bei PI durch Fluoridbestandteile erklärt, welche die Arginase hemmen (Roskam 2015). Da die Arginase zu keiner signifikanten Veränderung der L-hArg-Konzentration führt, kann die höhere L-hArg-Konzentration nicht durch die Blockade der Arginase erklärt werden.

6.2 Methodenvalidierung

Die Methodenvalidierung des ELISAs erfolgte bereits durch die Firma DLD Diagnostika GmbH. Die Sensitivität, Spezifität, Wiederfindungsrate, Linearität, Reproduzierbarkeit und Methodenvergleich sind der Anleitung zu entnehmen. Im Folgenden werden die Messpräzision und die Robustheit der Methode durch Verwendung von Trockenblutkarten ergänzt.

6.2.1 Messpräzision

Die Messpräzision, d.h. die sechsmalige Messung der Standards und Kontrollen derselben Probe, erzeugt beim verwendeten Tecan bereits einen Variationskoeffizienten von $9,8\%$ im Mittel. Für die HPLC und GC liegen die Vorgaben der Messpräzision bei unter einem 1% (Kromidas 2016). Die Streuung allein durch die Absorptionsmessung ist bei allen Ergebnissen daher zu berücksichtigen.

6.2.2 Intraassay

Die Präzision einer Methode ist gekennzeichnet durch den Variationskoeffizienten. Die hier entwickelte Methode zur Messung von Vollblutproben aus Trockenblutkarten zeigte einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 15,6% für den Intraassay. Dabei streute der Variationskoeffizient bei 9 Probanden von 6,71% bis 24,0%. Laut Herstellerangaben des ELISA Kits betrage die Spannweite der Variationskoeffizienten 3,3–6,1% für L-hArg-Konzentration von 0,83–2,23 $\mu\text{mol/L}$ im EDTA-Plasma gemessene (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014; EAGLE Biosciences 2016).

Ein höherer, als von Herstellerseite angegebener Variationskoeffizient, entspricht den Erwartungen, da die Methode einen weiteren Verfahrensschritt enthält. Ebenso zeigte sich bei mehrmaliger Messung derselben Mikrotiterplatte unmittelbar hintereinander, dass bereits durch die Absorptionsmessung eine Schwankung von bis zu 10% derselben Proben und Kontrollen entstanden ist und somit bereits eine höhere Messpräzision eine höhere Methodenpräzision bedingt.

Die Akzeptanzkriterien für die Präzision hängen von den Anforderungen und Messmethoden ab. Die Leitlinie für die Industrie des U.S. Departments for Health and Human Services, Food and Drug Administration 2013 schreibt für einen Ligandenbindungsassay einen Grenzwert von 20% bzw. 25% für die niedrigste Konzentration vor (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 2013).

Für die Messung von L-hArg aus Trockenblutkarten ist mit einem Variationskoeffizienten von 15,6% demnach geeignet. Dennoch sollte für eine exaktere Messungen von L-hArg andere Methoden bevorzugt werden: Mittels HPLC sind Variationskoeffizienten von 1,2 % (Jones et al. 2010), 1,4% (Valtonen et al. 2005) und 1,8% (Blackwell et al. 2007) zu erwarten. Weitere Methoden sind die Messungen mit LC-MS/MS mit 4,5% (2,9%-11,9%) (Atzler et al. 2011) bzw. 1,88% (Davids et al. 2012a) oder mit der GC-MS mit Variationskoeffizienten von 4,0 (2,19 – 5,84%) (Kayacelebi et al. 2014b). Dabei sollte die Wahl der Messmethode der Fragestellung angepasst werden. Während für wissenschaftliche Forschungszwecke Methoden gewählt werden sollten, die eine hohe Präzision aufweisen, ist die Messung der L- L-hArg-Konzentration mit Methoden mit geringerer Präzision ausreichend, um Patienten mit oder ohne Risiko für eine erhöhte Mortalität und Morbidität bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu detektieren.

6.2.3 Interassay

Die Methode zeigt auch innerhalb verschiedener Testansätze bei einem durchschnittlichen Variationkoeffizienten von 17% eine ausreichende Präzision (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration

2013). Herstellerangaben zur Interassay Präzision existieren nicht. Wie auch in anderen Methodenvvalidierungen bereits veröffentlicht, ist der Variationskoeffizient im Interassay höher als im Intraassay und entspricht somit den Erwartungen. Wie auch beim Intraassay existieren exaktere Methoden zur Homoargininquantifizierung – die HPLC welche Interassayvariationskoeffizienten von 4,6 % (Jones et al. 2010), 2,9% (Valtonen et al. 2005) und 3,3% (Blackwell et al. 2007) aufweisen kann. Für die Messung mittels LC-MS/MS sind Variationskoeffizienten im Interassay von 7,5% (5,5 – 9,5%) zu erwarten (Atzler et al. 2011) und mittels GC-MS von 4,0% (0,54 – 7,6%) mit dem DSQ zu erwarten (Kayacelebi et al. 2014b).

6.2.4 Intraindividuell

Bei Beobachtung von drei Probanden im Zeitverlauf von einer Woche zeigten sich deutlich höhere Schwankungen, als durch die Messmethode allein erklärbar war. Die Variationskoeffizienten waren bei einer fünftägigen kapillaren Messung 11%, 41,8% und 18,4% für dieselben Probanden deren Intraindividuelle Variationen aus venösem Blut 6,7%, 8,6% und 3,4% betragen.

Zu diesem Ergebnis kam auch bereits die AG von Blackwell et al., welche 12 gesunde Probanden über einen Zeitraum von 20 Wochen einmal wöchentlich testeten und eine Spannweite der Variationkoeffizienten von 19,1% bis 45,7% ermittelten (Blackwell et al. 2007). Das Plasma sei zwischenzeitlich tiefgefroren worden (Blackwell et al. 2007). Ein Abbau von L-hArg wurde dadurch vermieden. Um eine Interassayvariation zu minimieren, seien die gesamten Proben in zwei Testansätzen mittels HPLC gemessen (Blackwell et al. 2007). Der Variationskoeffizient im Intraassay über 20 Wochen sei 14,4%, im Vergleich dazu der Intraassay einer einmaligen Blutprobe sei 1,8% gewesen (Blackwell et al. 2007). Diese Steigerung der Variationskoeffizienten sei auch im Interassay zu beobachten: von 3,3% auf 37,8% (Blackwell et al. 2007).

Obwohl L-hArg eine nicht essentielle Aminosäure ist und somit vom Körper selbst hergestellt werden kann, scheint es, dass der L-hArg-Wert durch den Lebensstil beeinflussbar sei. Dass die Ernährung mitunter eine Bedeutung hat, lassen bereits die Studienergebnisse von Stockebrand und Atzler vermuten. Die orale Supplementation von 14 mg/mL und 28 mg/mL täglich führt bei Mäusen zu einer Erhöhung der L-hArg-Konzentration auf $328 \pm 40\%$ und $628 \pm 60\%$ (Stockebrand et al. 2015). Auch beim Menschen führte die einmalige Supplementation von 125 mg L-hArg zu einer Steigerung von durchschnittlich $2,87 \mu\text{mol/L}$ auf $8,74 \mu\text{mol/L}$ und nach einer 4-wöchigen Gabe sogar auf durchschnittlich $17,3 \mu\text{mol/L}$ (Atzler et al. 2016d). Auch die Infusion von Arginin führt zu einer Erhöhung der L-hArg-Konzentration (Kayacelebi et al. 2015). Ob die Zufuhr von bestimmten Substanzen die Homoargininkonzentration verringern kann, ist bisher nicht bekannt.

Die Beeinflussung durch körperliche Bewegung ist bisher noch nicht untersucht. Jedoch zeigt sich, dass die Ergebnisse des 6-Minuten-Gehstrecken-Testes positiv mit L-hArg korrelieren ($r=0,31$; $p<0,05$) (Atzler et al. 2016c).

6.2.1 Stabilität von L-Homoarginin

Midttun et al ermittelten in einem Experiment bereits die Stabilität von L-hArg in einem Zeitraum von 24 und 48 Stunden in EDTA-Röhrchen. Dabei wurde die Messergebnisse mit dem Ausgangswert korreliert. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden ist der Korrelationskoeffizient $>0,8$ und der Analyt, L-hArg, als stabil beurteilt worden (Midttun et al. 2014). Neben L-hArg, zeigten sich auch Trimethyllysin und Kreatinin als stabil, im Gegensatz zu ADMA oder Arginin (Midttun et al. 2014).

Ebenso liegen Daten vor, die die Stabilität von Arginin über einen längeren Zeitraum darstellen. Durch den Zusatz eines Arginase-Inhibitors auf eine Trockenblutkarte kann die Stabilität von Arginin verbessert werden (Roskam 2015). Während Arginin dabei im Zeitraum von 1 Monat, 3 Monaten und 9 Monaten (+8%, -11%, -31%) einen kurzen Anstieg der Konzentration zeigt, stellt sich bei L-hArg eine kontinuierliche Reduktion der Konzentration dar (-16%, -40%, -44%) (Roskam 2015). Auch das ADMA zeigt bei längerer Lagerungsdauer einen kurzzeitigen Anstieg (+7%, +13%, -11%) (Roskam 2015).

Mit Hilfe derselben Analyseverfahren zeigen sich in den Ergebnissen dieser Arbeit vereinzelt hohe Korrelationen, sowohl mit dem Ausgangswert, als auch mit der vorherigen Messung. Nicht immer konnte die Korrelation $> 0,8$ als signifikant erfasst werden. Dies ist einerseits der geringen Stichprobenmenge von $n=3$ zu schulden, andererseits der Streuung der Ergebnisse.

Allen Probanden dieser Studie gemeinsam ist, dass eine negative signifikante Korrelation über den gesamten Zeitraum besteht. Ein langsamer Abbau ist daher anzunehmen. Nach einem Monat kommt es durchschnittlich zu einer Reduktion auf 60% der L-hArg-Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert.

Für den praktischen Einsatz bedeutet dies, dass ein niedrig gemessener Wert von L-hArg einer Wiederholungsmessung mit einer frischen Probe bedarf, um das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses auszuschließen. Bei Probanden mit ausreichender L-hArg-Konzentration, bedarf es keiner weiteren Analyse und es können teure und aufwendige Nachweismethoden umgangen werden.

6.2.2 Stabilität der Methode

Die Messung von Analyten aus Trockenblutkarten ist im Neugeborenenenscreening für Stoffwechselerkrankungen bereits etabliert. Bei der Präparation der Trockenblutkarten soll gemäß der Leitlinie folgendes vermieden werden

- Künstliche Wärmequellen
- Aufliegen der Karten beim Trocknungsvorgang
- Wärme
- Feuchtigkeit
- Desinfektionsmittel
- Cremes
- Direkte Sonneneinstrahlung (Nennstiel-Ratzel et al. 2011)

Ähnlich zeigt es sich bei der Messung von L-hArg aus Trockenblutkarten. Starke Temperaturschwankungen, sowohl 35°C als auch Minusgrade und Feuchtigkeit führen zu falsch niedrigen Messdaten. So führt fünfmaliges einfrieren und Auftauen zu einer Konzentrationsänderung um -27% (1,0 µmol/L) und eine Lagerung bei 35°C feuchtem Milieu um -26% (0,6 µmol/L). Obwohl es sich bei L-hArg um ein Argininderivat handelt, zeigt sich bei Arginin im ähnlichen Versuchsaufbau kein signifikanter Unterschied unter dem Einfluss von Luftfeuchtigkeit und Minusgraden (Roskam 2015).

Keine Limitationen der Methode sind bei der Verwendung hämolytischer Proben, verschiedener Blutvolumina, Tageslicht der Anzahl verwendeter Spots (2 oder 3) und der Blutgewinnungsart (venös und kapillar) vorhanden.

6.3 Methoden Anwendung

6.3.1 Referenzwerte gesunder Probanden

Bei der Methodvalidierung wurde das venöse Blut von 14 gesunden Probanden, gemessen. Die Messergebnisse jener Proben, welche innerhalb von einer Woche gemessen wurden sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 46: L-Homoarginin (L-hArg)-Werte gesunder Probanden dieser Studie

	Gesamt	Männer	Frauen
Mittelwert	3,81 µmol/L	3,88 µmol/L	3,74 µmol/L
Standardabweichung	±1,66 µmol/L	±1,72 µmol/L	±1,60 µmol/L
Spannweite	1,24–9,96 µmol/L	1,24–9,72 µmol/L	1,29–9,96 µmol/L
n	14	8	6

Die mit dem Trockenblutkartenassay ermittelten L-hArg-Werte sind damit deutlich höher, als die publizierten Referenzmedianwerte im Plasma (1,88 $\mu\text{mol/L}$) und Serum 2,63 $\mu\text{mol/L}$, Atzler et al. 2016, Atzler et al. 2014b). Einen Überblick über die Messwerte gesunder Probanden ist in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 51: L-Homoarginin (L-hArg)-Werte gesunder Probanden diverser Studien

Messwert L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Methode (Probe)	n (Alter)	Quelle
MW: 2,0 SD: $\pm 0,7$	ELISA (Serum, Plasma)	252 ¹ (-)	(DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014) ¹ (Cordts et al. 2015)
Median: 1,99 (0,30 ^{2,5%} –3,68 ^{97,5%})	HPLC (Plasma)	100 (23-65 Jahre)	(Blackwell et al. 2007)
MW: 2,15 SD: $\pm 0,75$	HPLC (Plasma)	30 (16–81 Jahre)	(Jones et al. 2010)
MW: 2,3 SD: $\pm 0,74$	HPLC-ESI-MS (Plasma)	12 (-)	(Servillo et al. 2013)
MW: 0,98 SD: $\pm 0,35$	UPLC-QToF-MS (Plasma)	125 (60-85)	(van Dyk et al. 2015)
Median: 1,88 (1,47 ^{25%} –2,41 ^{75%})	LC-MS/MS (Plasma)	786 (50,4 \pm 10,5)	(Atzler et al. 2016b)
Median: 2,63 (2,08 ^{25%} –3,32 ^{75%})	LC-MS/MS (Serum)	1359 (36; 28 ^{25%} –47 ^{75%})	(Atzler et al. 2014b)
MW: 2,5 SD: $\pm 1,0$	LC-MS/MS (Plasma)	136 (48,5 \pm 11,0)	(Atzler et al. 2011)
Median: 1,41 (1,14 ^{25%} –1,82 ^{75%})	LC-MS/MS (Plasma)	40 (3,4–17,9) ²	(Jaźwińska-Kozuba et al. 2013) ² (Jaźwińska-Kozuba et al. 2012)
MW: 2,01 SD: $\pm 0,65$	LC-MS/MS (Heparinplasma)	27 (-)	(Davids et al. 2012a)
Median: 1,93	LC-MS/MS (Plasma)	171 (21–68)	(Midttun et al. 2013)
MW: 0,99 SD: $\pm 0,56$	UPLC-MS/MS (Plasma)	20 (42,5 \pm 5,0)	(Di Gangi et al. 2010)

Tabelle 51: L-Homoarginin (L-hArg)-Werte gesunder Probanden diverser Studien Fortsetzung

Referenzwert L-hArg in $\mu\text{mol/L}$	Methode (Probe)	n (Alter)	Quelle
MW: 0,99 SD: $\pm 0,56$	UPLC-MS/MS (Plasma)	20 (42,5 \pm 5,0)	(Di Gangi et al. 2010)
MW: 1,87 SD: $\pm 0,67$	GC-MS (EDTA-Plasma)	10 (-)	(Kayacelebi et al. 2014b)
Median: 2,49 (1,11 ^{2,5%} -4,68 ^{97,5%})	HPLC (Plasma)	39 (69,6 \pm 3,3)	(Meinitzer et al. 2007)
Median: 2,48 (1,42 ^{2,5%} -4,62 ^{97,5%})	HPLC (Plasma)	78 (26 \pm 4,0)	(Meinitzer et al. 2007)
Median: 2,37 (2,37 ^{2,5%} -4,69 ^{97,5%})	HPLC (Plasma)	82 (57,5 \pm 4,2)	(Meinitzer et al. 2007)
Median: 2,58 (1,38 ^{2,5%} -5,29 ^{97,5%})	HPLC (Plasma)	93 (41,6 \pm 4,0)	(Meinitzer et al. 2007)

Die Abweichung von den Referenzen könnte in der Verwendung von Vollblut begründet sein. Während andere Forschungsgruppen Plasma und Serum verwendeten. Das Verhältnis von L-hArg-Messungen im Vollblut zu Plasma entspricht nach Kapitel 3.2.1 bei Plasma 100%: einer L-hArg-Konzentration im Vollblut von durchschnittlich 195%. Bei durchschnittlichen Messwerten von 2,0 $\mu\text{mol/L}$ aus der Literatur für Serum und Plasma, entspräche dies 3,9 $\mu\text{mol/L}$ für Vollblut.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass es sich mit 14 Probanden um eine zu geringe Stichprobenzahl handelt um einen gültigen Referenzwert zu erzeugen. Da alle Probanden Zugehörige des Instituts der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie waren, ist keine große Heterogenität der Probanden zu erwarten.

Ebenso ist nicht auszuschließen, dass weitere Substanzen zu höheren Messwerten führen. Dieser Effekt ist in der Literatur bereits beschrieben worden für das isobare (ϵ)-Trimethyllysin (Cordts et al. 2015). Bei der Messung von (ϵ)-Trimethyllysin aus Serum zeigten Terada et al., dass L-hArg mit methylierten Proben interagiert (Terada et al. 1999). Dies wird unterbunden durch eine Propylierung und Acylierung der Proben (Terada et al. 1999). Der kommerzielle ELISA Kit von DLD Diagnostika GmbH beginnt mit einem Acylierungsschritt, sodass die Interaktion von L-hArg mit methylierten Proben lediglich im Probenröhrchen und oder im trockenen Zustand auf der Trockenblutkarte vorhanden sein kann.

Aminosäuren kommen im menschlichen Blut sowohl frei, als auch an an Proteine gebunden vor. Auch diese Möglichkeit ist für L-hArg zu erwähnen und als mögliche Begründung für die höheren Referenzwerte im Vollblut denkbar.

Die Messwerte im Trockenblutassay der chilenischen Kohorte zu Studienbeginn mit einem Mittelwert und einer Standardabweichung von $1,24 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$ bei einem Range von $0,57\text{--}2,49 \mu\text{mol/L}$ sind aufgrund des Probenalters von 6 Jahren nicht mit den anderen Messwerten der 14 gesunden Probanden zu vergleichen.

6.3.2 Geschlechtsabhängige Referenzwerte

Die im Intra- und Interassay 14 getesteten Probanden zeigten für beide Assays keinen Unterschied in zwischen den Geschlechtern in der L-hArg-Konzentration: Im Intraassay ($p=0,882$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) und im Interassay ($p=0,831$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test), obwohl die Zusammensetzung der Probanden variierte. Bei den Männern nahm lediglich Proband III an beiden Assays teil, während es bei den Frauen nur Probandin IV und V waren, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 52: Geschlechtsabhängige L-Homoarginin (L-hArg)-Werte

	Intraassay		Interassay	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Probanden	II, III, VII, VIII, X	I, IV, V, VI	III, X, XII, XIII	IV, V, IX, XI
Mittelwert	4,79 $\mu\text{mol/L}$	4,80 $\mu\text{mol/L}$	2,61 $\mu\text{mol/L}$	2,60 $\mu\text{mol/L}$
Standardabweichung	1,47 $\mu\text{mol/L}$	1,33 $\mu\text{mol/L}$	0,60 $\mu\text{mol/L}$	0,73 $\mu\text{mol/L}$
Minimum	3,04 $\mu\text{mol/L}$	2,32 $\mu\text{mol/L}$	1,67 $\mu\text{mol/L}$	1,50 $\mu\text{mol/L}$
Maximum	7,92 $\mu\text{mol/L}$	6,67 $\mu\text{mol/L}$	3,96 $\mu\text{mol/L}$	3,76 $\mu\text{mol/L}$
VK	16,3%	14,7%	16,9%	17,1%
n	5	4	4	4

In einer größer angelegten Studie von Atzler et al. mit 1359 gesunden Probanden konnte ein Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet werden ($p=0,01$) (Atzler et al. 2014b). Während Männer einen L-hArg-Median von $2,72 \mu\text{mol/L}$ im Serum aufwiesen, hatten Frauen eine mediane L-hArg-Konzentration von $2,56 \mu\text{mol/L}$ im Serum (Atzler et al. 2014b). Der durchschnittliche Unterschied zwischen Männern und Frauen aus der genannten Studie beträgt demnach $0,16 \mu\text{mol/L}$ (Atzler et al. 2014b). Für so geringfügige Unterschiede ist die Stichprobenzahl von 4 pro Geschlecht zu gering, um eine valide Aussage darüber treffen zu können.

Etwa dieselbe signifikante Differenz zwischen den Geschlechtern wurde auch in der Gutenbergstudie von Atzler et al. gezeigt mit einem L-hArg-Median von $2,01 \mu\text{mol/L}$ für Männer und $1,77 \mu\text{mol/L}$ für Frauen im Plasma (Atzler et al. 2016b). Ähnlich verhält es sich bei einer Analyse von 3514 Probanden verschiedener ethnischer Herkunft: mit Männer $2,92 \mu\text{mol/L}$ und Frauen $2,70 \mu\text{mol/L}$ (Atzler et al. 2014a).

6.3.3 Chilenische Kohorte

Die chilenische Kohorte wies L-hArg-Werte von $1,24 \pm 0,48 \mu\text{mol/L}$ zu Beginn der Studie und Werte von $0,74 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$ nach dem 6-monatigen Höhenexposition auf. Zudem fällt eine grundsätzlich niedrigere L-hArg-Konzentration auf, im Vergleich zu publizierten Plasma- oder Serum-Konzentrationen (Blackwell et al. 2007, Atzler et al. 2011, Jones et al. 2010, Davids et al. 2012a, Servillo et al. 2013, Jazwińska-Kozuba et al. 2013, DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014, Kayacelebi et al. 2014b, EAGLE Biosciences 2016). Aus der Dallas Heart Studie ist bekannt, dass sich die Referenzwerte ethnienabhängig signifikant unterscheiden. Es wurde zwischen Weißen, Hispanoamerikaner und Afroamerikaner unterschieden (Atzler et al. 2014a). Die Chilenen haben den größten Verwandtschaftsgrad zu Hispoamerikaner, weshalb eine L-hArg-Konzentration von durchschnittlich $3,1 \mu\text{mol/L}$ zu erwarten gewesen wäre. Vorrangig ursächlich für die unerwartet niedrigen mit dem Trockenblutkartenassay gemessenen Werte erscheint das Alter des Probenmaterials. Unter Berücksichtigung der Reduktion von Homoarginin um -44% in 9 Monaten, erscheinen die Messwerte als plausibel. Weitere mögliche Einflüsse könnten die unvollständige Benetzung der Trockenblutkarten und die Temperaturschwankungen während des Transportes haben. Beeinflussung durch Feuchtigkeit ist durch Kontrolle des Lagerungszustandes nicht anzunehmen. Obwohl die L-hArg-Konzentration der chilenischen Rekruten das Niveau der pathologischen Probanden diverser Studien (rund $1 \mu\text{mol/L}$) aufweisen, ist aufgrund der Befähigung zum Dienst und der medizinischen Eingangsuntersuchung ein pathologischer Prozess als Ursache unwahrscheinlich (Marescau et al. 1997, Pilz et al. 2011a, Choe et al. 2013, Tomaschitz et al. 2014, Kayacelebi et al. 2014c).

Bisher ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer niedrigen L-hArg-Konzentration einhergehen (Marescau et al. 1997, Pilz et al. 2011a, Choe et al. 2013, Tomaschitz et al. 2014; Kayacelebi et al. 2014c). Auch der 6-monatige Aufenthalt in 4000 m Höhe nicht akklimatisierter Probanden zeigte eine signifikante Erniedrigung der L-hArg-Konzentration

Pathophysiologische kommt es zu einem hypoxischen Zustand: -25% Sauerstoff ($15\% \text{O}_2$; $p\text{O}_2$ 115 mmHg) auf 2500 m Höhe bzw. -50% Sauerstoff ($10\% \text{O}_2$, 75 mmHg) auf 5800 m Höhe (Küpper 2017, West n.d).

„Die berüchtigten lebensbedrohlichen Höhenkrankheiten (Höhenlungen- und Höhenhirnödem) [...] treten erst nach 12–24 (Lunge) oder 24–96 Stunden (Hirn) ununterbrochener Exposition von mehr als 4000 m bzw. weniger als etwa 12,8 % Sauerstoff auf, wenn die Person nicht höhenakklimatisiert ist“ (Küpper 2017)

Diese hämodynamischen körperlichen Reaktionen des Lungenödems mit hypoxischer Vasokonstriktion kleiner Gefäße, die zu einem erhöhten Druck führen und Schäden an den Kapillarwänden verursachen ähneln einer pulmonalarteriellen Hypertonie und sind mit einer Verminderung der Homoargininkonzentration assoziiert (Atzler et al. 2016c, West, n.d.). L-hArg kann dosisabhängig, den vasokonstriktischen Effekt von L-NMMA durch einen Antagonismus umkehren (Thomas und Ramwell 1991). Neben den körperlichen molekularbiologischen Reaktionen spielt ebenso die Ernährung der Studienteilnehmer eine Rolle, da sich die L-hArg-Konzentration durch eine Supplementation von Lysin, Arginin oder L-hArg steigern lässt (Ryan und Wells 1964, Davids et al. 2012b, Atzler et al. 2013, Stockebrand et al. 2015, Kayacelebi et al. 2015, Atzler et al. 2016d).

6.3.4 Korrelationsanalyse mit anderen Parametern

Von den in der Literatur beschriebenen Korrelationen mit anthropometrischen Daten wie Alter und Geschlecht konnten in dieser Studie aufgrund der homogenen Gruppe junger Männer im Alter von 17-19 Jahren nicht bestätigt werden (Atzler et al. 2014b, Tomaschitz et al. 2014). Tomaschitz et al. berichteten bereits von einer schwachen Korrelation mit dem BMI (0,21, $p < 0,001$, Regressionsanalyse) (Tomaschitz et al. 2014). Ebenso wurde ein schwacher Zusammenhang von L-hArg mit dem BMI in der Dallas Heart Studie beschrieben ($p < 0,05$ für Hispoamerikaner) (Atzler et al. 2014a). Dieser Zusammenhang stellte sich in der Kohorte der chilenischen Probanden als höhergradiger heraus (Pearson $r = 0,447$, $p = 0,005$). Es ist anzunehmen, dass die gleichartige Ernährung der Rekruten und die gleichartige Lebensweise Confounder auszuschließen vermögen.

Ebenfalls bestätigt lässt sich, dass kein Zusammenhang des L-hArg-Wertes mit dem Rauchverhalten beobachtet werden kann (Tomaschitz et al. 2014).

Zusammenhänge mit dem Gewicht sind bisher nicht als ausreichend beschrieben worden, wie u.a. in der Dallas Heart Studie (Pearson $r = 0,183$, $p < 0,01$). Während May et al. die L-hArg-Konzentration bei 18 Probanden ohne kardiovaskuläre Erkrankungen, davon 4 mit schwerer Adipositas vor und nach einer bariatrischen OP, untersuchten und ebenfalls keinen Zusammenhang bestätigen konnten (May et al. 2015). Dieser Zusammenhang ist jedoch bei der Kohorte der chilenischen Studienteilnehmer ausgeprägt (Pearson $r = 0,361$, $p = 0,023$). Dies lässt vermuten, dass die L-hArg-Konzentration und das Gewicht indirekt zusammenhängen können. Eine Erklärung für vereinzelt beobachtete Zusammenhänge mit dem Gewicht, könnte metabolisch begründet sein.

In den Vorversuchen zeigte sich in Kapitel 5.2.1, dass die L-hArg-Konzentration, gemessen aus den Trockenblutkarten etwa der doppelten Konzentration der Plasmaprobe entspricht (relative L-hArg-Konzentration im Vollblut 195% im Vergleich zum Plasma). Dieses Ergebnis konnte in den Proben der chilenischen Kohorte reproduziert werden. Bei Beginn der Studie zeigte sich eine relative L-hArg-

Konzentration von Vollblut gegenüber Plasma von 204%. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse bestätigt wurde, obgleich

- die Probanden nicht vergleichbar waren
- die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab Entnahme gemessen wurden
- die Proben mehrjährigen Lagerungseinflüssen unterlagen

Dies spricht dafür, dass sich der Unterschied zwischen Vollblut und Plasmakonzentrationen unabhängig weiterer Einflussfaktoren übertragen lässt. Dass ein vergleichbarer Zusammenhang besteht, bestätigt auch die Korrelationsanalyse aller Datenpaare nach Pearson (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,543, $p < 0,001$). Bei Vergleich aller Datenpaare, welche keiner verstärkten Qualitätsveränderung der Trockenblutkarten unterliegt, zeigt sich eine noch stärkere Korrelation (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,781, $p < 0,001$).

Davon abweichend ist das Verhältnis nach 6-monatiger Höhenbelastung. Hier zeigt sich bereits eine relative L-hArg-Konzentration von Vollblut zum Plasma von 260%. Bei zusätzlich fehlender Korrelation nach 6-monatiger Exposition sind folgende Ursachen zu diskutieren:

- a) geringe Stichprobenzahl
Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl können Ausreißer oder Verwechslungen bei der Blutentnahme einen höheren Effekt auf das statistische Ergebnis haben.
- b) Selektion der Probanden durch Studienausschluss
Von der Studie wurden jene Rekruten ausgeschlossen, welche die Belastung keine 6 Monate durchgehalten hatten. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Probanden bereits nach ihren biochemischen Adaptationsmerkmalen selektiert zu haben.
- c) Veränderte Bindungskurve von Proteinen bei Höhenbelastung
Bei höherer Belastung zeigt sich aufgrund der veränderten Sauerstoffbindungskurve eine geringere Affinität von Sauerstoff an Hämoglobin. Dies ist auch bei den chilenischen Probanden mit einer Sauerstoffsättigung von 98% auf Meereshöhe und 90% nach 6-monatiger Exposition in 4000m Höhe zu erkennen. Ein verändertes Bindungsverhalten an Proteine oder Interferenzen von L-hArg ist daher ebenfalls anzunehmen.
- d) Verstärkte Interferenzen und Interaktionen durch Polyglobulie
Der Hämatokrit, das Zell-Plasma-Verhältnis verschiebt sich bei Höhenbelastung von 45,0% auf 48,9 %, während die L-hArg-Konzentration von $1,24\mu\text{mol/L}$ auf $0,74\mu\text{mol/L}$ sinkt. Dass der Hämatokrit, das Verhältnis zwischen Plasma und Blutzellen, einen Einfluss auf die gemessene L-hArg-Konzentration haben könnte, lässt die Korrelationsanalyse aller Datenpaare erahnen (Pearson-Korrelation $r = -0,320$, $p = 0,006$, $n = 73$). Bei weiterer Untergruppierung der Datenpaare ist jedoch weder eine Signifikanz noch ein Zusammenhang erkennbar.

Im Zusammenhang aller diskutierten Einflussfaktoren scheint daher nicht nur die veränderte Zusammensetzung des Plasma-Zellgemisches des Blutes, sondern wesentlich auch die veränderte Bindungsfähigkeit und daraus resultierende Verstoffwechslung von Substraten für eine Veränderung des L-hArg-Verhältnisses zwischen Plasma und Vollblut und letztendlich auch der L-hArg-Konzentration verantwortlich zu sein.

6.3.5 L-Homoargininstabilität in der chilenischen Kohorte

Die Stabilität von L-hArg ist bereits in der Methodvalidierung gemäß Kapitel 5.4.6 beobachtet worden. Dabei erfolgte die Mehrfachmessung von 5 Probanden über einen Zeitraum von bis zu 9 Monaten nach Entnahme. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion in den ersten Monaten von L-hArg im Mittel um -40% zum Ausgangswert nach 6-monatiger Lagerung. Nach 9-monatiger Lagerung wurde eine Reduktion von -44% zum Ausgangswert beobachtet. Die 6-monatige relative Reduktion vom Entnahmezeitpunkt bis zum 6. Monat betrug -40%, während die 3-monatige relative Reduktion vom 6. Monat zum 9. Monat -6% betrug.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass sich die nachweisbaren Konzentrationen von L-hArg aus Trockenblutkarten in den ersten Wochen und Monaten stärker unterscheiden.

Im Gegensatz zu den Eigenversuchen waren die Trockenblutkarten der chilenischen Studie zum Messzeitpunkt bereits mehrere Jahre alt. Abgesehen davon zeigte sich nach Höhenexposition eine verminderten L-hArg-Konzentration f -18,6%. Diese Beobachtung entspricht der Annahme, dass die relative Reduktion von L-hArg zum Vorwert besonders in den erste Monaten höhergradig ist.

Die Plasmaproben der Probanden waren im Vergleich dazu bei -20°C tiefgefroren über die Jahre. Hier zeigte sich eine Reduktion von L-hArg von -58,7% über den Zeitraum von 6 Monaten. Unter der Annahme, dass Abbauprozesse durch Tiefrieren aufgehalten werden, entspräche dies einer Messung in den ersten Monaten, wodurch die hohe Reduktion von L-hArg zu erwarten war.

7 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf Erkrankungen sind noch immer die häufigste Todesursache (RKI, n.d., Statistisches Bundesamt 2015). Bei diesen Erkrankungen hat die Dysbalance von NO und dem oxidativen Stress eine große Bedeutung auf der zellulären Ebene (Fleissner und Thum 2011). Diese Prozesse werden durch Argininderivate beeinflusst, dabei erweist sich eine geringe Konzentration von L-hArg als Prädiktor für die Mortalität (März et al. 2010, Pilz et al. 2011a, Drechsler et al. 2011, Atzler et al. 2013, Ravani et al. 2013, Atzler et al. 2014a, Tsikas und Wu 2015). Die Messung von L-hArg erfolgt bisher mittels diverser chromatografischer Verfahren und ELISA. Ziel der Arbeit ist die Etablierung einer kostengünstigen, stabilen Analyse von L-hArg aus Trockenblutkarten und anschließendem ELISA.

Der kommerzielle ELISA der Firma DLD Diagnostika wurde durch eine selbsthergestellte Elutionslösung ergänzt. Die Robustheit dieser erweiterten Methode wurde getestet in Bezug auf: hämolysierte Proben, diverse Blutmengen, Entnahmetechnik, Tageslichteinfluss, Einfrieren und Auftauen, Hitze und Feuchtigkeit und Lagerungsdauer. Im zweiten Abschnitt wurde die Methode für die L-hArg Bestimmung einer Studie angewandt, deren Probanden, chilenische Männer im Alter von 17-19 Jahren, über 6 Monate einer Höhenbelastung von 4000 m ausgesetzt wurden. Die Trockenblutkarten wurden vor Beginn und nach 6 Monaten Belastung gewonnen.

Die Qualität der Messung aus Trockenblutkarten ergab einen Variationskoeffizienten von 15,6% für den Intraassay und 17,0% für den Interassay. Bei einer Messpräzision von 9,8% ergibt sich eine Streuung durch die Methode alleine von 5-7%. Diese Methode ist stabil gegenüber Tageslicht, hämolysierter Probe, verschiedener Entnahmetechniken und Blutvolumina. Während Einfrieren und Auftauen ($p < 0,001$, $n = 5$) sicher zu einer signifikanten Veränderung des Messergebnisses führt. Dies ist auch bei Hitze und Feuchtigkeit nicht vollständig auszuschließen. Bei trockener und geschützter Lagerung ist von einer L-hArg Konzentrationsminderung von -20% nach einem Monat und -40% nach 6-9 Monaten auszugehen.

Die Qualität der Trockenblutkarten wird durch die Benetzung der Rückseite ($r = -0,439$; $p < 0,001$) und die Benetzungsfläche ($r = -0,280$; $p = 0,022$) beeinflusst. Die Belastung durch 4000 m Höhe zeigte auch nach Ausschluss von Trockenblutkarten mit geringer Qualität ein Absinken der L-hArg Konzentration von $1,10 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$ auf $0,78 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$ ($p = 0,003$; $n = 19$) bei einem Probenalter von 5 Jahren. In der Gruppe der gesunden Probanden zeigten sich Korrelationen mit metabolischen Laborwerten: zweizeitig bei Erythrozyten, VLDL und Triglyceriden, einzeitig mit Blutzucker, Gewicht, BMI und Puls direkt nach Höhengaufstieg. Die kardiovaskuläre Belastung in Form einer Höhenkrankheit führt auch bei jungen gesunden Probanden bereits zu einer Senkung der L-hArg-Konzentration.

Entsprechend der Leitlinie für die Industrie ist ein VK <20% bzw. <25% für die geringste Konzentration anzustreben (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 2013). Die Erweiterung der Methode erfüllt die Anforderungen der Präzision und kann unter Vermeidung präanalytischer Fehlerquellen wie starke Temperaturschwankungen, Feuchtigkeit und Probenalter angewendet werden.

Conclusion

Cardiovascular diseases are still the most leading cause for death (RKI, n.d., statistisches Bundesamt 2015). The imbalance of nitric oxide (NO) and oxidative stress play an important role on cellular level in those diseases (Fleissner and Thum 2011). This imbalance is influenced by derivatives of arginine. One of those derivatives is L-homoarginine (L-hArg). A low level of L-hArg is associated with a higher mortality (März et al. 2010, Pilz et al. 2011a, Drechsler et al. 2011, Atzler et al. 2013, Ravani et al. 2013, Atzler et al. 2014a, Tsikas and Wu 2015). L-hArg can be measured by chromatographic methods and enzyme-linked immunoassays (ELISA). The aim of this thesis was to implement a resilient and cheap method for measuring the concentration of L-hArg out of dry blood spot cards combined with ELISA.

The commercial ELISA from the company DLD Diagnostika GmbH was completed with an elution solution. This solution extracts the L-hArg out of the dry blood spot cards. The process robustness of haemolysed samples, different volumes, technique of blood sampling, influence of daylight, influence of freezing and thawing, influence of heat and high humidity and stability were validated. In the second part the new method was applied for L-hArg evaluation in a Chilean cohort. In this study young, healthy, male participant at the age of 17-19 from Chile who stayed at the altitude of 4000m for 6 months. The dry blood spots were collected at the beginning and after 6 months of living at the height.

The validity of the method shows a variation coefficient of 15.6% for the intraassay and 17.0% for the interassay, while the measurement accuracy is 9.8%. That means a variance of 5-7% just by the method. The method is robust against daylight, haemolysed samples, different techniques of blood sampling and different blood volumes ($n=5$; $p<0.05$), while freezing and thawing damage this method as well as heat with high humidity. The concentration of L-hArg of dry blood spot cards stored dry and dark shows a decrease of -20% after one month and about -40% after 6-9 months on average.

The quality of measuring the concentration of L-hArg out of a dry blood spot card is influenced by the wetting of the backside ($r=-0,439$; $p<0,001$) and by the size of the wetting area ($r=-0,28$; $p=0,022$). Although the clinical samples are more than 5 years old and bad quality samples were excluded, a difference in concentration of L-hArg before ($1,10\pm 0,42 \mu\text{mol/L}$) and after ($0,78\pm 0,26 \mu\text{mol/L}$) living 6 months in 4000 m was significant ($p=0,003$; $n=19$).

L-hArg associates with erythrocytes, very low-density lipoproteins (VLDL) and triglycerides in two times and only in one time with blood sugar, weight, bmi and pulse after the arrival at height.

According to the Guidance for industry the variation coefficient $<20\%$ or $<25\%$ for the lowest concentration is aspired (U.S. Department of Health and Human Services

Food and Drug Administration 2013). The enlargement of this method meets the requirements for precision and can be used by avoiding extreme variations in temperature, humidity considering the age of the sample.

8 Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AG	Arbeitsgruppe
AGAT	arginine:glycine aminidotransferase
AKS	Akutes Koronar Syndrom
AP	Angina Pectoris
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatsynthase
BMI	Body Maß Index
CRP	c-reaktives Protein
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay
GAMT	Guanidinoacetatmethyltransferase
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
L-hArg	L-Homoarginin
MW	Mittelwert
NMMA	N(G)-methyl-L-arginin
NT-pro-BNP	N-terminales pro brain natriuretisches Peptid
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PAH	pulmonale arterielle Hypertension
SD	Standardabweichung
SDMA	N(G),N'(G)-dimethyl-L-arginin
TIA	transitorische ischämische Attacke
UPLC-qTOF-MS/MS	ultra-performance Flüssigkeitschromatografie quadropole time off light Massenspektrometrie
VK	Variationskoeffizient
vWF	von-Willebrand-Faktor

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturformel L-Arginin und L-Homoarginin (Martens-Lobenhoffer et al. 2009).....	8
Abbildung 2: L-Homoarginin(L-hArg)-Synthese nach Davids et al. 2012b	9
Abbildung 3: L-Homoarginin(L-hArg)-Synthese durch AGAT nach Davids et al. 2012b.....	9
Abbildung 4: Vergleich der L-Homoarginin-Synthese (L-hArg) und der Argininsynthese	10
Abbildung 5: Trockenblutkartenpräparation für die Bewertung des Einflusses des Arginase-Hemmstoffes Nor-NOHA.....	29
Abbildung 6: Auswahlverfahren für Elutionslösungen	31
Abbildung 7: Trockenblutkarten bei verschiedenen Blutvolumina	37
Abbildung 8: Versuchsaufbau für Stabilität gegenüber Tageslicht.....	37
Abbildung 9: Versuchsaufbau der klimatischen Stabilität.....	38
Abbildung 10: Benetzung auf der Rückseite: vollständig - teilweise - keine Benetzung.....	40
Abbildung 11: Spotdurchmesser: mind. 4 mm - mind. 5 mm - kleiner als 4 mm ...	40
Abbildung 12: Standardkurve der ELISA Messung	42
Abbildung 13: Vergleich Vollblut und Plasma	44
Abbildung 14: Einfluss von Arginaseinhibitor.....	45
Abbildung 15: Einfluss der Proteaseinhibitoren im ADMA Card ELISA Elutionspuffer.....	46
Abbildung 16: Einfluss der Proteaseinhibtoren im 1M TRIS-HCl pH1 Elutionspuffer	48
Abbildung 17: Elutionslösungsvergleich - Kalibration mit ADMA Card ELISA Elutionspuffer.....	53
Abbildung 18: Elutionslösungsvergleich - Kalibration mit 1 M TRIS-HCl pH 1	54
Abbildung 19: Einfluss der verwendeten Spotanzahl	56
Abbildung 20: Einfluss der Blutentnahmetechnik	57
Abbildung 21: Intraassay	58
Abbildung 22: Interassay	59
Abbildung 23: Intraindividuelle Variation über den Verlauf von 5 Tagen.....	60
Abbildung 24: Einfluss mechanischer Hämolyse.....	61
Abbildung 25: Einfluss von Einfrieren und Auftauen.....	62
Abbildung 26: Einfluss der Blutmenge.....	63
Abbildung 27: Blutmenge im Vergleich.....	63
Abbildung 28: Einfluss von Tageslicht.....	64
Abbildung 29: Einfluss des Klimas.....	65
Abbildung 30: Homoargininstabilität relativ zum Ausgangswert.....	67
Abbildung 31: Chileproben Qualitätsverteilung.....	69
Abbildung 32: Homoarginin vor und nach 6-monatiger Höhenbelastung 4000m ..	70
Abbildung 33: Homoarginin vor und nach 6-monatiger Höhenbelastung von 4000m ohne Einfluss der Trockenblutkartenqualität.....	71
Abbildung 34: Vergleich von Plasma und Vollblut im zeitlichen Verlauf nach Exposition in 4000m Höhe.....	72
Abbildung 35: Korrelationsanalyse Homoarginin-Plasma und Homoarginin-Vollblut	73

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geschlechtsspezifische Unterschiede für L-Homoarginin (L-hArg)	12
Tabelle 2: Ethnien-spezifische Unterschiede für L-hArg (Atzler et al. 2014a)	13
Tabelle 3: Variationskoeffizienten (VK) für HPLC (Blackwell et al. 2007).....	13
Tabelle 4: L-Homoargininkorrelationen mit Laborparametern	16
Tabelle 5: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels HPLC (Gellert 2017)	18
Tabelle 6: Methodenpräzision der HPLC Messung von L-Homoarginin (L-hArg) mit Variationskoeffizienten (VK) (Gellert 2017)	19
Tabelle 7: DLD Diagnostika GmbH – Variationskoeffizienten (VK) für ELISA (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)	20
Tabelle 8: Korrelation der L-Homoarginin (L-hArg) Quantifizierung von ELISA und LC-MS/MS	21
Tabelle 9: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels LC-MS/MS Methoden (Gellert 2017).....	22
Tabelle 10: Methodenpräzision von LC-MS/MS Varianten (Gellert 2017); dargestellt mit Variationskoeffizienten (VK).....	22
Tabelle 11: Quantifizierung von L-Homoarginin (L-hArg) mittels GC-MS (Gellert 2017).....	23
Tabelle 12: Methodenpräzision der GC-MS bzw. GC-MS/MS (Gellert 2017) dargestellt: Variationskoeffizient (VK).....	23
Tabelle 13: Geschlechterverteilung der Probanden	26
Tabelle 14: Übersicht der Elutionslösungen	31
Tabelle 15: Beurteilung der Hämolyse.....	33
Tabelle 16: Elutionsmittel der Phase 3	33
Tabelle 17: Versuchsaufbau Probenstabilität	39
Tabelle 18: Qualitätsbeurteilung der Chileproben	40
Tabelle 19: relative Homoargininkonzentration im Vollblut.....	43
Tabelle 20: Variationskoeffizient (VK) Vergleich Vollblut und Plasma.....	43
Tabelle 21: Einfluss von Proteaseinhibitor im ADMA Reagenz	46
Tabelle 22: Variationskoeffizient (VK) unter Einfluss des Proteaseinhibitor-gemisches (PI).....	47
Tabelle 23: Einfluss des Proteaseinhibitors im TRIS-HCl.....	47
Tabelle 24: Variationskoeffizient (VK) ohne und mit Proteaseinhibitor (PI) in TRIS- HCl.....	49
Tabelle 25: Ausschluss von Elutionslösungen mit zu geringem Homoargininnachweis	50
Tabelle 26: Nicht mit dem ELISA kompatible Elutionslösungen	50
Tabelle 27: Elutionslösungen mit ausreichender Homoarginin-Elution und Kompatibilität mit dem ELISA (Stufe 1 und 2)	51
Tabelle 28: Ausgeschlossene aufgrund zu hoher Hämoglobinextraktion.....	52
Tabelle 29: Ausgewählte Elutionsreagenzien in Stufe 3.....	52
Tabelle 30: Variationskoeffizienten (VK) der Elutionslösungen in Stufe 4 - kalibriert mit ADMA DLD Elutionslösung	54
Tabelle 31: Variationskoeffizient (VK) in Elutionslösungen in Stufe 4 - kalibriert mit TRIS-HCl	54
Tabelle 32: Kontextkriterien der Elutionslösungen Stufe 4	55
Tabelle 33: Vergleich von kapillar und venös entnommenem Blut.....	57
Tabelle 34: Ergebnisse der Messpräzision.....	58
Tabelle 35: Intraassay Variationskoeffizienten (VK)	59
Tabelle 36: Interassay Variationskoeffizienten (VK)	60

Tabelle 37: Intraindividuelle Variation der Homoargininkonzentration.....	61
Tabelle 38: Hämolyseeinfluss; dargestellt Variationskoeffizienten (VK).....	62
Tabelle 39: Messschwankungen verschiedener Blutmengen.....	63
Tabelle 40: Einfluss von Tageslicht; dargestellt Variationskoeffizient (VK)	64
Tabelle 41: Klimaeinfluss.....	65
Tabelle 42: Stabilität der L-Homoarginin(L-hArg)-Konzentration über eine 9- monatige Lagerungsdauer.....	66
Tabelle 43: relative Veränderung der L-Homoarginin(L-hArg)-Konzentration zum Ausgangswert.....	66
Tabelle 44: Korrelation LHomoarginin (L-hArg) mit Probenalter.....	67
Tabelle 45: Einfluss der Trockenblutkartenqualität in der chilenische Studie.....	68
Tabelle 46: Vergleich L-Homoarginin (L-hArg)-konzentration im Plasma und Vollblut.....	72
Tabelle 47: Korrelationsanalysen der Untergruppen	73
Tabelle 48: L-Homoarginin (L-hArg)-konzentration gesunder Erwachsener im Plasma.....	74
Tabelle 49: L-Homoarginin(L-hArg)-konzentration gesunder Erwachsener im Serum	75
Tabelle 50: L-Homoarginin (L-hArg)-Werte gesunder Probanden dieser Studie...	82
Tabelle 51: L-Homoarginin (L-hArg)-Werte gesunder Probanden diverser Studien	83
Tabelle 52: Geschlechtsabhängige L-Homoarginin (L-hArg)-Werte.....	85

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Homoargininertrages.....	34
---	----

12 Literaturverzeichnis

- Atzler D, Mieth M, Maas R, Böger RH, Schwedhelm E (2011) Stable Isotope Dilution Assay for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Determination of L-Homoarginine in Human Plasma. *JJ Chromatogr B analyt Technol Biomed Life Sci.* 879 (23):2294–98.
- Atzler D, Rosenberg M, Anderssohn M, Choe C, Lutz M, Zugck C, Böger RH, Frey N, Schwedhelm E (2013) Homoarginine--an Independent Marker of Mortality in Heart Failure. *Int J Cardiol.* 168 (5):4907–9.
- Atzler D, Gore MO, Ayers CR, Choe C, Böger RH, de Lemos JA, McGuire DK, Schwedhelm E (2014a) Homoarginine and Cardiovascular Outcome in the Population-Based Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34 (11):2501–7.
- Atzler D, Schwedhelm E, Nauck M, Ittermann T, Böger RH, Friedrich N (2014b) Serum Reference Intervals of Homoarginine, ADMA, and SDMA in the Study of Health in Pomerania. *clin chem Lab Med.* 52 (12):1835–42.
- Atzler D, Baum C, Ojeda FM, Keller T, Cordts K, Schnabel RB, Choe C (2016a) Low Homoarginine Levels in the Prognosis of Patients With Acute Chest Pain. *J Am Heart Assoc.* 5 (4):e002565.
- Atzler D, Appelbaum S, Cordts K, Ojeda FM, Wild PS, Münzel T, Blankenberg S (2016b) Reference Intervals of Plasma Homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin chem Lab Med.* 54 (7):1231–37.
- Atzler D, Cracowski JL, Cordts K, Böger RH, Humbert M, Schwedhelm E (2016c) Homoarginine Predicts Mortality in Treatment-Naive Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Cardiol.* 217 (8):12–15.
- Atzler D, Schönhoff M, Cordts K, Ortland I, Hoppe J, Hummel FC, Gerloff C (2016d) Oral Supplementation with L-Homoarginine in Young Volunteers. *Br J clin Pharmacol.* July 19.
- BD Produkte (n.d.) Venöse Blutentnahme [online im Internet] URL: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=24918> [Stand: 03.11.2017, 14:37].
- Bhardwaj R, Moore PK (1989) The Effect of Arginine and Nitric Oxide on Resistance Blood Vessels of the Perfused Rat Kidney. *Br J Pharmacol.* 97 (3):739–44.
- Blackwell S, O'Reilly DSJ, Talwar D (2007) Biological Variation of Asymmetric Dimethylarginine and Related Arginine Metabolites and Analytical Performance Goals for Their Measurement in Human Plasma. *Eur J clin Invest.* 37 (5):364–71.
- Bretscher LE, Li H, Poulos TL, Griffith OW (2003) Structural Characterization and Kinetics of Nitric-Oxide Synthase Inhibition by Novel N5-(Iminoalkyl)- and N5-(Iminoalkenyl)-Ornithines. *J Biol chem.* 278 (47):46789–97.
- Cathelineau L, Saudubray JM, Charpentier C, Polonovski C (1974) Letter: The Presence of the Homoanalogues of Substrates of the Urea Cycle in the Presence of Argininosuccinate Synthetase Deficiency. *Pediatr res.* 8 (10):857.
- Choe C, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, Simova O (2013) Homoarginine Levels Are Regulated by L-Arginine:Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome: Results from Human and Murine Studies. *Circulation.* 128 (13):1451–61.
- Chowdhury SM, Munske GR, Yang J, Zhukova D, Nguyen H, Bruce JE (2014) Solid-Phase N-Terminal Peptide Enrichment Study by Optimizing Trypsin

- Proteolysis on Homoarginine-Modified Proteins by Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 28 (6):635–44.
- Cordts K, Atzler D, Qaderi V, Sydow K, Böger RH, Choe C, Schwedhelm E (2015) Measurement of Homoarginine in Human and Mouse Plasma by LC–MS/MS and ELISA: A Comparison and a Biological Application. *Amino Acids* 47 (9):2015–22.
- Davids M, Swieringa E, Palm F, Smith DEC, Smulders YM, Scheffer PG, Blom HJ, Teerlink T (2012a) Simultaneous Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine, L-Monomethylarginine, L-Arginine, and L-Homoarginine in Biological Samples Using Stable Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J chromatogr B analyt Technol Biomed Life Sci*. 900 (7):38–47.
- Davids M, Ndika JDT, Salomons GS, Blom HJ, Teerlink T (2012b) Promiscuous Activity of Arginine:Glycine Amidinotransferase Is Responsible for the Synthesis of the Novel Cardiovascular Risk Factor Homoarginine. *FEBS Letters* 586 (20):3653–57.
- Davids M, Teerlink T (2013) Plasma Concentrations of Arginine and Asymmetric Dimethylarginine Do Not Reflect Their Intracellular Concentrations in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Metabolism*. 62 (10):1455–61.
- DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A (2003) Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-Binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharm Res*. 20 (11):1885–1900.
- Di Gangi IM, Chiandetti L, Gucciardi A, Moret V, Naturale M, Giordano G (2010) Simultaneous Quantitative Determination of N(G),N(G)-Dimethyl-L-Arginine or Asymmetric Dimethylarginine and Related Pathway's Metabolites in Biological Fluids by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal chim Acta*. 677 (2):140–48.
- Dietz TE (2000) AMS Worksheet. *High Altitude Medicine*. 05 2000 [online] URL: <http://www.high-altitude-medicine.com/AMS-worksheet.html>. [Stand: 09.10.2017, 18:14].
- DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH (2011) Arbeitsanleitung ADMA - ELISA: Enzymimmunoassay Für Die Quantitative Bestimmung von Endogenem Asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA in Serum Oder EDTA-Plasma [online im Internet] URL: <http://www.dld-diagnostika.de/docs/ADMA-D.pdf>. [Stand:06.09.2017, 16:25].
- DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH (2014) Arbeitsanleitung Homoarginin ELISA: Enzymimmunoassay Für Die Quantitative Bestimmung von Homoarginin in Plasma, Serum Und Zellkulturproben [online im Internet] URL: <http://www.dld-diagnostika.de/docs/Homoarginin-D.pdf>. [Stand: 06.09.2017, 16:20].
- Drechsler C, Meinitzer A, Pilz S, Krane V, Tomaschitz A, Ritz E, März W, Wanner C (2011) Homoarginine, Heart Failure, and Sudden Cardiac Death in Haemodialysis Patients. *Eur J heart Fail*. 13 (8):852–59.
- van Dyk M, Mangoni AA, McEvoy M, Attia JR, Sorich MJ, Rowland A (2015) Targeted Arginine Metabolomics: A Rapid, Simple UPLC-QToF-MSE Based Approach for Assessing the Involvement of Arginine Metabolism in Human Disease. *Clin Chim Acta*. 447 (7):59–65.
- EAGLE Biosciences (2016) Homoarginine ELISA Assay Kit. Catalog Number: HOM39-K01. [online im Internet] URL:

- http://www.eaglebio.com/content/HOM39-K01_Homoarginine_ELISA_Assay_Kit.pdf. [Stand: 09.11.2016, 16:54].
- Escobales N, Rivera-Correa M, Altieri PI, Rodriguez JF (2000) Relationship between NO Synthesis, Arginine Transport, and Intracellular Arginine Levels in Vascular Smooth Muscle Cells. *Amino Acids* 19 (2):451–68.
- Fleissner F, Thum T (2011) Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 15 (4):933–48.
- Gellert S (2017) Vergleich der Nachweismethoden von Homoarginin aus humanen Blutprodukten gesunder Probanden. Studienarbeit, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf: Universität Hamburg.
- Haghikia A, Kayacelebi AA, Beckmann B, Hanff E, Gold R, Haghikia A, Tsikas D (2015) Serum and Cerebrospinal Fluid Concentrations of Homoarginine, Arginine, Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine, Nitrite and Nitrate in Patients with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. *Amino Acids* 47 (9):1837–45.
- Hanff E, Kayacelebi AA, Yanchev GR, Maassen N, Haghikia A, Tsikas D (2016) Simultaneous Stable-Isotope Dilution GC-MS Measurement of Homoarginine, Guanidinoacetate and Their Common Precursor Arginine in Plasma and Their Interrelationships in Healthy and Diseased Humans. *Amino Acids* 48 (3):721–32.
- Hecker M, Walsh DT, Vane JR (1991) On the Substrate Specificity of Nitric Oxide Synthase. *FEBS Lett.* 294 (3):221–24.
- Hernández-Guzmán G, Alvarez-Morales A (2001) Isolation and Characterization of the Gene Coding for the Amidinotransferase Involved in the Biosynthesis of Phaseolotoxin in *Pseudomonas Syringae* Pv. *Phaseolicola*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI.* 14 (4):545–54.
- Hira TS, Ohyama S, Hara H (2003) L-Homoarginine Suppresses Exocrine Pancreas in Rats. *Amino Acids* 24 (4):389–96.
- Hou Y, Jia S, Nawaratna G, Hu S, Dahanayaka S, Bazer FW, Wu G (2015) Analysis of L-Homoarginine in Biological Samples by HPLC Involving Precolumn Derivatization with o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-Cysteine. *Amino Acids* 47 (9):2005–14.
- Hrabák A, Bajor T, Temesi A (1994) Comparison of Substrate and Inhibitor Specificity of Arginase and Nitric Oxide (NO) Synthase for Arginine Analogues and Related Compounds in Murine and Rat Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 198 (1):206–12.
- Hruby VJ (1982) Structure-Conformation-Activity Studies of Glucagon and Semi-Synthetic Glucagon Analogs. *Mol Cell Biochem.* 44(1):49-64.
- Jaźwińska-Kozuba A, Martens-Lobenhoffer J, Kruszelnicka O, Rycaj, Chyrchel B, Surdacki A, Bode-Böger SM (2013) Opposite Associations of Plasma Homoarginine and Ornithine with Arginine in Healthy Children and Adolescents. *Int J Mol Sci.* 14 (11):21819–32.
- Jaźwińska-Kozuba A, Martens-Lobenhoffer J, Surdacki A, Kruszelnicka O, Rycaj J, Godula-Stuglik U, Bode-Böger SM (2012) Associations between Endogenous Dimethylarginines and Renal Function in Healthy Children and Adolescents. *Int J Mol Sci.* 13 (11):15464–74.
- Johnson DG, Goebel CU, Hruby VJ, Bregman MD, Trivedi D (1982) Hyperglycemia of Diabetic Rats Decreased by a Glucagon Receptor Antagonist. *Science.* 215 (4536):1115–16.

- Jones CE, Darcy CJ, Woodberry T, Anstey NM, McNeil YR (2010). HPLC Analysis of Asymmetric Dimethylarginine, Symmetric Dimethylarginine, Homoarginine and Arginine in Small Plasma Volumes Using a Gemini-NX Column at High PH. *Chromatogr B.* 878 (1):8–12.
- Kakoki M, Kim H-S, Arendshorst WJ, Mattson DL (2004). L-Arginine Uptake Affects Nitric Oxide Production and Blood Flow in the Renal Medulla. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol.* 287 (6):R1478-1485.
- Kayacelebi AA, Nguyen TH, Neil C, Horowitz JD, Jordan J, Tsikas D (2014a) Homoarginine and 3-Nitrotyrosine in Patients with Takotsubo Cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 173 (3):546–47.
- Kayacelebi AA, Beckmann BB, Gutzki FM, Jordan J, Tsikas D (2014b) GC-MS and GC-MS/MS Measurement of the Cardiovascular Risk Factor Homoarginine in Biological Samples. *Amino Acids* 46 (9):2205–17.
- Kayacelebi AA, Pham VV, Willers J, Hahn A, Stichtenoth DO, Jordan J, Tsikas D (2014c) Plasma Homoarginine (HArg) and Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Patients with Rheumatoid Arthritis: Is Homoarginine a Cardiovascular Corrective in Rheumatoid Arthritis, an Anti-ADMA? *Int J Cardiol.* 176 (3):1129–31.
- Kayacelebi AA, Langen J, Weigt-Usinger K, Chobanyan-Jürgens K, Mariotti F, Schneider JY, Rothmann S (2015) Biosynthesis of Homoarginine (HArg) and Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) from Acutely and Chronically Administered Free L-Arginine in Humans. *Amino Acids* 47 (9):1893–1908.
- Khalil A A, Tsikas D, Akolekar R, Jordan J, Nicolaides KH (2013) Asymmetric Dimethylarginine, Arginine and Homoarginine at 11-13 Weeks' Gestation and Preeclampsia: A Case-Control Study. *J Hum Hypertens.* 27 (1):38–43.
- Kleber ME, Seppälä I, Pilz S, Hoffmann MM, Tomaschitz A, Oksala N, Raitoharju E (2013) Genome-Wide Association Study Identifies 3 Genomic Loci Significantly Associated with Serum Levels of Homoarginine: The AtheroRemo Consortium. *Circ Cardiovasc Genet.* 6 (5):505–13.
- Kromidas (2016) Methodvalidierung in Der Analytik [online im Internet] URL:<http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/ValidierunginderAnalytik.pdf> [Stand 24.11.2016, 16:15].
- Küpper T (2017) Hypoxie Ist Kein Gift – Auf Die Dosis Kommt Es An!. *ASU Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin Zeitschrift für medizinische Prävention.* [online im Internet] URL: <https://www.asu-arbeitsmedizin.com/Archiv/ASU-Heftarchiv/article-623596-110576/hypoxie-ist-kein-gift-auf-die-dosis-kommt-es-an-.html> [Stand 01.11.2017, 11:25].
- Lehman LJ, Olson AL, Rebouche CJ (1987) Measurement of Epsilon-N-Trimethyllysine in Human Blood Plasma and Urine. *Anal Biochem.* 162 (1):137–42.
- Levin B, Oberholzer VG, Palmer T (1974) Letter: The High Levels of Lysine, Homocitrulline, and Homoarginine Found in Argininosuccinate Synthetase Deficiency. *Pediatr Res.* 8 (10):857–58.
- Lin CW, Fishman WH (1972) L-Homoarginine. An Organ-Specific, Uncompetitive Inhibitor of Human Liver and Bone Alkaline Phosphohydrolases. *J Biol chem.* 247 (10):3082–87.
- Lüneburg N, Siques P, Brito J, Arriaza K, Pena E, Klose H, Leon-Velarde F, Böger RH (2016) Long-Term Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats Causes an Imbalance in the Asymmetric Dimethylarginine/Nitric Oxide Pathway and ROS Activity: A Possible Synergistic Mechanism for Altitude Pulmonary Hypertension? *Pulm Med.* 2016:6578578.

- Lüneburg N, Siques P, Brito J, De La Cruz JJ, León-Velarde F, Hannemann J, Ibanez C, Böger RH (2017) Long-Term Intermittent Exposure to High Altitude Elevates Asymmetric Dimethylarginine in First Exposed Young Adults. *High Alt Med Biol.* 18 (3):226–33.
- Marescau B, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Because I, Billiouw JM, Lornoy W, De Deyn PP (1997) Guanidino Compounds in Serum and Urine of Nondialyzed Patients with Chronic Renal Insufficiency. *Metabolism.* 46 (9):1024–31.
- Markowski P, Baranowska I, Baranowski J (2007) Simultaneous Determination of L-Arginine and 12 Molecules Participating in Its Metabolic Cycle by Gradient RP-HPLC Method: Application to Human Urine Samples. *Anal chim Acta.* 605 (2):205–17.
- Martens-Lobenhoffer J, Schwedhelm E, Tsikas D (2009) Quantification of Arginine and Its Mono- and Dimethylated Analogs NMMA, ADMA and SDMA in Biological Fluids by LC-MS/MS: Is LC Superfluous? *J Chromatogr B analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (27):3261–66.
- März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J (2010) Homoarginine, Cardiovascular Risk, and Mortality. *Circulation* 122 (10):967–75.
- May M, Kayacelebi AA, Batkai S, Jordan J, Tsikas D, Engeli S (2015) Plasma and Tissue Homoarginine Concentrations in Healthy and Obese Humans. *Amino Acids* 47 (9):1847–52.
- Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W (2007) Reference Values for Plasma Concentrations of Asymmetrical Dimethylarginine (ADMA) and Other Arginine Metabolites in Men after Validation of a Chromatographic Method. *Clin Chim Acta Int J clin chem.* 384 (1–2):141–48.
- Merck/Sigma- Aldrich (n.d.) Protease Inhibitor Cocktail P8340 [online im Internet] URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8340> Accessed [Stand 23.10.2017, 10:37].
- Midttun O, Kvalheim G, Ueland PM (2013) High-Throughput, Low-Volume, Multianalyte Quantification of Plasma Metabolites Related to One-Carbon Metabolism Using HPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 405 (6):2009–17.
- Midttun O, Townsend MK, Nygård O, Tworoger SS, Brennan P, Johansson M, Ueland PM (2014) Most Blood Biomarkers Related to Vitamin Status, One-Carbon Metabolism, and the Kynurenine Pathway Show Adequate Preanalytical Stability and within-Person Reproducibility to Allow Assessment of Exposure or Nutritional Status in Healthy Women and Cardiovascular Patients. *J Nutr.* 144 (5):784–90.
- Moali C, Boucher JL, Sari MA, Stuehr DJ, Mansuy D (1998) Substrate Specificity of NO Synthases: Detailed Comparison of L-Arginine, Homo-L-Arginine, Their N Omega-Hydroxy Derivatives, and N Omega-Hydroxynor-L-Arginine. *Biochemistry(Mosc).* 37 (29):10453–60.
- Nennstiel-Ratzel U, Genzel-Boroviczény O, Böhles H, Fusch C, Grüters-Kieslich A, Mohnike K, Rossi R, Ensenauer R, Odenwald B, Hoffmann G (2011) Neugeborenen-Screening Auf Angeborene Stoffwechselstörungen Und Endokrinopathien. AWMF: Arbeitsgesellschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften der Medizin [online im Internet] URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-012l_S2k_Neugeborenencreening_2011-12.pdf [Stand 25.11.2016, 14:25].

- Papageorgiou N, Androulakis E, Papaioannou S, Antoniadou C, Tousoulis D (2015) Homoarginine in the Shadow of Asymmetric Dimethylarginine: From Nitric Oxide to Cardiovascular Disease. *Amino Acids* 47 (9):1741–50.
- Pilz S, Tomaschitz A, Meinitzer A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, Wanner C, Böhm BO, März W (2011a) Low Serum Homoarginine Is a Novel Risk Factor for Fatal Strokes in Patients Undergoing Coronary Angiography. *Stroke J Cereb Circ.* 42 (4):1132–34.
- Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, Wanner C, Boehm BO, März W (2011b) Low Homoarginine Concentration Is a Novel Risk Factor for Heart Disease. *Heart Br Card Soc.* 97 (15):1222–27.
- Pilz S, Teerlink T, Scheffer PG, Meinitzer A, Rutters F, Tomaschitz A, Drechsler C (2014) Homoarginine and Mortality in an Older Population: The Hoorn Study. *Eur J Clin Invest.* 44 (2):200–208.
- Pilz S, Putz-Bankuti S, Meinitzer A, März W, Kienreich K, Stojakovic T, Pieber TR, Stauber RE (2015) Association of Homoarginine and Methylarginines with Liver Dysfunction and Mortality in Chronic Liver Disease. *Amino Acids* 47 (9):1817–26.
- Ravani P, Maas R, Malberti F, Pecchini P, Mieth M, Quinn R, Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C (2013) Homoarginine and Mortality in Pre-Dialysis Chronic Kidney Disease (CKD) Patients. *PloS One* 8 (9):e72694.
- Reczkowski RS, Ash DE (1994) Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism, Alternate Substrates, and Inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 312 (1):31–37.
- RKI Robert Koch Institut (n.d.) Herz-Kreislauf-Erkrankungen. [online im Internet] URL:http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html. [Stand 05.08.2017, 14:45]
- Roskam TI (2015) Entwicklung und Validierung Diagnostischer Assays : Experimentelle Untersuchungen eines Nachweisverfahrens für die Bestimmung von A symmetrische m Dimethylarginin und L - Arginin in Trockenblut. Hamburg: Medizinische Fakultät der Universität Hamburg.
- Ryan WL, Wells IC (1964) HOMOCITRULLINE AND HOMOARGININE SYNTHESIS FROM LYSINE. *Science.* 144 (3622):1122–27.
- Sandvik MK, Leirgul E, Nygård O, Ueland PM, Berg A, Svarstad E, Vikse BE (2013) Preeclampsia in Healthy Women and Endothelial Dysfunction 10 Years Later. *Am J Obstet Gynecol.* 209 (6):569.e1-569.e10.
- Sarstedt Produkte (n.d.) S-Monovette 1,6ml K3E [online im Internet] URL: <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1956.001/> [Stand: 03.11.2017, 17:45]
- Servillo L, Giovane A, D'Onofrio N, Casale R, Cautela D, Castaldo D, Balestrieri ML (2013) Determination of Homoarginine, Arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in Biological Samples by HPLC-ESI-Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci.* 14 (10):20131–38.
- Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH (2010) The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev.* 6 (2):82–90.
- statistisches Bundesamt (2015) Gestorbene Nach Ausgewählten Todesursachen [online im Internet] URL:<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>. [Stand 03.11.2017, 13.12].
- Stockebrand M, Hornig S, Neu A, Atzler D, Cordts K, Böger RH, Isbrandt D, Schwedhelm E, Choe C (2015) Homoarginine Supplementation Improves Blood Glucose in Diet-Induced Obese Mice. *Amino Acids* 47 (9):1921–29.

- Terada N, Inoue F, Okochi M, Nakajima H, Kizaki Z, Kinugasa A, Sawada T (1999) Measurement of Carnitine Precursors, Epsilon-Trimethyllysine and Gamma-Butyrobetaine in Human Serum by Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 731 (1):89–95.
- Thomas G, Ramwell PW (1991) Effects of Guanidino Compounds on the Endothelium-Derived Relaxing Factor Inhibitor NG-Monomethyl L-Arginine. *J Pharmacol Exp Ther.* 259 (2):490–94.
- Tomaschitz A, Meinitzer A, Pilz S, Rus-Machan J, Genser B, Drechsler C, Grammer T (2014) Homoarginine, Kidney Function and Cardiovascular Mortality Risk. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 29 (3):663–71.
- Tomaschitz A, Verheyen N, Gaksch M, Meinitzer A, Pieske B, Kraigher-Krainer E, Colantonio C (2015) Homoarginine in Patients with Primary Hyperparathyroidism. *Am J Med Sci.* 349 (4):306–11.
<https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000419>.
- Tousoulis D, Koutsogiannis M, Papageorgiou N, Siasos G, Antoniadis C, Tsiamis E, Stefanadis C (2010) Endothelial Dysfunction: Potential Clinical Implications. *Minerva Med.* 101 (4):271–84.
- Tsikas D, Wu G (2015) Homoarginine, Arginine, and Relatives: Analysis, Metabolism, Transport, Physiology, and Pathology. *Amino Acids* 47 (9):1697–1702.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2013) Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. CDER Center for Drug Evaluation and Research [online im Internet] URL: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf> [Stand 10.10.2017, 12:45].
- Valtonen P, Karppi J, Nyyssonen K, Valkonen V, Halonen T, Punnonen K (2005) Comparison of HPLC Method and Commercial ELISA Assay for Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Determination in Human Serum. *J Chromatogr B.* 828 (1–2):97–102.
- Valtonen P, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JSA, Heiskanen N, Vanninen E, Punnonen K, Heinonen S (2008) Serum L-Homoarginine Concentration Is Elevated during Normal Pregnancy and Is Related to Flow-Mediated Vasodilatation. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 72 (11):1879–84.
- Verhelst J, Berwaerts J, Marescau B, Abs R, Neels H, Mahler C, De Deyn PP (1997) Serum Creatine, Creatinine, and Other Guanidino Compounds in Patients with Thyroid Dysfunction. *Metabolism.* 46 (9):1063–67.
- Walker JB (1955) Homoarginine Inhibition of Escherichia Coli B. *J Biol Chem.* 212 (2):617–22.
- Wellnitz J, Gluschke M (2005) Leitlinie zur Methodvalidierung, Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt [online im Internet] URL: <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf> [Stand: 04.11.2017, 10:10]
- West JB (n.d.) MSD Manual [online im Internet] URL <http://www.msd-manual.de/msdmanual/htbin/msdmanual.pl?m=21-13> [Stand: 25.11.2016, 17:44].
- Witkowska E, Orłowska A, Izdebski J (2004) Tryptic Digestion of Peptides Corresponding to Modified Fragments of Human Growth Hormone-Releasing Hormone. *Acta Biochim Pol.* 51 (1):51–56.

Zwan van der LP , Davids M, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CDA, Teerlink T (2013) L-Homoarginine and L-Arginine Are Antagonistically Related to Blood Pressure in an Elderly Population: The Hoorn Study. *J Hypertens.* 31 (6):1114–23.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rainer H. Böger, dem Leiter des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Schwedhelm für die stets konstruktive, motivierende und freundliche Betreuung.

Ebenso möchte ich Dr. rer. Nat. Lüneburg für die Bereitstellung von Proben und Daten danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Kathrin Cordts, Anna Steenpaß, Mariola Kästner und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie bedanken.

Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

13 Anhang

13.1 Anleitung der Methode (Standardanleitung)

(DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

1. Vorbereitung der Reagenzien

„MT-Streifen STRIPS

Mikrotiterstreifen im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen **sorgfältig** verschließen.

Waschpuffer WASH

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml auffüllen und kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

Ausgleichsreagenz EQUA-REAG

Inhalt des Fläschchens mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Acylierungsreagenz ACYL-REAG

Inhalt des Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.“ (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

2. Vorbereitung der Proben

Aus den getrockneten Trockenblutkarten werden 3 (alternativ 2) Stanzlinge pro Proband ausgestanzt. Es ist darauf zu achten, dass pro Spot nur einmal gestanzt wird. Die Stanze soll dabei möglichst zentral aus dem Spot ausgestanzt werden. Diese zwei Stanzlinge werden in einem beschrifteten 3ml Eppendorfgefäß gelegt.

3. Elution

„Reagenzien und [Kontroll-] Proben auf Raumtemperatur bringen. Die Elution wird in Einfachbestimmung und die anschließende Acylierung in Doppelbestimmung

angesetzt, d.h. es wird 2-mal pro Probe aus dem Elutionsröhrchen die Reaktionsplatte pipettiert.

Sollten keine 3 Stanzlinge zur Verfügung stehen, ist es möglich 2 Stanzlinge einzusetzen, wobei später der erhaltene Messwert mit 1,5 multipliziert werden muss.

1. Je 15 µl Standard und jeweils 3 Stanzlinge der einzelnen Probe in die [...] Elutions-Röhrechen geben.
2. Je 300 µl Elutionslösung in die Elutions-Röhrechen pipettieren.
3. Röhrechen gut vermischen (Vortex).
4. Röhrechen 20 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mischen [in der Zwischenzeit empfiehlt es sich das Acylreagenz vorzubereiten]
5. Röhrchen 5 Minuten bei mind. 3.000 x g zentrifugieren

Für die nachfolgende Acylierung je 2 x 75 µl des Überstandes verwenden.“ (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2011)

4. Acylierung

„Doppelbestimmungen sind vorgeschrieben.

1. Je 2x 75 µl des Überstands in die entsprechende Vertiefung der Reaktionsplatte für die Acylierung pipettieren. [Es empfiehlt sich ein 3 maliges Mischen des Überstandes mit der Pipettenspitze, bevor der Überstand in die Reaktionsplatte überführt wird. Für spätere Analysen sollte der Überstand abpipettiert und in ein anderes Gefäß übergeführt werden; alternativ ist die Entfernung des Stanzlings aus dem Elutionsgefäß möglich]
2. Je 25 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 50 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.
4. Reaktionsplatte ca. 10 Sekunden mischen.
5. Acylierungsreagenz frisch ansetzen und je 25 µl Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und sofort offen auf einem Schüttler mischen, dabei die Platte nicht abdecken oder zukleben.

Achtung

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

6. Reaktionsplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, Platte nicht abkleben oder Abdecken, offen schütteln.“ (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

Je 25 µl der so vorbereiteten Proben werden in dem Homoarginin-ELISA eingesetzt. Vor dem Pipettieren mit Hilfe der Pipette mehrfach mischen und im Anschluss direkt 25 µl pipettieren.

5. ELISA

„Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

1. 25 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 50 µl Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. 100 µl Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 25 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 18 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.“ (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2014)

13.2 Materialien

Materialien	
Eppendorf combitips Advanced 2,5 ml und 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipette "Reference"	0,5 – 10 µL 10 – 100 µL 100 – 1000 µL
Eppendorf Pipette "Research"	2 – 20 µL
Eppendorf Pipettenspitzen 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettenspitzen 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettenspitzen 200 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safelock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Homoarginin ELISA Kit	EA205/96 LOT H111 20.09.2015 EA205/96 LOT H112 2016-03-31 EA205/96 LOT H113 2017-08-30 DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH, Hamburg
Safe Seal Reagiergefäß 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Halbautomatische Einmallanzetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Monovette® EDTA KE 2,7 ml und 7,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Safety-Multifly-Set®	23G; 0,6 x 19 mm Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Serological Pipette 2 mL und 5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filterpapier/ Trockenblutkarten	FT-2-460-0008 N / 08-150 TFN 179g/m ² 060x085 mm Sartoriusstedim biotech

Trockenmittelbeutel Silica Gel Orange	Art.-Nr. N077.2 Charge 474222613 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Materialien Fortsetzung	
Hemoglobin Assay Kit	Katalognr. MAK 115 Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Spritze 20ml Braun	4606205V, 2H15048 BRAUN, Melsungen
Kanüle Braun Sterican	Gr. 12, 0,70x30 mm BL/LB 22G1 ¼

Geräte	
Brand Messzylinder	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Eppendorf Centrifuge	5415R Baujahr 2002 Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge	5810R
Heidolph „Reax Control“	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Heidolph Titramax 101	Seriennr.: 070408175 Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach
Heizblock	
Hirschmann Laborgeräte „Pipetus®“	Hirschmann Laborgeräte gmbH & Co. KG, Eberstadt
Inkubationsbehältnisse	Verpackungen (DLD Test Kit Homoarginin)
Kühlschrank Liebherr “FKS 5010”	Sollbereich +2°C bis +10°C
Kühltruhe Liebherr “Comfort” (-22°C)	
MRW (AM60) Waschautomat	Seriennr.: GA 2862
Tagesspektrumlampe “GLO Life-Glo 18”	15 Watt T 8 46cm lang
Tecan Sunrise Remote	Art.Nr.: F039300 Seriennr.: 0393003434 Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Wärmeschrank	

Reagenzien	
N ^ω -Hydroxy-nor-L-arginine	Aliquot von Merck CAS 189302 Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Lot: 011M400 Sigma-Aldrich / Merck, Darmstadt
Elutionslösung ADMA Kit	DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH, Hamburg
Aqua dest.	
Ameisensäure	
CHAPS	
Acetonitril	
DMSO	
Ethanol	
Methanol	
Salzsäure	
Aceton	
EDTA	
Formalin	
N-succinyl-Hydroxid	
Sodiumdodecylsulfat	
Sulfosalicylsäure-dihydrat	
Trichloressigsäure	
TRIS	
Tween	
NaCl 0,9%	
Citrat-Phosphatpuffer -----	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
Citronensäure	
Propylenglycol	
Dinatriumhydrogenphosphat	

Software
„Sunrise“ Firmware V 3.17
Graphpad Prism 5
IBM SPSS Statistics 21
ImportExport 4 V 4.50
Magellan V 4.00
Microsoft Excel 2010
Microsoft Word 2010
Plattendefinitionseditor V 4.50
Reader Server V 4.50
Tecan Calc 4 V 4.50
Zotero Standalone

13.3 Inhaltsstoffe des Protease-Inhibitorgemisches Fa. Sigma

Sigma Produkt Nr. P8340

- 104 mM AEBSF ([4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluorid hydrochlorid), Serinproteaseninhibitor, inhibiert:
 - Trypsin
 - Chymotrypsin
 - Plasmin
 - Kallikrein
 - Thrombin
- 80 μ M Aprotinin, Serinproteaseninhibitor, inhibiert:
 - Trypsin
 - Chymotrypsin
 - Plasmin
 - Kallikrein
 - Humane leukozytee Elastase
- 4 mM Bestatin hydrochloride, Aminopeptidaseninhibitor, inhibiert:
 - Leucine aminopeptidase
 - Alanylaminopeptidase
- 1,4 mM E-64 [N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucine 4 guanidinobutylamide], Cysteinproteasen, inhibiert:
 - Calpain
 - Papain
 - Cathepsin B
 - Cathepsin L
- 2 mM Leupeptin hemisulfate salz, Serin- und Cysteinproteasen, inhibiert:
 - Plasmin
 - Trypsin
 - Papain
 - Cathepsin B
- 1,5 mM Pepstatin A, Säureproteasen, inhibiert:
 - Pepsin
 - Renin
 - Cathepsin D
 - Mikrobielle Aspartatprotease

Entsprechend der Herstellerangabe wird 1mL des Proteaseinhibitormixes empfohlen, um endogene Enzyme in einem 100 mL Lysat von 20 g Rinderleber oder von 10 mL Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen im 100 mL Lysat zu inhibieren. Die Herstellerlösung wurde ohne weitere Verdünnung verwendet. Weitere Herstellerangaben sind dem Anhang 13.3 zu entnehmen

13.4 Stabilität von L-hArg

Probenalter in							
Wochen/Monat:	1.Woche	2.Woche	3.Woche	1.Monat	3.Monat	6.Monat	9.Monat
Tagen:	1.-6.Tag	7.-13. Tag	14.-28. Tag	29.-42. Tag	91.- 102.Tag	182.- 193.Tag	276.- 287.Tag
III							
MW in $\mu\text{mol/L}$	3,64	3,18	2,42	2,48		2,03	1,52
SD	0,63	0,64	0,64	0,39		0,13	0,50
Variationskoeffizient	17,4%	20,2%	26,6%	15,8%		6,4%	32,8%
IV							
MW in $\mu\text{mol/L}$	2,81	1,70	1,49	1,78		2,11	1,53
SD	0,65	0,15	0,13	0,12		0,29	0,52
Variationskoeffizient	23,2%	8,7%	8,8%	6,9%		14,0%	33,8%
V							
MW in $\mu\text{mol/L}$	5,12	3,29	3,22	3,06		2,44	2,05
SD	0,97	0,52	0,41	0,40		0,39	0,42
Variationskoeffizient	19,0%	15,7%	12,8%	13,1%		15,8%	20,5%
X							
MW in $\mu\text{mol/L}$	3,39	3,18	2,43	3,29	2,83	2,19	2,35
SD	0,30	0,67	0,11	0,69	0,07	0,12	0,34
Variationskoeffizient	8,7%	20,9%	4,7%	20,9%	2,4%	5,6%	14,7%
I							
MW in $\mu\text{mol/L}$	4,45	7,09	4,47	5,90	4,22	2,86	3,51
SD	0,83	1,64	1,08	1,00	0,50	0,36	1,21
Variationskoeffizient	18,6%	23,2%	24,2%	16,9%	11,9%	12,5%	34,5%

13.5 Retest-Reliabilität von L-Homoarginin (Stabilität)

Wochen/Monat:		2.Woche	3.Woche	1.Monat	3.Monat	6.Monat	9.Monat
Tagen:		7.-13.	14.-20.	28.-42.	91.-	182.-	276.-
Probennummer:		Tag	Tag	Tag	102.Tag	193.Tag	287.Tag
III	Korrelation mit vorherigem	-0,834 p=0,79	0,362 p=0,638	0,808 p=0,192		0,036 p=0,977	-1,000** P=0,008
III	Korrelation mit Ausgangswert	-0,834 p=0,79	-4,64 p=0,536	0,296 p=0,629		0,998** p=0,039	-0,999** p=0,031
I	Korrelation mit vorherigem	-0,140 p=0,0860	0,767 p=0,233	0,924 p=0,25	0,463 p=0,693	0,631 p=0,565	0,467 p=0,691
I	Korrelation mit Ausgangswert	-0,140 p=0,860	-0,193 p=0,807	0,145 p=0,907	-0,809 p=0,400	-0,55 p=0,965	-0,909 p=0,274
IV	Korrelation mit vorherigem	0,564 p=0,436	-0,561 p=0,439	-0,956* p=0,044		0,156 p=0,900	-0,588 p=0,600
IV	Korrelation mit Ausgangswert	0,564 p=0,436	-0,509 p=0,491	0,707 p=0,293		-0,178 p=0,886	0,901 p=0,286
V	Korrelation mit vorherigem	0,197 p=0,751	0,699 p=0,301	0,162 p=0,838		0,427 p=0,719	-0,127 p=0,019
V	Korrelation mit Ausgangswert	0,197 p=0,751	0,432 p=0,568	-0,875 p=0,052		0,179 p=0,886	0,953 p=0,195
X	Korrelation mit vorherigem	-0,330 p=0,670	-0,400 p=0,600	0,006 p=0,994	-0,026 p=0,984	0,569 p=0,614	-0,963 p=0,174
X	Korrelation mit Ausgangswert	-0,330 p=0,670	-0,718 p=0,282	-0,371 p=0,629	-0,761 p=0,449	0,099 p=0,937	0,173 p=0,889

13.6 Qualitätsbeurteilung der chilenischen Kohorte

Qualitätsbeurteilungsschema:

Hinten benetzt (1 = vollständig; 2 = teilweise; 3 = gar nicht)

Durchmesser (1 = mindestens 5 mm; 2 = mindestens 4 mm; 3 < 4mm)

Probenr. (0 Monate)	Datum	Durch- messer	hinten benetzt	Probenr. (6 Monate)	Datum	Durchmesser	hinten benetzt
4	19.04.2011	1	1	4	13.09.2011	2	2
7	19.04.2011	2	2	7	13.09.2011	2	2
8	19.04.2011	1	2	8	13.09.2011	1	1
10	27.04.2011	1	1	10	13.09.2011	1,5	1,5
18	27.04.2011	2	2	18	13.09.2011	1,5	3
30	27.04.2011	1	2,5	30	22.11.2011	1,5	1,5
32	27.04.2011	1	1	32	13.10.2011	2	2,5
33	27.04.2011	2	1,5	33	13.10.2011	1	1
34	27.04.2011	2	2	34	13.10.2011	2	3
38	27.04.2011	1	1	38	13.09.2011	2	1,5
42	27.04.2011	1	1	42	13.09.2011	1	1,5
44	27.04.2011	1	2	44	13.09.2011	1	1
46	27.04.2011	1,5	2	46	13.09.2011	2	2
47	27.04.2011	1	1	47	13.09.2011	1	1
48	27.04.2011	1	1	48	13.09.2011	1,5	1
50	17.05.2011	1	1	50	22.11.2011	1,5	2
51	17.05.2011	1	1	51	22.11.2011	1	1,5
53	17.05.2011	1	1	53	22.11.2011	2	2
54	17.05.2011	1	1,5	54	22.11.2011	1	1,5
61	17.05.2011	1,5	2	61	22.11.2011	1	1
63	17.05.2011	2,5	2	63	13.10.2011	1,5	1,5
64	17.05.2011	1	1	64	13.10.2011	1	1
71	17.05.2011	1	1,5	71	13.09.2011	3	2
73	17.05.2011	2	2	73	13.09.2011	2	2
76	17.05.2011	1	1,5	76	22.11.2011	3	2
77	17.05.2011	1	1	77	22.11.2011	1	2
78	17.05.2011	2	2	78	13.10.2011	1,5	1
80	17.05.2011	1	1	80	13.10.2011	1,5	2
85	17.05.2011	2	2	85	22.11.2011	2	3
86	17.05.2011	1	1	86	22.11.2011	1,5	1,5
87	17.05.2011	1	1	87	22.11.2011	3	2
89	31.05.2011	1,5	1	89	22.11.2011	1,5	2
90	31.05.2011	1	1	90	13.09.2011	1	1
92	31.05.2011	2,5	2	92	13.09.2011	2	2
95	31.05.2011	1,5	1,5	95	13.09.2011	2	1
100	31.05.2011	1	1	100	13.09.2011	3	1
107	31.05.2011	1	1	107	13.09.2011	2	3
108	31.05.2011	2	2	108	13.09.2011	1	2
116	31.05.2011	1,5	2	116	13.09.2011	1	1,5

Qualitätsbeurteilung der chilenischen Kohorte Fortsetzung

Probenr. (0 Monate)	Datum	Durch- messer	hinten benetzt	Probenr. (6 Monate)	Datum	Durchmesser	hinten benetzt
120	31.05.2011	1	1	120	22.11.2011	1	1
121	31.05.2011	1,5	2	121	27.07.2011	0	0
122	31.05.2011	2	2	122	13.10.2011	1	2

13.7 Korrelationsanalysen

13.7.1 Korrelationsanalyse zum Studienbeginn

Korrelationsparameter		Testverfahren	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Homoarginin 0 Monate	Alter 0 Monate	Spearman's- Rho	0,22	0,172
Homoarginin 0 Monate	Gewicht 0 Monate	Pearson r	0,105	0,521
Homoarginin 0 Monate	Größe 0 Monate	Pearson r	0,03	0,852
Homoarginin 0 Monate	BMI 0 Monate	Pearson r	0,117	0,474
Homoarginin 0 Monate	O ₂ Sättigung Meereshöhe 0 Monate	Spearman's- Rho	0,283	0,076
Homoarginin 0 Monate	O ₂ Sättigung 4000m 0 Monate	Pearson r	-0,186	0,251
Homoarginin 0 Monate	Hämoglobin 0 Monate	Pearson r	0,097	0,553
Homoarginin 0 Monate	Hämatokrit 0 Monate	Pearson r	0,096	0,556

13.7.2 Korrelationsanalysen nach 6-monatiger Höhenbelastung

Korrelationsparameter		Testverfahren	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Homoarginin 6 Monate	Alter 6 Monate	Spearman's- Rho	0,012	0,943
Homoarginin 6 Monate	Gewicht 6 Monate	Pearson r	0,361*	0,026
Homoarginin 6 Monate	Größe 6 Monate	Pearson r	-0,042	0,802
Homoarginin 6 Monate	BMI 6 Monate	Pearson r	0,447**	0,005
Homoarginin 6 Monate	O ₂ Sättigung 6 Monate	Pearson r	-0,073	0,665
Homoarginin 6 Monate	Hämoglobin 6 Monate	Spearman's- Rho	0,133	0,42
Homoarginin 6 Monate	Hämatokrit 6 Monate	Spearman's- Rho	0,163	0,321

13.7.3 Longitudinale Korrelationsanalysen

Korrelation der Differenz 6-0		Testverfahren	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Homoarginin	Gewicht	Spearman's-Rho	0,036	0,83
Homoarginin	Größe	Spearman's-Rho	0,134	0,415
Homoarginin	BMI	Pearson r	-0,065	0,7
Homoarginin	O ₂ Sättigung %	Spearman's-Rho	0,099	0,555
Homoarginin	Hämoglobin	Pearson r	-0,022	0,892
Homoarginin	Hämatokrit	Pearson r	-0,091	0,582