

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Entwicklung und Validierung Diagnostischer Assays: Experimentelle Untersuchungen eines Nachweisverfahrens für die Bestimmung von Asymmetrischem Dimethylarginin und L-Arginin in Trockenblut

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin / Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Thore Ibo Roskam

aus Aurich

Hamburg 2015

"O glücklich, wer noch hoffen kann, //
Aus diesem Meer des Irrtums
aufzutauchen! // Was man nicht weiß,
das eben brauchte man, // Und was
man weiß, kann man nicht brauchen."
- Vers 1064 ff. / Faust

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.12.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Böger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Karsten Sydow

~~Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: —~~

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Regulation der Gefäßfunktion durch das Endothel	2
2.2 Methylarginine	4
2.3 ADMA und NOS	5
2.4 ADMA kann den Gefäßwiderstand beeinflussen:	6
2.5 ADMA und Krankheit	7
2.6 Wie entsteht ADMA	8
2.7 Regulation von ADMA	9
2.8 ADMA – Transportwege	10
2.9 ADMA als Biomarker:	12
2.10 L-Arginin als zusätzlicher Messparameter:	14
2.11 Messverfahren für ADMA und L-Arginin	15
2.11.1 Tandem-MS-High-performance liquid chromatography (HPLC):	16
2.11.2 ELISA:	17
2.12 ADMA in Vollblut und in Plasma	20
2.13 Validierung diagnostischer Tests:	21

3	Material und Methoden	25
3.1	Verwendete Geräte und Materialien	25
3.2	Blutproben:	29
3.2.1	Probengewinnung und Aufbewahrung:	30
3.2.2	Chile Studie:.....	30
3.3	Methoden	31
3.3.1	Messung von ADMA und L-Arginin mittels ELISA:.....	31
3.3.2	Präparation und Aufbewahrung der Karten:.....	31
3.3.3	Vorbereitung der Reagenzien	32
3.3.4	ADMA-ELISA:	33
3.3.5	Arginin-ELISA:	34
3.3.6	Messung und Berechnung der Werte:	35
3.3.7	Evaluation:	35
3.3.8	Messung von ADMA und L-Arginin mittels LC-MS/MS:	37
3.3.9	Evaluation:	40
3.3.10	Statistische Auswertung.....	40
3.4	Testreihen:	40
3.4.1	Methodenspezifische Kenngrößen:.....	40
3.4.2	Personenspezifische Kenngrößen:	41

3.4.3	Präanalytik	42
3.4.4	Methodenvergleich ELISA & LC-MS/MS:.....	44
4	Ergebnisse:	46
4.2	Methodenspezifische Kenngrößen	46
4.2.1	Intra-Assay-Variabilität:	46
4.2.2	Inter-Assay-Variabilität:	48
4.3	Personenspezifische Kenngrößen.....	50
4.3.1	Intraindividuelle Variabilität:	50
4.4	Präanalytik.....	52
4.4.1	Einfluss von Luftfeuchtigkeit während des Trocknungsprozess:	52
4.4.2	Enzymatisch bedingte Konzentrationsänderungen während des Trocknens	54
4.4.3	Effekt von Nor-NOHA auf die Messungen von L-Arginin unter Einfluss von 12h Feuchtigkeit:	56
4.4.4	Nor-NOHA Negativprobe	58
4.4.5	Einfluss der verwendeten Blutmenge auf das Messergebnis.....	58
4.4.6	„Freeze & Thaw“:	60
4.4.7	Einfluss der Methode der Blutentnahme auf die Messung.....	62
4.4.8	Testreihe UV-Licht	64
4.4.9	Lagerungsdauer.....	66

4.4.10	Lagerungseinflüsse (Temperatur, Luftfeuchte)	71
4.5	Methodenvergleich ELISA & LC-MS/MS	73
4.5.1	Chile Studie.....	73
4.5.2	Vergleich mit Probanden aus dem UKE.....	79
5	Diskussion.....	85
5.2	Validierung	85
5.2.1	Testspezifische Kenngrößen.....	86
5.2.2	Personenspezifische Kenngrößen	86
5.2.3	Präanalytik	87
5.3	Vergleich zwischen LC-MS/MS und ELISA:	94
5.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse:	94
5.3.2	Klinische Beurteilung der ermittelten Übereinstimmung.....	96
6	Zusammenfassung.....	99
7	Literaturverzeichnis	100
8	Tabellenverzeichnis	111
9	Abbildungsverzeichnis	112
10	Danksagung.....	117
11	Lebenslauf	118
12	Eidesstattliche Versicherung.....	119

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Validierung eines Trockenbluttests für ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) und L-Arginin (eine semiessentielle Aminosäure). ADMA ist ein im Proteinstoffwechsel anfallendes Molekül, das seit einiger Zeit mit kardiovaskulären Krankheiten in Verbindung gebracht wird [Zoccali et al. 2003]. L-Arginin konkurriert mit ADMA um ein Stickstoffmonoxid (NO) produzierendes Enzym [Vallance et al. 1992], welches wiederum für die Regulierung der Gefäßweite wichtig ist.

Der Test misst mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) die Konzentration von ADMA und L-Arginin in Vollblut. Das zu untersuchende Blut wird auf Filterpapier getropft und trocknet auf dem Papier ein. Das so präparierte Papier kann für längere Zeit gelagert werden (2-4 Wochen), um dann im ELISA untersucht zu werden. Hierfür werden Stanzlinge aus dem Papier vorbereitet, die daraufhin in eine Elutionslösung eingebracht werden. Nach der Elution folgt eine Acylierung. Die entsprechend vorbereiteten Proben werden dann über Nacht mit Antiserum inkubiert, um schließlich das Reaktionsgemisch hinzuzugeben.

Für die Validierung dieses Messverfahrens gilt es, bestimmte Standard-Parameter zu überprüfen, wie z.B. die Intra-Assay-Varianz und die Inter-Assay-Varianz. Außerdem sollen potenzielle Einflussfaktoren der Präanalytik erfasst und untersucht werden. Um diese Einflussfaktoren beurteilen zu können, werden zunächst mehrere Proben analysiert und nachfolgend unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt. Daraufhin wird erneut die Konzentration der Probe bestimmt. Es wird also die relative Konzentrationsänderung des Analyten unter dem Einfluss verschiedener Umweltbedingungen untersucht.

Um ADMA und L-Arginin im Blut zu messen, gibt es noch eine weitere Methode, die „Liquid Chromatography“, gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Dieses Verfahren misst die zwei Analyten im Plasma. Im Rahmen dieser Arbeit wird desweiteren untersucht, inwieweit die Plasmakonzentration von L-Arginin und ADMA (gemessen mit LC-MS/MS) mit den aus Vollblut (ELISA) errechneten Konzentrationen korreliert.

2. Einleitung

2.1 Regulation der Gefäßfunktion durch das Endothel

Die Regulierung der Hämostase kann einerseits über systemische Faktoren geschehen, andererseits aber auch lokal - vom Endothel - über parakrin wirkende Substanzen gesteuert werden. Eine dieser lokal wirkenden Substanzen ist Stickstoffmonoxid (NO), der „Endothelium-Derived Relaxing Factor“ (EDRF), der Anfang der 80er-Jahre von R. Furchgott entdeckt wurde [Furchgott 1984].

Furchgott stellte fest, dass Acetylcholin am intakten Gefäß zu einer Dilatation, bei Entfernung des Endothels jedoch zur Vasokonstriktion führt. Da NO nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden hat, gelang es zunächst nicht, die Substanz chemisch zu identifizieren, daher auch der Name „EDRF“. 1998 wurde diese Entdeckung - und weiter die Identifizierung des „EDRF“ als Stickstoffmonoxid - dann mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin honoriert.

NO hat neben seiner gefäßdilatierenden Wirkung unter anderem auch Einfluss als Neurotransmitter, als Makrophagentoxin, als Hemmstoff der Plättchenaggregation, der Leukozytenadhäsion und der Proliferation glatter Muskelzellen. Die renale Autoregulation wird ebenfalls von NO mediert [Silbernagl et al. 2010].

Gebildet wird NO von einem Enzym, der NO-Synthase (NOS). Es gibt mehrere Unterformen dieser NOS, u.a. gibt es die neuronale NOS (nNOS: NO als Neurotransmitter) und es gibt auch eine endotheliale NOS (eNOS). Beispielhaft wird hier die Signalkette, die zur Aktivierung der eNOS führt, beschrieben:

In der Zellmembran der Endothelzelle befindet sich ein G-Protein-gekoppelter Hormonrezeptor. Die Stimulation des Rezeptors wird auf das G-Protein übertragen; diese Stimulation wird im Endothel beispielsweise durch Scherkräfte in der Zellmembran erreicht, wie sie bei höheren Flussgeschwindigkeiten des Blutes auftreten. Daher auch der Begriff „endothelabhängige Vasodilatation“.

Das G-Protein aktiviert nach Bindung des Substrats an den Rezeptor die Phospholipase C, und es wird Inositoltriphosphat gebildet, was wiederum die

intrazelluläre Konzentration an Calciumionen (Ca^{2+}) erhöht; dies führt zur Bildung eines Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes, welcher die eNOS stimuliert, die dann schließlich aus der semi-essentiellen Aminosäure L-Arginin (unter Abspaltung von Citrullin) NO synthetisiert.

Das kleine Molekül Stickstoffmonoxid diffundiert daraufhin schnell in die benachbarten Muskelzellen und löst dort über eine Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase einen Anstieg von cGMP aus. cGMP aktiviert eine Proteinkinase G, was wiederum über mehrere Schritte in der glatten Muskelzelle die Ca^{2+} -Konzentration verringert und somit zur Erschlaffung führt.

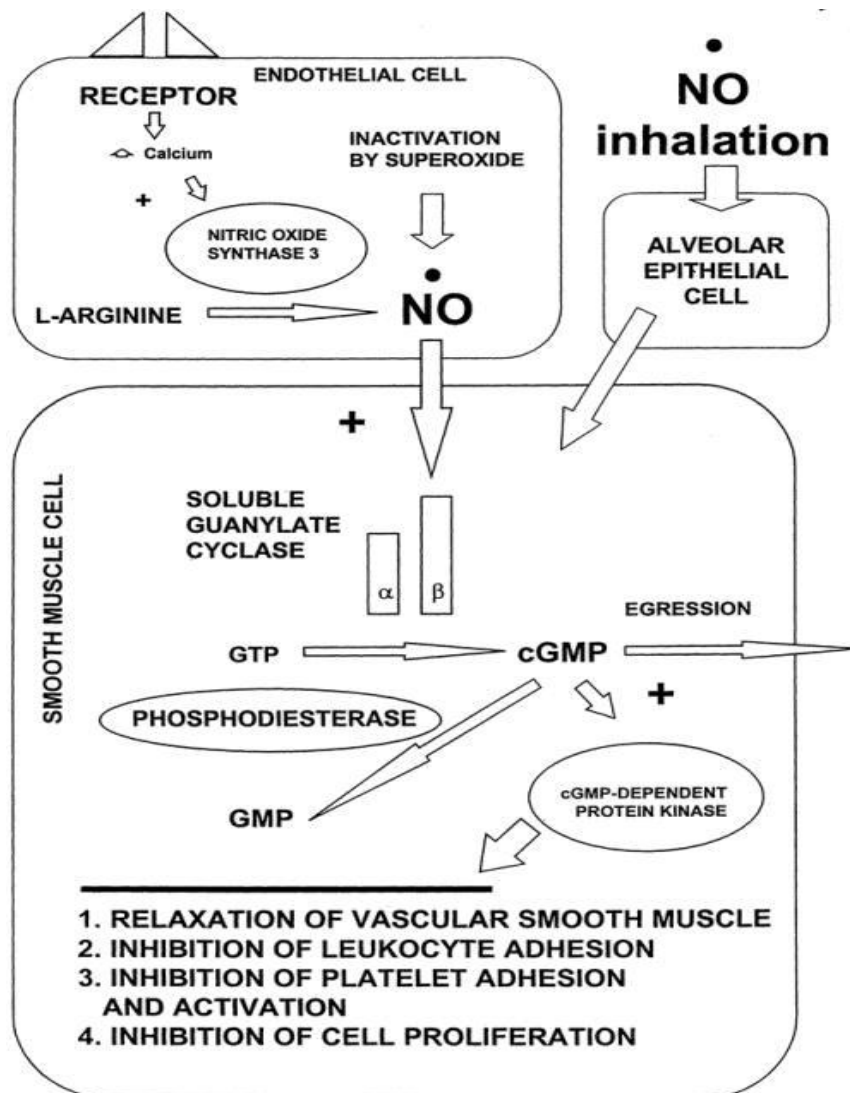


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Mechanismen der NO-induzierten Gefäßrelaxation, Steudel W et al. Anesthesiology. 1999

2.2 Methylarginine

Es gibt bestimmte Arginin-Derivate, die Methylarginine, die über einen kompetitiven Mechanismus nicht selektiv die NOS inhibieren (s.u.). Von diesen Methylargininen gibt es drei relevante Formen, das einfach methylierte N-Methylarginin (L-NMMA), das symmetrisch di-methylierte Methylarginin (SDMA) und das asymmetrisch di-methylierte Methylarginin (ADMA).

Bereits 1970 wurden von Kakimoto und Akazawa verschiedene, physiologisch im Urin vorkommende Aminosäuren und deren Derivate quantifiziert. Sie beschrieben, dass Methylarginine in vergleichsweise hohen Konzentrationen im Urin nachzuweisen sind.

1992 knüpften Vallance et al. an diese Publikation an und führten weitere Experimente durch: auch sie fanden heraus, dass L-Arginin Analoge im menschlichen Plasma und Urin endogen vorkommen und des Weiteren, dass die zwei Substanzen ADMA und L-NMMA die NO-Synthase kompetitiv hemmen können. ADMA wurde als mögliches Urämietoxin in Erwägung gezogen.

Seitdem gab es viele weitere Untersuchungen zu diesem Thema, mit der naheliegenden Frage, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthese und gefäßbezogenen Krankheiten gibt. Dieser Verdacht hat sich in den letzten 20 Jahren verfestigt und das Interesse an den Methylargininen ist seitdem deutlich gestiegen. Unter den Methylargininen ist ADMA der Vertreter mit der höchsten Konzentration im menschlichen Plasma.

Es ist nachgewiesen, dass es eine Reihe von Erkrankung gibt, die mit erhöhten Blutplasmakonzentrationen von ADMA korrelieren und gleichzeitig für den Krankheitsverlauf prognostisch relevante Informationen liefern, so z.B. der Fall bei Niereninsuffizienz [Zocalli et al. 2001] oder kardiovaskulären Erkrankungen [Böger et al. 2009].

2.3 ADMA und NOS

Die NO-Synthase produziert über Zwischenschritte aus dem Substrat L-Arginin die zwei Produkte Citrullin und NO. ADMA ist ein kompetitiver Inhibitor der NOS. Das bedeutet, dass ADMA mit L-Arginin um die Substratbindungsstelle des Enzyms konkurriert. Da es sich um eine kompetitive Inhibition handelt, d.h. die Inhibition ist reversibel, hängt folglich die Umsatzrate der NOS und damit auch die NO-Produktion von den jeweiligen Konzentrationen der beiden „Konkurrenten“ und deren Affinität zur Bindungsstelle ab.

Für ADMA wurde im Kleinhirn von Ratten eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der NO-Synthase von $1,8 \pm 0,1 \mu\text{mol}$ ermittelt [Faraci et al. 1995]. In kultivierten menschlichen Endothelzellen wurde eine IC_{50} von $3,9 \mu\text{mol/l}$ berechnet [Mügge et al. 2003]. Da ADMA ein kompetitiver Inhibitor der eNOS ist, braucht es im Beisein von ADMA folglich auch höhere Konzentrationen von L-Arginin, um pro Zeiteinheit eine bestimmte Menge an NO zu produzieren. Dieser Umstand lässt sich grafisch durch eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Arginin und die eNOS beschreiben.

Man weiß, dass zusätzliche Gabe von L-Arginin die NO-Produktion des Endothels fördert. Ebenfalls wurde gezeigt, dass L-Arginin, intravenös oder als Nahrungsergänzungsmittel, bei Tieren und beim Menschen eine endotheliale Dysfunktion verbessern kann [Cooke et al. 1991, Böger und Bode-Böger 2001]. Exogenes L-Arginin steigert hierbei die NO-Produktion. Eine Zeitlang wusste man diese Beobachtungen nicht zu erklären, denn L-Arginin liegt intrazellulär bereits in Konzentrationen von etwa $0,1\text{-}1 \text{ mmol/l}$ und im Plasma immerhin noch in Konzentrationen von etwa $210 \mu\text{mol/l}$ vor, wie zusammenfassend von Wu und Morris 1998 beschrieben wurde. Aufgrund dieses Überangebots an L-Arginin wäre also durch die Supplementation keine weitere nennenswerte Steigerung in der Aktivität der NO-Synthase zu erwarten, zumal der K_m -Wert der eNOS für L-Arginin bereits bei etwa $2,9 \mu\text{mol/l}$ erreicht ist. Diese vermeintliche Diskrepanz ist als das „L-Arginin Paradox“ bekannt.

Eine mögliche Erklärung wurde von Tsikas et al. (2000) aufgezeigt: Intrazelluläres, endogenes ADMA inhibiert tonisch die NOS, was dazu führt, dass die NO-Synthase

selbst unter physiologischen Bedingungen nicht ihre maximale Umsatzrate erreicht. Eine Supplementation führt dann über die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von L-Arginin, sowie über trans-stimulierten (s.u.) Export von ADMA zu einer verstärkten NO-Synthese.

Im Falle erhöhter ADMA-Plasmakonzentrationen kommt es zu einer noch stärkeren Inhibierung der intrazellulären NOS, ebenfalls im Zusammenhang mit Trans-stimulation (s.u.). Diese zusätzliche Hemmung verringert die NO-Synthese unter das physiologische Niveau.

2.4 ADMA kann den Gefäßwiderstand beeinflussen:

Palmer et al. (1987) sind einer Hypothese von R. Furchgott nachgegangen und haben gezeigt, dass der „EDRF“ von der NO-Synthase aus L-Arginin hergestelltes Stickstoffmonoxid ist. Vallance et al. (1992) fanden heraus, dass Methylarginine die Bildung des „EDRF“ inhibieren können. Die Positionierung von ADMA als wichtigen Regulator des vaskulären Widerstands war damit offensichtlich.

Azuma et al. konnten 1995 zeigen, dass nach Verletzungen des Endothels mit nachfolgender Regeneration in den neu gebildeten Endothelzellen signifikant erhöhte ADMA-Konzentrationen gemessen werden können. Gleichzeitig zeigten diese regenerierten Zellen eine deutlich verringerte endothelabhängige Vasodilatation.

An diese Versuche anknüpfend, konnten Masuda et al. 1999 eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Produktion von cGMP und der Konzentration von ADMA in den verletzten Zellen, sowie eine signifikante Korrelation der intrazellulären ADMA-Konzentration mit der Intima-Media Dicke eines geschädigten Gefäßes feststellen.

Es gibt experimentelle Studien am gesunden Menschen, in denen nach lokaler Verabreichung von ADMA eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen wurde [Calver et al. 1993]. Bei systemischen pharmakologischen Dosen von ADMA stellten andere einen Anstieg des systemischen vaskulären Widerstandes um $23,7 \pm 2,1\%$ fest. Ebenfalls beobachtet wurde ein Anstieg des arteriellen Blutdruckes, ein

Absinken der renalen Blutperfusion sowie eine Reduktion der kardialen Auswurfraction [Achan et al. 2003 und Kielstein et al. 2004]. Desweiteren zeigen auch Frauen, die im Verlauf eine Präeklampsie entwickeln, erhöhte ADMA-Konzentrationen im Blut. Hierbei ist die Plasmakonzentration bereits vor den ersten Symptomen erhöht [Holden et al. 1998].

2.5 ADMA und Krankheit

In den letzten 10 Jahren gab es einige epidemiologische Studien, die einen Zusammenhang zwischen ADMA-Plasmaspiegeln und Risikofaktoren u.a. für Herz-Kreislauferkrankung und für chronisches Nierenversagen nachgewiesen haben: Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen korrelieren z.B. mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Alter, Bluthochdruck, Diabetes, Insulinresistenz, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie oder Hyperhomocysteinämie [Böger et al. 1998, Miyazaki et al. 1999, Surdacki et al. 1999, Fujiwara et al. 2000, Abbasi et al. 2001, Lundman et al. 2001, Stühlinger et al. 2002, Stühlinger et al. 2003].

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die individuellen ADMA-Plasmakonzentrationen in einer Population chronisch Nierenkranker mit deren Risiko korreliert, an der Erkrankung frühzeitig zu sterben [Zoccali et al. 2001]. ADMA kann auch als Risikofaktor für das Erkrankungsrisiko und die Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen in einer Population mit variablem Risikoprofil hinzugezogen werden [Böger et al. 2009].

Es gibt einen, jeweils im Zusammenhang mit Alterung, Hochdruck und Herzinsuffizienz beobachteten Anstieg des Nierengefäß-Widerstandes. Die gemessenen ADMA-Konzentrationen sind hierbei prognostisch aussagekräftig [Kielstein et al. 2003(a) und Kielstein et al. 2003(b)].

Patienten mit Nierenversagen zeigen signifikant erhöhte ADMA-Werte, diese korrelieren zusätzlich direkt mit linksventrikulärer Hypertrophie und sind gegensätzlich mit der Auswurfraction korreliert [Zocalli et al. 2002].

Die Anzahl weiterer Studien ist groß und deren Aufzählung hier nur übersichtlich gehalten. Insbesondere im Hinblick auf kardiovaskuläre Schädigung ist ADMA von großem wissenschaftlichem Interesse: „Am Ende“ einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung findet sich immer eine Plaque in der Gefäßwand. Es gibt allerdings verschiedene Risikofaktoren, solch einen Plaque zu entwickeln. Verschiedene Risikofaktoren führen auf unterschiedlichen Wegen zu einer Schädigung der Gefäßwand, der Endpunkt ist allerdings gleich. Es ist zu vermuten, dass es einen Punkt gibt, an dem die verschiedenen Schädigungsmechanismen „zusammenlaufen“ und dass ab diesem Punkt dann eine einheitliche Kaskade abläuft. Wenn dem so ist, dann muss es auch Mediatoren geben, die die Bildung eines Plaques vermitteln. Es ist zum Beispiel bekannt, dass Monozyten hier eine große Rolle spielen. Andererseits liefern viele der oben genannten Studien Hinweise auf eine „kausale“ Beteiligung von ADMA.

Zwar sollte die Hoffnung, dass ADMA als Bindeglied möglicherweise direkt beeinflusst werden kann, nur mit Vorsicht behandelt werden: die Wegstrecke von „Ursache“ bis zur „Wirkung“ ist im Organismus üblicherweise redundant, sodass es, selbst wenn eine Strecke blockiert wird, noch genügend „Umgehungsstrecken“ gibt [Edelmann 2001]. Nichtsdestotrotz scheint der Quantifizierung von ADMA-Konzentrationen im Blut bei bestimmten Erkrankungen eindeutig eine prognostische Bedeutung zuzukommen. Im Folgenden werden einige grundsätzliche regulatorische Vorgänge im Körper in Bezug auf ADMA dargestellt.

2.6 Wie entsteht ADMA

Methylarginine, darunter auch das ADMA und L-NMMA sowie SDMA, entstehen durch die Methylierung von Arginin innerhalb der Peptidkette eines Proteins. Diese Methylierung findet posttranslational statt und dient der Modifizierung und Regulierung des entsprechenden Proteins, vergleichbar mit der Protein-Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Die entsprechenden Reaktionen werden durch bestimmte Enzyme, sogenannte Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) katalysiert [Clarke 1993 und Aletta et al. 1998]. Hierbei wird S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donator verbraucht.

In der Zelle dienen diese Mechanismen dazu, um beispielsweise den RNA-Abbau zu regulieren, Protein-Protein Wechselwirkungen zu ändern oder die Transkription zu beeinflussen [Bedford und Clarke 2009 und Nicholson et al. 2009].

Bisher hat man zwei Typen PRMTs identifiziert; beide dieser Typen katalysieren die Bildung von Monomethylarginin (MMA) aus L-Arginin, wohingegen der zweite Schritt sich je nach Enzym unterscheidet: Die Typ 1 PRMT katalysiert die Bildung von ADMA, während die Typ 2 PRMT symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) produziert [Bedford und Richard 2005 und Boulanger et al. 2005].

Freie Methylarginine entstehen zum Beispiel dadurch, dass im Rahmen des normalen Protein-Umsatzes die Peptidketten, aus denen Proteine bestehen, aufgespalten werden. Hierbei werden dann auch die verschiedenen methylierten Arginin-Reste innerhalb der Zelle freigesetzt.

2.7 Regulation von ADMA

In den Versuchen von Vallance et al. wurde ADMA als das Methylarginin mit der höchsten Konzentration im menschlichen Plasma identifiziert. Ein Teil dieser im Plasma enthaltenen Menge wird über die Nieren ausgeschieden. Die Ausscheidung von ADMA über die Nieren wird von Vallance et al. auf durchschnittlich 13,5 mg/d beziffert [Vallance et al. 1992].

Achan et al. (2003) gehen davon aus, dass der Mensch im Schnitt etwa 300 µmol ADMA pro Tag produziert (entspricht etwa 60 mg/d).

Vor über 30 Jahren wurde von McDermott (1976) im Tierversuch nachgewiesen, dass die „Wiederfindung“ von L-NMMA und ADMA im Urin (nach intravenöser Supplementation aller drei Methylarginine) im Vergleich zu SDMA deutlich geringer ist. U.a. aufgrund dieser Tatsache wurde dann, zusätzlich zu der renalen Ausscheidung, ein weiterer Mechanismus zur Entfernung des überschüssigen ADMA im Körper vermutet. Eine andere Studie von Ogawa et al. (1987) hat dann mittels radioaktiver Marker diesen Verdacht erhärten können.

Der größte Teil von ADMA und L-NMMA, nicht aber von SDMA, wird durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut - von diesem Enzym sind bis jetzt 2 Unterformen identifiziert, DDAH-1 und DDAH-2, wobei die DDAH-1 wesentlich höhere Metabolisierungsraten aufzuweisen scheint [Wang et al. 2007 und Pope et al. 2009]. Die DDAH wandelt L-NMMA und ADMA um in Citrullin und Monomethylamin, beziehungsweise Dimethylamin.

Die zwei Unterformen der DDAH lassen sich in verschiedenen Geweben, so z.B. den Nieren, Pankreas, Leber, Gehirn, Aorta, aber auch in Neutrophilen und Makrophagen nachweisen [Tran et al. 2003], wobei die DDAH1 eher in Geweben zu finden ist, die auch die nNOS exprimieren, während DDAH2 eher in Geweben mit viel eNOS zu finden ist [Leiper et al. 1999].

In Versuchen zeigte sich, dass die Hemmung der DDAH konzentrationsabhängig eine Verengung isolierter Arteriensegmente bewirken kann. Diese lässt sich durch zusätzliche Gabe von L-Arginin wieder aufheben [MacAllister et al. 1996]. Wird die DDAH gehemmt, so ergibt sich durch den verminderten Abbau des ADMA eine damit verbundene verstärkte Inhibition der NOS und damit auch Inhibition der Vasodilatation; dies führt zur Gefäßverengung.

Diese Beobachtung unterstützt die Einordnung der DDAH als wichtiges Enzym im Abbau und in der Regulation von ADMA. Eine Dysregulation dieses Enzyms ist neben der Niereninsuffizienz eine plausible Ursache für pathologisch erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen. Es wurde gezeigt, dass solch eine Dysregulation beispielsweise durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie z.B. Hypercholesterinämie oder hohe Zuckerwerte hervorgerufen werden kann [Ito et al. 1999 und Sorrenti et al. 2006].

2.8 ADMA – Transportwege

ADMA wird prinzipiell in allen Zellen des Körpers in unterschiedlicher Menge gebildet. Freies ADMA kann zum Teil noch innerhalb der Zellen metabolisiert werden (in unterschiedlichem Ausmaß), zum anderen Teil muss es die Zellen verlassen und

über die Extrazellulärflüssigkeit ins Plasma gelangen. Von dort kann es entweder über die Nieren ausgeschieden werden, oder es kann von anderen Zellen wieder aufgenommen werden, um dort metabolisiert zu werden. Es gibt Organe, die insgesamt mehr ADMA im Stoffwechsel umsetzen als sie selber produzieren, hauptsächlich die Leber und die Nieren [Nijveldt et al. 2003(a) und Nijveldt et al. 2003(b)].

Das Vorkommen von ADMA und Aminosäuren im Allgemeinen ist im Körper im Wesentlichen an drei Kompartimente gebunden: eine Plasmakomponente, ein intrazellulärer Anteil und ein proteingebundener Anteil. Diese drei Kompartimente beeinflussen sich gegenseitig und stehen miteinander im Gleichgewicht [Cynober 2002]. Aminosäuren können auch entgegen eines Konzentrationsgefälles transportiert werden. Je nach intra- und extrazellulärer Konzentration der entsprechenden Aminosäure wird hierbei von der Zelle Energie verbraucht. Ein Beispiel hierfür ist der Natrium-abhängige Co-Transport, der sich das Membranpotenzial zunutze macht. Es gibt aber auch Natrium-unabhängige Transporter: L-Arginin wird größtenteils über diese Natrium-unabhängigen Transporter geschleust. Die entsprechenden Transporter heißen CATs (cationic amino acid transporters) [Closs et al. 2006 und Closs 1996] .

Es gibt verschiedene Unterformen dieser Transporter. Die hier relevanten Vertreter sind CAT-1, CAT2A, CAT2B und CAT3 – mit jeweils unterschiedlicher Affinität zu ihren „Substraten“ und unterschiedlichem Verteilungsmustern innerhalb der Organe [Christensen 1984, White 1985, Deves und Boyd 1998, Mann et al. 2003]. ADMA ist ebenfalls ein gutes Substrat für den CAT [Closs et al. 1997]. Der Transport kann grundsätzlich in beide Richtungen erfolgen.

Es gibt Hinweise aus Tierversuchen, die zeigen, dass z.B. das Endothel eine wichtige Funktion als Abbauort für ADMA einnehmen kann. Diese Zellen können extrazelluläres ADMA aufnehmen [Hu et al. 2009]. Versuche mit kultivierten Endothelzellen zeigten ebenfalls, dass diese in einem ADMA-reichen Medium vermehrt ADMA aufnehmen [Bogle et al. 1995]. Infundiert man große Mengen L-Arginin, Lysin oder ADMA, dann lässt sich anfangs ein großer Anstieg der Plasmakonzentration messen; diese sinkt jedoch sehr schnell wieder ab und ist nach

kurzer Zeit wieder an den Ausgangswert angeglichen. Diese Tatsache spiegelt die große Transportfähigkeit der CATs wider, die in der Lage sind, ADMA aus der Zirkulation zu entfernen [Smulders et al. 1997, Prins et al. 2000, Kielstein et al. 2004].

Erythrozyten, die in 0,9% NaCl-Lösung inkubiert werden und dort unterschiedlichen extrazellulären ADMA-Konzentrationen ausgesetzt werden, zeigen initial einen starken Influx von ADMA, wenn die extrazelluläre Konzentration die intrazelluläre übersteigt. Wenn das extrazelluläre Medium frei von ADMA ist, dann lässt sich ein Efflux von ADMA aus den Erythrozyten nachweisen - die Konzentrationen gleichen sich also nach einiger Zeit an [Davids et al. 2012].

Der Transport ist letztendlich Ausdruck eines sich einstellenden Gleichgewichts zwischen extra-und intrazellulärer Konzentration. Hierbei spielen mehrere Faktoren eine Rolle: Die Konzentration der Aminosäuren auf der „trans“-Seite (also der jeweils gegenüberliegenden Seite) der Membran kann die CATs stimulieren. Dieser Prozess nennt sich „trans-stimulation“ [Closs 1996]. So kann z.B. extrazelluläres ADMA den Eflux von Arginin fördern und andersherum [Closs et al. 1997]. Vasoactive, hyperpolarisierende Substanzen wie Acetylcholin oder Bradykinin können die nach intrazellulär treibende Kraft auf die kationischen Aminosäuren erhöhen [Mann et al. 2003, Chin-Dusting et al. 2007]. ADMA kann neben der NO-Synthase auch die CATs hemmen [Closs et al. 1997, Wu und Morris 1998]. In gewissen Situationen, wie beispielsweise dem chronischen Nierenversagen, werden die CATs in der Membran von Erythrozyten verstärkt exprimiert; auch dies hat Einfluss auf das Konzentrationsgleichgewicht [Mendes et al. 2001].

2.9 ADMA als Biomarker:

Wenn es um gefäßbezogene Krankheiten geht, dann ist für den Untersucher der Zustand des Endothels von größtem Interesse. Bei einem konkreten Verdacht auf arteriosklerotische Veränderungen sind bildgebende Verfahren von großer Bedeutung. Für ein Screening-Verfahren eignen sie sich allerdings nicht. Hierfür ist es im klinischen Alltag notwendig, anderweitig einen Eindruck vom Zustand des Endothels zu erlangen, beispielsweise mithilfe von Biomarkern. Eine einfache

Methode ist die Bestimmung entsprechender Parameter in Blutbestandteilen. Die oben genannten Zusammenhänge lassen den Schluss zu, dass ADMA als Biomarker in Frage kommt. Bevor jedoch ein Biomarker im klinischen Alltag zur Anwendung kommt, muss sich zunächst erweisen, dass er bestimmte Voraussetzungen erfüllt:

- Zunächst müssen erhöhte Messwerte eindeutig mit einer Krankheit, bzw. mit einem Pathomechanismus korreliert sein.
- Der Analyt sollte mithilfe eines labortechnisch relativ einfachen Verfahren nachzuweisen sein, und die Durchsatzrate des Messverfahrens sollte verhältnismäßig groß sein.
- Schlussendlich ist es natürlich auch wichtig, dass eventuell erhöhte Werte eine prognostische Aussagekraft besitzen.

Aktuell gibt es bereits klinische Untersuchungen, in denen die Eignung von ADMA als prognostischer Indikator validiert werden soll [Mügge et al. 2003]. Hierbei ist auch von Interesse, mit welchem Verfahren die ADMA-Konzentrationen ermittelt werden können. Es gibt grundsätzlich mehrere Wege, eine Quantifizierung durchzuführen. Je nach Messmethode erfasst man unter Umständen unterschiedliche Kompartimente des Körpers. Es gibt einerseits eine Plasma-Komponente, andererseits auch intrazelluläre Komponenten. Da die Konzentration von ADMA und auch L-Arginin nicht überall gleich ist (s.o.), sondern variiert, kann man daher, in Abhängigkeit des erfassten Kompartiments, auch zu unterschiedlichen Messergebnissen kommen. Diese Tatsache spielt bei der Wahl der Messmethode eine Rolle. Wie bereits erwähnt, kann zur Bestimmung von ADMA einerseits Plasma oder Serum oder auch Vollblut verwenden. Viele klinische Blutparameter werden im Plasma/Serum bestimmt. Für ADMA gibt es allerdings bisher noch keine Routineverfahren. Es bleibt daher noch zu klären, ob es möglicherweise Messverfahren gibt, die von einer Vollblut-Messung profitieren.

Davids et al. (2012) haben jüngst den Zusammenhang zwischen intra- und extrazellulärem ADMA in Erythrozyten untersucht. Hierbei stellte die Gruppe fest, dass einerseits die Erythrozyten eine hohe Speicherkapazität von ADMA besitzen. Das ADMA liegt hierbei größtenteils nicht frei vor, sondern ist gebunden an Proteine. Insbesondere bei Krankheiten mit erhöhtem Blutumsatz (z.B. Sichelzellanämie oder

hereditäre Sphärozytose) ist daher eine signifikant verstärkte Freisetzung von ADMA denkbar. Andererseits stellten sie fest, dass sowohl die extrazelluläre Konzentration, als auch die intrazelluläre Konzentration an freiem ADMA in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war.

Frühere Ergebnisse anderer Gruppen konnten ebenfalls erhöhte intrazelluläre, proteingebundene Ansammlungen von ADMA aufzeigen [Billecke et al. 2006 und Billecke et al. 2009]. Auch hier kam man zu dem Schluss, dass Dysregulation der ADMA-Freisetzung aus Erythrozyten signifikant zu einer erhöhten Plasmakonzentration von ADMA beitragen könnte.

Bisher wurde lediglich der Zusammenhang zwischen gefäßbezogenen Krankheiten und Plasmakonzentrationen von ADMA in ausreichend großen Studien untersucht. Es bleibt zu klären, ob dieser Zusammenhang gleichermaßen deutlich zwischen Vollblut und Plasma besteht. Hierzu ist es zunächst erforderlich, Plasmawerte von Patienten und Kontrollen mit den entsprechenden Vollblutwerten in Zusammenhang zu bringen um ggf. erste Vergleiche anstellen zu können. Zu diesem Zweck stehen klinische Daten der „Chile-Studie“ zur Verfügung, die im Rahmen dieser Arbeit statistisch ausgewertet werden.

2.10 L-Arginin als zusätzlicher Messparameter:

Aufgrund der genannten Zusammenhänge zwischen ADMA und L-Arginin liegt es nahe, zu vermuten, dass auch den L-Arginin-Konzentrationen im Blut von Patienten eine Bedeutung zukommt. Mehrere Studien haben diesen Zusammenhang näher untersucht. In der Framingham-Offspring Studie wurde von Böger et al. (2009) gezeigt, dass Patienten mit hohen ADMA und niedrigen L-Arginin-Plasmakonzentrationen die höchste Mortalität besaßen.

Exogene Gabe von L-Arginin kann bei Patienten mit erhöhten ADMA-Spiegeln die Gefäßfunktion und Gefäßstruktur verbessern. Ebenfalls wird der Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen positiv beeinflusst. Dieser Effekt lässt sich durch die dadurch herbeigeführte Normalisierung der NO-Synthese erklären. L-Arginin kann

somit die endothelabhängige Vasodilatation und auch die klinische Symptomatik verbessern [Rector et al. 1996, Ceremuzyński et al. 1997, Böger et al. 1998, Lerman et al. 1998].

Studien über Restenosierung nach Angioplastik zeigen ebenfalls einen positiven Effekt von L-Arginin: Angioplastik-Patienten, die postoperativ eine intravenöse Gabe von L-Arginin verabreicht bekommen haben nach 6 Monaten eine um 36% geringere Verdickung der Intima-Media als die Kontrollgruppe [Suzuki et al. 2002].

Monozyten von hypercholesterinämischen Patienten zeigen durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen in der Gefäßwand verstärkte Interaktion mit dem Endothel. Dieser Zusammenhang korreliert ebenfalls mit erhöhten ADMA-Spiegeln und kann durch orale L-Arginin Supplementation positiv beeinflusst werden [Chan et al. 2000].

Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit profitieren von einer intravenösen Gabe von L-Arginin, sie zeigen danach signifikant erhöhte Durchblutung der Extremitäten und verlängerte schmerzfreie Intervalle beim Gehen [Böger et al. 1998].

2.11 Messverfahren für ADMA und L-Arginin

Es gibt grundsätzlich mehrere Möglichkeiten zur Messung von ADMA und L-Arginin. Für eine Übersicht empfiehlt sich die Arbeit „Quantification of ADMA: analytical approaches (Schwedhelm 2005). Im Folgenden werden hier lediglich die zwei Verfahren erläutert, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, nämlich HPLC-MS² und ELISA.

2.11.1 Tandem-MS-High-performance liquid chromatography (HPLC):

Diese setzt sich zusammen aus zwei analytisch relevanten Bestandteilen:

a) High-Performance liquid chromatography (HPLC)

Die High-performance liquid chromatography ist eine Möglichkeit ein Gemisch verschiedener Moleküle "auseinanderzunehmen" und die einzelnen Moleküle in Qualität, Quantität und Reinheit zu bestimmen. Die Technik hat mit der normalen Papier-Chromatografie nicht mehr viel gemeinsam. Es werden keine „Farben gezeichnet“, sondern die zu untersuchende Substanz wird mit Überdruck durch eine Filtersäule gepresst, an deren Ende ein Detektor die unterschiedlichen Substanzen identifiziert und quantifiziert.

Die HPLC benutzt eine ‚Stationäre Phase‘, die sich in einer länglichen Säule befindet und aus verschiedenen Materialien bestehen kann. Durch diese Säule wird dann mithilfe einer Pumpe die Probe gepresst, wobei die Probe selbst sich üblicherweise in einer sog. ‚Mobilen Phase‘ befindet, das bedeutet, dass sie sich in einem Lösungsmittel befindet. Am Ende dieser Säule befindet sich ein Detektor. Die Zeit, die ein Molekül braucht, um die stationäre Phase zu „durchqueren“ ist charakteristisch für jedes einzelne Molekül und hängt von mehreren Einflussfaktoren ab, so z.B. Polarität, Struktur und Größe der zu untersuchenden Substanz. Aber auch das Lösungsmittel, die „Porengröße“ der Säule und natürlich die Fließgeschwindigkeit sind zu berücksichtigen.

b) Massenspektrometrie (MS)

Es besteht die Möglichkeit, an die Methode der HPLC zusätzlich noch ein Tandem-Massenspektrometer anzufügen, welches die Proben somit noch sensitiver und spezifischer voneinander unterscheiden vermag. Dieses Verfahren nennt sich dann *LC-MS/MS*, oder *gleichbedeutend HPLC-MS²*.

Mit der Massenspektrometrie kann man in einem Vakuum die Molekülmasse freier Ionen bestimmen, beziehungsweise deren „Masse zu Ladungsverhältnis“ (m/z). Das ursprüngliche Prinzip der Massenspektrometrie funktioniert folgendermaßen:

Die zu untersuchende Probe wird mittels eines Hochvakuums in die Gasphase überführt und dort ionisiert (und teilweise auch fragmentiert). Die dadurch entstandenen Ionen können in einem elektrischen Feld auf eine definierte kinetische Energie beschleunigt werden. Sie durchfliegen daraufhin ein Magnetfeld und werden so auf Flugbahnen unterschiedlicher Radien (abhängig von der Masse der Teilchen) gezwungen. Nach Durchlaufen des Magnetfeldes können die Ionen dann mithilfe verschiedener physikalischer Verfahren detektiert werden. Es kann beispielsweise eine Auftrennung der Substanzen nach ihrer „Flugzeit“ erfolgen, oder auch über die erfolgte Auslenkung im Magnetfeld und darauffolgender Detektion in einem Sektorendetektor.

2.11.2 ELISA:

Eine weitere Möglichkeit, ADMA in einer Probe zu messen, ist die enzymgekoppelte Immunadsorption, genauer: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Dieses Verfahren wird schon seit Jahrzehnten in Labors angewendet, um bestimmte Stoffe mittels spezifischer Antikörper quantitativ nachzuweisen. Eine recht bekannte Anwendung findet sie beispielsweise in der Bestimmung des Antikörpertiters nach Impfung, oder in der Anwendung als HIV-Suchtest.

Es gibt unterschiedliche Formen des ELISA (vgl. Abb. 1). Allen gemeinsam ist, dass sie spezifische Antikörper nutzen. Durch ihre Spezifität sind Antikörper ideal, um eine einzelne Substanz (das Antigen) in einem Gemisch zu binden. Damit die Antikörper mit dem Substrat reagieren können, werden sie zusammen mit dem Analyten inkubiert. Im Anschluss wird das Reaktionsgefäß gewaschen, um den Überschuss zu entfernen. Nun wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch an den F_c-Teil des ersten Antikörpers.

Der Zweit-Antikörper ist zusätzlich mit Enzymen konjugiert. Am Ende eines zweiten Inkubationsverfahrens folgt ein erneuter Waschvorgang. Schließlich wird noch Substrat hinzugegeben. Die konjugierten Enzyme setzen dieses Substrat um und verursachen damit eine photometrisch messbare Farbänderung/Lichtdurchlässigkeit bei einer vorher definierten Wellenlänge.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit von DLD-Diagnostika handelt es sich um einen Kompetitions-ELISA, d.h. die Wände der 96-well-Platten sind mit Substrat beschichtet (siehe Abb. 1). Dieser ELISA misst die ADMA und L-Arginin-Konzentration in Vollblut.

Die Messung im ELISA kann ebenfalls mit Serum/Plasma geschehen; dieses Verfahren wurde bereits von Schulze et al. (2004) untersucht.

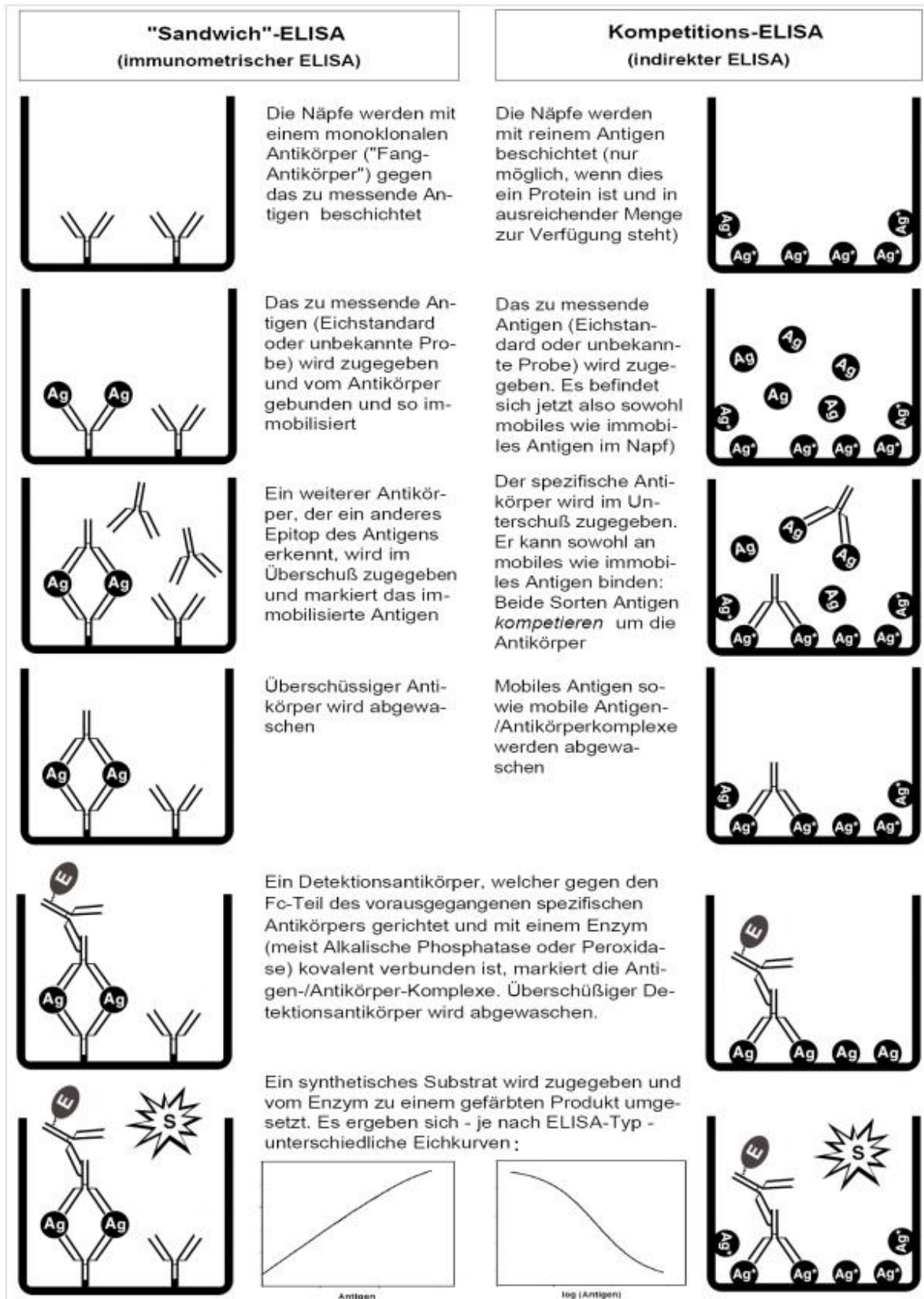


Abbildung 2: Vergleich zwischen Kompetitions- und Sandwich-ELISA, Auszug aus dem „Biochemie Skript 3. Fachsemester 2009“ der Abteilung für Biochemie am UKE.
 Verfasser: PD Dr. Wolfgang Weber

2.12 ADMA in Vollblut und in Plasma

Das Messergebnis des Vollblut-ELISA spiegelt letztlich unterschiedliche Kompartimente wider: es gibt eine zellfreie Komponente, bestehend aus Blutplasma, und eine zytosolische Komponente, hauptsächlich bestehend aus Erythrozyten (und auch anderen natürlicherweise im Blut vorkommenden Zellen wie z.B. Thrombozyten oder Monozyten).

Es ist also nicht abwegig, dass im Vergleich zwischen LC-MS/MS und ELISA die insgesamt gemessene Menge an freiem ADMA variiert. Die Ergebnisse von Davids et al. (2012) liefern eine Grundlage für die Hypothese, dass der ADMA-Gehalt von Erythrozyten in gewisser Weise mit dem Plasmagehalt korreliert.

Durch das Auftropfen des Blutes auf das Filterpapier lysieren alle Zellbestandteile im Blut. Hierdurch könnte sich die Menge des Analyten verändern. Es ist denkbar, dass aus dem Intrazellulärraum freigesetzte Enzyme die ADMA- und die L-Arginin-Konzentration nachträglich erhöhen oder verringern.

Davids et al. (2012) haben bei Experimenten mit lysierten Erythrozyten auch nach 18 Stunden keine nennenswerte Metabolisierung durch freigesetzte Enzyme (DDAH) feststellen können. Jedoch ist nach der Lyse der Gehalt an freiem ADMA deutlich angestiegen. Es wurde vermutet, dass der größte Teil des nachträglich freigesetzten ADMAs durch Proteinolyse entstanden ist. Vom Auftropfen auf das Filterpapier bis zur anschließenden Trocknung ist das Zeitfenster für enzymatische Veränderung der Analytenkonzentration jedoch deutlich kleiner als 18h. Die Möglichkeit der nachträglichen Umsetzung sollte trotzdem berücksichtigt werden. Eigene Versuche, in denen die Karten bei hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 100%) für 24 h gelagert wurden, zeigen eindeutig eine relative Verminderung der gemessenen Konzentrationen, sowohl von ADMA, als auch von L-Arginin.

Die lysierten Blutbestandteile enthalten das Enzym Arginase [Jacobsen et al. 2007]. Während der Trocknung bleibt das Enzym für eine gewisse Zeit aktiv und verändert somit die gemessene Konzentration des Analyten. Es besteht die Möglichkeit, einen Inhibitor einzusetzen, der diesen Prozess stark hemmt. Bei dem Inhibitor handelt es sich um Nor-NOHA, ein Strukturanalog des L-Arginin und Zwischenprodukt der NO-

Synthese. Nor-NOHA wird vor dem Betropfen der Karten mit Blut auf die Karten aufgesprüht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit L-Arginin und ADMA kann man jedoch eine gewisse Kreuzreaktivität feststellen. Auch dieser Prozess soll validiert werden.

2.13 Validierung diagnostischer Tests:

Bevor ein diagnostischer Test im Klinikalltag benutzt wird, muss er zunächst validiert werden, das heißt, dass anhand von verschiedenen Kriterien die Wiederholbarkeit der Testergebnisse untersucht werden muss. Existiert bereits ein etabliertes Testverfahren, so kann außerdem das neue Testverfahren mit dem Alten verglichen werden.

Eine Methodenvvalidierung findet zum Teil noch während der Entwicklungsarbeit einer Methode statt. Es ist andererseits prinzipiell nicht möglich, sämtliche potenziellen Einflussfaktoren vorab zu untersuchen, die Aufgabe des Untersuchers liegt vielmehr in einer Auswahl der wahrscheinlichsten Störfaktoren im klinischen Alltag. Das vorliegende Testverfahren von DLD Diagnostika wurde in Bezug auf einige Aspekte bereits ausführlich auf Grundlage von ISO-Normen untersucht. In dieser Arbeit wurden neben grundlegenden (bereits validierten) methodenspezifischen Kenngrößen unter anderem auch die „Robustheit“ der Methode untersucht. Robustheit beschreibt die Unempfindlichkeit eines Analyseverfahrens gegenüber Änderungen von Umweltparameteren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit etc.).

Um objektiv die Güte eines Messverfahrens zu beurteilen, gibt es bestimmte methodenspezifischen Kenngrößen. Im Folgenden sollen einige dieser Kenngrößen der Methodenvvalidierung erläutert werden.

- 1) „Robustheit“ beschreibt die Unempfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen.
- 2) „Präzision“ beschreibt die analytische Streuung einer Messmethode unter der Annahme, dass keine Messfehler vorliegen. Wichtige Kenngrößen für die Präzision sind beispielsweise die

- a) Intra-Assay-Varianz, sowie
- b) die Inter-Assay-Varianz.

Diese beiden Begriffe beschreiben die auftretende Varianz bei der Messung ein und derselben Probe

- a) mehrfach im selben Assay, oder
- b) mehrfach in aufeinanderfolgenden Assays.

- 3) Die „Richtigkeit“ der Methode beschreibt, wie sehr ein erhobener Wert mit einem erwarteten Wert übereinstimmt (bspw. einer Kontrollprobe).
- 4) „Genauigkeit“ ist ein Maß für den Gesamtfehler bei einer Analyse und setzt sich zusammen aus den Werten für Präzision und Richtigkeit.

Da in der Labormedizin nahezu alle Messungen „in vitro“ erfolgen, kann nicht mit aller Bestimmtheit von einem Messwert auf den tatsächlichen „in vivo“-Wert geschlossen werden (s.u.). Aussagen über die „Richtigkeit oder Genauigkeit“ eines Verfahrens sind somit nicht ohne Einschränkungen zu treffen. Ganz konkret in Bezug auf diese Arbeit ist es beispielsweise nicht möglich, eine Kontrollprobe mit einer genau definierten Menge des Analyten herzustellen, um dann anhand dieser Probe das Messverfahren zu kalibrieren. Die Eigenschaften des Blutes (bspw. Viskosität, Erythrozyten, Leukozyten, Enzyme) sind nicht zu simulieren. Man kann also keine künstliche Blutprobe im Reagenzglas herstellen, die dieselben Eigenschaften wie echtes Blut hat. Ebenfalls ist es nicht möglich, den genauen Zustand des Blutes und seiner Bestandteile im Organismus zu untersuchen („in vivo“), man muss zunächst das Blut aus dem Körper entnehmen („in vitro“), um es zu untersuchen und verfälscht möglicherweise hiermit das Ergebnis. Aus diesem Grund kommt dem Vergleich des neuen Verfahrens mit einem älteren, bereits etablierten Verfahren, eine recht große Bedeutung zu:

Bland und Altman (1986) argumentierten, dass man im Falle unterschiedlicher Messergebnisse bei tatsächlich unbekanntem „in-vivo“-Wert nicht davon ausgehen sollte, dass eines der Verfahren dem anderen überlegen ist, sondern vielmehr, dass beide Verfahren einen Wert liefern, der sich dem wahren Wert annähert. Sie schlagen vor, dass für eine quantitative Untersuchung der Übereinstimmung zweier

Verfahren, der durchschnittliche Wert beider Verfahren verglichen wird mit der Differenz zwischen der einen und der anderen Methode. Sie schlagen vor, dass man mit diesen Wertepaaren ein Punktediagramm erstellt um graphisch den Zusammenhang zu analysieren.

Aus einem Wertepaar S_1 und S_2 , wobei S_1 und S_2 Werte der jeweiligen unterschiedlichen Messmethoden darstellen, ergibt sich im Punktediagramm der neue Wert $S(x, y)$ nach der Formel:

$$S(x, y) = \frac{S_1 + S_2}{2}, (S_1 - S_2)$$

Für den in dieser Arbeit behandelten Vergleich zweier Messverfahren, nämlich LC-MS/MS und dem Vollblut-ELISA, sollten ebenfalls diese von Bland & Altman 1986 eingeführten Regeln gelten.

Prinzipiell gilt bei der Validierung einer Methode, dass für die Schwankungsbreite der einzelnen Kenngrößen, also bspw. der Präzision, vorab Grenzwerte einer noch tolerierten Schwankungsbreite festzulegen sind. Die Präzision die für einen Test benötigt wird, hängt von der klinischen Relevanz der Konzentrationsänderung ab.

Für Vollblut, wie es in dem untersuchten ELISA verwendet wird, existieren noch keine Referenzwerte von ADMA und L-Arginin. Nichtsdestotrotz ist es für die Validierung dieses Testverfahrens notwendig, vorab Grenzwerte festzulegen, bis zu denen die ermittelte Präzision noch vertretbar ist.

Es existieren einige Leitlinien für eine Methodenvvalidierung, wie beispielsweise die vom Umweltbundesamt herausgegebene „Leitlinie zur Methodenvvalidierung“ (Wellmitz und Gluschke 2005) oder die Vorgaben („Guidelines“) der „Federal Drug Administration“ (FDA) vom „U.S. Department of Health and Human Services“ der Vereinigten Staaten von Amerika. Laut den „Guidelines“ der FDA wird beispielsweise für die „Bioanalytical Method Validation“, also die Validierung biochemischer Messverfahren, eine einzuhaltende Grenze von 15% für den Variationskoeffizienten (CV) der Intra-Assay-Variabilität empfohlen (Stand: 2011).

Bei dieser Arbeit erfolgte eine Orientierung an der Leitlinie der FDA (Stand: 2011), sowie an dem Werk von Wellnitz und Gluschke (2005).

Es gibt außerdem allgemeine Normen nach der ISO-Klassifikation, diese sind beispielsweise von einem Unternehmen zu erfüllen, das ein Medizinprodukt auf den Markt bringen möchte. Auf diese soll hier nicht weiter eingegangen werden, sie wurden nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Materialien

ADMA-Arginin-Card ELISA	DLD Diagnostika GmbH, Hamburg
Sarstedt Halbautomatische Einmallanzetten (Safety-Lanzetten)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Safety-Multifly-Set®, „blau“, 23G 0,6 Ø x 19mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Monovette® EDTA KE 2,7 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Combitips Advanced 2,5ml & 5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safelock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipette „Reference“ 10-100 µl & 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipette „Research“ 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettenspitzen 200 µl „gelb“	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettenspitzen 1000 µl „blau“	Eppendorf AG, Hamburg
Sarstedt SafeSeal Reagiergefäß 2ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Greiner Bio-one PP-microplate 96 well U-shape	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Sarstedt Serological Pipette 5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Hirschmann Laborgeräte „Pipetus®“	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Heidolph „Reax Control“	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Tecan Sunrise Remote Art.Nr.: F039300 Ser.Nr.: 0393003434	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
MRW (AM60) Waschautomat Ser.Nr.: GA 2862	
Heidolph Titramax 101 Ser.Nr.: 070408175	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Eppendorf Centrifuge 5415R (Bj. 2002)	Eppendorf AG, Hamburg
Brand Messzylinder 500:10ml ±5ml in 20°C	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Millipore „Milli-Q“ Plus Geräte Nr.: 63420 Ser.Nr.: F5JM97117S	Merck Millipore Headquarters, Billerica, Massachusetts, USA
Kühltruhe Liebherr „Comfort“ (-22°C) Geräte Nr.: 302510	
Kühlschrank Liebherr „FKS 5010“ Sollbereich +2°C bis +10°C Geräte Nr.: 302512	
UV-Leuchtstoffröhre „SOLAR REPTIL SUN 30W (6000K)“	JBL GmbH & Co. KG, 67141 Neuhofen
Wärmeschrank	
Inkubationsbehälter	
Zeitschaltuhr	
Varian L1200 MS/MS inkl. Computer/Drucker	
HPLC Varian ProStar	
Eppendorf Zentrifuge 5810R	
Heizblock	

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

N-ω-Hydroxy-nor-L-arginin (nor-NOHA)	Calbiochem #399275
Protease Inhibitor Cocktail (Lösung)	Sigma Aldrich
Millipore 96well-Filterplatten 0.22 μm MultiScreen	Millipore MSGVN 2210
Greiner PP Mikrotiterplatten	Greiner 650201
Abdeckmatte für MegaBlock 1.2 mL (rund)	Sarstedt
Acetat-Klebefolie	
Eppendorf epTIPS 100 μL	
Eppendorf 8-Kanal Transferpipette 20 bis 200 μL	
Brand Multipette	
Acetonitril, gradient grade	
Methanol, gradient grade	
Wasser, gradient grade (Baker)	
Astec Chirobiotic T Vorsäule 20x1.0 mm	Alltech (spec Astec) 12101
L-Arg	
L-NMMA	
ADMA	

Methanol/Wasser 50:50, pH 5 (gepuffert mit HCOOH/NH3)	
Deuteriertes (d7-) Arginin	Cambridge Isotope Labs, EURISO-Top, DLM-541
Butanolische Salzsäure	Herstellung: 1 L Butanol für die HPLC, Acetylchlorid p.A. wird benötigt 100 mL Butanol werden der Flasche entnommen und zum Spülen der Glasgeräte verwendet. Ein Rührfisch wird in die Flasche gegeben und diese mit Eis gekühlt. Unter ständigem Rühren wird im Abzug innerhalb von 5-10 min 100 mL Acetylchlorid zugesetzt. Dabei kommt es zur Erwärmung der Butanolfflasche. Nach Zugabe wird der Rührfisch entfernt und die Flasche verschlossen und weitere 5-10 min im Eis stehen gelassen. Der Erfolg der Reaktion kann durch pH-Papier geprüft werden (innerhalb von 5 min nach dem Auftropfen sollte der pH-Wert 1 erreicht sein).
Aqua dest.	

Tabelle 4: Verwendete Software

Magellan V 4.00	
Reader Server V 4.50	
„Sunrise“ Firmware V 3.17	

Tecan Calc 4 V 4.50	
ImportExport 4 V 4.50	
Plattendefinitionseditor V 4.50	
Tecan Components V 1.21	
GraphPad Prism 5	
IBM SPSS Statistics 21	
Microsoft Excel 2007	
Varian Mass Spectrometry Workstation	

3.2 Blutproben:

Um den Zusammenhang zwischen den zwei Messverfahren ELISA und LC-MS/MS näher zu untersuchen, wurden aus zwei Kollektiven Blutproben entnommen und jeweils in beiden Verfahren gemessen, um Vergleichsdaten zu erlangen. Die daraus entstandenen Wertepaare wurden mithilfe eines t-Tests und eines Bland-Altman-Plots, sowie der Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht. Die zwei Kollektive werden im Folgenden beschrieben:

1. Dialysepatienten aus dem Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf (UKE):

Um Wertepaare im oberen Konzentrationsbereich zu erlangen, wurden Dialysepatienten in die Studie mit eingeschlossen. Die Blutproben aus diesem Kollektiv stammten von zwanzig freiwilligen Dialysepatienten, denen 2,7 ml Blut aus

einer laufenden Blutentnahme entnommen wurde. Als einziges Auswahlkriterium wurde bei diesen Probanden eine Dialysepflichtigkeit vorausgesetzt.

2. Gesunde Probanden aus dem Institut für Pharmakologie

Um gleichfalls Wertepaare im unteren Konzentrationsbereich zu erlangen, wurden zusätzlich 17 freiwillige, gesunde, nicht dialysepflichtige Probanden aus dem Institut für klinische Pharmakologie mit in die Studie eingeschlossen.

3.2.1 Probengewinnung und Aufbewahrung:

Das Blut wurde, soweit nicht anders beschrieben, mit einem Sarstedt Safety-Multifly-Set® aus der Ellenbeugenvene entnommen und in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Für die Gewinnung von Plasma wurde das Blut direkt nach der Entnahme bei 3000x G für 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Das auf diese Weise entstandene Plasma wurde in 1,5ml Safe-Lock Reaktionsgefäßen bei -20°C tiefgefroren.

3.2.2 Chile Studie:

Für den Vergleich zwischen LC-MS/MS und ELISA wurden außerdem bestehende Messwerte einer älteren Studie untersucht. Die sogenannte „Chile-Studie“ hatte das Ziel, Risikofaktoren für die Höhenkrankheit zu untersuchen. Die Studie bestand aus einer Gruppe von 100 freiwilliger, zufällig ausgewählten Berufssoldaten zwischen 17-21 Jahren, die zum ersten Mal einer größeren Höhe ausgesetzt wurden, und in 3.500m über NN in chronischer Hypoxie Arbeit verrichtet haben. Die Studie wurde in Chile durchgeführt.

In dieser Studie wurden Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen (Baseline, nach 1, 2, und 6 Monaten) und mit beiden Messverfahren analysiert. In dieser Arbeit wurden, aufgrund der niedrigen Fallzahlen in allen anderen Reihen, nur

die Ergebnisse aus der Baseline-Messung verwendet (N=91). Das entnommene Blut wurde verwendet, um ADMAcards mit Blut zu betropfen, und um Plasma zu gewinnen. Die Plasmaproben wurden tiefgefroren und zusammen mit den betropften ADMAcards nach Deutschland transportiert um dann im Institut für klinische Pharmakologie des UKE analysiert zu werden. Die entsprechenden Wertepaare der Baseline-Messung, sowie der Messung nach sechs Monaten kommen in dem Vergleich zwischen ELISA und LC-MS/MS zur Verwendung.

3.3 Methoden

3.3.1 Messung von ADMA und L-Arginin mittels ELISA:

Vollblut wurde auf eine Karte aus Filterpapier getropft und daraufhin getrocknet. Dann wurden mithilfe einer Stanze drei Trockenblut-Stanzlinge aus der präparierten Karte entnommen. In einem Elutionsvorgang wurden die zu untersuchenden Blutbestandteile ADMA und L-Arginin aus dem Filterpapier gelöst. Darauf folgte ein Acylierungsvorgang. Zum Schluss wurden die Proben in einem kompetitiven ELISA untersucht und so die Konzentration von ADMA und L-Arginin bestimmt.

Die Messung der ADMA-Karten erfolgte jeweils unter den gleichen Bedingungen. Da ELISAs temperaturempfindlich sind, wurde in einem gleichmäßig klimatisierten Raum gearbeitet. Zugluft wurde vermieden, ebenso direktes Sonnenlicht. Die Inkubationszeiten verliefen stets nach Vorgabe.

3.3.2 Präparation und Aufbewahrung der Karten:

Das Blut der freiwilligen Probanden wurde jeweils auf eine ADMA-Karte aus Filterpapier aufgetragen. Die ADMA-Karten wurden so betropft, dass jedes der sechs Felder auf der Karte ausreichend mit Blut bedeckt war. Es wurde allerdings bewusst keine einheitliche Blutmenge für alle Karten verwendet, sondern lediglich auf ausreichende Benetzung der Felder geachtet. Das Blut wurde, soweit nicht anders

beschrieben, mit einem Sarstedt Safety-Multifly-Set aus der Ellenbeugenvene entnommen und in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Die Verweildauer im EDTA-Röhrchen betrug nicht mehr als 10 Minuten.

Die betroffenen Karten wurden daraufhin mindestens einen Tag lang getrocknet um danach in den einzelnen Testreihen verwendet zu werden.

Die ADMA-Karten wurden, soweit dies durch die Art des Tests nicht anders vorgesehen war, unter trockenen Bedingungen luftdicht verpackt und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Jeder Verpackung wurde Kieselgel hinzugefügt um Feuchtigkeitsschwankungen möglichst zu reduzieren.

Für einzelne, entsprechend gekennzeichnete, Testreihen wurden die ADMA-Karten vorher mit Nor-NOHA präpariert. Es handelt es sich dabei um einen hochpotenten, kompetitiven Arginase-Inhibitor. Hierdurch sollte der Einfluss der Arginase auf die trocknenden Blutstropfen verringert werden. Nor-NOHA ist ein Strukturanalog von L-Arginin.

Bei der Präparation wurde folgendermaßen vorgegangen: Es wurden 3x 25µl einer 400mM Lösung pro Karte aufgetragen. Die Lösung wurde aufgetragen, bevor Blut aufgetropft wurde und die Karten wurden gleichfalls vorher mindestens für zwei Stunden getrocknet, bevor sie weiter verwendet werden konnten.

Zum Zeitpunkt der Messung wurden die ADMA-Karten mit einem Standard-Lochstanzgerät mittig ausgestanzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Stanzlinge komplett mit getrocknetem Blut ausgefüllt sind.

3.3.3 Vorbereitung der Reagenzien

Zunächst wurden die Stanzlinge mit dem getrockneten Blut in eine Elutionslösung überführt. Hierzu wurden drei Stanzlinge mit 300 µl Elutionslösung in ein Elutions-Röhrchen gegeben. Gleiches galt für die 15 µl der einzelnen Standards. Daraufhin

wurden die Röhrchen 20 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gemischt und in Folge bei 3000 x g für fünf Minuten zentrifugiert.

Es folgte die Acylierung, diese wurde in Doppelbestimmung angesetzt. Es wurde zweimal je 75 µl aus jedem Elutionsröhrchen in die Reaktions-Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wurde in jeden Well 25 µl Acylierungspuffer zugegeben. Es folgten 50 µl Ausgleichsreagenz. Die Reaktionsplatte wurde dann für ca. zehn Sekunden gemischt.

Dann wurde 25 µl einer frisch angesetzten Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen hinzugegeben und diese sofort offen auf einem Schüttler gemischt, ohne die Platte abzudecken oder zuzukleben.

Die Reaktionsplatte wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur offen auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Je 75 µl der so vorbereiteten Proben wurden in dem ADMA-ELISA und je 25 µl der so vorbereiteten Proben wurden in dem Arginin-ELISA eingesetzt.

3.3.4 ADMA-ELISA:

Je 75 µl der acylierten Standards 1-7 und der zu untersuchenden Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der ADMA-Mikrotiterstreifen pipettiert.. Hierzu wurden pro Vertiefung je 25 µl ADMA-Antiserum gegeben. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und 15-20 Stunden bei 2-6°C inkubiert.

Nach dem Inkubieren mussten alle Vertiefungen entleert werden, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer gefüllt und wieder entleert werden. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt.

Es folgten je 100 µl Enzym-Konjugat, die in alle Vertiefungen pipettiert wurde.

Danach wurde nochmals für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubiert.

Die Mikrotiterplatte musste erneut gewaschen werden, dann je 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettiert werden.

Im Folgenden wurde erneut 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubiert. Zum Schluss wurde je 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettiert.

Die Streifen wurden im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450nm innerhalb von 20 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650nm) gemessen.

3.3.5 Arginin-ELISA:

Je 25 µl der acylierten Standards 1-7 und der zu untersuchenden Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der ADMA-Mikrotiterstreifen pipettiert.. Hierzu wurden pro Vertiefung je 50 µl L-Arginin-Antiserum gegeben. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und 15-20 Stunden bei 2-6°C inkubiert.

Nach dem Inkubieren wurden alle Vertiefungen entleert, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer gefüllt und wieder entleert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt.

Es folgten je 100 µl Enzym-Konjugat, das in alle Vertiefungen pipettiert wurde.

Danach wurde nochmals für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubiert.

Die Mikrotiterplatte wurde erneut gewaschen, dann wurden je 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettiert.

Danach wurde erneut 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubiert. Zum Schluss wurde je 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettiert.

Die Streifen wurden im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450nm innerhalb von 20 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650nm) gemessen.

3.3.6 Messung und Berechnung der Werte:

Die OD-Werte der Standards (linear) wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Es wurde die 4-Parameter-Messmethode verwendet. Es handelte sich um eine Endpunktmessung. Die Messwellenlänge betrug 450 nm, die Referenzwellenlänge 620 nm.

3.3.7 Evaluation:

Die Berechnungen der Analytenkonzentration erfolgte mithilfe einer Eichkurve. Für ADMA gab es in der Eichkurve sieben Standards (0,001 / 0,2 / 0,5 / 0,8 / 1,4 / 4 / 10 $\mu\text{mol/l}$). Für L-Arginin gab es ebenfalls sieben Standards in der Eichkurve (0,001 / 2 / 6 / 20 / 60 / 200 / 600 $\mu\text{mol/l}$). Bei den Versuchsreihen wurde darauf geachtet, dass die gemessenen Standards im relevanten Konzentrationsbereich von 0,5 - 4 $\mu\text{mol/l}$ für ADMA, bzw. 6-200 $\mu\text{mol/l}$ für L-Arginin, nie mehr als 15% vom Referenzwert abweichen. Ansonsten wurde die Messung wiederholt.

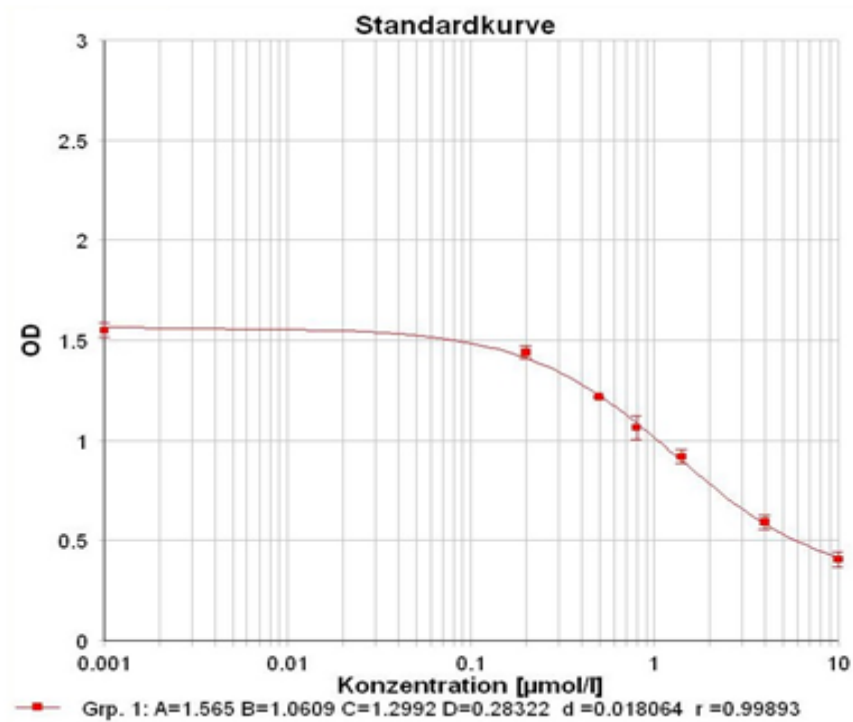


Abbildung 3: Beispiel für eine ELISA Standardkurve für ADMA

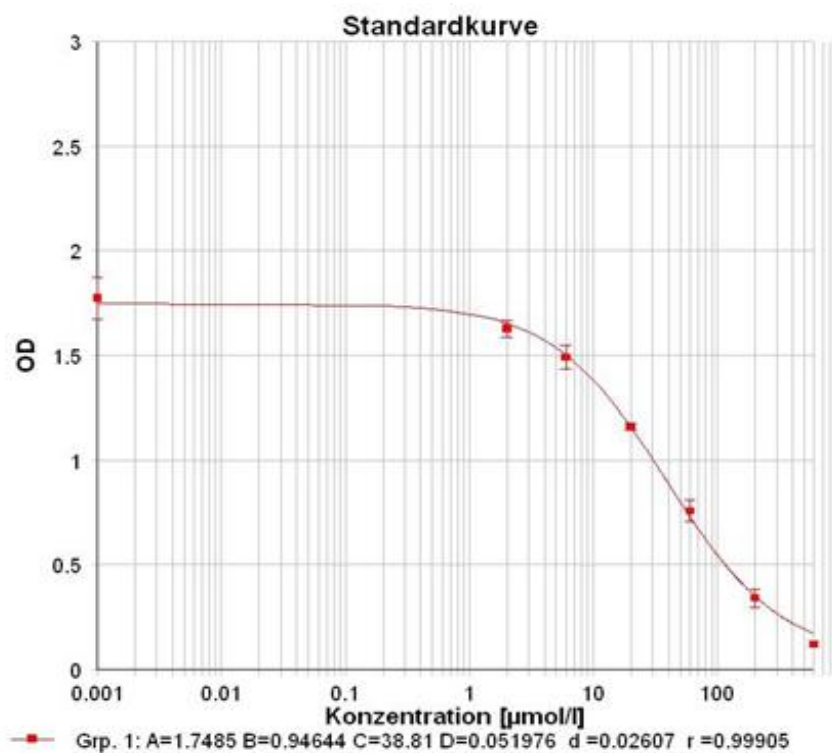


Abbildung 4: Beispiel für eine ELISA Standardkurve für L-Arginin

3.3.8 Messung von ADMA und L-Arginin mittels LC-MS/MS:

Durch das LC-MS/MS-Verfahren können die Konzentrationen von ADMA, SDMA, L-NMMA und L-Arginin im Plasma von Patienten oder Probanden bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit war lediglich die Bestimmung von ADMA und L-Arginin relevant. Die hier verwendete Methode zur Bestimmung von ADMA und L-Arginin im menschlichen Plasma basiert auf dem von Schwedhelm (2005) beschriebenen LC-MS²-Verfahren.

Die Messung erfolgte im Plasma. Die Blutentnahme erfolgte wie unter Punkt 3.1.5. beschrieben. Plasma wurde durch Zentrifugation der Blutproben (15 min bei 3000g) gewonnen. Daraufhin wurden die Plasma-Proben bis zur Verarbeitung in 1,5ml Safe-Lock Tubes bei -20°C tiefgefroren und so gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen, konnten die Proben dann für das LC-MS/MS Verfahren verwendet werden.

Als erste Maßnahme vor der Messung wurde eine mit Methanol verdünnte (1:1000) Lösung internen Standards hergestellt. Daraufhin wurde eine Multiscreen 96well-Filterplatte auf einer 96well-Unterplatte positioniert. Vom verdünnten Standard wurden daraufhin 100µl in die einzelnen Vertiefungen der Filterplatte pipettiert. Daraufhin folgen 25 µl Kalibrierlösung für ADMA in den Konzentrationsschritten 0 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, jeweils in Dreifachbestimmung, und für L-Arginin in den Konzentrationsschritten 0 µM, 60 µM, 120 µM, 250 µM, ebenfalls in Dreifachbestimmung. In die verbleibenden Wells werden 25 µl der zu untersuchenden Plasmaproben (in Doppelbestimmung), sowie am Ende zwei Qualitätskontrollen (ebenfalls in Doppelbestimmung) für ADMA (0,5 und 1,0 µmol/l) und L-Arginin (60 und 120 µmol/l) hinzugegeben. Daraufhin wurde die Platte bei Raumtemperatur 15 min geschüttelt. Es wurde vorsichtig pipettiert, eine optische Kontrolle wurde stets durchgeführt.

Die MultiScreen 96well-Platte wurde dann zusammen mit einer Polypropylenplatte bei 2000 rpm in einer Plattenzentrifuge für 15 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Erfolg optisch kontrolliert. Die Polypropylenplatte wurde dann auf den Heizblock gestellt, der zuvor auf 75°C geheizt wurde (unter dem Abzug). Nach ca. 30 min (als die Flüssigkeit komplett verdampft war) wurde die Platte kurz unter den Abzug gestellt und dann wurden je 100 µL butanolische Salzsäure zugegeben,

hierdurch wurde die Probe alkyliert. Die Platte wurde mit einer Abdeckmatte fest verschlossen um eine quantitative Derivatisierung zu gewährleisten. Die verschlossene Platte wurde daraufhin bei 65°C 30 min lang auf dem Heizblock geheizt (mit einer Plexiglasscheibe und einem Gewicht versehen, um zu verhindern, dass die Abdeckmatte durch den Dampfdruck abgelöst wird). Danach wurde die Platte für 1 min bei 2500 rpm (4°C) zentrifugiert und die Abdeckmatte unter einem Abzug wieder entfernt. Die butanolische Salzsäure wurde bei 75°C für ca. 60 min auf der Heizplatte verdampft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur, ebenfalls unter einem Abzug, wurde die Platte mit einer Abdeckmatte verschlossen und bei –20°C bis zur Messung gelagert.

Vor der Messung wurde mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well 100 µL Methanol/Wasser 50/50 (v/v), pH 5 (gepuffert mit HCOOH/NH₃), gegeben. Für das Lösen der Analyten wurden die 96well-Platten mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 min (RT) geschüttelt. Anschließend wurden die Proben auf eine neue MultiScreen 96well-Platte pipettiert (Mehrkanalpipette) und 5 min bei 2000 rpm (4°C) zentrifugiert. Die Messung auf dem Varian L1200 MS/MS Massenspektrometer erfolgte isokratisch mit den HPLC Varian ProStar Pumpen, 66 % Acetonitril, 33 % (0,1 %ige) Ameisensäure.

Bei dem Messverfahren werden die alkylierten Proben ohne Säulenchromatographie direkt in das Gerät eingeführt. Nach Alkylierung liegen ADMA, SDMA, L-NMMA und Arginin als entsprechende Ester vor. Im Electrospray-Interface kommt es dann zur Ionisierung. Im ersten Massenfilter (Quadrupol) wurden bestimmte Ionen selektiert, die dann in der Stosszelle mit Argonmolekülen kollidieren und somit weiter fragmentieren. Es entstehen dabei typische Fragmente, die im zweiten Massenfilter selektiert wurden und schließlich ein Signal erzeugen. Mit dieser Technik ist es möglich, innerhalb eines Laufes simultan ADMA, SDMA, L-NMMA und Arginin zu erfassen.

Für die Bestimmung von ADMA, SDMA, L-NMMA und Arginin wurde mittels „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) der Übergang der Ionen m/z 259.3 zu m/z 214, m/z 259.3 zu m/z 228, m/z 245.3 zu m/z 172 und m/z 231.3 zu m/z 70 verfolgt. Die Quantifizierung erfolgte durch Zusatz von internem, deuteriertem Standard. Als

interne Standards wurden d6-ADMA, d6-NMMA und d7-Arginin zugesetzt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm „Mass Spectrometry Workstation“ der Firma Varian.

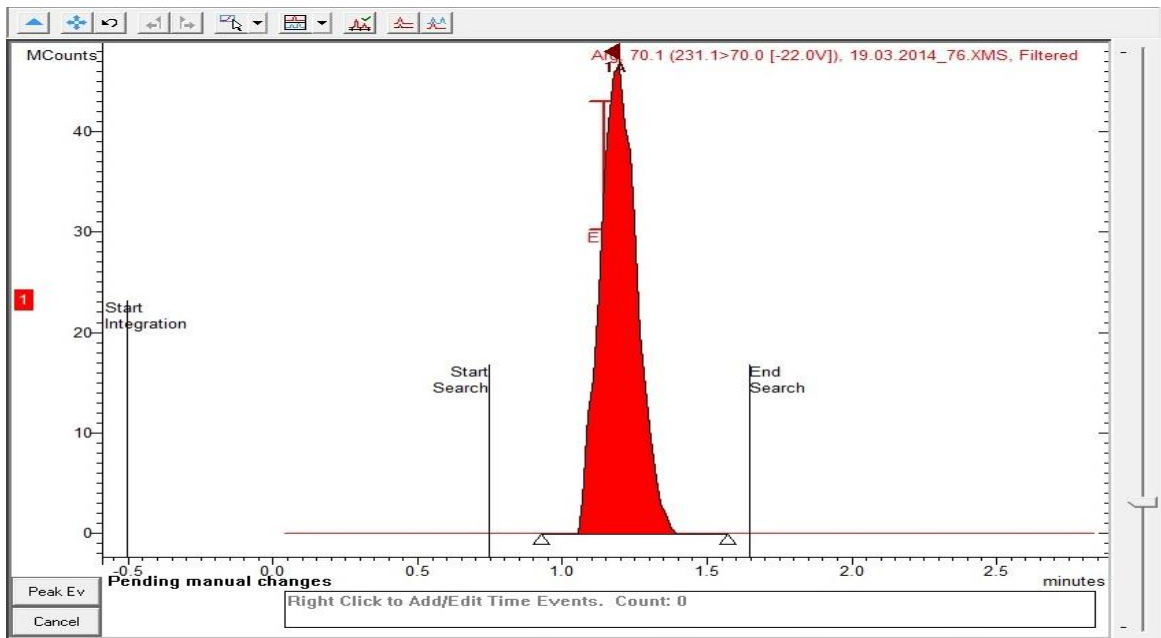


Abbildung 5: Beispiel für eine L-Arginin Konzentrationsbestimmung mithilfe des Programms "Mass Spectrometry Workstation"

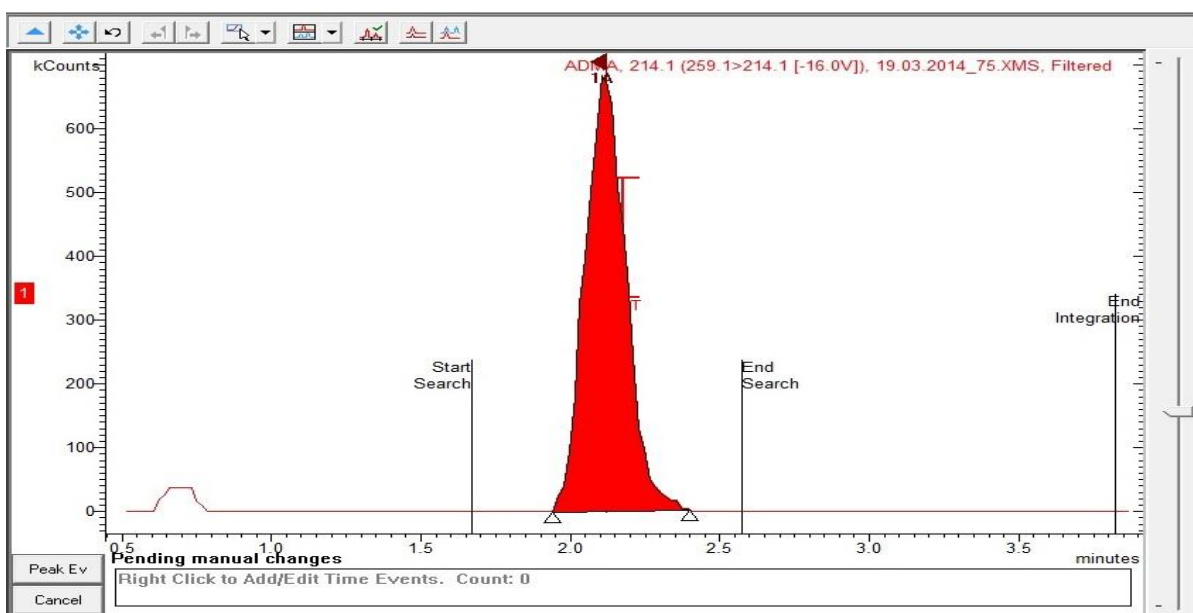


Abbildung 6: : Beispiel für eine ADMA Konzentrationsbestimmung mithilfe des Programms "Mass Spectrometry Workstation"

3.3.9 Evaluation:

Bei jeder Messung wurden zusätzlich zwei Qualitätskontrollen in Doppelbestimmung mit analysiert; diese wiesen für L-Arginin die Konzentration 60 und 120 $\mu\text{mol/l}$ und für ADMA die Konzentrationen 0,5 und 1,0 $\mu\text{mol/l}$ auf.

3.3.10 Statistische Auswertung

Die klinischen Studien wurden mit Superior Performing Software Systems (SPSS) Version 21 und mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.0 ausgewertet. Die Zusammenhänge zwischen ELISA- und LC-MS/MS-Messungen wurden durch eine Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht. Um die Übereinstimmung der zwei Messungen zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Bland-Altman-Plot erstellt. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte durch einen t-Test. Weitere Berechnungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in der Regel mit arithmetischem Mittelwert, dem Variationskoeffizienten und der Standardabweichung präsentiert. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

3.4 Testreihen:

3.4.1 Methodenspezifische Kenngrößen:

Um die Schwankungsbreite innerhalb mehrerer Messung derselben Probe zu bestimmen, wurden die Intra- und die Inter-Assay-Varianz ermittelt. Hierzu wurde fünfmal dieselbe Probe gemessen. Im Fall der Intra-Assay-Varianz wurde die Probe fünfmal im selben Assay untersucht und daraus die Schwankungsbreite ermittelt, d.h. es wurde die Varianz mithilfe eines Variationskoeffizienten definiert. Im Fall der Inter-Assay-Varianz wurde dieselbe Probe fünfmal in aufeinanderfolgenden Assays untersucht.

3.4.1.1 Intra-Assay-Variabilität:

Je fünf Karten pro Proband wurden mit Blut betropft ($n=8$). Die zu einem Probanden zugehörigen Karten wurden daraufhin zusammen in einem Assay untersucht. Die hierbei auftretende Varianz wurde bestimmt und der Variationskoeffizient errechnet.

3.4.1.2 Inter-Assay-Variabilität:

Je fünf Karten pro Proband wurden mit Blut betropft ($n=6$). Die zu einem Probanden zugehörigen Karten wurden daraufhin an aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils unterschiedlichen Messungen untersucht. Die hierbei auftretende Varianz wurde bestimmt und der Variationskoeffizient errechnet.

3.4.2 Personenspezifische Kenngrößen:

3.4.2.1 Intraindividuelle Variabilität:

Um die intraindividuelle Variabilität (d.h. die Schwankungsbreite mehrerer Proben von demselben Probanden an unterschiedlichen Tagen) zu bestimmen, wurden von jedem Probanden ($n=3$) fünf Blutproben an aufeinanderfolgenden Tagen entnommen. Diese Proben wurden später gesammelt in einem Assay untersucht, um die intraindividuelle Schwankungsbreite zu erhalten. Das auf die Karten getropfte Blut wurde in diesem Fall aus der Fingerbeere mittels einer Sarstedt Safety-Lanzette gewonnen. Pro Tag und Proband wurde so eine Karte betropft. Es wurden Nüchternwerte gemessen. Die hierbei auftretende Varianz wurde bestimmt und der Variationskoeffizient errechnet.

3.4.3 Präanalytik

3.4.3.1 Einfluss von Luftfeuchtigkeit während des Trocknungsprozesses:

Insgesamt zehn ADMA-Karten wurden mit Blut von einem Probanden betropft. Die Karten wurden auf zwei Gruppen (n=5) aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde mithilfe eines handelsüblichen Ventilators schnell und unter Umgebungstemperatur (innerhalb von 10 Minuten) getrocknet. Die andere Gruppe wurde direkt nach dem Auftropfen des Blutes in einen Inkubator mit 100% Luftfeuchtigkeit, ebenfalls bei Umgebungstemperatur, gestellt und dort für 24 Stunden aufbewahrt. Danach wurden beiden Gruppen verglichen.

3.4.3.2 Enzymatisch bedingte Konzentrationsänderung während des Trocknens:

Eine Kontrollgruppe (n=5) wurde mit einer Interventionsgruppe (n=4) verglichen. Alle Karten wurden mit identischem Blut betropft. Die Kontrollgruppe bestand aus fünf Karten, welche vor dem Auftropfen des Blutes nicht mit Nor-NOHA präpariert wurden. Die Interventionsgruppe bestand aus vier Karten, die vor dem Betropfen mit Blut mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Fa. Sigma-Aldrich) präpariert wurden. Durch die Verwendung des Protease-Inhibitor-Cocktails sollten Enzyme gehemmt werden, die potenziell am Abbau (Hydrolyse) oder in der Freisetzung (durch Proteolyse) von ADMA oder L-Arginin beteiligt sein könnten. Im Anschluss wurden beide Gruppen im ELISA gemessen und verglichen.

3.4.3.3 Effekt von Nor-NOHA auf die Messung unter Einfluss von 12h Feuchtigkeit:

Zwei Karten wurden als Kontrollgruppe ohne Nor-NOHA präpariert, und direkt nach dem Auftropfen des Blutes für 12 Stunden bei 20°C und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Vier weitere Karten wurden ebenfalls ohne Nor-NOHA präpariert und direkt nach dem Auftropfen des Blutes mittels Ventilator schnell getrocknet. Weitere vier Karten wurden mit 3x 25 µl einer 400 mM Nor-NOHA-Lösung präpariert und direkt nach dem Auftropfen des Blutes für 12 Stunden bei 20°C und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Karten wurde daraufhin in Bezug auf ihre L-Arginin Konzentration verglichen.

3.4.3.4 *Nor-NOHA Negativprobe:*

Vor Beginn der Versuche mit Nor-NOHA wurden zunächst zwei Karten mit Nor-NOHA besprüht, ohne dass sie mit Blut betropft wurden. Dies hatte zum Ziel, eine mögliche Kreuzreaktivität im ELISA frühzeitig festzustellen. Es wurden hierbei 3x 50 µl einer 400 mM Lösung Nor-NOHA verwendet. Die Karten wurden dann im ELISA untersucht.

3.4.3.5 *Einfluss der verwendeten Blutmenge auf das Messergebnis:*

Drei Karten wurden mit 50 µl Blut pro Feld betropft. Drei weitere Karten wurden mit der doppelten Menge Blut, also 100 µl pro Feld, betropft. Die Messergebnisse des ELISA wurden danach verglichen. Beim Stanzen der Proben wurde stets darauf geachtet, den Stanzling möglichst mittig aus dem Blutfleck zu entnehmen.

3.4.3.6 *„Freeze & thaw“:*

Bei diesem Versuch wurde der Einfluss mehrerer „Freeze and thaw“ Zyklen simuliert. Zwei Gruppen, also eine Kontrollgruppe und eine Interventionsgruppe (jeweils n=4), wurden verglichen. Die Kontrollgruppe wurde wie unter 3.2.2. beschrieben gelagert, die Interventionsgruppe wurde jeweils bei -20°C eingefroren und einen Tag später wieder aufgetaut. Nach drei dieser Zyklen in der Interventionsgruppe wurden beide Gruppen mittels ELISA gemessen und verglichen.

3.4.3.7 *Einfluss der Methode der Blutentnahme auf die Messung:*

Für diesen Versuch wurden 2 Gruppen betropfter Karten (jeweils n=5) verglichen. Es sollte der Einfluss der Methode der Blutentnahme auf die Messergebnisse bestimmt werden. Es wurde für alle Karten das Blut desselben Probanden verwendet. Die eine Gruppe Karten wurde mit venösem Blut aus einem EDTA-Röhrchen betropft, die andere Gruppe Karten wurde direkt (ohne vorher in einem Gefäß aufgefangen worden zu sein) mit Kapillarblut aus der Fingerbeere betropft.

3.4.3.8 Testreihe UV-Licht:

Die hier verwendeten Karten wurden vorab mit Nor-NOHA präpariert. Es wurden jeweils zwei Karten von vier Probanden untersucht: je eine Karte wurde einen Monat für 8 h pro Tag UV-Licht ausgesetzt, die andere wurde unter sonst gleichen Bedingungen (s. 3.2.2) für einen Monat im Dunkeln gelagert. Es wurde nach diesem Monat verglichen.

3.4.3.9 Lagerungsdauer:

Die hier verwendeten Karten wurden vorab mit Nor-NOHA präpariert. Jeweils 4 Karten pro Proband (n=5) werden unterschiedlichen Lagerdauern ausgesetzt. Es wird eine Nullpunktbestimmung durchgeführt und drei Folgemessungen: nach 21 Tagen, nach 76 Tagen, sowie nach 307 Tagen.

3.4.3.10 Lagerungseinflüsse (Temperatur, Luftfeuchte):

Die hier verwendeten Karten wurden vorab mit Nor-NOHA präpariert. Es wurden jeweils fünf Karten pro Proband (n=4) untersucht: zwei Karten pro Proband wurden für einen Monat einer Temperatur von 35°C ausgesetzt, je eine in trockenen und eine in feuchten Bedingungen, zwei weitere Karten wurden bei 20°C aufbewahrt, ebenfalls einmal bei feuchten und einmal bei trockenen Bedingungen. Die fünfte Karte eines Probanden wurde zu Anfang als Nullbestimmung verwendet. Die nach einem Monat ermittelten Werte wurden daraufhin mit dieser Nullbestimmung verglichen.

3.4.4 Methodenvergleich ELISA & LC-MS/MS:

Der Vergleich zwischen den zwei Methoden ELISA und LC-MS/MS erfolgte für ADMA als auch für L-Arginin. Um die Übereinstimmung beider Verfahren zu untersuchen, wurden die Proben mehrerer Kollektive in jeweils beiden Verfahren untersucht und somit Wertepaare jeder Probe erstellt.

Um den statistischen Zusammenhang zu untersuchen, wurde eine lineare Regressionsanalyse für Wertepaare aus LC-MS/MS und ELISA-Messungen vorgenommen. Um die Übereinstimmung beider Methoden graphisch zu untersuchen, wurde nach den Regeln von Bland & Altman vorgegangen und ein Bland & Altman Plot angefertigt.

4 Ergebnisse:

4.2 Methodenspezifische Kenngrößen

4.2.1 Intra-Assay-Variabilität:

Die gemessene Intra-Assay-Variabilität von insgesamt fünf gleichzeitig durchgeführten, also im selben Assay ermittelten, Messungen an (n=8) Probanden ergab einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten (CV) von 6,7% für die ADMA Intra-Assay-Variabilität. Das 95%-Konfidenzintervall berechnete sich hierbei zu [2,7; 10,7]. Bei der Messung von L-Arginin ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 6,5%, das 95%-Konfidenzintervall berechnete sich hierbei zu [0,8; 12,2].

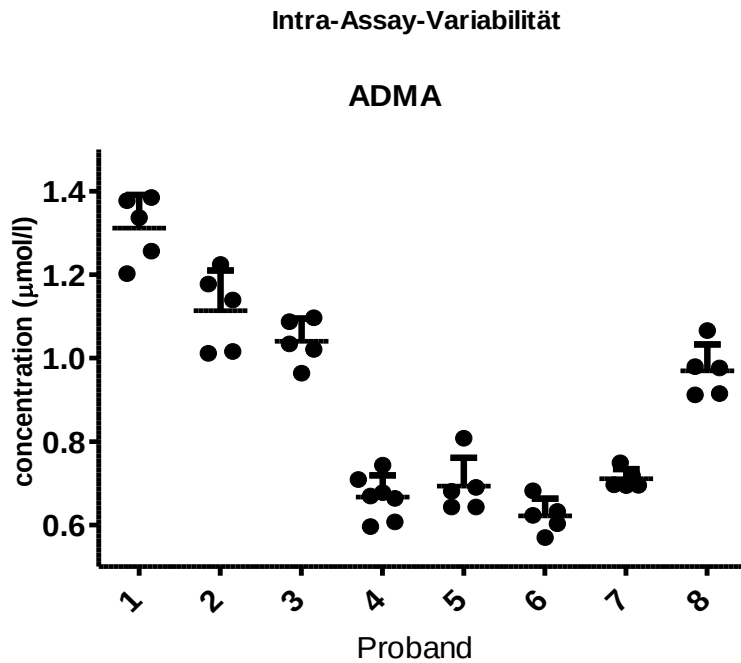


Abbildung 7: Darstellung der Intra-Assay-Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

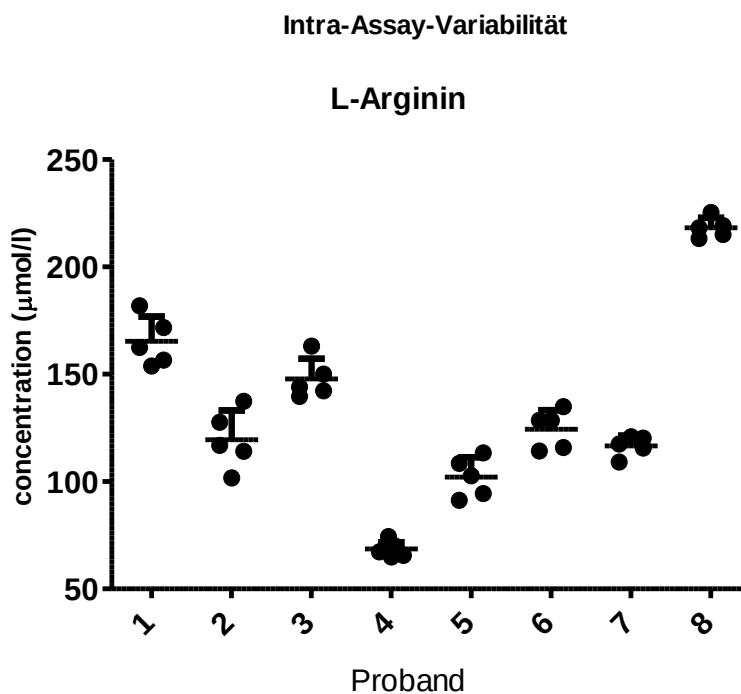


Abbildung 8: Darstellung der Intra-Assay-Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

4.2.2 Inter-Assay-Variabilität:

Bei der Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität von insgesamt fünf aufeinanderfolgenden Messdurchläufen mit (n=6) Probanden ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 10,4% mit einem 95%-Konfidenzintervall von [6,9; 13,9] für ADMA und ein Variationskoeffizient von 11,5% mit einem 95%-Konfidenzintervall von [8,4; 14,6] für L-Arginin.

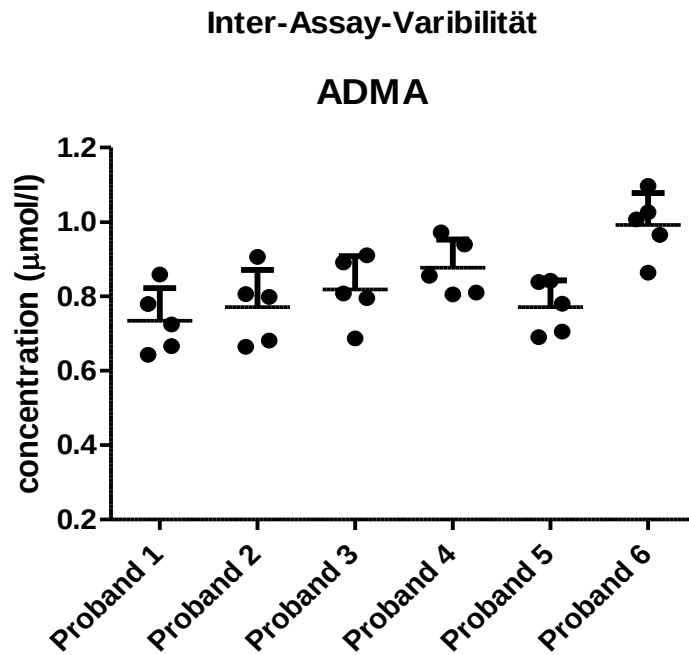


Abbildung 9: Darstellung der Inter-Assay-Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

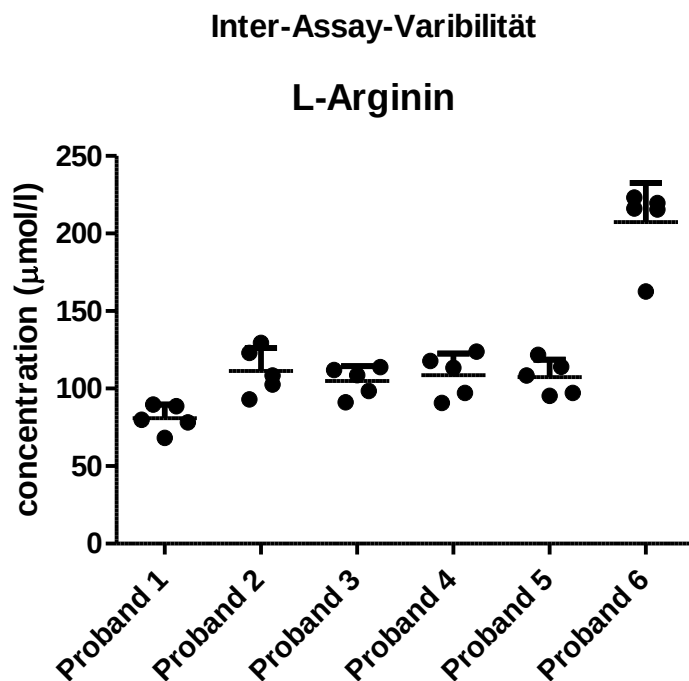


Abbildung 10: Darstellung der Inter-Assay-Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

4.3 Personenspezifische Kenngrößen

4.3.1 Intraindividuelle Variabilität:

Für die Intraindividuelle Variabilität, bestimmt anhand von insgesamt fünf aufeinanderfolgenden, pro Tag durchgeführten Messungen an (n=3) Probanden ergab sich bei der Intraindividuellen Variabilität von ADMA ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 8,51%; das 95%-Konfidenzintervall berechnete sich hierbei zu [4,3; 12,7) für ADMA. Für L-Arginin ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 17,82% mit einem 95%-Konfidenzintervall von [9,3; 26,4].

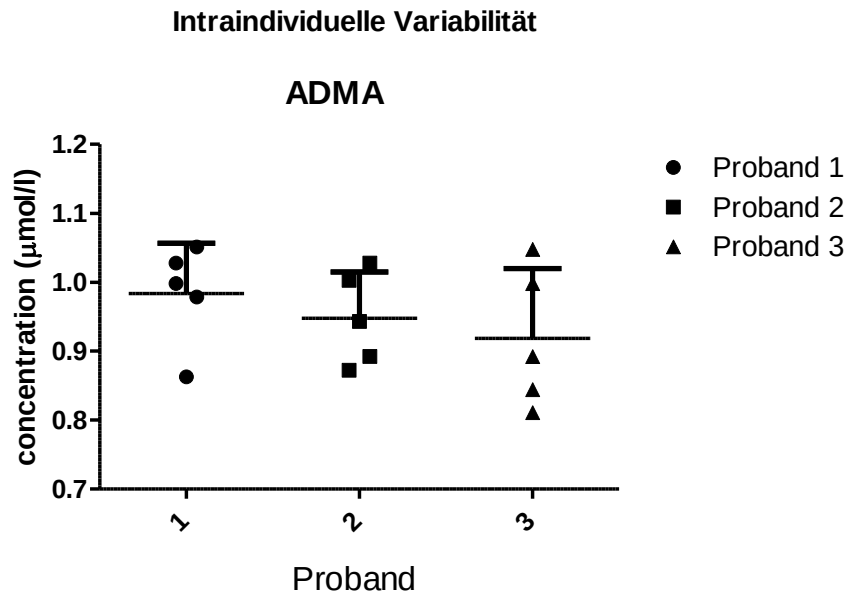


Abbildung 11: Darstellung der Intraindividuellen Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

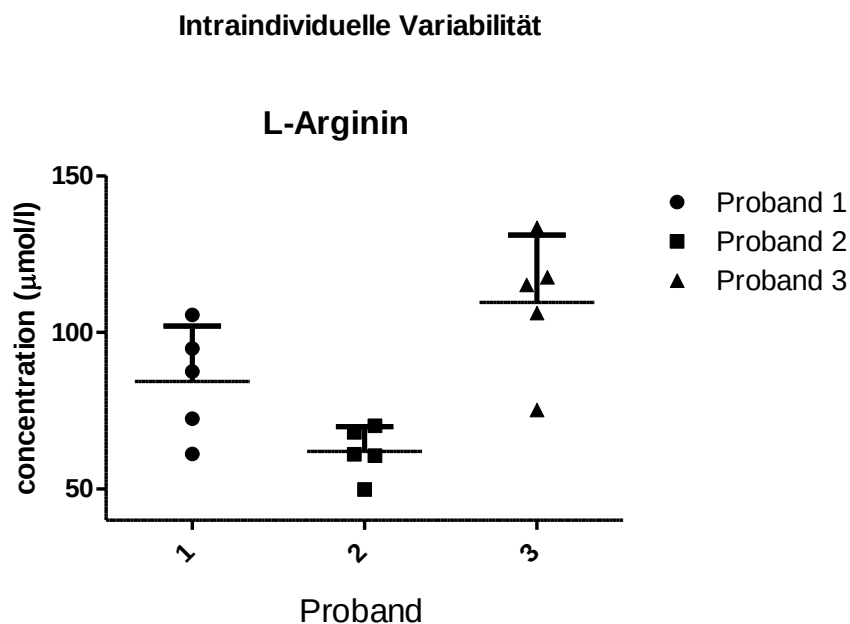


Abbildung 12: Darstellung der Intraindividuellen Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.

4.4 Präanalytik

4.4.1 Einfluss von Luftfeuchtigkeit während des Trocknungsprozess:

Der Mittelwert für L-Arginin in der trocken gelagerten Kontrollgruppe „control“ (n=5) betrug 256,8 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 7,54%], der Mittelwert für ADMA in dieser Gruppe betrug 1,07 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 13,59%].

Der Mittelwert für L-Arginin in der bei hoher Luftfeuchtigkeit gelagerten Versuchsgruppe „high humidity“ (n=5) betrug 5,9 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 44,4%], also nur noch 2% der ursprünglich gemessenen Konzentration. Ein t-Test zeigt für die ermittelten Werte eine signifikante Abnahme der Konzentration ($p < 0.0001$, $t=28,71$, $df=8$).

Der Mittelwert für ADMA in der bei hoher Luftfeuchte gelagerten Gruppe betrug 1,05 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 13,9], der Unterschied zur ursprünglichen Messung war in diesem Fall nicht signifikant ($p=0,77$, $t=0,302$, $df=8$).

Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte für ADMA

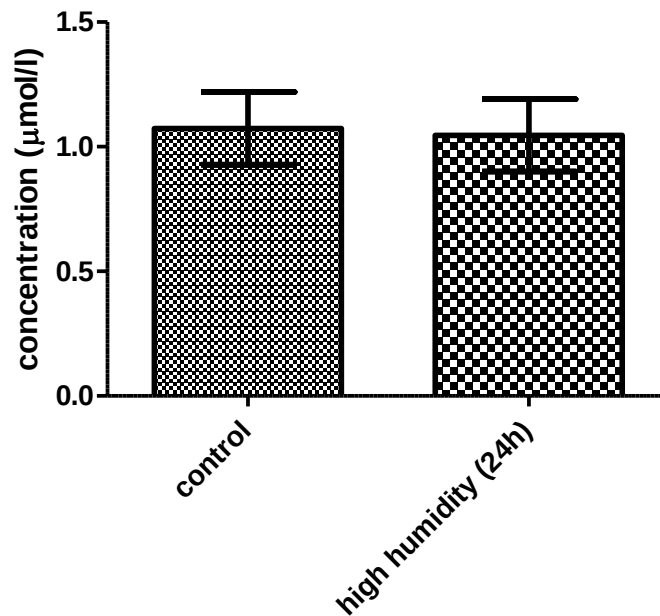


Abbildung 13: Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, $n=5$.

Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte für L-Arginin

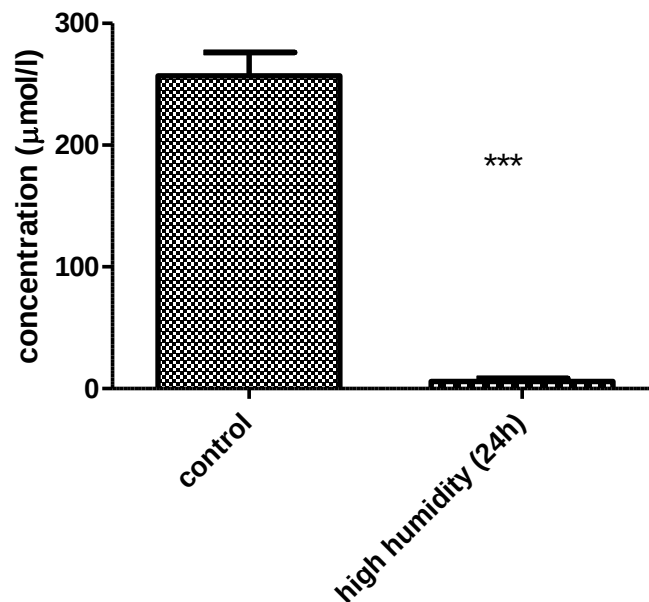


Abbildung 14: Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, $n=5$, *** $p<0,0001$.

4.4.2 Enzymatisch bedingte Konzentrationsänderungen während des Trocknens

Der Mittelwert für ADMA in der Kontrollgruppe *ohne* Proteaseinhibitor (n=5) betrug 0,86 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 5,13%], die durchschnittlich ermittelte Konzentration an L-Arginin in dieser Gruppe betrug 58,6 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 11,7%].

Der Mittelwert für ADMA in der Versuchsgruppe *mit* Proteaseinhibitor (n=4) betrug im Mittel 0,87 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 11,1%], während der Mittelwert für L-Arginin in dieser Gruppe im Mittel bei 99,1 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 6,1%] lag.

Ein t-test ergab nur für die Konzentrationsänderung von L-Arginin in der Versuchsgruppe einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$, $t = 9,247$, $df = 7$).

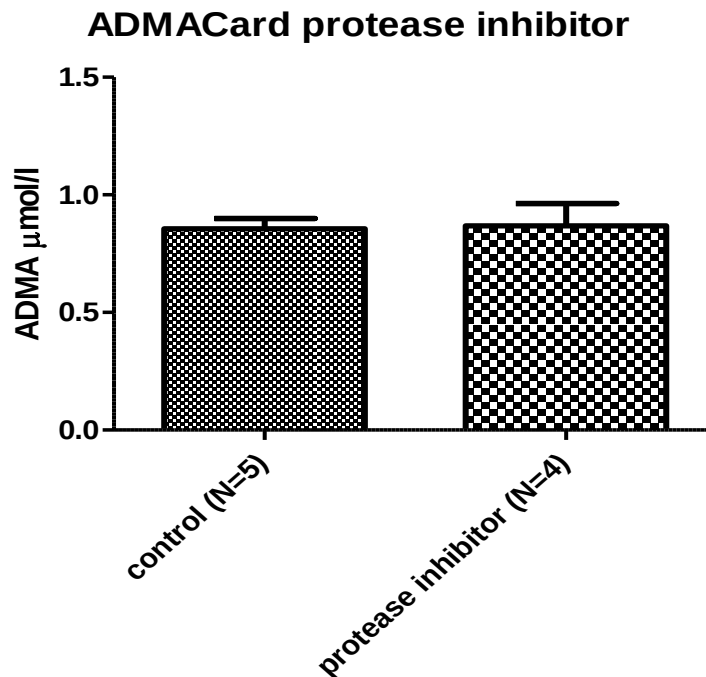


Abbildung 15: Einfluss enzymatisch bedingter Konzentrationsänderungen auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

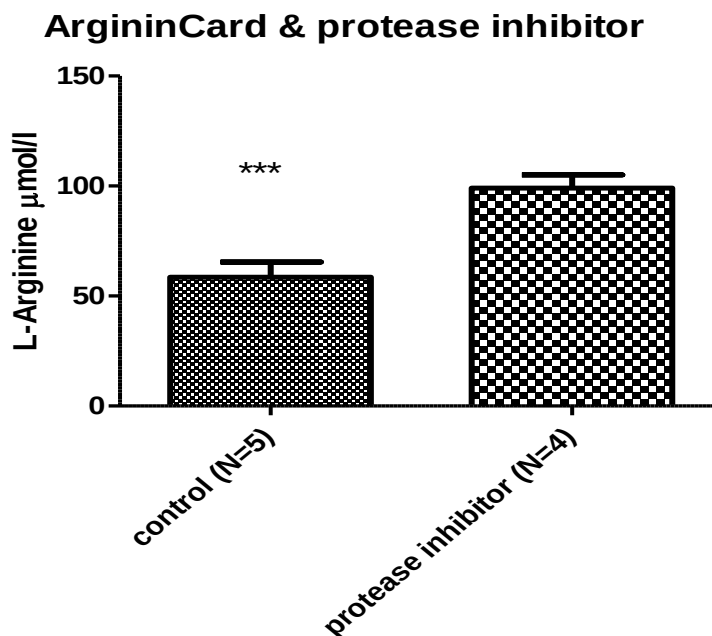


Abbildung 16: Einfluss enzymatisch bedingter Konzentrationsänderungen auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, *** $p < 0,0001$.

4.4.3 Effekt von Nor-NOHA auf die Messungen von L-Arginin unter Einfluss von 12h Feuchtigkeit:

Der Mittelwert für L-Arginin in der in hoher Umgebungsluftfeuchte gelagerten Kontrollgruppe „humid“ (n=2) betrug 14,1 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 2,7%] und ist damit als Ergänzung zu den Ergebnissen zu verstehen, die bereits in 4.4.2 präsentiert wurden. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,001$, $t = 10.27$ $df = 4$).

In der bei großer Luftfeuchtigkeit gelagerten und zusätzlich mit Nor-NOHA präparierten Versuchsgruppe „Nor-NOHA-humid“ (n=4) lagen die gemessenen Konzentrationen im Mittel bei 233,1 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 11,5%] und unterschieden sich damit nicht signifikant von den durchschnittlich gemessenen 230,9 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 12,2] in der Versuchsgruppe „instant dry“.

Einfluss von Nor-NOHA auf Arginase

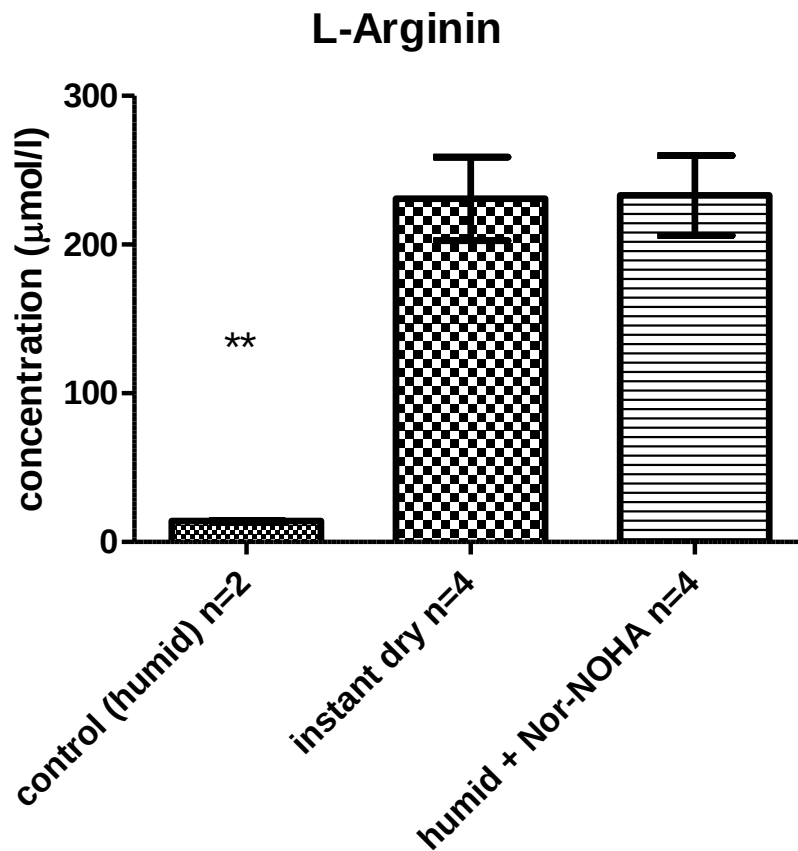


Abbildung 17: Einfluss von Nor-NOHA auf die Messwerte von L-Arginin unter Einfluss von hoher Luftfeuchtigkeit: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, ** $p < 0,001$ vs. „instant dry“.

4.4.4 Nor-NOHA Negativprobe

Zwei Nor-NOHA Negativproben wurden im ELISA untersucht. Die mittlere gemessene Konzentration betrug 0,17 $\mu\text{mol/l}$ für ADMA und 9,6 $\mu\text{mol/l}$ für L-Arginin.

4.4.5 Einfluss der verwendeten Blutmenge auf das Messergebnis

Der Mittelwert für ADMA in der Kontrollgruppe (n=3) betrug 0,863 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 10,9%], der für L-Arginin betrug 82,21 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 6,7%].

Der Mittelwert für ADMA in der Versuchsgruppe (n=3) war im Mittel 7,8% höher und betrug 0,93 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 10,2%], der Mittelwert für L-Arginin war im Mittel 10% niedriger und betrug 74,01 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 15,9].

Ein t-test ergab für ADMA bzw. L-Arginin nicht signifikante Unterschiede von $p=0,34$, respektive $p=0,39$.

Einfluss der aufgetragenen Blutmenge

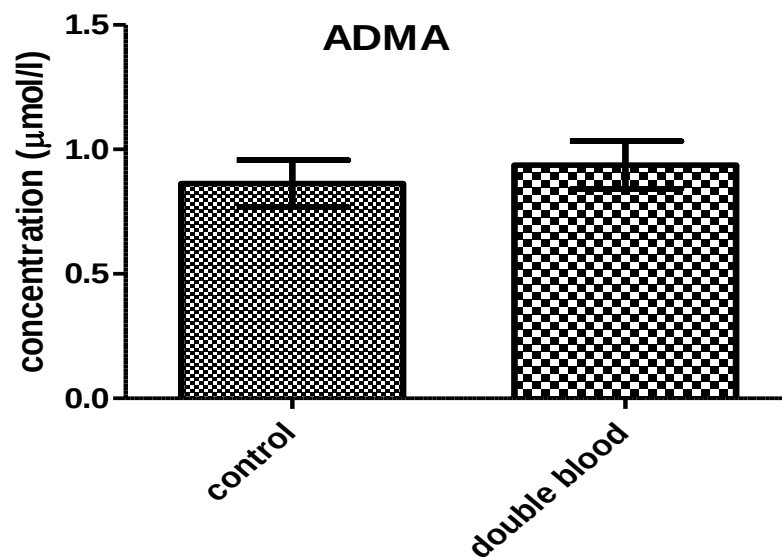


Abbildung 18: Einfluss der aufgetragenen Blutmenge auf ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, $n=3$.

Einfluss der aufgetragenen Blutmenge

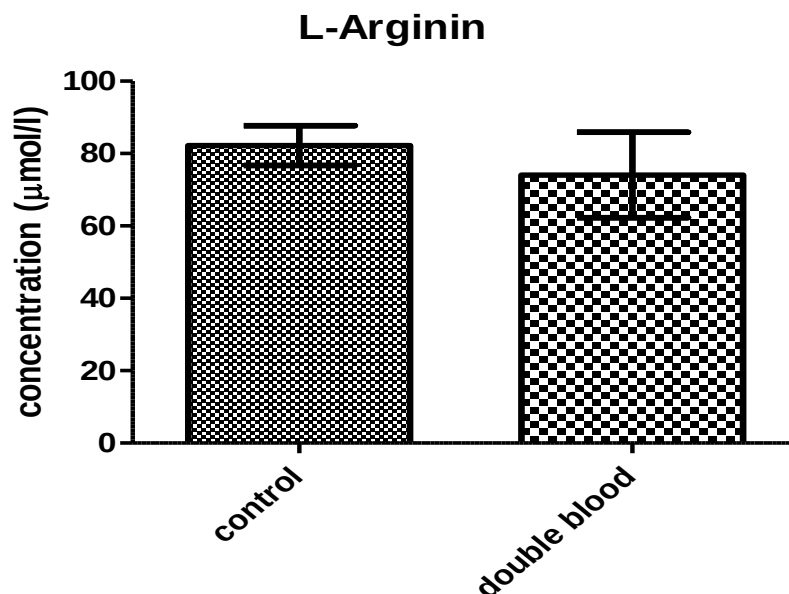


Abbildung 19: Einfluss der aufgetragenen Blutmenge auf L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall, $n=3$.

4.4.6 „Freeze & Thaw“:

Der Mittelwert für ADMA in der Kontrollgruppe (n=5) betrug 0,87 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 5,9 %], der für L-Arginin 205,6 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 6,2%].

Der Mittelwert für ADMA in der Versuchsgruppe (n=5), betrug nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen 0,86 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 12,25%], der für L-Arginin 207,87 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 6,7]. Mittels t-Test konnte weder für ADMA ($p=0,87$, $t=0,171$, $df=6$), noch für L-Arginin ($p=0,819$, $t=0,239$, $df=6$) eine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Einfluss von drei Freeze & Thaw Zyklen auf ADMA

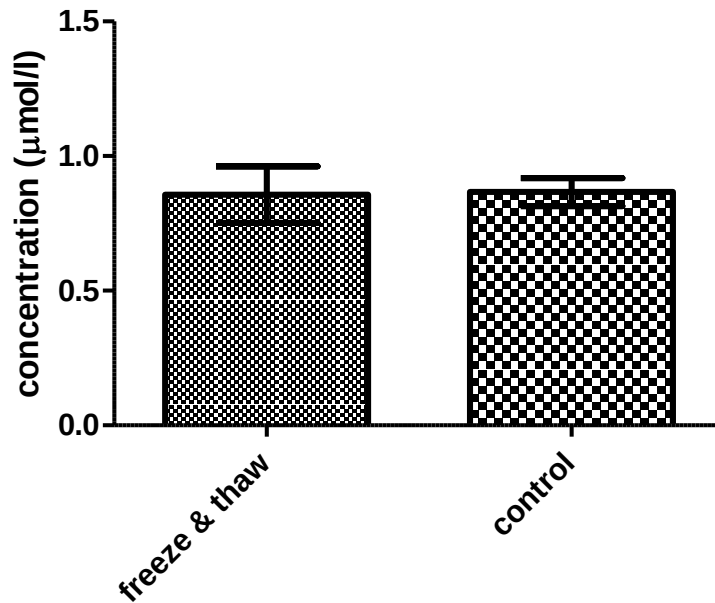


Abbildung 20: Einfluss von drei „Freeze & Thaw“ Zyklen auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=4.

Einfluss von drei Freeze & Thaw Zyklen auf L-Arginin

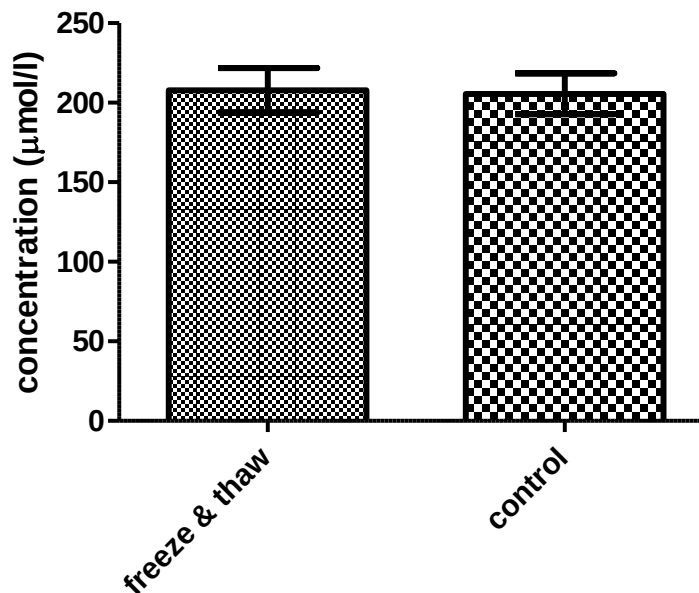


Abbildung 21: Einfluss von drei „Freeze & Thaw“-Zyklen auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=4.

4.4.7 Einfluss der Methode der Blutentnahme auf die Messung

Der Mittelwert für ADMA in der Kontrollgruppe mit Kapillarblut (n=5) betrug 0,86 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 8,8 %], der für L-Arginin 36,61 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 13,9%].

Der Mittelwert für ADMA in der Versuchsgruppe mit venösem Blut (n=5) betrug 0,78 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 5,9%], der für L-Arginin 26,82 $\mu\text{mol/l}$ [CV: 8,4].

Die gemessene ADMA-Konzentration war im venösen Blut also im Mittel 9% niedriger als im Kapillarblut. Für L-Arginin galt, dass im venösen Blut eine um 26,7% niedrigere Konzentration gemessen wurde.

Lediglich für L-Arginin konnte durch einen t-test eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden: $p=0,0043$, $t= 3,944$, $df=8$.

ADMA in venösem- und kapillären Blut

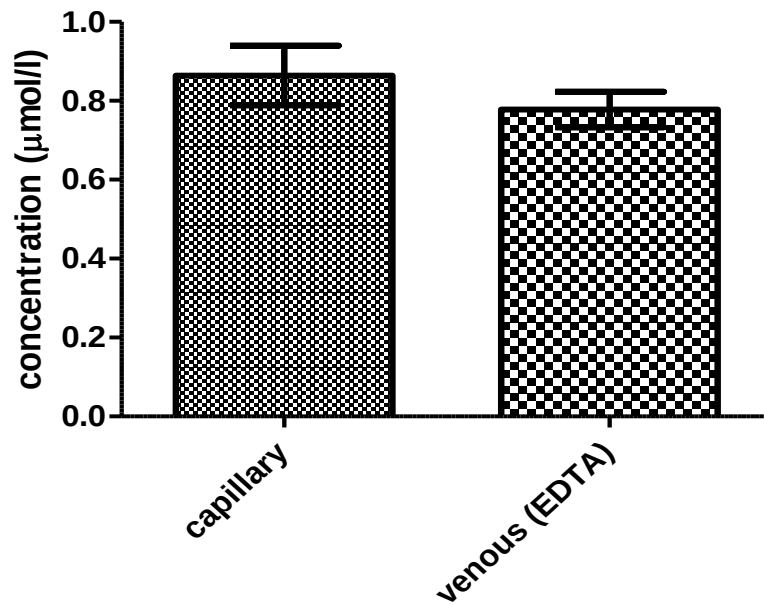


Abbildung 22: Einfluss der Art und Weise der Blutentnahme auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.

L-Arginin in venösem- und kapillären Blut

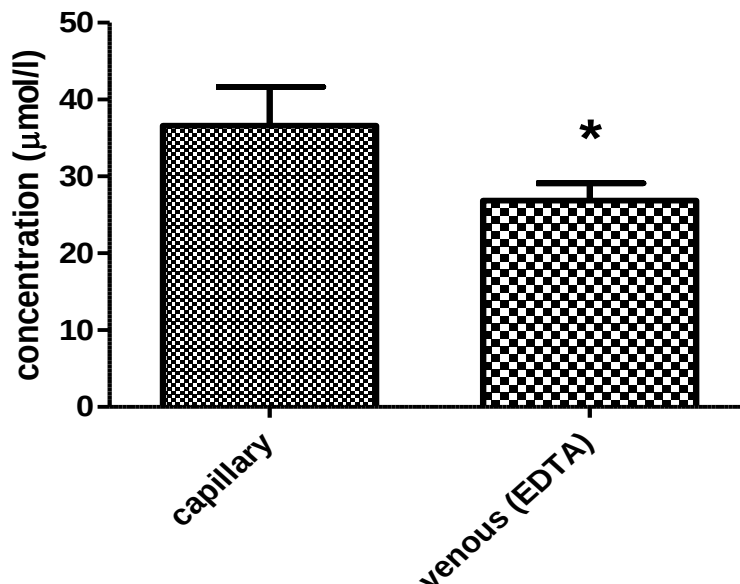


Abbildung 23: Einfluss der Art und Weise der Blutentnahme auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5, *p<0,01.

4.4.8 Testreihe UV-Licht

Die gemessene Konzentration für ADMA betrug im Mittel 9,8% weniger in der Versuchsgruppe (unter UV-Licht, n=4), als in der Kontrollgruppe (n=4). Für L-Arginin wurde in der Gruppe „UV-Licht“ eine im Mittel 7,3% geringere Konzentration gemessen als in der Kontrollgruppe. Das 95%-Konfidenzintervall dieser relativen Änderung beträgt für ADMA [-10,5; 30,1] und für L-Arginin [-14,4; 29].

Ein durchgeführter t-test ergab weder für ADMA, noch für L-Arginin ein signifikantes Ergebnis ($p=0,3653$, beziehungsweise $p=0,6222$).

Tabelle 5: Messwerte von L-Arginin und ADMA unter Einfluss von UV-Licht im direkten Vergleich mit einer Kontrollgruppe

Messung/ Probe	UV-Licht <i>L-Arginin</i> [$\mu\text{mol/l}$]	Kontrollgruppe <i>L-Arginin</i> [$\mu\text{mol/l}$]	UV-Licht <i>ADMA</i> [$\mu\text{mol/l}$]	Kontrollgruppe <i>ADMA</i> [$\mu\text{mol/l}$]
Probe 1	205.5	264.4	0.97	1.08
Probe 2	139.6	146.7	0.82	1.06
Probe 3	171.5	183.8	1.07	1.18
Probe 4	130.7	125.2	0.78	0.76

Einfluss von UV-Licht auf ADMA

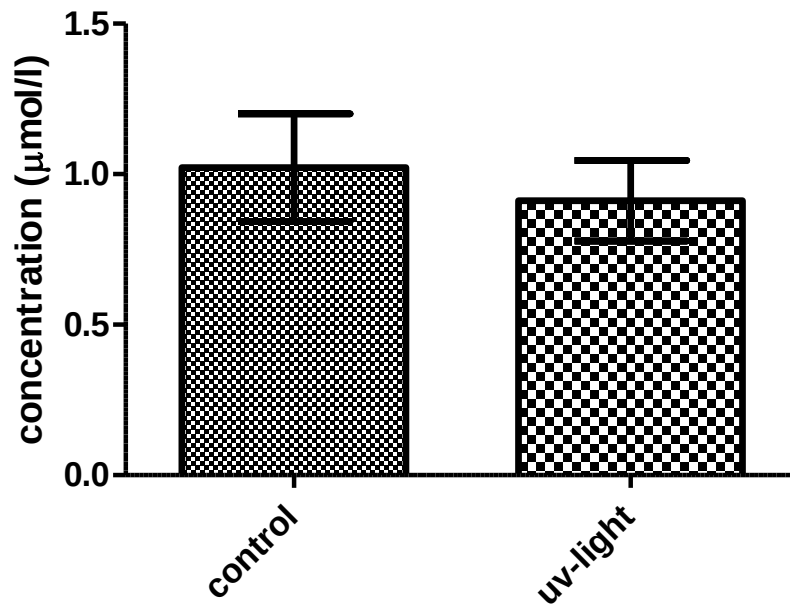


Abbildung 24: Einfluss von UV-Licht auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.

Einfluss von UV-Licht auf L-Arginin

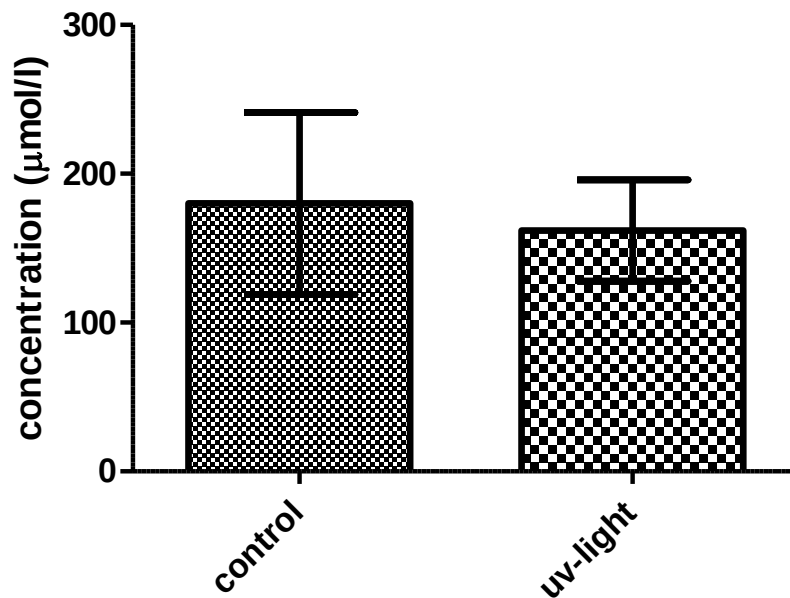


Abbildung 25: Einfluss von UV-Licht auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.

4.4.9 Lagerungsdauer

Für die Einfluss der Lagerungsdauer liegen folgende Ergebnisse vor: Die gemessenen Konzentrationen werden stets als prozentuale Änderung im Vergleich zur Nullbestimmung angegeben.

Nach 21 Tagen:

Die gemessene Konzentration für ADMA war im Mittel nach 21 Tagen Lagerungsdauer um 6,7% höher als die ursprünglichen Werte in der Nullbestimmung (n=5). Das 95%-Konfidenzintervall für die durchschnittliche, relative Konzentrationsänderung der einzelnen Proben lag bei [-0,24%; 13,64%]. Ein gepaarter t-test ergab hierbei eine signifikante Änderung mit $p < 0,01$, $t = 5.005$ $df = 4$.

Für L-Arginin wurden nach 21 Tagen Lagerungsdauer um 8,1% höhere Werte festgestellt als zum Zeitpunkt der Nullbestimmung (n=5). In diesem Fall errechnete sich das 95%-Konfidenzintervall der durchschnittlichen, relativen Konzentrationsänderung zu [-15,3%; 31,5%]. Ein gepaarter t-test konnte keine Signifikanz nachweisen.

Nach 76 Tagen:

Die gemessene Konzentration für ADMA betrug im Mittel nach 76 Tagen Lagerungsdauer 12,7% mehr als ursprünglich in der Nullbestimmung gemessen wurde (n=5). Im Vergleich zur Messung nach 21 Tagen war das 95%-Konfidenzintervall der mittleren, relativen Konzentrationsänderung mit Werten von -17,7% bis 43,1% bereits deutlich größer. Ein gepaarter t-test konnte keine Signifikanz nachweisen.

Für L-Arginin wurden nach 76 Tagen Lagerungsdauer im Mittel um -10,9% niedrigere Werte festgestellt als zum Zeitpunkt der Nullbestimmung (n=5). Das 95%-Konfidenzintervall der durchschnittlichen, relativen Konzentrationsänderung lag hier zwischen -49,1% und 27,4%. Ein gepaarter t-test konnte keine Signifikanz nachweisen.

Nach 307 Tagen:

Nach 307 Tagen hatte die gemessene Konzentration für ADMA im Vergleich zur Nullprobe durchschnittlich um 10,5% abgenommen (n=5). Das 95%-Konfidenzintervall der mittleren, relativen Konzentrationsänderung der einzelnen Proben errechnete sich zu [-31,6%; 10,5%]. Ein gepaarter t-test konnte keine Signifikanz nachweisen.

Für L-Arginin wurden nach 307 Tagen Lagerungsdauer (n=5) im Mittel -30,5% niedrigere Werte festgestellt als zum Zeitpunkt der Nullbestimmung, das 95%-Konfidenzintervall der gemittelten, relativen Konzentrationsänderung errechnete sich zu [-65,7%; 4,7%). Ein gepaarter t-test ergab eine signifikante Änderung mit $p < 0,05$, $t = 3.224$ $df = 4$.

Tabelle 6: Tabellarische Aufstellung der Messwerte nach unterschiedlicher Lagerungsdauer der Proben.

Probe / Messzeitpunkt	Analyt	Nullpunkt	Nach 21 Tagen	Nach 76 Tagen	Nach 307 Tagen
Probe 1	ADMA [μmol/l]	1,03	1,08 (+5,3%)	1,12 (+8,9%)	1,01 (-2%)
	L-Arginin [μmol/l]	216,7	264,4 (+20,3%)	194,0 (-11,7%)	148,3 (-32,5%)
Probe 2	ADMA [μmol/l]	1,03	1,06 (+2,9%)	0,93 (-9,5%)	0,73 (-29,6%)
	L-Arginin [μmol/l]	166,4	146,7 (-11,9%)	126,3 (-24,1%)	103,1 (-38,1%)
Probe 3	ADMA [μmol/l]	1,10	1,18 (+6,4%)	1,21 (+9,2%)	1,10 (-0,1%)
	L-Arginin [μmol/l]	156,7	183,8 (+17,3%)	122,7 (-21,7)	123,0 (-21,5%)
Probe 4	ADMA [μmol/l]	0,71	0,81 (+13,4%)	0,99 (+38,5%)	0,67 (-6-5%)
	L-Arginin [μmol/l]	183,4	208,2 (+13,5%)	139,5 (-23,9%)	78,2 (-57,4%)
Probe 5	ADMA [μmol/l]	0,72	0,76 (+5,5%)	0,84 (+16,5%)	0,62 (-14,3%)
	L-Arginin [μmol/l]	123,7	125,2 (+1,2%)	157,2 (+27,1%)	119,9 (-3,1%)

Einfluss der Lagerungsdauer (absolute Werte)

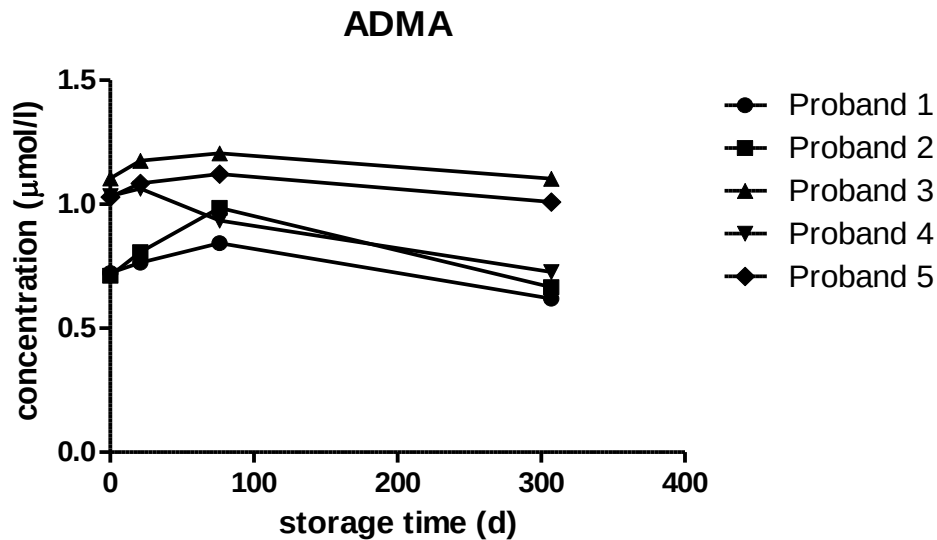


Abbildung 26: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die absoluten Werte der fünf Probanden im zeitlichen Verlauf.

Einfluss der Lagerungsdauer (relative Werte)

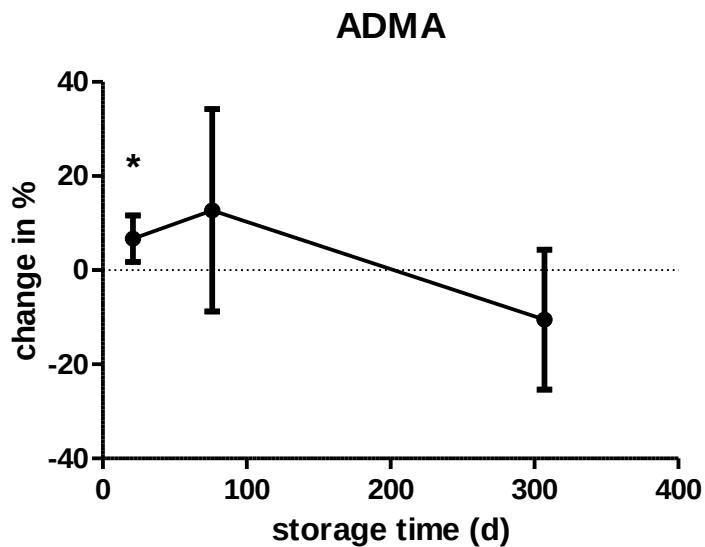


Abbildung 27: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die durchschnittlichen, relativen Änderungen aller fünf Proben im zeitlichen Verlauf, ausgehend von der Basismessung, sowie das 95% Konfidenzintervall, n=5, *p<0,01 vs. baseline.

Einfluss der Lagerungsdauer (absolute Werte)

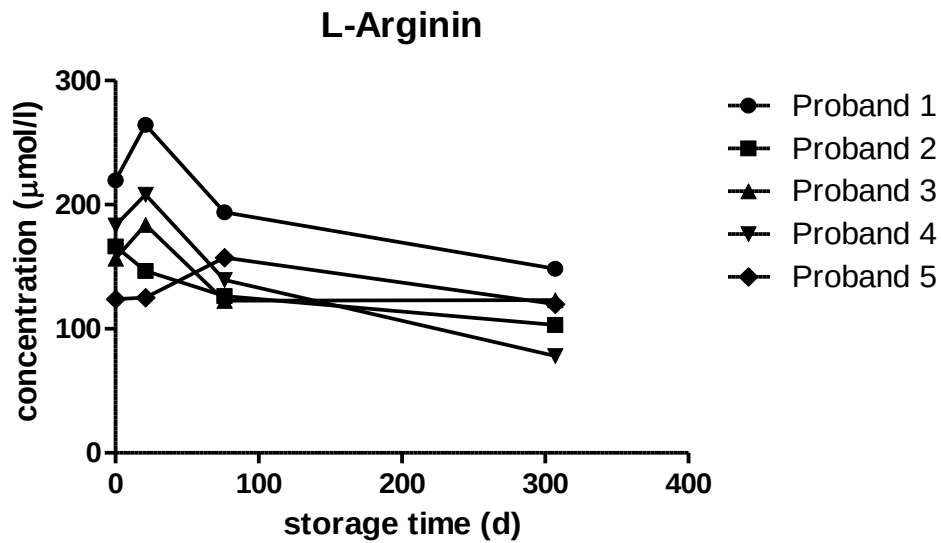


Abbildung 28: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die absoluten Werte der fünf Probanden im zeitlichen Verlauf.

Einfluss der Lagerungsdauer (relative Werte)

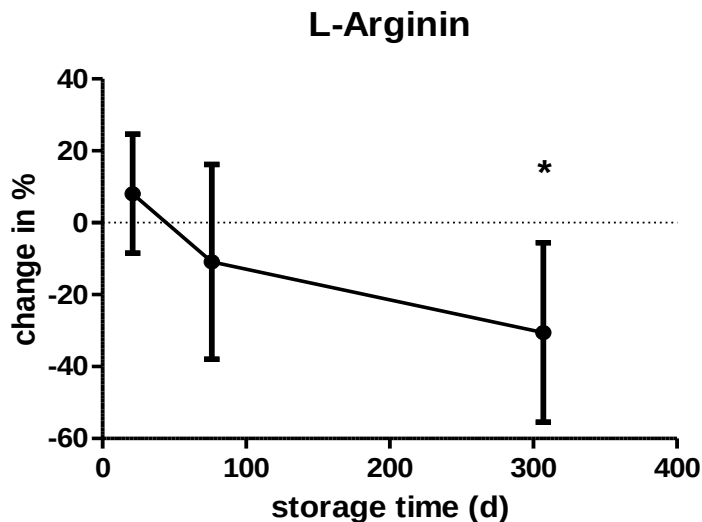


Abbildung 29: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die durchschnittlichen, relativen Änderungen aller fünf Proben im zeitlichen Verlauf, ausgehend von der Basismessung, sowie das 95% Konfidenzintervall, n=5, *p<0,05 vs. baseline.

4.4.10 Lagerungseinflüsse (Temperatur, Luftfeuchte)

Es gab insgesamt vier Gruppen, mit je vier Proben unterschiedlicher Probanden. Die Kontrollgruppe (n=4) wurde bei 20°C unter trockenen Bedingungen aufbewahrt. Eine weitere Gruppe (n=4) wurde bei 20°C unter hoher Luftfeuchte aufbewahrt, noch eine Gruppe (n=4), die bei 35°C unter trockenen Bedingungen aufbewahrt wurde, und eine Gruppe (n=4), die bei 35°C unter Bedingungen mit hoher Luftfeuchte aufbewahrt wurde.

Für die Kontrollgruppe ergab sich eine mittlere Konzentration von 0,91 µmol/l für ADMA und eine mittlere Konzentration von 170,2 µmol/l für L-Arginin.

In der Gruppe, die bei 20°C unter hoher Luftfeuchte aufbewahrt wurde, reduzierten sich die gemessenen Konzentrationen für ADMA im Mittel um 4,8% und für L-Arginin im Mittel um 96,5%. Ein gepaarter t-test konnte bei L-Arginin im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Änderung feststellen mit $p < 0,01$, $t = 12.93$ $df = 3$.

In der Gruppe, die bei 35°C unter trockenen Bedingungen aufbewahrt wurde, reduzierten sich die gemessenen Konzentrationen für ADMA im Mittel um 14,6% und für L-Arginin im Mittel um 14,2%. Für ADMA konnte ein gepaarter t-test eine signifikante Änderung nachweisen mit $p < 0,05$, $t = 3.298$ $df = 3$.

In der Gruppe, die bei 35°C unter hoher Luftfeuchte aufbewahrt wurde, reduzierten sich die gemessenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe für ADMA im Mittel um 75,5% und für L-Arginin im Mittel um 89,7%. Hier konnte ein gepaarter t-test für ADMA und L-Arginin eine signifikante Änderung feststellen mit $p < 0,01$, $t = 10.08$ $df = 3$ für ADMA und $p < 0,01$, $t = 11.83$ $df = 3$ für L-Arginin.

Einfluss von Temperatur und Luftfeuchte

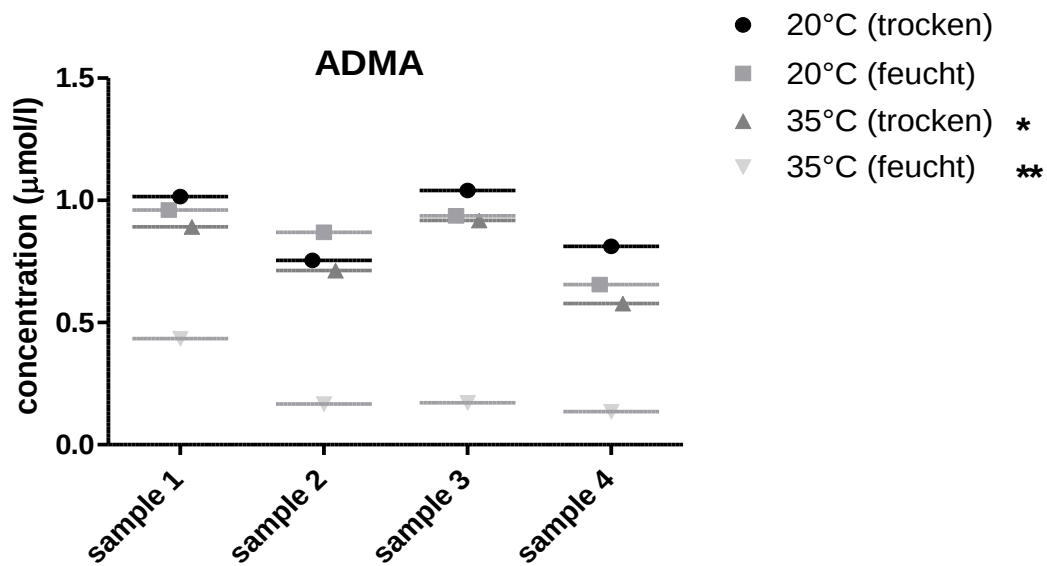


Abbildung 30: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Lagerung: dargestellt sind die absoluten Werte der vier Proben (sample) mit den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Einfluss von Temperatur und Luftfeuchte

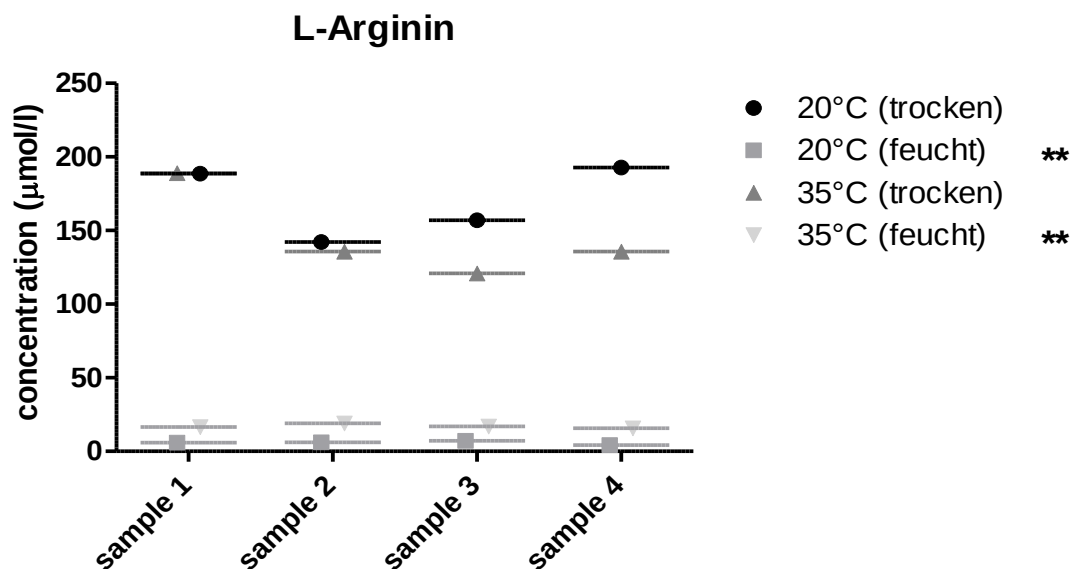


Abbildung 31: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Lagerung: dargestellt sind die absoluten Werte der vier Proben (sample) mit den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, ** $p < 0,01$.

4.5 Methodenvergleich ELISA & LC-MS/MS

In diesem Abschnitt sollen der Vergleich zwischen den zwei Messverfahren ELISA und HPLC-MS² dargestellt werden. Zunächst werden die Ergebnisse mit den Proben aus der Chile-Studie für ADMA und L-Arginin separat dargestellt. Danach folgt für ADMA und L-Arginin jeweils ein weiterer Vergleich. Die Ergebnisse des zweiten Vergleichs haben wurden mit Blutproben aus dem UKE durchgeführt. Da es bei dieser Untersuchung eine Gruppe mit gesunden Probanden und eine Gruppe mit Dialysepatienten gab, ist zusätzlich eine kurze Statistik der jeweils bestimmten Werte angefügt.

4.5.1 Chile Studie

4.5.1.1 Korrelationsanalyse für ADMA

Die Korrelationsanalyse nach Pearson für ADMA Plasmamessungen, gemessen mit LC-MS/MS und Vollblutmessungen, gemessen mit ELISA, ist in Abb. 32 dargestellt. Die Korrelationsanalyse ergab für die zwei Messmethoden innerhalb diesen Kollektivs eine schlechte Korrelation von $R=0,297$ ($p= 0,004$), $n=91$. Die einfache lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,58 + 0,18 \cdot X$.

Ein Bland-Altman-Plot in Abb. 33 stellt graphisch die Übereinstimmung zwischen den zwei Messverfahren dar. Dieser stellt einen gewissen systematischen Messfehler fest: der Mittelwert der Differenz (Bias) des LC-MS/MS im Vergleich zum ELISA beträgt $0,16 \mu\text{mol/l}$. Das bedeutet, dass mittels LC-MS/MS im Schnitt eine um $0,16 \mu\text{mol/l}$ höhere Konzentration gemessen wurde als mittels ELISA.

Die 95% Limits of Agreement (Schwankungsbreite der Differenzen, nach Bland & Altman) liegen zwischen $-0.20 \mu\text{mol/l}$, bzw. $0.53 \mu\text{mol/l}$.

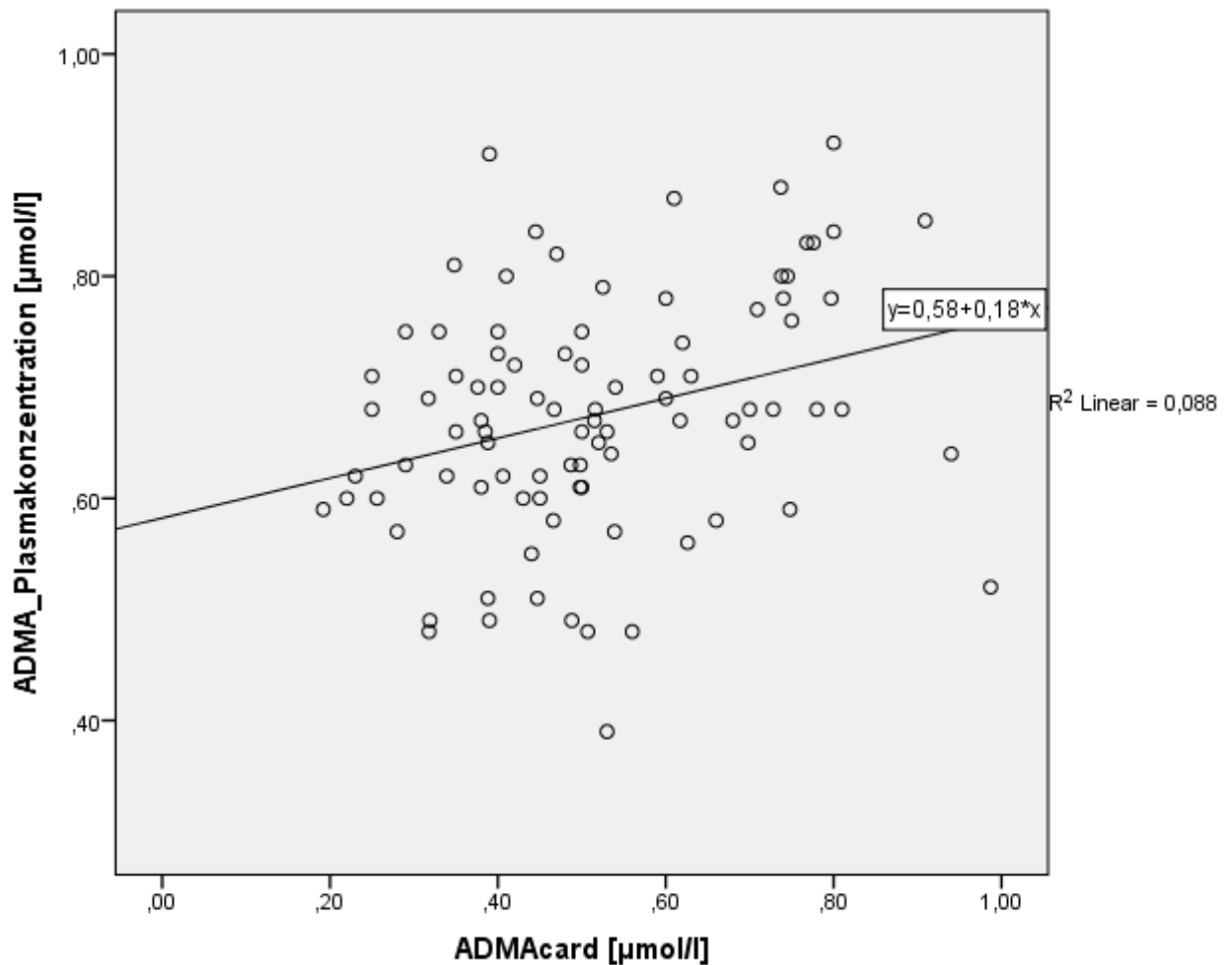


Abbildung 32: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ADMAcard, gemessen mit ELISA und ADMA Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMAcard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, n=91. Geradengleichung der linearen Regression: $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,58 + 0,18 \cdot X$, $R^2=0,088$.

Bland-Altman: Difference ([LC-MS/MS] - [ADMAcard]) vs average Chile-Studie

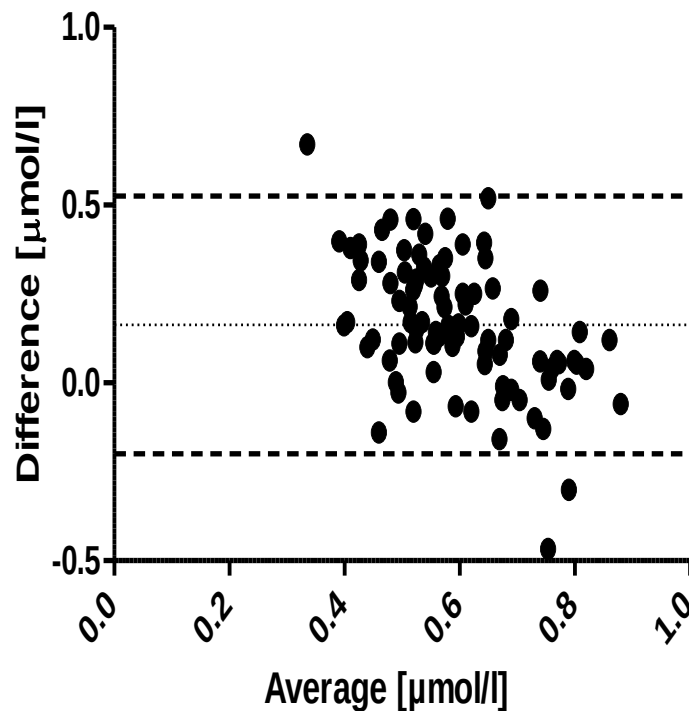


Abbildung 33: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMAcard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert (Average) beider Messverfahren. Der Bias und die 95%-Limits of Agreement sind ebenfalls eingezeichnet, $n=91$.

4.5.1.2 Korrelationsanalyse für L-Arginin:

Die Korrelationsanalyse nach Pearson für L-Arginin Plasmamessungen, gemessen mit LC-MS/MS und Vollblutmessungen, gemessen mit ELISA, ist in Abb. 34 dargestellt. Die Korrelationsanalyse ergab für die zwei Messmethoden innerhalb diesen Kollektivs eine nicht signifikante Korrelation von 0,171 ($p=0,105$), $n=91$. Die einfache lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y_{(\text{Plasmakonzentration L-Arginin})} = 13,8 + 0,12 \cdot X$.

In Abb. 35 stellt ebenfalls ein Bland-Altman-Plot graphisch die Übereinstimmung zwischen den zwei Messverfahren dar. Dieser stellt auch hier einen gewissen systematischen Messfehler fest: Der Mittelwert der Differenz (Bias) des LC-MS/MS im Vergleich zum ELISA beträgt in diesem Fall $-19,0 \mu\text{mol/l}$, d.h. in diesem Fall misst das LC-MS/MS Gerät im Schnitt $19,0 \mu\text{mol/l}$ weniger als der ELISA. Die 95% Limits of Agreement (Schwankungsbreite der Differenzen, nach Bland & Altman) sind $-47,9 \mu\text{mol/l}$, bzw. $9,8 \mu\text{mol/l}$.

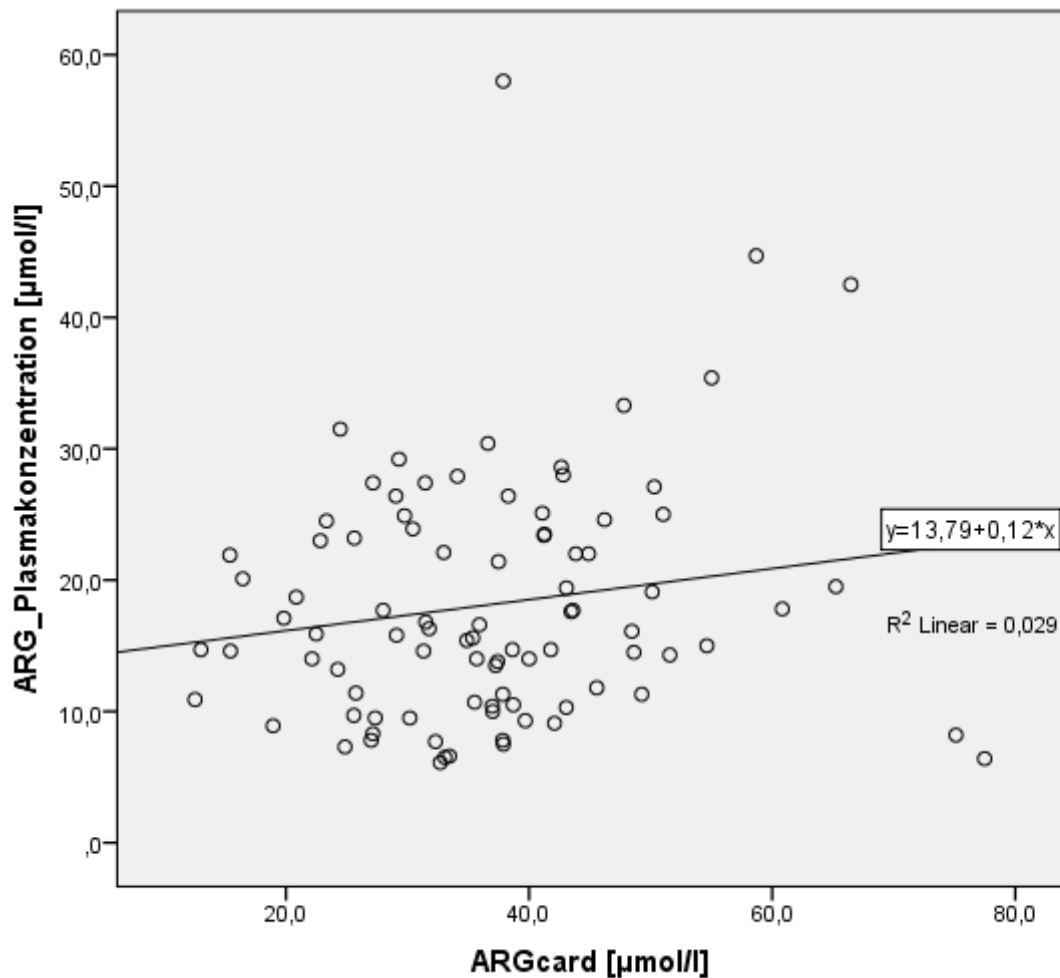


Abbildung 34: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen L-ArgininCard, gemessen mit ELISA und L-Arginin Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMACard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, n=91. Geradengleichung der linearen Regression: $Y_{(\text{Plasmakonzentration L-Arginin})} = 13,8 + 0,12 \cdot X$, $R^2=0,029$.

Bland-Altman: Difference ([LC-MS/MS] - [L-ArgCard]) vs average Chile-Studie

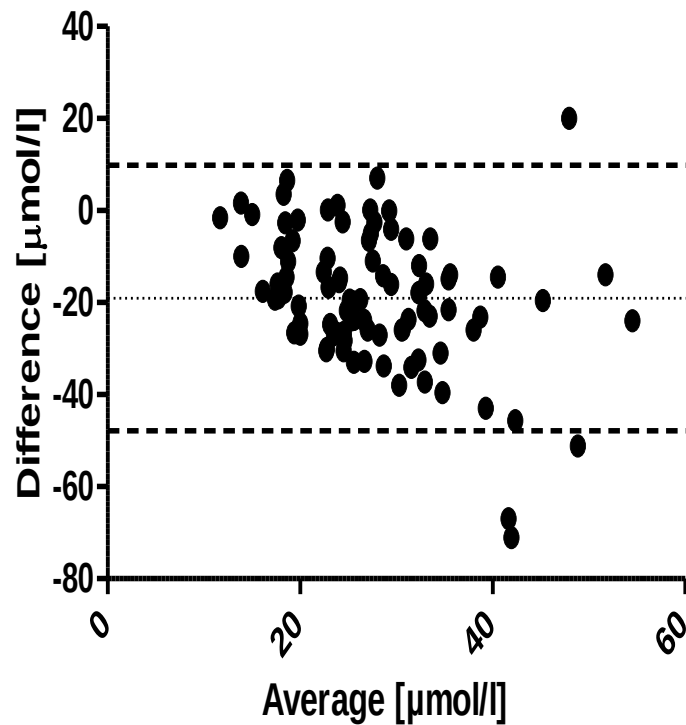


Abbildung 35: Bland-Altman-Plot der L-Arginin-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren. Ebenfalls dargestellt sind Bias und 95%-Limits of Agreement, n=91.

4.5.2 Vergleich mit Probanden aus dem UKE

4.5.2.1 Gruppencharakteristik bei der Messung von ADMA:

Die Untersuchung der zwei Kollektive aus dem UKE ergab eine signifikant höhere ADMA-Konzentration innerhalb der Dialyse-Gruppe, gemessen mittels ELISA.

In dem Kollektiv aus Dialyse-Patienten (n=20) wurde im Mittel eine ADMA-Konzentration von 1.109 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Standardfehler von ± 0.05 gemessen. In dem Kollektiv gesunder Probanden (n=17) aus dem Institut für klinische Pharmakologie wurde im Mittel eine ADMA-Konzentration von 0.78 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Standardfehler von ± 0.05 gemessen. Der zugehörige ungepaarte t-Test angewendet auf beide Gruppen ergibt einen p-Wert von $p < 0.0001$, mit $t=4.735$ und $df=35$.

4.5.2.2 Korrelationsanalyse für ADMA innerhalb dieses Kollektivs:

Die Korrelationsanalyse nach Pearson für ADMA Plasmamessungen, gemessen mit LC-MS/MS und Vollblutmessungen, gemessen mit ELISA, ist in Abb. 36 dargestellt. Die Korrelationsanalyse ergab für die zwei Messmethoden innerhalb dieses Kollektivs eine gute Korrelation mit $R=0,814$ ($p < 0,001$), $n=37$. Die einfache lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,03 + 0,88 \cdot X$.

Ein Bland-Altman-Plot in Abb. 37 vergleicht graphisch die Übereinstimmung zwischen den zwei Messverfahren. Auch in diesem Vergleich kann ein geringer systematischer Messfehler festgestellt werden: Der Bias des LC-MS/MS im Vergleich zum ELISA beträgt $-0,09 \mu\text{mol/l}$, die 95% Limits of Agreement sind $-0,42 \mu\text{mol/l}$, bzw. $0,24 \mu\text{mol/l}$. Es fällt auf, dass auch in diesem Kollektiv, trotz guter Korrelation, die 95%-Limits of Agreement ähnlich weit auseinander liegen, wie bereits in der Chile-Studie.

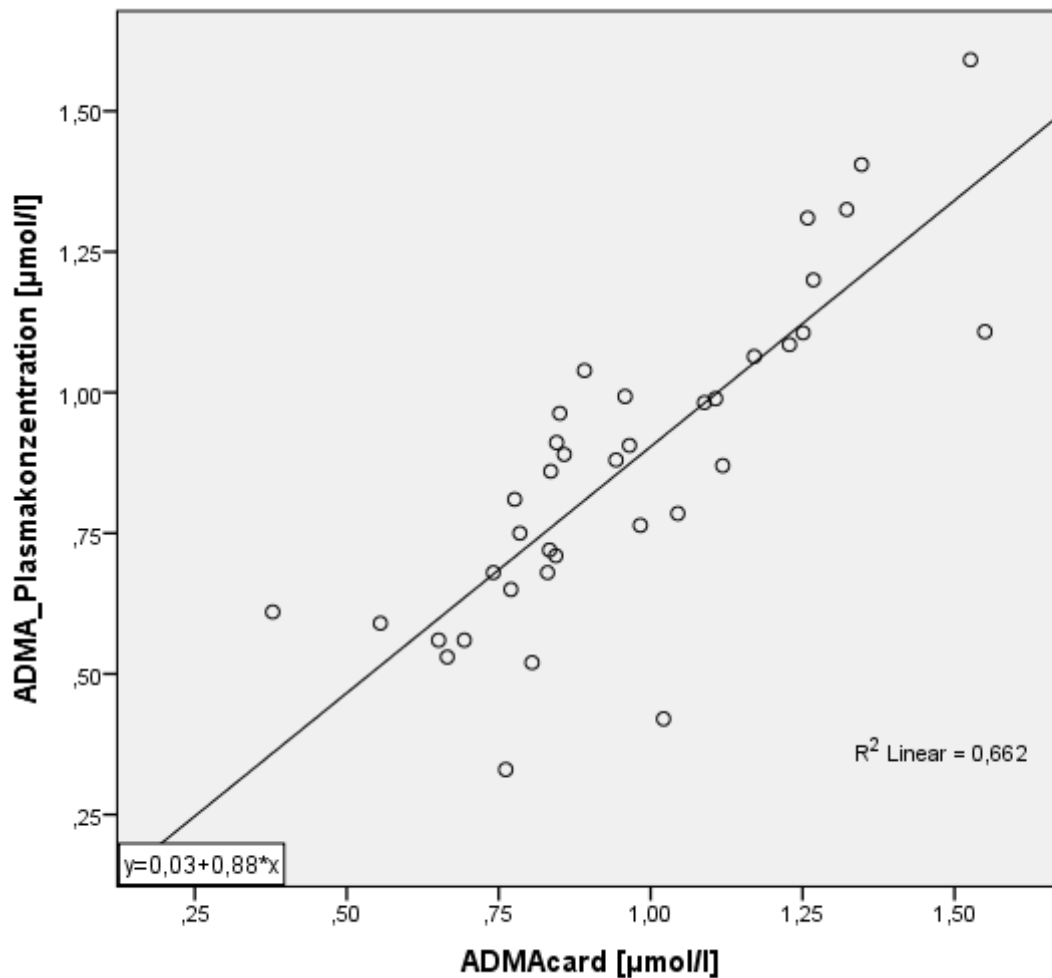


Abbildung 36: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ADMAcard, gemessen mit ELISA und ADMA Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMAcard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, n=37. Die Geradengleichung der Regressionsgeraden lautet: $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,03 + 0,88 * X$, $R^2=0,662$.

Bland-Altman: Difference ([LC-MS/MS] - [ADMAcard]) vs average UKE-Probanden

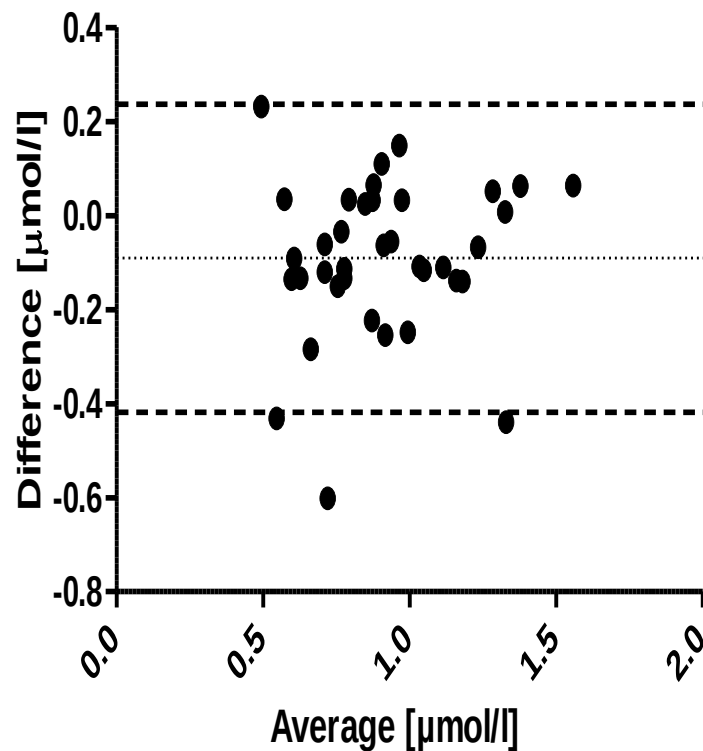


Abbildung 37: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Probanden aus dem UKE: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMAcard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren, sowie Bias und 95%-Limits of Agreement, n=37.

4.5.2.3 Gruppencharakteristik bei der Messung von L-Arginin:

Es handelte sich in dieser Gruppe um 17 freiwillige Probanden aus dem Institut für klinische Pharmakologie am UKE. Der Mittelwert der mit LC-MS/MS gemessenen Plasmakonzentrationen beträgt hier 100,5 µmol/l (SD= 28,9), der Mittelwert der mit ELISA bestimmten Konzentrationen beträgt 163,4 µmol/l (SD=39,4).

4.5.2.4 Korrelationsanalyse für L-Arginin innerhalb dieses Kollektivs

Die Korrelationsanalyse nach Pearson für L-Arginin Plasmamessungen, gemessen mit LC-MS/MS und Vollblutmessungen, gemessen mit ELISA, ist in Abb. 38 dargestellt. Die Korrelationsanalyse ergab für die zwei Messmethoden innerhalb dieses Kollektivs eine gute Korrelation mit $R=0,871$ ($p<0,001$), $n=17$. Die einfache lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y_{(\text{Plasmakonzentration L-Arginin})} = -3,8 + 0,64 \cdot X$.

Ein Vergleich der L-Arginin-Messergebnisse der gesunden UKE-Probanden mithilfe des Bland-Altman-Plot in Abb. 39 stellt hier einen deutlichen systematischen Messfehler fest: Der Bias beträgt -65,6 µmol/l für die LC-MS/MS Messung, die 95% Limits of Agreement sind -113,8 µmol/l, bzw. -17,4 µmol/l. Es fällt auf, dass in diesem Kollektiv, trotz guter Korrelation, die 95%-Limits of Agreement weiter auseinander liegen als in der Chile-Studie.

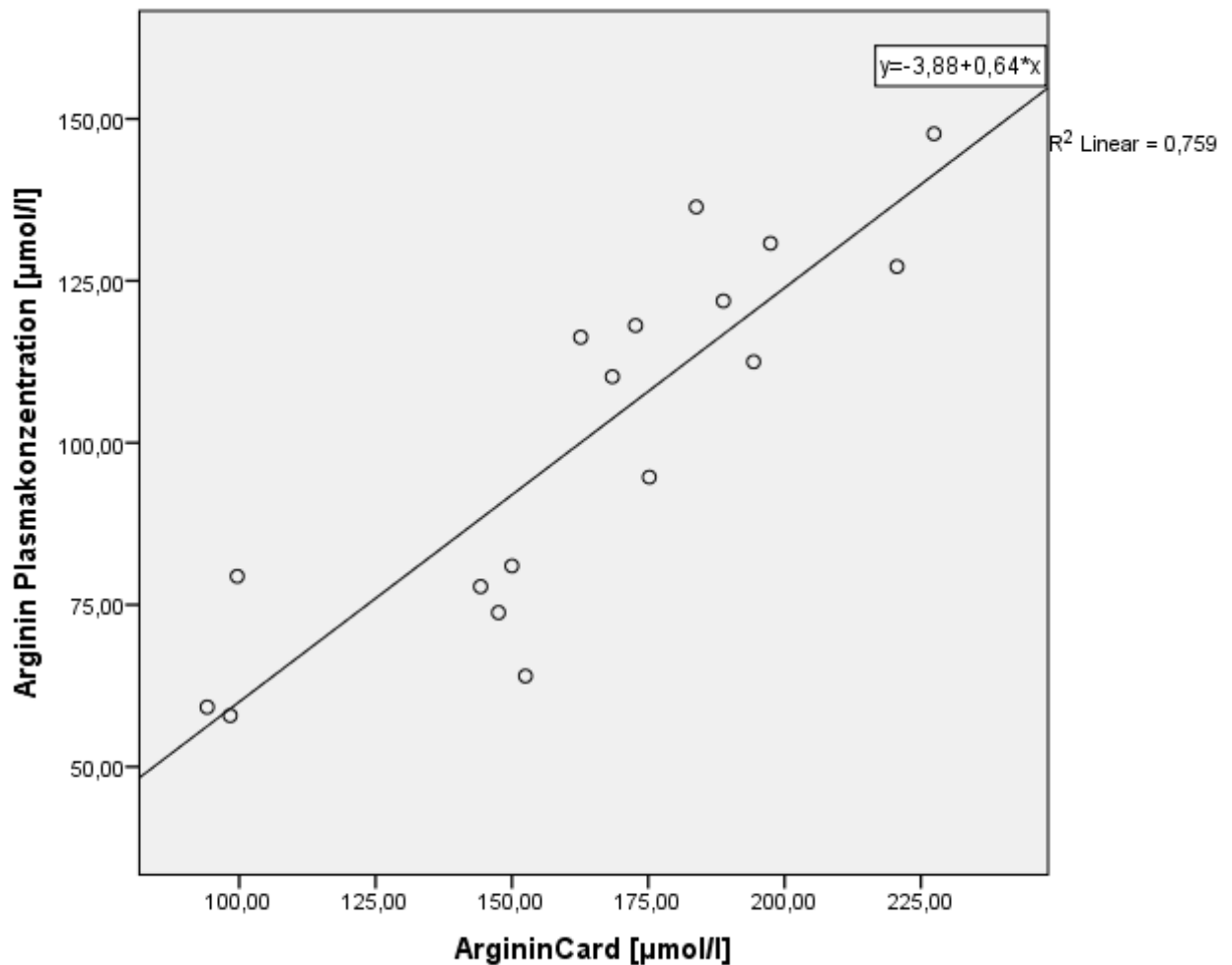


Abbildung 38: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ArgininCard, gemessen mit ELISA und Arginin Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMAcard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, n=17. Die lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y_{(\text{Plasmakonzentration L-Arginin})} = -3,8 + 0,64 * X$, $R^2 = 0,759$.

Bland-Altman: Difference ([LC-MS/MS] - [L-ArgCard]) vs average UKE-Probanden

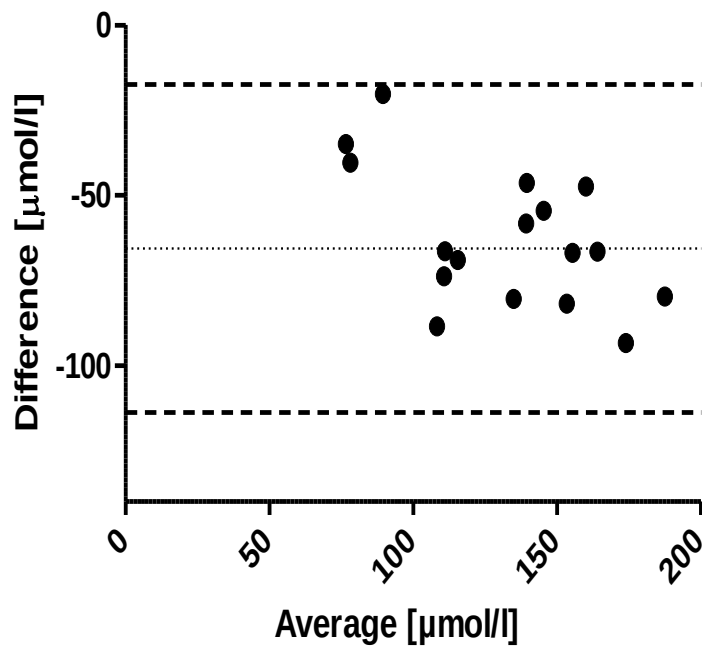


Abbildung 39: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren, sowie Bias und 95%-Limits of Agreement, n=17.

5 Diskussion

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Validierung eines Trockenblut-Tests zur Bestimmung von L-Arginin und ADMA. Zusätzlich sollte diese neue Messmethode, mit einem älteren, bereits etablierten Verfahren, dem LC-MS/MS verglichen werden und die Übereinstimmung überprüft werden. Es sollen zunächst die Ergebnisse besprochen werden, die zur Validierung herangezogen werden.

5.2 Validierung

Die Validierung eines bioanalytischen Testverfahrens dient dazu, festzustellen, ob ein Verfahren geeignet ist, klinische Messwerte zu erheben. Eine Voraussetzung für diese Eignung ist die methodische Reproduzierbarkeit. Diese wird bedingt durch Genauigkeit, Präzision, Robustheit, Reliabilität, Selektivität und Spezifität. Nicht alle diese Faktoren wurden in dieser Arbeit berücksichtigt, wie bereits in der Einleitung begründet wurde (siehe 2.13). Bei den Testreihen dieser Arbeit handelt es sich um Parameter, die zur Domäne der Präzision, der Reliabilität und, zu einem großen Teil, der Robustheit gehören. Andere, methodenspezifischen Kenngrößen (bspw. Selektivität, Spezifität, Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze), wurden bereits im Rahmen des firmeneigenen Validierungsprozesses untersucht.

Um die Güte des untersuchten ELISA bezüglich der Präzision und der Reliabilität zu beurteilen, wurden Empfehlungen der „Food and Drug Administration“ des „U.S. Department of Health and Human Services“ zur Validierung diagnostischer, bioanalytischer Assays herangezogen, sowie die vom Umweltbundesamt herausgegebene „Leitlinie zur Methodvalidierung“ (Wellnitz und Gluschke 2005) verwendet. Die jeweiligen Ergebnisse sollen im Folgenden besprochen werden.

5.2.1 Testspezifische Kenngrößen

Der Variationskoeffizient von durchschnittlich 10,4% für ADMA und 11,5% für L-Arginin in der Inter-Assay-Variabilität ist für ein diagnostisches Messverfahren laut Empfehlung der FDA ausreichend präzise. Gleiches gilt für den Variationskoeffizienten der Intra-Assay-Variabilität (6,7% für ADMA und 6,5% für L-Arginin). Es fällt auf, dass die Intra-Assay-Variabilität niedriger ist als die Inter-Assay-Variabilität. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, da bei der Messung der Inter-Assay-Variabilität mindestens ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor hinzukommt, nämlich die leicht unterschiedlich ausfallenden Testreihen, bedingt durch Umweltfaktoren (bspw. Temperaturunterschiede an den verschiedenen Testtagen) und/oder Chargenunterschiede der Testpackungen.

5.2.2 Personenspezifische Kenngrößen

Bei der intraindividuellen Variabilität wurden im Vergleich zur Intra- und Inter-Assay-Variabilität größere Variationskoeffizienten gemessen. Diese sind mit <15% jedoch immer noch akzeptabel. Für ADMA wurde ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 10,38% gemessen und für L-Arginin von 11,48%. Als Ursache für den höheren Variationskoeffizienten kommen diätetische Unregelmäßigkeiten in Frage. Über den Einfluss der Diät auf kurzfristige Änderungen der ADMA-Blutkonzentration gibt es unterschiedliche Ergebnisse: Während Fard et al. (2000) bei 50 Patienten mit Diabetes Typ II nach Einnahme einer fettreichen Mahlzeit kurzfristig (5h nach Baseline-Messung) einen signifikanten Anstieg von ADMA im Plasma messen konnten, haben Engeli et al. (2012) in einem Vergleich zwischen 17 normalgewichtigen und 12 fettleibigen Probanden nach einer zweiwöchigen Interventionsdiät keinen signifikanten Effekt im Hinblick auf ADMA-Plasmakonzentrationen feststellen können.

Für L-Arginin ist im Gegensatz der Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und Änderungen der Blutkonzentration eindeutiger. Als semiessentielle Aminosäure kann sie je nach Bedarf zu einem großen Teil über die Nahrung zugeführt werden, oder aus anderen Aminosäuren vom Körper synthetisiert werden.

In den oben beschriebenen drei Versuchsreihen wurden Variationskoeffizienten $<15\%$ ermittelt. In Anlehnung an die Guidelines der FDA ließe sich somit für den ELISA eine ausreichende Präzision bestätigen. Die erforderliche Präzision eines bioanalytischen Tests sollte allerdings immer auch in Bezug auf die Referenzwerte einer gesunden Population beurteilt werden: befinden sich diese Referenzwerte in einem engen Rahmen, so ist dies ebenfalls in der Beurteilung zu berücksichtigen.

5.2.3 Präanalytik

5.2.3.1 Prinzipielle Überlegungen

Eine Kernfrage der hier durchgeführten Untersuchungen beschäftigte sich mit dem Verhalten der Analyten im Zeitverlauf nach Auftragen des Blutes auf das Filterpapier. Verschiedene Mechanismen wurden als Einflussfaktoren auf die gemessene Konzentration in Erwägung gezogen. Einerseits war zu bedenken, dass die im Vollblut vorhandenen Zellen und sämtliche in ihnen enthaltenen Enzyme durch Lyseprozesse nach Auftragen auf das Filterpapier freigesetzt würden. Weitere Überlegungen wurden angestellt im Hinblick auf die Menge des aufgetragenen Blutes und Sättigungsprozesse des Filterpapiers. In der Praxis wird es bei Trockenbluttests häufig größere Schwankungen im Hinblick auf die aufgetragene Blutmenge geben. Auch dieser Aspekt wurde untersucht. Desweiteren ist die Lagerungsfähigkeit der Proben ein wichtiger Bestandteil der Alltagstauglichkeit eines Messverfahrens, hierzu gehören sowohl die Lagerungsfähigkeit bei Raumluft, als auch die Einflüsse mehrerer „Freeze & Thaw“-Zyklen. Auch diese zwei Sachverhalte wurden untersucht. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluss von EDTA auf die Messung, mit den Unterschieden einer kapillären Blutentnahme im Vergleich zu einer venösen, sowie dem Einfluss von längerer UV-Bestrahlung auf die Proben. Die Auswahl der in Erwägung gezogenen Einflussfaktoren erhebt jedoch keinen Anspruch an Vollständigkeit. Es wurde versucht, die wahrscheinlichsten Einflussfaktoren auszuwählen.

5.2.3.2 Einfluss von Luftfeuchtigkeit während des Trocknens:

Um mögliche Einflüsse bei der Trocknung der Blutproben auf dem Filterpapier zu untersuchen, wurden die Proben einer Gruppe direkt nach dem Auftropfen für 24 h bei 100% Luftfeuchtigkeit gelagert, die andere Gruppe wurde direkt nach dem Auftropfen mittels eines Ventilators schnell getrocknet. Durch diesen Aufbau wurde somit das Zeitfenster für enzymatische Reaktionen begrenzt – ohne ein Lösungsmittel (H_2O), so die Idee, kann schließlich keine Umsetzung erfolgen.

Bei der Messung von L-Arginin fiel auf, dass in der Gruppe, die einer hohen Luftfeuchtigkeit ausgesetzt war, die Konzentration deutlich abfiel. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Umsetzung von L-Arginin durch Enzyme, unter anderem das Enzym „Arginase“. Ein Hinweis auf die Beteiligung dieses Enzyms lieferten ferner die Versuche mit Nor-NOHA, sowie die Versuche mit einem Protease-Inhibitor Cocktail (siehe unten). Beide Substanzen sind in der Lage, das Arginase-Enzym zu hemmen.

Der verwendete Versuchsaufbau war geeignet, sehr deutliche Unterschiede der ermittelten Messwerte je nach Dauer des Trocknungsprozesses darzustellen. In diesem Fall zeigte der Test für L-Arginin eine deutliche verminderte Robustheit unter dem Einfluss höherer Luftfeuchtigkeit.

In den Testreihen mit Nor-NOHA konnte festgestellt werden, dass durch Auftragen diesen Enzyminhibitors die Konzentration von L-Arginin - auch unter Bedingungen mit hoher Luftfeuchtigkeit während des Trocknungsprozesses – nicht messbar abfiel, im Vergleich zur ventilatorgetrockneten „Kontrollgruppe“.

Bei der Messung von ADMA konnte kein relevanter Unterschied der zwei Gruppen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die auf den Karten gemessene Konzentration von ADMA nicht wesentlich von Proteinolyse oder enzymatischer Umsetzung „in vitro“, also auf dem Filterpapier, beeinflusst wird.

Die hier diskutierten Versuchsaufbauten haben einen wichtigen Schwachpunkt des ADMA-L-Arginin-ELISA aufgezeigt: unter dem Einfluss höherer Umgebungsfeuchtigkeit ist es unter Umständen möglich, dass die gemessenen Konzentrationen für L-Arginin niedriger ausfallen, als wenn die Karten unter

trockenen Bedingungen präpariert und gelagert werden. Änderungen in der Dauer des Trocknungsprozesses haben ebenfalls maßgebliche Auswirkungen auf die gemessene Konzentration. Es ist schwierig, den Trocknungsprozess zu standardisieren. Eine mögliche Lösung wäre der Einsatz eines Arginase-Inhibitors wie z.B. Nor-NOHA. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest unter kurzfristig (12 h) extrem erhöhter Luftfeuchtigkeit die Anwendung von Nor-NOHA effektiv die Umsetzung von L-Arginin verhindert. Leider können keine Aussagen bezüglich der Stabilität von Nor-NOHA auf dem Filterpapier getroffen werden. Entsprechende Untersuchungen sind hier also noch nötig.

5.2.3.3 Enzymatisch bedingte Konzentrationsänderungen während des Trocknens

Die Benutzung eines Protease-Inhibitor Cocktails sollte einen möglichen Einfluss von Enzymen offenlegen. Insbesondere die Möglichkeit der nachträglichen Freisetzung, bzw. des nachträglichen Abbaus der Analyten war von Interesse. Bei den Versuchen ergab sich im Hinblick auf die ADMA-Konzentrationsbestimmung kein signifikanter Unterschied. Jedoch war die gemessene Konzentration an L-Arginin in der Versuchsgruppe mit Protease-Inhibitor signifikant höher ($p < 0,0001$).

Eine gute Erklärung für den hier beobachteten Effekt liegt in der Inhibierung des Enzyms Arginase, welches in der Lage ist, L-Arginin hydrolitisch zu spalten. Hierbei wird Arginin unter Anwesenheit von Wasser zu Harnstoff und Ornithin umgesetzt. Der Protease-Inhibitor-Cocktail von Sigma-Aldrich enthält hohe Konzentrationen an gebundenem Flourid in Form des Serinproteaseinhibitors „4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid“ (AEBSF). Das darin enthaltende Flourid vermag die Arginase zu inhibieren, mit einer IC_{50} von $1500 \pm 200 \mu\text{mol}$ bei einem pH-Wert von 7,4 (Cama et al. 2004).

5.2.3.4 Effekt von Nor-NOHA auf die Messungen bei 12 h Luftfeuchtigkeit

In Ergänzung zu den Versuchen mit einem Protease-Inhibitor Cocktail bewirkt auch die Verwendung des spezifischen Arginase-Inhibitors Nor-NOHA signifikant höhere Konzentrationen an gemessenem L-Arginin, insbesondere unter dem gleichzeitigen Einfluss höherer Luftfeuchtigkeit beim Trocknen der Filterpapierkarten.

Die Versuchsreihen mit Nor-NOHA zeigten, dass die Verwendung des Arginase-Inhibitors Nor-NOHA bei der Präparation der Karten die Umsetzung von L-Arginin direkt nach dem Auftropfen von Blut signifikant verringert. Der Effekt war am stärksten festzustellen bei hoher Umgebungsluftfeuchtigkeit, die den Trocknungsprozess verlängert. In diesem Zusammenhang empfiehlt sich die Verwendung von Nor-NOHA um die Proben unempfindlicher gegenüber klimatischen Bedingungen zu machen. Die Kreuzreaktivität mit dem ELISA (s.u.) sollte jedoch berücksichtigt werden und erfordert eine genaue Dosierung.

5.2.3.5 *Nor-NOHA Negativprobe*

Die Nor-NOHA Negativproben zeigte im ELISA eine gewisse Kreuzreaktivität: die mittlere gemessene Konzentration betrug 0,17 $\mu\text{mol/l}$ für ADMA und 9,6 $\mu\text{mol/l}$ für L-Arginin. Da Nor-NOHA ein Struktur analogon des L-Arginin ist, war zu erwarten, dass ein gewisser Anteil dieses Inhibitors ebenfalls in den Messergebnissen auftaucht. Aus diesem Grund wurde dieser Versuch bereits zu Anfang der Arbeit durchgeführt, damals noch mit einer größeren Menge an Nor-NOHA. Es wurden 3x 50 μl einer 400mM Lösung verwendet. Da die Ergebnisse dieses Versuchs eine gewisse Kreuzreaktivität des Nor-NOHA mit dem L-Arginin und ebenfalls mit dem ADMA ELISA aufzeigten, wurde in darauffolgenden Versuchen mit Nor-NOHA nur noch die halbe Menge, also 3x 25 μl einer 400mM Lösung aufgetragen. Im Hinblick auf die Trocknung der Karten bei hoher Luftfeuchtigkeit (s.o.) scheint diese Menge ausreichend zu sein. Die enzymatische Umsetzung wird so bereits ausreichend unterdrückt.

5.2.3.6 *Einfluss der verwendeten Blutmenge auf das Messergebnis:*

In diesem Test wurde überprüft, inwieweit die aufgetragene Menge Blut sich in den Ergebnissen widerspiegelt. Die Erfahrung mit diesem ELISA und den dazugehörigen Karten aus Filterpapier hat schon von Anfang an gezeigt, dass die Felder auf den Karten sehr häufig nur mit winzigen Tropfen Kapillarblut betropft werden und sich das Blut somit nur kaum über die Ausmaße eines Stanzlings ausbreitet. Es lag also nahe, zu überprüfen, inwieweit das Filterpapier durch unterschiedliche Blutmengen gesättigt werden kann. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten in den zwei Gruppen kleine Unterschiede, die über das Maß an Streuung hinausgehen, welches aufgrund

der Versuche mit der Variabilität (s. 4.1.1.) zu erwarten gewesen wäre. Allerdings zeigte ein t-test für keine der beiden Substanzen signifikante Unterschiede an.

Es lässt sich also sagen, dass das Filterpapier soweit gesättigt sein muss, dass zumindest keine signifikanten Messunterschiede durch unterschiedliche Blutmengen resultieren. Aufgrund der, im Vergleich zu den Ergebnissen aus 4.1.1., relativ größeren Unterschiede, ließe sich möglicherweise durch eine Standardisierung der aufgetragenen Blutmenge noch eine Verbesserung der Präzision erreichen.

5.2.3.7 „Freeze & Thaw“

Laut Arbeitsanleitung ist es möglich, die Karten bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur zu lagern, um sie danach ggf. für spätere Testdurchführung einzufrieren. Um die Stabilität der Proben auch nach mehreren Einfrier- und Auftauvorgängen zu untersuchen, wurden mehrere Proben entsprechend präpariert. Es hat sich gezeigt, dass für ADMA und für L-Arginin auch durch drei aufeinanderfolgenden „Freeze & Thaw“-Zyklen keine relevanten Konzentrationsänderungen ergeben.

5.2.3.8 Einfluss der Methode der Blutentnahme auf die Messung

Das Filterpapier der Karten kann auf zwei verschiedenen Wegen mit Blut betropft werden; entweder benutzt man eine Lanzette und entnimmt so Kapillarblut aus dem Finger o.ä. oder man betropft die Karten mit Blut, dass per Venenpunktion gewonnen wurde. In dieser Arbeit konnte für ADMA keine relevanten Unterschiede bezüglich des Entnahme-Modus festgestellt werden. Allerdings betrug die gemessene L-Arginin Konzentration im venösen Blut im Mittel etwa 27% weniger als im kapillär entnommenen Blut ($p=0,0043$). Diese arteriovenöse Differenz wurde für L-Arginin und für Aminosäuren im Allgemeinen bereits bei anderen Forschern beschrieben (McCormick & Webb 1982 und Wahren et al. 1972). Für die Bestimmung von L-Arginin sollte diesen Ergebnissen zufolge in Zukunft die Entnahmemethode berücksichtigt werden.

5.2.3.9 Testreihe UV-Licht

Die gemessene Konzentration für ADMA betrug im Mittel 9,8% weniger in der Gruppe, die dem UV-Licht ausgesetzt war (n=4), als in der Kontrollgruppe (n=4). Für L-Arginin wurde in der Gruppe „UV-Licht“ (n=4) eine im Mittel 7,3% geringere Konzentration gemessen als in der Kontrollgruppe (n=4). Die Karten waren in diesem Fall ca. 240 Stunden dem UV-Licht ausgesetzt. Es fällt auf, dass in dieser Versuchsreihe die ermittelte Veränderung der Proben der vier Probanden untereinander stark schwankt ($1,96\sigma$ -Wert für ADMA und L-Arginin jeweils $>20\%$). Eine signifikante Änderung kann somit nicht festgestellt werden. Ein durchgeführter t-test ergab eine nicht signifikante Änderung.

5.2.3.10 Einfluss der Lagerungsdauer

Um zeitlich bedingte Veränderung der Proben und damit auch Änderungen derer Konzentrationen zu ermitteln, wurden die Proben nach einer Nullbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erneut gemessen. Auch hierbei wurde in allen Messungen, außer in der Bestimmung von ADMA nach 21 Tagen, eine relativ hohe Schwankungsbreite der Probenkonzentrationen der vier Probanden untereinander festgestellt (siehe Abbildung 21).

Die Konzentrationsänderungen lassen sich deshalb nicht eindeutig einem Trend zuordnen, dafür sind die Konfidenzintervalle zu groß. Für keine der Messungen konnte im Vergleich zur Nullbestimmung ein t-Test eine signifikante Veränderung der mittleren Konzentrationen errechnen. Es ist denkbar, dass in diesem Fall Messfehler zu einer solchen Ungenauigkeit geführt haben. Lediglich die Messung von ADMA nach 21 Tagen liefert verwertbare Ergebnisse: Bei dieser Messung konnte eine geringfügige Zunahme der gemessenen Konzentration von durchschnittlich 6,7% festgestellt werden (95% Konfidenzintervall: -0,24 und 13,64). Diese Änderung bewegt sich im gleichen Bereich wie die der Inter-Assay-Variabilität. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass der gemessene Unterschied lediglich im Rahmen der normalen Schwankungsbreite aufgetreten ist.

ELISAs sind empfindlich bzgl. Umweltveränderungen – möglicherweise haben sich klimatischen Veränderungen (trotz Innenklimatisierung) auch in den

Messergebnissen niedergeschlagen. Diese Tatsache illustriert gleichermaßen auch einen Schwachpunkt dieser Arbeit, denn es wurden keine eigenen Qualitätskontrollen in jeder Messung mit untersucht. Diese sind sinnvoll, denn sie tragen dazu bei, ggf. auftretende Trends zu erkennen. Solche Trends könnten bedingt sein durch klimatische Veränderungen (s.o.), aber auch durch Chargenunterschiede oder wechselnde Untersucher.

Eine weitere mögliche Erklärung soll allerdings nicht unerwähnt bleiben: Bei beiden oben erwähnten Versuchsreihen könnte eine enzymatische Umsetzung der Analyten in Betracht gezogen werden. Durch unterschiedliche Konzentration der entsprechenden Enzyme im Blut der Probanden (bspw. DDAH oder Arginase) könnten sich die Unterschiede im Lauf der Zeit potenzieren und somit die größere Schwankung erklären.

5.2.3.11 Lagerungseinflüsse (Temperatur, Luftfeuchtigkeit)

Hohe Temperaturen, sowie eine hohe Luftfeuchtigkeit bedingen eine Verringerung der gemessenen Analytenkonzentration. Diese Arbeit hat gezeigt, dass eine einheitliche und möglichst kurze Lagerung der Karten für präzise Testergebnisse unabdingbar ist.

Der enzymatische Umsatz von L-Arginin durch die Arginase ist eine Hypothese, die die Veränderung in der gemessenen Analytenkonzentration erklären kann. Für diese Hypothese sprechen die in 4.4.3. besprochenen Ergebnisse. Die gemessene Konzentrationsänderung für ADMA hat sich im Vergleich langsamer vollzogen. Als mögliche Ursache für den Abbau käme das Enzym DDAH in Frage, dass im Rahmen der Zelllyse aus Neutrophilen und Makrophagen freigesetzt werden kann, und nachträglich auf dem Filterpapier enzymatische Vorgänge katalysiert (vgl. Kapitel 2.7).

5.3 Vergleich zwischen LC-MS/MS und ELISA:

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in dem Vergleich zwischen den zwei Messmethoden LC-MS/MS und ELISA. Hierzu wurden vorbestehende Daten der Chile-Studie statistisch ausgewertet, sowie eigene klinische Messwerte erhoben. Es wurden Messwertepaare aus jeweils beiden Messverfahren gebildet und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, sowie die Überprüfung der Übereinstimmung mit einem Bland-Altman-Plot, sollten ein weiterer Baustein im Validierungsprozess des ADMACard ELISA sein.

Unabhängig von dem hier besprochenen Verfahren gibt es bereits ein validiertes ELISA-Verfahren zur Messung von ADMA und L-Arginin im menschlichen Plasma. Dieses Verfahren zeigte in dem Validierungsverfahren ein hohes Agreement, also eine gute Übereinstimmung, mit dem „Goldstandard“ der Massenspektrometrie (vgl. Schulze et al. 2004). Bezüglich der Übereinstimmung der aus Vollblut erhaltenen ELISA Messwerte mit dem LC-MS/MS-Verfahren liefert diese Arbeit unterschiedliche Ergebnisse.

5.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse:

Es wurden zwei Kollektive zum Vergleich der zwei Verfahren herangezogen, ein Kollektiv stammte aus der Chile-Studie, das andere Kollektiv bestand aus Probanden des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Die Korrelation zwischen ELISA und LC-MS/MS war in dem Kollektiv der Chile-Studie deutlich schlechter. Für das andere Kollektiv konnte ein wesentlich besserer Zusammenhang dargestellt werden. Hier konkurrieren nun zwei Überlegungen miteinander: die Daten der Chile-Studie ergeben sich aus einer deutlich höheren Anzahl an Probanden/Proben. Andererseits sind diese Daten für den Verfasser dieser Arbeit wesentlich schlechter zu überprüfen oder nachzuvollziehen. Die Proben der Chile-Studie wurden in Chile gewonnen, und dann nach Deutschland geschickt, um im UKE untersucht zu werden – es ist im Nachhinein nicht möglich, die Probengewinnung, sowie die Transportbedingungen zu rekonstruieren. Die Ergebnisse der ELISA-Validierung geben Hinweise darauf, dass Umweltbedingungen (Luftfeuchtigkeit, Lagerung,

Transport im Flugzeug/Schiff bei unbekannten Bedingungen) verantwortlich sein können für Messungenauigkeiten. Für die Proben aus Hamburg ist andererseits der Weg von der Probengewinnung bis zu der Probenauswertung eindeutig bekannt. Es gab hierbei ein einheitliches Vorgehen, sowie einen einzelnen Verantwortlichen. Bei der Interpretation der Daten sollte dies Berücksichtigung finden.

Bezüglich der Überprüfung der Übereinstimmung beider Verfahren wurden in beiden Fällen nach den Regeln von Bland & Altman vorgegangen. Es wurden für L-Arginin und für ADMA jeweils zwei Bland-Altman-Plots, zugehörig zu den jeweiligen Kollektiven, angefertigt. Die ermittelte Übereinstimmung ist klinisch zu interpretieren:

Der im Rahmen der Chile Studie gemachte Vergleich zwischen LC-MS/MS und der ELISA-Methode ergibt im Mittel für die LC-MS/MS Messung von ADMA eine um $0,16 \mu\text{mol/l}$ höhere Konzentration, als der Durchschnittswert beider Verfahren. Die 95%-Limits of Agreement für diesen Bias liegen zwischen $-0,20 \mu\text{mol/l}$, bzw. $0,53 \mu\text{mol/l}$, das bedeutet, dass 95% der Messergebnisse in diesem Bereich der Übereinstimmung liegen. Im Gegensatz dazu fällt auf, dass in dem Kollektiv aus dem UKE das LC-MS/MS für ADMA eine um $-0,09 \mu\text{mol/l}$ geringere Konzentration misst, als der Durchschnittswert beider Verfahren angibt. Hier liegen die 95%-Limits of Agreement zwischen $-0,42 \mu\text{mol/l}$, bzw. $0,24 \mu\text{mol/l}$. Auch wenn beide Vergleiche einen Trend in unterschiedliche Richtungen zeigen, und auch wenn der Bias beider Vergleiche einen Vorzeichenwechsel vornimmt, so zeigen doch beide Vergleiche ähnlich große Konfidenzintervalle (siehe 5.2.2.).

Für L-Arginin ergab sich eine in der Chile-Studie ein Bias von $-19,02 \mu\text{mol/l}$ der LC-MS/MS Messung im Vergleich mit dem ELISA. Die 95%-Limits of Agreement liegen zwischen $-47,86 \mu\text{mol/l}$ und $9,81 \mu\text{mol/l}$, während für das UKE-Kollektiv ein Bias von $-65,60$, mit 95%-Limits of Agreement zwischen $-113,80 \mu\text{mol/l}$ und $-17,41 \mu\text{mol/l}$ vorliegt. Die ELISA-Methode misst also deutlich höhere L-Arginin-Konzentrationen als das LC-MS/MS Verfahren.

Billecke et al. (2009) konnten bei Nierenkranken einen im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ stärkeren Anstieg des Plasmagehalts an ADMA, im Vergleich zu dem des Zytosols zeigen. Das bedeutet, dass bei höheren ADMA Konzentrationen die Unterschiede im Vollblut nicht so ausgeprägt waren wie im

Plasma. Die Ergebnisse von Billecke et al. zeigen allerdings trotzdem einen signifikanten Anstieg der Vollblut ADMA-Konzentrationen von etwa 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Davids et al. (2012): Hier wurde im Konzentrationsbereich $>0,6 \mu\text{mol}$ ein stärkerer Anstieg der Intrazellulären Konzentrationen als der der Plasmakonzentrationen gemessen. In dieser Arbeit konnte für ADMA – auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Kollektive – kein signifikanter Trend festgestellt werden.

5.3.2 Klinische Beurteilung der ermittelten Übereinstimmung

Um die ermittelte Übereinstimmung der zwei Messverfahren zu beurteilen, müssen klinische Vergleichswerte herangezogen werden, um eine Idee davon zu erhalten, in welchem Rahmen sich die Unterschiede zwischen „normal“ und „pathologisch“ manifestieren. Der Unterschied zwischen pathologischen und normalen Konzentrationen wird anhand von Referenzwerten definiert. Diese Referenzwerte stammen aus einem repräsentativen, gesunden Kollektiv und entsprechen bei einer Gauß'schen Normalverteilung den Werten, zwischen denen 95% aller Werte der gesunden Personen liegen. Mithilfe dieser Referenzwerte kann nun eingeschätzt werden, inwieweit die ermittelten Übereinstimmungen und Unterschiede klinische Relevanz haben:

In einer Studie mit Nachkommen der Framingham-Kohorte haben Schwedhelm et al. anhand von 1126 gesunden Probanden Referenzwerte für die Plasmakonzentration von ADMA ermittelt. Für ADMA geben sie eine mittlere Plasmakonzentration von $0.52 \mu\text{mol/L}$ an, sowie Referenzwerte (innerhalb der 2,5 – und 97,5%-Marke) von 0.31 und 0.73 (95% CI: 0.30– 0.32 und 0.72–0.74) (Schwedhelm et al. 2009). Andere Autoren ermittelten ähnliche Werte (Hov GG et al. 2007 und Meinitzer et al. 2007)

Lüneburg et al. ermittelten Referenzwerte für L-Arginin ebenfalls anhand von 1141 Nachkommen der Framingham-Kohorte. Sie errechneten eine mittlere Plasmakonzentration von L-Arginin von $77.4 \pm 18.2 \text{ mmol/L}$ (95% CI), die Referenzwerte befanden sich zwischen $41,0 \text{ mmol/L}$ (95% CI: 39.5–42.5mmol/L), sowie 114 mmol/L (95% CI = 112–115 mmol/L) (Lüneburg et al. 2011). Andere

Autoren ermittelten auch hier ähnliche Werte (Hov GG et al. 2007 und Meinitzer et al. 2007).

Die hier angegebenen Referenzwerte wurden als Plasmakonzentrationen angegeben. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA misst jedoch die Analytenkonzentrationen im Vollblut. Hier entstehen möglicherweise Abweichungen von der Plasmakonzentration, da ebenfalls die intrazelluläre Komponente in die Messung mit einbezogen wird. Trotzdem lassen sich folgende Aussagen bzgl. der Übereinstimmung der zwei Messverfahren treffen:

- 1.) Die Referenzwerte der Plasmakonzentration von ADMA liegen bei Gesunden - im Vergleich zur ermittelten Übereinstimmung von LC-MS² und ELISA - innerhalb eines relativ kleinen Konzentrationsbereichs.
- 2.) Die Referenzwerte für L-Arginin im Plasma sind deutlich niedriger, als die mit dem ELISA im Vollblut gemessenen Konzentrationen.

In Anbetracht der eng definierten Referenzwerte für eine gesunde Population (s.o.) sind die für die Übereinstimmung ermittelten 95%-Limits of Agreement vergleichsweise hoch, wollte man das LC-MS/MS-Verfahren mit dem ELISA-Verfahren ohne weitere Untersuchungen austauschen. Um besser einschätzen zu können, welche Konsequenz erhöhte Werte für den Patienten haben, ist es also erst noch erforderlich, in Bezug auf Vollblut, Referenzwerte zu ermitteln. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich:

Beispielsweise fehlen für beide Populationen, sowohl denen der Chile-Studie, als auch denen aus dem UKE, ausführliche Anamnesen. Da die Studie primär nur die Messwerte zwischen den zwei Verfahren vergleichen wollte, können die Probanden im Nachhinein nicht normiert werden. Schlussendlich stellt sich auch die Frage, inwieweit ein Verfahren, dass sich methodisch so sehr vom etablierten Verfahren unterscheidet, überhaupt den Anspruch erheben kann, das LC-MS zu ersetzen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Blutproben von Dialyse-Patienten aus dem UKE zeigten im Vergleich mit gesunden Probanden aus dem Institut für klinische Pharmakologie in Bezug auf ihre ADMA-Blutwerte, dass die ADMA-Konzentrationen in der Dialyse-Gruppe signifikant höher waren, als die der gesunden Probanden

($p < 0.0001$). Diese Ergebnisse sind jedoch insoweit sehr limitiert, als sie in keiner Weise kontrolliert sind, und ebenfalls nicht ohne weiteres auf andere Patientenkollektive anwendbar sind. Auch hier wird deutlich, dass für den Vollblut-ELISA schlichtweg noch Referenzwerte fehlen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden einige Stärken des untersuchten ELISA-Verfahrens herausgearbeitet, wie beispielsweise die einfache Durchführbarkeit bei gleichzeitig akzeptabler Präzision, sowie die gute Probenstabilität. Es wurden allerdings auch einige Schwächen beleuchtet. Bei der Messung von L-Arginin gibt es eine Diskrepanz zwischen arterieller und venöser Probeentnahme; außerdem verringert sich die L-Arginin-Konzentration bereits bei kurzer Lagerung in hoher Luftfeuchtigkeit und es gibt in diesem Zusammenhang Anzeichen dafür, dass uneinheitliche Umweltbedingungen während des Trocknungsprozesses bei der Bestimmung von L-Arginin signifikante Unterschiede verursachen. Durch Modifikation ist es möglich, das Messverfahren weiter zu optimieren, wie in dieser Arbeit durch die Verwendung des Arginase-Inhibitors „Nor-NOHA“ gezeigt wurde. In gegebener Zeit eignet sich dieser Test möglicherweise für ein standardisiertes Messverfahren, was weiterhin Ungenauigkeiten, bedingt durch die Empfindlichkeit eines ELISA gegenüber Umwelteinflüssen, dezimieren zu helfen vermag.

Im Hinblick auf die Übereinstimmung des ELISA mit der etablierten Methode des LC-MS/MS liefert diese Arbeit ebenfalls erste Ergebnisse, wenn auch teilweise widersprüchliche. So sind beispielsweise die zwei durchgeführten Korrelationsanalysen nicht konkordant. Andererseits liefern beide ähnliche große Werte bzgl. der Abweichung der zwei Verfahren zueinander: Die ermittelte Übereinstimmung ist – im Hinblick auf geltende Toleranzgrenzen – vergleichsweise hoch und lässt einen Austausch der zwei Messverfahren nicht zu. Vom ELISA werden andere Kompartimente des „Blutes“ untersucht als von der Methode LC-MS/MS. Die klinische Konsequenz hieraus ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Um den prognostischen Wert des neuen Verfahrens zu untersuchen, sind somit weitere Untersuchungen notwendig.

7 Literaturverzeichnis

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2001; 88: 1201–1203.

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23.

Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in posttranslational modifications. *Trends Biochem Sci* 1998;23:89-91.

Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, Obayashi S (1995) Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 115:1001–1004.

Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell.* 2005;18(3):263-72.

Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell.* 2009;33(1):1-13.

Billecke SS, D'Alecy LG, Platel R, Whitesall SE, Jamerson KA, Perlman RL, Gadegbeku CA. Blood content of asymmetric dimethylarginine: new insights into its dysregulation in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(2):489-96.

Billecke SS, Kitzmiller LA, Northrup JJ, Whitesall SE, Kimoto M, Hinz AV, D'Alecy LG. Contribution of whole blood to the control of plasma asymmetrical dimethylarginine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1788-96.

Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med*. 2006;38(2):126-36.

Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:79-99.

Böger RH (a), Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842–1847.

Böger RH (b), Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(5):1336-44.

Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res*. 2009;60(6):481-7.

Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol* 1995;269: C750–756.

Boulanger MC, Liang C, Russell RS, Lin R, Bedford MT, Wainberg MA, Richard S. Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol*. 2005 Jan;79(1):124-31.

Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens*. 1993 Apr;7(2):193-4.

Cama E, Pethe S, Boucher JL, Han S, Emig FA, Ash DE, Viola RE, Mansuy D, Christianson DW. Inhibitor coordination interactions in the binuclear manganese cluster of arginase. *Biochemistry*. 2004 Jul 20;43(28):8987-99.

Ceremużyński L, Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K. Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1997;1;80(3):331-3.

Chan J, Böger R, Bode-Böger S, et al. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1040.

Chin-Dusting JP, Willems L, Kaye DM. L-arginine transporters in cardiovascular disease: a novel therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2007;116:428–36.

Christensen HN. Organic ion transport during seven decades. The amino acids. *Biochim Biophys Acta*. 1984;779:255–69.

Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:977-83.

Closs EI, CATs, a family of three distinct cationic amino acid transporters. *Amino Acids* 1996;11:193–208.

Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y^+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*. 1997;1(1):65-73.

Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs) *J Membr Biol*. 2006;213:67–77.

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991;83:1057-62.

Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*. 2002 Sep;18(9):761-6.

Davids M, van Hell AJ, Visser M, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA, Teerlink T. Role of the human erythrocyte in generation and storage of asymmetric dimethylarginine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(8):H1762-70.

Deves R, Boyd CAR. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*. 1998;78:487–545.

Edelman ER. On causes: Hippocrates, Aristotle, Robert Koch, and the Dread Pirate Roberts. *Circulation*. 2001;104(21):2509-12.

Engeli S, Tsikas D, Lehmann AC, Böhnke J, Haas V, Strauß A, Janke J, Gorzelniak K, Luft FC, Jordan J. Influence of dietary fat ingestion on asymmetrical dimethylarginine in lean and obese human subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(9):720-6.

Faraci FM¹, Brian JE Jr, Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*. 1995;269(5):H1522-7.

Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(9):2039-44.

Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation*. 2000; 101:856–861.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984;6 Suppl 2:S336-43.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178:551–556.

Hu X, Xu X, Zhu G, Atzler D, Kimoto M, Chen J, Schwedhelm E, Lüneburg N, Böger RH, Zhang P, Chen Y. Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2009;1;120(22):2222-9.

Hov GG, Sagen E, Bigonah A, Asberg A. Health-associated reference values for arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) measured with high-performance liquid chromatography. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(8):868-76.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction. Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092–3095.

Jacobsen LC, Theilgaard-Mönch K, Christensen EI, Borregaard N. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood.* 2007;1;109(7):3084-7.

Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethylarginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970;245:5751-8.

Kielstein JT (a), Bode-Böger SM, Frölich JC, et al. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation.* 2003;107:1891–1895.

Kielstein JT (b), Bode-Böger SM, Klein G, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:370–375.

Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoyer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 2004;20;109(2):172-7.

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999 Oct 1;343 Pt 1:209-14.

Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation.* 1998;2;97(21):2123-8.

Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:111–116.

Lüneburg N, Xanthakis V, Schwedhelm E, Sullivan LM, Maas R, Anderssohn M, Riederer U, Glazer NL, Vasan RS, Böger RH. Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort. *J Nutr.* 2011;141(12):2186-90.

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br. J. Pharmacol.* 1996;119:1533-1540.

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 2003;83:183–252.

Masuda H, Goto M, Tamaoki S, et al. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br J Pharmacol*. 1999;126:211–218.

McCormick ME, Webb KE Jr. Plasma free, erythrocyte free and plasma peptide amino acid exchange to calves in steady state and fasting metabolism. *J Nutr*. 1982;112(2):276-82.

McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J*. 1976; 154(1):179–184.

Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin Chim Acta*. 2007;384(1-2):141-8.

Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC et al. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 697–712.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999; 99:1141–1146.

Mügge A, Hanefeld C, Böger RH, et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter CARDIAC study. *Atheroscler Suppl*. 2003;4:29–32.

Nicholson TB, Chen T, Richard S. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res*. 2009 Dec;60(6):466-74.

Nijveldt RJ(a), Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). Clin Nutr. 2003(a);22(1):17-22.

Nijveldt RJ(b), Teerlink T, van Guldener C, Prins HA, van Lambalgen AA, Stehouwer CDA, et al. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. Nephrol Dial Transplant. 2003(b);18:2542–50.

Nijveldt RJ, van Leeuwen PAM, van Guldener C, Stehouwer CDA, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SMDA) dimethylarginine in fasting humans. Nephrol Dial Transplant. 2002;17:1999–2002.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. J Biol Chem. 1990;265(34):20938-45.

Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG-and NG,N'-G-dimethylarginine in rats. Arch Biochem Biophys. 1987;252(2):526-37.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;11-17;327(6122):524-6.

Pope AJ, Karuppiiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. Pharmacol Res. 2009;60(6):461-5.

Prins HA, Houdijk AP, Wiezer MJ, Teerlink T, van Lambalgen AA, Thijs LG, van Leeuwen PA. The effect of mild endotoxemia during low arginine plasma levels on organ blood flow in rats. Crit Care Med. 2000;28(6):1991-7.

Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. Circulation. 1996;15;93(12):2135-41.

Rodionov RN, Murry DJ, Vulman SF, Stevens JW, Lentz SR. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2010 Feb 19;285(8):5385-91.

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP and Böger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(12):1377–1383.

Schwedhelm E. Quantification of ADMA: analytical approaches. *Vasc Med*. 2005;10 Suppl 1:S89-95.

Schwedhelm E, Xanthakis V, Maas R, Sullivan LM, Schulze F, Riederer U, Benndorf RA, Böger RH, Vasan RS. Asymmetric dimethylarginine reference intervals determined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: results from the Framingham offspring cohort. *Clin Chem*. 2009;55(8):1539-45.

Silbernagl et al. *Physiologie*, 2010(6); S. 43, Zeile: 30-46 Thieme Verlag

Sorrenti V, Mazza F, Campisi A, Vanella L, Li Volti G, Di Giacomo C. High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells. *Curr Neurovasc Res*. 2006 Feb;3(1):49-54.

Smulders RA, Aarsen M, Teerlink T, De Vries PM, Van Kamp GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. Haemodynamic and biochemical responses to L-arginine and L-lysine infusions in normal subjects: L-arginine-induced vasodilatation cannot be explained by non-specific effects of cationic amino acids. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(4):367-74.

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002;287: 1420–1426.

Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmölzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of ADMA. *Circulation*. 2003;108:933–938.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 33: 652–658.

Suzuki T, Hayase M, Hibi K, et al. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans. *Am J Cardiol*. 2002;89:363–367.

Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dec;4(4):33-40.

Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000;23810:1-3.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guideline for Industry: Bioanalytical Method Validation, Mai 2001 [Online im Internet.] URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> [Stand 21.01.2014, 10:05 Uhr].

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.

Wahren J, Felig P, Cerasi E, Luft R. Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1972;51(7):1870-8.

Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leone A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circ Res*. 2007 Sep 14;101(6):627-35.

Wellmitz J., Gluschke Dr. M. (2005) Leitlinie zur Methodenvvalidierung, Umweltbundesamt, Berlin [Online im Internet.] URL: <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf> [Stand: 21.01.2014, 10:11 Uhr].

White MF. The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1985;822:355–74.

Wu G, Morris SM, Jr (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336(Pt 1):1–17.

Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001;22-29;358(9299):2113-7.

Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodelling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002;62:339–345.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl*. 2003;(85):S105-10.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien	25
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	27
Tabelle 4: Verwendete Software.....	28
Tabelle 6: Messwerte von L-Arginin und ADMA unter Einfluss von UV-Licht im direkten Vergleich mit einer Kontrollgruppe	64
Tabelle 7: Tabellarische Aufstellung der Messwerte nach unterschiedlicher Lagerungsdauer der Proben.....	68

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Mechanismen der NO-induzierten Gefäßrelaxation, Steudel W et al. Anesthesiology. 1999.....	3
Abbildung 2: Vergleich zwischen Kompetitions- und Sandwich-ELISA, Auszug aus dem ‚Biochemie Skript 3. Fachsemester 2009‘ der Abteilung für Biochemie am UKE. Verfasser: PD Dr. Wolfgang Weber	19
Abbildung 3: Beispiel für eine ELISA Standardkurve für ADMA	36
Abbildung 4: Beispiel für eine ELISA Standardkurve für L-Arginin	36
Abbildung 5: Beispiel für eine L-Arginin Konzentrationsbestimmung mithilfe des Programms "Mass Spectrometry Workstation"	39
Abbildung 6: : Beispiel für eine ADMA Konzentrationsbestimmung mithilfe des Programms "Mass Spectrometry Workstation"	39
Abbildung 7: Darstellung der Intra-Assay-Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5. ..	47
Abbildung 8: Darstellung der Intra-Assay-Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5. ..	47
Abbildung 9: Darstellung der Inter-Assay-Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5. ..	49
Abbildung 10: Darstellung der Inter-Assay-Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.....	49
Abbildung 11: Darstellung der Intraindividuellen Variabilität des ADMA-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.....	51

Abbildung 12: Darstellung der Intraindividuellen Variabilität des L-Arginin-ELISA, dargestellt sind absolute Werte, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung, n=5.....	51
Abbildung 13: Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.....	53
Abbildung 14: Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5, ***p<0,0001.	53
Abbildung 15: Einfluss enzymatisch bedingter Konzentrationsänderungen auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.	55
Abbildung 16: Einfluss enzymatisch bedingter Konzentrationsänderungen auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, ***p<0,0001.....	55
Abbildung 17: Einfluss von Nor-NOHA auf die Messwerte von L-Arginin unter Einfluss von hoher Luftfeuchtigkeit: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, **p<0,001 vs. „instant dry“.....	57
Abbildung 18: Einfluss der aufgetragenen Blutmenge auf ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=3.....	59
Abbildung 19: Einfluss der aufgetragenen Blutmenge auf L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall, n=3.	59
Abbildung 20: Einfluss von drei „Freeze & Thaw“ Zyklen auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=4.....	61
Abbildung 21: Einfluss von drei „Freeze & Thaw“-Zyklen auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=4.	61

Abbildung 22: Einfluss der Art und Weise der Blutentnahme auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.....	63
Abbildung 23: Einfluss der Art und Weise der Blutentnahme auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5, *p<0,01.	63
Abbildung 24: Einfluss von UV-Licht auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.	65
Abbildung 25: Einfluss von UV-Licht auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=5.	65
Abbildung 26: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die absoluten Werte der fünf Probanden im zeitlichen Verlauf.....	69
Abbildung 27: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die durchschnittlichen, relativen Änderungen aller fünf Proben im zeitlichen Verlauf, ausgehend von der Basismessung, sowie das 95% Konfidenzintervall, n=5, *p<0,01 vs. baseline.	69
Abbildung 28: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von L-Arginin: dargestellt sind die absoluten Werte der fünf Probanden im zeitlichen Verlauf.	70
Abbildung 29: Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messwerte von ADMA: dargestellt sind die durchschnittlichen, relativen Änderungen aller fünf Proben im zeitlichen Verlauf, ausgehend von der Basismessung, sowie das 95% Konfidenzintervall, n=5, *p<0,05 vs. baseline.	70
Abbildung 30: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Lagerung: dargestellt sind die absoluten Werte der vier Proben (sample) mit den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, *p<0,05, **p<0,01.	72

Abbildung 31: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Lagerung: dargestellt sind die absoluten Werte der vier Proben (sample) mit den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, $**p < 0,01$ 72

Abbildung 32: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ADMACard, gemessen mit ELISA und ADMA Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMACard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, $n=91$. Geradengleichung der linearen Regression: $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,58 + 0,18 \cdot X$, $R^2=0,088$ 74

Abbildung 33: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert (Average) beider Messverfahren. Der Bias und die 95%-Limits of Agreement sind ebenfalls eingezeichnet, $n=91$ 75

Abbildung 34: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen L-ArgininCard, gemessen mit ELISA und L-Arginin Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMACard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, $n=91$. Geradengleichung der linearen Regression: $Y_{(\text{Plasmakonzentration L-Arginin})} = 13,8 + 0,12 \cdot X$, $R^2=0,029$ 77

Abbildung 35: Bland-Altman-Plot der L-Arginin-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren. Ebenfalls dargestellt sind Bias und 95%-Limits of Agreement, $n=91$ 78

Abbildung 36: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ADMACard, gemessen mit ELISA und ADMA Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMACard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, $n=37$. Die Geradengleichung der Regressionsgeraden lautet: $Y_{(\text{Plasmakonzentration ADMA})} = 0,03 + 0,88 \cdot X$, $R^2=0,662$ 80

Abbildung 37: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Probanden aus dem UKE: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren, sowie Bias und 95%-Limits of Agreement, n=37..... 81

Abbildung 38: Scatterplot des Zusammenhangs zwischen ArgininCard, gemessen mit ELISA und Arginin Plasmakonzentration, gemessen mit LC-MS/MS. Eingetragen sind die Wertepaare jeweils einer Probe, gemessen mit beiden Verfahren. Auf der X-Achse ist die ermittelte Konzentration mittels ADMACard abzulesen und auf der Y-Achse die der LC-MS/MS-Messung, n=17. Die lineare Regressionsgerade berechnet sich nach $Y(\text{Plasmakonzentration L-Arginin}) = -3,8 + 0,64 \cdot X$, $R^2 = 0,759$ 83

Abbildung 39: Bland-Altman-Plot der ADMA-Konzentrationen der Chile-Studie: dargestellt ist die Differenz zwischen LC-MS/MS-Messung und ADMACard-Messung je einer Probe im Vergleich zum Durchschnittswert beider Messverfahren, sowie Bias und 95%-Limits of Agreement, n=17. 84

10 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Rainer H. Böger, Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, der mir es ermöglichte, die Dissertationsarbeit erstellen zu können. Prof. Böger war gleichzeitig mein Betreuer und bei Fragestellungen immer hilfsbereit.

Ich möchte ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Karsten Sydow für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Ein herzlicher Dank gebührt Anna Steenpaas, Mariola Kastner und Cornelia Woermann für ihre hervorragende Einweisung in das Arbeiten im Labor, die vielen freundschaftlichen Unterhaltungen und ihre steten Hilfestellungen während der gesamten Laborarbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm danke ich für seine Hilfe bei der Messung von ADMA und L-Arginin mittels LC-MS/MS und für seine Expertise mit dem DLD-ELISA.

Desweiteren möchte ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie danken, mit denen im Rahmen von Seminaren und Exkursionen stets eine freundliche Zusammenarbeit möglich war.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, bei Cornelia Jenke und bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken, an die ich mich stets mit Fragen und Anliegen wenden konnte und die mich während meiner Zeit im Institut begleitet haben.

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eidesstattliche Versicherung

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: