

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie des
Universitären Herzzentrums Hamburg (UHZ)
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Assoziation von Asymmetrischem Dimethylarginin mit Vorhofflimmern und Intermediären Phänotypen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christoph Bauer
aus Köln

Hamburg, 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.02.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Renate Schnabel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Diagrammverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Hintergrund der Arbeit	11
1.2 Vorhofflimmern	12
1.2.1 Allgemeines	12
1.2.2 Epidemiologie	12
1.2.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren	14
1.2.3.1 Oxidativer Stress	15
1.2.4 Diagnosestellung	16
1.3 Der Stickstoffmonoxid-Signalweg	16
1.3.1 Stickstoffmonoxid	16
1.3.2 Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)	18
1.4 Arginin-Derivate als Biomarker	21
1.4.1 L-Arginin	21
1.4.2 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	23
1.4.3 Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)	25
1.4.4 N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)	26
2 Methoden	29
2.1 Die Gutenberg-Gesundheitsstudie	29
2.1.1 Ziel der Studie	29
2.1.2 Rekrutierung der Teilnehmer	29
2.1.3 Ein-/Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie	31
2.1.4 Aufklärung der Teilnehmer	31
2.1.5 Vorbereitung der Teilnehmer	32
2.1.6 Studienablauf	33
2.1.7 Übersicht über die einzelnen Stationen	34
2.1.8 Ethik	36
2.1.9 Datenschutz	37
2.2 Erfassung der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren	38

2.2.1	Computer-assistiertes persönliches Interview	38
2.2.2	Anthropometrie	39
2.2.3	Venöse Blutentnahme	39
2.2.4	Blutfette	41
2.2.5	Messung der Plasmakonzentration mittels LC-MS/MS	42
2.2.6	Blutdruck	43
2.2.7	Echokardiographie	44
2.2.8	Elektrokardiographie	47
2.3	Datenmanagement	51
2.4	Definitionen	52
2.5	Qualitätskontrolle	53
2.6	Statistische Auswertung	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Baseline-Daten	55
3.2	Vorhofflimmern und Elektrokardiographie	57
3.3	Vorhofflimmern und Echokardiographie	58
3.4	Arginin-Derivate im Vergleich	59
3.4.1	Streudiagramme	59
3.4.2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	62
3.5	Arginin-Derivate im Zusammenhang mit den intermediären Phänotypen	63
3.5.1	Arginin-Derivate und elektrokardiographische Phänotypen	63
3.5.2	Arginin-Derivate und echokardiographische Phänotypen	65
3.6	Arginin-Derivate und Vorhofflimmern	67
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	76
6	Abstract	78
7	Literaturverzeichnis	79
	Danksagung	88
	Eidesstattliche Erklärung	89

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AF	Atrial Fibrillation
AKS	Akutes Koronarsyndrom
BMI	Body Mass Index
B-Mode	Brightness-Modulation
BPM	Beats Per Minute
CAPI	Computer-assistiertes persönliches Interview
CATI	Computer-assistiertes Telefon-Interview
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMIA	Chemolumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CPT	Cell Preparation Tuber
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylamin-Hydrolase
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
eCRF	electronic Case Report Form
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E/E'	Echokardiographisches Flussprofil während der Diastole; die E-Welle entspricht der frühdiastolischen passiven linksventrikulären Füllung
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
GCP	Good Clinical Practice
GEP	Good Epidemiological Practice
GHS	Gutenberg-Gesundheitsstudie
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
IVSD	Interventricular Septum at Diastole
KHK	Koronare Herzkrankheit

KI	Konfidenzintervall
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem Massenspektrometrie
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LV	Linksventrikulär
LVIDd	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVPWd	diastolische Hinterwanddicke
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MMA	Methylmalonylsäure
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
M-Mode	Motion-Mode
NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OH ⁻	Hydroxyl-Radikal
OR	Odds Ratio
O ₂ ⁻	Super-Oxidradikal
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCWP	Pulmonalkapilläre Verschlussdruck
PKG	Proteinkinase G
PR-Intervall	Zeitdauer von Beginn P-Welle bis Anfang QRS-Komplex
PRMT	Protein-Arginin-M-Methyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive O ₂ -Spezies
rpm	rounds per minute
r _s	Spearmans Rho
RVIDd	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
R ₂	Determinationskoeffizient
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	Standardabweichung
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOP	Standard Operating Procedure

TDI	Gewebedoppler
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VHF	Vorhofflimmern
WPW	Wolff-Parkinson-White-Syndrom

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: VHF im EKG, Extremitätenableitung	16
Abb. 2: Das Wirkungsprofil von NO in der Übersicht	18
Abb. 3: ADMA und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko	19
Abb. 4: Vasodilatation durch NO	19
Abb. 5: ADMA und seine Metabolisierung	20
Abb. 6: Die verschiedenen NO-Synthasen in der Übersicht	21
Abb. 7: Strukturformel von L-Arginin	22
Abb. 8: Strukturformel von ADMA	25
Abb. 9: Strukturformel von SDMA	26
Abb. 10: Strukturformel NMMA	28
Abb. 11: Säulen der GHS	34
Abb. 12: Die einzelnen Stationen im Überblick	36
Abb. 13: Apikale und parasternale Schnittebene durch das Herz	45
Abb. 14: Der Gewebedoppler	47
Abb. 15: Die Ableitungsorte des 12-Kanal-EKG nach Wilson	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Risikofaktoren des Patientenkollektivs mit und ohne VHF	56
Tab. 2: Übersicht über definierte Biomarker in Bezug auf VHF	57
Tab. 3: Elektrokardiographische intermediäre Phänotypen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von VHF	58
Tab. 4: Echokardiographische intermediäre Phänotypen	59
Tab. 5: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (rs)	62
Tab. 6: Multivariabel-adjustierte lineare Regressionsanalyse von Arginin-Derivaten in Bezug auf elektrokardiographische intermediäre Phänotypen in der Gesamtkohorte	65
Tab. 7: Multivariabel-adjustierte lineare Regressionsanalyse der Arginin-Derivate in Bezug auf echokardiographische intermediäre Phänotypen in der Gesamtkohorte	66
Tab. 8: Übersicht der logistischen Regression für VHF	67

Diagrammverzeichnis

Diagr. 1: Die verschiedenen Arginin-Derivate in Korrelation	61
Diagr. 2: Odds Ratio für VHF, adjustiert nach Alter und Geschlecht sowie kardiovaskulären Risikofaktoren	68

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

Die Inzidenz und die Prävalenz der Herzrhythmusstörung Vorhofflimmern (VHF) in der Allgemeinbevölkerung, insbesondere in unserer westlichen Welt, sind hoch und weiterhin steigend (Go et al. 2001, Miyasaka et al. 2006). Es ist zu erwarten, dass künftig geschätzte 2–3 % der europäischen Bevölkerung mit VHF diagnostiziert werden. Insgesamt leiden rund 30 Millionen Menschen weltweit an dieser Herzrhythmusstörung und viele weitere mehr, ohne es zu wissen (Kirchhof et al. 2015).

Jedoch sind die genauen Gründe bzw. ist die Risikofaktorenverteilung für den zu beobachtenden Anstieg der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung bislang nur unvollständig verstanden. Klar ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch, dass VHF zu einem maßgeblichen Anstieg von der Morbidität und Mortalität entscheidend beiträgt (Schnabel et al. 2009).

Symptomatisches VHF reduziert die Lebensqualität und den funktionellen Status der Betroffenen. Komplikationen von VHF wie etwa der Schlaganfall oder die Herzinsuffizienz sind gravierend. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, adäquate Methoden zur individuellen Risikoeinschätzung zu etablieren, um bei gefährdeten Patienten primärpräventive Maßnahmen einleiten zu können.

Die für die Vasodilatation wichtigste Substanz im Körper ist das aus L-Arginin gebildete Stickstoffmonoxid (NO). L-Arginin kommt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gefäßhomöostase zu. Endogene Arginin-Derivate, hier vor allem das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) und das symmetrische Dimethylarginin (SDMA), hemmen hingegen die NO-Biosynthese und führen so zu einer Dysbalance mit konsekutiv erhöhtem oxidativen Stress.

1.2 Vorhofflimmern

1.2.1 Allgemeines

VHF (lat. Arrhythmia absoluta) ist eine Rhythmusstörung der Herzvorhöfe und zählt demnach zu den supraventrikulären Tachykardien. Im Gegensatz zum regulären Herzrhythmus werden die elektrischen Impulse aus dem Sinusknoten durch arrhythmisch kreisende Erregungswellen unterdrückt. Diese kreisenden Erregungen, die ihre Größe und Lokalisation in den Vorhöfen ständig verändern, führen zum sogenannten Flimmern der Vorhöfe. Dabei entstehen in den Vorhöfen sehr hohe Frequenzen von bis zu 800 bpm (beats per minute). Aufgrund der ineffektiven Kontraktion fehlt die prä systolische Füllung der Ventrikel, woraus eine um 15–30%ige Abnahme des Herzminutenvolumens resultiert (Abernathy und Willis 1973). In der Folge kann der systolische Blutdruck signifikant abfallen, wohingegen pulmonalarterielle Druck (PAP) und pulmonalkapilläre Verschlussdruck (PCWP) signifikant ansteigen können (O'Neill et al. 1990). Jedoch wurde in der Vergangenheit eine große Varianz in der Auswirkung von VHF auf die linksventrikuläre Funktion festgestellt (Camm et al. 2010).

1.2.2 Epidemiologie

Das Erstmanifestationsalter von VHF liegt in der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland im Mittel bei 65 Jahren bei einer Inzidenz von 0,1 % pro Jahr, wobei in jüngeren Altersgruppen Männer häufiger als Frauen betroffen sind. Durch die höhere Lebenserwartung der Frauen ist die Gesamtprävalenz für beide Geschlechter in etwa gleich hoch (Deutsche Stiftung für Herzforschung 2013). VHF erhöht das Langzeitrisiko von Schlaganfall, Herzinsuffizienz und Gesamtsterblichkeit, insbesondere bei Frauen (Volkman et al. 2009). Fast 1,8 Millionen Menschen in Deutschland (ca. 2 % der Bevölkerung) und über 6 Millionen Menschen in Europa leiden an dieser häufig anhaltenden Herzrhythmusstörung (Camm et al. 2010). Wahrscheinlich wird die Anzahl derer, die in den USA an VHF leiden, bis 2050 um das 2,5-Fache steigen (Go et al. 2001). Das US Census Bureau schätzt, dass der Anteil der Bevölkerung mit VHF wiederum im Jahr 2050 um die 12,2 Mio. betragen

wird (Miyasaka et al. 2006). VHF hat eine Prävalenz von 5,9 % in der Gruppe der über 65-Jährigen. Die Diagnose VHF lässt sich bei fast 10 % aller Menschen über 80 Jahre nachweisen (Baldus 2012). Im Alter ab 85 Jahren steigt die Prävalenz gar auf bis zu 18 % (Camm et al. 2010). Experten schätzen daher, dass es eine hohe Zahl an Betroffenen gibt, die mit VHF leben, ohne es zu merken. Bei Menschen, die jünger als 65 sind und keine zusätzlichen Herzkrankheiten oder andere Erkrankungen haben, liegt das Risiko, im nächsten Lebensjahr einen Schlaganfall zu erleiden, bei unter 1 % (Deutsche Stiftung für Herzforschung 2013).

VHF ist mit besonders schweren Schlaganfällen assoziiert (Camm et al. 2010). Während des Flimmerns der Herzvorhöfe kommt es zu einer relativen Stase des Blutes in den Vorhöfen, wodurch sich Thromben bilden können. Lösen sich die Thromben, werden sie in den Systemkreislauf und z. B. über die Karotiden in die Gehirnarterien verschleppt, sodass auch die Zahl der 270.000 Betroffenen, die jedes Jahr in Deutschland mit den Folgen eines Schlaganfalls leben müssen, u. a. hierin begründet liegt (Kirchhof und Leute 2013). Mindestens jeder fünfte Schlaganfall geht nach den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) auf VHF zurück (Volkman et al. 2009). Das sind fast 40.000 Schlaganfälle pro Jahr in Deutschland (Deutsche Stiftung für Herzforschung 2013). So überrascht die Prognose nicht, dass sich in den nächsten 40 Jahren die Zahl der Patienten mit VHF mehr als verdoppeln wird – nicht zuletzt aufgrund unserer alternden Gesellschaft und der Zunahme von Risikofaktoren wie Bluthochdruck und Übergewicht. Die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) rechnet in ihren Leitlinien von 2010 für das Management von VHF durch die zunehmende Alterung der Bevölkerung in den nächsten 50 Jahren gar mit einer Zunahme um den Faktor 2,5, wobei sich das individuelle Risiko mit jeder Altersdekade verdoppeln wird (Deutsche Stiftung für Herzforschung 2013).

Insgesamt ist VHF mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden, auch bei leitliniengetreuer Therapie (Kirchhof und Leute 2013). So gilt VHF als starker Risikofaktor für Herzversagen. Patienten mit VHF, die ein Herzversagen erleiden, haben eine höhere Mortalitätsrate als solche, die kein VHF hatten (Schnabel et al. 2013). Bei bis zu 70 % der Patienten mit organischen Herzerkrankungen liegt VHF vor (Burstein und Nattel 2008). Es bleibt festzuhalten, dass VHF zur Chronifizierung neigt, zumal 20 Jahre nach der Erstdiagnose mehr als 90 % der Patienten

permanentes VHF aufweisen (Kirchhof et al. 2012). So wird VHF als progressive Erkrankung betrachtet, die sich oftmals vom paroxysmalen zum permanenten Typ entwickelt (Dudley et al. 2005). Die Lebenserwartung für VHF-Patienten unter 65 Jahren und ohne weitere Herzerkrankungen ist im Vergleich zu herzgesunden Menschen im selben Alter nicht signifikant geringer.

1.2.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren

In Bezug auf seine Ätiologie, Pathophysiologie, klinische Präsentation sowie das Outcome ist VHF eine heterogene Erkrankung (de Vos et al. 2010), bei der zu rund 60 % modifizierbare Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, übermäßiger Alkoholkonsum, Übergewicht, Fumatorium, Schlafapnoe sowie kardiovaskuläre Grunderkrankungen gefunden werden können (Huxley et al. 2011). Die häufigsten dem VHF zugrunde liegenden kardialen Grunderkrankungen sind arterieller Hypertonus (50 %), Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung (KHK) (25 %), Klappenitien (14 %) insbesondere die der Mitralklappe (Sack 2014), pulmonale Erkrankungen (3 %), Hyperthyreose (3 %) und andere Ursachen (5 %) (Baldus 2012). Bluthochdruck steigert das Risiko, an VHF zu erkranken, auf etwa das Doppelte und eine symptomatische Herzinsuffizienz (New York Heart Association-Klassen II-IV) auf das 4,5- bis 6-Fache (Deutsche Stiftung für Herzforschung 2013). Zu den weiteren Begleiterkrankungen, die VHF verursachen kann oder dessen Fortschreiten begünstigt, zählen auch (dilatative/hypertrophe) Kardiomyopathien, Vorhofseptum-Defekte (VSD) und andere angeborene Herzfehler, Übergewicht, Diabetes mellitus, die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD), cholinerge Drogen sowie Schlafapnoe und die chronische Niereninsuffizienz (Camm et al. 2010). Weiterhin zählen hierzu die Myokarditis, das Sick-Sinus-Syndrom (SSS) und das Wolf-Parkinson-White-Syndrom (WPW-Syndrom) sowie das Holiday-Heart-Syndrom (Barriales Alvarez et al. 1999). Insbesondere Herzmuskelerkrankungen wie Kardiomyopathien und die Myokarditis führen durch Schwächung der Herzleistung zu VHF und werden bei rund 15 % aller VHF-Patienten beobachtet. Beim akuten Koronarsyndrom (AKS) tritt in 2–21 % der Fälle ein VHF auf, das auch hier mit einem erhöhten Mortalitäts- und Schlaganfallrisiko einhergeht. Auch der Diabetes mellitus und das VHF zeigen eine

relevante Koinzidenz, insbesondere vor dem Hintergrund der Tatsache, dass 13 % aller Patienten mit VHF an Diabetes leiden (Camm et al. 2010). Trotz jener beeindruckenden Zahlen weiß man noch nicht genug über diese Volkskrankheit. Sicher ist, dass VHF in hohem Maße die Lebensqualität beeinträchtigt, etwa durch als unangenehm empfundene Palpitationen, Synkopen und Herzrasen oder durch Symptome, die mit der Klinik einer Angina pectoris einhergehen. Weitere zu nennende Symptome sind Schwindel, Atemnot, Abgeschlagenheit, Brustschmerz bzw. Palpitationen sowie Beklemmungs- und Angstgefühle.

1.2.3.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist entscheidend beteiligt bei der Entstehung und Manifestation von VHF (Yang und Dudley 2013). So konnte in mehreren zurückliegenden Studien gezeigt werden, dass VHF mit oxidativem Stress assoziiert ist (Mihm et al. 2001, Carnes et al. 2001). Unter oxidativem Stress versteht man ein Missverhältnis zwischen reaktiven Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS) einerseits und Antioxidantien andererseits zugunsten der ROS bzw. RNS. Zu ROS zählen u. a. das Super-Oxidradikal (O_2^-), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot). Risikofaktoren sind dieselben wie bei der Atherosklerose, einer Krankheit, von der bekannt ist, dass sie durch oxidativen Stress aufrechterhalten wird. Diese Risikofaktoren, zu denen u. a. Bluthochdruck, Alter, Diabetes mellitus und kardiochirurgische Eingriffe zählen, haben singulär eine direkte Assoziation mit den erhöhten systemischen Markern der Oxidation. Daher legt jene Assoziation mit oxidativem Stress die Vermutung nahe, dass VHF die Manifestation einer systemischen Erkrankung sein könnte (Yang und Dudley 2013).

Eine Dysbalance führt am Endothel zu oxidativem Stress, welcher in der Pathogenese von VHF impliziert ist (Bonilla et al. 2012). Gegenwärtig geht man davon aus, dass sich krankheitsauslösende oder -begünstigende Faktoren für ein Überwiegen an oxidativen Stress generierenden Substanzen verursachen. Unklar indes scheint nach wie vor zu sein, ob oxidativer Stress Ursache oder Wirkung von Krankheiten ist.

1.2.4 Diagnosestellung

Zur Diagnosestellung von VHF ist eine Dokumentation mittels Elektrokardiogramm (EKG) erforderlich. Per definitionem ist VHF eine Herzrhythmusstörung mit folgenden Charakteristika:

1. Das Oberflächen-EKG zeigt absolut irreguläre RR-Intervalle.
2. Es gibt keine eindeutig abgrenzbaren P-Wellen im EKG, jedoch kann eine scheinbar reguläre elektrische Aktivität in einigen Ableitungen (v. a. in Ableitung V1) sichtbar sein.
3. VHF zeigt typischerweise variable Vorhofzykluslängen und eine verkürzte PQ-Zeit (< 200 ms).

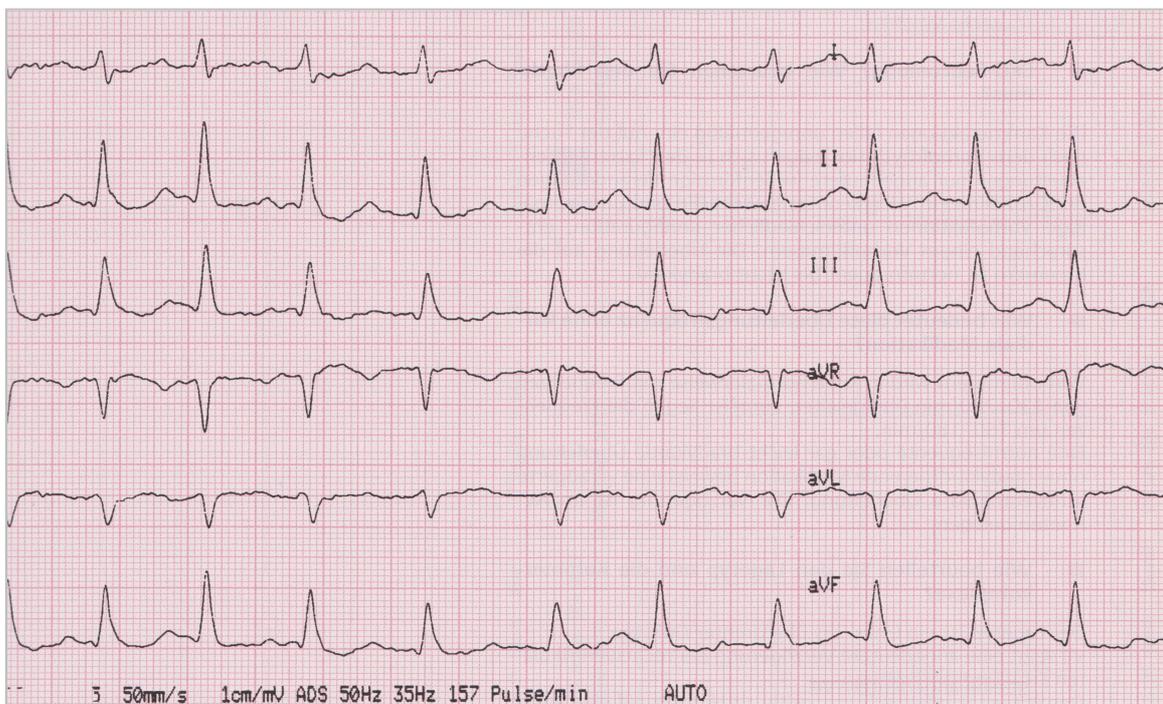


Abb. 1: VHF im EKG, Extremitätenableitung (Horacek, 2013)

1.3 Der Stickstoffmonoxid-Signalweg

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der wichtigsten vasoaktiven Botenstoffmoleküle im Körper und besitzt elementare Bedeutung für die endotheliale Homöostase (Sibal et

al. 2010) – auch weil es die Proliferation glatter Muskelzellen im Endothel fördert. NO wirkt im Gehirn als Neurotransmitter und im Immunsystem als Mediator der Abwehr. Im kardiovaskulären System werden NO protektive Eigenschaften für ein intaktes Endothelium zugeschrieben, indem es durch seine zelluläre Eigenschaft als anti-atherogenes Molekül direkt vasodilatierend wirkt (Böger 2014).

Eine geringe NO-Bioverfügbarkeit korreliert unterdessen direkt mit einer gestörten Endothel-Funktion (Lorin et al. 2014). So gibt es einen steigenden Beweis dafür, dass die kardiale Struktur und Funktion durch NO moduliert werden (Lieb et al., 2009). Eine Hyperglykämie etwa hemmt die Aktivität der „endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase“ (eNOS), was zu einer Störung der endothelabhängigen Vasodilatation führt (Bassenge et al. 2005). Neben vasodilatatorischen werden dem NO ebenfalls antithrombotische sowie antiatherogene Eigenschaften zugeschrieben (Tousoulis et al. 2007)

Weiterhin werden Einflüsse des NO auf die vaskuläre Produktion von Superoxidradikalen (Reduktion) und die Oxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL) im Sinne einer Verhinderung beschrieben.

Da die Expression der NOS durch eine ultra-schnelle Öffnung des Ionenkanals im arteriellen Endothel durch laminare Strömung und zyklische Dehnung induziert wird (Vallance et al. 1989), stellen Cai und Kollegen die Hypothese auf, dass VHF zu einer Herunterregulierung der atrialen endokardialen Expression und Produktion von NOS führt. Da NO antithrombotische Eigenschaften besitzt, könnte eine herunterregulierte NOS zur Entwicklung thromboembolischer Ereignisse bei Patienten mit VHF beitragen. Diese Daten legen nahe, dass eine organisierte Vorhofkontraktion zur Gewährleistung einer normalen endokardialen NOS-Expression notwendig ist. Hier beschreibt die Studie, dass der linke Vorhof dreimal mehr NO produziert als irgendein anderes Endothelium, wie z. B. der rechte Vorhof oder die Aorta (Cai et al. 2002). Vermindertes NO führt zudem zu einer Reduktion des myokardialen Blutflusses (Goette et al. 2012).

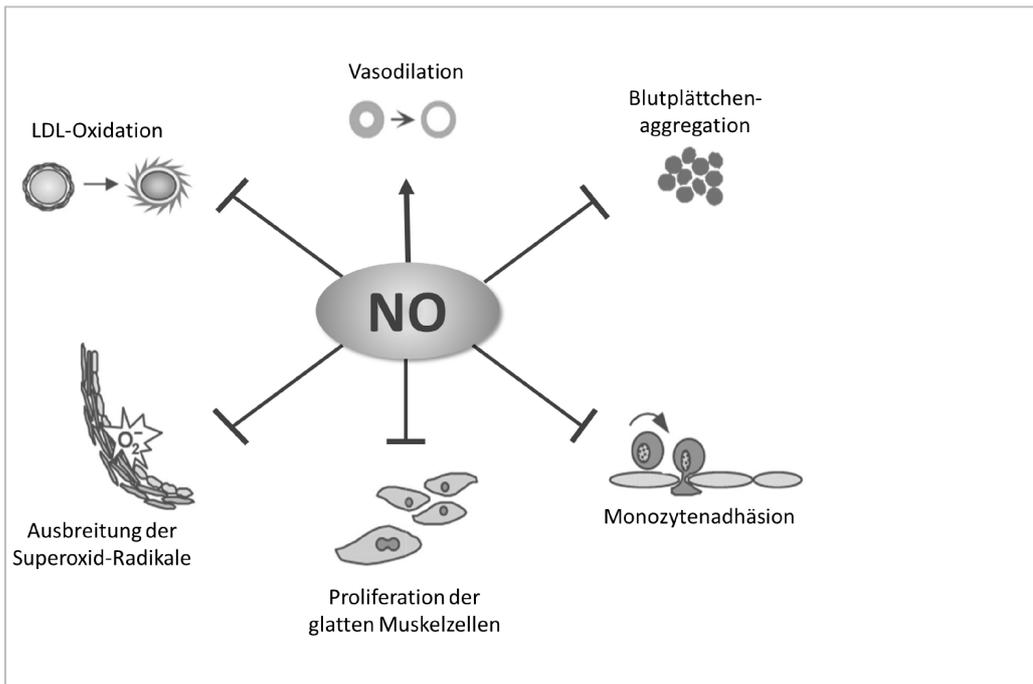


Abb. 2: Das Wirkungsprofil von NO in der Übersicht (in Anlehnung an Böger, 2003; zitiert nach von Holten, 2011)

1.3.2 Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

NO, ein hochreaktives Radikal mit geringer Halbwertszeit, wird durch das zuvor erwähnte Enzym „endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase“ aus L-Arginin gebildet. Es entsteht durch eine 5-Elektronen-Oxidation eines Stickstoffatoms der Guanidin-Gruppe des L-Arginins. Das entstehende Nebenprodukt ist L-Citrullin (Leone et al. 1991), aus welchem in mehreren Schritten wiederum L-Arginin in Niere und Leber zurückgewonnen werden kann (Wu und Meininger 1993). Die Aktivierung der eNOS erfolgt primär durch eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration (Andrew und Mayer 1999). Gleichermäßen hochreguliert wird die NOS durch Scherstress (Qu et al. 2001), durch eine verminderte Salzaufnahme (Tojo et al. 2000), durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Endres und Laufs, 1998), durch Calcium-Kanal-Blocker (Tanaka et al. 2002), durch Urämie (Abdel-Gawad et al. 1999) sowie im hohen Alter (Holaj et al. 1998).

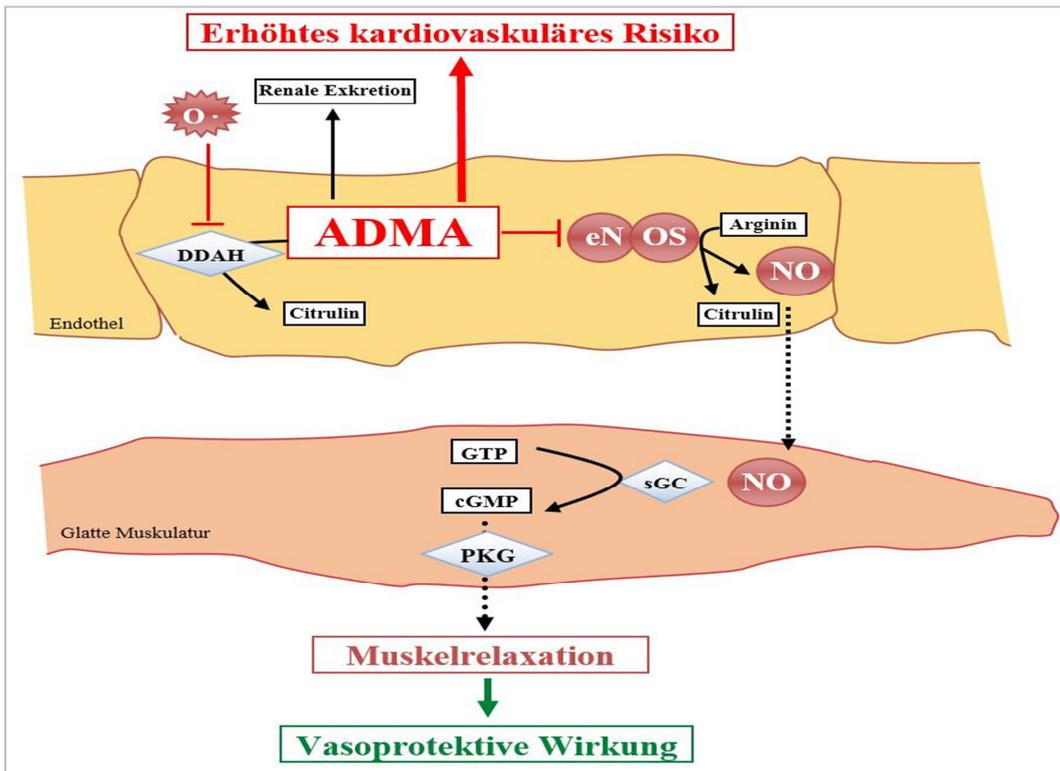


Abb. 3: ADMA und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (in Anlehnung an Ozkor und Quyyumi, 2011; zitiert nach Herzog, 2013)

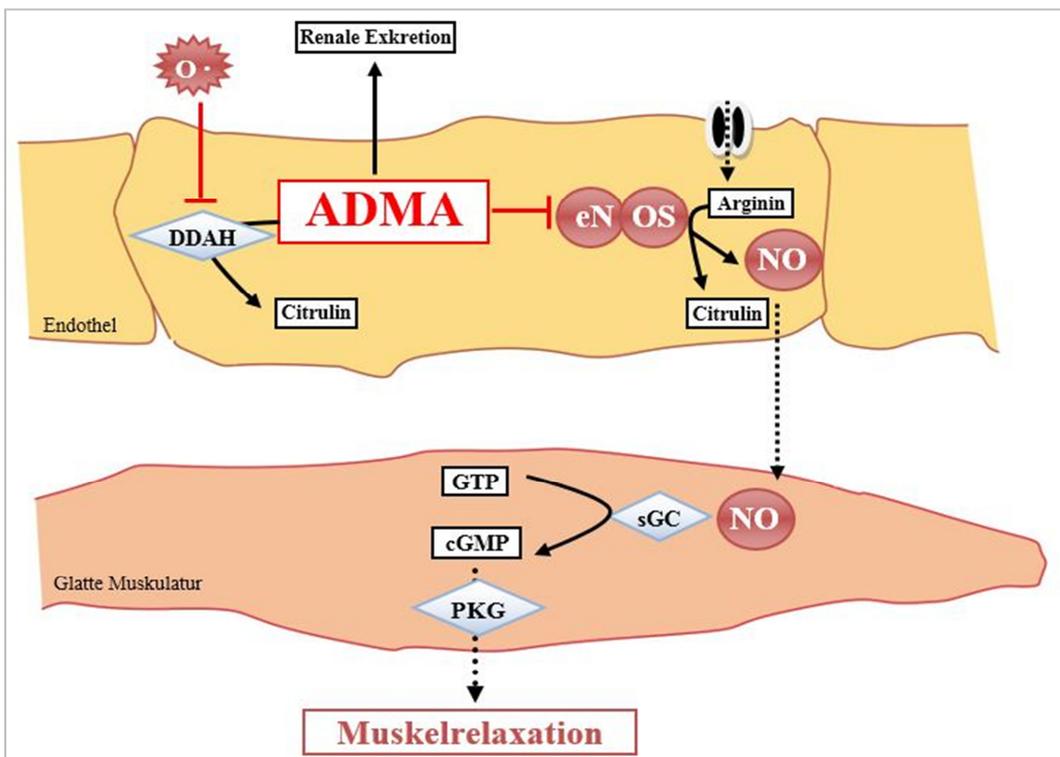


Abb. 4: Vasodilatation durch NO (in Anlehnung an Ozkor und Quyyumi, 2011; zitiert nach Herzog, 2013)

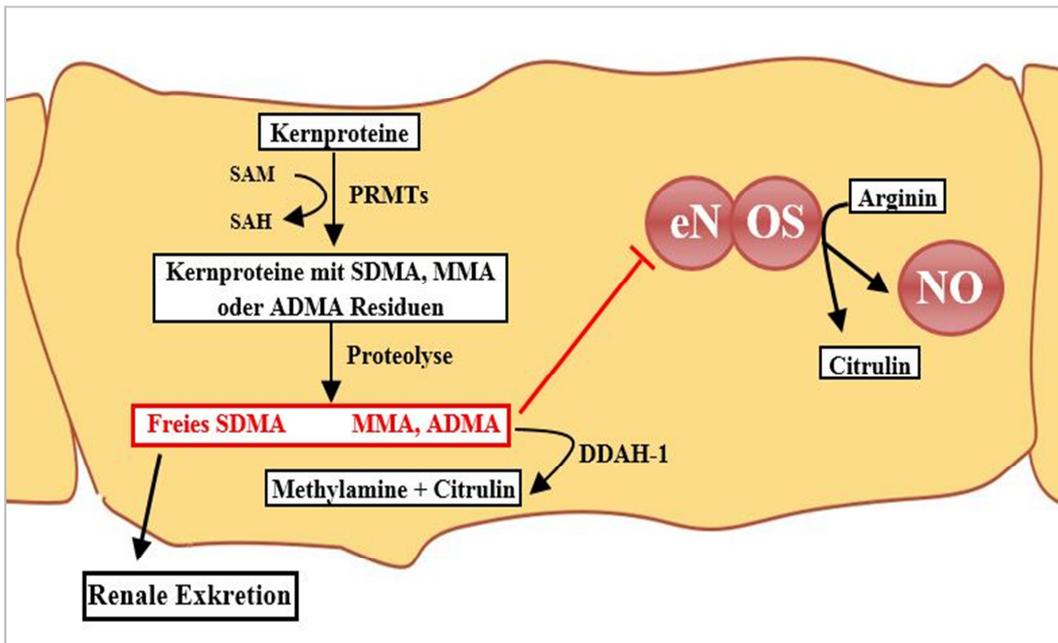


Abb. 5: ADMA und seine Metabolisierung (in Anlehnung an Ozkor und Quyyumi, 2011); zitiert nach Herzog, 2013)

Abb. 3, 4 und 5: Die NO-Synthase, DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminhydrolase, ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, GTP: Guanosintriophosphat, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, sGC: lösliche Guanylatzyklase, PKG: Proteinkinase G, SAM: S-Adenosyl-L-Methionin, SAH: S-Adenosyl-Homocystein, MMA: Methylmalonylsäure.

Zu einer Herunterregulierung kommt es u. a. durch Hypertonie (Crabos et al. 1997), durch eine vermehrte Salzaufnahme (Ni und Vaziri 2001), durch eine erhöhte Konzentration an oxidiertem LDL (Böger et al. 2000), durch Tumornekrosefaktoren (Yoshizumi et al. 1993) und schließlich durch eine reduzierte Androgenkonzentration (Marin et al. 1999).

Intrazellulär konkurriert die eNOS mit Enzymen wie der Arginase um das Substrat L-Arginin. Bislang sind vier fundamentale Mechanismen für reduzierte Level an bioaktivem NO bekannt: eine verringerte Syntheseleistung, eine verringerte Sensitivität gegenüber NO, eine verminderte NO-Halbwertszeit sowie eine gesteigerte oxidative Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffzwischenprodukte.

So zeigt eine Arbeitsgruppe um Bonilla et al. 2012, dass die NOS die Fähigkeit besitzt, in ihrer Eigenschaft als unpaariges Molekül statt NO Superoxidanionen zu produzieren, d. h. dass es zu einem Shift von der Produktion von NO hin zu Superoxidanionen kommt, welche als potente freie Radikale und Oxidanzien fungieren.

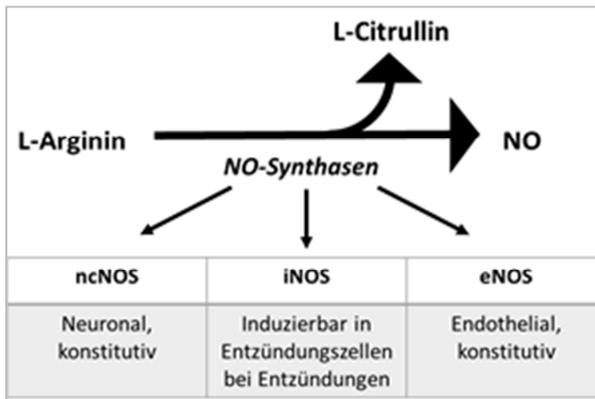


Abb. 6: Die verschiedenen NO-Synthasen in der Übersicht (in Anlehnung an Espinola-Klein und Münzel, 2008; zitiert nach von Holten, 2011)

1.4 Arginin-Derivate als Biomarker

1.4.1 L-Arginin

L-Arginin ist der Ausgangsstoff für die Synthese von NO (Lorin et al. 2014). Die intrazelluläre L-Arginin-Produktion beträgt etwa 1–2 mmol/l in frisch isolierten Endothelzellen bzw. in endothelialen Zellkulturen (Tousoulis et al. 2007). Die Halbwertszeit beträgt durchschnittlich 24–98 min. Plasmalevel an L-Arginin sind eng verknüpft mit der vaskulären und systemischen NO-Produktion. Weiterhin von Bedeutung für die Bioverfügbarkeit von NO über die intrazelluläre Konzentration an L-Arginin ist das Enzym Arginase, welches verantwortlich ist für den Abbau von L-Arginin zu Ornithin und Urea. So könnte eine gesteigerte Aktivität der Arginase zu einem lokalen L-Arginin-Mangel führen und folglich zu einer verringerten NO-Produktion.

Dem L-Arginin werden ebenfalls antioxidative und antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben.

Indes reduziert L-Arginin das vaskuläre Remodeling und die neointimale Dicke. Die Autoren beschreiben weiterhin, dass die Administration von L-Arginin die vaskuläre, endothelabhängige Dilatation verbessert und proximale Segmente der epikardialen Koronararterien signifikant weitstellt (Tousoulis et al. 2007). So ist auch zu verstehen, dass ein L-Arginin-Mangel-Syndrom eine endotheliale Entzündung beinhaltet (Lorin

et al. 2014). Eine Behandlung mit L-Arginin kann zu einer nennenswerten Weitstellung von atherosklerotisch veränderten Koronararterien bei KHK-Patienten führen, wie eine Studiengruppe um Böger (2014) ermitteln konnte.

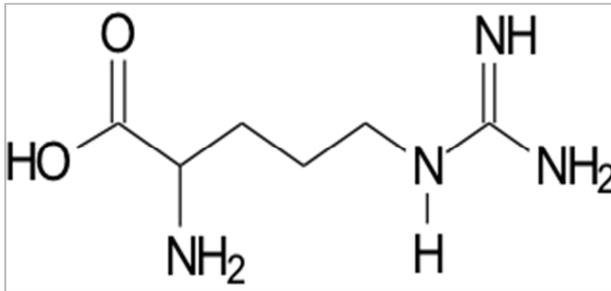


Abb. 7: Strukturformel von L-Arginin (Wikipedia, 2016a)

L-Arginin: C₆H₁₄N₄O₂

Proteinogene, basische Aminosäure, die gut wasserlöslich ist und protoniert vorliegen kann (im sauren, neutralen oder auch schwach basischen Bereich), ansonsten häufig als Zwitterion.

Böger (2006) beschreibt ferner, dass die Applikation von L-Arginin mit einer Restitution der vaskulären Integrität einhergeht und die klinischen Symptome von Erkrankungen, welche mit einer vaskulären Dysfunktion assoziiert sind, verbessern kann. Trotzdem bleibt unklar, ob eine dauerhafte Applikation von L-Arginin einen Effekt auf das klinische Outcome bei Patienten mit KHK hat (Tousoulis et al. 2007). Wilson et al. (2007) veröffentlichen Studienergebnisse, wonach eine Behandlung mit L-Arginin bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) nicht den erwünschten Effekt einer optimierten vaskulären Reaktivität und sogar mögliche negative Folgen für die Patienten haben könnte. Böger (2014) postuliert hingegen, dass die intravenöse bzw. die orale Applikation von relativ hohen Dosen an L-Arginin bei Patienten mit gestörter endothelialer Funktion eine gesteigerte NO-Bildung zur Folge hat. Dies geht konform mit anderen kontrollierten Studien, die in einer Langzeitadministration von L-Arginin eine Besserung der kardiovaskulären Symptomatik zeigen, wohingegen bei Patienten mit hohen asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA)-Spiegeln der L-Arginin/ADMA-Index wieder hergestellt wird und sich die endotheliale Funktion normalisiert. Keine Effekte scheint L-Arginin jedoch bei Individuen mit geringen ADMA-Leveln zu haben. Böger (2014) konstatiert weiter, dass eine Dosis von 3 bis 8 g/Tag sicher zu sein scheint. Anders lautet eine Schlussfolgerung von Wilson et al. (2007) auf Grundlage einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie, in der sich zeigt, dass eine orale L-Arginin-

Supplementation (3 g/Tag für 6 Monate) hinsichtlich der endothelialen Funktion weniger effektiv als das Placebo war. Yang et al. (2011) sowie Yang und Dudley (2013) führen als mögliche Erklärung für die unklare Studienlage zur Therapie an, dass L-Arginin nicht die zugrunde liegende Ursache bekämpfe.

1.4.2 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

Endogenes ADMA, ein Analogon der Aminosäure L-Arginin, ist als natürlich vorkommende Aminosäure ein biologisches Produkt des Metabolismus, welches im menschlichen Körper vorkommt (Sibal et al. 2010). Hohe ADMA-Konzentrationen korrelieren mit negativen Folgen für das kardiovaskuläre System. In epidemiologischen Studien zeigt sich, dass ADMA mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Zoccali et al. 2001). De Gennaro Colonna et al. (2007) beschreiben ADMA als unabhängigen Risikofaktor – sowohl für die endotheliale Integrität als auch für die KHK.

ADMA wird durch den Katabolismus von proteingebundenen Arginin-Seitenkettengruppen freigesetzt, die zuvor durch Protein-Arginin-N-Methyltransferasen (PRMT 1 und 2) posttranslational methyliert werden (Sydow und von Leitner 2008). Täglich werden ca. 300 mmol/l produziert und mehr als 10 mg über die Nieren ausgeschieden (Vallance et al. 1992). Die PRMT 1 führt zur Bildung von ADMA und N-Monomethyl-L-Arginin (NMMA), wohin gegen die PRMT 2 eher zur Bildung von SDMA und L-NMMA neigt. Hauptsächlich verstoffwechselt wird ADMA mittels hydrolytischer Degradation durch Dimethylarginin-Dimethylaminhydrolase (DDAH) zu L-Citrullin und Dimethylamin, während ein kleiner Teil durch die Niere eliminiert wird (Yang et al. 2011). Die Arbeitsgruppe um Schwedhelm zeigt in Untersuchungen, dass es in der DDAH-defizienten Maus, in der ADMA nicht mehr metabolisiert werden kann und somit akkumuliert, zu einem erhöhten Blutdruck und zu einem verminderten Ansprechen der Aorta auf den vasodilatierenden Botenstoff Acetylcholin kommt. Die vaskuläre DDAH indes ist bei oxidativem Stress gestört und mit erhöhtem Cholesterolemie, Blutzucker, Triglyceriden sowie Homocystein assoziiert (Ito et al. 1999, Stühlinger et al. 2001). Neben einer DDAH-Defizienz kann es durch eine erhöhte PRMT-Aktivität zu gesteigerten ADMA-Level kommen (Yang et al. 2011).

Sowohl für PRMT als auch für DDAH gilt, dass sie redoxsensitiv sind, sodass gesteigerter oxidativer Stress zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität mit konsekutiver Akkumulation von ADMA führt (Sydow und von Leitner 2008), entweder durch eine vermehrte ADMA-Produktion (PRMT) oder durch einen verminderten Abbau (DDAH). In seinem Review stellt Böger (2006) die Hypothese auf, dass ADMA ein geeigneter diagnostischer Marker für die Risikobewertung kardiovaskulärer Erkrankungen sei. Bereits seit 2001 wird ADMA von Valkonen und Kollegen (2001) als potenzieller Marker für die endotheliale Dysfunktion und als Risikofaktor für die Atherosklerose gesehen.

ADMA inhibiert reversibel die eNOS in vivo mit anschließender Generierung von Superoxiden statt NO, in dem es mit L-Arginin um das aktive Zentrum der NOS kompetiert (Lorin et al. 2014) und so zu einem NO-Defizit führen kann (Yang et al. 2011).

ADMA-Plasmakonzentrationen sind u. a. erhöht bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie sowie bei einer Reihe weiterer klinischer Krankheitsbilder wie KHK, Herzinsuffizienz, pulmonale Hypertonie (Böger 2006), Niereninsuffizienz, Insult und pAVK, und sie stellen einen Prädiktor für die Gesamtmortalität bei diesen Risikopatienten dar (Sydow und von Leitner 2008). Gerade bei letztgenannten Patienten kann die Arbeitsgruppe um Böger und Bode-Böger (1997) zeigen, dass erhöhte ADMA-Plasmaspiegel in Relation zur Schwere einer pAVK stehen. Darüber hinaus wird vermutet, dass ADMA an dem Prozess des atrialen Remodelings teilnehmen könnte. Auch können erhöhte ADMA-Level bei Patienten mit VHF getestet werden (Yang et al. 2011). Fontes et al. (2013) beschreiben, dass ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI), Rauchen, ein negatives Lipidprofil und ein gesteigerter Hüftumfang mit gesteigerten Konzentrationen von ADMA assoziiert sind. Bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil sind die Plasmakonzentrationen von ADMA typischerweise um den Faktor 2 erhöht, während bei Gesunden die mittlere Plasma-ADMA-Konzentration zwischen 0,5 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$ beträgt (Stühlinger et al. 2002, Vallance et al. 1992). Richir et al. (2009) konstatieren, dass geringe Konzentrationen an L-Arginin und hohe Konzentrationen an ADMA bei kritisch kranken Patienten nach großen operativen Eingriffen gefunden werden können.

Untersuchungen zeigen, dass erhöhte Werte an ADMA über die reduzierte NO-Synthese zu einem erhöhten systemischen Gefäßwiderstand führen und somit ein starker Vorbote für kardiovaskuläre Ereignisse und Sterblichkeit bei Patienten mit KHK sind (Schulze et al. 2010), sogar über die traditionellen Risikofaktoren hinaus (Sibal et al. 2010).

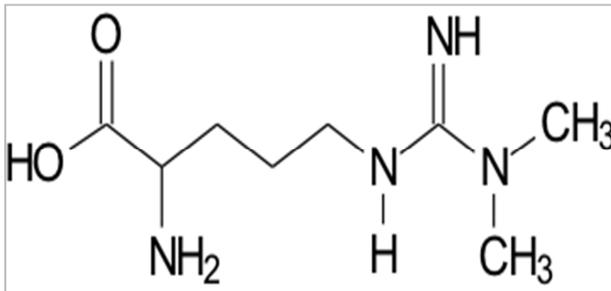


Abb. 8: Strukturformel von ADMA (Wikipedia, 2016b)

ADMA: $C_8H_{18}N_4O_2$

Asymmetrisches Dimethylarginin: Im Vergleich zum L-Arginin (welches nicht durch eine zweifache Elektronenpaarbindung gebunden ist) an dem einen endständigen Stickstoff des Guanidin Rests zweifach methyliert, dadurch auch höhere molare Masse als L-Arginin (zusätzliche CH_3 -Gruppen).

In Bezug auf VHF können signifikant höhere ADMA-Level verglichen mit Patienten im Sinusrhythmus festgestellt werden. Jedoch normalisierten sich die ADMA-Level innerhalb von 24 Stunden nach elektrischer Kardioversion wieder. Es wird angenommen, dass VHF ADMA erhöht und von Mikrozirkulationsstörungen und der Freisetzung von Troponin begleitet wird (Goette et al. 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration für die Mortalität und für zukünftige kardiovaskuläre Erkrankungen ein guter prädiktiver Marker bei Patienten mit und ohne Risikofaktoren sein wird (Böger et al. 2006, Schnabel et al. 2005).

1.4.3 Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)

Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) ist das Struktur-Isomer von ADMA. Sowohl ADMA als auch SDMA entstehen aus der intranukleären Methylierung von L-Arginin und werden dann nach Proteolyse ins Zytoplasma ausgestoßen. SDMA wird durch die PRMT 5 und 7 produziert. SDMA beeinflusst nicht direkt die Enzymaktivität der NOS, aber es kann sie durch Hemmung der zellulären Wiederaufnahme von

L-Arginin modulieren (Bonilla et al. 2012), indem es z. B. deren Wiederaufnahme aus der Henle-Schleife stört (Tojo et al. 1997).

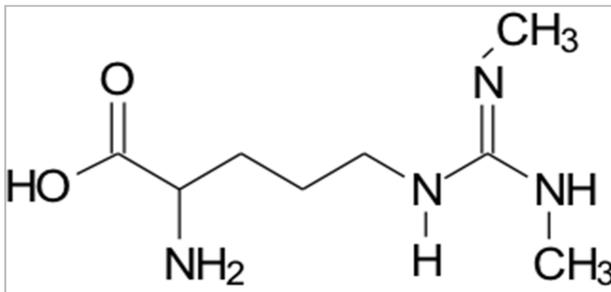


Abb. 9: Strukturformel von SDMA (Wikipedia, 2016c)

SDMA: $C_8H_{18}N_4O_2$

Symmetrisches Dimethylarginin: Im Vergleich zum L-Arginin auch zweifach methyliert, allerdings an beiden endständigen Stickstoffen des Guanidin Rests, daher symmetrisch. Gleiche Summenformel wie ADMA.

Im Gegensatz zu ADMA (durch die DDAH zu Citrullin und Dimethylamin) wird SDMA streng renal ausgeschieden.

SDMA hemmt dosisabhängig die NOS in Endothelzellen, wohingegen es keinerlei Effekt auf die Protein-Expression der NOS zeigt.

Auch das SDMA ist nach einer Untersuchung von Schulze et al. (2010) mit 394 Patienten nach akutem ischämischen Schlaganfall signifikant mit VHF assoziiert.

Die Studie demonstriert ebenfalls, dass SDMA mit endothelialer Dysfunktion und einer Plättchen-Aktivierung korreliert, und daher mutmaßen die Autoren, dass es möglicherweise eine bislang unbekannte Rolle in der Pathophysiologie des Schlaganfalls spielen könnte. Jedoch gibt es hiernach keine signifikante Interaktion zwischen SDMA und VHF in Bezug auf die Sterblichkeit. Die mögliche Bedeutung von SDMA bei der Entstehung von VHF ist bisher wenig untersucht.

1.4.4 N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)

Auch das N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) zählt zu den endogenen Hemmstoffen der NOS, wobei es niedrigere Plasmaspiegel als ADMA aufweist (Tsikas et al. 2000, Vallance et al. 1992).

L-NMMA wird über die DDAH abgebaut, und zwar zu Citrullin und Monomethylamin. L-NMMA besitzt ähnliche vasokonstriktorische Eigenschaften wie das ADMA (Ferguson et al. 2006). Chowdhary et al. (2004) finden neben den vasokonstriktorischen Eigenschaften von L-NMMA ferner heraus, dass es durch systemische Hemmung der NOS durch Infusion von L-NMMA neben einer Reflexbradykardie ebenso zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Drucks (MAP) kommt und zur Inhibition der normalen koronaren Vasodilatation (Hays et al. 2015). In vorgenannter Studie wird der positive chronotrope Effekt durch Infusion der adrenalinähnlichen Substanz Isoproterenol (Isoprenalin) bei Gabe von L-NMMA reduziert. Cotter et al. (2000) untersuchen die Sicherheit und Effizienz von L-NMMA in der Behandlung des kardiogenen Schocks, in dem sie L-NMMA als intravenösen Bolus (1 mg/kg) applizieren. Dabei steigt nicht nur der MAP um 43 %, sondern ebenfalls die Urinausscheidung innerhalb von 5 Stunden um sogar 148 %. Hingegen bleiben Herzfrequenz sowie PCWP stabil. Hieraus schließen die Autoren, dass die Administration von L-NMMA bei Patienten im kardiogenen Schock sicher zu sein scheint und günstige klinische und hämodynamische Effekte besitzt. Darüber hinaus finden Takahashi et al. (2002) heraus, dass L-NMMA signifikant den Blutfluss des Unterarms reduziert. La Fontaine et al. (2013) beschreiben indes, dass in Tiermodellen die Inhibition der NOS durch L-NMMA mit einer Verlängerung des EKG-Intervalls einhergeht.

Insgesamt jedoch ist die Datenlage zu L-NMMA bislang nicht ausreichend untersucht, sodass künftig weitere Untersuchungen zu Wirkung und Bedeutung nötig sein werden, um die gesamtheitliche (patho-)physiologische Relevanz und den möglichen therapeutischen Nutzen in der Behandlung mit L-NMMA zu identifizieren.

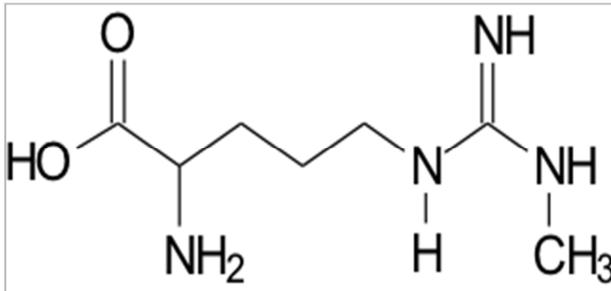


Abb. 10: Strukturformel NMMA (Wikipedia, 2016d)

NMMA: $C_7H_{16}N_4O_2$

N_γ-Monomethyl-L-Arginin: Im Vergleich zum L-Arginin nur einfach methyliert am endständigen Stickstoff des Guanidin Rests (daher auch andere Summenformel, molare Masse etwas geringer als ADMA und SDMA).

Um den Nettoeffekt auf das biologische System und den oxidativen Stress abschätzen zu können, muss das Gleichgewicht der einzelnen Arginin-Derivate in Betracht gezogen werden. Arginin-Derivate lassen sich im peripheren Blut messen und könnten als Biomarker künftig eine Funktion bei der Einschätzung des individuellen Risikos spielen. Ob sie das Risiko von VHF anzeigen, ist noch nicht ausreichend untersucht.

Hypothese dieser Arbeit ist, dass es einen relevanten Zusammenhang zwischen zirkulierenden Arginin-Derivaten und der Häufigkeit von VHF gibt.

2 Methoden

Zur Abhandlung der zuvor genannten Hypothese dieser Arbeit wurden die Baseline-Daten der ersten konsekutiven 5000 Individuen der Gutenberg-Gesundheitsstudie (GHS) herangezogen, da nur bei diesen die Arginin-Derivate ausgewertet worden sind.

2.1 Die Gutenberg-Gesundheitsstudie

Bei der GHS handelt es sich um eine monozentrische, longitudinale Kohortenstudie, bei der eine repräsentative, zufällige Stichprobe aus dem Einwohnermeldeamt der Stadt Mainz und dem umliegenden Landkreis Mainz-Bingen gezogen wurde.

2.1.1 Ziel der Studie

Das Ziel der Studie besteht in der verbesserten Vorhersagbarkeit des individuellen Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder hiermit assoziierten Grunderkrankungen wie Krebs-, Stoffwechsel-, Immun- und Augenerkrankungen sowie für psychische/psychiatrische Störungen mit dem übergeordneten Ziel, präventive Untersuchungen zur Früherkennung von kardiovaskulären Erkrankungen zu eruieren.

2.1.2 Rekrutierung der Teilnehmer

Basierend auf den durch das Einwohnermeldeamt gewonnenen Daten wurde eine Zufallsstichprobe gezogen. Bewohner des Landkreises Mainz-Bingen und der Stadt Mainz wurden im Verhältnis 1:1 in die Studie eingeschlossen. Eine weitere Stratifizierung fand nach Geschlecht (1:1) und Altersdekaden (35–74 Jahre) statt.

Die so vorselektierten Einwohner wurden in mehreren Wellen auf dem Briefweg angeschrieben. Ein erstes Anschreiben enthielt Informationen für den Teilnehmer bezüglich seiner Studienwahl und deren Bedeutung, darüber hinaus einen Flyer mit Informationen zur Studie, den durchzuführenden Untersuchungen, Leitung und

Organisation der Studie und schließlich eine portofreie Rückantwortkarte. Hierüber war es dem Teilnehmer möglich, bei Interesse und bestehenden Unklarheiten weiterführende Informationen anzufordern, um ein Telefongespräch mit einem Studienmitarbeiter zu bitten, passende Termine zur Studienteilnahme anzugeben oder die Teilnahme an der Studie oder Anrufe vonseiten der Studienzentrale abzulehnen.

Weiterhin bestand für die potenziellen Teilnehmer die Möglichkeit, über eine in dem Schreiben angegebene kostenfreie Telefonnummer direkten Kontakt mit der Studienzentrale aufzunehmen.

Jenen Einwohnern, die eine Mitwirkung an der Studie und weitere telefonische Kontaktaufnahmen ablehnten, wurde ein sogenanntes Non-Responder-Interview zugesandt, welches in einem Freiumschlag zurückgeschickt werden konnte.

Ein telefonisches oder postalisches Non-Responder-Interview fand statt, wenn ein in der Stichprobe gezogener potenzieller Proband die Studienteilnahme ablehnte. Inhaltlicher Bestandteil des Interviews waren Fragen zu Herkunft, Rauchgewohnheiten, Größe und Gewicht, (Vor-)Erkrankungen, Erkrankungen in der Familie, Bildung, zur beruflichen Situation und schließlich zur körperlichen Aktivität. Die aufgeführten Charakteristika konnten denen der Teilnehmer gegenübergestellt werden, um mögliche Verzerrungen der Stichprobe zu erkennen.

Für den Fall, dass es innerhalb von zwei Wochen nach Eingang des ersten Anschreibens zu keinerlei Kontakt gekommen sein sollte, wurde zunächst die Telefonnummer der Teilnehmer ermittelt und im weiteren Schritt nach einem festen Algorithmus der Versuch unternommen, die potenziellen Teilnehmer auf telefonischem oder postalischem Weg zu kontaktieren.

Personen galten dann als nicht kontaktierbar, wenn es trotz dreimaligen Anschreibens weder zu schriftlichem noch zu telefonischem Kontakt gekommen war. Dies traf auch dann zu, wenn das erste Anschreiben nicht zugestellt werden konnte und eine neue Anschrift nicht zu ermitteln war.

Wenn Teilnehmer zuvor einen vereinbarten Untersuchungstermin nicht wahrgenommen hatten, wurden sie in dem Fall mehrfach telefonisch zur erneuten Terminvereinbarung kontaktiert und bei ausbleibendem Kontakt angeschrieben.

2.1.3 Ein-/Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie

Um die Studienpopulation genauer zu definieren und um mögliche Verzerrungen zu vermeiden, wurden spezielle Ein- und Ausschlusskriterien formuliert.

Zu den Einschlusskriterien zählten:

- Alter zwischen 35 und 74 Jahren
- Gemeldeter Wohnsitz in der Stadt Mainz oder dem Landkreis Mainz-Bingen
- Das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme

Zu den Ausschlusskriterien zählten:

- Mangelnde Kenntnisse der deutschen Sprache
- Physische/psychische Inkompetenz zur Teilnahme an allen Untersuchungen
- Unter-/Überschreiten der Altersgrenze
- Geplanter Umzug
- Tod

2.1.4 Aufklärung der Teilnehmer

Die Voraussetzung für eine Studienteilnahme ist nach den Vorgaben der Good Clinical Practice (GCP) und denen der Good Epidemiological Practice (GEP) das schriftliche und informierte Einverständnis der Teilnehmer. Aus diesem Grund wurde jeder Studienteilnehmer vor Studienbeginn von einem speziell geschulten Studienmitarbeiter in einem persönlichen Gespräch und in einem eigens hierfür vorgesehenen Raum in einer ruhigen Atmosphäre über Studienziele, Untersuchungen und den Umgang mit persönlichen Daten und Biomaterialien wie Blut und Urin aufgeklärt.

Durch die Basiseinwilligungserklärung stimmten die Teilnehmer schriftlich den vorzunehmenden Untersuchungen und der darauffolgenden Auswertung pseudonymisierter Studiendaten – auch durch Kooperationspartner – zu. Zusätzlich ermöglichten die Probanden auf diese Weise dem Studienteam, relevante medizinische Informationen bei behandelnden Ärzten zu möglicherweise vorbestehenden Erkrankungen einzuholen. Im Falle eines fehlenden schriftlichen Einverständnisses wurde der Teilnehmer nicht im Studienzentrum untersucht.

Im Studienzentrum wurden die Studienteilnehmer erneut auf den vertrauensvollen Umgang im Hinblick auf persönliche Daten und auf die freiwillige Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie aufmerksam gemacht. Ebenfalls hingewiesen wurden die Teilnehmer auf den jederzeit möglichen Widerruf zur Teilnahme an der Studie.

Darüber hinaus wurden die Teilnehmer um Zustimmung zu nachfolgend genannten Punkten gebeten:

- Einwilligungserklärung zu genetischen Untersuchungen von Blutproben
- Einwilligungserklärung zu einem Abgleich von Daten mit dem Krebsregister Rheinland-Pfalz
- Einwilligungserklärung zur Weitergabe anonymisierter Biomaterialien an akademische und industrielle Kooperationspartner der Studie

Den Teilnehmern entstand kein Nachteil im Falle einer fehlenden Zustimmung.

Zusätzlich wurde nach dem Aufklärungsgespräch eine Mappe mit Fragebögen an die Studienteilnehmer ausgeteilt, die in den Pausen, zwischen einzelnen Untersuchungen und nach der letzten Untersuchung ausgefüllt werden sollten. Thematischer Bestandteil dieses Fragebogens waren lebensverändernde Ereignisse, alltägliche Belastungen, körperliche Aktivität sowie seelische Beschwerden und persönliche Eigenschaften.

2.1.5 Vorbereitung der Teilnehmer

Zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Studienteilnehmer wurde diesen zwei Wochen vor dem eigentlichen Untersuchungstermin ein Erinnerungsschreiben mit Merkblatt und Hinweisen zur Vorbereitung auf die bevorstehende Studienteilnahme zugesandt.

Die auf dem Merkblatt angeführten Hinweise an die Studienteilnehmer waren:

- Zwei Stunden vor Untersuchungstermin nicht mehr rauchen
- Einnahme der letzten Mahlzeit maximal fünf Stunden vor den Untersuchungen
- Wasser als einziges Getränk vor den Untersuchungen
- Einnahme der Medikation wie gewohnt
- Keine Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln wie z. B. Vitaminpräparaten

- Kein Genuss einer fettreichen Mahlzeit bis zwölf Stunden vor Untersuchungsbeginn
- Verzicht auf Alkohol und Sport mindestens acht Stunden vor der Untersuchung

2.1.6 Studienablauf

Aus der oben beschriebenen Bevölkerungsstichprobe wurden bislang 15.000 freiwillige Personen untersucht.

Die Studie gliedert sich in drei Abschnitte:

Nach einer ausführlichen Aufklärung und Einwilligung zur Studienteilnahme absolvierten die Studienteilnehmer ein ca. fünfstündiges Untersuchungsprogramm im Studienzentrum, welches anamnestische und körperliche Untersuchungen beinhaltete.

Bei dieser Baseline-Untersuchung durchliefen die Teilnehmer insgesamt fünf Stationen (siehe Abschnitt 2.1.7). Diese Stationen waren von geschulten und zertifizierten Mitarbeitern besetzt, die in einem vorgegebenen Zeitraum und unter Einhaltung der Standard Operating Procedures (SOPs) jeden Studienteilnehmer unter gleichen Raum- und Temperaturbedingungen untersuchten.

2,5 Jahre nach der Baseline-Untersuchung fand das erste Follow-up statt, welches den zweiten Studienabschnitt darstellte. Die Studienteilnehmer wurden im Rahmen eines Computer-assistierte Telefongesprächs (CATI) interviewt. Zuvor wurden die Studienteilnehmer postalisch kontaktiert und gebeten, dem Studienzentrum das Studientagebuch bereitzustellen und vor dem Telefonat zurück in das Studienzentrum zu schicken. In diesem Studientagebuch, welches nach der Baseline-Untersuchung ausgehändigt wurde, sollten alle Krankheiten, die länger als zwei Wochen angehalten haben, sowie alle Krankenhausaufenthalte, die zwischen der Baseline-Untersuchung bis zum ersten Follow-up aufgetreten sind, notiert werden. Diese in den vergangenen 2,5 Jahren aufgetretenen Erkrankungen und Krankenhausaufenthalte wurden im Rahmen des Interviews besprochen. Zusätzlich wurden in einem standardisierten Interview der aktuelle Stand oder das Neuauftreten folgender Krankheitsbilder anamnestisch abgefragt: Bluthochdruck, Diabetes

mellitus, Dyslipidämie, medikamentös zu behandelnde Herzinsuffizienz, Schlaganfall, KHK, Herzinfarkt, VHF und Krebs. Ebenso wurden die Patienten nach ihren Rauchgewohnheiten gefragt.

Im dritten und somit vorerst letzten Studienabschnitt, der nach weiteren 2,5 Jahren erfolgte, wurden die Studienteilnehmer erneut zu einer körperlichen Untersuchung in das Studienzentrum eingeladen (siehe Abbildung 11).

Vor dem Beginn der Studie wurden die Mitarbeiter dezidiert in ihre Stationen eingewiesen, eingearbeitet und entsprechend zertifiziert. Alle Mitarbeiter arbeiteten nach standardisierten Arbeitsprozessen.

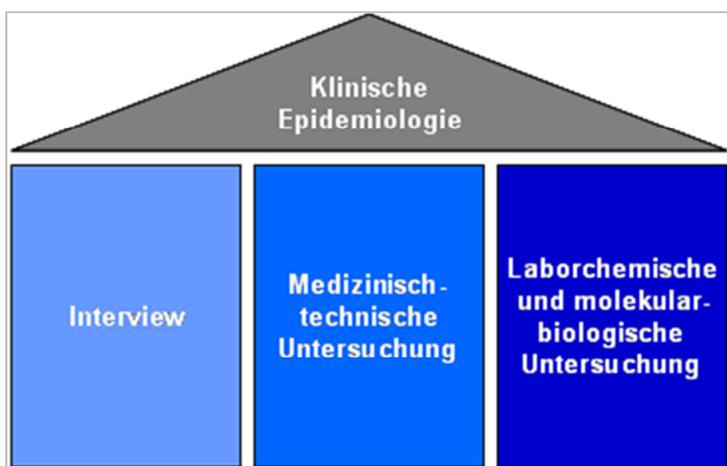


Abb. 11: Säulen der GHS

2.1.7 Übersicht über die einzelnen Stationen

Nachfolgend werden die fünf Stationen der Baseline-Untersuchung und deren Bestandteile jeweils überblicksartig vorgestellt. Die beiden letzten Stationen vier und fünf werden der Vollständigkeit halber ebenfalls beschrieben, spielen für die zugrunde liegende Untersuchung jedoch keine Rolle, da es sich hierbei um die Auswertung der Baseline-Daten handelt.

Station 1: Untersuchung I

Medikamentenerfassung, Messung des Ruheblutdrucks und der Ruheherzfrequenz im Sitzen, Spirometrie, Messung des Kohlenmonoxid-Gehalts, Zahnplaque-Asservierung

Station 2: Bildgebung I – Endothelfunktion

Messung der Reaktivität der Brachialarterie, Messung des digitalen Volumenpulses, Messung der arteriellen Pulscurve, Messung des Ruheblutdrucks und der Ruheherzfrequenz im Liegen, Knöchel-Arm-Index

Station 3: Untersuchung II

Anthropometrische Messung, Elektrokardiographie, Messung der Körpertemperatur, Blut- und Uringewinnung

Nach der dritten Station wurde eine 30-minütige Pause eingelegt, in der die Teilnehmer etwas essen und ggf. rauchen konnten. Außerdem wurden die Studienteilnehmer gebeten, selbständig einen Fragebogen auszufüllen, der ihnen zu Beginn des Aufklärungsgesprächs ausgehändigt wurde. In diesem Fragebogen wurden private Umstände wie psychosoziale Belastung am Arbeitsplatz, psychische Störungen, Lebensereignisse, alltägliche Belastungen, soziale Integration, körperliche Aktivität und die Erfassung der visuellen Lebensqualität abgehandelt. Die eigenständige Beantwortung des Fragebogens durch jeden Studienteilnehmer soll falsche Angaben/Antworten, etwa aufgrund von Stolz oder Angst, verhindern.

Station 4: Bildgebung II – Echokardiographie

2D-Echokardiographie, 3D-Echokardiographie, Sonographie der Karotiden.

Station 5: Computer-assistierte persönliches Interview (CAPI)

Fragen zu: Soziodemographie COPSOQ vs. ERI, Krankengeschichte, Gesundheit, Inanspruchnahme von medizinischer Hilfe, Familienanamnese, Berufsanamnese, Gesundheitsverhalten (Abfragen von Risikofaktoren), tägliche psychische und physische Belastung, Lärmbelastung, Feinstaubbelastung, Arbeitslärm, Wohnbedingungen, Umweltfaktoren, Hygiene und Beruf.

Nachdem die Stationen erfolgreich beendet werden konnten, wurde in einem gemeinsamen Gespräch mit den Teilnehmern das weitere Vorgehen hinsichtlich deren Teilnahme erläutert. Anschließend erfolgte die Ausgabe von Unterlagen, die für das folgende Follow-up-Interview von Bedeutung waren. Dazu zählt u. a. ein Heft als Nachweis und zur Dokumentation von Beschwerden und Krankheiten.

Des Weiteren wurde jeder Studienteilnehmer mit einer Studien-ID und entsprechender Studien-ID-Karte sowie einer ausführlichen Befundmappe mit gesammelten diagnostischen Erhebungen des Tages zur Vorlage beim Hausarzt ausgestattet. Jene Teilnehmer, bei denen im Rahmen der Untersuchung krankhafte Befunde erhoben wurden, wurden ohne weiteren Zeitverzug zu einem persönlichen Gespräch mit dem Studienarzt gebeten, um die vorliegenden Befunde gemeinsam zu erörtern und mögliche gesundheitliche und prognostische Konsequenzen zu diskutieren.

Täglich wurden – mit Ausnahme des Mittwoch (12) – bis zu 18 Teilnehmer untersucht. Einmal monatlich wurde der Studientag an einem Samstag veranstaltet, um vor allem Arbeitnehmern eine Möglichkeit zur Mitarbeit zu bieten.

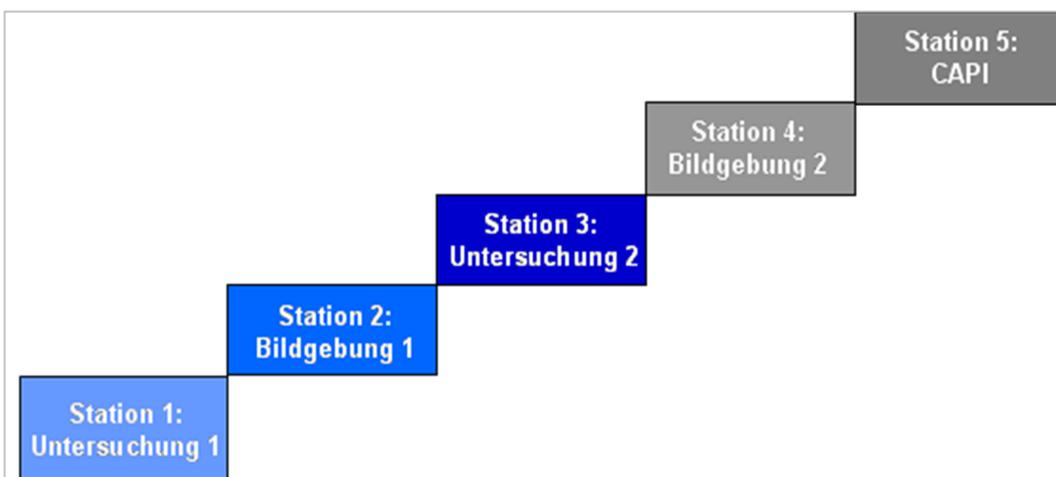


Abb. 12: Die einzelnen Stationen im Überblick

2.1.8 Ethik

Vor dem Beginn der GHS wurde das Gesamtkonzept hinsichtlich geplanter Untersuchungen, Studienverlauf, Aufklärungsbögen und Informationshefte von einer unabhängigen Ethikkommission der Landesärztekammer des Landes Rheinland-

Pfalz geprüft und im Anschluss genehmigt. Hierfür wurden die Kriterien der GCP und der GEP zugrunde gelegt.

Grundlage der einzelnen Untersuchungen und Abläufe bildeten die SOPs.

Die Teilnahme an der Studie geschah ausnahmslos auf freiwilliger Basis. Nach bereits erwähntem Aufklärungsgespräch wurde das Einverständnis bzw. die Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie schriftlich eingeholt, dennoch konnte diese Einverständniserklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen und damit der Verzicht an einer weiteren Mitwirkung erklärt werden. Auf direkten Wunsch war eine Vernichtung von Studiendaten und Bioprobenmaterial möglich. Dies zog dann notwendigerweise die Vernichtung aller entsprechenden Daten der Teilnehmer nach sich.

2.1.9 Datenschutz

Den Studienteilnehmern wurde zur Pseudonymisierung eine fünfstellige Studien-Identifikationsnummer (Studien-ID) zugewiesen. Diese wurde zufällig generiert und ließ somit keinerlei Rückschlüsse z. B. auf die Initialen der Studienteilnehmer o. ä. zu. Sämtliche Daten wurden pseudonymisiert gespeichert. Der nennenswerte Vorteil dieser Studien-ID bestand darin, dass der hierauf befindliche Barcode an jeder Untersuchungsstation mittels Scanner eingelesen werden konnte.

Die Befundanalyse und deren Auswertung erfolgten allein hinsichtlich der Studien-ID und ohne die Kenntnis der Studienmitarbeiter über persönliche Daten der Teilnehmer.

Darüber hinaus kam es bei der Blutentnahme zur Zuteilung einer eigenen, zufällig ausgewählten Labor-ID.

Daher war allein der Studienleitung eine Verknüpfung von Studien- und Labor-ID möglich.

Der Landesdatenschutzbeauftragte und die Datenschutzbeauftragte des Klinikums haben zuvor dieses Procedere begutachtet und genehmigt.

2.2 Erfassung der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren

2.2.1 Computer-assistierte persönliches Interview

Das CAPI wurde mit jedem Teilnehmer geführt. Dieses Gespräch fand in einem abgetrennten Raum statt und wurde durch eigens geschulte Interviewer ohne medizinische Expertise in einer 1:1-Situation geführt. Dabei saßen sich die beiden Gesprächsteilnehmer frontal gegenüber, und es musste gewährleistet sein, dass ausschließlich der Interviewer Einsicht auf den Computer-Monitor hatte. Jeder Untersucher interviewte maximal drei Teilnehmer pro Tag, wobei ein Gespräch etwa 50 min dauerte. Wie ein Großteil der Antworten waren auch die Fragen in ihrer Chronologie festgelegt und wurden bei jedem Teilnehmer im genauen Wortlaut vorgelesen. Antworttafeln wie etwa visuelle Analogskalen oder Listen mit Zahlen- oder Buchstabenkodierungen fanden bei komplexeren Fragestellungen Anwendung. Das Programm DAIMON (Dateneingabe im Online-Betrieb) wurde zur Eingabe der Antworten verwendet. Verschiedene Themenkomplexe wie z.B. die Inanspruchnahme medizinischer Hilfe (z.T. geschlechtsspezifisch), Fragen zur Gesundheit, eine medizinische Anamnese, Familien- und Berufsanamnese, Kinder und Gesundheitsverhalten, chronifizierte Erkrankungen nach KORA (kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) sowie verschiedene Symptomkomplexe (z. B. für Angina Pectoris) wurden erfragt.

Sofern eine Frage nicht auf Anhieb verstanden werden konnte, wurde diese erneut mit dem Ziel wiederholt, die Frage gemäß erstem gedanklichen Impuls zu beantworten.

Herzinfarkt, VHF und Schlaganfall wurden als kardiovaskuläre Risikofaktoren durch das Interview erhoben. Es wurde nach einem von einem Arzt diagnostizierten Ereignis gefragt. Anamnestisch wurde zudem das Vorbestehen einer obstruktiven Atemwegserkrankung wie die chronische Bronchitis oder das Asthma bronchiale zu eruieren versucht. Bezüglich einer KHK wurde nach einer möglichen Verengung eines oder beider Herzkranzgefäße(s) gefragt und zur Erfassung einer Herzinsuffizienz deren eventuelle Behandlung in den letzten zwölf Monaten in Erfahrung gebracht. Schließlich bezog sich der Myokardinfarkt in der Familie auf

Eltern, Geschwister und Kinder, wobei Männer vor dem 60. Lebensjahr und Frauen vor dem 65. Lebensjahr erkrankt sein mussten.

Auch wurden die Rauchgewohnheiten der Teilnehmer mithilfe des Interviews erhoben.

2.2.2 Anthropometrie

Nach der Aufklärung wurden Körpergröße und -gewicht gemessen. Hierfür mussten sich die Teilnehmer – bis auf die Unterwäsche – vollständig entkleiden.

Für die Bestimmung der Größe wurde der Messstab Secca 220 von Secca (Deutschland) verwendet. Mit geschlossenen Füßen stellten sich die Teilnehmer gerade mit dem Rücken vor die Messlatte und blickten mit horizontaler Kinnstellung nach vorne. Dann wurde die Messlatte auf die Köpfe der Teilnehmer hinab geschoben, bis sie flach auf der Kalotte auflag, sodass die Körpergröße bis auf 0,1 cm genau abgelesen und anschließend per Hand in das Programm eCRF (electronic case report form) eingetragen werden konnte.

Vor Untersuchungsbeginn wurde für die Bestimmung des Körpergewichts die Genauigkeit der Waage derart sichergestellt, dass sich die Eich-Luftblase in dem dafür vorgesehenen Kontrollkreis befand. Nun konnte das Gewicht anhand der digitalen Anzeige abgelesen und umgehend in das schon erwähnte Programm eCRF eingegeben werden.

2.2.3 Venöse Blutentnahme

Auf die anthropometrischen Bestimmungen, die Temperaturmessung und die EKG-Erfassung folgte an Station drei die venöse Blutentnahme, die am liegenden und nüchternen Teilnehmer durchgeführt wurde.

Ziel der Untersuchung war die Gewinnung von ca. 114,5 ml Blut der Teilnehmer, um genügend Material für alle im Studienprotokoll aufgelisteten Untersuchungen zu erhalten.

Nach Identifikation einer geeigneten Vene, Desinfektion (Einwirkzeit von 30 s) des Punktionsbereiches und Trocknen der Punktionsstelle mittels Tupfer wurde der

Adapter auf den Plastikschauch des Butterfließ aufgesetzt. Die empfohlene Reihenfolge der Abnehmeröhrchen wurde streng eingehalten – daher wurde mit dem CPT-Röhrchen (cell preparation tubes) für die RNA (Ribonukleinsäure) begonnen.

Es wurde ferner darauf geachtet, dass alle Röhrchen vollständig – das bedeutet bis zur oberen Markierung – mit Blut befüllt wurden.

Nach erfolgter Blutentnahme wurden die Teilnehmer gebeten, den entsprechenden Arm möglichst 30–40 Grad gegenüber der Horizontalen nach oben zu halten und für ca. 4 min kräftig auf die Punktionsstelle zu drücken.

Bei der Hälfte der Studienteilnehmer wurde zunächst Blut für die RNA-Analyse in ein CPT-Röhrchen abgenommen, welches umgehend nach der Entnahme von einer Medizinisch-Technischen Assistentin abgeholt und im Labor des Studienzentrums verarbeitet wurde.

Ein Teil des gewonnenen Blutes wurde in Form von Monovetten in den Analysestraßen des Zentrallabors der Universitätsmedizin als Notfalllabor untersucht. Das Ergebnis des Routinelabors konnte den Teilnehmern dadurch bereits am Ende der Untersuchung mitgeteilt werden. Die Proben von drei aufeinander folgenden Teilnehmern wurden gesammelt und anschließend gemeinsam in das Zentrallabor transportiert. Somit konnten die Analysen zeitnah durchgeführt werden.

Im Zentrallabor wurden folgende Blutparameter bestimmt:

- Differentialblutbild
- Elektrolytkonzentration
- Leberwerte
- Nierenwerte
- Blutfette
- Glukose
- Thyreoidea-stimulierendes Hormon
- Gerinnungsparameter
- Entzündungsparameter (C-reaktives Protein)

Für die Durchführung der venösen Blutentnahme wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien benötigt:

- 1 CPT Vacutainer BD à 8 ml
- 1 Citrat-Monovette à 9 ml (Preventit-Labor)
- 1 Citrat-Monovette à 2,7 ml (Notlabor)
- 1 Heparin-Monovette à 2,6 ml (Notlabor)
- 1 EDTA-Monovette à 2,7 ml (Notlabor)
- 6 EDTA-Monovetten à 9 ml (Preventit-Labor)
- 1 EDTA-Monovette à 2,7 ml (Routinelabor)
- 1 braune Serum-Monovette à 2,6 ml (Routinelabor)
- 4 weiße Serum-Monovetten à 7,5 ml (Preventit-Labor)
- 1 Homocystein-Monovette à 2,9 ml (Routinelabor)

Das Verfahren wurde gemäß gültiger SOP durchgeführt und ordnungsgemäß dokumentiert.

Die Durchführung der Prozedur oblag ausschließlich eingewiesenen Mitarbeitern.

2.2.4 Blutfette

Die Blutfette wurden bestimmt, um vor dem Hintergrund der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren eine Aussage über das Vorliegen einer Dyslipidämie treffen zu können. Alle Messungen wurden mit Architect c8000-Systemen (Abbott, Longford, Irland) durchgeführt. Für die Analysen wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Plasma verwendet. Als Testverfahren kam ein Chemolumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay (CMIA, Architect Assay, Abbott, Longford, Irland) zum Einsatz.

Folgende Werte wurden bestimmt:

- Gesamtcholesterin
- Triglyceride
- HDL-Cholesterin
- LDL-Cholesterin

Der LDL-Wert mg/dl wurde approximativ auf Basis der Friedewald-Formel berechnet:

$$LDL\text{-Cholesterin} = \text{Gesamtcholesterin} - \left(HDL\text{-Cholesterin} + \frac{\text{Triglyzeride}}{5} \right)$$

2.2.5 Messung der Plasmakonzentration mittels LC-MS/MS

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von L-Arginin, SDMA, ADMA und NMMA erfolgte mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Dabei dient die Chromatographie der Auftrennung der Substanzen sowie der Abtrennung der Analyten von der Matrix. Die Massenspektrometrie erlaubt die Identifikation und Quantifizierung der Analyten. Die Messung der Analyten erfolgt nach Derivatisierung zu den entsprechenden Butylestern. Diese LC-MS/MS-Methode hat den Vorteil, dass die dimethylierten Arginin-Derivate SDMA und ADMA anhand ihrer unterschiedlichen Massenübergänge von Mutter- zu Tochterion spezifisch quantifiziert und besser von der Matrix abgetrennt werden können (Schwedhelm et al. 2007).

Die Plasmaproben wurden bis zur Bestimmung der Arginin-Derivate mittels Massenspektrometrie bei -80 °C ohne Auftauzyklen eingelagert. Zur Aufbereitung der Plasmaproben wurden je 100 µL einer methanolischen Lösung der internen Standards (2 µmol/l [²H₆]-ADMA und 50 µmol/l L-[²H₇]-Arginin) in einer MultiScreen 96-Well-Filterplatte vorgelegt (Durapore® Membran, 0,22 µm). Die Filterplatte wurde zuvor über einer 96-Well-Polypropylenplatte positioniert. Je 25 µl Kalibrierlösung, Plasmaproben oder Qualitätskontrollproben wurden hinzu pipettiert, und die Platte wurde anschließend bei Raumtemperatur 15 min lang auf einem Orbital-Schüttler geschüttelt. Die MultiScreen 96-Well-Filterplatte wurde nachfolgend zusammen mit der Polypropylenplatte bei 2000 rpm (rounds per minute) 10 min bei +4 °C zentrifugiert, sodass die methanolische Phase vollständig in die Polypropylenplatte eluierte. Die Polypropylenplatte wurde dann auf einem Heizblock positioniert und die Lösung bei +80 °C unter dem Abzug abgedampft. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft war, wurden je 100 µl einer 1 N butanolischen Salzsäurelösung auf die Proben pipettiert. Die Platte wurde mit einer Abdeckmatte verschlossen und für 30 min auf einen auf +65 °C geheizten Heizblock gestellt. Durch die butanolische

Salzsäure wurden die Aminosäuren zu ihren Butylestern umgesetzt. Nach der Derivatisierung wurde die butanolische Salzsäurelösung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter dem Abzug abgedampft. Die Polypropylenplatte wurde bis zur Messung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Messung wurde das Probengemisch in $100\text{ }\mu\text{l}$ (microliter) Probenpuffer (Methanol/dest. Wasser, 50/50 v/v, pH 5) aufgenommen. Zum Lösen des Analyten wurde die Platte mit einer Acetat-Klebefolie abgedeckt und 30 min lang bei Raumtemperatur auf dem Orbital-Schüttler geschüttelt. Die Proben wurden ein weiteres Mal durch eine MultiScreen-Filterplatte filtriert (10 min/2000 rpm) und waren nun messbereit. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Lösung wurden zur Analyse injiziert. Die Messung erfolgte mit einer Varian ProStar HPLC-Pumpe (Model 210, Fa. Agilent, Waldbronn, Deutschland), gekoppelt an ein Varian 1200 L Triple Quadrupole Massenspektrometer (Fa. Agilent) unter Verwendung einer Polaris C18-Ether-Trennsäule (Varian $50 \times 2,0\text{ mm}$, Fa. Agilent). Zur Quantifizierung von ADMA, SDMA und L-Arginin wurden die folgenden Massenübergänge von Mutter- zu Tochterion der Moleküle gemessen: L-Arginin $m/z\ 231,1 \rightarrow 70,0$; L- $[\text{}^2\text{H}_7]$ -Arginin $m/z\ 238,1 \rightarrow 77,0$; ADMA $m/z\ 259,1 \rightarrow 214,1$, SDMA $m/z\ 259,1 \rightarrow 228,1$ und $[\text{}^2\text{H}_6]$ -ADMA $m/z\ 265,1 \rightarrow 220,1$. Die Probenlaufzeit betrug 4 min mit einer Intra-Assay- und einer Inter-Assay-Präzision von $< 15\%$.

2.2.6 Blutdruck

In einem separaten, angenehm temperierten (mindestens $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ Raumluft) und ruhigen Raum wurden die Vitalparameter Ruheblutdruck und Ruheherzfrequenz des Patienten mit dem Gerät Omron 705CP-li (Omron, Japan) gemessen.

Vor Beginn der Messung wurden die Studienteilnehmer explizit über den genauen Ablauf in Kenntnis gesetzt. Die Studienteilnehmer wurden darum gebeten, die Arme soweit von der Kleidung zu befreien, dass eine unproblematische Blutdruckmessung möglich wurde. Sobald die Teilnehmer eine entspannte Sitzposition eingenommen hatten, ließen sie die Arme locker vom Körper herabhängen, um dann den Unterarm – je nach Konstitution des einzelnen Teilnehmers – auf der Stuhllehne oder dem Oberschenkel abzulegen.

Nachdem der Armumfang mithilfe eines Maßbands ermittelt und die entsprechende Blutdruckmanschette ausgewählt wurde, wurde diese entlüftet und ca. 3 cm oberhalb der Ellenbeuge angelegt, sodass sie auf Herzhöhe positioniert werden konnte. Insgesamt musste hierbei darauf geachtet werden, dass die Teilnehmer die Messergebnisse nicht einsehen konnten.

Nach 5, 8 und 11 min Ruhephase fanden jeweils Messungen statt. Die Teilnehmer wurden darauf hingewiesen, nicht zu sprechen und sich zu entspannen. Die erste Messung wurde an beiden Armen durchgeführt, und die beiden folgenden Messungen wurden nur dann ebenfalls an beiden Armen durchgeführt, wenn bei der ersten Messung eine Blutdruckdifferenz zwischen rechtem und linkem Arm von mehr als 20 mmHg systolisch oder 15 mmHg diastolisch festgestellt wurde.

Mithilfe eines eigens für die Studie erstellten eCRF wurden die Ergebnisse aus Blutdruck- und Herzfrequenzbestimmung in die Datenbank eingegeben und diese den Teilnehmern erst nach Beendigung aller drei Messungen mitgeteilt.

2.2.7 Echokardiographie

Die Transthorakale Echokardiographie (TTE) stellt ein wichtiges Instrument in der Diagnostik kardialer Funktionsstörungen dar.

Sie gewährleistet die exakte Darstellung von Struktur, Funktion sowie Hämodynamik des Herzens und bietet konsequenterweise die Erfassung etwaig vorliegender Pathologien wie Hypertrophien und Klappenvitien.

Die Qualitätsleitlinien in der Echokardiographie wurden von der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie determiniert (Erbel et al. 1997).

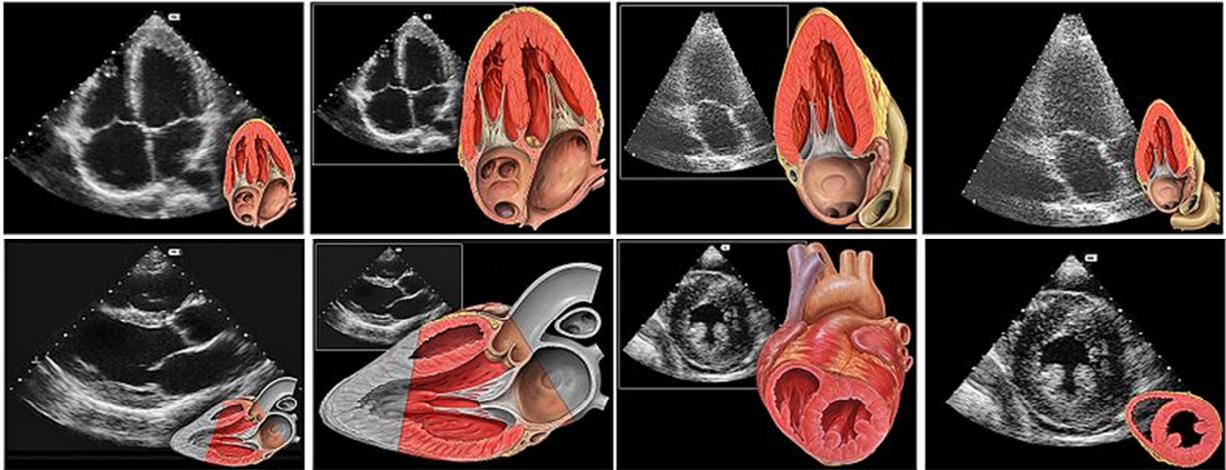


Abb. 13: Apikale und parasternale Schnittebene durch das Herz (Wikipedia, 2016e)

-
1. Reihe: Apikale, links 4-Kammer-Blick, rechts 3-Kammer-Blick.
 2. Reihe: Parasternale Schnittreihe durch das Herz, links lange Achse, rechts kurze Achse.
-

Bei der TTE kann das Herz parasternal und apikal, also aus der Perspektive der Herzspitze (Apex cordis), dargestellt werden.

Im sogenannten M-Mode (Motion-Mode) können die Ventrikelparameter sehr genau ausgemessen und bestimmt werden. Dann werden M- und B-Mode (Brightness Mode) respektive 2D-Bild miteinander gekoppelt.

Eine erhöhte Geschwindigkeit des Blutstroms über einer Herzklappe, beispielsweise durch eine insuffiziente Mitralklappe, kann durch den Pulsed-Wave-Doppler (PW-Doppler) detektiert werden. Dagegen erfasst der Gewebedoppler (auch Tissue-Doppler Imaging, TDI) die vergleichsweise langsameren Geschwindigkeiten an der Kammerwand.

Sowohl die Werte bei der frühdiastolischen (= passiven) linksventrikulären Füllung als auch die bei der spätdiastolischen (= aktiven) linksventrikulären Füllung während der Kontraktion der Vorhöfe werden durch beide Doppler-Systeme erfasst.

Die Durchführung der echokardiographischen Untersuchung wird nachfolgend beschrieben:

Nachdem der Teilnehmer seinen Oberkörper entkleidet hatte, wurde er anschließend gebeten, sich in die Linksseitenlage zu begeben, seinen linken Arm zu heben und unter dem Kopf abzulegen. Der rechte Arm kam auf der rechten Körperhälfte zum Liegen.

Nun konnten in der M-Mode unterschiedliche Parameter in der langen, parasternalen Achse gemessen werden.

Folgende Parameter wurden erfasst:

- die diastolische Septumdicke (IVSd)
- der rechts- und linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (RVIDd und LVIDd)
- der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVIDs)
- die diastolische Hinterwanddicke (LVPWd)

Daran anschließend wurden im apikalen 3-Kammer-Blick B-Bilder erstellt und ein Gewebedoppler angelegt. Dann folgend konnten mittels 4-Kammer-Blick die Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion des Herzens erschlossen werden.

Durch den Einsatz des PW-Dopplers wurde der Blutstrom über der Mitralklappe gemessen.

Hierbei wurden nachfolgende Werte erfasst:

- MV-E: Vmax: maximale Geschwindigkeit des Blutstroms über der Mitralklappe während der schnellen frühen Füllung des (linken) Ventrikels in der Diastole
- MV-A: Vmax: maximale Geschwindigkeit des Blutstroms über der Mitralklappe als Folge der linksatrialen Kontraktion
- MV-E: Dezelerationszeit: Zeit von der maximalen Geschwindigkeit der schnellen frühen LV-Füllung (MV-E Vmax) bis zum Abfall des Blutflusses auf 0 m/s.

Der Gewebedoppler misst die Geschwindigkeit des Mitralanulus. Zu beachten bei der Durchführung und zu berücksichtigen bei der Bewertung der Ergebnisse ist, dass das Messvolumen am medialen Anulus langsamer als am lateralen Anulus ist. In der Baseline-Untersuchung wurde der Gewebedoppler am lateralen Mitralanulus platziert.

Es wurden folgende Geschwindigkeiten gemessen:

- lat. E' Vmax: maximale Geschwindigkeit des lateralen Mitralanulus während der schnellen frühen Füllungsphase des linken Ventrikels
- lat. A' Vmax: maximale Geschwindigkeit des lateralen Mitralanulus während der Vorhofkontraktion
- lat. S' Vmax: maximale Geschwindigkeit des lateralen Mitralanulus in der Ventrikelsystole

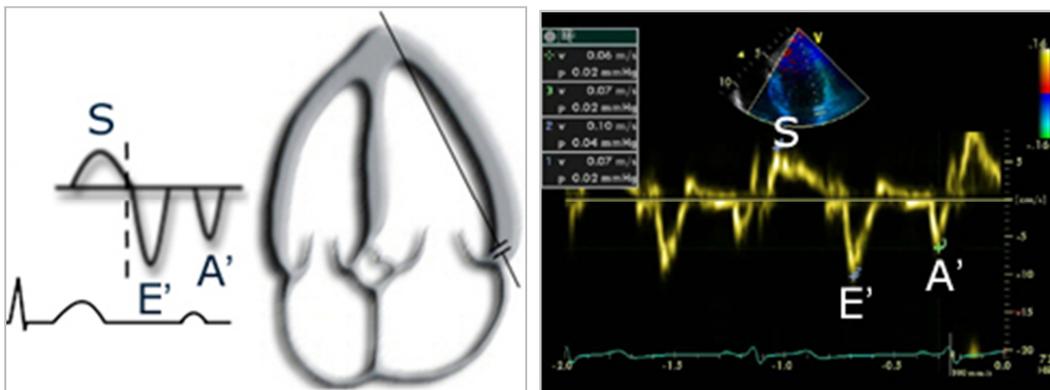


Abb. 14: Der Gewebedoppler (Mereles, 2014)

Links: Das Messvolumen des Gewebedopplers, welches auf dem lateralen Mitralanulus platziert worden ist.

Rechts: Eine Spektraldarstellung.

Schließlich wurde der Studienteilnehmer gebeten, zehn Bauchzüge durchzuführen. Hiernach wurden im TDI identische Parameter erfasst, nun jedoch in Form von Stressparametern mit dem Ziel, mögliche Diskrepanzen in der Hämodynamik des Herzens bei körperlicher Aktivität sichtbar zu machen.

In der Diagnostik der Echokardiographie fanden das Ultraschallgerät iE33 von Philips Medical Systems aus den Niederlanden und ein Schallkopf S5-1 Anwendung.

2.2.8 Elektrokardiographie (EKG)

Die während der Herzaktion auftretenden Spannungsdifferenzen lassen im Organismus ein elektrisches Feld entstehen. Die Veränderung des elektrischen Feldes kann in Form von Potenzialdifferenzen erfasst werden. Aus diesen Potenzialdifferenzen entstehen Aktionsströme, die sich an der Körperoberfläche ableiten lassen. Elektroden können die Ströme an der Körperoberfläche detektieren

und leiten sie an einen Verstärker mit Registriereinrichtungen – den Elektrokardiographen – weiter. Die Extremitätenableitungen vermitteln vorwiegend eine Übersicht über die Summationsströme, während die Brustwandableitungen einen Einblick in sogenannte Nahpotenziale ermöglichen.

Man unterscheidet:

- die bipolaren Standardableitungen nach Einthoven: I, II, III
- die unipolaren Extremitätenableitungen nach Goldberger: aVR, aVL, avF
- die unipolaren Brustwandableitungen nach Wilson: V1, V2, V3, V4, V5, V6

Für das EKG wurde im PREVENT-it Studienzentrum ein Ruhe-EKG sowie ein Rhythmusstreifen über 30 s erfasst.

Für die Durchführung der elektrokardiographischen Untersuchung wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

- PC mit Monitor, Tastatur, Maus, Drucker und Druckerpapier
- EKG Software, CardioSoft V 6.01, REF Nr. 2006301-018, GE Medical Systems Information Technologies Germany
- Elektroden-Applikationssystem, KISS (Kabel-Integriertes-Saug-System), Medical Systems Information Technologies Germany
- Patientenmodul CORINA, Cat. Nr. 101 118 32, GE Medical Systems Information Technologies Germany
- Elektrodenspray, „Kontaktspray“, 200 ml, Cat. Nr. 217 307 01, GE Medical Systems Information Technologies Germany
- Thoraxwinkel, 2 Stück in unterschiedlichen Längen
- Stift zur Markierung der Elektrodenpositionen C1–C6
- Papiertücher zum Reinigen
- Untersuchungsfläche, mindestens 80 cm breit
- Laken
- Filterscheiben

Der Untersuchungsraum war kein Durchgangszimmer und enthielt ebenfalls kein Telefon. Die Zimmertemperatur sollte mindestens 23 °C (Raumluft) betragen, damit die Ableitung des EKGs nicht durch Muskelzittern des frierenden Teilnehmers überlagert wurde.

Nachdem sich der Teilnehmer bzw. die Teilnehmerin entkleidet hatte (Oberkörperkleidung, ggf. Büstenhalter, Hose, Schuhe, Strümpfe, Uhr und Schmuck), musste er sich vor Beginn der Messung über den im Prüfplan festgelegten Zeitraum von 5 min in liegender Position ausruhen. Währenddessen wurden die Elektroden entsprechend angelegt. Es empfahl sich, unter die Knie des Teilnehmers eine Knierolle zur Entlastung der unteren Extremitäten zu legen.

Vor dem Anbringen der Saugelektroden wurden zunächst Haare im Bereich der Elektrodenpositionen abrasiert und die Haut mit Elektrodenspray zur Reduktion des elektrischen Hautwiderstands besprüht.

Danach wurden die Saugelektroden an den Extremitäten angelegt. Der Sog der Elektroden wurde mittels eines Schiebereglers am KISS-Modul reguliert. Die Elektrodenkabel mussten „geordnet“ verlaufen und durften keine „Schleifen“ bilden, um induktive Wechselstromstörungen zu vermeiden.

Folgende Reihenfolge sollte eingehalten werden:

1. Linkes Bein (grün)
2. Rechtes Bein (schwarz)
3. Linker Arm (gelb)
4. Rechter Arm (rot)
5. Brustwandableitungen in der Reihenfolge C1–C6

Die Ableitungsorte wurden vor dem Anlegen der Saugelektroden auf dem Oberkörper der Probanden mit einem Stift markiert.

Im Einzelnen wurde unter Verwendung des Thoraxwinkels wie folgt vorgegangen:

1. Es wurde der 1. Intercostalraum am linken Sternalrand mit dem Zeigefinger der rechten Hand palpiert
2. Gezählt wurde bei sukzessivem Ertasten der folgenden Intercostalräume bis zum 4. Intercostalraum
3. Markiert wurde mit einem Fettstift der rechte Sternalrand des 4. Intercostalraums Position C1
4. Ebenso wurde mit dem linken Sternalrand des 4. Intercostalraums Position C2 verfahren

5. Markiert wurde die Thoraxmitte in Höhe des linken Sternalrandes des 5. Intercostalraums Position X
6. Der Thoraxwinkel wurde bei Position X angelegt und dort markiert, wo der Thoraxwinkel die linke mittlere Axillarlinie kreuzt (Position C6).

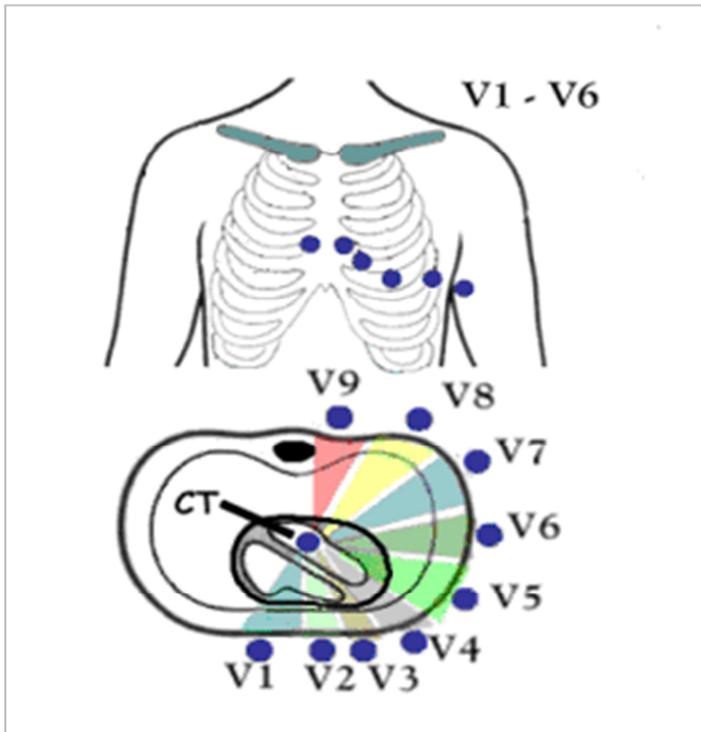


Abb. 15: Die Ableitungsorte des 12-Kanal-EKG nach Wilson (Kleindienst, 2016)

Auf dem Bildschirm erschienen die Extremitäten- und Brustwandableitungen (I/II/III/avR/avL/avF/V1/V2/V3/V4/V5/V6).

Nach Anlegen der Elektroden erfolgte die Aufnahme des Elektrokardiogramms.

Eine gute EKG-Registrierung war die Voraussetzung für eine optimale Auswertung der Untersuchungen. Deshalb sollte die Ableitung sehr sorgfältig durchgeführt werden. Möglichst 2–3 min vor der Aufnahme wurden die Elektroden angelegt und dem Teilnehmer ein Untersuchungskittel übergelegt, damit durch Kälte kein Zittern provoziert werden konnte.

Nach der Überprüfung der Elektroden mit den entsprechenden Kabeln wurden die Probanden sodann aufgefordert, sich während der Ableitung zu entspannen, nicht zu sprechen und möglichst flach in Atemmittellage zu atmen.

Das EKG wurde mit einer Fortlaufgeschwindigkeit von 50 mm/s geschrieben. Eine separate Registrierung eines Rhythmusstreifens war nicht notwendig, da die Online-Aufzeichnung einen Abschnitt über 30 s enthielt.

2.3 Datenmanagement

Jede Untersuchungsstation war zur Erfassung aller Daten mit einem PC ausgestattet. Die jeweilige Studien-ID wurde mithilfe eines Scanners eingegeben und die erfassten Daten digital gespeichert. Die Daten wurden in einer Studiendatenbank sowie einer gespiegelten Datenbank (Backup-System) gespeichert.

Die erhobenen Daten wurden kontinuierlich von dem Datenmanagement-Team und dem EDV-Team überprüft.

Sollte der Fall eingetreten sein, dass Daten fehlten, so konnten unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen, die jedoch durch das Datenmanagement-Team umfassend überprüft wurden. Folgende Ursachen konnten zugrunde liegen:

1. Daten waren nicht erhoben worden: eine Erfassung war nicht möglich, etwa weil bei einem Teilnehmer im Rollstuhl die exakte Größe nicht bestimmt werden konnte oder das Zeitlimit einer Station überschritten worden war. Die Gründe wurden durch die Untersucher entsprechend dokumentiert
2. Das Fehlen blieb ungeklärt. In diesem Fall wurden die Daten als "missing" deklariert

Darüber hinaus wurden alle erhobenen Daten vor jeglicher Auswertung umfangreich anhand von vordefinierten Plausibilitätskriterien überprüft, um die Qualität der Daten sicherzustellen. Neben der Aufklärung von fehlenden Werten wurden ungewöhnlich hohe und niedrige Werte mittels vordefinierter Grenzwerte überprüft. Ebenso wurden die Kodierung der Variablen sowie widersprüchliche Angaben identifiziert und kontrolliert. Des Weiteren wurden stets Kommentare der untersuchenden Personen berücksichtigt, um ggf. Aufschlüsse über fehlerhafte oder fehlende Werte zu erhalten.

2.4 Definitionen

Bei jedem Teilnehmer wurde ein 12-Kanal-EKG geschrieben (GE Healthcare, CardioSoftVersion 6).

Die Diagnose VHF wurde gestellt, wenn

1. ein anamnestisch ärztlich dokumentiertes VHF vorlag, oder
2. auf dem für 10 s während der Studienuntersuchung aufgezeichneten 12-Kanal-Studien-EKG eine Arrhythmie (AA) bzw. Vorhofflattern aufgezeichnet worden war.

In diesem Fall begutachteten mindestens zwei Kardiologen mit Erfahrung in der Interpretation eines EKG den vorliegenden Rhythmus. In schwierigen Fällen wurde ein Elektrophysiologe konsultiert.

Bei einem mittleren systolischen Blutdruck von über 140 mmHg oder einem mittleren diastolischen Blutdruck von über 90 mmHg in der zweiten und in der dritten Messung, also nach 8 min bzw. 11 min Ruhephase, und/oder bei Einnahme antihypertensiver Medikation galt eine arterielle Hypertonie als vorhanden.

Als Diabetiker galt ein Teilnehmer dann, wenn er im Interview angegeben hatte, an einem durch einen Arzt diagnostizierten Diabetes mellitus zu leiden und/oder bei einer Nüchtern-Blutglucose-Konzentration über Nacht von > 126 mg/dl oder von > 200 mg/dl bei weniger als 8 h bestehender Nüchternheit.

Der BMI errechnet sich wie folgt:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße zum Quadrat (m}^2\text{)}}$$

Bezüglich des Rauchens wurden die Teilnehmer in vier Gruppen eingeteilt: Nichtraucher, Ex-Raucher, Gelegenheitsraucher (< 1 Zigarette/Tag), Raucher (> 1 Zigarette/Tag).

Eine Dyslipoproteinämie galt als vorliegend, wenn eine dahingehende Diagnose durch eine Arzt erfolgt war (LDL/HDL-Ratio von > 3,5).

Die Diagnosen einer KHK, eines (abgelaufenen) Myokardinfarkts in der Vorgeschichte und in der Familie, einer Herzinsuffizienz, eines VHF, eines Schlaganfalls und einer COPD wurden eigenanamnestisch im Rahmen des CAPI erhoben.

2.5 Qualitätskontrolle

Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurden in dem eCRF Ober- und Untergrenzen für die jeweiligen Parameter vorab festgelegt.

Diese Daten warnten den Untersucher außerhalb der jeweiligen Grenzen und minimierten so die Wahrscheinlichkeit von Tippfehlern. In einem weiteren Schritt wurden unterschiedliche Parameter, so etwa Größe und Gewicht, mit der Lungenfunktion verglichen. Große Diskrepanzen gaben einen Hinweis auf möglicherweise falsch oder unvollständig erfasste Daten. Eine dritte Plausibilitätsprüfung erfolgte schließlich wieder beim Datenmanagement-Team, welches eventuelle Fehlerberichte mit Werten außerhalb definierter Grenzen erstellt und überprüft hat.

Eine weitere Qualitätskontrolle der gewonnenen Angaben aus dem Interview erfolgte über die Überprüfung logischer Verknüpfungen einzelner Fragen. Eine tägliche Überprüfung und Eichung sämtlicher Tests und Geräte wurde gemäß den Routineüberprüfungen des Zentrallabors durchgeführt. Eine Validierung durch einen Arzt erfolgte für den Fall eines von der Norm abweichenden Ergebnisses während einer Messung.

2.6 Statistische Auswertung

Für die allgemeinen Charakteristika der Studienpopulation wurden normalverteilte, kontinuierliche Parameter mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Die Datenanalyse wurde für die betrachtete Stichprobe von 5000 Patienten durchgeführt. Um annähernd eine Normalverteilung zu erreichen, wurden die Variablen einschließlich der vorgenannten Biomarker logarithmisch umgewandelt.

Die Auswertungen beinhalteten deskriptive Statistiken mit Verteilungsdarstellungen und Korrelationsanalysen. Berechnet wurden lineare und logistische Regressionen in alters- und geschlechtsadjustierten sowie in multivariabel für kardiovaskuläre Risikofaktoren adjustierten Modellen.

Bereits der Anstieg um eine Standardabweichung der Biomarker in den logistischen Regressionsmodellen zeigte einen Zusammenhang zu VHF.

Bezüglich der Prävalenzen der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Adipositas, Hypertension, Herzinsuffizienz) wurden diese als relative und absolute Häufigkeiten angegeben.

In multivariablen Analysen wurden Zusammenhänge zwischen Biomarkern und elektro- und echokardiographischen intermediären Phänotypen untersucht.

Zur Berechnung der relativen Häufigkeit von kardialen Funktionsstörungen in Untergruppen mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen wurde jeweils die Prävalenz in dieser Untergruppe definiert und ins Verhältnis zur Prävalenz der Gesamtpopulation gesetzt.

Ein p-Wert (p-value) von 0,05 war statistisch signifikant. Darüber hinaus wurde in den einzelnen Analysen die Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SAS (Version 9.2; SAS-Institute Inc., Cary, NC, USA), R (Version 2.8.1.) und SPSS 17.0 (SPSS Inc., USA).

3 Ergebnisse

3.1 Baseline-Daten

Die Grundcharakteristika der 4998 Teilnehmer, bei denen Biomarker-Analysen gewonnen werden konnten, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zusätzlich können anteilhaft die Werte für Patienten mit VHF abgelesen werden. Das Durchschnittsalter der Stichprobe beträgt $55,5 \pm 10,9$ Jahre. Der Anteil der Männer an der Stichprobe liegt bei 50,8 %.

Von den 4998 Teilnehmern leiden insgesamt 161 an VHF (3,2 %). Darunter befinden sich 115 Männer (71,4 %).

Beim Vergleich der Teilnehmer mit und ohne VHF ist festzustellen, dass die Patienten mit VHF ein höheres kardiovaskuläres Risikoprofil aufweisen als die Patienten ohne VHF.

Die Patienten mit VHF sind durchschnittlich 10 Jahre älter (64,9 Jahre gegenüber den Patienten ohne VHF mit durchschnittlich 55,2 Jahren) und haben im Mittel einen höheren BMI von $29,3 \pm 5,4$ kg/m² im Vergleich zu den Patienten ohne VHF ($27,1 \pm 4,8$ kg/m²). Von den 161 an VHF leidenden Patienten haben 21 (13 %) einen Diabetes mellitus, wohingegen von den 4837 Patienten ohne VHF 353 (7,3 %) an einem Diabetes mellitus leiden. Bei 62 Patienten mit VHF (38,5 %) wurde eine Fettstoffwechselstörung im Sinne einer Dyslipidämie diagnostiziert, und etwa ein Fünftel (n = 33) der 161 Patienten mit VHF haben eine positive Familienanamnese hinsichtlich eines bereits erlittenen Myokardinfarkts. Ein nennenswerter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne VHF in Bezug auf eine Herzinsuffizienz konnte nicht festgestellt werden. Der Anteil der Raucher im VHF-Kollektiv ist geringer als der bei den Patienten ohne VHF (11,2 % mit VHF und 19,5 % ohne VHF). An Bluthochdruck leiden 73,3 % der Patienten mit VHF. Der Anteil der Patienten ohne VHF mit einem Hypertonus liegt indes bei 50,6 %.

Risikofaktoren	Gesamt (n = 4998)	Ohne VHF (n = 4837)	Mit VHF (n = 161)
Alter (Jahre)	55,5±10,9	55,2±10,9	64,9±8,3
Männer, n (%)	2539 (50,8)	2424 (50,1)	115 (71,4)
Frauen, n (%)	2459 (49,2)	2413 (49,9)	46 (28,6)
<i>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</i>			
Body Mass Index (kg/m ²)	27,2±4,8	27,1±4,8	29,3±5,4
Raucher, n (%)	959 (19,2)	941 (19,5)	18 (11,2)
Diabetes, n (%)	374 (7,5)	353 (7,3)	21 (13)
Dyslipidämia, n (%)	1462 (29,3)	1400 (28,9)	62 (38,5)
Pos. FA bzgl. eines Myokardinfarkts, n (%)	886 (17,7)	853 (17,6)	33 (20,5)
Hypertension, n (%)	2563 (51,3)	2445 (50,6)	118 (73,3)
Herzinsuffizienz, n (%)	965 (19,4)	456 (18,0)	509 (20,8)

Tab. 1: Risikofaktoren des Patientenkollektivs mit und ohne VHF

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung für das Alter. Für diskrete Variablen stellen sie den Anteil dar. FA: Familienanamnese.

Die Arginin-Derivate sind bei den Patienten mit und ohne VHF unterschiedlich verteilt (siehe Tabelle 2). L-Arginin ist bei den Patienten ohne VHF höher (74,3 µmol/l) als bei den Patienten mit VHF (70,6 µmol/l). Ebenso ist der L-Arginin/ADMA-Index bei den Patienten ohne VHF höher (145) als bei den Patienten mit VHF (130).

Das demethylierte, strukturverwandte L-Arginin-Analogon ADMA ist bei den Patienten mit VHF ebenso erhöht (0,54 µmol/l gegenüber 0,51 µmol/l) wie das SDMA (0,48 µmol/l gegenüber 0,43 µmol/l) und das NMMA (0,14 µmol/l zu 0,13 µmol/l).

Biomarker	Gesamt (n = 4998)	Ohne VHF (n = 4837)	Mit VHF (n = 161)
L-Arginin (µmol/l)	74,1 (62,0/87,8)	74,3 (62,1/88,0)	70,6 (58,2/84,4)
ADMA (µmol/l)	0,51 (0,45/0,57)	0,51 (0,45/0,57)	0,54 (0,49/0,62)
SDMA (µmol/l)	0,43 (0,37/0,50)	0,43 (0,37/0,50)	0,48 (0,39/0,57)
NMMA (µmol/l)	0,13 (0,1/0,15)	0,13 (0,10/0,15)	0,14 (0,12/0,16)
L-Arginin/ADMA-Index	144 (120/173)	145 (120/173)	130 (103/157)

Tab. 2: Übersicht über definierte Biomarker in Bezug auf VHF

Werte sind Median mit 25./75. Perzentile. ADMA: asymmetrisches demethyliertes Dimethylarginin; SDMA: symmetrisches demethyliertes Dimethylarginin; NMMA: NG-Monomethyl-L-Arginin.

3.2 Vorhofflimmern und Elektrokardiographie

Bei der Auswertung des EKG fällt bei den Patienten mit VHF auf, dass sie mit 171 Millisekunden (ms) im Vergleich zu den Teilnehmern ohne VHF (158 ms) ein verlängertes PR-Intervall zeigen (siehe Tabelle 3).

Gleichermaßen weisen die Patienten mit VHF gegenüber den Patienten ohne VHF eine verzögerte atriale Erregungsausbreitung in Form einer verbreiterten P-Welle (118 ms bei Patienten mit VHF, 110 ms bei Patienten ohne VHF) auf. Zusätzlich haben die Probanden mit VHF eine erhöhte Kammerfrequenz (Patienten mit VHF 65 bpm, Patienten ohne VHF 60 bpm) sowie eine verlängerte Kammerkomplexdauer (QRS-Dauer, mit VHF 96 ms, ohne VHF 94 ms). So kann beim VHF-Kollektiv ein durchschnittlich längeres QTc-Intervall von 431 ms gegenüber den Probanden ohne VHF (419 ms) detektiert werden.

Elektrokardiogramm	Gesamt (n = 4998)	Ohne VHF (n = 4837)	Mit VHF (n = 161)
PR-Intervall (ms)	158 (144/174)	158 (144/174)	171 (154/187)
P-Welle Dauer (ms)	110 (100/118)	110 (100/118)	118 (108/128)
Herzfrequenz (bpm)	60 (54/67)	60 (54/67)	65 (55/75)
QRS-Dauer (ms)	94 (88/102)	94 (88/102)	96 (90/110)

Tab. 3: Elektrokardiographische intermediäre Phänotypen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von VHF

Werte sind Median mit 25./75. Perzentile. ms: Millisekunden; BPM: beats per minute (Herzfrequenz).

3.3 Vorhofflimmern und Echokardiographie

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung zeigt sich, dass die Patienten mit VHF einen durchschnittlich vergrößerten linken Vorhof (24 cm² bei Patienten mit VHF, 18 cm² bei Patienten ohne VHF) und eine hypertrophierte linke Kammer (235 g mit VHF, 162 g ohne VHF, siehe Tabelle 4) aufweisen.

Die Ejektionsfraktion (EF) ist bei den Teilnehmern mit VHF mit 62 % im Verhältnis zu Nicht-VHF-Patienten mit 64 % vermindert. Es zeigen sich keine klinisch relevanten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen in den intermediären Phänotypen der diastolischen Funktion (E/A, E/E', Dezelerationszeit).

Echokardiogramm	Gesamt (n = 4998)	Ohne VHF (n = 4837)	Mit VHF (n = 161)
Größe linker Vorhof (cm ²)	18 (16/21)	18 (16/21)	24 (19/28)
E/A	1,05 (0,83/1,28)	1,05 (0,83/1,28)	1,03 (0,80/1,33)
E/E'	6,98 (5,74/8,67)	6,97 (5,73/8,64)	7,71 (6,12/9,78)
Dezelerationszeit (ms)	222 (193/254)	222 (193/254)	218 (176/257)
Linksventrikuläre EF (%)	64 (60/68)	64 (60/68)	62 (57/67)

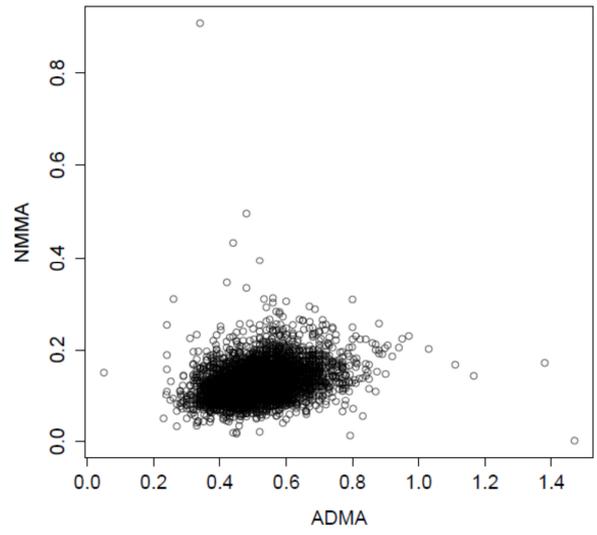
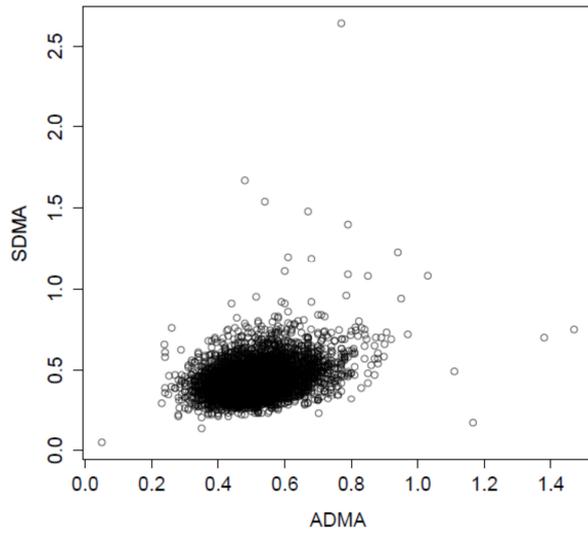
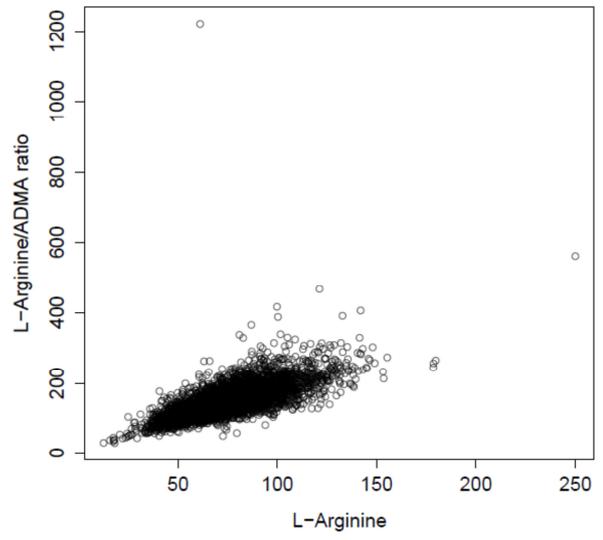
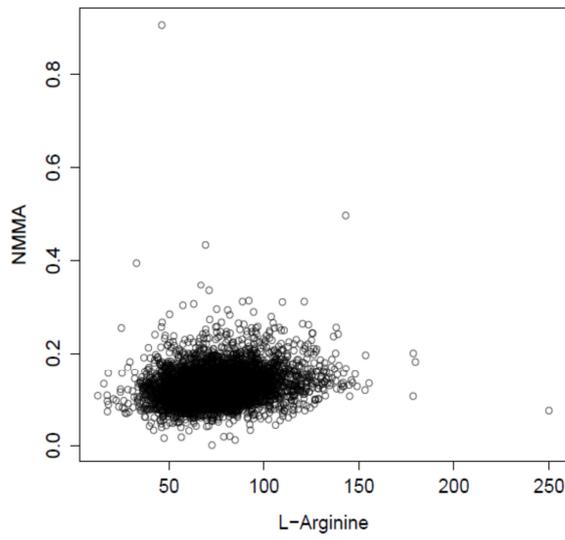
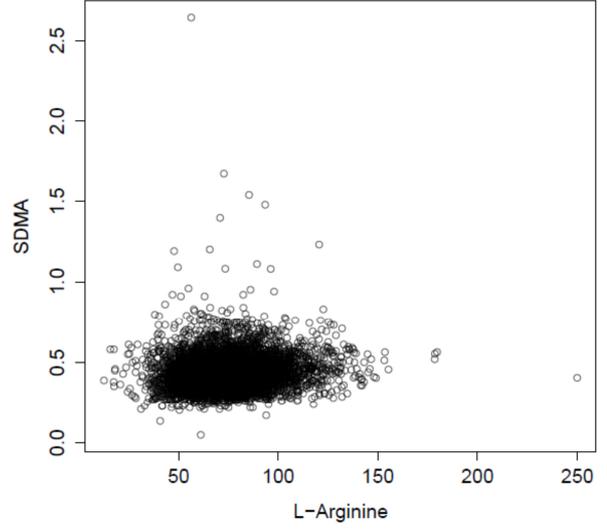
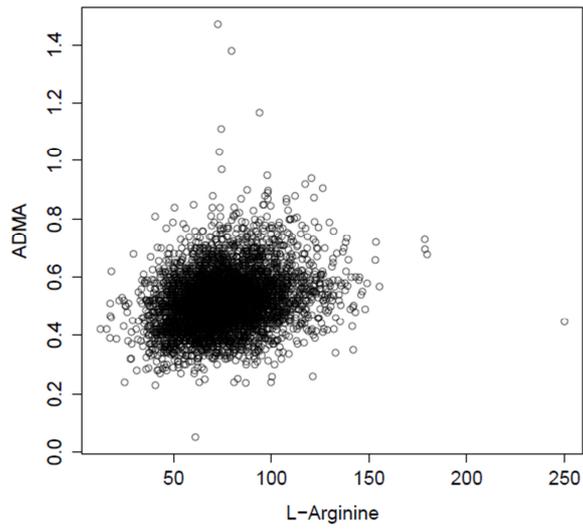
Tab. 4: Echokardiographische intermediäre Phänotypen

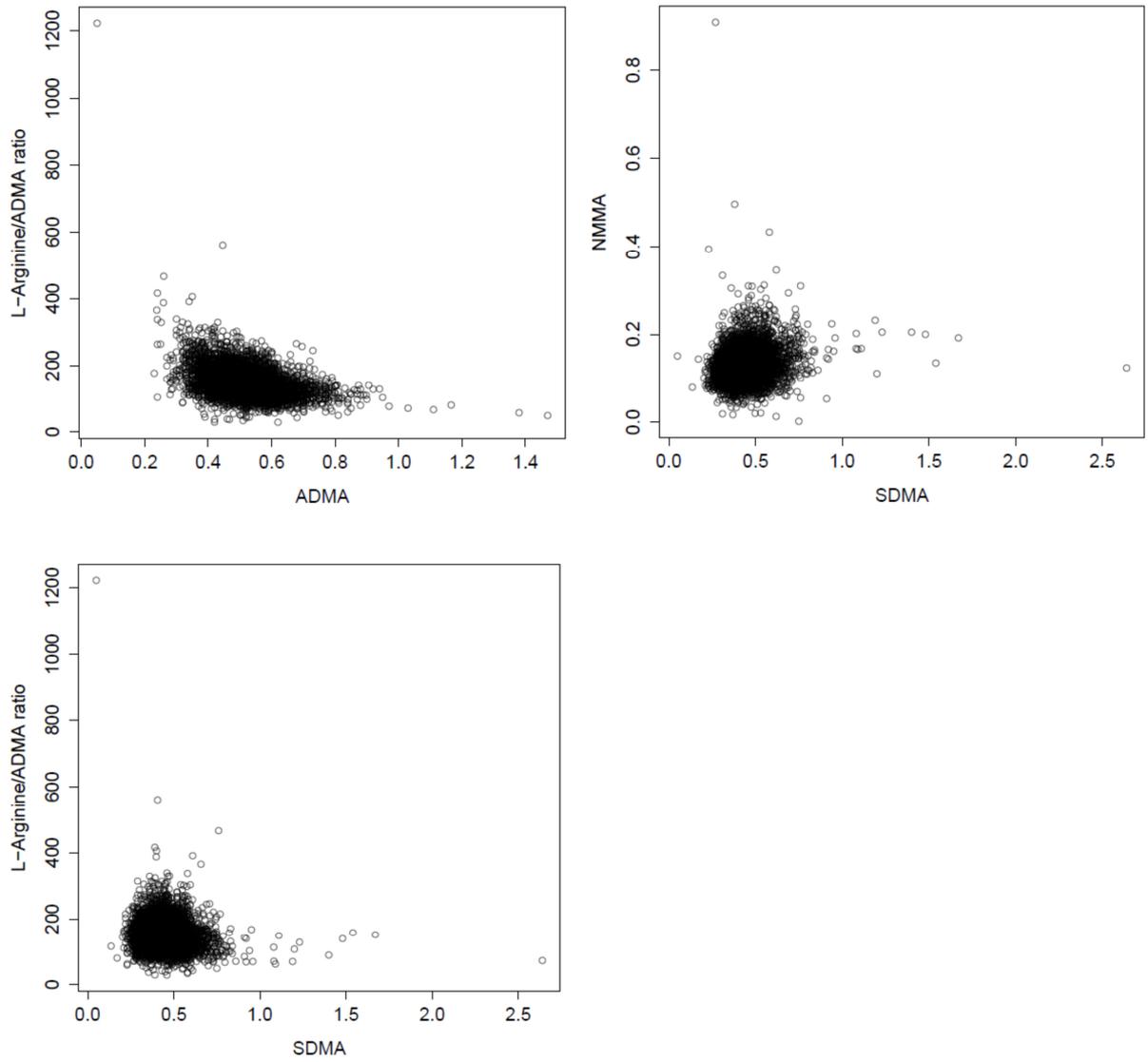
Werte sind Median mit 25./75.Perzentile. E/A: spätdiastolische aktive LV-Füllung; E/E': frühdiaastolische passive LV-Füllung; EF: Ejektionsfraktion.

3.4 Arginin-Derivate im Vergleich

3.4.1 Streudiagramme

Die Streudiagramme erlauben einen ersten Eindruck über die Abhängigkeitsstruktur der Arginin-Derivate untereinander. In den meisten Diagrammen – mit Ausnahme des Streudiagramms für L-Arginin sowie für den L-Arginin/ADMA-Index – fallen Cluster (Ballungen) auf. In diesen Clustern ist ein linearer Anstieg des L-Arginin/ADMA-Index mit steigendem L-Arginin zu erkennen. Die Streudiagramme für ADMA und den L-Arginin/ADMA-Index zeigen mit steigendem ADMA einen abfallenden L-Arginin/ADMA-Index, jedoch ohne die Nulllinie zu erreichen (siehe Diagramm 1).





Diagr.1: Die verschiedenen Arginin-Derivate in Korrelation

3.4.2 Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen den Biomarkern bediente man sich zusätzlich des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman's Rho, r_s).

L-Arginin zeigt einen schwachen Zusammenhang zu ADMA ($r_s = 0,26$; $p < 0,0001$) und NMMA ($r_s = 0,22$; $p < 0,0001$). Zum L-Arginin/ADMA-Index kann hingegen ein deutlicher Zusammenhang beobachtet werden ($r_s = 0,75$; $p < 0,0001$).

ADMA weist zu SDMA ($r_s = 0,30$; $p < 0,0001$) und NMMA ($r_s = 0,34$; $p < 0,0001$) einen schwachen positiven Zusammenhang und zum L-Arginin/ADMA-Index einen schwachen negativen Zusammenhang ($r_s = -0,39$; $p < 0,0001$) auf.

Biomarker	Spearman's Rho	p-Wert
L-Arginin und ADMA	0,26	<0,0001
L-Arginin und SDMA	0,13	< 0,0001
L-Arginin und NMMA	0,22	< 0,0001
L-Arginin und L-Arginin/ADMA-Index	0,75	< 0,0001
ADMA und SDMA	0,30	< 0,0001
ADMA und NMMA	0,34	< 0,0001
ADMA und L-Arginin/ADMA-Index	-0,39	< 0,0001
SDMA und NMMA	0,19	< 0,0001
SDMA und L-Arginin/ADMA-Index	-0,08	< 0,0001

Tab. 5: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s)

3.5 Arginin-Derivate im Zusammenhang mit den intermediären Phänotypen

3.5.1 Arginin-Derivate und elektrokardiographische Phänotypen

Im Rahmen einer multivariabel-adjustierten linearen Regressionsanalyse von Arginin-Derivaten im Kontext mit den elektrokardiographischen Phänotypen zeigen die Ergebnisse für die Kammerfrequenz (beta -0,58; 95 % Konfidenzintervall [KI] -0,95/-0,20; $p = 0,0003$) und für die QRS-Dauer (beta 0,49; 95 % KI 0,02/0,96; $p = 0,036$) negative Korrelationen zu L-Arginin. Hingegen korreliert die QTc-Zeit positiv mit L-Arginin (beta -1,47; 95 % KI -2,34/-0,61; $p < 0,0001$) und stellt gleichzeitig unter den signifikanten elektrokardiographischen Phänotypen den stärksten Zusammenhang zu L-Arginin dar (siehe Tabelle 6). Hinsichtlich ADMA kann weder für das PR-Intervall, für die Dauer der P-Welle, für die Kammerfrequenz noch für die QRS-Dauer eine statistisch signifikante Relation beobachtet werden. Gleiches gilt für NMMA.

Das SDMA ist lediglich im Hinblick auf die Kammerfrequenz signifikant ($p = 0,0029$) und zeigt eine negative Assoziation (beta -0,51; 95 % KI -0,90/-0,13).

Der L-Arginin/ADMA-Index zeigt negative Zusammenhänge zur Kammerfrequenz (beta = -0,39; 95 % KI -0,77/-0,02; $p = 0,0356$) und der QTc-Zeit (beta = -1,48; 95 % KI -2,35/-0,61; $p < 0,0001$). Hingegen findet sich für das PR-Intervall, für die P-Welle und die QRS-Dauer keine Assoziation zu dem L-Arginin/ADMA-Index.

Intermediäre Phänotypen	Biomarker	Model R ²	Beta per SD (95 % KI)	p-Wert
PR-Intervall	L-Arginin	0,13	0,44 (-0,44/1,31)	1
	ADMA	0,13	0,58 (-0,29/1,46)	0,43
	SDMA	0,13	0,40 (-0,50/1,30)	1
	NMMA	0,13	0,26 (-0,61/1,12)	1
	L-Arginin/ADMA-Index	0,13	0,08 (-0,80/0,96)	1
P-Wellendauer	L-Arginin	0,18	-0,23 (-0,69/0,22)	0,93
	ADMA	0,18	0,23 (-0,22/0,69)	0,95
	SDMA	0,18	0,46 (-0,01/0,92)	0,06
	NMMA	0,18	0,28 (-0,17/0,73)	0,56
	L-Arginin/ADMA-Index	0,18	-0,35 (-0,81/0,11)	0,25
Kammerfrequenz	L-Arginin	0,12	-0,58 (-0,95/-0,20)	0,0003
	ADMA	0,12	-0,27 (-0,65/0,10)	0,31
	SDMA	0,12	-0,51 (-0,90/-0,13)	0,0029
	NMMA	0,12	-0,26 (-0,63/0,11)	0,35
	L-Arginin/ADMA-Index	0,12	-0,39 (-0,77/-0,02)	0,036
QRS-Dauer	L-Arginin	0,16	0,49 (0,02/0,96)	0,036
	ADMA	0,16	0,35 (-0,12/0,82)	0,28
	SDMA	0,16	0,15 (-0,34/0,63)	1
	NMMA	0,16	0,01 (-0,45/0,47)	1

	L-Arginin/ADMA-Index	0,16	0,29 (-0,19/0,76)	0,59
QTc-Zeit	L-Arginin	0,16	-1,47 (-2,34/-0,61)	< 0,0001
	ADMA	0,16	0,15 (-0,71/1,02)	1
	SDMA	0,16	-0,01 (-0,90/0,88)	1
	NMMA	0,16	-0,57 (-1,43/0,28)	0,42
	L-Arginin/ADMA-Index	0,16	-1,48 (-2,35/-0,61)	< 0,0001

Tab. 6: Multivariabel-adjustierte lineare Regressionsanalyse von Arginin-Derivaten in Bezug auf elektrokardiographische intermediäre Phänotypen in der Gesamtkohorte

Multivariable Regressionsanalyse, adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, BMI, systolischer Blutdruck, antihypertensive Medikation, Diabetes, Rauchen, Familienanamnese hinsichtlich Myokardinfarkt, Dyslipidämie sowie Herzinsuffizienz). SDMA und der L-Arginin/ADMA-Index wurden für die Analysen logarithmiert. Die p-Werte wurden für fünf Tests nach Bonferroni angepasst. SD: Standardabweichung; KI: Konfidenzintervall; R²: Determinationskoeffizient.

3.5.2 Arginin-Derivate und echokardiographische Phänotypen

ADMA und NMMA stehen in ähnlich bedeutender statistisch relevanter Relation zur linksventrikulären Masse (ADMA: beta 1,86; 95 % KI 0,49/3,24; p = 0,0023; NMMA: beta 1,82; 95 % KI 0,47/3,17; p = 0,0027).

Hinsichtlich des SDMA können signifikante Werte für den Durchmesser des linken Vorhofs (beta 0,16; 95 % KI 0,04/0,28; p = 0,0034) sowie für die linksventrikuläre EF (beta 0,25; 95 % KI 0,01/0,49; p = 0,0336) konstatiert werden.

Im Rahmen der echokardiographischen Phänotypen wird deren Varianz zu 14 % (linksventrikuläre EF), zu 30 % (Größe linker Vorhof) und zu 44 % (linksventrikuläre Masse) durch die Arginin-Derivate erklärt.

Für das L-Arginin sowie für den L-Arginin/ADMA-Index kann bezüglich der echokardiographischen Phänotypen kein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden (siehe Tabelle 7).

Intermediäre Phänotypen	Biomarker	Model R ²	Beta per SD (95 % KI)	p-Wert
Größe linker Vorhof	L-Arginin	0,30	-0,04 (-0,15/0,08)	1
	ADMA	0,30	0,08 (-0,03/0,20)	0,32
	SDMA	0,30	0,16 (0,04/0,28)	0,0034
	NMMA	0,30	0,05 (-0,09/0,14)	1
	L-Arginin/ADMA-Index	0,30	-0,06 (-0,18/0,06)	0,91
Linksventrikuläre EF	L-Arginin	0,14	-0,03 (-0,26/0,21)	1
	ADMA	0,14	-0,01 (-0,24/0,22)	1
	SDMA	0,14	0,25 (0,01/0,49)	0,034
	NMMA	0,14	0,04 (-0,19/0,27)	1
	L-Arginin/ADMA-Index	0,14	-0,06 (-0,30/0,17)	1
Linksventrikuläre Masse	L-Arginin	0,44	0,34 (-1,03/1,72)	1
	ADMA	0,44	1,86 (0,49/3,24)	0,0023
	SDMA	0,44	1,28 (-0,13/2,69)	0,09
	NMMA	0,44	1,82 (0,47/3,17)	0,0027
	L-Arginin/ADMA-Index	0,44	-0,74 (-2,12/0,64)	0,85

Tab. 7: Multivariabel-adjustierte lineare Regressionsanalyse der Arginin-Derivate in Bezug auf echokardiographische intermediäre Phänotypen in der Gesamtkohorte

Multivariable Regressionsanalyse, adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, BMI, systolischer Blutdruck, antihypertensive Medikation, Diabetes, Rauchen, Familienanamnese hinsichtlich Myokardinfarkt, Dyslipidämie sowie Herzinsuffizienz). SDMA und der L-Arginin/ADMA-Index wurden für die Analysen logarithmiert. Die p-Werte werden für fünf Tests nach Bonferroni angepasst. SD: Standardabweichung; KI: Konfidenzintervall; R²: Determinationskoeffizient; EF: Ejektionsfraktion.

3.6 Arginin-Derivate und Vorhofflimmern

Die L-Arginin-Derivate ADMA, SDMA und NMMA und der L-Arginin/ADMA-Index – adjustiert nach Alter und Geschlecht – zeigen statistische Zusammenhänge mit dem Auftreten von VHF (siehe Tabelle 8).

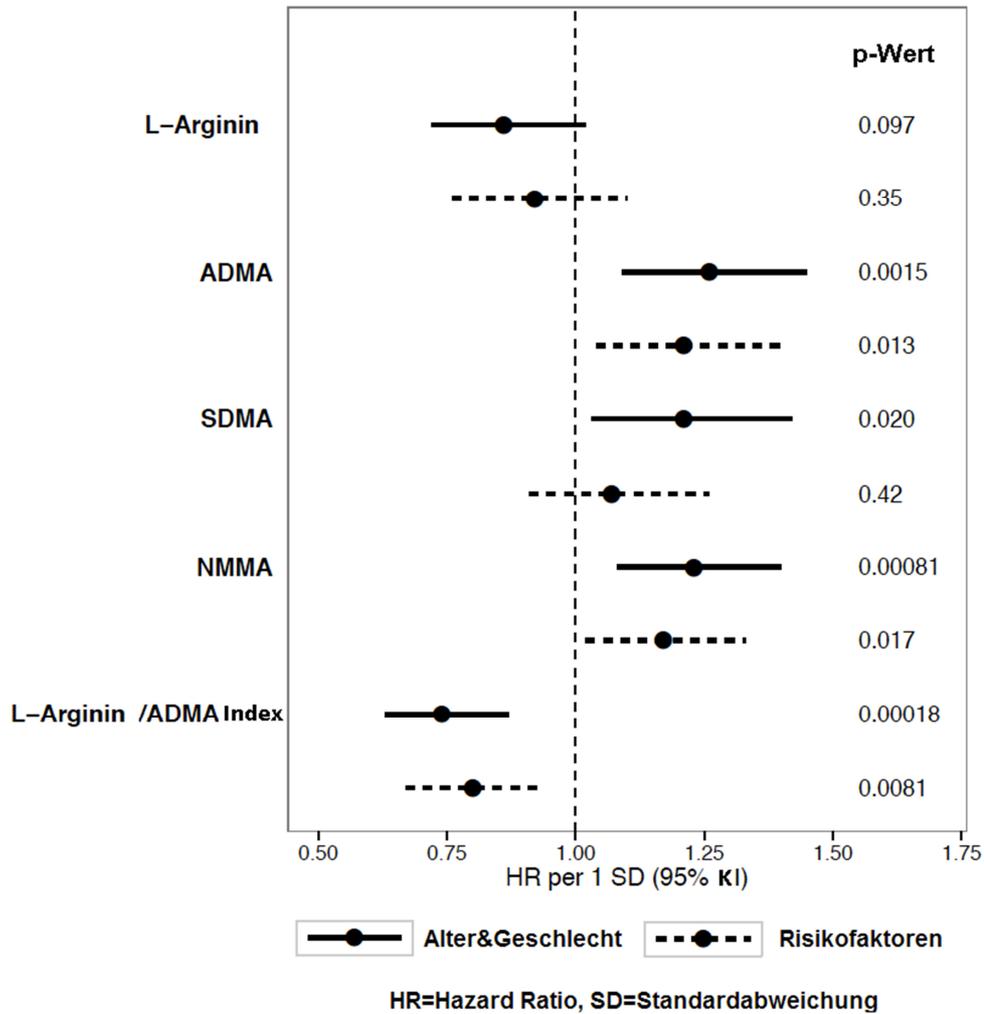
L-Arginin zeigt hingegen keinen signifikanten Zusammenhang zu VHF ($p = 0,0973$).

Biomarker	n	OR (KI)	OR per SD (KI)	p-Wert
L-Arginin	4829	0,99 (0,98/1)	0,86 (0,73/1,03)	0,0973
ADMA	4829	10,25 (2,44/43,05)	1,26 (1,09/1,45)	0,0015
SDMA	4829	4,32 (1,47/12,71)	1,18 (1,05/1,34)	0,0079
NMMA	4829	228,11 (9,52/5467,94)	1,23 (1,09/1,39)	< 0,0001

Tab. 8: Übersicht der logistischen Regression für VHF

Logistische Regression, adjustiert nach Alter und Geschlecht. n gibt die absolut betrachtete Anzahl der Probanden an. OR (KI) steht für Odds Ratio mit dem Konfidenzintervall und OR per SD (KI) für Odds Ratio pro Standardabweichung mit dem Konfidenzintervall.

Diagramm 2 zeigt ergänzend zu Tabelle 8, dass auch nach Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren (gestrichelte Linie) ein signifikanter Zusammenhang zwischen ADMA, NMMA und dem L-Arginin/ADMA-Index sowie der Manifestation von VHF festzustellen ist. Bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass sich nach Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren die Stärke der Assoziation abschwächt und sich die Schätzer Richtung 1 bewegen.



Diagr. 2: Odds Ratio für VHF, adjustiert nach Alter und Geschlecht sowie kardiovaskulären Risikofaktoren

Multivariabel-adjustierte Hazard Ratios per Standardabweichung (HR per SD) für Arginin-Derivate in Bezug auf VHF. Kontinuierliche Linien zeigen alters- und geschlechtsadjustierte Werte. Gestrichelte Linien zeigen Risikofaktoren-adjustierte Werte (einschließlich Alter, Geschlecht, BMI, systolischer Blutdruck, antihypertensive Medikation, Diabetes mellitus, Rauchen, positive Familienanamnese hinsichtlich eines Myokardinfarkts, Dyslipidämie sowie Herzinsuffizienz).

4 Diskussion

Gut etablierte klinische Risikofaktoren für VHF sind neben dem Alter und dem Geschlecht insbesondere Übergewicht (erhöhter BMI), arterielle Hypertonie sowie kardiovaskuläre Grunderkrankungen, bei letzteren vor allem Herzvitien und die Herzinsuffizienz. So liegt VHF zu 70 % bei den organischen Herzerkrankungen vor (Burstein und Nattel 2008). Da diese Risikofaktoren jedoch bei Weitem nicht alle Fälle von VHF erklären können, wird die Notwendigkeit apparent, die Vorhersagbarkeit und das grundsätzliche Verständnis von VHF zu verbessern und klinisch einfach und günstig zu bestimmende Marker einzuführen – zumal die aktuell vorhandenen pharmakologischen Behandlungen limitierte Effizienz haben (Carnes et al. 2001).

Ein Marker, der zuletzt das Potenzial zu haben schien, die Risikoklassifizierung von VHF zu optimieren, war das Arginin sowie seine chemischen Verwandten, hier insbesondere das ADMA.

In der vorliegenden Arbeit konnten in multi-variabel adjustierten Analysen moderate positive Zusammenhänge von ADMA und NNMA mit prävalentem VHF konstatiert werden. Ein inverser Zusammenhang mit VHF konnte indes für den L-Arginin/ADMA-Index evaluiert werden. Für die elektrokardiographischen intermediären Phänotypen Herzfrequenz, Überleitungszeit, QRS- sowie QTc-Dauer und für eine Reihe an echokardiographischen Variablen, darunter etwa die Größe des linken Vorhofs, die E/E', die linksventrikuläre EF oder die linksventrikuläre Masse, konnten hingegen nur schwache Zusammenhänge mit VHF herausgearbeitet werden; am ehesten konnte, aufgrund einer vergleichsweise überschaubaren Anzahl an Individuen, die Analyse der Untergruppe mit manifestem VHF den Zusammenhang nicht nachhaltig untermauern.

Die Relationen zwischen Arginin-Derivaten und VHF konnten bislang nur unvollständig durch intermediäre Phänotypen erklärt werden. Auch die Analyse und Bewertung der GHS-generierten Daten vermag den Zusammenhang zwischen zirkulierenden Arginin-Derivaten und VHF auf Grundlage der elektro- und echokardiographischen intermediären Phänotypen nicht abschließend bestimmen.

Gleichwohl werden hier Ergebnisse einer genau definierten, populationsbasierten Kohorte vorgelegt, die auch künftig einen Beitrag zur weiteren Klärung der Volkskrankheit VHF leisten werden.

De Gennaro und weitere Autoren (2009) beschreiben, dass ADMA akut die kardiale Auswurfleistung beeinflusst und aktiv zur Verschlechterung sowohl des linkskardialen Remodelings als auch der postischämischen ventrikulären Kontraktilität bei Patienten beiträgt.

Die hier beschriebenen Observationen stimmen nicht exakt mit den Ergebnissen der Allgemeinbevölkerung bei der GHS überein, da die Arginin-Derivate in den vorliegenden Ergebnissen keinen wesentlichen Zusammenhang zur EF zeigen.

Weiterhin untersuchten Zoccali et al. (2007) die Beziehung zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und ADMA-Konzentrationen im Plasma in einer Kohorte mit Hämodialyse (n = 225) und fanden heraus, dass die Akkumulation von ADMA bei Patienten mit chronischem Nierenversagen einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten darstellt.

Zurückliegende Studien konnten derweil zeigen, dass NO für die kardiovaskuläre Homöostase eine elementare Rolle spielt (Barouch et al. 2002, Vallance et al. 1992).

Schnabel et al. (2010) konnten unterdessen erfolgreich den Nachweis dafür erbringen, dass weitere Biomarker, die mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht werden – etwa die Glutathion-Peroxidase-1 oder auch die Myeloperoxidase – nicht mit prävalentem VHF korrelieren, auch nicht nach Abgleich kardiovaskulärer Risikofaktoren.

Gleichwohl wurde hier das Hormon B-natriuretisches Peptid (BNP) – und weniger das Hormon atriales natriuretisches Peptid – als der stärkste Prädiktor hinsichtlich der Inzidenz von VHF beschrieben, der am ehesten mit der linksatrialen Größe und der ventrikulären EF korrelierte. Bezüglich BNP scheint der limitierende Faktor jedoch zu sein, dass es keine Unterscheidung zwischen konkomitanten kardiovaskulären Zuständen und Komorbiditäten zulässt (Kirchhof et al. 2015).

Dies legt jedoch die Vermutung nahe, dass künftig spezifischere Zusammenhänge zwischen Arginin-Derivaten und VHF für die beobachteten Assoziationen in Betracht gezogen werden müssen.

Vorgenannte Ergebnisse könnten indes dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen ADMA und VHF und weiteren assoziierten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz) genauer zu determinieren.

Diese Resultate werden durch die vorliegende Arbeit gestützt, indem signifikante Korrelationen von prävalentem VHF und ADMA sowie NMMA – selbst nach Adjustierung hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren – determiniert werden konnten.

Während SDMA und der L-Arginin/ADMA-Index mit der Größe des linken Vorhofs korrelierten, konnte bei keinem der weiteren Arginin-Derivate ein objektivierbarer Zusammenhang zu der atrialen Erregungsleitfähigkeit, welche im EKG durch die Dauer der P-Welle bzw. die Dauer des PQ-Intervalls repräsentiert wird, observiert werden.

Bezugnehmend auf die existierende Literatur zu dieser Thematik konnte gezeigt werden, dass frühes atriales Pacing die ADMA-Konzentration erhöht und die Dysfunktion der endothelialen NO-Synthase verstärkt. Richir und Kollegen (2009) beschreiben, dass Infusionen mit ADMA schädigende Veränderungen hinsichtlich Herzfrequenz und Blutdruck in der Hämodynamik induzieren.

Das Ziel dieser Studie war es, die Effekte von geringem L-Arginin in Verbindung mit hohem ADMA auf Hämodynamik und Organperfusion zu evaluieren. Bekannt ist auch die sich hieraus ergebende pathophysiologische Konsequenz, dass es bei gesteigerten Konzentrationen von ADMA zu einer Störung der vaskulären Integrität und Funktion mit einer konsekutiven Zunahme der Steifheit der arteriellen Gefäßwandung kommt (Weber et al. 2007).

Richir et al. (2009) beschreiben weiter, dass sowohl der MAP als auch der systemische Widerstand nach Infusion mit ADMA steigen, die Organperfusion in Nieren, Milz und Leber sinken und niedrige L-Arginin-Level in Kombination mit hohen ADMA-Level die Hämodynamik deutlich aggravieren. Diese Daten legen nahe, dass

eine verringerte NO-Produktion in das Auftreten von Organversagen involviert sein könnte.

Bei der Blutdruck- und EKG-Analyse von männlichen Hunden konnte belegt werden, dass die Hemmung des L-Arginin Methylesters der NOS zu einer Verlängerung der elektrokardiographischen Intervalle führt (Ward et al. 2012). Daten aus Untersuchungen am Menschen sind dagegen bislang nicht final überzeugend (La Fontaine et al. 2013).

Auch im Rahmen der vorliegenden Daten kann bestätigt werden, dass SDMA sowohl mit der Vorhoferregung (P-Welle) als auch mit der atrioventrikulären Überleitungszeit in positive Korrelation zu bringen ist. Schnabel et al. (2010) und Cheng et al. (2009) beschreiben ferner, dass ein verlängertes PR-Intervall mit einem erhöhten Risiko für VHF assoziiert ist. Kolek et al. (2014) sowie Pfeufer et al. (2010) bewerten das PR-Intervall als ein klares genetisches Merkmal.

Dass der QRS-Komplex als elektrokardiographische Repräsentanz der Kammerkontraktion bei Betrachtung der Phänotypen weniger pathologische Relevanz hat und darum geringere Beachtung erfährt, basiert auf der Erkenntnis, dass VHF eine Erkrankung ist, die über eine atriale Arrhythmie erheblichen Einfluss auf die geordnete Vorhofkontraktion hat.

In einer bereits geraume Zeit zurückliegenden Betrachtung aus dem Jahre 2009 waren Plasmakonzentrationen von ADMA und L-Arginin nicht mit echokardiographischen M-Mode-Messungen in Zusammenhang zu bringen (Lieb et al. 2009). Lieb und Kollegen (2009) haben in ihrer Studie mit multivariablen Modellen (n = 1919) ADMA und L-Arginin in Zusammenhang zur echokardiographisch gemessenen linksventrikulären Masse und Größe gesetzt. Sie fanden hierbei heraus, dass weder ADMA noch L-Arginin oder deren Index mit der linksventrikulären Masse sowie Größe assoziiert waren. ADMA war lediglich zur linksatrialen Größe bei Übergewichtigen assoziiert. Insgesamt waren weder Plasma-ADMA noch die L-Arginin-Konzentration zur kardialen Struktur oder Funktion verlinkt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnisse in Bezug auf echokardiographische Determinanten lassen durchaus Rückschlüsse der Arginin-Derivate ADMA, SDMA und NMMA auf die linksventrikuläre Masse zu, wohingegen weder L-Arginin noch der

L-Arginin/ADMA-Index einen signifikanten Zusammenhang zu echokardiographischen Variablen zulassen. Fazitativ bleibt festzuhalten, dass die Arginin-Derivate unterschiedliche Korrelationen in voneinander abweichender Intensität zeigen. Diese Einschätzung deckt sich mit der Beobachtung von Vallance und Leiper (2004), die bei 12 männlichen Probanden mit Nierenversagen Plasma-ADMA-Level bestimmt haben und diese als unabhängiges Korrelat der linksventrikulären EF deuten. Sie vergleichen in einer randomisierten Doppelblindstudie die Effekte von intravenös appliziertem niedrigdosiertem ADMA mit der Placebo-Gruppe in Bezug auf Herzfrequenz, Blutdruck, Herzminutenvolumen sowie den systemischen Gefäßwiderstand in Ruhe und unter Aktivität. Neben der Bestätigung der Annahme, dass ADMA sowohl den MAP als auch den systemischen Gefäßwiderstand steigert, observierten sie weiterhin, dass ADMA eine inverse Beziehung zur linksventrikulären EF hat und interessanterweise die schnellste Änderung in der Herzfrequenz verursachte – und dies noch lange, bevor sich der Blutdruck änderte.

Ward et al. (2012) beschreiben hingegen, dass nach Gabe von NMMA vor allem ein statistisch signifikanter Anstieg von Blutdruck und Pulsamplitude beobachtet werden konnte.

Echokardiographische Assoziationen mit der linksventrikulären Masse und linksatrialen Dimension, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, waren unterdessen nicht so stark ausgeprägt, punktuell jedoch statistisch signifikant. Derartige Korrelate könnten von erhöhten Arginin-Derivaten über die kardiale Struktur und das elektrische Remodeling auf den pathophysiologischen Ursprung von VHF hindeuten.

ADMA-Konzentrationen können künstlich erhöht werden. So hat die ADMA-Konzentration bei Patienten (n = 60) mit persistierendem VHF nach Kardioversion zugenommen und die eNOS wurde herunter reguliert (Goette et al. 2012).

Gleichzeitig hat die Reduktion von oxidativem Stress positive Effekte auf die kardiale Struktur und Funktion. Ein therapeutisches Ziel könnte künftig die (biochemische) Modifikation von Arginin-Derivaten in Form von Medikamenten oder Arginin-Analoga sein, um die Risikowahrscheinlichkeit für die Erst- oder Re-Manifestation von VHF zu

minimieren. Gegenwärtig jedoch fehlt es an der nötigen evidenzbasierten Kausalität, über eine Reduktion von ADMA eine Auftrittsreduktion von VHF zu erreichen.

Nachfolgend soll eine Annäherung an die klinisch divergierenden Einflüsse von ADMA und SDMA erfolgen, die der Vermutung zugrunde liegt, dass es für beide Moleküle vor dem Hintergrund ihrer Potenz als Biomarker in VHF verschiedene Schwerpunkte zu geben scheint.

Beide sind Analoga der Aminosäure Arginin, biochemisch also strukturverwandt (siehe Abb. 7–9); beide beeinflussen in nicht unerheblichem Maße den NO-Stoffwechsel.

Jedoch scheinen beide Derivate durch eben jenen marginalen Unterschied ihres biochemischen Aufbaus auch verschiedene pathophysiologische Konsequenzen zu haben. Erhöhte Level an SDMA etwa haben – noch eher als das bei anderen Arginin-Derivaten zu beobachten ist – einen unmittelbaren Einfluss auf die elektrische Leitfähigkeit am Herzen bzw. auf das Reizbildungs- und Leitungssystem.

Gleichwohl ist bekannt, dass ADMA über eine direkte Inhibition des NO-Synthase-Komplexes eine Störung der endothelialen Integrität zu verursachen vermag.

SDMA wirkt etwas abweichend, in dem es bei seinem Shift nach intrazellulär mit L-Arginin und hCAT (humaner kationischer Aminosäure-Transporter) – einem Transportmolekül – in Wechselbeziehung tritt und erst hierüber die Formation von NO stört (Closs et al. 1997).

Betrachtet man additiv nun noch das NMMA, so stellt man fest, dass dieses am ehesten einen Zusammenhang zur E/E' gestattet und damit ein Abbild der diastolischen Funktion darstellt.

Die Prävalenz von diagnostiziertem VHF ist in den vergangenen Jahren gestiegen (Wilke et al. 2013, Lip et al. 2012) und wird laut Schätzungen innerhalb der EU in den nächsten 10 Jahren weiter zunehmen (Chugh et al. 2014).

Aus diesem Grund ist es von elementarer Bedeutung, eine effektive Prävention für VHF zu etablieren und die klinische Versorgung und deren Qualität angesichts teils stark divergierender Therapiestandards zu vereinheitlichen. Denn klar scheint in diesem Zusammenhang zu sein, dass einheitliche Versorgungsstandards eine

bessere Therapie gewährleisten.

Nur bei rund 60 % der Patienten mit VHF liegen modifizierbare Risikofaktoren vor (Huxley 2011). Auch daher gilt VHF als heterogene Krankheit in Bezug auf Ätiologie, Pathophysiologie, klinische Präsentation und Outcome (de Vos et al. 2010).

Aufgrund der Heterogenität dieser Volkskrankheit hat die ESC 2015 einen (bis 2020 geltenden) insgesamt 18 Punkte umfassenden Forschungsschwerpunkt gebildet. Darunter fällt die Evaluation neuer Parameter wie etwa Blut- und/oder EKG-Parameter sowie die Identifizierung neuer VHF-Subtypen und Risikogruppen, basierend auf Bildgebung und EKG. Dazu sollen die Datenbanken bestehender Proben und Kohortenstudien intensiv genutzt werden (vorliegender Bericht schildert die Ergebnisse der fünften EHRA (Atrial Fibrillation Network/European Heart Rhythm Association consensus conference in Nizza am 22./23.1.2015).

Das mittel- bis langfristige Ziel muss also sein, Krankheitsmechanismen zu erkennen, um das individuelle Erkrankungsrisiko eines Menschen für VHF besser abschätzen zu lernen.

Dies auch insbesondere vor dem Hintergrund, dass gegenwärtig kein belastbarer Beweis für die Vermutung existiert, dass eine Reduktion von ADMA oder eine Modulation anderer Arginin-Derivate die Auftretenswahrscheinlichkeit von VHF minimieren kann und die Vorhersagbarkeit zur Entstehung zu optimieren imstande ist.

5 Zusammenfassung

Der exakte pathophysiologische Mechanismus von VHF ist bislang trotz steigender Prävalenz und hoher gesundheitsökonomischer Relevanz in der Allgemeinbevölkerung weitestgehend unklar. Ebenso wenig geklärt ist die Rolle zirkulierender Arginin-Derivate, denen bereits seit Jahren eine potenzielle Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser häufigsten Herzrhythmusstörung zudedacht wird. Es wurde vermutet, dass oxidativer Stress ebenso wie zirkulierende Arginin-Derivate mit VHF assoziiert sein könnten. Diese Metabolite können laborchemisch bestimmt werden und ermöglichen daher einen epidemiologischen Ansatz.

Anspruch der vorliegenden Arbeit war die weiterführende Evaluation eines möglichen Zusammenhangs zwischen L-Arginin und Arginin-Derivaten, insbesondere ADMA mit VHF, um hieraus mögliche Therapieansätze abzuleiten.

In der populationsbasierten GHS konnten moderate Zusammenhänge für L-Arginin, SDMA und den L-Arginin/ADMA-Index hinsichtlich der Kammerfrequenz und zusätzlich für L-Arginin und den L-Arginin/ADMA-Index zum frequenzkorrigierten QT-Intervall beobachtet werden (Bonferroni-korrigierte Regressionsanalysen).

SDMA konnte in echokardiographischen Analysen in Verbindung zum linksatrialen Durchmesser und elektrokardiographisch zur PQ-Zeit gebracht werden, wohingegen ADMA sowie NMMA mit der linksventrikulären Masse korrelierten. ADMA und NMMA waren mit prävalentem VHF assoziiert.

Die Auswertung der vorliegenden Daten erlaubt es, einen moderaten Zusammenhang zwischen zirkulierenden Arginin-Metaboliten sowie intermediären elektro- und echokardiographischen Phänotypen einerseits und VHF andererseits herzustellen. Die Assoziationen waren jedoch schwach und von fraglicher klinischer Relevanz. Auch nach dieser Arbeit bleibt die Pathophysiologie von L-Arginin und ADMA in Bezug auf VHF weitestgehend ungeklärt. Weitere experimentelle Daten und die Identifizierung von Risikofaktoren werden daher künftig notwendig sein, um die genaue Rolle der Arginin-Derivate im pathophysiologischen Kontext mit VHF zu

erläutern. Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten liefern einen entscheidenden Stimulus hierfür.

Es ergibt sich ein vielversprechender epidemiologischer und wissenschaftlicher Ansatz, dessen Verfolgung beträchtliche potenzielle Auswirkungen nicht nur für das Gesundheitswesen, sondern für die Medizin allgemein und die mit VHF assoziierten Erkrankungen haben dürfte.

6 Abstract

The exact pathophysiological mechanism of Atrial Fibrillation (AF) has been largely unclear in spite of increasing prevalence and high health-economic relevance in the general population.

The role of circulating arginine derivatives, which have been thought to have a potential role in the development and maintenance of this most common cardiac arrhythmia, has also not been clarified. It was thought that oxidative stress as well as circulating arginine derivatives could be associated with AF. These metabolites can be determined by laboratory chemistry and therefore allow an epidemiological approach.

The aim of the present work was the further evaluation of a possible relationship between L-arginine and arginine derivatives, in particular ADMA with AF, in order to derive possible therapeutic approaches from these. In the population-based GHS, moderate correlations for L-arginine, SDMA and the L-arginine/ADMA-Index were observed with respect to the heart rate, additionally for L-arginine and the L-arginine/ADMA-Index to the frequency-corrected QT interval (Bonferroni corrected regression analysis).

SDMA was correlated with the left atrial diameter and electrocardiographically to the PQ time in echocardiographic analysis, while ADMA and NMMA correlated with the left ventricular mass. ADMA and NMMA were associated with prevalent AF.

The analysis of the available data makes it possible to establish a moderate relationship between circulating arginine metabolites as well as intermediate electro- and echocardiographic phenotypes on the one hand and AF on the other hand. However, the associations were weak and of questionable clinical relevance. Even after this work, the pathophysiology of L-arginine and ADMA with respect to AF

remains largely unexplained. Further experimental data and the identification of risk factors therefore will be necessary in the future to explain the exact role of the arginine derivatives in the pathophysiological context with AF. The data obtained in the study provide a decisive stimulus for this.

There is a promising epidemiological and scientific approach, the persecution of which is likely to have considerable potential effects not only in health care, but also in general medicine and AF-related diseases.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Gawad, M., Huynh, H., Brock, G. (1999). Experimental Chronic Renal Failure-Associated Erectile Dysfunction: Molecular Alterations in Nitric Oxide Synthase Pathway and IGF-I System. *Molecular Urology*, 3(2), 117–125.
- Abernathy, W. S., Willis, P. W. (1973). Thromboembolic complications of rheumatic heart disease. *Cardiovascular Clinics*, 5(2), 131–75.
- Andrew, P. J., Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43(3), 521–31.
- Baldus, S. (2012). Kardiovaskuläre Medizin am Herzzentrum der Uniklinik Köln - ein Ausblick. *Das Kölner Herzzentrum, Fachzeitschrift Für Den Arzt*.
- Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai I. A., Lemmon C. A., Burnett A. L., O'Rourke B, Rodriguez E. R., Huang P. L., Lima J. A., Berkowitz D. E., Hare, J. M. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 416(6878), 337–9.
- Barriales Alvarez, V., Morís de la Tassa, C., Sánchez Posada, I., Barriales Villa, R., Rubin López, J., de la Hera Galarza, J. M., Vara Manso J., Hevia Nava S., Cortina Llosa, A. (1999). The etiology and associated risk factors in a sample of 300 patients with atrial fibrillation. *Revista Española de Cardiología*, 52(6), 403–14.
- Bassenge, E., Schneider, H. T., Daiber, A. (2005). Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 130(50), 2904–9.
- Böger, R. H. (2014). The pharmacodynamics of L-arginine. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 20(3), 48–54.
- Böger, R. H. (2006). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Annals of Medicine*, 38(2), 126–36.
- Böger, R. H., Bode-Böger, S. M. (2000). Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(5), 539–45.
- Böger, R. H. & Bode-Böger, S. M. (1997). Endothelial dysfunction in peripheral arterial occlusive disease: from basic research to clinical use. *VASA. Zeitschrift Für Gefässkrankheiten*, 26(3), 180–4.
- Bonilla, I. M., Sridhar, A., Györke, S., Cardounel, A. J., Carnes, C. A. (2012). Nitric oxide synthases and atrial fibrillation. *Frontiers in Physiology*, 3, 105.
- Burstein, B., Nattel, S. (2008). Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(8), 802–9.
- Cai, H., Li, Z., Goette, A., Mera, F., Honeycutt, C., Feterik, K., Wilcox J. N., Dudley S. C. Jr., Harrison D. G., Langberg, J. J. (2002). Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation:

potential mechanisms for atrial thrombosis and stroke. *Circulation*, 106(22), 2854–8.

- Camm, a J., Kirchhof, P., Lip, G. Y. H., Schotten, U., Savelieva, I., Ernst, S., Van Gelder I. C., Al-Attar N., Hindricks G., Prendergast B., Heidbuchel H., Alfieri O., Angelini A., Atar D., Colonna P., De Caterina R., De Sutter J., Goette A., Gorenek B., Haldal M., Hohloser S. H., Kolh P., Le Heuzey J. Y., Ponikowski P., Rutten F. H., Vahanian A., Auricchio A., Bax J., Ceconi C., Dean V., Filippatos G., Funck-Brentano C. Kearney P., McDonagh T. Popescu B., Reiner Z., Sechtem U., Sirnes P. A., Tendera M., Vardas P. E., Widimsky P., Vardas P. E., Agladze V., Aliot E., Balabanski T., Blomstrom-Lundqvist C., Capucci A., Crijns H., Dahlöf B., Folliguet T., Glikson M., Goethals M., Gulba D. C., Ho S. Y., Klautz R. J. M., Kose S., McMurray J., Filardi P. P., Raatkainen P., Salvador M. J., Schalij M. J., Shpektor A., Sousa J., Stepinska J., Uuetoa H., Zamorano J. L., Zupan I. (2010). Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 31(19), 2369–429.
- Carnes, C. A., Chung, M. K., Nakayama, T., Nakayama, H., Baliga, R. S., Piao, S., Kanderian A., Pavia S., Hamlin R. L., McCarthy P. M., Bauer J. A., Van Wagoner, D. R. (2001). Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circulation Research*, 89(6), E32–8.
- Cheng, S., Keyes, M. J., Larson, M. G., Mc Cabe, E. L., Newton-Cheh, C., Levy, D., Benjamin E. J., Vasan R. S., Wang, T. J. (2009). Long-term outcomes in individuals with prolonged PR interval or first-degree atrioventricular block. *JAMA*, 301(24), 2571–7.
- Chowdhary, S., Marsh, A. M., Coote, J. H., Townend, J. N. (2004). Nitric oxide and cardiac muscarinic control in humans. *Hypertension*, 43(5), 1023–8.
- Chugh, S. S., Havmoeller, R., Narayanan, K., Singh, D., Rienstra, M., Benjamin, E. J., Gillum R. F., Kim Y. H., McAnulty J. H. Jr., Zheng Z. J., Forouzanfar M. H., Naghavi M., Mensah G. A., ezzati M. & Murray, C. J. (2014). Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*, 129(8), 837–47.
- Closs, El., Basha, F. Z., Habermeier, A., Förstermann, U. (1997). Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*, 1(1), 65–73.
- Cotter, G., Kaluski, E., Blatt, A., Milovanov, O., Moshkovitz, Y., Zaidenstein, R., Salah A., Alon D., Michovitz Y., Metzger M., Vered Z., Golik, A. (2000). L-NMMA (a nitric oxide synthase inhibitor) is effective in the treatment of cardiogenic shock. *Circulation*, 101(12), 1358–61.
- Crabos, M., Coste, P., Paccalin, M., Tariosse, L., Daret, D., Besse, P., Bonoron-Adele, S. (1997). Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(1), 55–5.

- De Gennaro Colonna, V., Bianchi, M., Pascale, V., Ferrario, P., Morelli, F., Pascale, W., Tomasoni, L., Turiel, M. (2009). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Medical Science Monitor*, 15(4), RA91–101.
- De Gennaro Colonna, V., Bonomo, S., Ferrario, P., Bianchi, M., Berti, M., Guazzi, M., Manfredi B., Muller E. E., Berti F., Rossoni, G. (2007). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces vascular endothelium impairment and aggravates post-ischemic ventricular dysfunction in rats. *European Journal of Pharmacology*, 557(2-3), 178–85.
- De Vos, C. B., Pisters, R., Nieuwlaat, R., Prins, M. H., Tieleman, R. G., Coelen, R.-J. S., van den Heijkant A. C., Allessie M. A., Crijns, H. J. G. M. (2010). Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(8), 725–31.
- Deutsche Stiftung für Herzforschung (2013). Jahresbericht 2013.
- Dudley, S. C., Hoch, N. E., McCann, L. A., Honeycutt, C., Diamandopoulos, L., Fukai, T., Harrison D. G., Dikalov S. I., Langberg, J. (2005). Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*, 112(9), 1266–73.
- Endres, M., Laufs, U. (1998). HMG-CoA reductase inhibitor and risk of stroke. *Der Nervenarzt*, 69(8), 717–21.
- Erbel, R., Kneissl, G. D., Schweizer, P., Lambertz, H. J. & Engberding, R. (1997). Qualitätsrichtlinien in der Echokardiographie. *Zeitschrift für Kardiologie*, 86, 387–402.
- Ferguson, J. W., Dover, A. R., Chia, S., Cruden, N. L. M., Hayes, P. C. & Newby, D. E. (2006). Inducible nitric oxide synthase activity contributes to the regulation of peripheral vascular tone in patients with cirrhosis and ascites. *Gut*, 55(4), 542–6.
- Fontes, J. D., Yamamoto, J. F., Larson, M. G., Wang, N., Dallmeier, D., Rienstra, M., Schnabel R. B., Vasan R. S., Keaney Jr. J. F., Benjamin, E. J. (2013). Clinical correlates of change in inflammatory biomarkers: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*, 228(1), 217–23.
- Go, A. S., Hylek, E. M., Phillips, K. a., Chang, Y., Henault, L. E., Selby, J. V., Singer, D. E. (2001). Prevalence of Diagnosed Atrial Fibrillation in Adults. *Jama*, 285(18), 2370.
- Goette, A., Hammwöhner, M., Bukowska, A., Scalera, F., Martens-Lobenhoffer, J., Dobrev, D., Ravens U., Weinert S., Medunjanin S., Lendeckel U., Bode-Böger, S. M. (2012). The impact of rapid atrial pacing on ADMA and endothelial NOS. *International Journal of Cardiology*, 154(2), 141–6.
- Hays, A. G., Iantorno, M., Soleimanifard, S., Steinberg, A., Schär, M., Gerstenblith, G., Stuber M., Weiss, R. G. (2015). Coronary Vasomotor Responses to Isometric Handgrip Exercise are Primarily Mediated by Nitric Oxide: a Noninvasive MRI Test of Coronary Endothelial Function. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, ajpheart.00023.2015.

- Herzog, R. F. (2013). Effekte von chirurgisch initiiertem Gewichtsverlust auf die endotheliale Dysfunktion. *Medizinische Dissertation*. Universität Hamburg.
- Holaj, R., Spáčil, J., Petrásek, J., Malík, J., Aschermann, M., Haas, T. (1998). Relation of the thickness of the intima and media of the common carotid artery, atherosclerotic plaque in the carotids and manifestations of atherosclerosis in the vessels of the lower extremity in comparison to coronary atherosclerosis. *Casopis Lékařů Českých*, 137(23), 716–20.
- Horacek, T. (2013). Der EKG-Trainer. Ein didaktisch geführter Selbstlernkurs mit 200 Beispiel-EKGs. (3. korrigierte Ausg.). Georg Thieme Verlag.
- Huxley, R. R., Lopez, F. L., Folsom, A. R., Agarwal, S. K., Loehr, L. R., Soliman, E. Z., Macle hose R., Konety S., Alonso, A. (2011). Absolute and attributable risks of atrial fibrillation in relation to optimal and borderline risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*, 123(14), 1501–8.
- Ito, A., Tsao, P. S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Ogawa, T., Cooke, J. P. (1999). Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 99(24), 3092–5.
- Kirchhof, P., Breithardt, G., Bax, J., Benninger, G., Blomstrom-Lundqvist, C., Boriani, G., Brandes A., Brown H., Brueckmann M., Calkins H., Calvert M., Christoffels V., Crijns H., Dobrev D., Ellinor P., Fabritz L., Fetsch T., Ben Freedman S., Gerth A., Goette A., Guasch E., Hack G. Haegeli L., Hatem S., Haeusler K. G., Heidbüchel H., Heinrich-Nols J., Hidden-Lucet F., Hindricks G., Juul-Möller S., Kääb S., Kappenberger L., Kespohl S., Kotecha D., Lane D. A., Leute A., Lewalter T., Meyer R., Mont L., Münzel F., Nabauer M., Nielsen J. C., Oeff M., Oldgren J., Oto A., Piccini J. P., Pilmeyer A., Potpara T., Ravens U., Reinecke H., Rostock T., Rustige J., Savelieva I., Schnabel R., Schotten U., Schwichtenberg L., Sinner M. F., Steinbeck G., Stoll M., Tavazzi L., Themistoclakis S., Tse H. F., Van Gelder I. C., Vardas P. E., Varpula T., Vincent A., Werring D., Willems S., Ziegler A., Lip G. Y. H., Camm, A. J. (2015). A roadmap to improve the quality of atrial fibrillation management: proceedings from the fifth Atrial Fibrillation Network/European Heart Rhythm Association consensus conference. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 18(1), 37-50. <http://doi.org/10.1093/europace/euv304>
- Kirchhof, P., Leute, A. (2013). Vorhofflimmern: EAST-Studie. Internationale Studie testet frühe rhythmuserhaltende Behandlung. *Herz Heute*, 4/2013, 22–4.
- Kirchhof, P., Goette, A., Gulba, D., Hindricks, G. & Hohnloser, S. H. (2012). Kommentar zu den Leitlinien der ESC zum Vorhofflimmern. *Der Kardiologe*, 6(1), 12–27.
- Kleindienst, R. (o. J.) Standardableitungen 12-Kanal-EKG. [Online im Internet.] URL: <http://www.grundkurs-ekg.de/ableitung/ableitung3.htm> [Stand: 08.06.2016].
- Kolek, M. J., Parvez, B., Muhammad, R., Shoemaker, M. B., Blair, M. A., Stubblefield, T., Kucera G. A., Denny J. C., Roden D. M., Darbar, D. (2013). A common variant on chromosome 4q25 is associated with prolonged PR interval

- in subjects with and without atrial fibrillation. *American Journal of Cardiology*, 113(2), 309–13.
- La Fontaine, M. F., Wecht, J. M., Bauman, W. A. (2013). Acute nitric oxide synthase inhibition and cardiac conduction in persons with spinal cord injury: a short report. *Die Pharmazie*, 68(4), 245–50.
- Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S., Moncada, S. (1991). Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 23790–5.
- Lieb, W., Benndorf, R. A., Benjamin, E. J., Sullivan, L. M., Maas, R., Xanthakis, V., Schwedhelm E., Aragam J., Schulze F., Böger R. H., Vasan, R. S. (2009). Plasma asymmetric dimethylarginine, L-arginine and left ventricular structure and function in a community-based sample. *Atherosclerosis*, 204(1), 282–7.
- Lip, G. Y. Brechin, C. M., Lane, D. A. (2012). The global burden of atrial fibrillation and stroke: a systematic review of the epidemiology of atrial fibrillation in regions outside North America and Europe. *Chest*, 142(6), 1489–98.
- Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J.-C., Cottin, Y., Vergely, C., Rochette, L. (2014). Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(1), 101–16.
- Marin, R., Escrig, A., Abreu, P., Mas, M. (1999). Androgen-dependent nitric oxide release in rat penis correlates with levels of constitutive nitric oxide synthase isoenzymes. *Biology of Reproduction*, 61(4), 1012–6.
- Mereles, D. (2014). Echobasics. Diastolische LV-Funktion. [Online im Internet.] URL: <http://www.echobasics.de/diastole.html> [Stand: 08.06.2016].
- Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser, P. J., McCarthy, P. M., Van Wagoner, D. R., Bauer, J. A. (2001). Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*, 104(2), 174–80.
- Miyasaka, Y., Barnes, M. E., Gersh, B. J., Cha, S. S., Bailey, K. R., Abhayaratna, W. P., Seward J. B., Tsang, T. S. M. (2006). Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*, 114(2), 119–25.
- Ni, Z., Vaziri, N. D. (2001). Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *American Journal of Hypertension*, 14(2), 155–63.
- O'Neill, P. G., Puleo, P. R., Bolli, R., Rokey, R. (1990). Return of atrial mechanical function following electrical conversion of atrial dysrhythmias. *American Heart Journal*, 120(2), 353–9.
- Pfeuffer, A., van Noord, C., Marciante, K. D., Arking, D. E., Larson, M. G., Smith, A. V., Tarasov K. V., Müller M., Sotoodehnia N., Sinner M. F., Verwoert G. C., Li M., Kao W. H., Köttgen A., Coresh J., Bis J. C., Psaty B. M., Rice K., Rotter J. I., Rivadeneira F., Hofman A., Kors J. A., Stricker B. H., Uitterlinden A. G., van Duijn C. M., Beckmann B. M., Sauter W., Gieger C., Lubitz S. A., Newton-Cheh C., Wang T. J., Magnani J. W., Schnabel R. B., Chung M. K., Barnard J., Smith J. D., Van Wagoner D. R., Vasan R. S., Aspelund T., Eiriksdottir G., Harris T. B.,

- Launer L. J., Najjar S. S., Lakatta E., Schlessinger D., Uda M., Abecasis G. R., Müller-Myhsok B., Ehret G. B., Boerwinkle E., Chakravarti A., Soliman E. Z., Lunetta K. L., Perz S., Wichmann H. E., Meitinger T., Levy D., Gudnason V., Ellinor P. T., Sanna S., Kääb S., Witteman J. C., Alonso A., Benjamin E. J., Heckbert, S. R. (2010). Genome-wide association study of PR interval. *Nature Genetics*, 42(2), 153–9.
- Qu, X. W., Wang, H., De Plaen, I. G., Rozenfeld, R. A., Hsueh, W. (2001). Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(2), 439–46.
- Richir, M. C., van Lambalgen, A. A., Teerlink, T., Wisselink, W., Bloemena, E., Prins, H. A., de Vries T. P. G. M., van Leeuwen, P. A. M. (2009). Low arginine/asymmetric dimethylarginine ratio deteriorates systemic hemodynamics and organ blood flow in a rat model. *Critical Care Medicine*, 37(6), 2010–7.
- Sack, S. (2014). Epidemiologie des Vorhofflimmerns. *Herz*, 27(4), 294–300.
- Schnabel, R. B., Rienstra, M., Sullivan, L. M., Sun, J. X., Moser, C. B., Levy, D., Pencina M. J., Fontes J. D., Magnani J. W., McManus D. D., Lubitz S. A., Tadros T. M., Wang T. J., Ellinor P. T., Vasan Ramachandran S., Benjamin, E. J. (2013). Risk assessment for incident heart failure in individuals with atrial fibrillation. *European Journal of Heart Failure*, 15(8), 843–9.
- Schnabel, R. B., Larson, M. G., Yamamoto, J. F., Sullivan, L. M., Pencina, M. J., Meigs, J. B., Toftler G. H., Selhub J., Jaques P. F., Wolf P. A., Magnani J. W., Ellinor P. T., Wang T. J., Levy D., Vasan R. S., Benjamin, E. J. (2010). Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community. *Circulation*, 121(2), 200–7.
- Schnabel, R. B., Aspelund, T., Li, G., Sullivan, L. M., Suchy-Dicey, A., Harris, T. B., Pencina M. J., D'Agostino R. B. Sr., Levy D., Kannel W. B., Wang T. J., Kronmal R. A., Wolf P. A., Burke G. L., Launer L. J., Vasan R. S., Psaty B. M., Benjamin E. J., Gudnason V., Heckbert, S. R. (2010). Validation of an atrial fibrillation risk algorithm in whites and African Americans. *Archives of Internal Medicine*, 170(21), 1909–17.
- Schnabel, R. B., Sullivan, L. M., Levy, D., Pencina, M. J., Massaro, J. M., D'Agostino, R. B. Sr., Newton-Cheh C., Yamamoto J. F., Magnani J. W., Tadros T. M., Kannel W. B., Wang T. J., Ellinor P. T., Wolf P. A., Vasan R. S., Benjamin, E. J. (2009). Development of a risk score for atrial fibrillation (Framingham Heart Study): a community-based cohort study. *Lancet*, 373(9665), 739–45.
- Schnabel, R. B., Blankenberg, S., Lubos, E., Lackner, K. J., Rupprecht, H. J., Espinola-Klein, C., Jachmann N., Post F., Peetz D., Bickel C., Cambien F., Tiret L., Münzel, T. (2005). Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circulation Research*, 97(5), e53–9.

- Schulze, F., Carter, A. M., Schwedhelm, E., Ajjan, R., Maas, R., von Holten, R. A., Atzler D., Grant P. J., Böger, R. H. (2010). Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis*, 208(2), 518–23.
- Schwedhelm, E, Maas, R., Freese, R., Jung, D., Lukacs, Z., Jambrecina, A., Spickler W., Schulze F., Böger, R.H. (2007). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65(1), 51–9.
- Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D., Boger, R. H. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews*, 6(2), 82–90.
- Stühlinger, M. C., Abbasi, F., Chu, J. W., Lamendola, C., McLaughlin, T. L., Cooke, J. P., Reaven G. M., Tsao, P. S. (2002). Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*, 287(11), 1420–6.
- Stühlinger, M. C., Tsao, P. S., Her, J. H., Kimoto, M., Balint, R. F., Cooke, J. P. (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 104(21), 2569–75.
- Sydow, C., von Leitner, E. (2008). ADMA- from Bench to Bedside. *Universitäres Herzzentrum Hamburg, Forschungsbericht*, 12–15.
- Takahashi, N., Ishibashi, Y., Shimada, T., Sakane, T., Ohata, S., Sugamori, T., Ohta Y., Inoue S., Nakamura K., Shimizu H., Katoh H., Murakami, Y. (2002). Impaired exercise-induced vasodilatation in chronic atrial fibrillation--role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 66(6), 583–8.
- Tanaka, Y., Kamibayashi, M., Yamashita, Y., Imai, T., Tanaka, H., Nakahara, T., Kunio I., Shigenobu, K. (2002). Evidence for the possible involvement of Ca²⁺ entry blockade in the relaxation by class I antiarrhythmic drugs in the isolated pig coronary smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(1), 56–66.
- Tojo, A., Kimoto, M., Wilcox, C. S. (2000). Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin. *Kidney International*, 58(5), 2075–83.
- Tojo, A., Welch, W. J., Bremer, V., Kimoto, M., Kimura, K., Omata, M., Ogawa T., Vallance P., Wilcox, C. S. (1997). Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney International*, 52(6), 1593–601.
- Tousoulis, D., Böger, R. H., Antoniades, C., Siasos, G., Stefanadi, E., Stefanadis, C. (2007). Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis--a clinical perspective. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, 4(5), 274–83.
- Tsikas, D., Böger, R. H., Sandmann, J., Bode-Böger, S. M., Frölich, J. C. (2000). Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Letters*, 478(1-2), 1–3.

- Valkonen, V. P., Päivä, H., Salonen, J. T., Lakka, T. A., Lehtimäki, T., Laakso, J., Laaksonen, R. (2001). Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet*, 358(9299), 2127–8.
- Vallance, P., Leiper, J. (2004). Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24(6), 1023–30.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 339(8793), 572–5.
- Vallance, P., Collier, J., Moncada, S. (1989). Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovascular Research*, 23(12), 1053–7.
- Volkman, H., Walter, M., Bergmann, C., Rose, E., Krpciar, V., Vetter, S. (2009). Antithrombotic therapy in atrial fibrillation: when vitamin K antagonists? When aspirin? When heparin? When combinations of anticoagulant and antiplatelet drugs?. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie*, 20(2), 61–9.
- von Holten, R.A. (2011). Bedeutung des Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) als prädikativer Marker für das Schlaganfallrisiko. *Medizinische Dissertation*. Universität Hamburg.
- Ward, G., Milliken, P., Patel, B., McMahon, N. (2012). Comparison of non-invasive and implanted telemetric measurement of blood pressure and electrocardiogram in conscious beagle dogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 66(2), 106–13.
- Weber, T., Maas, R., Auer, J., Lamm, G., Lassnig, E., Rammer, M., O'Rourke M. F., Böger R. H., Eber, B. (2007). Arterial wave reflections and determinants of endothelial function a hypothesis based on peripheral mode of action. *American Journal of Hypertension*, 20(3), 256–62.
- Wilke, T., Groth, A., Mueller, S., Pfannkuche, M., Verheyen, F., Linder, R., Maywald U., Bauersachs R., Breithardt, G. (2013). Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace*, 15(4), 486–93.
- Wikipedia (2016a). Arginin. [Online im Internet.] URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Arginin> [Stand: 09.06.2016].
- Wikipedia (2016b). Asymmetrisches Dimethylarginin. [Online im Internet.] URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Asymmetrisches_Dimethylarginin [Stand: 09.06.2016].
- Wikipedia (2016c). Symmetrisches Dimethylarginin. [Online im Internet.] URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Symmetrisches_Dimethylarginin [Stand: 09.06.2016].
- Wikipedia (2016d). N-Monomethyl-L-Argenin. [Online im Internet.] URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Methylarginine> [Stand: 09.06.2016].
- Wikipedia (2016e). Echokardiografie. [Online im Internet.] URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Echokardiografie> [Stand: 29.07.2014].

- Wilson, A. M., Harada, R., Nair, N., Balasubramanian, N., Cooke, J. P. (2007). L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation*, 116(2), 188–95.
- Wu, G., Meininger, C. J. (1993). Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. *The American Journal of Physiology*, 265(6 Pt 2), H1965–71.
- Yang, K.C., Dudley, S. C. (2013). Oxidative stress and atrial fibrillation: finding a missing piece to the puzzle. *Circulation*, 128(16), 1724–6.
- Yang, L., Xiufen, Q., Shuqin, S., Yang, Y., Ying, S., Yanwei, Y., Dechun, Y. (2011). Asymmetric dimethylarginine concentration and recurrence of atrial tachyarrhythmias after catheter ablation in patients with persistent atrial fibrillation. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology: An International Journal of Arrhythmias and Pacing*, 32(2), 147–54.
- Yoshizumi, M., Perrella, M. A., Burnett, J. C. Jr., Lee, M. E. (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation Research*, 73(1), 205–9.
- Zoccali, C., Bode-Böger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L., Cataliotti A., Bellanuova I., Fermo I., Frölich J., Böger, R. (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet (London, England)*, 358(9299), 2113–7.
- Zoccali, C., Maas, R., Cutrupi, S., Pizzini, P., Finocchiaro, P., Cambareri F., Panuccio V., Martorano C., Schulze F., Enia G., Tripepi G., Boger, R. (2007). Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(3), 801–6.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Universitäts-Professorin Dr. med. Renate Schnabel, Universitäres Herzzentrum Hamburg, Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, bedanken, die mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Herzlichen Dank!

In besonderem Maße bin ich für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und die fortwährende Hilfsbereitschaft dankbar. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich ganz ausdrücklich bedanken.

Mein Dank gilt neben der gesamten Arbeitsgruppe für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, für die vielen hilfreichen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ebenso den Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie – stellvertretend Herr Professor Dr. med. Böger und Herr Privat-Dozent Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm - die als ausgewiesene Experten auf diesem Feld nützliche Hinweise geben konnten.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Eltern und für meinen Bruder, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Hilfestellung und viel Geduld bedacht haben.

Ariana, für deine moralische und fachliche Unterstützung bin ich Dir sehr dankbar. Danke für alles!

Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: