

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Vergleich analytischer Methoden zur quantitativen Bestimmung von
Homoarginin und Untersuchung von Homoarginin als
kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Risikomarker**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kathrin Cordts
Hamburg, Dezember 2018

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Elke Oetjen
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm

Datum der Disputation: 18.01.2019

Datum der Zulassung zur Veröffentlichung: 18.01.2019

Wenn der Weg schön ist, lass' uns nicht fragen, wohin er führt!

Anatole France

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract.....	3
3. Einleitung.....	4
3.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen	4
3.2. Stickstoffmonoxid	6
3.3. Homoarginin	8
3.3.1. Mögliche Interaktionen von Homoarginin im Stickstoffmonoxid- Stoffwechsel.....	12
3.3.2. Bedeutung des Homoarginins als kardiovaskulärer Risikomarker	15
3.3.3. Homoargininquellen	19
3.3.4. Bestimmungsmethoden für Homoarginin	21
3.4. Zielsetzung.....	24
4. Methoden	25
4.1. Bestimmung von Homoarginin	25
4.1.1. LC-MS/MS.....	25
4.1.2. GC-MS	28
4.1.3. ELISA.....	32
4.2. Methodenvergleich	37
4.2.1. ACS-Studie	38
4.3. ELISA-Referenzintervalle für Homoarginin in der gesunden Bevölkerung .	40
4.3.1. Studienpopulation	40
4.3.2. Statistik.....	41
4.4. Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen.....	43
4.4.1. Schlaganfall und Schlaganfallrisiko.....	43
4.4.2. Hypertrophe Kardiomyopathie.....	46
4.4.3. Chronisch-intermittierende Hypoxie bei Höhengaufenthalt	49
5. Ergebnisse.....	50
5.1. Methodenvergleich	50
5.1.1. Bestimmung von Homoarginin in wässriger Pufferlösung	50
5.1.2. Bestimmung von Homoarginin in dialysiertem Plasma	52
5.1.3. Homoargininbestimmung in humanen Plasmaproben.....	54
5.1.4. Untersuchung des isobaren <i>N</i> ^ε -Trimethyllysins	56

5.1.5.	Untersuchung des Enantiomers D-Homoarginin.....	57
5.1.6.	Biologische Applikation – Homoargininkonzentration in Patienten mit koronarer Herzkrankheit versus akutem Koronarsyndrom	58
5.2.	ELISA-Referenzintervalle für Homoarginin in der gesunden Bevölkerung .	61
5.3.	Homoarginin-ELISA-Schnelltest	65
5.3.1.	Vergleich ELISA „Normal“ vs. ELISA „Schnelltest“	65
5.3.2.	Validierung des qualitativen Schnelltestes	67
5.4.	Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen	69
5.4.1.	Schlaganfall und Schlaganfallrisiko	69
5.4.2.	Hypertrophe Kardiomyopathie.....	80
5.4.3.	Chronische Hypoxie bei Höhengaufenthalt	88
6.	Diskussion	89
6.1.	Bestimmung von Homoarginin – Methodenvergleich, Schnelltest und Referenzwerte.....	89
6.2.	Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen	102
6.2.1.	Schlaganfall und Schlaganfallrisiko	102
6.2.2.	Hypertrophe Kardiomyopathie.....	106
6.2.3.	Chronische Hypoxie bei Höhengaufenthalt	109
7.	Literaturverzeichnis	112
8.	Anhang	126
8.1.	Lösungen und Puffer	126
8.2.	Materialien.....	127
8.2.1.	Substanzen	127
8.2.2.	Verbrauchsmaterialien und Kits	128
8.2.3.	Laborgeräte.....	129
8.2.4.	Software	130
8.3.	Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS.....	131
8.4.	Pipettierschemata Homoarginin-ELISA und Schnelltest.....	138
8.5.	Lebenslauf.....	139
8.6.	Veröffentlichungen	140
8.6.1.	Publikationen.....	140
8.6.2.	Kongressbeiträge (Poster)	141
9.	Danksagung.....	142
10.	Eidesstattliche Erklärung	143

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGAT	L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
AGXT2	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
Arg	Arginin
ARG1	Arginase 1
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthase
ATC	Anatomisch-therapeutisch-chemisches Klassifikationssystem
AUC	Fläche unter der Kurve
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Kationische Aminosäuretransporter
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CK	Kreatinkinase
DD	Diastolische Dysfunktion
DDAH	Dimethylamin-Dimethylaminohydrolase
DHS	<i>Dallas Heart Study</i>
ECNICI	Elektroneneinfang Negativ-Ionen-Chemische Ionisation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Endotheliale NOS; NOS III
ESI ⁺	Positive Elektrospray-Ionisation
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GC	Gaschromatographie
GHS	<i>Gutenberg health study</i>
GOCA	6-Guanidino-2-oxocapronsäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
hArg	Homoarginin
HbA1c	Glykohämoglobin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HDL	<i>High-density</i> Lipoprotein
HLOCM	Hypertrophe latent-obstruktive Kardiomyopathie
HNOCM	Hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie
HOCM	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	Hazard Ratio
hsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
hsTnT	Hochsensitives Troponin T
HW	Dicke der posterioren Wand des linken Ventrikels
IAP	Instabile Angina pectoris
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IMT	Intima-Media-Dicke
iNOS	Induzierbare NOS; NOS II

IQR	Interquartilsbereich
IS	Interner Standard
IVRT	Isovolumetrische Relaxationszeit
KHK	Koronaren Herzkrankheit
K _m	Michaelis-Konstante
LA	Linkes Atrium
LACI	Lakunäre Infarkte
LC	Flüssigchromatographie
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>Low-density</i> Lipoprotein
LVEF	Linksventrikuläre Auswurfraction
LVOT	Linksventrikulärer Ausflusstrakt
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MI	Myokardinfarkt
mPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
n.a.	nicht anwendbar
NADPH/NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nNOS	Neuronale NOS; NOS I
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid -Synthase
NSTEMI	Myokardinfarkt ohne persistierende ST-Strecken-Hebung
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OD	Optische Dichte
OR	Odds ratio
OSCP	<i>Oxfordshire Community Stroke Project</i> -Klassifikation
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PACI	Partiell anteriore Infarkte
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PFP	Pentafluoropropionsäure
PFFA	Pentafluoropropionsäureanhydrid
PH	Pulmonale Hypertonie
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
POCI	Posteriore Infarkte
QTc	Frequenzkorrigiertes QT-Intervall
rp	Umkehrphase
RSD	Relative Standardabweichung
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sGC	Lösliche Guanylylcyclase
SHIP	<i>Study of Health in Pomerania</i>
STEMI	Myokardinfarkt mit persistierender ST-Strecken-Hebung
SW	Septumswanddicke
TACI	Totale anteriore Infarkte
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigchromatographie
VHF	Vorhofflimmern
VK	Variationskoeffizient

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zehn häufigsten Todesursachen durch Erkrankungen des Kreislaufsystems	5
Abbildung 2: Metabolismus von Homoarginin und assoziierte Stoffwechselwege.....	9
Abbildung 3: Strukturformeln von Homoarginin und Lathyrin.....	20
Abbildung 4: Prinzip der LC-MS/MS-Methode.....	25
Abbildung 5: Chromatogramme und Kalibrierkurve der LC-MS/MS-Methode.	28
Abbildung 6: Prinzip der GC-MS-Methode mit Quadrupol-Massenspektrometer.....	29
Abbildung 7: Massenspektren der GC-MS-Methode und Strukturformeln der Analyten.....	31
Abbildung 8: Chromatogramme der GC-MS-Methode.....	32
Abbildung 9: Prinzip des kompetitiven Homoarginin-ELISAs.....	33
Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrierkurve des Homoarginin-ELISAs.	34
Abbildung 11: Studienpopulation – ACS-Studie.	39
Abbildung 12: Studienpopulation – Gesunde Referenzkohorte der SHIP-TREND-Studie.	42
Abbildung 13: Lineare Regressionsanalyse – Homoarginin in wässriger Pufferlösung.	50
Abbildung 14: Lineare Regressionsanalyse - dialysiertes Plasma.....	52
Abbildung 15: Lineare Regressionsanalysen und Bland-Altman-Plots - humanes Plasma.....	55
Abbildung 16: ESI ⁺ -Tandem-Massenspektren von O-butyliertem (links) Homoarginin und (rechts) N ^ε -Trimethyllysin.....	56
Abbildung 17: LC-MS/MS-Chromatogramme von L- und D-Homoarginin.	57
Abbildung 18: Homoarginin-Plasmakonzentration in der ACS-Studie.	59
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven.....	60
Abbildung 20: Geschlechtsabhängige Referenzintervalle für Homoarginin.	63
Abbildung 21: Kalibrierkurven der Homoarginin-ELISAs "Normal" vs. "Schnelltest".	65
Abbildung 22: Lineare Regressionsanalyse und Bland-Altman-Plot für den Vergleich ELISA „Normal“ vs. „Schnelltest“.	66
Abbildung 23: Logistische Regressionsanalyse von Homoarginin mit den Schlaganfall-Subtypen nach OCSP.....	74
Abbildung 24: Logistische Regressionsanalyse von Homoarginin mit der Schlaganfall-Ätiologie (TOAST-Klassifikation).....	76

Abbildung 25: Logistische Regressionsanalyse für eine Stenose/Okklusion der Karotis in der UKE- und Harburg-Kohorte sowie Metaanalyse.....	77
Abbildung 26: Logistische Regressionsanalyse für Homoarginin und Vorhofflimmern.	78
Abbildung 27: Spearman-Korrelation von Homoarginin mit dem CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score.	79
Abbildung 28: Zusammenhang von Homoarginin mit dem Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion in HCM-Patienten.	84
Abbildung 29: Homoarginin in Patienten mit und ohne VHF.....	87
Abbildung 30: Homoargininkonzentration vor und nach einem sechsmonatigen Aufenthalt in der Höhe.	88
Abbildung 31: Strukturformeln von Homoarginin, N ^G -Monomethylarginin, N ^ε -Acetyllysin und N ^ε -Trimethyllysin.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fließmittelgradient der LC-MS/MS-Methode..... 27

Tabelle 2: Wiederfindung in wässriger Lösung – LC-MS/MS..... 51

Tabelle 3: Wiederfindung in wässriger Lösung – GC-MS. 51

Tabelle 4: Wiederfindung in wässriger Lösung – ELISA..... 51

Tabelle 5: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – LC-MS/MS..... 53

Tabelle 6: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – GC-MS. 53

Tabelle 7: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – ELISA..... 53

Tabelle 8: Allgemeine Charakteristika der ACS-Studie. 58

Tabelle 9. Allgemeine Eigenschaften der Studienpopulation stratifiziert nach dem
Geschlecht..... 62

Tabelle 10. Alters- und geschlechtsabhängige Referenzintervalle für Homoarginin. 63

Tabelle 11. Sensitivitätsanalyse der geschlechtsabhängigen Homoarginin-
Referenzintervalle..... 64

Tabelle 12: Variablen der 4-Parameter-Analyse..... 66

Tabelle 13: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit. 68

Tabelle 14: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit. 68

Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der UKE-Kohorte. 70

Tabelle 16: Allgemeine Charakteristika der „Leeds-Stroke-Studie“. 71

Tabelle 17: Allgemeine Charakteristika der „Harburg-Stroke-Studie“. 72

Tabelle 18: Spearman-Korrelationsanalysen von Homoarginin mit den allgemeinen
Charakteristika der UKE-Kohorte. 73

Tabelle 19: Allgemeine Charakteristika der HCM-Studie..... 81

Tabelle 20: Logistische Regressionsanalyse für Homoarginin und die NYHA-
Klassifikation in HCM-Patienten. 82

Tabelle 21: Echokardiographische Parameter zur Beurteilung der diastolischen
Funktion..... 83

Tabelle 22: Spearman-Korrelationsanalyse der echokardiographischen Parameter
der diastolischen Funktion mit Homoarginin..... 85

Tabelle 23: Lineare Regressionsanalyse der Homoargininkonzentration mit
echokardiographischen Parametern der diastolischen Funktion. 86

Tabelle 24: Logistische Regressionsanalyse für das Vorliegen von VHF in aktuellen
EKG-Aufzeichnungen oder in der Historie..... 88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 25: Lineare Bereiche der analytischen Methoden für Homoarginin.....	93
Tabelle 26: Homoargininkonzentrationen in gesunden Erwachsenen der verschiedenen analytischen Methoden.....	100
Tabelle 27: Alters- und geschlechtsabhängige Homoarginin-Referenzintervalle in gesunden Populationen.	101

1. Zusammenfassung

Niedrige Plasma- und Serumkonzentrationen der nicht-proteinogenen Aminosäure Homoarginin (hArg) wurden in den letzten Jahren als Biomarker für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen identifiziert. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung von hArg miteinander verglichen (Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie [LC-MS/MS], Gaschromatographie-Massenspektrometrie [GC-MS] und ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* [ELISA]), Referenzwerte in einer gesunden Population für den ELISA bestimmt und ein qualitativer ELISA-Schnelltest für die Identifizierung von Patienten mit einer niedrigen hArg-Konzentration $<2 \mu\text{mol/L}$ entwickelt. Beim Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA zur Quantifizierung von hArg in humanen Plasmaproben zeigte sich ein linearer Zusammenhang der Methoden mit Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,90$ für den Vergleich LC-MS/MS vs. GC-MS, $r^2=0,88$ für LC-MS/MS vs. ELISA und $r^2=0,95$ für GC-MS vs. ELISA. Die Werte der LC-MS/MS-Methode waren dabei 21% höher als die GC-MS-Methode und 31% höher als der ELISA, die GC-MS-Methode lieferte 9% höhere Werte als der ELISA. In einer gesunden Population wurden alters- und geschlechtsabhängige Referenzwerte für hArg-Serumkonzentrationen mit dem ELISA bestimmt. Hierfür wurden 858 Frauen mit einem mittleren Alter von 41 [32-50] Jahren (Median [25.-75. Perzentil]) und 451 Männer mit einem mittleren Alter von 39 [30-49] Jahren untersucht. Frauen hatten dabei insgesamt niedrigere hArg-Konzentrationen als Männer ($1,93 [1,49-2,59]$ vs. $2,02 [1,63-2,61] \mu\text{mol/L}$; $P=0,03$, Kruskal-Wallis-Test). Für die Entwicklung des qualitativen Schnelltestes wurden $2 \mu\text{mol/L}$ hArg als Grenzwert definiert. Die Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VKs) zur Bestimmung der Wiederholpräzision waren 2,1 und 2,8% für 1,5 und $2,5 \mu\text{mol/L}$ hArg. Die Inter-Assay-VKs zur Bestimmung der Vergleichspräzision waren 2,0 und 2,9% für 1,5 und $2,5 \mu\text{mol/L}$ hArg. Mit diesem Test ist es möglich, Patienten mit niedrigem hArg und erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität in der Klinik schnell zu identifizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Zusammenhänge von hArg mit klinischen Charakteristika in Schlaganfall(risiko)patienten, Patienten mit einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) und gesunden Probanden, welche einer chronisch-intermittierenden Hypoxie in der Höhe ausgesetzt waren, untersucht. Sowohl in Schlaganfall- als auch in Schlaganfallrisikopatienten war niedriges hArg mit

territorialen Infarkten und den Ursachen dieses Schlaganfall-Subtyps, Kardioembolien oder einer Atherosklerose der großen Gefäße, assoziiert. Dabei war hArg nicht unabhängig mit Vorhofflimmern (VHF) oder einer Stenose der Carotis interna assoziiert. HCM-Patienten mit einer diastolischen Dysfunktion (DD) hatten niedrigere Plasmakonzentrationen als Patienten mit einer normalen diastolischen Funktion. Niedriges hArg war in diesem Kollektiv mit VHF, welches vermehrt bei DD-Patienten auftritt, assoziiert. In den untersuchten gesunden Probanden nahm die hArg-Plasmakonzentration bei einem sechsmonatigen chronisch-intermittierenden Aufenthalt in der Höhe ab.

2. Abstract

Low concentrations of the non-proteinogenic amino acid homoarginine (hArg) in plasma or serum have been identified as marker for cardiovascular and cerebrovascular diseases. In this work three methods for the quantification of hArg were compared (liquid chromatography-tandem mass spectrometry [LC-MS/MS], gas chromatography-mass spectrometry [GC-MS] and an enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]), hArg reference values were determined for the ELISA in a healthy population, and a rapid qualitative ELISA for the identification of patients with low hArg <2 $\mu\text{mol/L}$ was developed. Method comparison in human plasma samples revealed linear associations of the applied methods with correlation coefficients of $r^2=0.90$ for LC-MS/MS vs. GC-MS, $r^2=0.88$ for LC-MS/MS vs. ELISA, and $r^2=0.95$ for GC-MS vs. ELISA. Values obtained by LC-MS/MS were 21% higher than values obtained by GC-MS and 31% higher than ELISA. GC-MS values were 9% higher than ELISA values. Further age- and sex-dependent serum reference intervals of a healthy population (858 women; median [25.-75. percentile] age 41 [32-50] years; 451 men; age 39 [30-49] years) were determined by ELISA. In this population hArg was lower in women compared to men (1.93 [1.49-2.59] vs. 2.02 [1.63-2.61] $\mu\text{mol/L}$; $P=0.03$, Kruskal-Wallis test). For the development of the rapid hArg ELISA 2 $\mu\text{mol/L}$ was defined as cutoff value. Intra-assay variability was 2.1 and 2.8% for 1.5 and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ hArg. Inter-assay variability was 2.0 und 2.9% for 1.5 und 2.5 $\mu\text{mol/L}$ hArg. This assay allows the fast identification of patients with low hArg and high risk of cardiovascular outcome and mortality in clinics.

For the second part of this work associations of hArg with clinical characteristics were analyzed in stroke patients or patients at risk for stroke, patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and in a healthy population that was exposed to chronic-intermittent hypoxia in high altitude. Low hArg was associated with territorial infarcts and cardioembolic or large-vessel diseases in stroke patients as well as in patients at risk for stroke. hArg was not independently associated with atrial fibrillation (AF) or occlusion of the internal carotid artery. HCM patients suffering from diastolic dysfunction (DD) had lower hArg than patients with a normal diastolic function. DD is a risk factor for AF and low hArg was associated with a higher prevalence in this population. The healthy subjects that were exposed to chronic-intermittent hypoxia in high altitude showed decreasing hArg compared to the baseline concentration.

3. Einleitung

3.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind mit einem Anteil von 39% die häufigste Todesursache in Deutschland (Abbildung 1) (Statistisches Bundesamt, 2015). Durch eine verbesserte Erkennung und Behandlung der Erkrankungen sowie ein verbessertes Gesundheitsverhalten der Bevölkerung reduzierte sich der Anteil im Zeitraum von 1998 bis 2015 bereits um 9% (Finger et al., 2016; Statistisches Bundesamt, 2018a). Finger et al. fanden im Untersuchungszeitraum zwischen 1990-2011 eine Reduktion des systolischen Blutdruckes, des Blutzuckers und des Gesamtcholesterols bei gleichzeitig steigenden Anwendungsprävalenzen von Blutdrucksenkern, Antidiabetika und Lipidsenkern in der untersuchten Population (Finger et al., 2016). Zudem erhöhte sich der Anteil an Personen, die sich sportlich aktiv betätigen und bei den Männern erniedrigte sich der Anteil an Rauchern. Trotz dieser positiven Entwicklung spielen kardiovaskuläre Erkrankungen noch immer eine große Rolle in unserem Gesundheitssystem. Im Jahr 2015 verursachten Krankheiten des Kreislaufsystems Kosten in Höhe von 46 Milliarden Euro in Deutschland, was 14% der gesamten Krankheitskosten entspricht (Statistisches Bundesamt, 2018a). 2016 waren jeweils 15% der aus dem Krankenhaus sowie aus Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtungen entlassenen vollstationären Patienten auf Grund von Krankheiten des Kreislaufsystems in Behandlung und verblieben durchschnittlich 7,7 bzw. 24,9 Tage in den Einrichtungen (Statistisches Bundesamt, 2018a). In durch das Robert-Koch-Institut durchgeführten bevölkerungsbasierten Studien betragen die Lebenszeitprävalenzen von koronarer Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt (MI) und Schlaganfall bei Erwachsenen im Alter von 40-79 Jahren 9,3, 4,7 und 2,9% (Busch et al., 2013; Gößwald et al., 2013). Die chronisch ischämische Herzkrankheit, darunter auch die KHK, der akute MI und der Schlaganfall zählen zu den zehn häufigsten Todesursachen durch Erkrankungen des Kreislaufsystems (Abbildung 1) (Statistisches Bundesamt, 2018b), sodass neben der weiteren stetigen Verbesserung der frühzeitigen Erkennung und Behandlung ebenso eine verbesserte Prävention dieser Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

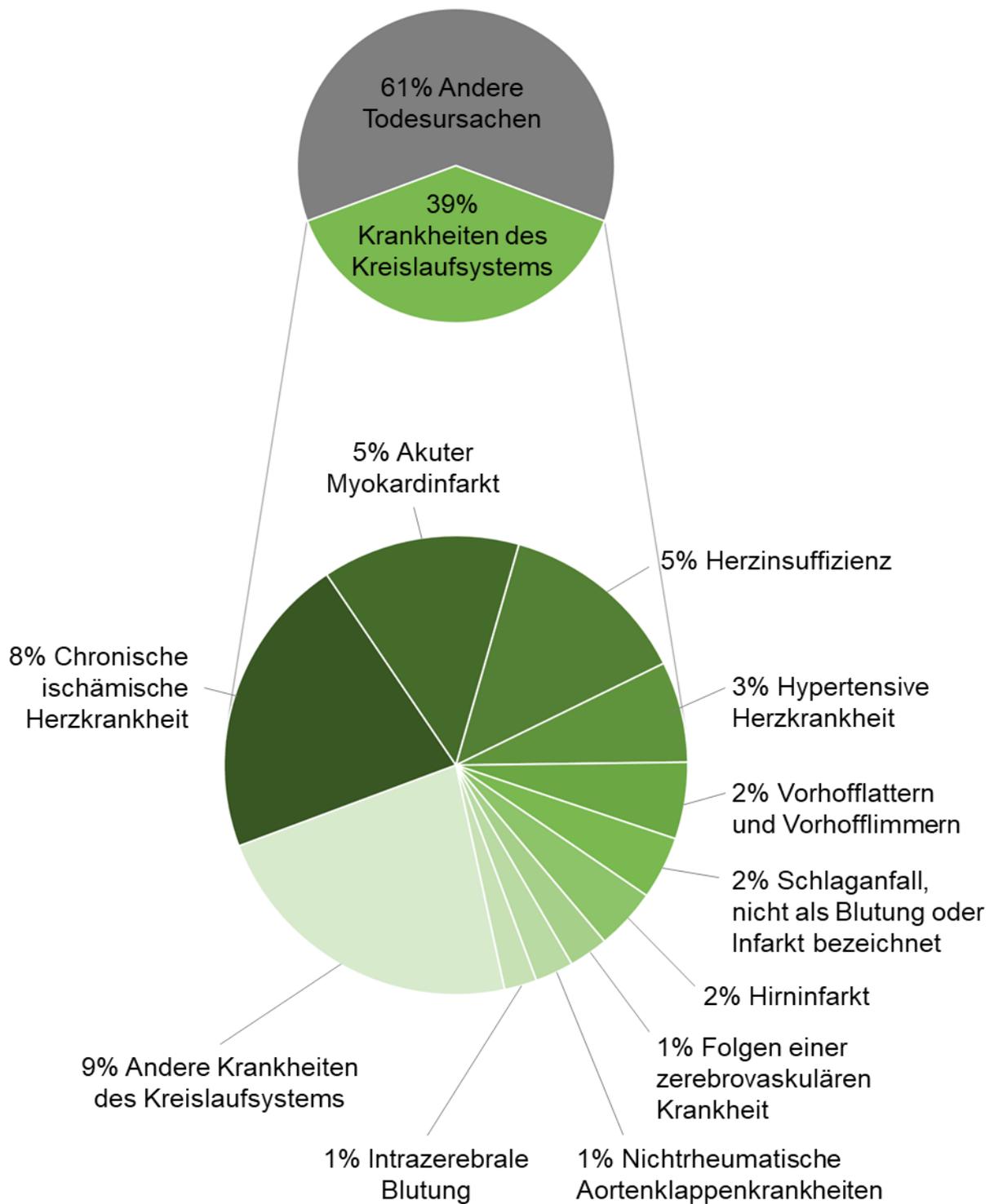


Abbildung 1: Die zehn häufigsten Todesursachen durch Erkrankungen des Kreislaufsystems ICD-10-Kodierungen: I00-I99 Krankheiten des Kreislaufsystems; I11, hypertensive Herzkrankheit; I21, akuter Myokardinfarkt; I25, chronische ischämische Herzkrankheit; I35, nichtrheumatische Aortenklappenkrankheiten; I48, Vorhofflattern und Vorhofflimmern; I50, Herzinsuffizienz; I61, intrazerebrale Blutung; I63, Hirninfarkt; I64, Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet; I69, Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit. Modifiziert nach Statistisches Bundesamt, 2018b.

3.2. Stickstoffmonoxid

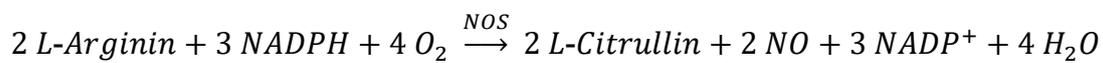
Das kleine gasförmige Molekül Stickstoffmonoxid (NO), von Furchgott et al. als „*Endothelium-derived relaxing factor*“ entdeckt (Furchgott et al., 1984), ist ein wichtiger physiologischer Botenstoff im kardiovaskulären System (Bredt und Snyder, 1994). NO hat nur eine kurze Halbwertszeit und wird im Organismus anschließend zu Nitrat und Nitrit oxidiert (Hibbs et al., 1988; Marletta et al., 1988). NO stimuliert die lösliche Guanylylcyclase (sGC) zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) (Bork und Nikolaev, 2018). cGMP wiederum aktiviert unter anderem die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), welche in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten exprimiert ist. Abgebaut wird cGMP durch Phosphodiesterasen. In den Kardiomyozyten spielt cGMP eine Rolle bei der Kontraktilität, in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Relaxation und in Endothelzellen bei der Angiogenese und der vaskulären Permeabilität (Bork und Nikolaev, 2018; Feil et al., 2003).

Im vaskulären System bewirkt NO eine Vasodilatation (Palmer et al., 1987). Über die Aktivierung der PKG durch cGMP kommt es in den vaskulären glatten Muskelzellen unter anderem durch die Regulation von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen und der Calcium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums zu einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration (Feil et al., 2003). Dabei werden der Eintritt extrazellulären Calciums in die Zelle und die intrazelluläre Calciumfreisetzung moduliert. Es kommt zur Vasodilatation kleiner Arterien und Arteriolen mit einer Reduktion des Blutdruckes. Des Weiteren hemmt NO die Thrombozytenaggregation (Radomski et al., 1987a) und -adhäsion (Radomski et al., 1987b). In den Thrombozyten wird durch die cGMP-Bildung via der NO-abhängigen sGC über die PKG das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein phosphoryliert, wodurch vermutlich verschiedene Rezeptoren der Thrombozyten (z.B. der Fibrinogenrezeptor [Glykoprotein-IIIa/IIb] und Adenosindiphosphat-Rezeptor) gehemmt werden (Feil et al., 2003). Weiterhin hemmt NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (vermutlich über einen anderen Mechanismus als die PKG-Aktivierung) (Feil et al., 2003) und moduliert die Interaktion von Leukozyten mit der Gefäßwand (Moncada und Higgs, 2006).

Im Herzen kann NO verschiedene Ionenkanäle beeinflussen und spielt sowohl bei der Kontraktion, als auch bei der Relaxation eine Rolle (Balligand und Cannon, 1997). NO

hemmt z.B. L-Typ-Calciumkanäle, vermutlich zum einen direkt durch cGMP, zum anderen durch Aktivierung von Phosphodiesterasen mit einem verstärkten Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und folglich verminderter Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase, welche wiederum L-Typ-Calciumkanäle aktivieren würde. In der Diastole bewirkt NO eine frühere und schnellere Relaxation und einen reduzierten linksventrikulären Druck, ohne dabei jedoch die Kontraktilität zu beeinflussen (Shah und MacCarthy, 2000).

NO wird z.B. von Endothelzellen unter der katalytischen Aktivität der NO-Synthasen (NOS) aus Arginin (Arg) synthetisiert (Abbildung 2) (Moali et al., 1998; Palmer et al., 1988).



Gleichung 1: Reaktionsgleichung der NOS. NADPH/NADP⁺, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, NO-Synthase.

Von der NOS (EC 1.14.13.39) sind drei Isoenzyme bekannt: NOS I (neuronal NOS; nNOS), NOS II (induzierbare NOS; iNOS) und NOS III (endotheliale NOS; eNOS) (Förstermann et al., 1994). NOS I wird konstitutiv in neuronalen und epithelialen Zellen z.B. der Lunge und des Herzens exprimiert, wird durch den Calcium/Calmodulin-Komplex reguliert und spielt eine Rolle in der synaptischen Transmission im zentralen Nervensystem, bei der zentralen Blutdruckregulation, der Relaxation der glatten Muskelzellen, der Vasodilatation via peripherer nitrerger Nerven und bei der Freisetzung der Katecholamine am Herzen (Balligand und Cannon, 1997; Förstermann et al., 1994). NOS II wird unter anderem in Immunzellen exprimiert (Förstermann et al., 1994). Diese Isoform wird nicht durch Calcium reguliert, kann aber durch Lipopolysaccharide und Cytokine induziert werden. Die Zellen produzieren daraufhin große Mengen NO, die z.B. auf parasitische Zellen durch die Reaktion mit eisenhaltigen Enzymen einen zytostatischen Effekt haben können. Die NOS III wird konstitutiv vor allem in endothelialen Zellen exprimiert. Acetylcholin und Scherstress aktivieren die NOS III Calcium- und Calmodulin-vermittelt. Das gebildete NO führt zur Vasodilatation, hemmt die Thrombozyten- und Monozytenadhäsion sowie die Proliferation glatter Muskelzellen (Förstermann et al., 1994). Im Herzen spielt die NOS III u.a. eine Rolle bei der Relaxation in der Diastole (Balligand und Cannon, 1997). Alle Isoformen enthalten Häm, nutzen L-Arg und molekularen Sauerstoff als Substrat und

benötigen die Cofaktoren NADPH, 6(*R*)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Flavinadenindinukleotid und Flavinmononukleotid (Förstermann et al., 1994).

Arginasen (EC 3.5.3.1) beeinflussen indirekt die NO-Bildung, indem sie die intrazelluläre Verfügbarkeit von Arg regulieren. Die Arginase ist eines der fünf Schlüsselenzyme des Harnstoffzyklus, welches Arg in Harnstoff und Ornithin spaltet (Abbildung 2) (Jenkinson et al., 1996). Die Isoform 1 ist vor allem in der Leber, Isoform 2 vor allem in der Niere lokalisiert (Iyer et al., 1998).

3.3. Homoarginin

Homoarginin (hArg) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die sich von Arg durch eine zusätzliche Methylengruppe in der Kohlenstoffkette unterscheidet. Auf Grund der Ähnlichkeit von hArg zum Substrat der NOS, Arg, wird für hArg ebenfalls eine Rolle im NO-Stoffwechsel angenommen. In vivo wird hArg durch die Katalyse der L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT; EC 2.1.4.1) aus Lysin und Arg gebildet (Abbildung 2) (Choe et al., 2013). Schon 1964 beschrieben Ryan et al. Lysin als möglichen Vorläufer von hArg (Ryan und Wells, 1964). Choe et al. bestätigten die Transamidierungsreaktion von Lysin zu hArg im Zellversuch und zeigten außerdem stark erniedrigte hArg-Plasmakonzentrationen in AGAT-defizienten Mäusen, sodass dies als Hauptweg der endogenen hArg-Synthese angenommen wird (Choe et al., 2013). Daneben katalysiert die AGAT die Bildung von Guanidinoacetat aus Arg und Glycin, welches durch Katalyse eines weiteren Enzyms, der Guanidinoacetat-Methyltransferase (EC 2.1.1.2), zum Kreatin methyliert wird (Abbildung 2) (Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000). In humanen Lymphoblasten fanden Davids et al. eine 60-fach höhere Syntheserate der AGAT für Guanidinoacetat, sodass dieser Metabolit als das Hauptprodukt der AGAT-Katalyse angenommen wird (Davids et al., 2012a). Kreatin wird weiter durch die Kreatinkinase zum Phosphokreatin phosphoryliert, welches besonders in Zellen und Geweben mit einem hohen Energieverbrauch als wichtige, schnell verfügbare Energiereserve dient (Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000).

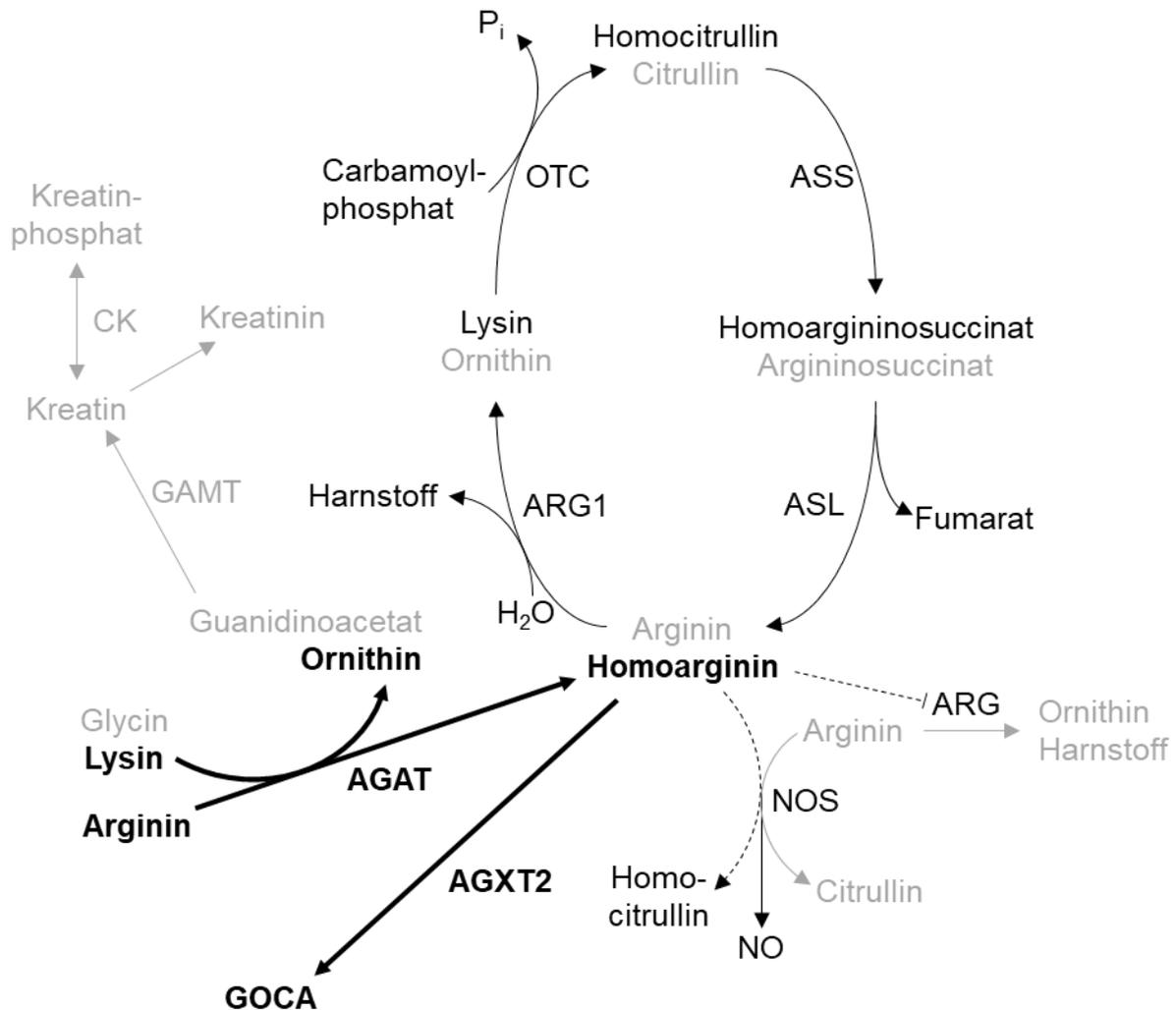


Abbildung 2: Metabolismus von Homocitrullin und assoziierte Stoffwechselwege. AGAT, L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase; AGXT2, Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2; ARG1, Arginase 1; ASL, Argininosuccinat-Lyase; ASS, Argininosuccinat-Synthase; CK, Kreatinkinase; GAMT, Guanidinoacetat-N-Methyltransferase; GOCA, 6-Guanidino-2-oxocapronsäure; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, NO-Synthase; OTC, Ornithin-Transcarbamylase. Modifiziert nach Atzler et al., 2015; Davids et al., 2012a; Rodionov et al., 2016; Valtonen et al., 2008.

Im Jahr 2013 wurde in zwei unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) die AGAT mit den hArg-Plasma- bzw. Serumkonzentrationen assoziiert (Choe et al., 2013; Kleber et al., 2013). Daneben wurde außerdem eine Assoziation mit Genvariationen in den Genloci im Bereich der Carbamoylphosphat-Synthetase I (EC 6.3.4.16), einem Enzym des Harnstoffzyklus, gefunden. Dieser dient in Säugetieren dem Abbau stickstoffhaltiger Substanzen, die nach Metabolisierung als Harnstoff renal ausgeschieden werden (Morris, 2002). Statt Citrullin könnte Homocitrullin von der Argininosuccinat-Synthase (ASS; EC 6.3.4.5) zu Homoargininosuccinat (statt Argininosuccinat) und dieses weiter durch Abspaltung von

Fumarat zu hArg (statt Arg) umgesetzt werden (Abbildung 2) (Davids et al., 2012a; Valtonen et al., 2008). Davids et al. konnten dies im Zellversuch nicht bestätigen und fanden zudem in ASS-defizienten Patienten sogar erhöhte hArg-Plasmakonzentrationen (Davids et al., 2012a). Dies und die stark erniedrigten hArg-Konzentration in AGAT-defizienten Mäusen (Choe et al., 2013) lassen darauf schließen, dass zumindest der Hauptanteil des zirkulierenden hArg durch die Katalyse der AGAT aus Lysin und Arg gebildet wird.

Um einen Zusammenhang zwischen hArg und z.B. kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen, wird die Konzentration in der Regel im Plasma oder Serum gemessen und mit klinischen Parametern assoziiert. Die intraindividuelle Variabilität im Plasma beträgt dabei 14% (Blackwell et al., 2007). Blackwell et al. untersuchten hierfür über einen Zeitraum von 20 Wochen wöchentlich die Konzentrationen in 12 gesunden Probanden (50% männlich; Alter 20-53 Jahre; nüchtern). hArg findet sich in vielen weiteren Kompartimenten und Geweben, z.B. in Urin, Leber, Niere, Skelettmuskel, Fettgewebe, Gehirn und Liquor (Marescau et al., 1992; May et al., 2015; Mori et al., 1982). Die intrazellulären hArg-Konzentrationen können sich von den Plasmakonzentrationen unterscheiden. May et al. fanden z.B. keine Assoziationen der Plasmakonzentrationen mit den Konzentrationen in Fett- oder Muskelgewebe (May et al., 2015). In mononukleären Zellen des peripheren Blutes fanden Davids und Teerlink hingegen eine schwache positive Korrelation ($P=0,055$) mit den Plasmakonzentrationen (Davids und Teerlink, 2013). Insgesamt unterschieden sich die Konzentrationen des Plasmas und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes nicht voneinander. Im Muskelgewebe scheinen dagegen doppelt so hohe Konzentrationen wie im Fettgewebe zu sein (May et al., 2015). Intrazellulär vorhandenes hArg wird entweder intrazellulär synthetisiert oder durch die Plasmamembran in die Zelle transportiert. Das wichtigste Enzym für die hArg-Synthese *in vivo* ist die AGAT, welche vor allem in der Niere, aber auch in zahlreichen anderen Organen wie Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Herz und Lunge exprimiert ist (Bernstein et al., 2015; Cullen et al., 2006). Dabei ist die AGAT-Expression zumindest in manchen Geweben reguliert, möglicherweise zur Erhöhung der lokalen Konzentration der Syntheseprodukte. Im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten ist die AGAT temporär lokal hochreguliert (Cullen et al., 2006). Nach Regeneration der Patienten mit Einstellung einer normalen Herzfunktion sank die AGAT-Expression wieder auf das Level von Herzgesunden. Neben der zellulären Synthese durch die

AGAT wird hArg auch in die Zellen und Gewebe transportiert. In mit hArg supplementierten C57BL/6J-Mäusen korrelierte die hArg-Plasmakonzentration mit der im Myokard gemessenen Konzentration (Atzler et al., 2017). Einen möglichen Transportweg stellen dabei kationische Aminosäuretransporter (CAT) der „*solute carrier family 7*“ dar, mit Hilfe derer kationische L-Aminosäuren wie z.B. Arg und hArg durch Zellmembranen transportiert werden können (Closs et al., 2006). CAT1 kommt mit Ausnahme der Leber im gesamten Körper, z.B. im Gehirn, vor (Bernstein et al., 2015; Closs et al., 2006). CAT2A wird vor allem in der Leber, aber auch in Skelettmuskel und Pankreas exprimiert; CAT2B scheint in Immunzellen von Bedeutung zu sein und CAT3 wird auch in peripheren Geweben exprimiert (Closs et al., 2006). Chafai et al. zeigten in *in vitro*-Experimenten, dass hArg ein Substrat der kationischen Aminosäuretransporter CAT1, CAT2A und CAT2B ist (Chafai et al., 2017). Die hArg-Aufnahme in die Zelle kann dabei z.B. durch Arg, welches ebenfalls über CAT transportiert wird (Strobel et al., 2012), gehemmt werden (Chafai et al., 2017). Während die Hemmkonzentrationen für den CAT2A und CAT2B außerhalb des physiologischen Bereiches liegen, hemmt Arg den Transport von hArg via CAT1 auch in physiologisch relevanten Konzentrationen (100 $\mu\text{mol/L}$ Arg und 2 $\mu\text{mol/L}$ hArg) (Chafai et al., 2017). Andererseits kann hArg, wenn in diesem Experiment auch nur in unphysiologisch hohen Konzentrationen, den Transport von Arg über CAT1, CAT2A und CAT2B hemmen.

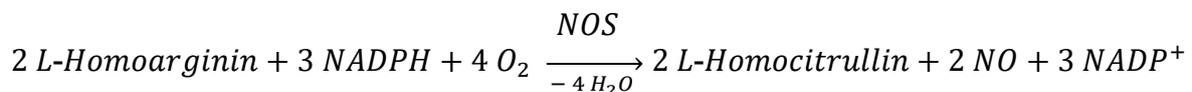
Neben der Assoziation von hArg mit der AGAT wurde in einer GWAS-Analyse außerdem eine Assoziation mit Genvariationen in den Genloci im Bereich der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGXT2; EC 2.6.1.44) gefunden (Kleber et al., 2013). Die AGXT2 ist vor allem in Leber und Nieren exprimiert und katalysiert den Transfer einer Aminogruppe von Alanin auf Glyoxylat (Rodionov et al., 2014). Diese Reaktion ist der Namensgeber für das Enzym, jedoch katalysiert die AGXT2 noch eine Reihe weiterer Reaktionen, beispielsweise wird der NOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ebenfalls über dieses Enzym abgebaut. Kürzlich zeigten Rodionov et al. *in vitro* und *in vivo* eine Umsetzung von hArg durch die AGXT2 zu 6-Guanidino-2-oxocapronsäure (GOCA; Abbildung 2) (Rodionov et al., 2016). *In vitro* fanden sie eine Michaelis-Menten-Konstante (K_m) von 24 mmol/L , zeigten aber trotz des hohen Wertes *in vivo*, dass diese Umsetzung von biologischer Relevanz ist, da AGXT2-defiziente Mäuse erhöhte hArg-Plasmawerte sowie erniedrigtes GOCA aufwiesen und *vice versa* in AGXT2-transgenen Mäusen. Die Umsetzung bestätigten sie durch den Nachweis

von gelabeltem GOCA nach Applikation von $^2\text{H}_4\text{-hArg}$ *in vitro* und *in vivo* in Wildtyp-Mäusen.

3.3.1. Mögliche Interaktionen von Homoarginin im Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel

3.3.1.1. Stickstoffmonoxid-Synthase

Neben der durch die NOS katalysierten Umsetzung von Arg zu Citrullin und NO (Moali et al., 1998; Palmer et al., 1988) könnte die NOS hArg als alternatives Substrat zu Homocitrullin und NO umsetzen (Abbildung 2 und Gleichung 2).



Gleichung 2: Mögliche Reaktionsgleichung der NOS mit hArg als Substrat. NADPH/NADP⁺, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, NO-Synthase.

Chen et al. beschrieben 1993 eine Erhöhung der renalen Ausscheidung von Nitrat, dem Abbauprodukt des NO, nach Infusion äquimolarer Mengen (1,5 mmol/kg Körpergewicht) Arg bzw. hArg in hypertensiven Ratten (Chen und Sanders, 1993). Ebenfalls in Ratten fanden Dellera et al. in Arg- und auch in hArg-supplementierten Ratten erhöhte Nitritkonzentrationen im Serum (Dellera et al., 2016). Pentyala und Rao stellten in Mäusen fest, dass hArg nicht nur ein (wenn auch schwächeres) Substrat der NO-Synthasen darstellt, sondern im Vergleich zu Arg zu einer verlängerten Freisetzung von NO führt (Pentyala und Rao, 1999). Nach intraperitonealer Injektion von Arg bzw. hArg (2 mg/g Körpergewicht) wurden die maximalen Blutnitrat-Konzentrationen mit beiden Aminosäuren nach 2 h erreicht, wobei mit hArg 27% geringere Konzentrationen gemessen wurden. Während nach Applikation von Arg die Nitrat-Konzentration nach 4 h wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte, sank die Nitrat-Konzentration nach Applikation von hArg deutlich langsamer ab. In der selben Arbeit zeigten die Autoren bei einem Probanden nach Einnahme von 2 g hArg über einen Pflanzenextrakt (*Lathyrus sativus*) eine renale Nitrat-Ausscheidung, die auch nach 6-14 h noch um fast das doppelte gesteigert war (Pentyala und Rao, 1999). Moali et al. beschrieben eine Akkumulation des Zwischenproduktes der NO-Synthese N^ω-Hydroxy-L-hArg und einen erhöhten Verbrauch von NADPH während der NO-Bildung aus hArg (Moali et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe konnte nach intraperitonealer

Injektion von gelabeltem hArg in Wildtyp-Mäusen ebenfalls gelabeltes Homocitrullin und Lysin detektieren, was auf eine Umsetzung des hArg zu Homocitrullin durch NOS hindeuten könnte (Rodionov et al., 2016). Für rekombinante NOS aller drei Isoformen fanden Bretscher et al. etwa 10-fach höhere K_m -Werte für hArg im Vergleich zu Arg (Bretscher et al., 2003). Alesutan et al. zeigten zum einen hArg als Substrat der drei NOS-Isoenzyme, zum anderen aber auch eine konzentrationsabhängige, bei physiologischen Konzentrationen bis 10 $\mu\text{mol/L}$ hArg eher schwache Hemmung der Umsetzung von Arg durch die NOS-Isoenzyme (Alesutan et al., 2016).

NOS I (nNOS)

In synaptosomalen cytosolischen Präparationen aus dem Vorderhirn von Ratten betrug die mittlere effektive Konzentration für die NO-vermittelte Aktivierung der Guanylylcyclase für Arg 6 $\mu\text{mol/L}$ und für hArg 174 $\mu\text{mol/L}$ (Knowles et al., 1989). Selbst bei der doppelten Konzentration hArg im Vergleich zur eingesetzten Arg-Konzentration (200 vs. 100 $\mu\text{mol/L}$) betrug die Aktivität der Guanylylcyclase in dieser Arbeit nur 57% der Aktivität des Arg. Pentyala und Rao fanden für die murine nNOS für 100 $\mu\text{mol/L}$ hArg eine halb so hohe Umsatzgeschwindigkeit und einen 7-fach höheren K_m -Wert im Vergleich zum Arg (27 vs. 4 $\mu\text{mol/L}$) (Pentyala und Rao, 1999). In rekombinanter nNOS fanden Moali et al. ähnliche K_m -Werte für hArg und Arg (23 und 3 $\mu\text{mol/L}$) und eine 15-fach höhere Effizienz für Arg als Substrat (Moali et al., 1998).

NOS II (iNOS)

Schon 1987 wurde eine erhöhte Nitrat- und Nitrit-Synthese in aktivierten Makrophagen nach Inkubation sowohl mit Arg, als auch (im geringeren Ausmaße) mit hArg beschrieben (Hibbs et al., 1987; Iyengar et al., 1987). In einer lipopolysaccharidaktivierten Monozyten/Makrophagen-Zelllinie fanden die Autoren für hArg im Vergleich zu Arg eine um 72% niedrigere Aktivität der cytosolischen iNOS und eine um 95% niedrigere Aktivität der membrangebundenen mikrosomalen iNOS (Hecker et al., 1991), wohingegen in Rattenmakrophagen nur eine um 25% niedrigere Aktivität beschrieben wurde (Hrabák et al., 1994). Moali et al. fanden für rekombinante murine iNOS eine 5-fach höhere Effizienz für Arg mit einer niedrigeren Michaelis-Menten-Konstante ($K_m=13 \mu\text{mol/L}$) im Vergleich zum hArg ($K_m=33 \mu\text{mol/L}$) (Moali et al., 1998).

NOS III (eNOS)

In kultivierten endothelialen Zellen zeigte hArg im Vergleich zu Arg 80% der cytosolischen eNOS-Aktivität, jedoch nur 25% für die membrangebundene eNOS (Hecker et al., 1991). Palmer et al. fanden in aus Schweineaorten isolierten Endothelzellen hingegen keinen direkten Effekt von hArg auf die NO-Freisetzung (Palmer et al., 1988).

3.3.1.2. Arginase

Über die Reaktion von hArg mit der Arginase gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. hArg könnte zum einen als Substrat der Arginasen dienen und damit zu Lysin und Harnstoff abgebaut werden, zum anderen könnte es die Arginase inhibieren und damit zu einem verminderten Abbau von Arg führen.

Greenstein et al. fanden hArg (Racemat) als schwaches Substrat mit geringer Hydrolyserate der Ratten-Arginase I, allerdings erst nach verlängerter Inkubationszeit (Greenstein, 1937; Greenstein et al., 1941). Auch eine weitere Arbeit zeigte hArg als schwaches Substrat für die Arginase I aus Rattenleber ($K_m=7,2$ mmol/L) (Reczkowski und Ash, 1994). Arbeiten zur humanen und murinen Arginase I (Berüter et al., 1978; Hrabák et al., 1994; Tommasi et al., 2018) und humanen Arginase II (Colleluori und Ash, 2001; Tommasi et al., 2018) zeigten wiederum keinen Umsatz von hArg durch das Enzym. Nach intraperitonealer Injektion von gelabeltem hArg in Wildtyp-Mäusen konnten Rodionov et al. gelabeltes Homocitrullin und Lysin detektieren, was auf eine Umsetzung des hArg zu Lysin durch Arginasen hindeuten könnte (Rodionov et al., 2016).

Mehrere Arbeiten zeigten eine Hemmung der Arginase I (Hrabák et al., 1994; Ikemoto et al., 1990; Tommasi et al., 2018) und II (Colleluori und Ash, 2001; Tommasi et al., 2018) durch hArg in millimolarer Konzentration. In der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Tommasi et al. zeigten die Autoren bei hArg-Konzentrationen von 1-10 mmol/L eine Hemmung der Arginase I um 30-76% (halbmaximale inhibitorische Konzentration $[IC_{50}]=8,14$ mmol/L) und eine Hemmung der Arginase II um 47-88% ($IC_{50}=2,52$ mmol/L) (Tommasi et al., 2018). Bei physiologischen hArg-Konzentrationen (1-10 μ mol/L) fanden die Autoren hingegen keine signifikante Hemmung der humanen Arginasen. Um zu untersuchen, ob die potentielle Arginase-Hemmung durch hArg auch *in vivo* einen Einfluss hat, bestimmten sie hArg, Lysin, Arg und Ornithin im

Plasma von 50 Gesunden (Median Alter 70 Jahre, 54% männlich) (Tommasi et al., 2018). Adjustiert für das Alter, Geschlecht und die Nierenfunktion fanden sie keinen Zusammenhang der hArg-Plasmakonzentration mit Lysin, Arg, Ornithin oder dem Arg/Ornithin-Verhältnis, welches eine indirekte Messung der Arginase-Aktivität und damit die relative Arginin-Bioverfügbarkeit darstellt. Die Autoren nehmen daher an, dass die Hemmung der Arginase durch hArg *in vivo* weder von biologischer noch von klinischer Relevanz sei (Tommasi et al., 2018).

3.3.2. Bedeutung des Homoarginins als kardiovaskulärer Risikomarker

Niedriges hArg wurde in den letzten Jahren als Biomarker für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen identifiziert (Atzler et al., 2015; Pilz et al., 2015). In unterschiedlichen Patientenkollektiven zeigte sich ein Zusammenhang zwischen niedrigem hArg und einem erhöhten Risiko der Gesamtmortalität (Atzler et al., 2016c, 2013; Choe et al., 2013; Drechsler et al., 2015; März et al., 2010; Pilz et al., 2011a; Vogl et al., 2015). Herzinsuffizienzpatienten hatten beispielsweise pro Anstieg der Plasmakonzentration um 1,55 $\mu\text{mol/L}$ hArg (anti-log) ein um 28% erniedrigtes Risiko, innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Jahren zu versterben (Atzler et al., 2013). Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) hatten pro Erhöhung des hArg um 0,35 $\mu\text{mol/L}$ sogar ein um 41% reduziertes Risiko innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7 Jahren zu versterben (Vogl et al., 2015). In Patienten mit behandlungsnaiver pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) sank das Mortalitätsrisiko pro Anstieg der Plasmakonzentration um 0,66 $\mu\text{mol/L}$ um 49%, in Patienten mit idiopathischer PAH sogar um 59% (Atzler et al., 2016c). Pilz et al. zeigten in einer populationsbasierten Studie mit älteren Teilnehmern eines mittleren Alters von 70 Jahren ein 2-faches Risiko für die Sterblichkeit bei den Teilnehmern im unteren Quartil verglichen mit denen der höheren Quartile (Pilz et al., 2014b). In dieser Population war das Risiko der kardiovaskulären Mortalität bei niedrigem hArg sogar um den Faktor 3,8 erhöht. Auch dialysepflichtige Diabetiker hatten ein höheres Mortalitätsrisiko (1,7-fach) beim Vergleich des unteren Quartils mit dem oberen Quartil (März et al., 2010). Vogl et al. fanden in männlichen pAVK-Patienten insgesamt niedrigere hArg-Serumkonzentrationen als in alters- und Typ 2 Diabetes-gematchten Kontrollen ($1,77 \pm 0,65$ vs. $2,01 \pm 0,96$ $\mu\text{mol/L}$; Mittelwert \pm Standardabweichung) (Vogl et al., 2015). Patienten, die während des Beobachtungszeitraumes von 7 Jahren verstarben, hatten dabei niedrigeres hArg verglichen mit den Überlebenden ($1,52 \pm 0,61$

vs. $1,81 \pm 0,65 \mu\text{mol/L}$; Mittelwert \pm Standardabweichung). Insgesamt hatten die Patienten ein 41% niedrigeres Risiko für die Gesamtmortalität bei einem Anstieg der Plasmakonzentration um $0,35 \mu\text{mol/L}$ hArg. In einer weiteren Studie mit pAVK-Patienten fanden Hafner et al. ebenfalls geringfügig niedrigeres hArg in den Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 8,3 Jahren verstarben ($1,43$ [$1,00$ - $1,84$] vs. $1,63$ [$1,24$ - $2,07$]; $P=0,05$; Median [Interquartilsbereich, IQR]) (Hafner et al., 2014).

3.3.2.1. Stabile koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom

Bei der stabilen KHK liegen atherosklerotische und / oder funktionelle Veränderungen der epikardialen Gefäße bzw. der Mikrozirkulation vor, die zu einem Ungleichgewicht zwischen Energiebedarf und -bereitstellung des Myokards führen (Montalescot et al., 2013). Die stabilen (a)symptomatischen Phasen bei dieser Erkrankung können hierbei von einem akuten Koronarsyndrom (ACS; s.u.) unterbrochen werden. Gelangt der Patient wieder in einen Zustand gleichbleibender Symptomatik, wird der Patient wieder als „stabile KHK“ klassifiziert. Das Leitsymptom einer stabilen KHK, retrosternaler Brustdruck, wird in der Regel durch z.B. körperliche Belastung der Patienten ausgelöst und bessert sich in der Regel durch Ruhe und / oder den Einsatz von Nitraten innerhalb von Minuten. Auch beim ACS ist das Leitsymptom der Thoraxschmerz (Roffi et al., 2016). Man unterteilt ACS-Patienten weiter in drei Gruppen: i) Patienten mit instabiler Angina pectoris (IAP) ohne Elektrokardiogramm (EKG)-Veränderung und ohne erhöhtes hochsensitives Troponin T (hsTnT), ii) Patienten ohne persistierende ST-Strecken-Hebung im EKG mit erhöhtem hsTnT (NSTEMI) und iii) Patienten mit persistierender ST-Strecken-Hebung und erhöhtem hsTnT (STEMI). Die IAP ist charakterisiert durch eine myokardiale Ischämie in Ruhe oder bei minimaler Betätigung ohne Kardiomyozytennekrose. Im Gegensatz zu den MI-Patienten (STEMI und NSTEMI) zeigen IAP-Patienten ein geringeres Mortalitätsrisiko und profitieren weniger vom Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern oder invasiven Maßnahmen.

In einer Studie mit unter Brustschmerz leidenden Patienten, von denen 36% unter einem ACS litten, war die hArg-Konzentration tendenziell niedriger in MI-Patienten ($2,34$ [$1,80$ - $2,92$] $\mu\text{mol/L}$; Median [IQR]) als in Patienten mit IAP ($2,40$ [$1,95$ - $3,05$] $\mu\text{mol/L}$) oder nicht-kardialen Brustschmerz ($2,40$ [$1,86$ - $3,05$] $\mu\text{mol/L}$) (Atzler et al., 2016b). Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 183 Tagen verstarben, einen MI oder Schlaganfall erlitten, wiesen dabei niedrigere hArg-Konzentrationen auf als die Patienten ohne eines dieser Ereignisse ($2,09$ [$1,48$ - $2,77$] vs. $2,39$ [$1,87$ - $3,01$] $\mu\text{mol/L}$).

Pro Anstieg des logarithmisch transformierten hArg um 0,37 hatten die Patienten der gesamten Kohorte ein 26% niedrigeres Risiko für diesen kombinierten Endpunkt, während das Risiko in den ACS-Patienten sogar um 35% erniedrigt war. In einer Studie mit KHK-Patienten, die sich routinemäßig einer Koronarangiographie unterzogen, hatten die Patienten im unteren Quartil der hArg-Konzentration ($<1,85 \mu\text{mol/L}$) im Vergleich zu den Patienten im obersten Quartil ($>3,1 \mu\text{mol/L}$) ein 2,7-faches (März et al., 2010) bzw. 2,1-faches (Pilz et al., 2011a) Risiko für die Gesamtmortalität innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7,7 bzw. 9,9 Jahren. In beiden Analysen fanden die Autoren ein noch stärkeres Risiko (~ 3 -fach) für die kardiovaskuläre Mortalität. In einer Subgruppenanalyse dieser Kohorte fanden Tomaschitz et al. einen stärkeren Zusammenhang in Patienten mit einer reduzierten Nierenfunktion (Tomaschitz et al., 2014). Mit steigender hArg-Serumkonzentration fanden sie in Patienten mit einer Nierenfunktion $\geq 60 \text{ mL/min}$ ein 12% niedrigeres Risiko für kardiovaskuläre Mortalität, während Patienten mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) $< 60 \text{ mL/min}$ sogar ein um 22% niedrigeres Risiko aufwiesen. Das Risiko eines fatalen MI war in dieser Kohorte mit steigendem hArg sogar um 42% reduziert (Pilz et al., 2011a). Patienten im unteren Quartil ($<1,84 \mu\text{mol/L}$) wiesen dabei ein fast 4-faches Risiko für fatale MI auf, verglichen mit den Patienten im höchsten Quartil ($>3,09 \mu\text{mol/L}$). In der populationsbasierten Dallas Heart Studie (DHS) mit 3.514 Teilnehmern zeigte sich dagegen keine Assoziation niedriger hArg-Plasmakonzentrationen mit vorherigen MI (Atzler et al., 2014a).

3.3.2.2. Schlaganfall und Schlaganfallrisiko

Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall weisen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung erniedrigte hArg-Plasmakonzentrationen auf ($1,07 [0,74] \mu\text{mol/L}$; Median [IQR]; Leeds Stroke Studie) (Atzler et al., 2016a; Choe et al., 2013). Patienten, die während des Beobachtungszeitraumes von 7,4 Jahren verstarben, hatten niedrigere hArg-Werte verglichen mit den Überlebenden ($0,96 [0,64]$ vs. $1,27 [0,72] \mu\text{mol/L}$) (Choe et al., 2013). Die Patienten hatten pro Anstieg der Plasmakonzentration um $0,22 \mu\text{mol/L}$ hArg (anti-log) ein um 21% niedrigeres Risiko, innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu versterben (Choe et al., 2013). In der Harburg Stroke Studie hatten die Patienten, die während des Beobachtungszeitraumes von 30 Tagen verstarben, ins Krankenhaus eingeliefert wurden, einen MI oder erneut einen Schlaganfall erlitten, im Vergleich zu den

Patienten ohne Ereignis erniedrigte hArg-Konzentrationen (1,48 [1,01] $\mu\text{mol/L}$ vs. 1,93 [1,04] $\mu\text{mol/L}$). Die Patienten hatten pro Anstieg der Plasmakonzentration um 1,65 $\mu\text{mol/L}$ hArg (anti-log) eine um 31% niedrigere Wahrscheinlichkeit für diesen kombinierten Endpunkt. In einer Studie mit 3.305 KHK-Patienten, die sich routinemäßig einer Koronarangiographie unterzogen, fanden die Autoren pro Anstieg der hArg-Konzentration um 1,05 $\mu\text{mol/L}$ eine 38% niedrigere Wahrscheinlichkeit für fatale Schlaganfälle im Beobachtungszeitraum von 9,9 Jahren und eine um 18% niedrigere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen vorheriger nicht-tödlicher zerebrovaskulärer Erkrankungen (Pilz et al., 2011b). In dialysepflichtigen Typ 2 Diabetes-Patienten fanden Drechsler et al. während eines Beobachtungszeitraumes von 4 Jahren in univariaten Analysen einen Zusammenhang niedriger hArg-Konzentrationen mit dem Auftreten von Schlaganfällen, was jedoch im multivariaten Modell nicht mehr signifikant war (Drechsler et al., 2011). In 829 Patienten nach Nierentransplantation fanden ebenfalls Drechsler et al. tendenziell ein niedrigeres Risiko für zerebrovaskuläre Events mit steigender hArg-Konzentration (Hazard Ratio, HR [95% Konfidenzintervall, CI] 0,72 [0,46-1,12]), in der kategorialen Analyse zeigten Patienten mit hArg-Konzentrationen im untersten Quartil ($\leq 1,40$ $\mu\text{mol/L}$) ein fast 3-faches Risiko für zerebrovaskuläre Events, verglichen mit den Patienten im obersten Quartil ($> 2,34$ $\mu\text{mol/L}$) (Drechsler et al., 2015). Auch in der populationsbasierten DHS-Studie mit 3.514 Teilnehmern zeigte sich eine Assoziation niedriger hArg-Plasmakonzentrationen mit vorherigen Schlaganfällen (Atzler et al., 2014a).

3.3.2.3. Hypertrophe Kardiomyopathie

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist durch eine erhöhte Wanddicke des linken Ventrikels definiert und tritt im Erwachsenenalter mit einer Prävalenz von 0,02-0,23% auf (Elliott et al., 2014). Dabei liegen bei bis zu 60% der Patienten autosomal dominant vererbte Mutationen kardialer Sarkomerproteine vor. Am Häufigsten liegen die Mutationen dabei in den Genen, die für die „*beta-myosin heavy chain*“ oder das „*myosin binding protein C*“ kodieren. Einige HCM-Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine diastolische Dysfunktion (DD). Eine DD gehört zu den prädisponierenden Faktoren von Vorhofflimmern (VHF), welches zu den häufigsten Arrhythmien zählt, die in HCM-Patienten auftreten (Elliott et al., 2014). Pilz et al. fanden in einer Studie mit Patienten mit DD oder DD-Risiko einen Zusammenhang von niedrigem hArg mit dem Vorliegen einer DD in den Patienten (Pilz et al., 2014a). Die

Symptome einer DD unterscheiden sich nicht von denen einer systolischen Herzinsuffizienz und die Einteilung der Patienten erfolgt hier ebenfalls nach der NYHA-Klassifikation. Als therapeutische Option zur Reduktion der Herzinsuffizienzsymptome werden in der aktuellen Leitlinie Betablocker, Verapamil oder Diltiazem sowie Schleifen- und Thiaziddiuretika empfohlen (Elliott et al., 2014), wobei keine Pharmakotherapie bisher das Überleben verlängerte oder das Mortalitätsrisiko senkte (Andries et al., 2018).

3.3.2.4. Chronisch-intermittierende Hypoxie in der Höhe

In der Höhe findet sich ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck, wodurch der Sauerstoffpartialdruck des Blutes ebenfalls absinkt und gleichzeitig die messbare Sauerstoffsättigung im Blut abnimmt (Grocott et al., 2009). Zur Gegenregulation der Unterversorgung mit Sauerstoff kommt es zur Aktivierung des Atemzentrums mit einer Hyperventilation, die wiederum durch vermehrtes Abatmen von Kohlendioxid eine respiratorische Alkalose zur Folge haben kann (Bärtsch und Gibbs, 2007). Verschiedene Mechanismen scheinen die Sauerstoffversorgung der Gewebe lokal zu regulieren, darunter auch die Freisetzung von NO. Im großen Kreislauf kommt es zu einer Vasodilatation und durch eine Aktivierung des Sympathikotonus erhöhen sich der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz. Im Lungenkreislauf kommt es hingegen zu einer Vasokonstriktion der Lungengefäße mit einer Druckerhöhung (Euler und Liljestrand, 1946). Unter hypobaren hypoxischen Bedingungen, z.B. beim Aufenthalt in großen Höhen, kann eine pulmonale Hypertonie (PH) ausgelöst werden (Galiè et al., 2016). In einer Studie mit behandlungsnaiven PAH-Patienten korrelierte hArg invers mit den Druckverhältnissen im Lungenkreislauf und war mit einem niedrigeren Mortalitätsrisiko assoziiert (Atzler et al., 2016c).

3.3.3. Homoargininquellen

3.3.3.1. Pflanzen

Endogenes hArg stammt vermutlich nicht nur aus der körpereigenen Biosynthese, sondern kann auch z.B. über die Nahrung aufgenommen werden. hArg ist ein Bestandteil von verschiedenen Arten der Platterbsen (z.B. *Lathyrus sativus*) (Bell, 1962a, 1962b, 1962c; Rao et al., 1963) und Linsensamen (z.B. *Lens Culinaris*) (Rozaan et al., 2001; Sulser und Sager, 1976). hArg könnte in den Pflanzen z.B. als

3.3.4. Bestimmungsmethoden für Homoarginin

In der Literatur sind mittlerweile viele verschiedene Methoden für die Quantifizierung von hArg in Plasma- und Serumproben beschrieben. Die für die im Folgenden beschriebenen Methoden ermittelten hArg-Serum- oder Plasmakonzentrationen gesunder Kontrollen reichen im Mittel von 0,77 $\mu\text{mol/L}$ (Di Gangi et al., 2010) bis 2,58 $\mu\text{mol/L}$ (Meinitzer et al., 2007). In den neueren Methoden findet zunächst eine Auftrennung der Analyten bzw. Abtrennung des Analyten von Matrixbestandteilen durch eine chromatographische Methode wie der Flüssig (LC)- oder Gaschromatographie (GC) statt, gefolgt von einer Detektionsmethode wie der Massenspektrometrie (MS) oder Fluoreszenzdetektion. Nach der Methode von Jones et al. folgt nach einer Festphasenextraktion an einer Kationenaustauschersäule eine Derivatisierung des hArg mit 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbammat (Jones et al., 2010). Die Auftrennung der Analyten erfolgt durch eine Umkehrphasen (rp)-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit anschließender Fluoreszenzdetektion. Andere Methoden schließen ebenfalls eine Festphasenextraktion mit einer Kationenaustauschersäule in die Probenvorbereitung ein, mit anschließender Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd, Auftrennung mittels rp-HPLC und Fluoreszenzdetektion (Blackwell et al., 2007; Meinitzer et al., 2007; Teerlink et al., 2002; Valtonen et al., 2005). Eingesetzt werden in diesen Methoden 100 μL (Jones et al., 2010; Meinitzer et al., 2007) bis 200 μL (Blackwell et al., 2007; Teerlink et al., 2002; Valtonen et al., 2005) Probenvolumen und die Laufzeit beträgt 30 min (Meinitzer et al., 2007; Teerlink et al., 2002) bis 52 min (Jones et al., 2010). Davids et al. nutzen für ihre rp-HPLC-Methode bei einem eingesetzten Probenvolumen von 200 μL ebenfalls eine Festphasenextraktion mit einer Kationenaustauschersäule zur Probenvorbereitung, derivatisieren die Analyten zu ihren *O*-Butylesterderivaten mit einer anschließenden Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) (Davids et al., 2012b). Die Laufzeit ist mit 10 min deutlich kürzer als die der zuvor beschriebenen Methoden. Atzler et al. und Di Gangi et al. beschreiben Methoden, die ebenfalls die *O*-Butylesterderivate mittels MS/MS analysieren, in der Probenvorbereitung aber statt einer Festphasenextraktionsmethode eine Proteinpräzipitation nutzen (Atzler et al., 2011; Di Gangi et al., 2010). Während bei der rp-HPLC-MS/MS-Methode von Atzler et al. ein Probenvolumen von 25 μL und eine Laufzeit von 4 min benötigt wird (Atzler et al., 2011), kommt die rp-Ultrahochleistungsflüssigchromatographie (UPLC)-MS/MS-Methode von Di Gangi et

al. mit 10 µL Probenvolumen und einer Laufzeit von nur 1,9 min aus (Di Gangi et al., 2010). Andere Methoden kommen wiederum ohne Derivatisierung aus und schließen der Probenvorbereitung mit einer Proteinpräzipitation direkt die chromatographische Trennung an (Midttun et al., 2013; van Dyk et al., 2015). In der rp-HPLC-MS/MS-Methode von Midttun et al. werden bei einer Laufzeit von 3,4 min 45 µL Probe eingesetzt (Midttun et al., 2013), van Dyk et al. setzen in ihrer rp-UPLC-MS-Methode 50 µL Probe bei einer Laufzeit von 6 min ein (van Dyk et al., 2015). Kayacelebi et al. beschrieben eine Methode mit einer Auftrennung der Analyten mittels GC (Kayacelebi et al., 2014). Hierfür werden 10 µL Probe einer Ultrafiltration unterzogen und die Analyten in zwei Schritten zunächst zu ihren O-Methylesterderivaten, anschließend mit Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA) derivatisiert. Bei einer Laufzeit von 13,2 min folgt die Analyse mittels MS oder MS/MS. Hanf et al. modifizierten diese GC-MS-Methode, indem sie die Ultrafiltration durch eine Proteinpräzipitation in der Probenvorbereitung ersetzen und die Laufzeit auf 11,6 min reduzierten (Hanff et al., 2016). Weiter unterscheiden sich die beschriebenen Methoden durch die Wahl des jeweils eingesetzten internen Standards (IS), welcher zur quantitativen Erfassung möglicher Verluste des Analyten (hier: hArg) während der Probenvorbereitung eingesetzt wird. Während Jones et al. *N*-Propyl-L-Arg und Blackwell et al. Monoethyl-Arg als IS nutzten (Blackwell et al., 2007; Jones et al., 2010), wurde in den anderen hier beschriebenen chromatographischen Methoden mit Fluoreszenzdetektion *N*^G-Methyl-L-Arg als IS gewählt (Meinitzer et al., 2007; Teerlink et al., 2002; Valtonen et al., 2005). *N*^G-Methyl-L-Arg kommt dabei auch endogen im Plasma vor, jedoch in so geringer Konzentration, dass die Autoren von einer Ungenauigkeit <1% durch diesen Umstand ausgehen (Meinitzer et al., 2007). Interessanterweise wurde auch hArg in der Vergangenheit in einigen Methoden als IS bei der Quantifizierung von Arg und den methylierten Arg-Derivaten *N*^G,*N*^G-Dimethylarginin (ADMA) und *N*^G,*N*^G-Dimethylarginin (symmetrisches Dimethylarginin, SDMA) eingesetzt (Schwedhelm, 2005), was bei einer interindividuellen Variabilität der hArg-Plasmawerte im Gesunden von 37,8% (Blackwell et al., 2007) und Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich durchaus die Ergebnisse der bestimmten Parameter beeinflusst haben könnte. Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen MS-gekoppelten Methoden wurden isotopisch markierte Verbindungen von Arg, ADMA und hArg als IS für die quantitative Bestimmung von hArg eingesetzt. Di Gangi et al. nutzten für ihre UPLC-MS/MS-Methode ¹³C₁²H₄-Arg als IS (Di Gangi et al., 2010), van Dyk et al. für ihre

UPLC-MS-Methode $^2\text{H}_6$ -ADMA (van Dyk et al., 2015) und Atzler et al., Davids et al. sowie Middtun et al. für ihre HPLC-MS/MS-Methoden Isotopen-markiertes hArg ($^{13}\text{C}_6$ -hArg, $^2\text{H}_4$ -L-hArg und $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -hArg) (Atzler et al., 2011; Davids et al., 2012b; Middtun et al., 2013). Kayacelebi et al. und Hanff et al. stellten den bei ihrer GC-MS(/MS)-Methode genutzten IS $^2\text{H}_3$ -O-Methyl-hArg *de novo* während der ersten Derivatisierung zu den O-Methylesterderivaten her, indem sie hier statt Methanol deuteriertes Methanol einsetzten (Hanff et al., 2016; Kayacelebi et al., 2014). Neben diesen chromatographischen Methoden ist ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Quantifizierung von hArg kommerziell von der Firma DLD Diagnostika GmbH erhältlich. Hier erfolgt die Bestimmung des Analyten nach vorhergehenden Antigen (hArg)-Antikörper-Reaktionen und der Gebrauch eines IS ist bei dieser Methode nicht anwendbar, jedoch beschreiben die Hersteller niedrige Kreuzreaktivitäten $<0,03\%$ von hArg mit Arg und den Arg-Analoga ADMA, SDMA und N^G -Monomethyl-Arg (DLD Diagnostika GmbH, 2014).

3.4. Zielsetzung

In der Literatur sind bereits viele verschiedene Methoden zur quantitativen Messung des kardiovaskulären Risikomarkers hArg beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Methoden bezüglich ihrer biologischen Anwendbarkeit miteinander zu vergleichen. Hierzu wurde eine Studie mit ACS- und KHK-Patienten untersucht. Zudem sollten hArg-Referenzwerte in der gesunden Bevölkerung für die ELISA-Methode bestimmt werden. Die erhaltenen Ergebnisse dienen als Grundlage für die Entwicklung eines ELISA-Schnelltestes, mit dem die schnelle Identifikation von Patienten mit einer niedrigen hArg-Konzentration in der Klinik möglich ist.

Des Weiteren sollte die Bedeutung von hArg als Risikomarker in verschiedenen Kollektiven mit zerebrovaskulären und kardiovaskulären Erkrankungen untersucht werden. Dazu wurde in einer Studie mit Schlaganfall(risiko)patienten untersucht, ob hArg mit verschiedenen Schlaganfallssubtypen oder der Ätiologie, z.B. einer Atherosklerose der *Carotis interna* oder Vorhofflimmern (VHF) assoziiert ist. Desweiteren wurden in einer Kohorte von HCM-Patienten mögliche Assoziationen der hArg-Plasmakonzentration mit dem Vorliegen einer DD und deren klinischen echokardiographischen Parametern sowie VHF untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien könnten Hinweise darauf geben, ob eine Supplementation mit hArg in Patienten mit einem Schlaganfall sowie einem Schlaganfallrisiko oder HCM-Patienten mit DD möglicherweise einen positiven Effekt auf die Pathogenese bzw. Symptomatik haben könnte. Bei einem Aufenthalt in der Höhe besteht die Gefahr der Entwicklung einer PH. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die hArg-Konzentration in einer gesunden Kohorte chilenischer Soldaten durch eine chronisch-intermittierende Hypoxie beeinflusst wird.

4. Methoden

4.1. Bestimmung von Homoarginin

4.1.1. LC-MS/MS

4.1.1.1. Prinzip

Die Quantifizierung von hArg mit LC-MS/MS erfolgte nach Atzler et al. (2011). Das verwendete Equipment setzte sich aus einer HPLC-Anlage mit zwei Varian ProStar model 210 HPLC Pumpen und einem Varian 1200 L Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zusammen (Agilent Technologies; Abbildung 4). Nach einer Proteinfällung und Derivatisierung zu den *O*-Butylesterderivaten werden die Analyten hierbei zunächst in der HPLC von Matrixbestandteilen der Probe getrennt. Der Flüssigkeitsstrom wird vernebelt und die Analyten in der Ionenquelle ionisiert (positive Elektrospray-Ionisation, ESI⁺). Die positiv geladenen Moleküle gelangen dann durch Beschleunigung im elektrischen Feld in einen Massenanalysator, in dem die Analyten nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) separiert werden. Durch Kollision mit dem Edelgas Argon fragmentieren die Analyten zu kleineren Bruchstücken. Eines dieser Fragmente wird in einem weiteren Massenanalysator separiert und zum Detektor geleitet.

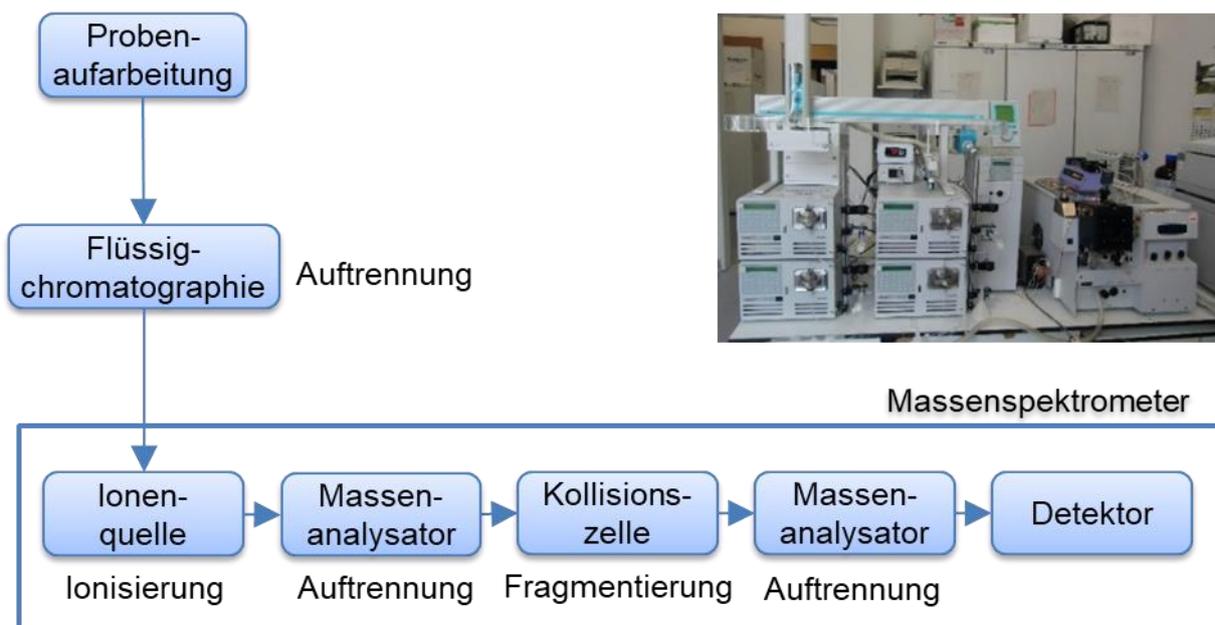


Abbildung 4: Prinzip der LC-MS/MS-Methode. Foto: HPLC-Anlage mit Varian CTC PAL Autosampler und zwei Varian ProStar model 210 HPLC Pumpen und 1200 L Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent Technologies) des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

4.1.1.2. Plasmadialyse

Zur Gewinnung von dialysiertem Plasma für die Herstellung der Kalibratoren und Kontrollen der LC-MS/MS-Methode wurden 6 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Monovetten (à 9 mL) 20 min bei 4 °C und 2.000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde gepoolt und 12-30 mL für die Plasmadialyse verwendet. Es wurden 1-1,5 L einer 0,9%igen NaCl-Lösung in ein 2 L Becherglas vorgelegt und die Dialyse-Kassette (ThermoScientific) für ca. 2 min zum Benetzen eingetaucht. Das Plasma wurde mit Hilfe einer 22 G-Kanüle langsam zwischen die Membranen gebracht. Die Kassette wurde in die NaCl-Lösung gebracht und mit einem Magnetrührer eine leichte Zirkulation der Kassette eingestellt. Die Plasmadialyse fand über 96 h bei 4 °C statt. Dabei wurde die NaCl-Lösung nach 12, 24, 36, 48 und 72 h erneuert. Im erhaltenen dialysierten Plasma wurde die hArg-Konzentration bestimmt.

4.1.1.3. Probenaufarbeitung

Es wurden 100 µL einer Lösung des IS ($^{13}\text{C}_6$ - bzw. $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_7$ - hArg, finale Konzentration 10 µmol/L) in Methanol in eine 96-Well-Filterplatte (0,22 µm MultiScreen, Millipore), die auf einer U-96-Well-Polypropylenplatte platziert war, vorgelegt. Nach Zugabe von 25 µL Kalibrierlösung (0 – 2 – 5 – 10 bzw. 0 – 1 – 5 – 10 µmol/L hArg in dialysiertem Plasma), Plasma-/Serumprobe oder Qualitätskontrolle (2 – 5 µmol/L hArg in dialysiertem Plasma) wurde die Platte 15 min bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler geschüttelt (Proteinfällung) und im Anschluss 20 min bei 800 x g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde dann bei 80 °C innerhalb von ca. 30 min auf einem 96-Well-Aluminium-Heizblock abgedampft. Die Derivatisierung zu den O-Butylesterderivaten erfolgte abgedeckt mit einer Abdeckmatte durch Zugabe von 100 µL 1 mol/L HCl in 1-Butanol und einer Inkubation bei 65 ± 2 °C für 30 min. Nach kurzem Zentrifugieren (1 min bei 800 x g) wurde die Flüssigkeit bei 75 °C im Heizblock innerhalb von ca. 60 min abgedampft. Der Rückstand wurde in 100 µL Probenpuffer (Methanol/Wasser 25/75 [v/v] + 0,1% Ammoniumformiat, pH 5 mit Ameisensäure eingestellt) aufgenommen, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt, in eine Filterplatte übertragen und erneut zentrifugiert (10 min bei 800 x g).

4.1.1.4. Flüssigchromatographie

22 µL der aufbereiteten Probe wurden mittels eines Autosamplers in das Gerät injiziert. Die HPLC-Pumpen wurden auf eine Flussrate von 0,3 mL/min eingestellt. Die Ofentemperatur lag bei 30 °C. Die Trennung der Analyten von Matrixbestandteilen erfolgte auf einer Polaris C18-Ether-Säule (50x2,0 mm; Agilent Technologies) mit einem Fließmittelgradienten bestehend aus (A) 0,1% Ameisensäure in Wasser und (B) Acetonitril/Methanol (50/50, v/v) + 0,1% Ameisensäure. Die Zusammensetzung des Fließmittels über die Zeit ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Fließmittelgradient der LC-MS/MS-Methode.

Zeit (Minuten: Sekunden)	A (Volumen-%)	B (Volumen-%)
0:00	95	5
0:30	95	5
2:00	50	50
2:01	95	5
4:00	95	5

A, 0,1% Ameisensäure in Wasser; B, Acetonitril/Methanol (50/50; v/v) + 0,1% Ameisensäure.

4.1.1.5. Massenspektrometrie

Der Flüssigkeitsstrom wurde in das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer geleitet und die Analyten im ESI⁺-Modus ionisiert. Als Vernebelungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff (250 °C; 90 und 180 L/h) eingesetzt. Zur Erzeugung der positiv geladenen Ionen wurden eine Nadel- und Schildspannung von 5.000 und 600 Volt angelegt. Die Fragmentierung mittels kollisionsinduzierter Dissoziation wurde mit Argon (2 Pa) bei einer Kollisionsenergie von 14 eV erreicht. Die Messzeit pro Analyt (Dwell-Zeit) wurde auf 0,5 Sekunden gesetzt. Die Messung erfolgte im „Multiple Reaction Monitoring“-Modus, wobei für hArg der Massenübergang m/z 245→211 gewählt wurde, für ¹³C₆-hArg m/z 251→217 und für ¹⁵N₄¹³C₇-hArg m/z 256→220.

4.1.1.6. Auswertung

Es wurden die Peakflächen („area under the curve“, AUC) von hArg sowie IS mit Hilfe der Software MS Data Review® (Varian MS Workstation Version 6.6; Agilent Technologies) bestimmt und die Peakflächen miteinander ins Verhältnis gesetzt. Es

wurde eine Kalibrierkurve erstellt (Abbildung 5) und die Analytkonzentrationen nach Gleichung 3 berechnet.

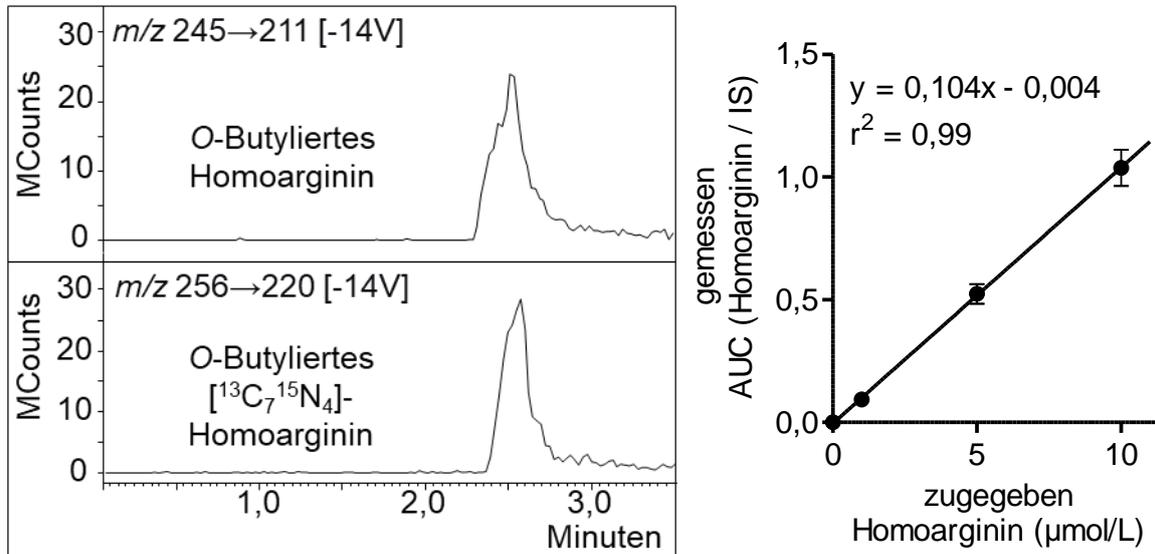


Abbildung 5: Chromatogramme und Kalibrierkurve der LC-MS/MS-Methode. Links: LC-MS/MS-Chromatogramme von O-butyliertem hArg (oben) und O-butyliertem $^{15}\text{N}_4$ $^{13}\text{C}_7$ -Homoarginin (unten). Rechts: Beispiel einer Kalibriergeraden der LC-MS/MS-Methode. AUC, Fläche unter der Kurve; IS, interner Standard (hier: $^{15}\text{N}_4$ $^{13}\text{C}_7$ -Homoarginin); m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

$$\text{Homoarginin } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{AUC (Homoarginin/IS)}}{\text{Steigung}} - \text{Schnittpunkt mit der y-Achse}$$

Gleichung 3: Berechnung der hArg-Konzentration aus der Kalibriergeraden. AUC, Fläche unter der Kurve; IS, interner Standard.

4.1.1.7. Aufnahme von Massenspektren

Tandem-Massenspektren wurden nach Injektion von 10 μL einer Lösung von O-butyliertem hArg bzw. N^ϵ -Trimethyllysin (10 $\mu\text{mol/L}$ in Methanol/Wasser, 25/75, v/v) in das Massenspektrometer aufgenommen. Aufgezeichnet wurden die Tochterionen des Mutterions mit dem $m/z=245$ im „Full scan“-Modus. Nadel- und Schildspannung für die ESI⁺ waren 5.000 und 600 V, die Kollisionsenergie des Argons lag bei 14 eV.

4.1.2. GC-MS

4.1.2.1. Prinzip

Die Messung der hArg-Konzentration mittels GC-MS wurde im Institut für Toxikologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. Dimitrios Tsikas) an einem 1310 Gaschromatographen, ausgestattet mit einem AS 1310 Autosampler und gekoppelt an

ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer (Modell ISQ; alles von ThermoFisher) durchgeführt (Abbildung 6). Hierfür wurde eine von der Arbeitsgruppe bereits publizierte Methode modifiziert (Kayacelebi et al., 2014). Nach einer Proteinfällung und Derivatisierung zu ihren O-Methylesterderivaten folgt eine zweite Derivatisierung zu den Pentafluoropropionsäure(PFP)amiden. Durch diese Modifikation gelingt es, die Analyten der GC zugänglich zu machen, bei der eine Trennung von anderen Matrixbestandteilen stattfindet. In der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehen durch chemische Ionisierung (Einleitung des Reaktantgases Methan) stabile, negativ geladene Ionen, welche im Massenanalysator separiert und zum Detektor geleitet werden.

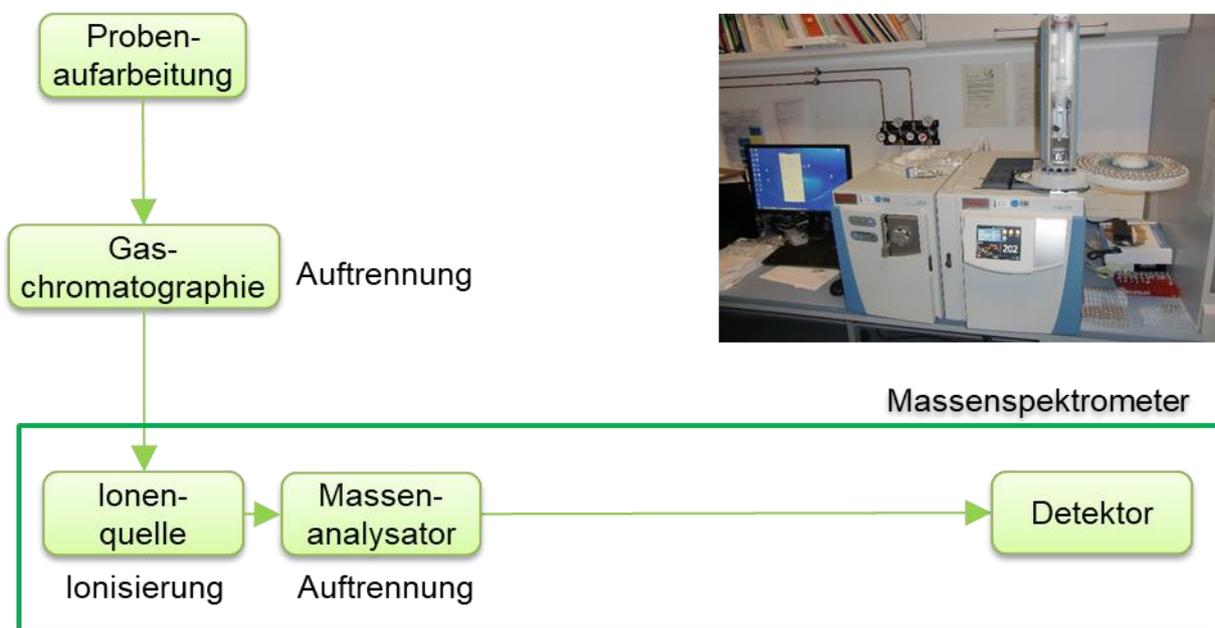


Abbildung 6: Prinzip der GC-MS-Methode mit Quadrupol-Massenspektrometer. Foto: 1310 Gaschromatograph mit Autosampler AS 1310 und Quadrupol Massenspektrometer ISQ von ThermoFisher des Institutes für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover (Prof. Dr. Dimitrios Tsikas).

4.1.2.2. Probenaufarbeitung

Es wurden 10 µL Plasma mit 50 µL einer eiskalten Lösung des IS (1 µmol/L $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -hArg in 2 mol/L HCl in Methanol) in ein Glasgefäß pipettiert und kurz gemischt. Anschließend wurden präzipitierte Proteine für 5 min bei 4.500 x g und 4 °C abzentrifugiert. 40 µL Überstand wurden in ein neues 1,5 mL Autosampler-Glasgefäß überführt und unter Stickstoffstrom (5-10 psi) zur Trockene eingedampft. Anschließend wurden die Analyten mit 100 µL 2 mol/L HCl in Methanol versetzt, kurz gemischt und 1 h bei 80 °C zu ihren O-Methylesterderivaten derivatisiert. Die Proben wurden erneut

unter Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 100 µL einer täglich frisch hergestellten Lösung von PFPA in Ethylacetat (1:4, v/v) aufgenommen und bei 65 °C für 30 min derivatisiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 200 µL wässrigem 0,4 mol/L Boratpuffer (pH 8,5) aufgenommen. Dieser Schritt diente zur Entfernung saurer Bestandteile nach der Derivatisierung und wurde zügig durchgeführt, um eine Hydrolyse der Ester zu verhindern. Nach Zugabe von 200 µL Toluol wurden die Proben 1 min gemischt und anschließend 5 min bei 4.500 x g und 4 °C zentrifugiert. 150 µL des Toluol-Überstandes (obere Phase) wurden in ein Autosampler-Glasgefäß überführt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

4.1.2.3. Gaschromatographie

Es wurde 1 µL Toluolextrakt mit Hilfe des Autosamplers in das Gerät injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer 15 m langen Kapillarsäule Optima 17 (0.25 mm I.D., 0.25 µm Filmdicke) von Macherey–Nagel. Als Trägergas wurde Helium mit einem Fluss von 1 mL/min verwendet. Die Ofentemperatur lag initial für 0,5 min bei 90 °C und wurde mit einer Rate von 15 °C/min erst auf 210 °C, dann mit einer Rate von 35 °C/min weiter auf 320 °C erhöht.

4.1.2.4. Massenspektrometrie

Der Gasstrom wurde in das Single-Quadrupol-Massenspektrometer geleitet. Die Temperaturen von Interface und Injektor wurden auf 280 und 300 °C eingestellt, die Ionenquelle auf 250 °C. Als Ionisationsverfahren wurde die Elektroneneinfang Negativ-Ionen-Chemische Ionisation (ECNICI) mit Methan als Reaktantgas (2,4 mL/min) angewandt. Elektronenenergie und Elektronenstrom lagen bei 70 eV und 50 µA. Die Dwell-Zeit wurde auf 0,5 s gesetzt. Die Aufnahme erfolgte im „*Single-Ion-Monitoring*“-Modus, wobei das gewählte Ion der Analyten im Massenanalysator separiert und direkt zum Detektor geleitet wurde. Zur Quantifizierung wurde für hArg das Ion mit einem m/z von 600 gewählt, für $^{13}\text{C}_7,^{15}\text{N}_4\text{-hArg}$ ein m/z von 611 (jeweils Abspaltung von 2 x HF, Abbildung 7).

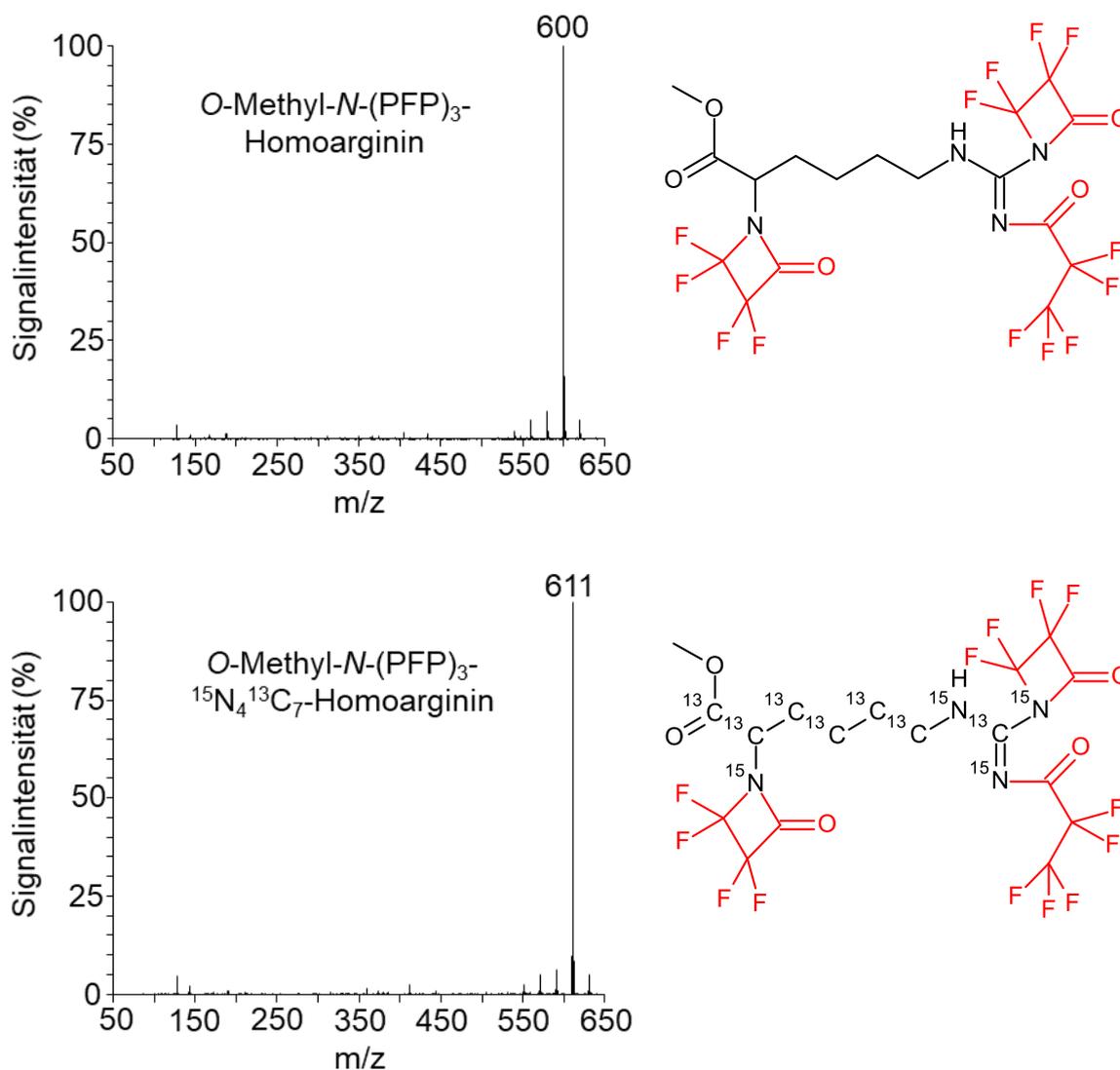


Abbildung 7: Massenspektren der GC-MS-Methode und Strukturformeln der Analyten. Strukturformeln jeweils für das Molekül mit der stärksten Signalintensität (M-2xHF) für derivatisiertes Homoarginin mit $m/z=600$ (oben) und $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -Homoarginin mit $m/z=611$ (unten). m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; PFP, Pentafluoropropionyl.

4.1.2.5. Auswertung

Für die Berechnung der hArg-Konzentration wurden die Peakflächen von hArg und dem IS $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -hArg miteinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 8).

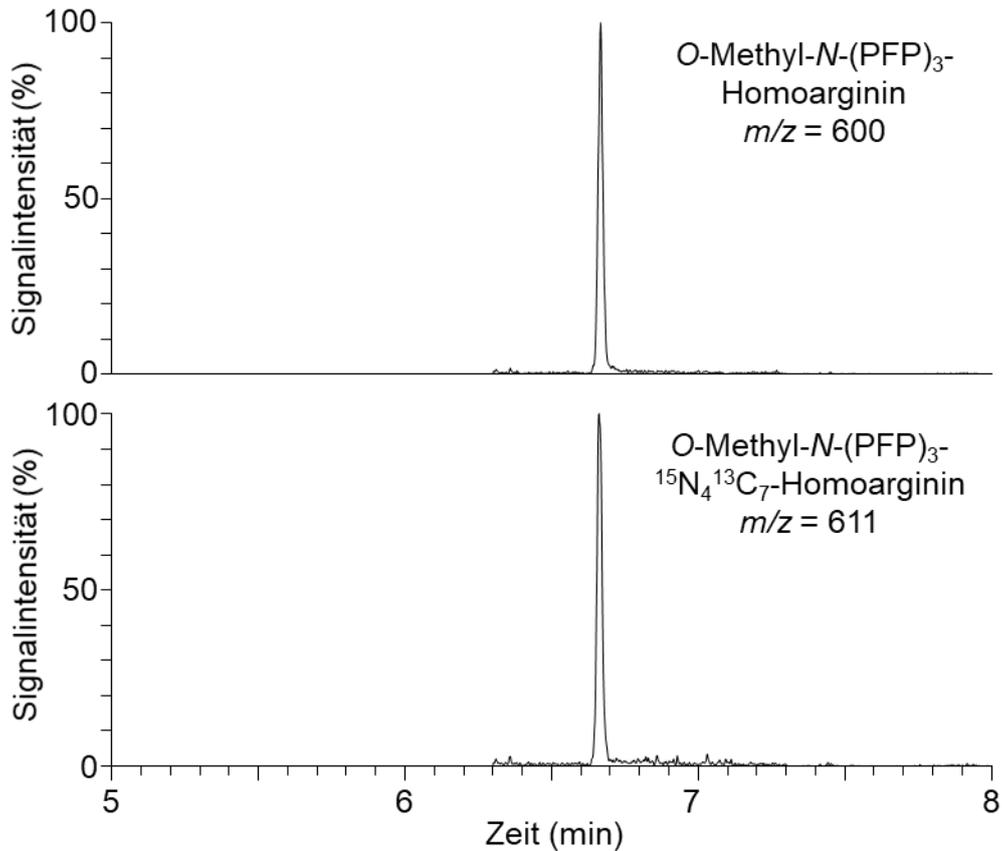


Abbildung 8: Chromatogramme der GC-MS-Methode. Oben: Derivatisiertes Homoarginin. Unten: Derivatisierter interner Standard ¹³C₇¹⁵N₄-Homoarginin. m/z, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; PFP, Pentafluoropropionyl.

4.1.3. ELISA

4.1.3.1. Prinzip

Für die Messung der hArg-Konzentrationen mittels ELISA wurde der hArg-ELISA der Firma DLD Diagnostika GmbH bezogen und nach der Arbeitsanleitung des Herstellers (DLD Diagnostika GmbH, 2014) durchgeführt (Abbildung 9). Im ersten Schritt der Probenvorbereitung findet eine Acylierung des hArg statt. Die acylierten Proben werden in die mit acyliertem hArg beschichteten ELISA-Platten gegeben und ein Antiserum zugefügt, welches Antikörper gegen acyliertes hArg enthält. Das in der Probe enthaltene hArg konkurriert nun mit dem gebundenen hArg um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Freies hArg und freie hArg-Antikörperkomplexe werden durch Waschen entfernt und es wird ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, zugegeben. Dieser Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, welche die Reaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu einem farbigen

Produkt katalysiert. Nach Zugabe einer sauren Stopplösung findet ein Farbumschlag statt und die Intensität der Farbe wird photometrisch bestimmt.

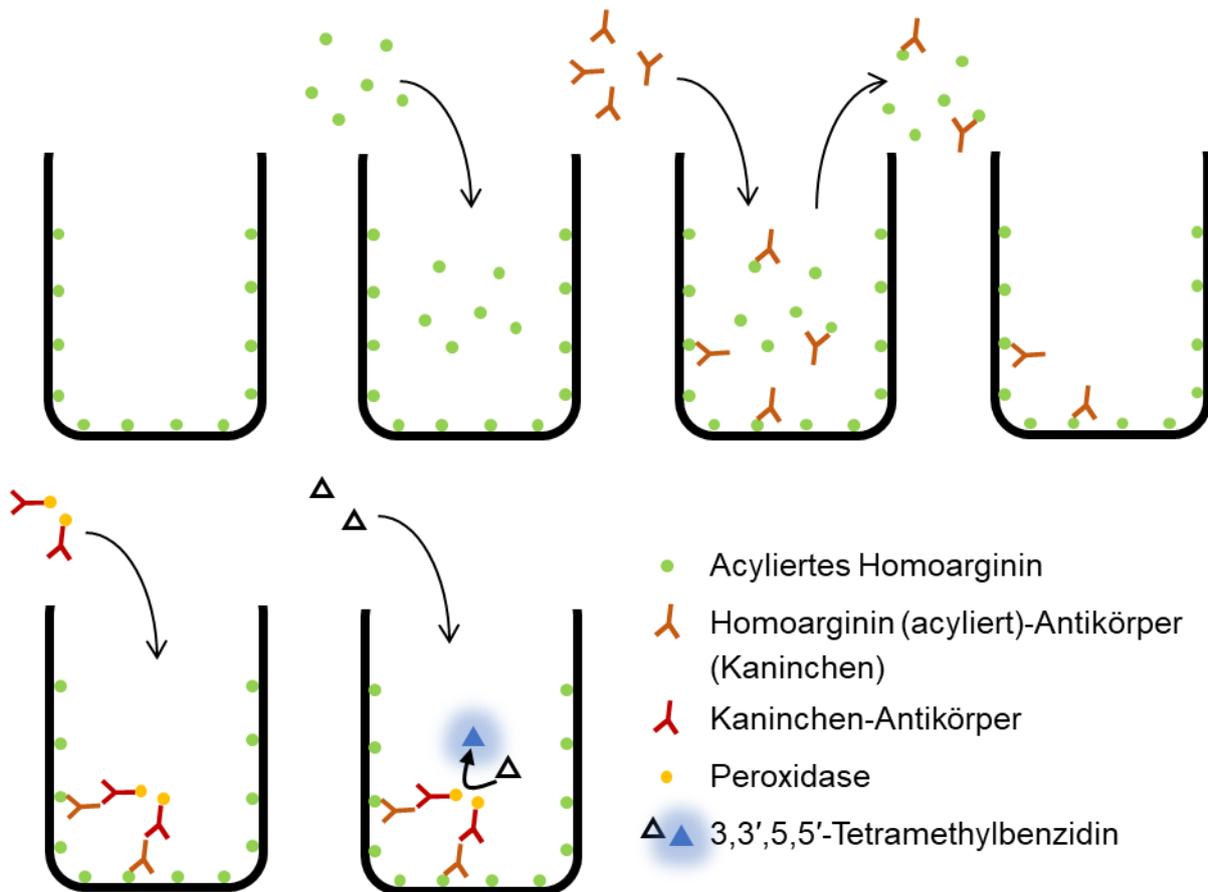


Abbildung 9: Prinzip des kompetitiven Homoarginin-ELISAs.

4.1.3.2. Testdurchführung

Die Reagenzien und Materialien wurden auf Raumtemperatur gebracht und die Reagenzien nach Herstelleranweisung (DLD Diagnostika GmbH, 2014) vorbereitet. Für die Probenvorbereitung (Acylierung) wurden je 20 μL Standards, Kontrollen und Proben in die Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert. Nach Zugabe von 20 μL Acylierungspuffer und 200 μL Ausgleichsreagenz wurde die Platte 10 s auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Es wurden 50 μL frisch angesetztes Acylierungsreagenz zugeben und anschließend 15 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubiert. 20 μL der so vorbereiteten Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterstreifen transferiert und 50 μL Antiserum zugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und 90 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte 4x mit 300 μL Waschpuffer mit Hilfe eines MRW

Waschautomaten (Dynex Technologies) oder einer 8-Kanalpipette gewaschen. Nach Zugabe von 100 µL Enzymkonjugat wurde 25 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert und die Platte anschließend erneut 4x gewaschen. Es wurden 100 µL Substrat zugegeben und 25±5 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Hierbei wurde die Platte mit einer Kiste abgedeckt, um eventuelle Temperaturunterschiede der Umgebung (z.B. durch Luftströme) zu vermeiden. Nach Zugabe von 100 µL Stopplösung und einem kurzen Mischen der Platte auf dem Horizontalschüttler wurde die optische Dichte (OD) im Photometer (Tecan Sunrise™; Tecan Group) bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Im Anhang unter 8.4 ist die Arbeitsanleitung als Pipettierschema aufgeführt.

4.1.3.3. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Magellan™ (Version 4.00; Tecan Group) unter Nutzung der 4-Parameter-Analyse (Gleichung 4). Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die OD-Werte linear gegen die in den Kalibratoren enthaltenen logarithmischen Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 10).

$$OD(450\text{ nm}) = \frac{A - D}{1 + (\text{hArg-Konzentration}/C)^B} + D$$

Gleichung 4: 4-Parameter-Analyse. A: Minimum der Asymptote; B: Steilheit; C: Wendepunkt; D: Maximum der Asymptote.

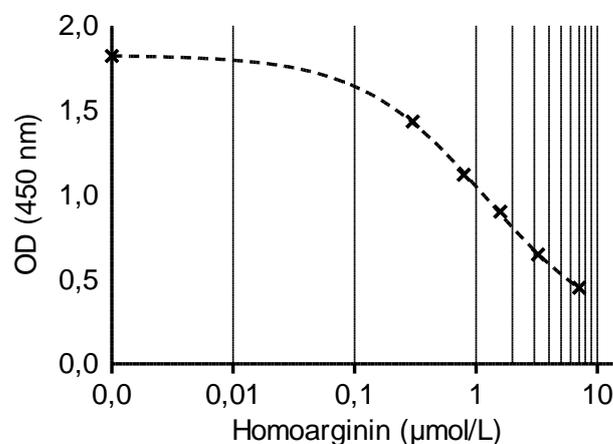


Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrierkurve des Homoarginin-ELISAs. OD, optische Dichte.

4.1.3.4. ELISA-Variante „Schnelltest“

Hierfür wurde der Homoarginin ELISA der Firma DLD Diagnostika GmbH bezogen. Die Inkubationszeiten wurden reduziert und die Probenaufarbeitung sowie die Konzentration des Antiserums modifiziert. Im Folgenden ist die modifizierte Arbeitsanleitung für den qualitativen Schnelltest aufgeführt, mit dem Patienten, die eine niedrige hArg-Serumkonzentration $<2 \mu\text{mol/L}$ aufweisen, identifiziert werden sollen. Für die Austestungen und den Vergleich ELISA „Normal“ vs. „Schnelltest“ wurden die Standards und Kontrollen aus dem originalen Kit verwendet. Für die Validierung wurden der Standard ($2 \mu\text{mol/L}$) und die Kontrollen ($1,5$ und $2,5 \mu\text{mol/L}$) des Schnelltestes verwendet. Die Entwicklung dieser Assayvariante erfolgte in Zusammenarbeit mit der Wesamin GmbH & Co. KG, welche diese Variante des hArg-ELISAs nun für Forschungszwecke produziert. Die Validierung des Assays erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Munif Haddad (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

4.1.3.4.1. Testdurchführung

Die Reagenzien und Materialien wurden auf Raumtemperatur gebracht und die Reagenzien nach Herstelleranweisung (DLD Diagnostika GmbH, 2014) vorbereitet. Für die Probenvorbereitung (Acylierung) wurden je $20 \mu\text{L}$ Standard, Kontrollen und Proben in 2 mL -Reaktionsgefäße pipettiert. Nach Zugabe von $20 \mu\text{L}$ Acylierungspuffer und $200 \mu\text{L}$ Ausgleichsreagenz wurden die Proben kurz gemischt. Es wurden $50 \mu\text{L}$ frisch angesetztes Acylierungsreagenz zugeben, jede Probe jeweils sofort nach Zugabe gemischt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubiert. Danach wurden je $250 \mu\text{L}$ Aqua dest. zugefügt und die Proben gemischt. $20 \mu\text{L}$ der so vorbereiteten Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterstreifen transferiert und $100 \mu\text{L}$ eines zweifach konzentrierten Antiserums [200%] zugegeben. Die Platte wurde mit Folie abgeklebt und 45 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte 4x mit $300 \mu\text{L}$ Waschpuffer mit Hilfe eines MRW Waschautomaten (Dynex Technologies) oder einer 8-Kanalpipette gewaschen. Nach Zugabe von $100 \mu\text{L}$ Enzymkonjugat wurde 15 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert und die Platte anschließend erneut 4x gewaschen. Es wurden $100 \mu\text{L}$ Substrat zugegeben und $15 \pm 5 \text{ min}$ bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Hierbei wurde die Platte mit

einer Kiste abgedeckt, um eventuelle Temperaturunterschiede der Umgebung (z.B. durch Luftströme) zu vermeiden. Nach Zugabe von 100 µL Stopplösung und einem kurzen Mischen der Platte auf dem Horizontalschüttler wurde die OD im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Im Anhang unter 8.4 ist die Arbeitsanleitung als Pipettierschema aufgeführt.

4.1.3.4.2. Auswertung

Für die ersten Austestungen des Schnelltestes wurde die Auswertung wie die des kommerziellen ELISAs durchgeführt (4.1.3.3). Für den qualitativen Schnelltest wurden ein Standard (2 µmol/L) sowie zwei Kontrollen (1,5 und 2,5 µmol/L) gemessen und das Verhältnis der OD des Standards zur Kontrolle bzw. Probe nach Gleichung 3 gebildet.

$$Faktor = \frac{OD_{Standard}}{OD_{Kontrolle/Probe}}$$

Gleichung 5: Berechnung des Faktors zur Beurteilung der Höhe der hArg-Konzentration. OD, optische Dichte.

4.1.3.4.3. Methodenvergleich zwischen Homoarginin-ELISA und Schnelltest

Zum Vergleich des herkömmlichen Homoarginin-ELISAs mit der Schnelltest-Variante wurden 40 humane Serumproben der ACS-Studie (siehe 4.2.1) parallel mit beiden Tests gemessen. Die Proben wurden so gewählt, dass sie einen möglichst großen Konzentrationsbereich abdeckten. Die Methoden wurden mittels linearer Regressionsanalyse und zugehörigem Korrelationskoeffizienten r^2 miteinander verglichen. Mittels Bland-Altman-Analyse wurde die prozentuale Abweichung berechnet und dargestellt.

4.1.3.4.4. Validierung

Da der Homoarginin-ELISA kommerziell erwerblich ist und dafür eine Validierung seitens der Hersteller durchgeführt wurde, wurde auf eine erneute Überprüfung der Sensitivität, Spezifität, Wiederfindung und Linearität verzichtet. Für die Untersuchung der Präzision wurden die Intra- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit untersucht. An fünf Tagen wurden der Standard (2 µmol/L) und die Kontrollen (1,5 und 2,5 µmol/L; jeweils n=5) von drei verschiedenen Personen gemessen und der Faktor nach Gleichung 5 berechnet. Die folgenden Berechnungen wurden jeweils für beide Kontrollen einzeln

durchgeführt. Für die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurden der Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (VK) der jeweiligen 5 berechneten Faktoren für jeden der fünf Tage berechnet. Der mittlere VK stellt den Mittelwert der individuellen VKs der fünf aufeinanderfolgenden Tage dar. Als Grenzwerte für die Einzelwerte wurde als untere Grenze der Mittelwert der Faktoren eines Tages minus 3x Standardabweichung festgelegt, als oberer Grenzwert der Mittelwert der Faktoren eines Tages plus 3x Standardabweichung. Lagen die Einzelwerte der Faktoren eines Tages innerhalb dieser Grenzen, galt die Untersuchung als bestanden. Für die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit wurden der Mittelwert, Standardabweichung und VK der 25 Werte der fünf Tage berechnet. Als Grenzwert für die Einzelwerte wurde als untere Grenze der Mittelwert minus 3x Standardabweichung festgelegt, als oberer Grenzwert der Mittelwert plus 3x Standardabweichung. Lagen die Einzelwerte der Faktoren der fünf Tage innerhalb dieser Grenzen, galt die Untersuchung als bestanden.

4.2. Methodenvergleich

Zum Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA wurden die hArg-Konzentrationen in verschiedenen Matrices gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zunächst wurden die Konzentrationen in den Kalibrierlösungen der beiden Methoden LC-MS/MS (hArg in dialysiertem Plasma) und ELISA (hArg in wässriger Pufferlösung; DLD Diagnostika GmbH, persönliche Kommunikation, 2015) gemessen. Die Methoden wurden paarweise mittels linearer Regressionsanalyse und zugehöriger Korrelationskoeffizienten r^2 miteinander verglichen. Des Weiteren wurde für jede Methode die Wiederfindungsrate nach Gleichung 6 sowie die mittlere Wiederfindungsrate bestimmt.

$$\text{Wiederfindungsrate (\%)} = \frac{(X_{\text{gemessen}} - X_{\text{Leerwert}})}{X_{\text{zugegeben}}} \times 100\%$$

Gleichung 6: Berechnung der Wiederfindungsrate.

Zum Vergleich der Methoden bezüglich der Messung von hArg in biologischer Matrix wurde die hArg-Konzentration in 144 Plasmaproben der ACS-Studie gemessen. Die Methoden wurden wieder paarweise durch lineare Regressionsanalyse und den jeweiligen Korrelationskoeffizienten r^2 miteinander verglichen. Auf Unterschiede der absoluten Konzentrationen der gesamten Kohorte zwischen den drei Bestimmungsmethoden wurde mittels einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA,

analysis of variance) mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Post-hoc-Test getestet. Mit Hilfe von Analysen nach Bland-Altman wurden die prozentualen Abweichungen berechnet und dargestellt. Außerdem wurde mit allen Methoden eine 2 µmol/L-Lösung des Enantiomers D-hArg vermessen. Zur Feststellung, ob eine Unterscheidung mittels der chromatographischen Methoden LC-MS/MS und GC-MS möglich ist, wurden hier die Retentionszeiten von L-hArg vs. D-hArg mittels zweiseitigem t-Test auf Unterschiede getestet.

4.2.1. ACS-Studie

In diese multizentrische prospektive Studie wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer H. Böger (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE, Hamburg) 184 Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen, eingeschlossen (Abbildung 11). Die Patienten wurden zwischen 2004 und 2009 in den Hamburger Kliniken UKE und Asklepius Klinik Hamburg Nord rekrutiert. Die Datenbank für die Studie wurde von Vahzma Quaderi erstellt. Einschlusskriterien waren die Diagnose einer stabilen Angina pectoris, ACS-Symptomatik oder angiographischer Nachweis einer KHK sowie Alter >18 Jahre und das Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Probanden. Ausschlusskriterien waren eine terminale Niereninsuffizienz oder eine unmittelbar vorausgehende Reanimation. Bei 40 Patienten waren keine hArg-Konzentrationen verfügbar, sodass insgesamt 144 Patienten eingeschlossen wurden. Darunter waren 13 Patienten, bei denen eine KHK in der Koronarangiographie ausgeschlossen werden konnte, 36 Patienten mit stabiler KHK sowie 95 Patienten mit einem ACS (31 Patienten mit IAP, 48 Patienten mit NSTEMI und 16 Patienten mit STEMI). Plasma- und Serumproben der Patienten wurden vor der Herzkatheteruntersuchung abgenommen. Für die Untersuchung der biologischen Applikation der drei Methoden (5.1.6) wurden nur Patienten eingeschlossen, deren Brustschmerz kardialer Ursache war (insgesamt 131 Patienten, davon 36 KHK-Patienten und 95 ACS-Patienten). Der Beobachtungszeitraum dieser prospektiven Studie betrug 1.200 Tage. Primärer Endpunkt dieser Studie waren Tod und die kombinierten sekundären Endpunkte nicht-tödlicher MI und Schlaganfall. Die n-Zahlen unterschieden sich in der Gruppe der KHK-Patienten wie folgt: BMI (n=33) und GC-MS-hArg (n=35); in der ACS-Gruppe: BMI (n=86), GFR (n=94), Hypercholesterolämie (n=94), kombinierter Endpunkt (n=86) und GC-MS-hArg (n=93). Die Studie wurde unter Einhaltung der Good Clinical Practice (GCP)-Richtlinie nach

der »Note for Guidance on Good Clinical Practice« (CPMP/ICH/135/95) und unter Beachtung der Deklaration von Helsinki (revidierte Fassung, Somerset West, Oktober 1996) durchgeführt.

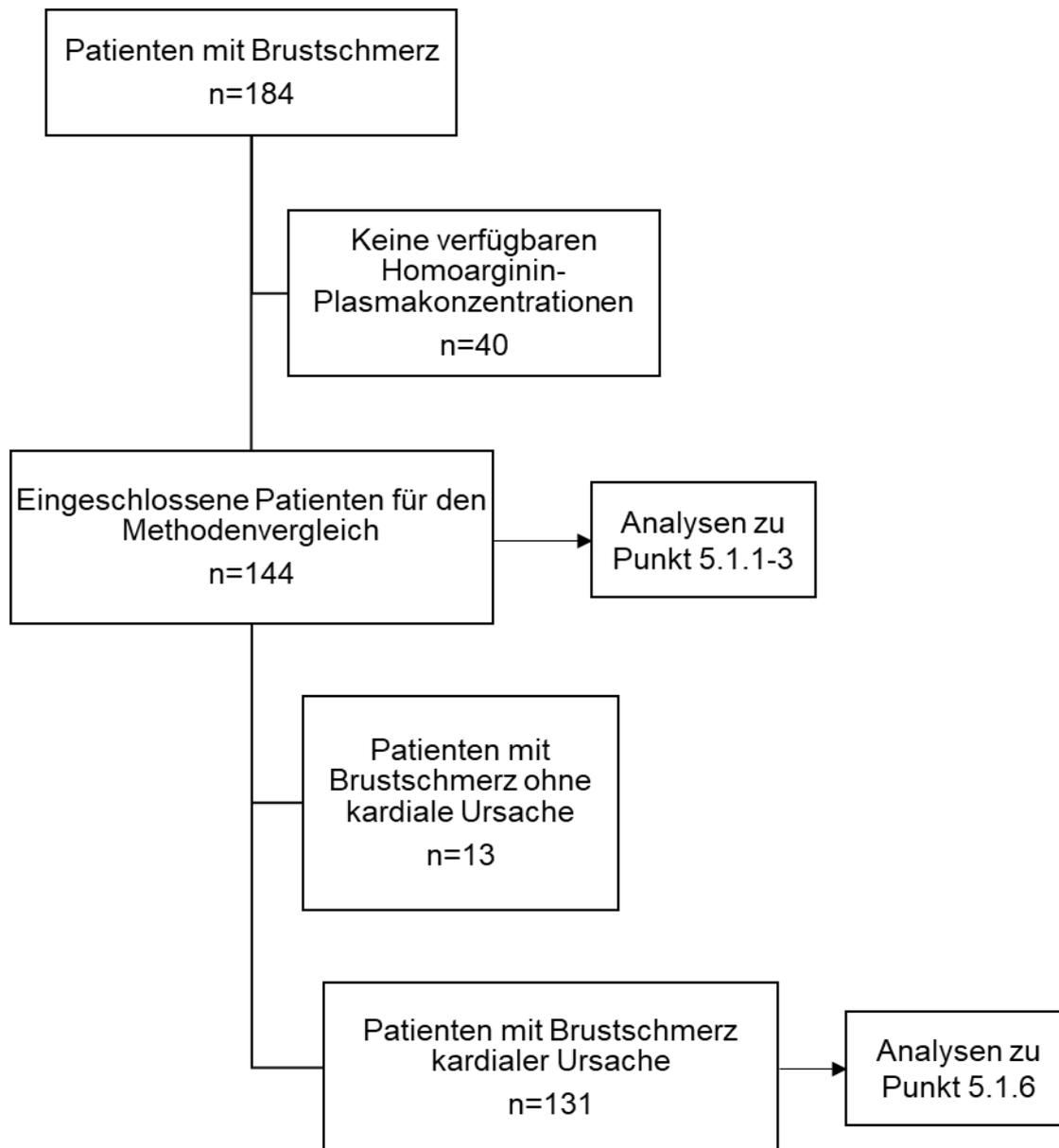


Abbildung 11: Studienpopulation – ACS-Studie.

4.2.1.1. Statistik

Normalverteilte kontinuierliche Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung dargestellt, kategoriale Variablen als n-Zahl (%). Auf Unterschiede zwischen den Gruppen KHK und ACS wurde bei kontinuierlichen Variablen mittels zweiseitigem t-Test getestet, bei dichotomen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test. Die prospektiven Analysen wurden für die hArg-Konzentrationen der drei verschiedenen Methoden

durchgeführt und überprüft, ob alle Methoden zum gleichen Ergebnis führen. Hierfür wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven für den kombinierten Endpunkt der Ereignisse MI, Schlaganfall und / oder Tod nach 1.200 Tagen, stratifiziert nach dem jeweiligen Median der hArg-Konzentration, erstellt und mittels Log-rank-Test auf Unterschiede getestet.

4.3. ELISA-Referenzintervalle für Homoarginin in der gesunden Bevölkerung

4.3.1. Studienpopulation

Für die Bestimmung der Referenzwerte wurden das Probenmaterial und die Daten der „*Study of Health in Pomerania*“ (SHIP) vom Forschungsverbund Community Medicine der Universitätsmedizin Greifswald zur Verfügung gestellt (Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung; Förderkennzeichen 01ZZ9603, 01ZZ0103, 01ZZ0701). Die hier verwendete SHIP-TREND-Kohorte ist die zweite, unabhängige Kohorte der bevölkerungsbasierten SHIP-Studie (Völzke et al., 2011). Die Studie wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Henry Völzke an der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Das Einzugsgebiet der Studienteilnehmer lag in Vorpommern im Nordosten Deutschlands. Von 8.826 eingeladenen Teilnehmern nahmen 4.420 Probanden an der Studie teil (Abbildung 12). Die Untersuchungen fanden zwischen 2008 und 2012 statt und schlossen eine standardisierte medizinische Untersuchung, eine Blutabnahme zur Gewinnung von Plasma und Serum sowie ein umfangreiches computergestütztes Interview ein. Alle Teilnehmer gaben schriftlich ihre Einverständniserklärung ab. Zur Bestimmung von hArg-Referenzwerten in der gesunden Bevölkerung wurden die Plasmakonzentrationen in einer Subgruppe dieser Kohorte mittels hArg-ELISA (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Für eine genauere Beschreibung der Bestimmung der anderen Parameter siehe Moritz et al. (2017). Für die Auswahl der gesunden Probanden wurden 3.111 Teilnehmer der ursprünglichen Kohorte ausgeschlossen, bei denen mindestens eine der folgenden Bedingungen vorlag (mit Überlappungen; modifiziert nach Moritz et al. [2017]; Abbildung 12): kardiovaskuläre Erkrankungen (n=518), Diabetes mellitus (n=529), Bluthochdruck (n=2.028), Metabolisches Syndrom (n=1.187), erhöhte Leberenzyme (Alanin-Aminotransferase >0,77 µkatal/L, Aspartat-Aminotransferase >0,59 µkatal/L und / oder Gamma-Glutamyltranspeptidase >0,96 µkatal/L; n=837), eingeschränkte Nierenfunktion (eGFR <60 mL/min/1,73 m²; n=352), Adipositas (Body-Mass-Index

[BMI] $>30 \text{ kg/m}^2$; $n=1.338$), fehlende Daten ($n=227$), Alter >70 Jahre ($n=29$; 12 Frauen und 17 Männer). Kardiovaskuläre Erkrankungen waren definiert als das selbst-reportierte Vorliegen einer Herzinsuffizienz, eines MI, Schlaganfalles oder eines chirurgischen Eingriffes am Herzen in der Vergangenheit, eine elektrokardiographische Diagnose eines MI, eine Auswurfraction $\leq 40\%$ und / oder eine linksventrikuläre Verkürzungsfraktion $\leq 25\%$. Diabetes mellitus war definiert als das selbst-reportierte Vorliegen der Erkrankung, die Einnahme von Antidiabetika (Anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikationssystem [ATC] A10) und / oder $\text{HbA1c} \geq 6,5\%$. Bluthochdruck war definiert als die selbst-reportierte Einnahme von Antihypertensiva und / oder ein bei der medizinischen Untersuchung erfasster erhöhter Blutdruck (systolisch $\geq 140 \text{ mmHg}$ und / oder diastolisch $\geq 90 \text{ mmHg}$). Das metabolische Syndrom wurde definiert als das Vorliegen von mindestens drei der Risikofaktoren Bluthochdruck, erhöhter Taillenumfang (Männer $\geq 94 \text{ cm}$, Frauen $\geq 80 \text{ cm}$), Diabetes mellitus, erniedrigtes *High-density* Lipoprotein (HDL; Männer $\leq 1,03 \text{ mmol/L}$, Frauen $\leq 1,29 \text{ mmol/L}$), selbst-reportierte Einnahme von Lipidsenkern (ATC C10AB oder C10AD) und / oder erhöhte Triglyceride ($\geq 2,3 \text{ mmol/L}$ nach <8 -stündigem Fasten und $\geq 1,7 \text{ mmol/L}$ nach ≥ 8 -stündigem Fasten) (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002). Daraus ergab sich eine Studienpopulation von 1.309 Teilnehmern mit 451 Männer und 858 Frauen.

4.3.2. Statistik

Die statistischen Analysen wurden von PD Dr. Nele Friedrich (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Deutschland) durchgeführt. Kontinuierliche Daten sind als Median [25. – 75. Perzentil], nominale Daten als Prozent dargestellt. Zur bivariaten Testung auf Unterschiede zwischen Männern und Frauen wurden der Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Parameter oder der Chi-Quadrat-Test für nominale Parameter angewandt. Zur Abschätzung der altersabhängigen Referenzintervalle der hArg-Serumkonzentrationen wurde eine Quantil-Regressionsanalyse durchgeführt und das 2,5. und 97,5. Perzentil berechnet (Koenker, 2005). Für die verschiedenen Altersklassen wurden jeweils die Mittelwerte der Referenzwerte für jedes Alter der entsprechenden Gruppe gebildet. Diese Bestimmungsmethode hat den Vorteil, dass keine Normalverteilung der Daten für diese Analyse erforderlich ist. Es wurden

Sensitivitätsanalysen für verschiedene Subgruppen erstellt: 1) Nichtraucher (282 Männer, 574 Frauen), 2) Probanden mit normalen Blutlipiden (Triglyceride $\leq 1,9$ mmol/L, Gesamtcholesterol ≤ 6 mmol/L, HDL $\geq 1,03$ mmol/L und *Low-density Lipoprotein* (LDL)-Cholesteroll $\leq 3,34$ mmol/L; 211 Männer, 521 Frauen), 3) Probanden mit einem BMI ≤ 25 kg/m² (224 Männer, 574 Frauen) und 4) Probanden mit einer eGFR ≥ 90 mL/min/1.73 m² (232 Männer, 340 Frauen). Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SAS v 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) durchgeführt.

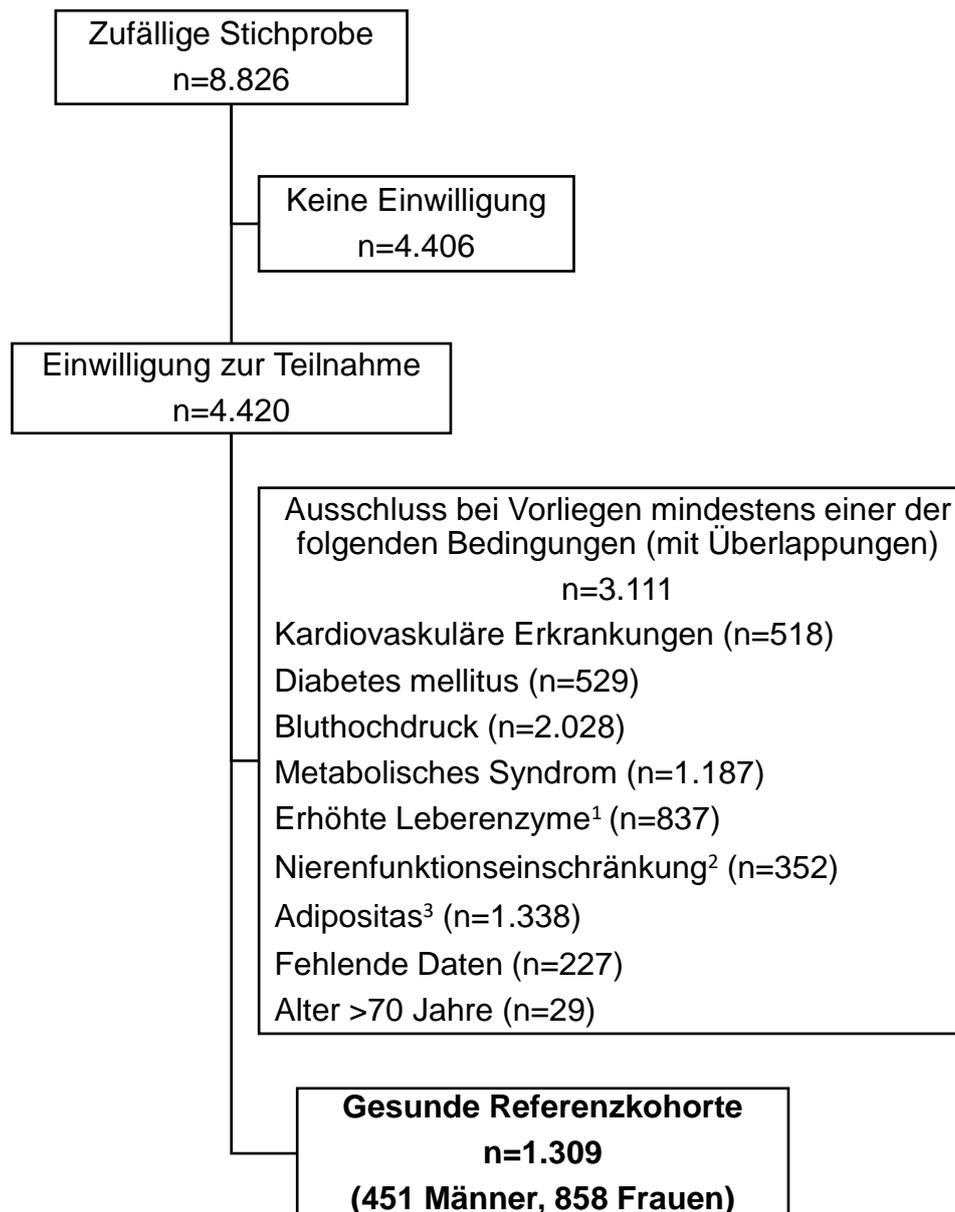


Abbildung 12: Studienpopulation – Gesunde Referenzkohorte der SHIP-TREND-Studie. ¹ Alanin-Aminotransferase $>0,77$ μ katal/L, Aspartat-Aminotransferase $>0,59$ μ katal/L und / oder Gamma-Glutamyltranspeptidase $>0,96$ μ katal/L; ² eGFR <60 mL/min/1,73 m²; ³ BMI >30 kg/m². BMI, Body-Mass-Index; eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate; SHIP, Study of Health in Pomerania.

4.4. Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen

4.4.1. Schlaganfall und Schlaganfallrisiko

4.4.1.1. Studienpopulationen

4.4.1.1.1. UKE-Schlaganfallrisiko-Kohorte

Es wurden 274 Patienten der neurovaskulären Ambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Zeitraum zwischen Oktober 2015 und September 2016 unter der Leitung von PD Dr. Chi-un Choe in die Studie eingeschlossen. Die Datenbank der Studie wurde von Ricarda Grzybowski erstellt. Einschlusskriterien waren Alter >18 Jahre, diagnostizierter Schlaganfall in der Patientenhistorie oder gesteigertes Schlaganfallrisiko und Einverständniserklärung der Patienten. Vorherige Ereignisse (MI und Schlaganfall), Vorerkrankungen (Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterolämie, VHF und KHK) sowie die Medikation (Antihypertensiva, Antidiabetika, Lipidsenker, Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien) wurden in der Patientenanamnese erfasst. Zwei Patienten wurden auf Grund fehlender Werte ausgeschlossen. Somit wurden 272 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 226 Patienten (83%) zuvor schon einen Schlaganfall erlitten hatten. Blutproben zur Gewinnung von EDTA-Plasma und Serum wurden nach Einschluss in die Studie genommen und bei -20 °C gelagert. Die Studie wurde unter Beachtung der Deklaration von Helsinki (1975) durchgeführt und wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (PV4715). hArg wurde im Plasma nach der unter 4.1.1 beschriebenen Methode bestimmt (Atzler et al., 2011). Als IS wurde hier $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_7$ -hArg verwendet. Arg, ADMA und SDMA wurden nach einer von Schwedhelm et al. publizierten Methode bestimmt (Schwedhelm et al., 2007). Als IS wurden hier $^2\text{H}_7$ -Arg für Arg und $^2\text{H}_7$ -ADMA für ADMA und SDMA verwendet. Cholesteroll, LDL, HDL, Serumkreatinin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Kreatinkinase, und hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP) wurden im Routinelabor des UKEs bestimmt. Die eGFR wurde nach der *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD)-Formel bestimmt. Alle Labormitarbeiter waren bezüglich der klinischen Daten verblindet. Ischämische Schlaganfälle wurden nach der „*Oxfordshire Community Stroke Project*“ (OSCP)-Klassifikation (Bamford et al., 1991) in verschiedene Subtypen eingeteilt: lakunäre (LACI; Infarkte hauptsächlich in tiefen Stromgebieten), partiell anteriore (PACI), totale anteriore (TACI; Infarkte im vorderen

Stromgebiet [Versorgung durch Karotiden]) oder posteriore Infarkte (POCI; Infarkte im vertebrobasilären [hinteren] Stromgebiet). Weiterhin erfolgte eine Einteilung der Patienten mit ischämischen Schlaganfall nach den „*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*“ (TOAST)-Kriterien (Adams et al., 1993) in die Subtypen der Ätiologie: Mikroangiopathie, Makroangiopathie, kardiale Embolien, Infarkte anderer Ursache oder unbekannte Ätiologie. Elektrokardiographie, Echokardiographie, Darstellung der extra- und intrakraniellen Gefäße, Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Laboranalysen wurden in der Vergangenheit direkt nach Aufnahme mit einem Schlaganfall erfasst. Die Schlaganfall-Subtyp-Klassifikation erfolgte nach einer eingehenden Überprüfung der klinischen Symptome und Ergebnisse neurologischer Tests durch erfahrene Neurologen. Die Karotiden wurden mittels hochauflösender B-mode und Duplex Ultraschall mit einem GE Logiq7-System mit einem 7,5-MHz linear-array transducer (GE Healthcare, Solingen, Germany) untersucht. Die Intima-Media-Dicke (IMT) wurde nach dem Mannheim IMT Consensus beurteilt (Touboul et al., 2012). Der größte Messwert aus rechter und linker Karotisarterie wurde als individuelle IMT definiert. Alle Ultraschalluntersuchungen der Karotiden wurden von zwei Untersuchern durchgeführt. Die Offline-Analyse wurde durch einen erfahrenen Mediziner durchgeführt, der für die klinischen Daten verblindet war. Weiterhin wurde der CHA₂DS₂-VASc-Score zur Einschätzung des Risikos eines erneuten Schlaganfalles bestimmt (Lip et al., 2010). In die Kalkulation gingen folgende Parameter ein: Herzinsuffizienz, Hypertonus, Alter ≥ 75 Jahre, Diabetes mellitus, vorheriger Schlaganfall, transitorische ischämische Attacke oder Thromboembolie, vaskuläre Erkrankungen (vorheriger MI, pAVK oder Aortenplaques), Alter zwischen 65-74 Jahren und weibliches Geschlecht. Zur Validierung der in der UKE-Kohorte gefundenen Ergebnisse wurden die Analysen in zwei Studien mit akuten Schlaganfällen (Leeds Stroke Studie und Harburg Stroke Studie; s.u.) sowie in einer Metaanalyse zusammengefasst wiederholt.

4.4.1.1.2. Leeds Stroke Studie

Eine ausführliche Beschreibung dieser Studie wurde schon von Carter et al. und Schulze et al. veröffentlicht (Carter et al., 2007; Schulze et al., 2010). Korrelationsanalysen und Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen hArg und z.B. der Mortalität wurden von Choe et al. publiziert (Choe et al., 2013). Die Patienten wurden an vier Krankenhäusern in Leeds (Großbritannien) rekrutiert. Von den 545

eingeschlossenen Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall waren in 394 Patienten hArg-Plasmakonzentrationen verfügbar. Die hArg-Konzentrationen wurden nach der Methode von Atzler et al. mit $^{13}\text{C}_6$ -hArg als IS gemessen (Atzler et al., 2011). Die Schlaganfälle wurden anhand der OCSF-Klassifikation in die oben genannten Subtypen eingeteilt (Bamford et al., 1991). Vorliegendes VHF wurde durch ein 12-Kanal-EKG bestätigt. Neben der Anamnese und der medizinischen Untersuchung erfolgte eine Blutabnahme zur Bestimmung von Routinelaborparametern. Das Risiko eines erneuten Schlaganfalles wurde mit Hilfe des $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Scores abgeschätzt (Lip et al., 2010).

4.4.1.1.3. Harburg Stroke Studie

Eine ausführliche Beschreibung der Studie wurde von Lüneburg et al. publiziert (Lüneburg et al., 2012). Assoziationen von hArg mit z.B. der Mortalität wurden bereits von Choe et al. veröffentlicht (Choe et al., 2013). Insgesamt wurden 137 Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall, rekrutiert in der Neurologie der Asklepios-Klinik-Harburg, eingeschlossen. hArg wurde im Plasma nach der Methode von Atzler et al. mit $^{13}\text{C}_6$ -hArg als IS bestimmt (Atzler et al., 2011). Die Patienten wurden entsprechend der Schlaganfallätiologie nach den TOAST-Kriterien klassifiziert (Adams et al., 1993). Außerdem wurde auf das Vorliegen von VHF untersucht und der $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Score bestimmt (Lip et al., 2010).

4.4.1.2. Statistik

Kontinuierliche, normalverteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, nicht normalverteilte Variablen als Median (IQR). Kategoriale Variablen sind als n-Zahl (%) angegeben. Zusammenhänge zwischen hArg und kontinuierlichen Variablen wurden durch Spearman-Korrelationsanalysen (Korrelationskoeffizient ρ) oder lineare Regressionsanalysen (Betakoeffizient und 95% CI) untersucht. Vergleiche von zwei Gruppen wurden mittels zweiseitigem t-Test oder logistischer Regressionsanalyse (Odds ratio, OR und 95% CI) analysiert. Die Regressionsanalysen wurden jeweils für drei Modelle gerechnet: nicht adjustiert (Modell 1), adjustiert für Alter und Geschlecht (Modell 2) und adjustiert für Alter, Geschlecht und die kardiovaskulären Risikofaktoren Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolemie (Modell 3). Die Metaanalyse erfolgte mit den Einzelwerten der drei Studien. Bei logistischen Regressionsanalysen wurde im Modell 3 zusätzlich für

die Studienkohorte adjustiert. Ein P-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen IBM SPSS Statistics (Version 22, IBM Corp.) und GraphPad Prism (Version 5) durchgeführt.

4.4.2. Hypertrophe Kardiomyopathie

4.4.2.1. Studienpopulation

Es wurden im Zeitraum zwischen Mai 2011 und September 2016 insgesamt 215 HCM-Patienten in diese Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden in der sogenannten „HCM-Sprechstunde“ unter der Leitung von PD Dr. Monica Patten am Universitären Herzzentrum Hamburg rekrutiert. Die Datenbank für diese Studie wurde zusammen mit Doreen Seelig erstellt. Einschlusskriterien waren Alter zwischen 18-99 Jahren, genetisch und / oder klinisch bestätigte HCM, unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten und verfügbare Plasmakonzentrationen von hArg. Ausschlusskriterien waren eine eGFR <30 mL/min und Schwangerschaft. Die Routinelaborparameter hsTNT, Kreatinkinase, N-terminales *pro brain natriuretic peptide* (NT-proBNP), Kreatinin, Laktatdehydrogenase (LDH) und Hämatokrit wurden in der Klinischen Chemie des UKEs bestimmt. hsTNT <3 pg/mL wurde für die Analysen auf 2,99 pg/mL, NT-proBNP <5 ng/L auf 4,99 ng/L gesetzt. Die eGFR wurde nach der MDRD-Formel ($eGFR = 175 \times \text{Kreatinin}^{-1,154} \times \text{Alter}^{-0,203}$) berechnet. Arg, ADMA, SDMA und hArg wurden im EDTA-Plasma mittels bereits publizierter LC-MS/MS-Methoden gemessen (Atzler et al., 2011; Schwedhelm et al., 2007). Als interne Standards wurden $^2\text{H}_7$ -Arginin für Arginin, $^2\text{H}_6$ -ADMA für ADMA, $^2\text{H}_7$ -ADMA für SDMA, und $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_7$ -hArg für hArg verwendet. In der Anamnese wurden durch Befragung der Patienten Vorerkrankungen (Diabetes mellitus, KHK und arterielle Hypertonie) und VHF in der Vergangenheit erfasst. Das frequenzkorrigierte QT-Intervall (QTc) sowie das Vorliegen eines Sinusrhythmus oder VHF wurden aus aktuellen 12-Kanal-EKGs bestimmt. Außerdem wurde eine zweidimensionale transthorakale Echokardiographie an einem Philips iE33-System (Philips Healthcare, Best, Niederlande) von erfahrenen Kardiologen durchgeführt, welche die echokardiographischen Daten mit Syngo Dynamics (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) ausgewertet haben. Die linksventrikuläre Auswurfraction (LVEF) wurde mit der Simpson-Methode mit zweidimensionalen apikalen Aufnahmen bestimmt. Eine LVEF $\leq 55\%$ galt als reduzierte LVEF. Die maximale Dicke der Septumwand (SW) sowie der lateralen Wand (HW) wurden in der parasternalen kurzen Achse gemessen. Der Durchmesser

des linken Atriums wurde im M-Mode, ebenfalls in der parasternalen kurzen Achse bestimmt. Durch Pulswellendoppler-Bildgebung im apikalen Vierkammerblick wurde das transmitrale Strömungsprofil mit der E-Welle (max. Geschwindigkeit des passiven Einstroms in den linken Ventrikel) und A-Welle (max. Geschwindigkeit des aktiven Einstroms in den linken Ventrikel) gemessen. Mittels Gewebedoppler-Bildgebung wurden die frühdiastolischen passiven septal und lateral gemessenen Mitralanulusgeschwindigkeiten E' sowie die isovolumetrischen Relaxationszeiten (IVRT), ebenfalls im apikalen Vierkammerblick, bestimmt. Die Einteilung der DD erfolgte nach Nagueh et al. (2009):

Normale Diastolische Funktion:	septales $E' \geq 8$ cm/s laterales $E' \geq 10$ cm/s Volumen des linken Atriums < 34 mL/m ²
Milde DD (Grad 1)	septales $E' < 8$ cm/s laterales $E' < 10$ cm/s Volumen des linken Atriums ≥ 34 mL/m ² $E/A < 0,8$ $E/E' \leq 8$
Moderate DD (Grad 2)	septales $E' < 8$ cm/s laterales $E' < 10$ cm/s Volumen des linken Atriums ≥ 34 mL/m ² $E/A 0,8-1,5$ $E/E' 9-12$
Schwere DD (Grad 3)	septales $E' < 8$ cm/s laterales $E' < 10$ cm/s Volumen des linken Atriums ≥ 34 mL/m ² $E/A \geq 2$ $E/E' \geq 13$

Außerdem wurden durch Flussmessung im linksventrikulären Ausflusstrakt (LVOT) Ruhe- und gegebenenfalls Stressgradienten bestimmt. Die Patienten wurden danach in Patienten mit einer hypertrophen nicht-obstruktiven Kardiomyopathie (HNOCM; Ruhegradient < 30 und Stressgradient < 30 mmHg), Patienten mit einer hypertrophen latent-obstruktiven Kardiomyopathie (HLOCM; Ruhegradient < 30 und Stressgradient > 50 mmHg) und Patienten mit einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie

(HOCM; Ruhegradient >30 mmHg) eingeteilt. Zudem wurden die Patienten entsprechend ihrer körperlichen Belastbarkeit nach der *New York Heart Association* (NYHA)-Klassifikation eingestuft. Für 204 (95%) der 215 eingeschlossenen Patienten waren Daten zur DD verfügbar (61 Patienten mit normaler diastolischer Funktion und 143 Patienten mit einer DD). Folgend aufgeführte Parameter waren nicht für alle Patienten verfügbar. HCM-Patienten: n=211 für BMI; n=192 für hsTNT; n=205 für Kreatinkinase; n=204 für NT-proBNP; n=212 für Kreatinin und QTc; n=188 für LDH; n=213 für GFR und LVEF; n=214 für EKG; n=149 für die Obstruktionseinteilung; n=213 für die max. SW; n=206 für die max. HW und SW/HW; n=210 für den Durchmesser des linken Atriums; n=209 für die E-Welle; n=197 für die A-Welle und E/A; n=204 für septales und laterales E' sowie laterales IVRT; n=200 für mittleres E', septales E'/laterales E' und septales/laterales IVRT; n=202 für septales E/E', laterales E/E' und septales IVRT und n=198 für mittleres E/E'. Patienten mit normaler diastolischer Funktion: n=60 für BMI und Kreatinkinase; n=56 für LDH; n=57 für hsTNT; n=59 für NT-proBNP und QTc und n=35 für die Obstruktionseinteilung; n=60 für die E-Welle, A-Welle, E/A, septales E', mittleres E', septales E'/laterales E', laterales E/E', septales IVRT und septales/laterales IVRT und n=59 für septales und mittleres E/E'. Patienten mit DD: n=140 für BMI; n=126 für hsTNT; n=136 für die Kreatinkinase und NT-proBNP; n=141 für Kreatinin; n=123 für LDH; n=142 für die GFR, QTc und das EKG und n=110 für die Obstruktionseinteilung; n=137 für die max. HW, SW/HW, laterales E', septales IVRT und laterales IVRT; n=141 für den Durchmesser des linken Atriums und E-Welle; n=134 für die A-Welle, E/A und das mittlere E/E'; n=139 für das septale E'; n=135 für das mittlere E', septales E'/laterales E' und septales/laterales IVRT; n=138 für septales E/E' und n= 136 für laterales E/E'.

4.4.2.2. Statistik

Kontinuierliche, normalverteilte Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung angegeben, nicht normalverteilte Daten als Median (25. – 75. Perzentil). Kategoriale Variablen sind als n-Zahl (%) dargestellt. Nicht normalverteilte Daten wurden vor parametrischen Analysen logarithmiert (Basis 10). Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde der zweiseitige t-Test, der Chi-Quadrat-Test oder logistische Regressionsanalysen angewandt. Ein Zusammenhang zwischen hArg und kontinuierlichen Parametern wurde mittels Spearman-Korrelationsanalysen oder linearen Regressionsanalysen untersucht. Die Regressionsanalysen wurden mit

verschiedenen Modellen durchgeführt: Modell 1 war nicht adjustiert, Modell 2 war adjustiert für das Alter und Geschlecht und Modell 3 war adjustiert für das Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, KHK und arterielle Hypertonie. P-Werte $<0,05$ galten in allen Analysen als signifikant. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad 5.02 (La Jolla, USA) und IBM SPSS Statistics 22 (Ehningen, Deutschland) angefertigt.

4.4.3. Chronisch-intermittierende Hypoxie bei Höhengaufenthalt

4.4.3.1. Studienpopulation

Die Proben dieser Studie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Rainer H. Böger und PD Dr. Nicole Lüneburg (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt 123 chilenische Soldaten in die Studie eingeschlossen. Die Probanden hielten sich über einen Zeitraum von sechs Monaten im Wechsel jeweils fünf Tage in einer Höhe von 3.550 m gefolgt von zwei Tagen auf Höhe des Meeresspiegels auf. Vor Studienbeginn und nach Beendigung der Studie nach sechs Monaten wurden Plasmaproben der Probanden genommen und die hArg-Konzentrationen mittels hArg-ELISA (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. hArg war in 99 (Studienbeginn) bzw. 97 (6 Monate) Probanden verfügbar.

4.4.3.2. Statistik

Kontinuierliche, normalverteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mittels gepaartem t-Test wurde auf eine Veränderung des hArg zwischen den Zeitpunkten Studienbeginn und nach 6-monatigem chronisch-intermittierendem Höhengaufenthalt getestet. Ein P-Wert $<0,05$ galt als signifikant. Die statistischen Analysen wurde mit IBM SPSS Statistics 22 (Ehningen, Deutschland) angefertigt.

5. Ergebnisse

5.1. Methodenvergleich

Teilergebnisse dieses Projektes wurden bereits veröffentlicht (Cordts et al., 2015).

5.1.1. Bestimmung von Homoarginin in wässriger Pufferlösung

Zum Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA wurden die hArg-Konzentrationen zunächst in wässrigen Pufferlösungen bestimmt. Verwendet wurden hierzu die Kalibrierlösungen des hArg-ELISAs mit den folgenden hArg-Konzentrationen: 0 – 0,3 – 0,8 – 1,6 – 3,2 – 7 $\mu\text{mol/L}$. Lineare Regressionsanalysen der zugefügten und gemessenen hArg-Konzentrationen ergaben Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,99$ für LC-MS/MS, $r^2=1,00$ für GC-MS und $r^2=0,99$ für den ELISA (Abbildung 13). Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Leerwert (0 $\mu\text{mol/L}$ hArg) von der gemessenen Konzentration abgezogen und die Wiederfindungsrate nach der Gleichung 6 berechnet. Für die LC-MS/MS-Methode lag die mittlere Wiederfindungsrate bei $98\pm 15\%$, für die GC-MS-Methode bei $133\pm 9\%$ und für den ELISA bei $105\pm 17\%$ (Tabellen 2-4).

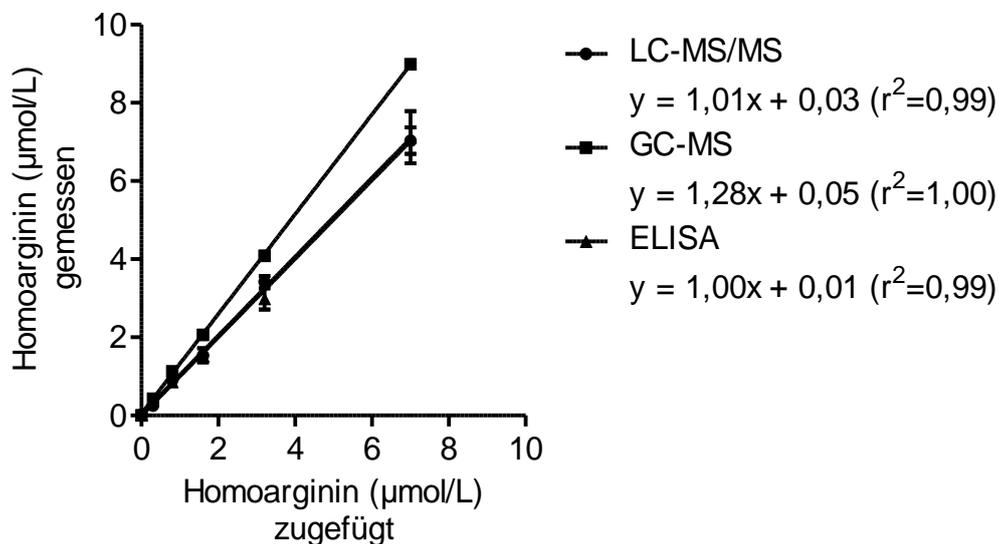


Abbildung 13: Lineare Regressionsanalyse – Homoarginin in wässriger Pufferlösung. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=6$ für LC-MS/MS; $n=3$ für GC-MS; $n=6$ für ELISA. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

Tabelle 2: Wiederfindung in wässriger Lösung – LC-MS/MS.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
0,3	0,24±0,03	15	80±11	98±15
0,8	0,89±0,13	14	111±16	
1,6	1,52±0,18	12	95±11	
3,2	3,40±0,15	4	107±5	
7,0	7,01±0,34	5	100±5	

¹ 0,02 $\mu\text{mol/L}$ Homoarginin; ² Mittelwert±Standardabweichung. LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie; RSD, relative Standardabweichung. n=6.

Tabelle 3: Wiederfindung in wässriger Lösung – GC-MS.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
0,3	0,43±0,02	5	142±7	133±9
0,8	1,12±0,12	10	140±15	
1,6	2,07±0,01	1	129±1	
3,2	4,08±0,03	1	127±1	
7,0	8,98±0,04	0	128±1	

¹ 0,00 $\mu\text{mol/L}$; ² Mittelwert±Standardabweichung. GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; RSD, relative Standardabweichung. n=3.

Tabelle 4: Wiederfindung in wässriger Lösung – ELISA.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
0,3	0,39±0,06	15	129±20	105±17
0,8	0,84±0,08	9	105±10	
1,6	1,51±0,12	8	94±7	
3,2	2,97±0,28	9	93±9	
7,0	7,11±0,67	9	102±10	

¹ 0,01 $\mu\text{mol/L}$; ² Mittelwert±Standardabweichung. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; RSD, relative Standardabweichung. n=6.

5.1.2. Bestimmung von Homoarginin in dialysiertem Plasma

Zum weiteren Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA wurden die hArg-Konzentrationen in dialysiertem Plasma mit zugefügtem hArg bestimmt. Hierfür wurden die Lösungen verwendet, die in der LC-MS/MS-Methode als Kalibrierlösungen mit den Konzentrationen 0 – 2 – 5 – 10 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt werden. Da der Messbereich des ELISAs nur bis zu einer Konzentration von 7 $\mu\text{mol/L}$ hArg reicht, wurde die 10 mikromolare Lösung für die Bestimmung mittels ELISA 1:2 verdünnt und das Ergebnis mit zwei multipliziert. Die Korrelationskoeffizienten der linearen Regressionsanalysen von der zugefügten mit der gemessenen hArg-Konzentration waren $r^2=0,99$ für LC-MS/MS, $r^2=1,00$ für GC-MS und $r^2=0,96$ für den ELISA (Abbildung 14). Die mittlere Wiederfindungsrate der LC-MS/MS-Methode lag bei $93\pm 7\%$, für die GC-MS-Methode bei $110\pm 2\%$ und für den ELISA bei $99\pm 15\%$ (Tabellen 5-7).

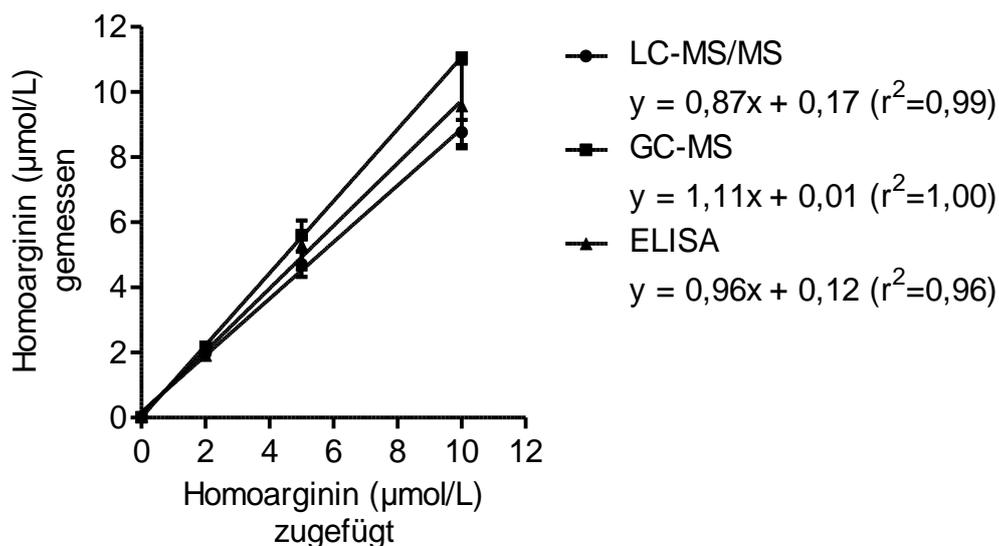


Abbildung 14: Lineare Regressionsanalyse - dialysiertes Plasma. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=6$ für LC-MS/MS; $n=3$ für GC-MS; $n=8-10$ für ELISA. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

Tabelle 5: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – LC-MS/MS.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
2	1,96±0,07	4	98±3	93±7
5	4,69±0,38	8	94±8	
10	8,75±0,38	4	88±4	

¹ Der Leerwert betrug 0,04 $\mu\text{mol/L}$; ² Mittelwert±Standardabweichung. LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie; RSD, relative Standardabweichung. n=6.

Tabelle 6: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – GC-MS.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
2	2,15±0,02	1	108±2	110±2
5	5,59±0,07	1	112±1	
10	11,03±0,09	1	110±1	

¹ Der Leerwert betrug 0,02 $\mu\text{mol/L}$; ² Mittelwert±Standardabweichung. GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; RSD, relative Standardabweichung. n=3.

Tabelle 7: Wiederfindung in dialysiertem Plasma – ELISA.

Homoarginin zugegeben	Homoarginin gemessen minus Leerwert ¹		Wiederfindungsrate	Mittlere Wiederfindungsrate
$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}^2$	RSD %	% ²	% ²
2	1,87±0,16	8	94±8	99±15
5	5,26±0,75	14	105±15	
10	9,53±1,30	14	95±13	

¹ Der Leerwert betrug 0,05 $\mu\text{mol/L}$; ² Mittelwert±Standardabweichung. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; RSD, relative Standardabweichung. n=8.

5.1.3. Homoargininbestimmung in humanen Plasmaproben

Zum Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA bezüglich der hArg-Bestimmung in einer biologischen Matrix wurde die hArg-Konzentration in 141-144 humanen Plasma-Proben der ACS-Studie bestimmt. In linearen Regressionsanalysen für die paarweisen Vergleiche zeigten sich Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,90$ für LC-MS/MS vs. GC-MS, $r^2=0,88$ für LC-MS/MS vs. ELISA und $r^2=0,95$ für GC-MS vs. ELISA (Abbildung 15 A-C links). Die ermittelten Konzentrationen nahmen in der Reihenfolge LC-MS/MS > GC-MS > ELISA ab ($2,23\pm 1,06$ vs. $1,90\pm 0,97$ vs. $1,73\pm 0,86$ $\mu\text{mol/L}$ hArg; $P<0,001$ für alle Vergleiche; einfaktorielle ANOVA mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Post-hoc-Test). Die mittlere Differenz zwischen LC-MS/MS und GC-MS betrug dabei $0,33\pm 0,34$ $\mu\text{mol/L}$ hArg, zwischen LC-MS/MS und ELISA $0,50\pm 0,39$ $\mu\text{mol/L}$ hArg und zwischen GC-MS und ELISA $0,17\pm 0,24$ $\mu\text{mol/L}$ hArg. Die mittels LC-MS/MS erhaltenen Werte waren durchschnittlich $31\pm 23\%$ höher im Vergleich zum ELISA und $21\pm 20\%$ höher im Vergleich zur GC-MS-Methode (Abbildung 15 A-C rechts). Die GC-Methode lieferte im Vergleich zum ELISA um $9\pm 12\%$ höhere Werte.

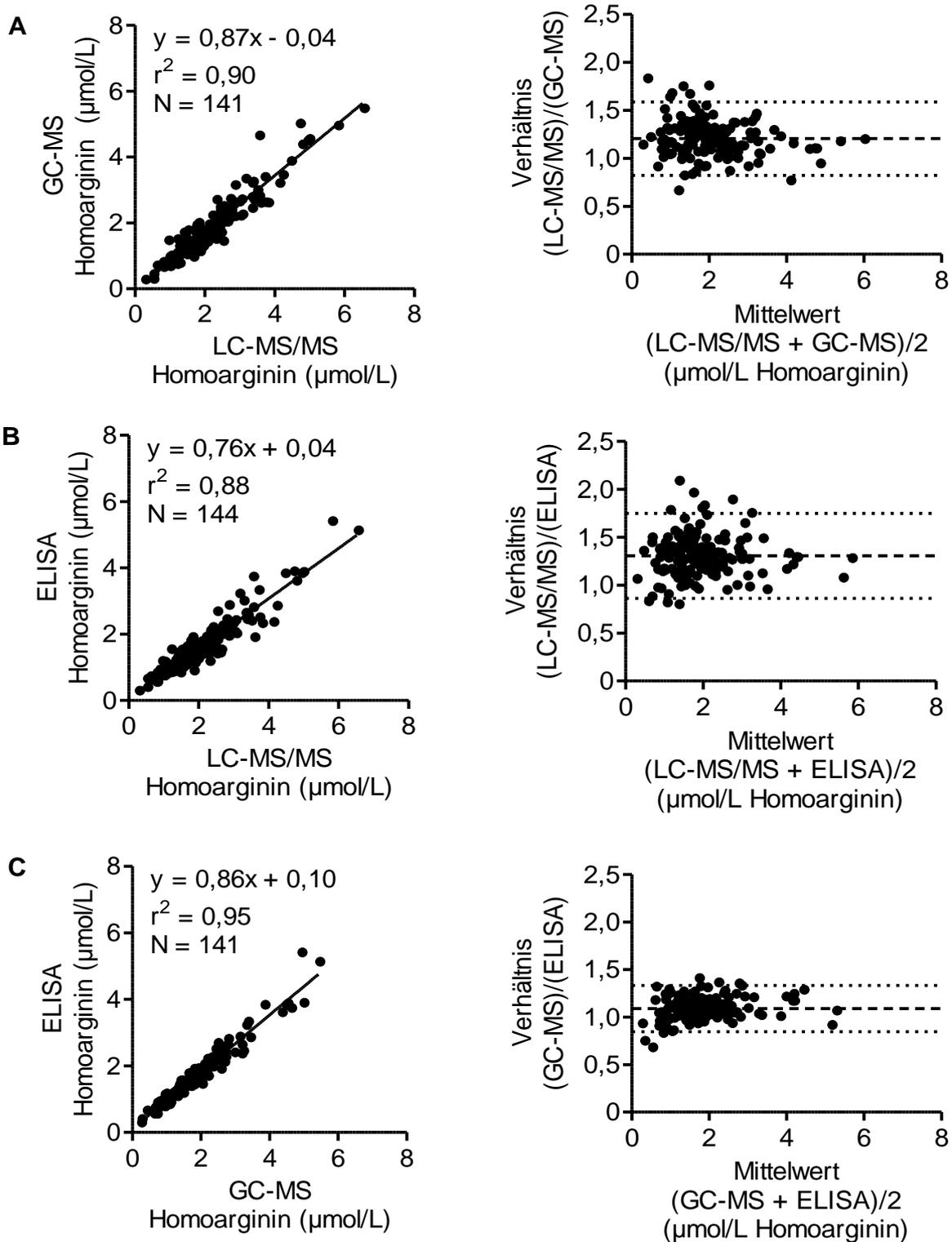


Abbildung 15: Lineare Regressionsanalysen und Bland-Altman-Plots - humanes Plasma. Lineare Regressionsanalysen (links) und Bland-Altman-Plots (rechts) für LC-MS/MS vs. GC-MS (A), LC-MS/MS vs. ELISA (B) und GC-MS vs. ELISA (C). Die gestrichelte Linie in den Bland-Altman-Plots zeigt das mittlere Verhältnis jeweils zweier Methoden, die gepunkteten Linien zeigen die 95% Übereinstimmungsgrenze (Mittlere Differenz $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung). $n=141-144$. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

5.1.4. Untersuchung des isobaren N^{ϵ} -Trimethyllysins

Um zu untersuchen, ob eventuelle Isobare des hArg mittels der LC-MS/MS-Methode erfasst würden und so zu den höheren Messwerten führen könnten, wurden die ESI⁺-MS/MS-Spektren von hArg und N^{ϵ} -Trimethyllysin aufgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 16). Die beiden Isobaren zeigen einige gemeinsame Fragmente (z.B. $m/z=86$, 130 und 186). Das Fragment $m/z=211$, welches für die Quantifizierung von hArg verwendet wird, zeigte sich nicht im Spektrum vom N^{ϵ} -Trimethyllysin, sodass diese Substanz in diesem Setting nicht mit der hArg-Bestimmung interferiert.

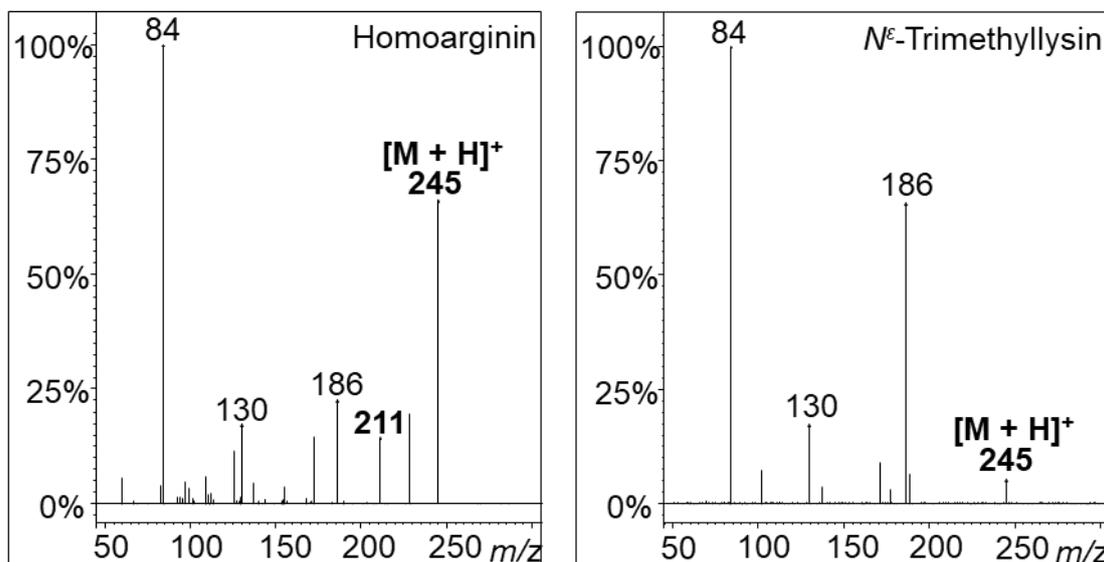


Abbildung 16: ESI⁺-Tandem-Massenspektren von O-butyliertem (links) Homoarginin und (rechts) N^{ϵ} -Trimethyllysin. Die Mutterionen ($[M + H]^+$) wurden einer kollisionsinduzierten Dissoziation mit Argon bei einer Kollisionsenergie von 14 eV unterzogen. ESI⁺, positive Elektrospray-Ionisation; m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

5.1.5. Untersuchung des Enantiomers D-Homoarginin

Zur Untersuchung einer möglichen chromatographischen Trennung der beiden Enantiomere wurden wässrige Lösungen mit 2 $\mu\text{mol/L}$ L- bzw. D-hArg gemessen. Die Retentionszeiten der LC-MS/MS-Methode unterschieden sich nicht ($1,22 \pm 0,02$ vs. $1,20 \pm 0,02$ min für L-hArg vs. D-hArg; $P=0,20$; zweiseitiger t-Test; jeweils $n=6$;). Analog dazu unterschieden sich auch die Retentionszeiten der GC-MS-Methode von L- und D-hArg nicht ($10,35 \pm 0,004$ vs. $10,35 \pm 0,008$ min; $P=0,21$; zweiseitiger t-Test; jeweils $n=6$). Mittels hArg-ELISA konnte bei Messung einer wässrigen 2 mikromolaren Lösung kein D-hArg detektiert werden ($0,00 \pm 0,00$ $\mu\text{mol/L}$; $n=8$).

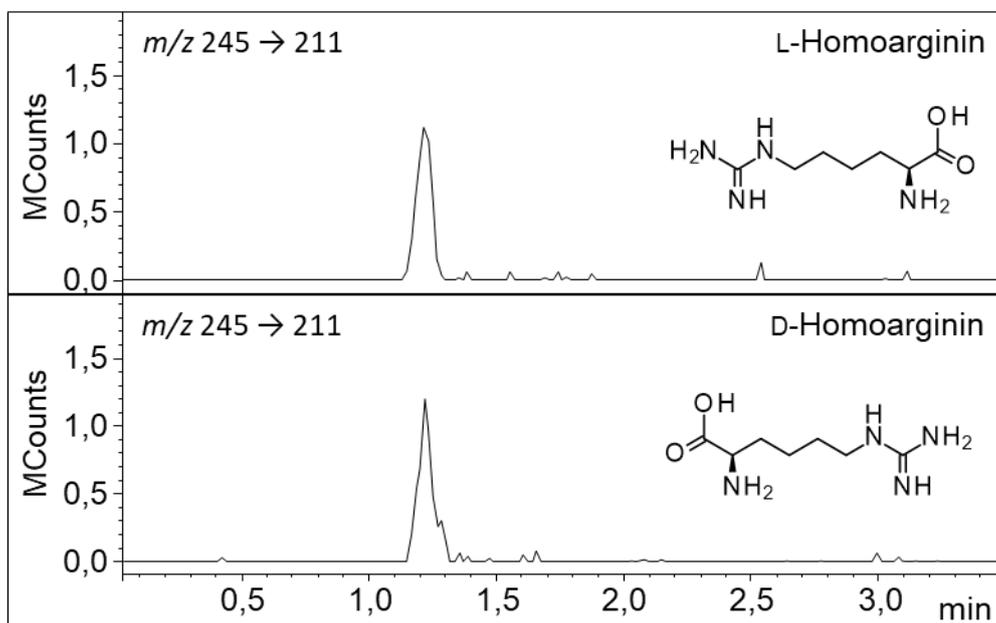


Abbildung 17: LC-MS/MS-Chromatogramme von L- und D-Homoarginin. LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie; m/z, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

5.1.6. Biologische Applikation – Homoargininkonzentration in Patienten mit koronarer Herzkrankheit versus akutem Koronarsyndrom

Zum Vergleich der biologischen Applikation der drei Methoden wurde die Homoargininkonzentration in 131 Patienten der ACS-Studie bestimmt (36 Patienten mit einer stabilen KHK und 95 ACS-Patienten). Die allgemeinen Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle 8 aufgeführt. In einer Querschnittsanalyse wiesen die ACS-Patienten niedrigere hArg-Plasmakonzentrationen als KHK-Patienten auf, welches mittels jeder der drei getesteten Methoden gezeigt werden konnte ($2,04 \pm 0,92$ vs. $2,56 \pm 1,12$ $\mu\text{mol/L}$, Mittelwert \pm Standardabweichung, $P < 0,01$, zweiseitiger t-Test für LC-MS/MS; $1,74 \pm 0,87$ vs. $2,18 \pm 1,08$ $\mu\text{mol/L}$, $P < 0,05$ für GC-MS und $1,59 \pm 0,75$ vs. $1,98 \pm 0,95$ $\mu\text{mol/L}$, $P < 0,05$ für ELISA; Abbildung 18).

Tabelle 8: Allgemeine Charakteristika der ACS-Studie.

	KHK (n=36)	ACS (n=95)	P-Wert
Alter (Jahre)	65 \pm 10	69 \pm 12	<0,05
Geschlecht (n, % männlich)	30 (83%)	66 (69%)	0,11
Bodymass-Index (kg/m²)	27 \pm 4	27 \pm 5	0,65
eGFR (mL/min)	92 \pm 33	80 \pm 30	<0,05
Hypertonie (n, %)	31 (86%)	82 (86%)	0,98
Hypercholesterinämie (n, %)	30 (83%)	69 (73%)	0,23
Diabetes (n, %)	13 (36%)	26 (27%)	0,33
Raucher (n, %)	8 (22%)	31 (33%)	0,24
Kombinierter Endpunkt¹ (n, %)	8 (22%)	22 (26%)	0,69
Homoarginin ($\mu\text{mol/L}$)			
LC-MS/MS	2,56 \pm 1,12	2,04 \pm 0,92	<0,01
GC-MS	2,18 \pm 1,08	1,74 \pm 0,87	<0,05
ELISA	1,98 \pm 0,95	1,59 \pm 0,75	<0,05

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Auf Unterschiede wurden mittels zweiseitigem t-Test (kontinuierliche Variablen) oder Chi-Quadrat-Test (dichotome Variablen) getestet. ¹ Myokardinfarkt, Schlaganfall, Tod (nach 1.200 Tagen). ACS, akutes Koronarsyndrom; eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; KHK, koronare Herzkrankheit; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

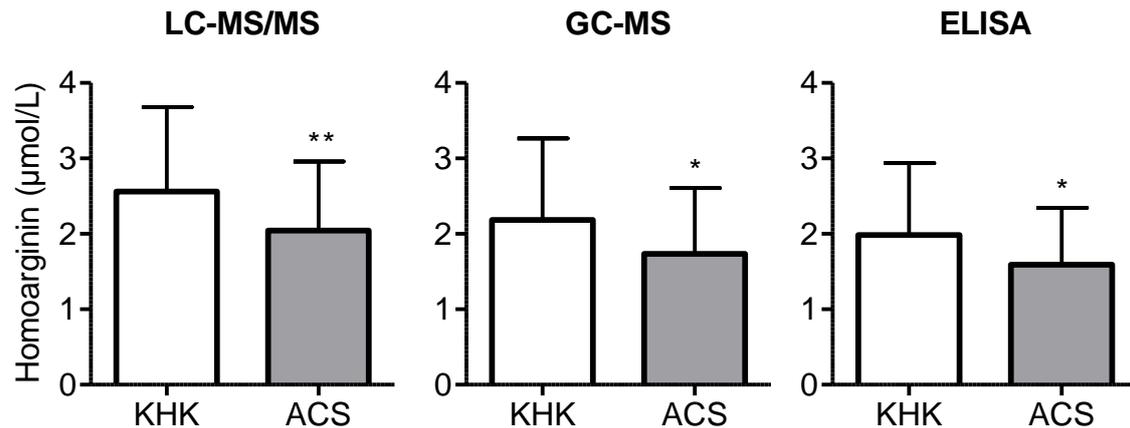


Abbildung 18: Homoarginin-Plasmakonzentration in der ACS-Studie. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm Standardabweichung. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; zweiseitiger t -Test. ACS, akutes Koronarsyndrom; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; KHK, koronare Herzkrankheit; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

Für die Analyse des kombinierten Endpunktes MI, Schlaganfall und Tod im Beobachtungszeitraum von 1.200 Tagen wurden die Patienten nach dem Median der Plasmakonzentration der jeweiligen Methode gruppiert. Patienten mit hArg-Plasmakonzentrationen kleiner als der Median der Kohorte ($2,09 \mu\text{mol/L}$ für LC-MS/MS; $1,71 \mu\text{mol/L}$ für GC-MS; $1,53 \mu\text{mol/L}$ für ELISA) zeigten eine höhere Wahrscheinlichkeit, den kombinierten Endpunkt zu erreichen ($P < 0,001$ für LC-MS/MS; $P < 0,001$ für GC-MS; $P < 0,01$ für ELISA; Log-rank-Test). Nach 1.200 Tagen erlitten in der Gruppe mit Plasmakonzentrationen unter dem Median mehr Patienten einen MI, Schlaganfall oder verstarben, verglichen mit den Patienten oberhalb des Medians (49 vs. 16% für LC-MS/MS; 47 vs. 18% für GC-MS; 46 vs. 17% für ELISA).

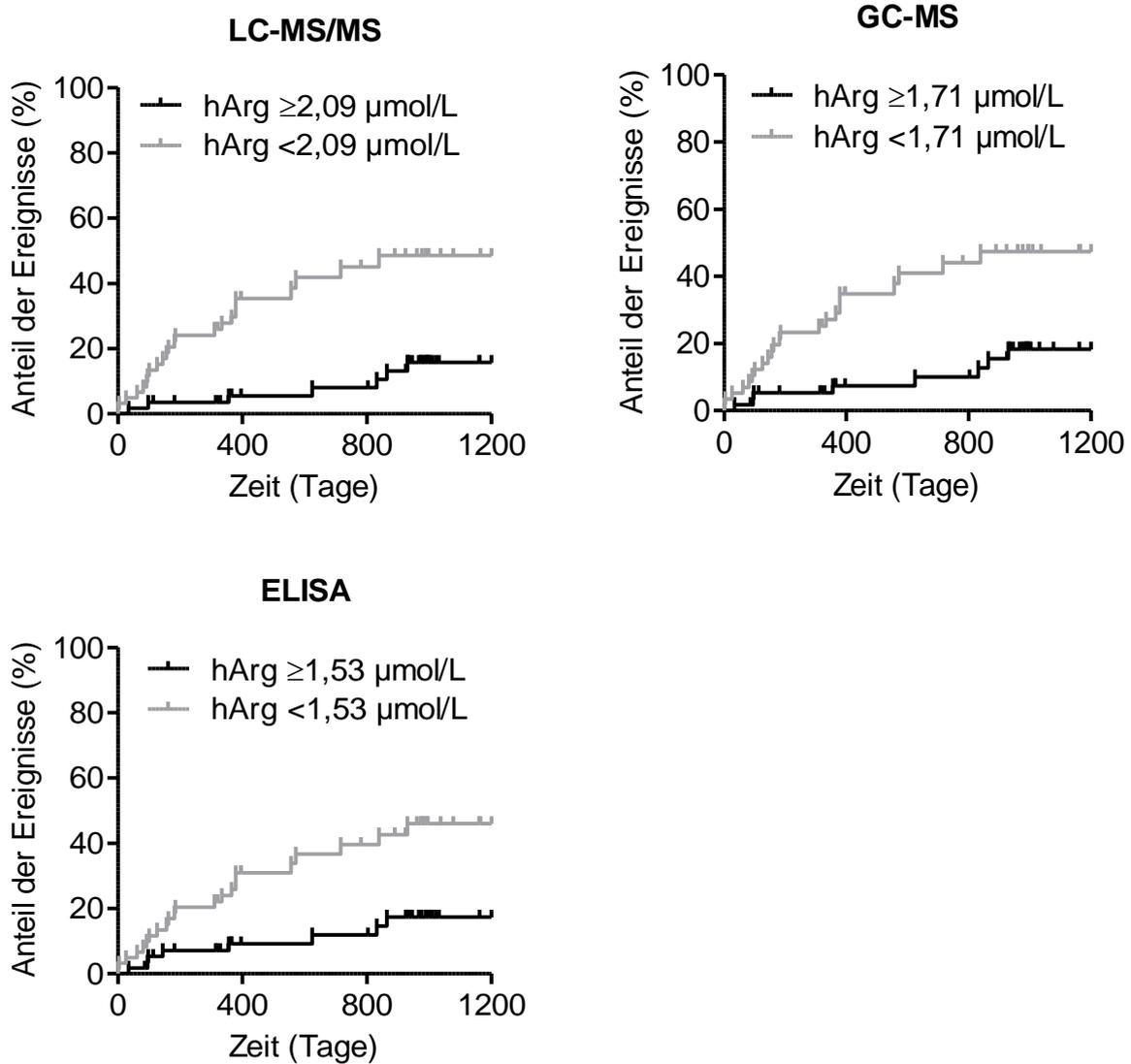


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven. Überlebenszeit-Analyse für den kombinierten Endpunkt Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod nach 1.200 Tagen. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; hArg, Homoarginin; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.

5.2. ELISA-Referenzintervalle für Homoarginin in der gesunden Bevölkerung

Es wurden altersabhängige Referenzintervalle der hArg-Serumkonzentration mit dem hArg-ELISA bestimmt. Die allgemeinen Charakteristika der Kohorte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Hierfür wurden 858 Frauen eines mittleren Alters von 41 [32-50] Jahren (Median [25.-75. Perzentil]) und 451 Männer eines mittleren Alters von 39 [30-49] Jahren untersucht. Insgesamt wiesen die Frauen eine niedrigere hArg-Konzentration auf als die Männer (1,93 [1,49-2,59] vs. 2,02 [1,63-2,61] $\mu\text{mol/L}$; $P=0,03$, Kruskal-Wallis-Test). In der Altersgruppe 20-29 Jahre wiesen Frauen höhere hArg-Werte im Vergleich zu gleichaltrigen Männern auf (2,33 [1,74-3,28] vs. 1,96 [1,61-2,36] $\mu\text{mol/L}$; $P<0,01$), während in den Altersgruppen 30-39 Jahre und 40-49 Jahre kein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern bestand (1,96 [1,5-2,73] vs. 2,03 [1,56-2,62] $\mu\text{mol/L}$ und 1,86 [1,43-2,5] vs. 2,02 [1,64-2,69] $\mu\text{mol/L}$; $P=0,96$ und $P=0,05$). In den Altersgruppen 50-59 Jahre und ≥ 60 Jahre hatten Frauen im Vergleich zu den Männern niedrigere hArg-Konzentrationen (1,75 [1,38-2,2] vs. 2,22 [1,84-2,73] $\mu\text{mol/L}$ und 1,65 [1,41-2,2] vs. 1,91 [1,68-2,41] $\mu\text{mol/L}$; $P<0,01$ und $P=0,01$).

Mittels Quantil-Regression wurden alters- und geschlechtsabhängige Referenzintervalle (2,5.-97,5. Perzentil) bestimmt (Abbildung 20, Tabelle 10). In der gesamten Referenzkohorte lag das Intervall für Frauen bei 0,89-5,17 $\mu\text{mol/L}$, wobei die Intervalle mit steigendem Alter geringer wurden (1,00-6,20 $\mu\text{mol/L}$ für 20-29-Jährige und 0,92-3,05 $\mu\text{mol/L}$ für ≥ 60 -Jährige). Das Referenzintervall der gesamten männlichen Kohorte lag bei 1,08-3,76 $\mu\text{mol/L}$ und zeigte zwischen den verschiedenen Altersgruppen keine wesentliche Veränderung. Sensitivitätsanalysen in verschiedenen Subgruppen der Kohorte (Nichtraucher, Normolipidämie, $\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$ und $\text{eGFR} \geq 90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) führten ebenfalls nicht zu wesentlichen Veränderungen der Referenzintervalle (Tabelle 11).

Tabelle 9. Allgemeine Eigenschaften der Studienpopulation stratifiziert nach dem Geschlecht.

	Frauen (n=858)	Männer (n=451)	p- Wert
Alter (Jahre)	41 [32-50]	39 [30-49]	0,02
Body-Mass-Index (kg/m²)	23,6 [21,7-25,9]	25,0 [22,8-26,6]	<0,01
Aktuelle Raucher (%)	33,1	37,6	0,11
Systolischer Blutdruck (mmHg)	110 [103-119]	124 [116-130]	<0,01
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	71 [66-76]	74 [70-79]	<0,01
HbA_{1c} (%)	4,9 [4,6-5,3]	5,1 [4,8-5,4]	<0,01
Gesamtcholesterol (mmol/L)	5,20 [4,60-5,90]	5,10 [4,30-5,80]	<0,01
High-density Lipoprotein (mmol/L)	1,67 [1,45-1,90]	1,31 [1,13-1,52]	<0,01
Low-density Lipoprotein (mmol/L)	3,03 [2,45-3,61]	3,19 [2,58-3,81]	<0,01
Triglyceride (mmol/L)	0,96 [0,73-1,29]	1,14 [0,81-1,57]	<0,01
Kreatinin (µmol/L)	67 [59-73]	82 [74-90]	<0,01
Homoarginin (µmol/L)			
Insgesamt	1,93 [1,49-2,59]	2,02 [1,63-2,61]	0,03
Nach Altersgruppen:			
20-29 Jahre	2,33 [1,74-3,28]	1,96 [1,61-2,36]	<0,01
30-39 Jahre	1,96 [1,5-2,73]	2,03 [1,56-2,62]	0,96
40-49 Jahre	1,86 [1,43-2,5]	2,02 [1,64-2,69]	0,05
50-59 Jahre	1,75 [1,38-2,2]	2,22 [1,84-2,73]	<0,01
≥ 60 Jahre	1,65 [1,41-2,2]	1,91 [1,68-2,41]	0,01

Kontinuierliche Variablen sind als Median (25.-75. Perzentil), kategoriale Variablen als prozentualer Anteil dargestellt. Zum Vergleich der Gruppen wurden der Kruskal-Wallis-Test (kontinuierliche Variablen) oder der Chi-Quadrat-Test (kategoriale Variablen) angewandt. HbA_{1c}, Glykohämoglobin.

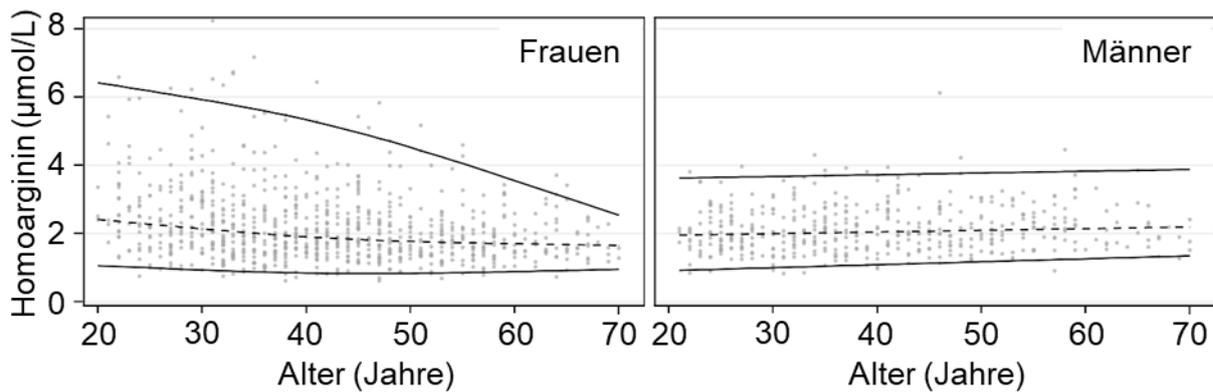


Abbildung 20: Geschlechtsabhängige Referenzintervalle für Homoarginin. Aufgetragen sind die Einzelwerte (Punkte) für 858 Frauen (links) und 451 Männer (rechts) mit den Referenzkurven basierend auf der Quantil-Regression für den Median und das 2,5. sowie 97,5. Perzentil.

Tabelle 10. Alters- und geschlechtsabhängige Referenzintervalle für Homoarginin.

	Frauen	Männer
Altersgruppen	Untere-obere Grenze ($\mu\text{mol/L}$) (2,5%-97,5% Perzentil)	Untere-obere Grenze ($\mu\text{mol/L}$) (2,5%-97,5% Perzentil)
Insgesamt	0,89-5,17	1,08-3,76
20-29 Jahre	1,00-6,20	0,96-3,65
30-39 Jahre	0,89-5,67	1,04-3,70
40-49 Jahre	0,83-4,99	1,13-3,75
50-59 Jahre	0,86-4,10	1,22-3,80
≥ 60 Jahre	0,92-3,05	1,31-3,85

Berechnung der Referenzintervalle basierend auf der Quantil-Regression (Abbildung 20).

Tabelle 11. Sensitivitätsanalyse der geschlechtsabhängigen Homoarginin-Referenzintervalle.

	Frauen	Männer
Subpopulationen	Untere-obere Grenze ($\mu\text{mol/L}$) (2,5%-97,5% Perzentil)	Untere-obere Grenze ($\mu\text{mol/L}$) (2,5%-97,5% Perzentil)
Insgesamt	0,89-5,17	1,08-3,76
Nichtraucher	0,95-5,43	1,25-3,81
Normolipidämie¹	0,88-5,43	1,03-3,81
BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$	0,87-5,33	1,03-3,55
eGFR $\geq 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$	0,89-5,60	0,93-3,85

¹ Normolipidämie ist definiert als Triglyceride $\leq 1,9 \text{ mmol/L}$, Gesamtcholesterol $\leq 6 \text{ mmol/L}$, high-density Lipoprotein $\geq 1,03 \text{ mmol/L}$ und low-density Lipoprotein $\leq 3,34 \text{ mmol/L}$. BMI, Body-Mass-Index; eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate.

5.3. Homoarginin-ELISA-Schnelltest

Um ein schnelles Screening von Patienten mit niedriger hArg-Konzentration in der Klinik zu ermöglichen, wurde diese Variante des kommerziellen hArg-ELISAs (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg) entwickelt. Die Probenvorbereitung und die Antiserumkonzentration wurden mit freundlicher fachlicher und materieller Unterstützung der Wesamin GmbH & Co. KG so modifiziert, dass eine Verkürzung der Inkubationszeiten auf die Hälfte des normalen ELISAs vorgenommen werden konnte.

5.3.1. Vergleich ELISA „Normal“ vs. ELISA „Schnelltest“

5.3.1.1. Austestung der Kalibrierung

Die Probenaufarbeitung und die Antiserumkonzentration wurde so verändert, dass eine möglichst hohe Steilheit der Asymptote (Parameter B der Kalibrationskurve nach Gleichung 4) und ein Wendepunkt nahe der 2 $\mu\text{mol/L}$ -Konzentration (Parameter C) erreicht wurde. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Kalibrierkurven des ELISAs „Normal“ und des ELISAs „Schnelltest“, Tabelle 12 zeigt die zugehörigen Parameter der Kalibrierkurve.

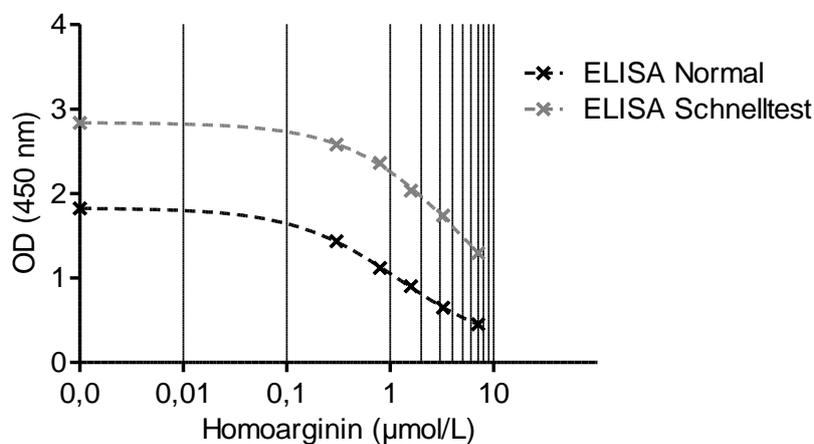


Abbildung 21: Kalibrierkurven der Homoarginin-ELISAs "Normal" vs. "Schnelltest". ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; OD, Optische Dichte bei 450 nm.

Tabelle 12: Variablen der 4-Parameter-Analyse.

	A	B	C	D	r ²
Normal	1,83	0,92	1,04	0,24	0,999
Schnelltest	2,84	0,92	2,83	0,69	0,997

A: Minimum der Asymptote; B: Steilheit; C: Wendepunkt; D: Maximum der Asymptote

5.3.1.2. Austestung in humanen Serumproben

Hierfür wurde die hArg-Serumkonzentration in 40 Patienten der ACS-Studie mit dem ELISA „Normal“ und dem ELISA „Schnelltest“ gemessen. Eine lineare Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten r^2 von 0,96 (Abbildung 22 links). Die mittels des normalen ELISAs gemessenen Werte waren $21 \pm 16\%$ höher als die Werte des Schnelltestes (Abbildung 22 rechts).

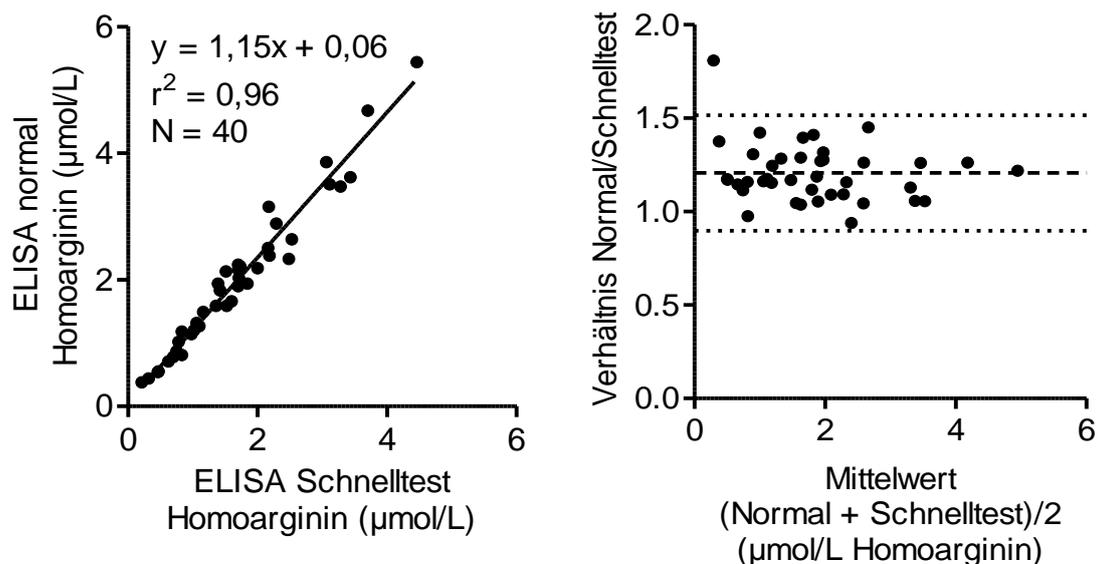


Abbildung 22: Lineare Regressionsanalyse und Bland-Altman-Plot für den Vergleich ELISA „Normal“ vs. „Schnelltest“. Links: Lineare Regressionsanalyse ELISA "Normal" vs. "Schnelltest" in humanen Serumproben. Rechts: Bland-Altman-Plot für den Vergleich ELISA "Normal" vs. "Schnelltest". Das mittlere Verhältnis Normal/Schnelltest war $1,21 \pm 0,16$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, gestrichelte Linie) mit einer 95% Übereinstimmungsgrenze (Mittleres Verhältnis $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung) von $0,90$ bis $1,52$ (gepunktete Linien). ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay.

5.3.2. Validierung des qualitativen Schnelltestes

Der Schnelltest soll dazu verwendet werden, Patienten mit einer niedrigen hArg-Konzentration zu identifizieren. Hierfür wurde ein Grenzwert von 2 $\mu\text{mol/L}$ gewählt, der bei jedem Testansatz als Standard gemessen wurde. Daneben wurden zwei Kontrollen (1,5 und 2,5 $\mu\text{mol/L}$) mitgemessen und der Faktor $\text{OD}_{\text{Standard}}/\text{OD}_{\text{Kontrolle}}$ gebildet. Die Validierung wurde an fünf verschiedenen Tagen von drei Personen durchgeführt (Tabelle 13). Die mittleren Intra-Assay-VKs waren 2,1% und 2,8% für 1,5 und 2,5 $\mu\text{mol/L}$ hArg. Die VKs der einzelnen Tage lagen zwischen 1,6-2,5% und 1,9-3,8%. Alle Einzelwerte lagen innerhalb der vorher definierten Grenzen, sodass diese Prüfung als bestanden gilt. Die Inter-Assay-VKs waren 2,0 und 2,9% für 1,5 und 2,5 $\mu\text{mol/L}$ hArg (Tabelle 14). Alle Einzelwerte lagen innerhalb der Grenzen (0,86-0,97 und 0,98-1,17 für 1,5 und 2,5 $\mu\text{mol/L}$; Mittelwert \pm 3 Standardabweichungen). Diese Grenzwerte für die Faktoren des Standards mit den Kontrollen dienen in der Durchführung des Schnelltestes weiterhin für die Prüfung der Qualität des Testes.

Tabelle 13: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit.

	1,5 µmol/L				
Tag	1	2	3	4	5
Person	A	B	A	A	C
N-Zahl	5	5	5	5	5
Faktor¹	0,91±0,02	0,91±0,02	0,92±0,02	0,92±0,02	0,92±0,02
Grenzen Faktor²	0,86-0,96	0,84-0,98	0,88-0,97	0,85-0,99	0,86-0,97
Minimum Faktor	0,90	0,88	0,90	0,90	0,89
Maximum Faktor	0,94	0,93	0,94	0,96	0,94
VK (%)	1,8	2,5	1,6	2,5	2,1
Mittlerer VK (%)	2,1				
	2,5 µmol/L				
Tag	1	2	3	4	5
Person	A	B	A	A	C
N-Zahl	5	5	5	5	5
Faktor¹	1,09±0,02	1,07±0,04	1,08±0,03	1,06±0,02	1,08±0,03
Grenzen Faktor²	1,03-1,15	0,95-1,20	0,98-1,18	0,98-1,13	0,98-1,18
Minimum Faktor	1,06	1,02	1,03	1,03	1,04
Maximum Faktor	1,12	1,12	1,11	1,09	1,13
VK (%)	1,9	3,8	3,0	2,4	3,1
Mittlerer VK (%)	2,8				

¹ Mittelwert±Standardabweichung; ² Mittelwert±3 Standardabweichungen. VK, Variationskoeffizient.

Tabelle 14: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit.

	1,5 µmol/L	2,5 µmol/L
Faktor¹	0,92±0,02	1,08±0,03
Grenzen Faktor²	0,86-0,97	0,98-1,17
Minimum Faktor	0,88	1,02
Maximum Faktor	0,96	1,13
VK (%)	2,0	2,9

¹ Mittelwert±Standardabweichung; ² Mittelwert±3 Standardabweichungen. VK, Variationskoeffizient.

5.4. Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen

5.4.1. Schlaganfall und Schlaganfallrisiko

Es wurde der Zusammenhang der hArg-Plasmakonzentrationen mit der Schlaganfallätiologie, dem Stenosegrad der Carotis interna, VHF und dem CHA₂DS₂-VASc-Score in drei Querschnittsstudien untersucht. Die „UKE-Kohorte“ diente als „Discovery-Kohorte“ und die Ergebnisse wurden in zwei Validierungs-Kohorten, der Leeds- und Harburg-Kohorte, validiert sowie Metaanalysen durchgeführt. In den Tabellen 15-17 sind die allgemeinen Charakteristika der drei Kohorten aufgeführt. In Spearman-Korrelationsanalysen war hArg in der UKE-Kohorte positiv mit der eGFR ($\rho=0,18$; $P=0,004$; Tabelle 18), Triglyceriden ($\rho=0,16$; $P=0,01$), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ($\rho=0,15$; $P=0,01$), Glutamat-Pyruvat-Transaminase ($\rho=0,14$; $P=0,03$), Kreatinkinase ($\rho=0,17$; $P=0,005$) und Arg ($\rho=0,19$; $P=0,002$), invers mit dem Alter ($\rho=-0,16$; $P=0,007$), HDL ($\rho=-0,23$; $P=1,3 \times 10^{-4}$), CRP ($\rho=-0,14$; $P=0,02$) und SDMA ($\rho=-0,14$; $P=0,02$) assoziiert (Tabelle 18). hArg-Konzentrationen waren höher in den Männern, verglichen mit den Frauen ($1,96 \pm 0,79$ vs. $1,57 \pm 0,62$; $P < 0,001$; zweiseitiger t-Test).

Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der UKE-Kohorte.

	UKE-Kohorte
Alter (Jahre)	65±13
Männliches Geschlecht (n, %)	162 (60%)
Body-Mass-Index (kg/m²)	27±4
Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (mL/min)	84±32
Systolischer Blutdruck (mmHg)	139±19
Diastolische Blutdruck (mmHg)	77±11
Totales Cholesterol (mmol/L)	4,6±1,4
Low-density Lipoprotein (mmol/L)	2,5±1,0
High-density Lipoprotein (mmol/L)	1,4±0,5
Triglyceride (mmol/L)	1,5 (1,1-2,1)
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (U/L)	24 (19-30)
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (U/L)	20 (14-29)
Kreatinkinase (U/L)	90 (66-124)
C-reaktives Protein (mg/dL)	3,1 (1,0-5,0)
Homoarginin (µmol/L)	1,80±0,75
Arginin (µmol/L)	70±21
Asymmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,54±0,14
Symmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,60±0,23
Raucher (n, %)	58 (21%)
Hypertonus (n, %)	204 (75%)
Diabetes (n, %)	62 (23%)
Hypercholesterolämie (n, %)	111 (41%)
Kardiovaskuläre Erkrankung (n, %)	222 (82%)
Vorhergehender Myokardinfarkt (n, %)	32 (12%)
Vorhergehender Schlaganfall (n, %)	173 (64%)
Vorhergehender transitorische ischämische Attacke (n, %)	87 (32%)
Lipidsenkende Medikation (n, %)	215 (79%)
Antihypertensive Medikation (n, %)	210 (77%)
Thrombozytenaggregationshemmer (n, %)	229 (84%)
Antikoagulantien (n, %)	36 (13%)
Vorhofflimmern (n, %)	21 (8%)

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung (normalverteilt) oder Median (IQR) (nicht normalverteilt), kategoriale Daten als n-Zahl (%) dargestellt. n=272

Tabelle 16: Allgemeine Charakteristika der „Leeds-Stroke-Studie“.

	Leeds-Kohorte
Alter (Jahre)	70±12
Männliches Geschlecht (n, %)	210 (53%)
Body-Mass-Index (kg/m²)	26±5
Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (mL/min)	60±18
Systolischer Blutdruck (mmHg)	161±31
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	91±17
Totales Cholesterol (mmol/L)	5,5±1,3
Triglyceride (mmol/L)	1,5 (1,2-2,1)
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (U/L)	21 (18-28)
C-reaktives Protein (mg/dL)	6,6 (2,5-22,3)
Homoarginin (µmol/L)	1,13±0,52
Arginin (µmol/L)	95±34
Asymmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,52±0,11
Symmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,55±0,25
Raucher (n, %)	74 (19%)
Hypertonus (n, %)	163 (41%)
Diabetes (n, %)	58 (15%)
Hypercholesterolämie¹ (n, %)	165 (56%)
Koronare Herzkrankheit (n, %)	111 (28%)
Vorhergehende zerebrovaskuläre Erkrankung (n, %)	112 (28%)
Antihypertensive Medikation (n, %)	107 (27%)
Thrombozytenaggregationshemmer (n, %)	95 (24%)
Antikoagulantien (n, %)	12 (3%)
Vorhofflimmern (n, %)	65 (16%)

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung (normalverteilt) oder Median (IQR) (nicht normalverteilt), kategoriale Daten als n-Zahl (%) dargestellt.

¹ *Hypercholesterolämie ist definiert als totales Cholesterol >5,2 mmol/L und / oder Einnahme von Lipidsenkern. n=394*

Tabelle 17: Allgemeine Charakteristika der „Harburg-Stroke-Studie“.

	Harburg-Kohorte
Alter (Jahre)	70±11
Männliches Geschlecht (n, %)	59 (43%)
Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (mL/min)	80±42
Systolischer Blutdruck (mmHg)	143±17
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	84±10
Totales Cholesterol (mmol/L)	4,9±1,1
Low-density Lipoprotein (mmol/L)	2,9±0,9
High-density Lipoprotein (mmol/L)	1,3±0,5
Triglyceride (mmol/L)	1,3 (0,8-1,9)
C-reaktives Protein (mg/dL)	4,8 (2,2-14,2)
Homoarginin (µmol/L)	1,84±0,83
Arginin (µmol/L)	59±25
Asymmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,58±0,12
Symmetrisches Dimethylarginin (µmol/L)	0,58±0,42
Übergewicht (n, %)	61 (45%)
Raucher (n, %)	48 (35%)
Hypertonus (n, %)	108 (79%)
Diabetes (n, %)	33 (24%)
Hyperlipoproteinämie (n, %)	73 (53%)
Herzinsuffizienz (n, %)	5 (4%)
Vorhergehender Myokardinfarkt (n, %)	16 (12%)
Vorhofflimmern (n, %)	30 (22%)

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung (normalverteilt) oder Median (IQR) (nicht normalverteilt), kategoriale Daten als n-Zahl (%) dargestellt. n=137

Tabelle 18: Spearman-Korrelationsanalysen von Homoarginin mit den allgemeinen Charakteristika der UKE-Kohorte.

	Rho	P-Wert
Alter	-0,16	<0,01
Body-Mass-Index	0,09	0,14
Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate	0,18	<0,01
Systolischer Blutdruck	0,06	0,35
Diastolischer Blutdruck	0,06	0,30
Cholesterol	-0,04	0,51
Low-density Lipoprotein	0,03	0,57
High-density Lipoprotein	-0,23	<0,001
Triglyceride	0,16	<0,05
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	0,15	<0,05
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	0,14	<0,05
Kreatinkinase	0,17	<0,01
C-reaktives Protein	-0,14	<0,05
Arginin	0,19	<0,01
Asymmetrisches Dimethylarginin	0,02	0,72
Symmetrisches Dimethylarginin	-0,14	<0,05

5.4.1.1. Zusammenhang der Homoarginin-Konzentration mit verschiedenen Subtypen des Schlaganfalls

In der UKE-Kohorte der Patienten mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko hatten 226 Patienten (83%) zuvor bereits einen Schlaganfall erlitten. Diese Patienten wurden nach der OSCP-Klassifizierung entsprechend der verschiedenen Subtypen eingeteilt. In der UKE-Kohorte erlitten 13 Patienten (5%) in der Vergangenheit einen TACI, 75 Patienten (28%) einen PACI, 53 Patienten (19%) einen POCI und 23 Patienten (8%) einen LACI. 57 Patienten (21%) erlitten eine transiente ischämische Attacke, bei 6 Patienten (2%) war der Schlaganfall-Subtyp unbekannt und bei 15 Patienten (6%) wurde eine Dissektion festgestellt. Patienten mit territorialen Infarkten (TACI, PACI, POCI) hatten tendenziell etwas niedrigere hArg-Plasmakonzentrationen, verglichen mit den Patienten, die einen lakunären Infarkt (LACI) erlitten ($1,77 \pm 0,72$ vs. $2,03 \pm 0,85$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,18$; zweiseitiger t-Test). In einer univariaten logistischen Regressionsanalyse zeigte sich kein Zusammenhang des hArg mit territorialen Infarkten (OR [95% CI] für territoriale vs. lakunäre Infarkte pro Anstieg der hArg-

Plasmakonzentration um eine Standardabweichung: 0,73 [0,49-1,09]; P=0,13; Abbildung 23). Nach Adjustierung für Alter und Geschlecht (Modell 2; OR [95% CI]: 0,62 [0,40-0,97]; P=0,03) sowie nach zusätzlicher Adjustierung für Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolämie (Modell 3; OR [95% CI]: 0,63 [0,41-0,97]; P=0,04) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedrigem hArg und territorialen Infarkten in der UKE-Kohorte. In der Leeds-Kohorte fand sich bei 84 Patienten (21%) ein TACI, bei 131 Patienten (33%) ein PACI, bei 40 Patienten (10%) ein POCI und bei 139 Patienten (35%) ein LACI. In dieser Studie zeigte sich sowohl in der univariaten Analyse (Modell 1; OR [95% CI]: 0,70 [0,55-0,89]; P=0,003) als auch in den multivariaten Analysen (Modell 2; OR [95% CI]: 0,69 [0,53-0,91]; P=0,008 und Modell 3; OR [95% CI]: 0,70 [0,53-0,92]; P=0,01) eine Assoziation zwischen der hArg-Konzentration und territorialen Infarkten. Bei einer Metaanalyse beider Studien zeigte sich dieser Zusammenhang im multivariaten Modell 3 mit zusätzlicher Adjustierung für die Studienkohorte (OR [95% CI]: 0,61 [0,46-0,81]; P<0,001).

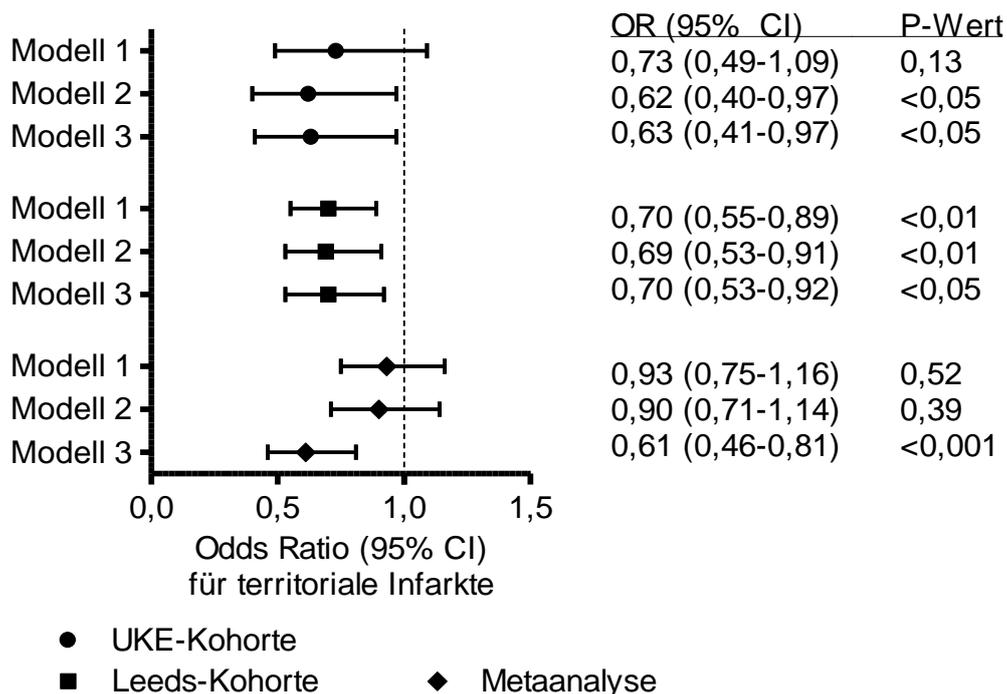


Abbildung 23: Logistische Regressionsanalyse von Homoarginin mit den Schlaganfall-Subtypen nach OSCP. Odds Ratios (95% CI) pro Anstieg der Homoargininkonzentration um eine Standardabweichung (0,75 [UKE]; 0,52 [Leeds]; 0,75 [Metaanalyse] $\mu\text{mol/L}$) für territoriale Infarkte verglichen mit lakunären Infarkten. Modell 1 ist nicht adjustiert, Modell 2 ist adjustiert für Alter und Geschlecht, Modell 3 ist adjustiert für Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolämie. Für die Metaanalyse ist Modell 3 zusätzlich adjustiert für die Studienkohorte. CI, Konfidenzintervall; OSCP, Oxfordshire Community Stroke Project-Klassifikation OR, Odds Ratio.

Weiter wurde eine Assoziation von hArg mit den Subtypen nach der TOAST-Klassifizierung untersucht. In der UKE-Kohorte erlitten 153 Patienten (56%) einen Schlaganfall nach Atherosklerose der großen Gefäße, 19 Patienten (7%) nach Kardioembolien und 15 Patienten (6%) nach Atherosklerose der kleinen Gefäße. Bei 29 Patienten (11%) lag eine andere Ursache für den Schlaganfall vor und bei 10 Patienten (4%) war die Ursache unbekannt. In der Harburg-Kohorte waren eine Atherosklerose der großen Gefäße bzw. kardioembolische Erkrankungen ursächlich für einen Schlaganfall bei 49 Patienten (36%) bzw. 26 Patienten (19%) und bei 17 Patienten (12%) eine Atherosklerose der kleinen Gefäße. Bei 2 Patienten (1%) lag eine andere Ursache für den Schlaganfall vor und bei 43 Patienten (31%) war die Ursache unbekannt. In der UKE-Kohorte zeigten Patienten mit einer Atherosklerose der großen Gefäße oder einem Schlaganfall kardioembolischer Ursache tendenziell niedrigeres hArg als die Patienten mit einer Atherosklerose der kleinen Gefäße ($1,76 \pm 0,74$ vs. $2,07 \pm 0,94$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,23$; zweiseitiger t-Test). Auch hier zeigte sich in der univariaten logistischen Regressionsanalyse kein Zusammenhang zwischen hArg und den Subtypen (Modell 1; OR [95% CI] für einen Schlaganfall nach Kardioembolie oder Atherosklerose der große Gefäße: 0.71 (0.46-1.11); $P=0,13$; Abbildung 24). Nach Adjustierung zeigte sich ein erniedrigtes Risiko für Kardioembolien oder Atherosklerose der großen Gefäße mit steigender hArg-Konzentration (Modell 2; OR [95% CI]: 0.61 (0.38-0.99); $P=0,04$ und Modell 3; OR [95% CI]: 0.62 (0.38-0.99); $P=0,05$). Dieser Zusammenhang fand sich noch stärker ausgeprägt in allen Modellen in der Harburg-Kohorte (Modell 1; OR [95% CI]: 0.43 (0.25-0.76); $P=0,004$; Modell 2; OR [95% CI]: 0.49 (0.28-0.85) ; $P=0,01$ und Modell 3; OR [95% CI]: 0.47 (0.27-0.83); $P=0,01$) sowie in der Metaanalyse beider Studien (Modell 1; OR [95% CI]: 0.59 (0.44-0.80); $P<0,001$; Modell 2; OR [95% CI]: 0.59 (0.43-0.80); $P=0,001$; Modell 3; OR [95% CI]: 0.60 (0.43-0.84); $P=0,002$).

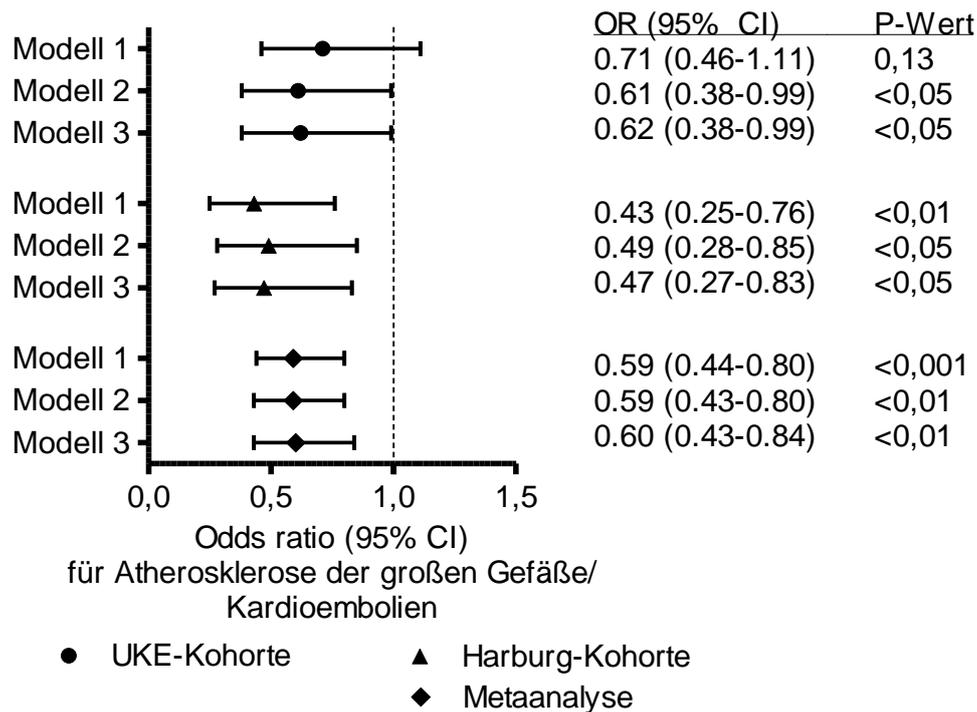


Abbildung 24: Logistische Regressionsanalyse von Homoarginin mit der Schlaganfall-Ätiologie (TOAST-Klassifikation). Odds Ratios (95% CI) pro Anstieg der Homoarginin-Konzentration um eine Standardabweichung (0,75 [UKE]; 0,83 [Harburg]; 0,75 [Metaanalyse] $\mu\text{mol/L}$) für eine Atherosklerose der großen Gefäße oder Kardioembolien, verglichen mit einer Atherosklerose der kleinen Gefäße. Modell 1 ist nicht adjustiert, Modell 2 ist adjustiert für Alter und Geschlecht, Modell 3 ist adjustiert für Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolämie/Hyperlipidämie. Für die Metaanalyse ist Modell 3 zusätzlich adjustiert für die Studienkohorte. CI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio; TOAST, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.

5.4.1.2. Zusammenhang der Homoarginin-Konzentration mit einer Atherosklerose der Carotis interna

In der UKE-Kohorte war hArg nicht mit der IMT der *Carotis interna* assoziiert (Modell 1; β -Koeffizient [95% CI]: -0,02 [-0,07-0,04]; $P=0,58$; Modell 2; β -Koeffizient [95% CI]: 0,00 [-0,06-0,06]; $P=0,96$ und Modell 3; β -Koeffizient [95% CI]: 0,00 [-0,06-0,06]; $P=0,97$; lineare Regressionsanalyse). In logistischen Regressionsanalysen zeigte sich in der UKE-Kohorte kein Zusammenhang von hArg mit dem Vorliegen von Stenosen bzw. einer Okklusion der *Carotis interna* (Modell 1; OR [95% CI]: 0,90 [0,68-1,18]; $P=0,43$; Modell 2; OR [95% CI]: 0,86 [0,64-1,15]; $P=0,30$ und Modell 3; OR [95% CI]: 0,88 [0,65-1,19]; $P=0,41$; Abbildung 25). In der Harburg-Kohorte fanden sich in den

Patienten mit steigendem hArg weniger Stenosen der Carotis interna im univariaten Modell (Modell 1; OR [95% CI]: 0,34 [0,15-0,77]; P=0,01) und auch in den adjustierten Modellen (Modell 2; OR [95% CI]: 0,29 [0,12-0,71]; P=0,007 und Modell 3; OR [95% CI]: 0,29 [0,12-0,71]; P=0,007), was auch in den multivariaten Modellen der Metaanalyse zu sehen war (Modell 2: OR [95% CI]: 0,72 [0,55-0,94]; P=0,02 und Modell 2; OR [95% CI]: 0,74 [0,55-0,99]; P=0,04).

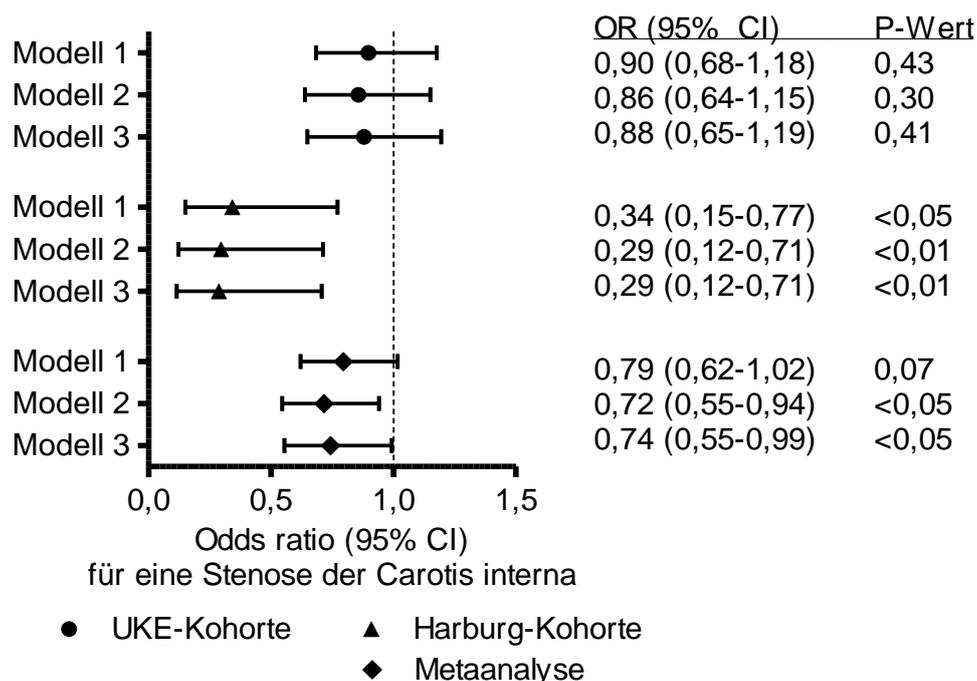


Abbildung 25: Logistische Regressionsanalyse für eine Stenose/Okklusion der Karotis in der UKE- und Harburg-Kohorte sowie Metaanalyse. Odds Ratios (95% CI) pro Anstieg der Homoarginin-Konzentration um eine Standardabweichung (0,75 [UKE]; 0,83 [Harburg]; 0,75 [Metaanalyse] $\mu\text{mol/L}$) für eine Stenose/Okklusion der Karotis. Modell 1 ist nicht adjustiert, Modell 2 ist adjustiert für Alter und Geschlecht, Modell 3 ist adjustiert für Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolämie/Hyperlipidämie. Für die Metaanalyse ist Modell 3 zusätzlich adjustiert für die Studienkohorte. CI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio.

5.4.1.3. Zusammenhang von Homoarginin mit Vorhofflimmern

In der UKE-Kohorte waren die hArg-Plasmakonzentrationen tendenziell etwas niedriger in Patienten mit VHF ($1,57 \pm 0,66$ vs. $1,82 \pm 0,76$ $\mu\text{mol/L}$; P=0,15; zweiseitiger t-Test). Auch in der Harburg-Kohorte zeigte sich dieser Trend ($1,66 \pm 0,62$ vs. $1,89 \pm 0,88$ $\mu\text{mol/L}$; P=0,18), während sich in der Leeds-Kohorte deutlich erniedrigte hArg-Konzentrationen bei Patienten mit VHF zeigten ($0,95 \pm 0,44$ vs. $1,16 \pm 0,53$ $\mu\text{mol/L}$;

P=0,003). In einer logistischen Regressionsanalyse fand sich dieses in der UKE- und Harburg-Kohorte ebenfalls als Trend (P>0,05; Abbildung 26). In der Leeds-Kohorte und in der Metaanalyse zeigten sich im univariaten Modell 1 eine erniedrigte Wahrscheinlichkeit für VHF mit Zunahme der hArg-Konzentration (OR [95% CI] für VHF pro Anstieg um eine Standardabweichung hArg: 0,56 [0,34-0,91]; P=0,02 und 0,67 [0,52-0,86]; P=0,002), in den adjustierten Modellen war dieser Zusammenhang nicht mehr signifikant.

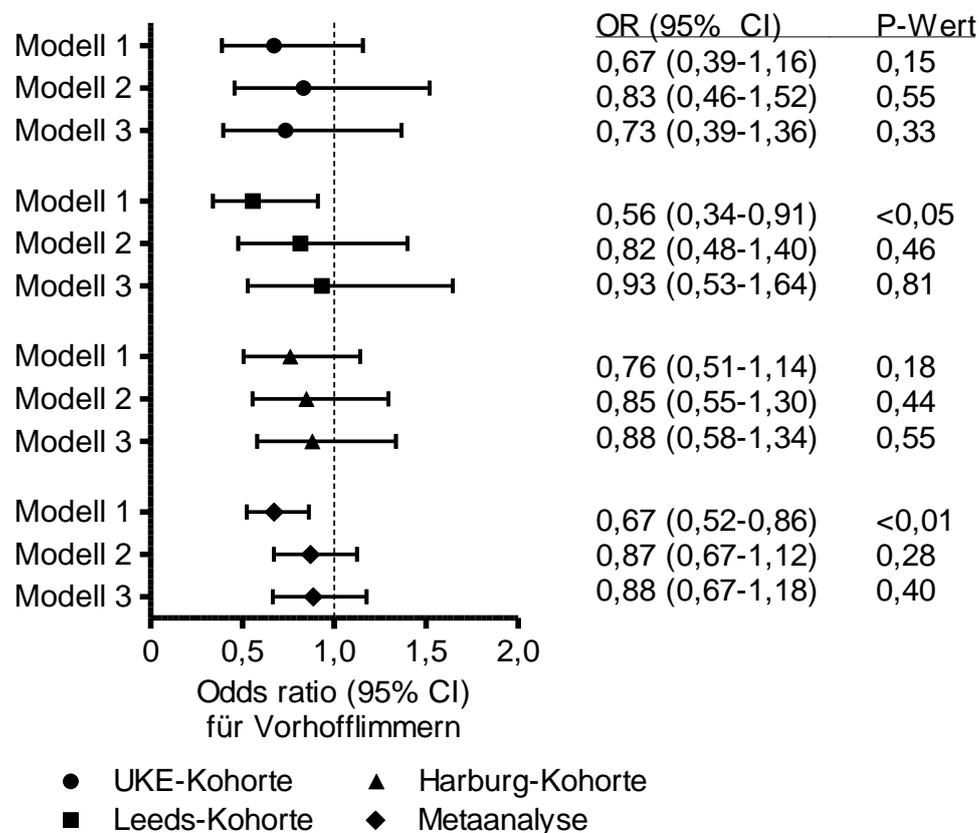


Abbildung 26: Logistische Regressionsanalyse für Homoarginin und Vorhofflimmern. Odds Ratios (95% CI) pro Anstieg der Homoargininkonzentration um eine Standardabweichung (0,75 [UKE]; 0,52 [Leeds]; 0,83 [Harburg]; 0,75 [Metaanalyse] $\mu\text{mol/L}$) für Vorhofflimmern. Modell 1 ist nicht adjustiert, Modell 2 ist adjustiert für Alter und Geschlecht, Modell 3 ist adjustiert für Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes und Hypercholesterolämie/Hyperlipidämie. Für die Metaanalyse ist Modell 3 zusätzlich adjustiert für die Studienkohorte. CI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio.

5.4.1.4. Zusammenhang von Homoarginin mit dem Schlaganfallrisiko

Es wurde der Zusammenhang der hArg-Konzentration mit dem CHA₂DS₂-VASc-Score in allen drei Kohorten untersucht. Der CHA₂DS₂-VASc-Score ist ein gut etablierter Score, um das jährlichen Schlaganfallrisiko abzuschätzen. In allen Kohorten zeigte sich in Spearman-Analysen ein inverser Zusammenhang zwischen dem Score und der hArg-Konzentration (UKE-Kohorte: $\rho=-0,13$; $P=0,03$; Leeds-Kohorte: $\rho=-0,34$; $P<0,001$; Harburg-Kohorte: $\rho=-0,27$; $P<0,01$; Metaanalyse: $\rho=-0,23$; $P<0,001$).

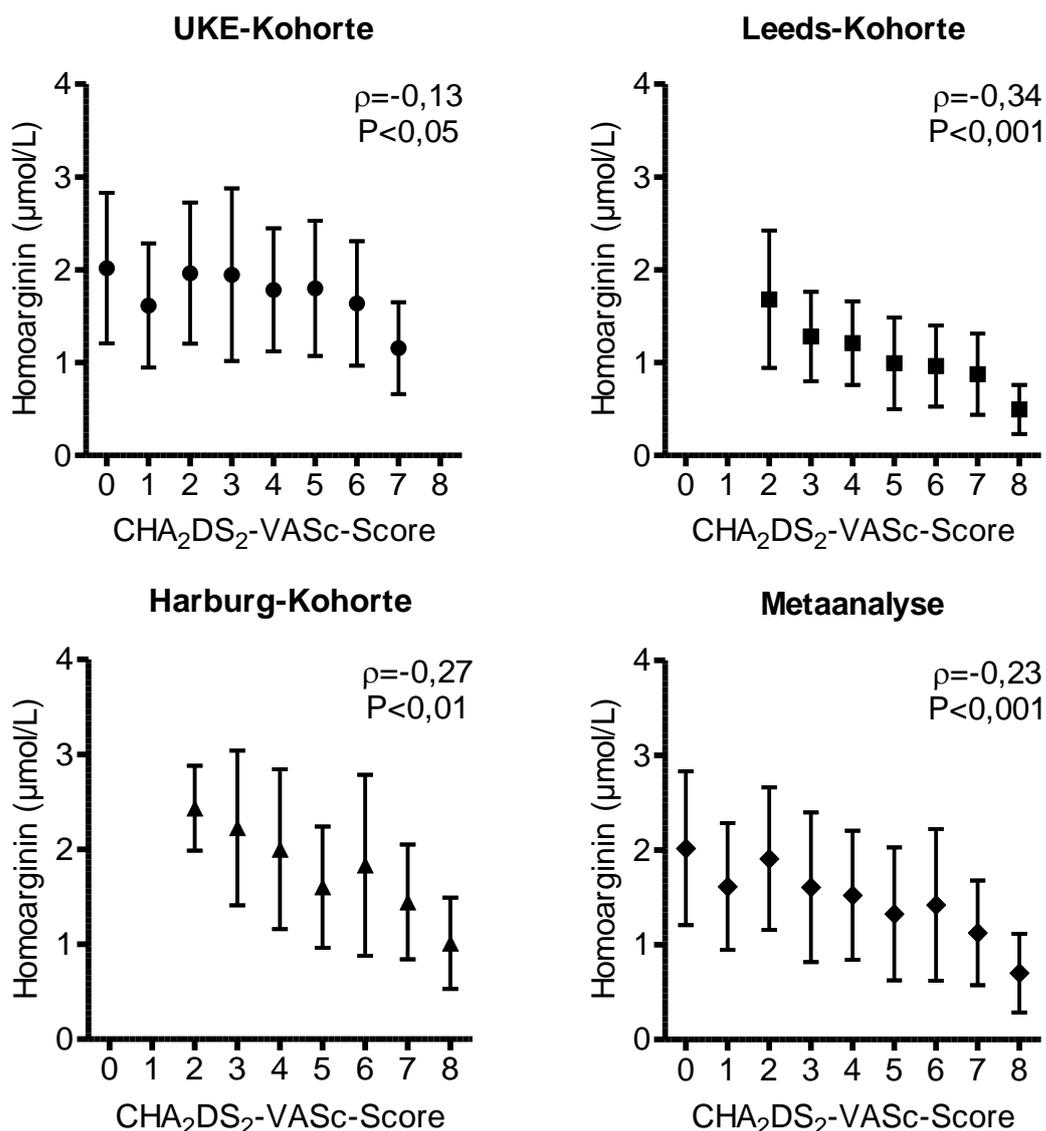


Abbildung 27: Spearman-Korrelation von Homoarginin mit dem CHA₂DS₂-VASc-Score. Der CHA₂DS₂-VASc-Score dient der Abschätzung des Risikos eines erneuten Schlaganfalles (Lip et al., 2010). Bei der Berechnung wurden folgende Parameter berücksichtigt: Alter, Geschlecht und das Vorliegen von Vorerkrankungen (Herzinsuffizienz, Hypertonus, Diabetes mellitus, vorheriger Schlaganfall, transitorische ischämische Attacke oder Thromboembolie sowie vaskuläre Erkrankungen).

5.4.2. Hypertrophe Kardiomyopathie

Es wurden 215 HCM-Patienten in die Studie eingeschlossen. Die allgemeinen Charakteristika der gesamten Kohorte sowie aufgeteilt in Patienten mit normaler diastolischer Funktion vs. Patienten mit DD sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Patienten waren durchschnittlich 54 ± 15 Jahre alt und 58,1% waren männlich. Die mittlere Dicke der SW lag bei 22 ± 5 mm und bei 59 Patienten (39,6%) lag eine Obstruktion des LVOT vor. Mittleres Plasma-hArg lag bei $1,6 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$. 61 Patienten (29,9%) hatten eine normale diastolische Funktion, 50 Patienten (24,5%) litten unter einer milden DD, 86 Patienten (42,2%) unter einer moderaten und 7 Patienten (3,4%) unter einer schweren Form der DD. Patienten mit DD waren älter als die Patienten mit normaler diastolischer Funktion (58 ± 13 vs. 44 ± 15 Jahre; $P < 0,001$; zweiseitiger t-Test). In der Gruppe der Patienten mit DD war ein niedrigerer Anteil Männer zu finden (52,4% vs. 70,5%; $P = 0,02$) und ein höherer BMI (28 ± 6 vs. 25 ± 4 kg/m^2 ; $P < 0,001$) sowie höheres Kreatinin ($1,01 \pm 0,28$ vs. $0,93 \pm 0,25$; $P = 0,03$) und eine niedrigere eGFR (76 ± 23 vs. 94 ± 27 mL/min). Bei den Patienten mit DD waren zudem hsTNT, NT-proBNP und LDH erhöht ($14 [8-25]$ vs. $8 [5-16]$ pg/mL ; $P = 0,002$; $983 [316-2028]$ vs. $286 [111-680]$ ng/L ; $P < 0,001$ und 275 ± 69 vs. 223 ± 50 U/L ; $P < 0,001$). Mehr Patienten mit einer DD litten ebenso an einer HOcm (47,3% vs. 17,1%; Chi-Quadrat-Test). DD-Patienten hatten eine höhere QTc (444 ± 34 vs. 422 ± 27 ms ; $P < 0,001$, zweiseitiger t-Test) und litten in der Vergangenheit häufiger unter VHF (34,3% vs. 18,0%; $P = 0,02$; Chi-Quadrat-Test). In den Patienten mit DD wurden die Patienten entsprechend ihrer Symptomatik in höhere NYHA-Klassen eingruppiert ($P < 0,001$). In der gesamten Kohorte korreliert hArg invers mit NT-proBNP (Spearman- $\rho = -0,405$; $P < 0,001$) und war niedriger in Patienten mit einer moderaten bis schweren Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit (NYHA III-IV), verglichen mit den Patienten mit keiner oder einer milden Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit ($1,45 \pm 0,62$ vs. $1,68 \pm 0,68$ $\mu\text{mol/L}$; $P = 0,02$; zweiseitiger t-Test). In einer logistischen Regressionsanalyse war eine steigende hArg-Konzentration um eine Standardabweichung mit einer 30% niedrigeren Wahrscheinlichkeit für die NYHA-Klassifikation >2 assoziiert (OR [95% CI]: 0,70 [0,51-0,96]; $P = 0,03$; Tabelle 20), was nach Adjustierung nicht mehr signifikant war ($P > 0,05$). In der Tabelle 21 sind die echokardiographischen Parameter der diastolischen Funktion aufgeführt.

Tabelle 19: Allgemeine Charakteristika der HCM-Studie.

	HCM (n=215)	Keine DD (n=61)	DD (n=143)	P- Wert
Alter (Jahre)	54±15	44±15	58±13	<0,001
Geschlecht (männl., n)	125 (58,1%)	43 (70,5%)	75 (52,4%)	<0,05
BMI (kg/m²)	27±5	25±4	28±6	<0,001
Kreatinin (mg/dL)	0,99±0,27	0,93±0,25	1,01±0,28	<0,05
eGFR (mL/min)	81±26	94±27	76±23	<0,001
hsTNT (pg/mL)	12 [7-24]	8 [5-16]	14 [8-25]	<0,01
NT-proBNP (ng/L)	686 [236-1696]	286 [111-680]	983 [316-2028]	<0,001
Kreatinkinase (U/L)	119 [80-167]	133 [82-175]	114 [77-155]	0,12
LDH (U/L)	260±69	223±50	275±69	<0,001
SW (mm)	22±5	21±6	22±5	0,05
HW (mm)	14±4	13±4	15±3	<0,01
SW/HW	1,57±0,41	1,61±0,46	1,55±0,39	0,38
Obstruktion (n)				<0,01
HNOCM	71 (47,7%)	24 (68,6%)	45 (40,9%)	
HLOCM	19 (12,8%)	5 (14,3%)	13 (11,8%)	
HOCM	59 (39,6%)	6 (17,1%)	52 (47,3%)	
Homoarginin (µmol/L)	1,6±0,7	1,76±0,64	1,54±0,68	<0,05
ADMA (µmol/L)	0,72±0,22	0,66±0,16	0,74±0,25	<0,01
SDMA (µmol/L)	0,57±0,22	0,52±0,14	0,59±0,24	<0,01
Arginin (µmol/L)	52±34	50±21	52±38	0,58
QTc (ms)	438±33	422±27	444±34	<0,001
VHF (Anamnese) (n)	67 (31,2%)	11 (18,0%)	49 (34,3%)	<0,05
VHF (aktuell) (n)	12 (5,6%)	0 (0,0%)	7 (4,9%)	<0,05
Reduzierte LVEF (n)	20 (9,4%)	2 (3,3%)	16 (11,2%)	0,07
NYHA (n)				<0,001
I-II	145 (67,4%)	56 (91,8%)	81 (56,6%)	
III-IV	70 (32,6%)	5 (8,2%)	62 (43,4%)	
Vorerkrankungen				
Diabetes mellitus	25 (12%)	4 (6,6%)	19 (13,3%)	0,16
KHK	36 (17%)	4 (6,6%)	28 (19,6%)	<0,05
Arterielle Hypertonie	96 (45%)	18 (29,5%)	74 (51,7%)	<0,01

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung (normalverteilt) oder Median (25.-75. Perzentil) (nicht normalverteilt), kategoriale Daten als n-Zahl (%)

dargestellt. Auf Unterschiede wurde mittels zweiseitigem t-Test oder Chi-Quadrat-Test getestet (normale diastolische Funktion vs. DD). Nicht normalverteilte Daten wurden zuvor logarithmiert (Basis 10). ADMA, asymmetrisches Dimethylarginin; BMI, Body-Mass-Index; eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; HLOCM, hypertrophe latent-obstruktive Kardiomyopathie; HNOCM, hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie; HOCM, hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie; hsTNT, hochsensitives Troponin T; HW, Dicke der posterioren Wand; KHK, Koronare Herzkrankheit; LDH, Laktatdehydrogenase; LVEF, linksventrikuläre Auswurfraction; NT-proBNP, N-terminales pro brain natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association; QTc, frequenzkorrigiertes QT-Intervall; SDMA, symmetrisches Dimethylarginin; SW, Septumswanddicke; VHF, Vorhofflimmern.

Tabelle 20: Logistische Regressionsanalyse für Homoarginin und die NYHA-Klassifikation in HCM-Patienten.

	OR (95% CI)	P-Wert
Modell 1	0,70 (0,51-0,96)	0,03
Modell 2	0,86 (0,61-1,20)	0,37
Modell 3	0,83 (0,57-1,20)	0,32

Logistische Regressionsanalyse mit OR [95% CI] pro Anstieg von Homoarginin um eine Standardabweichung für die Eingruppierung in NYHA III-IV. Modell 1 wurde nicht adjustiert, Modell 2 wurde adjustiert für das Alter und Geschlecht, Modell 3 wurde adjustiert für das Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit und arterielle Hypertonie. CI, Konfidenzintervall; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; NYHA, New York Heart Association; OR, Odds Ratio.

Tabelle 21: Echokardiographische Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion.

	HCM (n=215)	Keine DD (n=61)	DD (n=143)	P-Wert
E-Welle (m/s)	93±29	87±22	95±32	0,04
A-Welle (m/s)	79±54	60±20	88±61	<0,001
E/A	1,37±0,68	1,55±0,57	1,28±0,71	0,007
Septales E' (cm/s)	5,6±2,1	7,3±2,0	4,8±1,6	<0,001
Laterales E'(cm/s)	8,0±3,0	10,3±2,9	7,0±2,5	<0,001
Mittleres E'(cm/s)	6,8±2,2	8,9±1,9	5,9±1,7	<0,001
Septales E'/laterales E'	0,75±0,32	0,74±0,27	0,75±0,34	0,83
Septales E/E'	19,2±10,4	12,5±3,8	22,2±11,1	<0,001
Laterales E/E'	13,2±6,8	9,1±3,8	15,3±7,1	<0,001
Mittleres E/E'	16,1±7,7	10,6±2,8	18,7±7,9	<0,001
Septales IVRT (ms)	136±45	109±29	149±45	<0,001
Laterales IVRT (ms)	111±37	92±21	120±39	<0,001
Septales/laterales IVRT	1,29±0,39	1,23±0,42	1,30±0,38	0,27
Durchmesser LA (mm)	46±10	41±7	48±10	<0,001

Darstellung von Mittelwert±Standardabweichung. Auf Unterschiede wurde mittels zweiseitigem t-Test getestet (normale diastolische Funktion vs. DD). DD, diastolische Dysfunktion; IVRT, isovolumetrische Relaxationszeit; LA, linkes Atrium.

5.4.2.1. Homoarginin und diastolische Dysfunktion in HCM-Patienten

Die hArg-Konzentration war niedriger in den Patienten mit einer DD, verglichen mit den Patienten mit einer normalen diastolischen Funktion ($1,54 \pm 0,68$ vs. $1,76 \pm 0,64$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,03$; zweiseitiger t-Test, Abbildung 28 links). In der univariaten logistischen Regressionsanalyse zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang der hArg-Konzentration mit dem Vorliegen einer DD bei den Patienten (Modell 1; OR [95% CI] pro Anstieg um eine Standardabweichung: $0,74$ [$0,55-1,00$]; $P=0,049$; Abbildung 28 rechts) sowie ein Trend in der multivariaten Regressionsanalyse nach Adjustierung für das Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, KHK und arterielle Hypertonie ($0,70$ [$0,49-1,00$]; $P=0,05$). Die hArg-Konzentration der Patienten mit einer milden DD unterschied sich nicht von den Patienten mit einer moderaten bis schweren DD ($1,51 \pm 0,63$ vs. $1,56 \pm 0,71$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,70$; zweiseitiger t-Test).

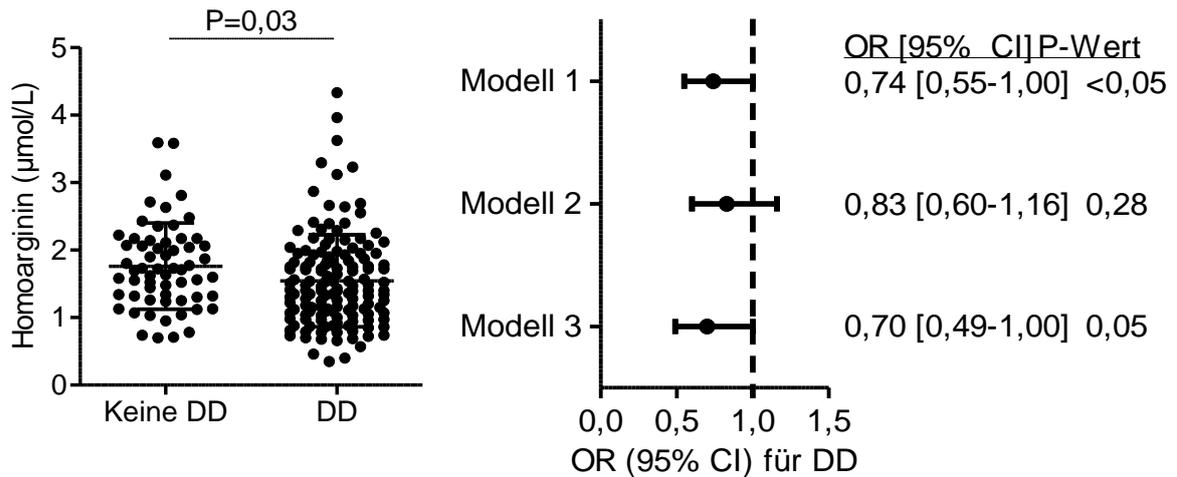


Abbildung 28: Zusammenhang von Homoarginin mit dem Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion in HCM-Patienten. Links: Darstellung von Mittelwert±Standardabweichung; zweiseitiger t-Test, Varianzgleichheit nicht angenommen. Rechts: Logistische Regressionsanalyse mit OR [95% CI] pro Anstieg von Homoarginin um eine Standardabweichung für das Vorliegen einer DD. Modell 1 wurde nicht adjustiert, Modell 2 wurde adjustiert für das Alter und Geschlecht, Modell 3 wurde adjustiert für das Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit und arterielle Hypertonie. CI, Konfidenzintervall; DD, diastolische Dysfunktion; OR, Odds Ratio.

In Spearman-Korrelationsanalysen der hArg-Plasmakonzentration mit den echokardiographischen Parametern der diastolischen Funktion zeigten sich eine positive Assoziation mit dem septalen E' ($\rho=0,17$; $P=0,02$; Tabelle 22) und dem mittleren E' ($\rho=0,17$; $P=0,02$) und eine inverse Assoziation mit der septalen und lateralen IVRT ($\rho=-0,16$; $P=0,03$ für beide). Keine Assoziationen gab es mit der E- und A-Welle, E/A, dem lateralen E', septalem, lateralem und mittlerem E/E', der septalen/lateralen IVRT und dem Durchmesser des linken Atriums ($P>0,05$). In der linearen Regressionsanalyse zeigte sich keine Assoziation des hArgs mit den echokardiographischen Parametern ($P>0,05$; Tabelle 23).

Tabelle 22: Spearman-Korrelationsanalyse der echokardiographischen Parameter der diastolischen Funktion mit Homoarginin.

	ρ	P-Wert
E-Welle	-0,03	0,69
A-Welle	0,01	0,94
E/A	-0,01	0,86
Septales E'	0,17	<0,05
Laterales E'	0,13	0,07
Mittleres E'	0,17	<0,05
Septales E/E'	-0,12	0,09
Laterales E/E'	-0,09	0,20
Mittleres E/E'	-0,12	0,10
Septales IVRT	-0,16	<0,05
Laterales IVRT	-0,16	<0,05
Septales/laterales IVRT	0,01	0,93
Durchmesser linkes Atrium	-0,02	0,75

IVRT, isovolumetrische Relaxationszeit.

Tabelle 23: Lineare Regressionsanalyse der Homoargininkonzentration mit echokardiographischen Parametern der diastolischen Funktion. β -Koeffizienten pro Anstieg der Homoargininkonzentration um eine Standardabweichung.

	E-Welle		A-Welle		E/A	
	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert
Modell 1	-0.24	0.90	0.34	0.93	-0.05	0.33
Modell 2	1.57	0.45	1.32	0.74	-0.04	0.37
Modell 3	1.39	0.52	-0.19	0.96	-0.02	0.66
	Septales E'		Laterales E'		Mittleres E'	
	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert
Modell 1	0.21	0.15	0.22	0.31	0.21	0.19
Modell 2	0.04	0.80	-0.01	0.95	0.00	0.99
Modell 3	0.09	0.52	0.14	0.52	0.11	0.49
	Septales E/E'		Laterales E/E'		Mittleres E/E'	
	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert
Modell 1	-0.65	0.39	0.04	0.94	-0.24	0.67
Modell 2	0.39	0.59	0.66	0.17	0.67	0.21
Modell 3	0.27	0.72	0.43	0.37	0.49	0.36
	Septale IVRT		Laterale IVRT		Septale/laterale IVRT	
	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert	β -Koeffizient	P-Wert
Modell 1	-6.13	0.06	-2.56	0.33	0.00	0.87
Modell 2	-4.98	0.13	-2.21	0.41	0.00	0.87
Modell 3	-5.87	0.08	-2.52	0.36	0.00	0.93
	LA-Durchmesser					
	β -Koeffizient	P-Wert				
Modell 1	-0.32	0.66				
Modell 2	-0.32	0.67				
Modell 3	-0.76	0.30				

Modell 1 wurde nicht adjustiert, Modell 2 wurde adjustiert für das Alter und Geschlecht, Modell 3 wurde adjustiert für das Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit und arterielle Hypertonie. IVRT, isovolumetrische Relaxationszeit; LA, linkes Atrium.

5.4.2.2. Homoarginin und Vorhofflimmern in HCM-Patienten

hArg korrelierte in den HCM-Patienten invers mit der QTc-Zeit (Spearman- $\rho = -0,23$; $P < 0,001$). Die Patienten mit aktuell vorliegendem VHF ($n=12$) hatten tendenziell niedrigeres hArg als Patienten mit Sinusrhythmus ($n=187$; $1,26 \pm 0,60$ vs. $1,65 \pm 0,68$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,05$; zweiseitiger t-Test; Abbildung 29A). Auch in der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich dieser Trend mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für VHF in Patienten mit höherem hArg ($P > 0,05$; Tabelle 24). Bei der Betrachtung der Patienten, bei denen innerhalb der letzten 5 Jahre mindestens einmal VHF auftrat ($n=67$), zeigten sich niedrigere hArg-Konzentrationen verglichen mit den Patienten, die nicht an VHF litten ($n=148$; $1,42 \pm 0,54$ vs. $1,69 \pm 0,70$ $\mu\text{mol/L}$; $P=0,002$; zweiseitiger t-Test; Abbildung 29B). In der univariaten Regressionsanalyse zeigte sich eine 38% niedrigere Wahrscheinlichkeit bzw. im voll adjustierten Modell 3 eine 34% niedrigere Wahrscheinlichkeit für VHF bei steigendem hArg im Plasma (Tabelle 24).

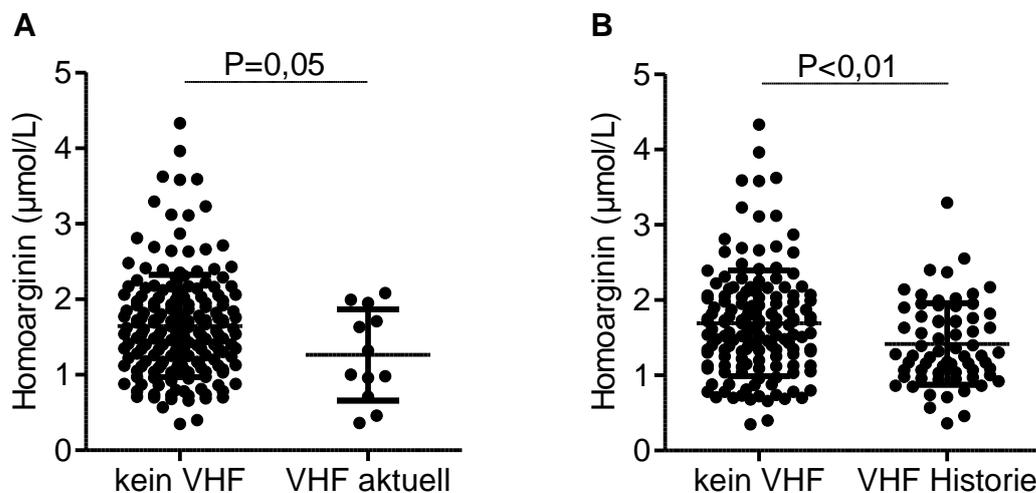


Abbildung 29: Homoarginin in Patienten mit und ohne VHF. A: VHF in aktuellen EKG-Aufzeichnungen. B: VHF in der Historie. Mittelwert \pm Standardabweichung; zweiseitiger t-Test. VHF, Vorhofflimmern.

Tabelle 24: Logistische Regressionsanalyse für das Vorliegen von VHF in aktuellen EKG-Aufzeichnungen oder in der Historie. Odds Ratios pro Anstieg von Homoarginin um eine Standardabweichung.

	VHF in aktuellen EKG-Aufzeichnungen		VHF in der Historie	
	OR (95% CI)	P-Wert	OR (95% CI)	P-Wert
Modell 1	0,48 (0,23-1,03)	0,06	0,62 (0,44-0,87)	0,006
Modell 2	0,58 (0,26-1,29)	0,18	0,69 (0,48-0,98)	0,04
Modell 3	0,54 (0,23-1,27)	0,16	0,66 (0,46-0,95)	0,03

Modell 1 wurde nicht adjustiert, Modell 2 wurde adjustiert für das Alter und Geschlecht, Modell 3 wurde adjustiert für das Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit und arterielle Hypertonie. CI, Konfidenzintervall; EKG, Elektrokardiogramm; OR, Odds Ratio; VHF, Vorhofflimmern.

5.4.3. Chronische Hypoxie bei Höhengaufenthalt

Es wurden 99 männliche chilenische Soldaten im Alter von $18,2 \pm 1,1$ Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung) in die Studie eingeschlossen. Nach einem sechsmonatigem Höhengaufenthalt war hArg $26 \pm 21\%$ niedriger im Vergleich zur Ausgangskonzentration ($1,76 \pm 0,62$ vs. $2,44 \pm 0,71$ $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,001$, gepaarter t-Test; Abbildung 30).

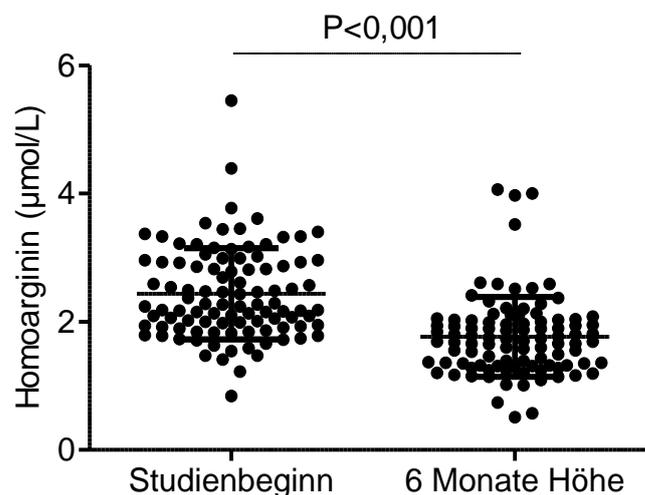


Abbildung 30: Homoargininkonzentration vor und nach einem sechsmonatigen Aufenthalt in der Höhe. Mittelwert \pm Standardabweichung; gepaarter t-Test.

6. Diskussion

6.1. Bestimmung von Homoarginin – Methodenvergleich, Schnelltest und Referenzwerte

Beim Vergleich der drei Methoden LC-MS/MS, GC-MS und ELISA zur Quantifizierung von hArg zeigte sich im gewählten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang der Ergebnisse mit der eingesetzten Konzentration in wässriger Pufferlösung sowie in dialysiertem Plasma mit Korrelationskoeffizienten $r^2 \geq 0,96$. Die Wiederfindungsrate sollte im Bereich 70 – 130% liegen (Vogelgesang und Hädrich, 1998). Die Werte der LC-MS/MS-Methode und des ELISAs lagen sowohl in wässriger Lösung als auch in dialysiertem Plasma innerhalb dieser Grenzen. Die Wiederfindungsrate der GC-MS-Methode lag nur in wässriger Lösung mit 133% außerhalb dieser Grenzen, in dialysiertem Plasma betrug sie hingegen 110%. Zum Vergleich der drei Methoden bezüglich der Messung von hArg in einer biologischen Matrix wurden die Konzentrationen in den Plasmaproben einer Studie mit ACS- und KHK-Patienten gemessen. In linearen Regressionsanalysen mit paarweisen Vergleichen jeweils zweier Methoden war $r^2=0,90$ für den Vergleich LC-MS/MS vs. GC-MS, $r^2=0,88$ für LC-MS/MS vs. ELISA und $r^2=0,95$ für GC-MS vs. ELISA. Die LC-MS/MS-Methode lieferte dabei die höchsten Werte, 21% höher als die GC-MS-Methode und 31% höher als der ELISA. Eine mögliche Ursache für die mittels GC-MS und LC-MS/MS gemessenen höheren Werte im Vergleich zum ELISA könnte in der Probenaufarbeitung liegen. Beispielsweise könnten im Plasma enthaltene Proteine einen Teil des hArg binden. Für das methylierte Arg-Derivat ADMA zeigten Sitar et al., dass nur 70% frei im Plasma vorliegen und 30% an Albumin gebunden werden (Sitar et al., 2015). Kayacelebi et al. fanden in gepooltem Plasma nach einer sauren Hydrolyse der Proteine tendenziell 31% höhere hArg-Konzentrationen, was in diesem Versuch aber nicht signifikant war (Kayacelebi et al., 2014). Während beim ELISA keine Proteine präzipitiert werden, könnte dieser Schritt der Probenvorbereitung bei der LC-MS/MS- und der GC-MS-Methode möglicherweise gebundenes hArg freisetzen und so zumindest teilweise zu den höheren Werten beitragen. Dies würde bedeuten, dass mit dem ELISA nur der freie und damit biologisch verfügbare Anteil des hArg gemessen würde, während mit LC-MS/MS und GC-MS der gesamte Anteil – freies und gebundenes hArg – bestimmt würde. Weiterhin wurde untersucht, ob die Methoden sowohl L-hArg als auch D-hArg detektieren können. Enantiomere haben die gleichen chemischen und physikalischen

Eigenschaften, mit Ausnahme der Drehrichtung polarisierten Lichtes. Früher nahm man an, dass D-Aminosäuren, außer in einigen Mikroorganismen, nicht in lebenden Organismen vorkommen und hier keine Rolle spielen (Genchi, 2017). Heute weiß man, dass D-Aminosäuren nicht nur im Menschen vorkommen, sondern auch von physiologischer Bedeutung sind. So kommt z.B. dem D-Serin eine wichtige Rolle als Neuromodulator der glutamatergen Neurotransmission zu (Fuchs et al., 2005). D-Aminosäuren können vom Menschen selbst durch Racemasen aus L-Aminosäuren synthetisiert, durch die endogene mikrobielle Flora hergestellt oder auch über die Nahrung, z.B. Milch, Obst und Gemüse, aufgenommen werden (Genchi, 2017). Während mit der LC-MS/MS- und der GC-MS-Methode keine Unterscheidung der beiden Enantiomere möglich war, wurde mit dem ELISA nur L-hArg, nicht aber D-hArg detektiert. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zum Vorkommen von D-hArg im menschlichen Organismus, jedoch könnte es z.B. über die Nahrung aufgenommen werden und somit verglichen mit dem ELISA bei den hier untersuchten chromatographischen Methoden zu höheren Werten führen. Bisher ist nicht bekannt, ob D-hArg physiologisch eine Rolle im menschlichen Organismus spielt. In hypertensiven Ratten untersuchten Chen und Sanders den Einfluss von sowohl L- als auch D-hArg auf die Nitrat-Ausscheidung und den Blutdruck (Chen und Sanders, 1993). Sie fanden dabei eine erhöhte renale Ausscheidung von Nitrat und eine Erniedrigung des Blutdruckes nur bei der Infusion von L-hArg, nicht aber bei D-hArg. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zumindest die diskutierte Rolle des hArg als mögliches Substrat der NOS nicht auf das D-Enantiomer zutrifft. Beim Vergleich des hArg-ELISAs mit einer anderen, nicht weiter spezifizierten LC-MS-Methode zeigte sich laut Herstellerangaben des ELISAs eine gute Korrelation der beiden Methoden ($r^2=0,996$) mit einer Geradengleichung von $C_{ELISA}=0,98 \times C_{LC-MS}+0,12$ (DLD Diagnostika GmbH, 2014). Somit waren bei diesem Vergleich die Werte der LC-MS-Methode ebenfalls geringfügig höher als die mittels ELISA erhaltenen Werte. Ein anderer Grund für die mittels der hier angewandten LC-MS/MS-Methode gemessenen höheren Werte könnte eine geringere Selektivität dieser Methode sein. Das O-butylierte hArg mit einem m/z von 245 fragmentiert durch kollisionsinduzierte Dissoziation mit Argon zu kleineren Fragmenten, wovon eines zur Quantifizierung genutzt wird. Zum hArg isobare Analyten, die ebenfalls ein Fragment mit dem m/z von 211 ergeben, könnten mit dieser Methode ebenfalls erfasst werden. Hierzu untersuchten Atzler et al. bereits L-N-Monomehtylarginin und N^ε-Acetyllysin (Strukturformeln in Abbildung 31), welche

jedoch keinen Massenübergang m/z von 245→211 aufweisen (Atzler et al., 2011). Die endogene Konzentration von N^G -Monomethylarginin beträgt beispielsweise nach Meinitzer et al. 0,16-0,27 $\mu\text{mol/L}$ (Meinitzer et al., 2007). Verglichen mit den hArg-Konzentrationen, die mit deren Methode ermittelt wurde, könnte es somit zu einer Abweichung von 6-10% kommen, wenn N^G -Monomethylarginin zusätzlich mitgemessen würde. N^ϵ -Trimethyllysin stellt ein weiteres Isobar zum hArg dar (Abbildung 31), welches mit dieser Methode interferieren könnte. 1987 fanden Lehman et al. mit ihrer rp-HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion im Plasma sechs gesunder Menschen $0,56 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$ N^ϵ -Trimethyllysin (Lehman et al., 1987). Midttun et al. fanden in 171 gesunden Erwachsenen im Median (5.-95. Perzentil) 0,68 (0,40-1,31) $\mu\text{mol/L}$, während die selben Probanden eine hArg-Konzentration von 1,93 (1,17-3,31) $\mu\text{mol/L}$ hatten (Midttun et al., 2013). Damit könnte N^ϵ -Trimethyllysin, wenn es fälschlicherweise mitgemessen würde, zu einer Erhöhung der hArg-Konzentration um 35% führen. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich das N^ϵ -Trimethyllysin untersucht, welches jedoch unter den gewählten Bedingungen ebenfalls kein Fragment mit einem m/z von 211 aufweist. Damit ist zwar nicht auszuschließen, dass nicht andere Isobare noch mit dieser Methode interferieren könnten, so z.B. N -Acetylglutamin (Martens-Lobenhoffer et al., 2009), jedoch können N^G -Monomethylarginin, N^ϵ -Acetyllysin und N^ϵ -Trimethyllysin bezüglich einer Interferenz ausgeschlossen werden. Bei der GC-MS-Methode wird das Derivat O -Methyl- N -(PFP)₃-hArg quantifiziert. Die Carboxylgruppe ist dabei methyliert und PFPA reagiert dann mit den Aminofunktionen des hArg, könnte aber auch mit anderen funktionellen Gruppen wie z.B. Alkoholen reagieren. N^G -Monomethylarginin wird mit der GC-MS-Methode chromatographisch von hArg getrennt (persönliche Kommunikation Erik Hanff, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, 2018). N^ϵ -Acetyllysin und N^ϵ -Trimethyllysin hingegen können nur mit zwei bzw. einem PFPA-Rest reagieren, sodass diese beiden Analyten bezüglich einer Interferenz mit der hArg-Bestimmung mittels GC-MS ausgeschlossen werden können. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Kayacelebi et al. angewendet, die sich in der Wahl des IS unterscheidet (Kayacelebi et al., 2014). In dieser Arbeit wurde $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_7$ -hArg verwendet, während Kayacelebi et al. den IS $^2\text{H}_4$ -Methyl-hArg während der Probenaufarbeitung *de-novo* synthetisierten. Bei einem Vergleich von MS vs. MS/MS fanden die Autoren im Plasma um 18% niedrigere Werte für hArg, wenn sie im MS-Modus maßen, sodass auch die Auswahl des

Analyseverfahrens zu der Höhe der absoluten Werte beitragen könnte (Kayacelebi et al., 2014).

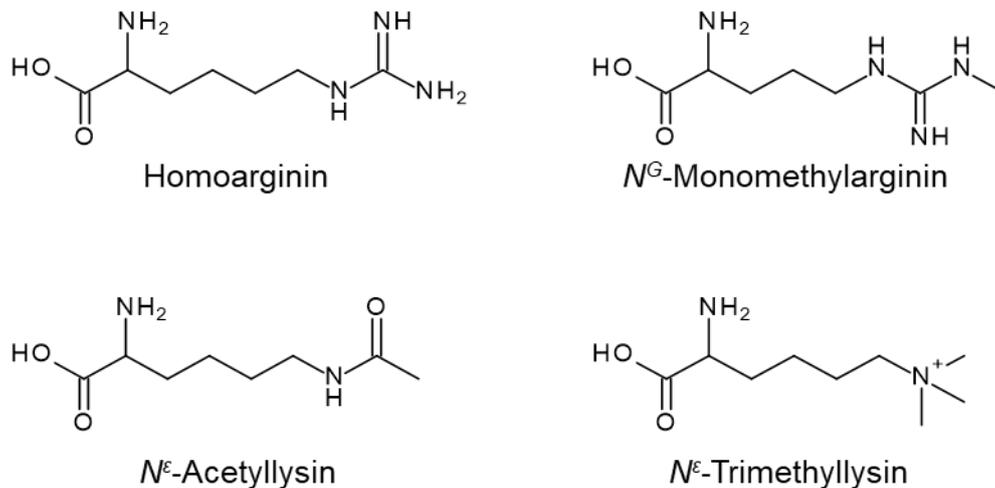


Abbildung 31: Strukturformeln von Homoarginin, N^G-Monomethylarginin, N^ε-Acetylarginin und N^ε-Trimethylarginin.

Es wurden die hArg-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit einer stabilen KHK und einem ACS mit allen drei Methoden bestimmt. Alle Methoden zeigten erniedrigtes hArg in den ACS-Patienten, verglichen mit den KHK-Patienten. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 1.200 Tagen fand sich mit jeder Methode eine höhere Wahrscheinlichkeit, einen MI, Schlaganfall oder den Tod zu erleiden, in den Patienten, die mit ihrem hArg-Wert unterhalb des methodenspezifischen Medians (2,09 µmol/L für LC-MS/MS; 1,71 µmol/L für GC-MS und 1,53 µmol/L für ELISA) lagen. In einer größer angelegten Studie mit 1.649 Patienten mit Brustschmerzen, darunter 589 ACS-Patienten, zeigten Atzler et al. ebenso ein gesteigertes Risiko für einen MI, Schlaganfall oder den Tod in Patienten mit hArg-Konzentrationen unterhalb des Medians (Atzler et al., 2016b). Der Methodenvergleich dieser Arbeit zeigt zwar unterschiedliche absolute Werte der ermittelten hArg-Konzentrationen im Plasma, jedoch zeigt er auch eine gute Korrelation der verschiedenen Methoden miteinander, sodass verschiedene Kriterien für die Wahl der Methode herangezogen werden können. Ein Kriterium könnte z.B. die Sensitivität der Methode sein. Bei einem Vergleich der Quantifizierungslimits der verschiedenen Methoden der Literatur beschreiben die Autoren Limits von 0,008 µmol/L (Davids et al., 2012b), 0,05 µmol/L (Di Gangi et al., 2010; van Dyk et al., 2015), 0,1 µmol/L (Atzler et al., 2011), 0,2 µmol/L (Midttun et al., 2013), 0,3 µmol/L (Jones et al., 2010; Valtonen et al., 2005) bis

1,0 µmol/L (Meinitzer et al., 2007). Entscheidend ist hier jedoch auch der lineare Bereich, innerhalb der die Konzentration zuverlässig bestimmt werden kann (Tabelle 25).

Tabelle 25: Lineare Bereiche der analytischen Methoden für Homoarginin.

Quelle	Methode	Matrix	Linearer Bereich (µmol/L)
Atzler et al., 2011	LC-MS/MS	Plasma	0,1-50
Blackwell et al., 2007	HPLC	Plasma	k.A.
Davids et al., 2012b	LC-MS/MS	Plasma	0,1-5
Di Gangi et al., 2010	UPLC-MS/MS	Plasma	0,05-4
Di Gangi et al., 2010	UPLC-MS/MS	Serum	0,05-4
DLD Diagnostika GmbH, 2014	ELISA	Plasma	0,48-3,76
DLD Diagnostika GmbH, 2014	ELISA	Serum	0,39-2,68
Hanff et al., 2016	GC-MS	Plasma	2-10
Jones et al., 2010	HPLC	Plasma	0,5-12
Kayacelebi et al., 2014	GC-MS	Plasma	1-10
Kayacelebi et al., 2014	GC-MS/MS	Plasma	1-10
Meinitzer et al., 2007	HPLC	Plasma	2,5-12,5
Midttun et al., 2013	LC-MS/MS	Plasma	0,1-40
Valtonen et al., 2005	HPLC	Plasma	0,1-7,5
van Dyk et al., 2015	UPLC-MS	Plasma	0,1-5

ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; GC, Gaschromatographie; HPLC, Hochleistungsflüssigchromatographie; k.A., keine Angabe; LC, Flüssigchromatographie; MS, Massenspektrometrie; MS/MS, Tandem-Massenspektrometrie; UPLC, Ultrahochleistungsflüssigchromatographie.

Ein weiteres Kriterium für die Methodenauswahl kann das für die Messung verfügbare Probenvolumen sein. Für die erwähnten HPLC-Methoden mit anschließender Fluoreszenzdetektion sowie der LC-MS/MS-Methode von Davids et al. werden mit 100-200 µL (Blackwell et al., 2007; Davids et al., 2012b; Jones et al., 2010; Meinitzer et al., 2007; Teerlink et al., 2002; Valtonen et al., 2005) recht hohe Probenvolumina benötigt, andere chromatographische MS-gekoppelte Methoden und auch der hArg-ELISA benötigen hingegen nur ≤50 µL Probenvolumen für eine Bestimmung von hArg (Atzler et al., 2011; Di Gangi et al., 2010; Hanff et al., 2016; Kayacelebi et al., 2014; Midttun et al., 2013; van Dyk et al., 2015). Ein großer Vorteil der chromatographischen Methoden im Vergleich zum ELISA ist, dass oftmals gleichzeitig mehrere Analyten

gemessen werden können (Blackwell et al., 2007; Davids et al., 2012b; Di Gangi et al., 2010; Hanff et al., 2016; Jones et al., 2010; Meinitzer et al., 2007; Midttun et al., 2013; Teerlink et al., 2002; Valtonen et al., 2005; van Dyk et al., 2015). Nach der LC-MS/MS-Methode von Midttun et al. können beispielsweise sogar elf weitere Analyten (Arg, ADMA, SDMA, Kreatinin, Trimethyllysin, Cystathionin, Methionin, Methioninsulfoxid, Cholin, Betain und Dimethylglycin) parallel mitgemessen werden (Midttun et al., 2013). Ebenso entscheidend für die Auswahl der geeigneten Methode sind der apparative sowie der zeitliche Aufwand einer Methode. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer schnellen Methode zur Identifikation von Patienten in der Klinik mit einer niedrigen hArg-Konzentration. Die Ergebnisse des Methodenvergleiches dieser Arbeit haben bestätigt, dass bei z.B. multizentrischen Studien die Konzentrationen an verschiedenen Zentren mit der gleichen Methode bestimmt werden sollten, um die analytisch bedingten Variationen im Patientenkollektiv möglichst gering zu halten. Die Wahl der Methode ist hier auf den ELISA gefallen, da der apparative Aufwand im Vergleich zu den chromatographischen Methoden am geringsten ist. Für den ELISA ist nur ein 96-Well-Mikrotiterplatten-fähiges Photometer nötig, welches in vielen Laboratorien verfügbar ist. Die Messzeit an diesem Gerät ist sehr kurz, sodass hier in der Regel keine Engpässe an dem Gerät erwartet werden. Werden im Vergleich dazu z.B. mehr oder weniger große Studien an einer LC-MS(/MS)- oder GC-MS(/MS)-Apparatur gemessen, sind diese Geräte häufig mehrere Stunden bis Tage ausgelastet, was eine tägliche Durchführung eines Schnelltestes erschweren würde. Die Validierung des ELISA-Schnelltestes wurde in dieser Arbeit in einem Labor von drei verschiedenen Personen durchgeführt, sodass wir eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auch in anderen Zentren erwarten.

Zur Beurteilung, ob hArg-Werte erniedrigt sind, bedarf es Referenzwerte einer gesunden Kohorte. Die mittleren hArg-Konzentrationen im Serum oder Plasma gesunder Kontrollen, die in der Literatur für die verschiedenen Methoden beschrieben sind, liegen bei 0,77 $\mu\text{mol/L}$ (Di Gangi et al., 2010) bis 2,58 $\mu\text{mol/L}$ (Meinitzer et al., 2007) (Tabelle 26). Für die hier verwendeten Methoden sind die in der Literatur beschriebenen mittleren hArg-Plasmakonzentrationen (Mittelwert \pm Standardabweichung) 2,5 \pm 1,0 $\mu\text{mol/L}$ für die LC-MS/MS-Methode (Atzler et al., 2011), 1,7 \pm 0,6 $\mu\text{mol/L}$ für die GC-MS-Methode (mit $^2\text{H}_3\text{-O-Methyl-hArg}$ als internem Standard) (Hanff et al., 2016) und 2,0 \pm 0,7 $\mu\text{mol/L}$ für den ELISA (DLD Diagnostika GmbH, 2014). Diese Abweichungen könnten zum einen durch die Wahl

unterschiedlicher Methoden begründet sein, zum anderen durch unterschiedliche anthropometrische Eigenschaften (wie z.B. Alter und Geschlecht) der Referenzkohorten. Generell ist die hArg-Konzentration niedriger in Frauen, verglichen mit den Männern. Atzler et al. fanden z.B. in der populationsbasierten SHIP-Studie in Serumproben 1.359 gesunder Teilnehmer deutscher Abstammung in Männern im Median (2,5.-97,5. Perzentil) 2,72 (2,20-3,33) und in Frauen 2,56 (1,99-3,32) $\mu\text{mol/L}$ hArg (Tabelle 27) (Atzler et al., 2014b). In einer weiteren populationsbasierten Studie fanden dieselben Autoren in 786 gesunden Teilnehmern europäischer Abstammung ebenfalls niedrigeres hArg in den weiblichen Teilnehmern (1,77 [0,84-3,89] vs. 2,01 [0,98-4,10] $\mu\text{mol/L}$) (Atzler et al., 2016a), ebenso in der populationsbasierten DHS (Atzler et al., 2014a) und in einer Population mit älteren Teilnehmern (Pilz et al., 2014b). In 282 Herzinsuffizienzpatienten fanden Atzler et al. keine Assoziation mit dem Geschlecht (Atzler et al., 2013), jedoch wurden in zahlreichen anderen Patientenkollektiven ebenfalls höhere hArg-Konzentrationen bei Männern beobachtet: in Patienten, bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde (Atzler et al., 2016b; Pilz et al., 2011a), Schlaganfallpatienten bzw. Patienten mit transitorischer ischämischer Attacke (Haghikia et al., 2017), Patienten mit DD oder DD-Risiko (Pilz et al., 2014a), niereninsuffizienten Diabetikern (März et al., 2010) und Patienten nach Nierentransplantation (Drechsler et al., 2015). Ein weiterer Faktor, der die hArg-Konzentration zu beeinflussen scheint, ist das Alter. In der populationsbasierten GHS-Studie zeigte sich eine leichte Abnahme der hArg-Konzentration in Männern (Spearman- $\rho=-0,11$) und Frauen (Spearman- $\rho=-0,09$) (Atzler et al., 2016a). In der ebenfalls populationsbasierten SHIP-Studie fand sich dieser Zusammenhang nur bei den Frauen, nicht aber bei Männern, welche die höchsten Werte im Alter von 20-49 Jahren aufwiesen (Atzler et al., 2014b). Auch Meinitzer et al. fanden in einer gesunden Population mit 292 männlichen Teilnehmern der VITAGE-Studie keine Altersabhängigkeit der hArg-Konzentration (Meinitzer et al., 2007). In der populationsbasierten DHS-Studie korrelierte das Alter in einer univariaten Analyse invers mit hArg, was in einer multivariaten Analyse jedoch nicht signifikant war (Atzler et al., 2014a). In einer Population mit älteren Teilnehmern (Pilz et al., 2014b) sowie in verschiedenen Patientenkollektiven wie Patienten, bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde (Atzler et al., 2016b; März et al., 2010), akute Schlaganfall-Patienten (Choe et al., 2013), in Patienten mit DD oder DD-Risiko (Pilz et al., 2014a), dialysepflichtigen Typ 2 Diabetes-Patienten (März et al., 2010), sowie in

Patienten nach einer Nierentransplantation (Drechsler et al., 2015) wurde ebenfalls ein inverser Zusammenhang mit dem Alter gezeigt, während es in Studien mit Herzinsuffizienzpatienten (Atzler et al., 2013) und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen (Drechsler et al., 2013; Hov et al., 2015) keinen Zusammenhang gab. Während die bisher verfügbaren, geschlechts- und altersabhängigen Referenzintervalle mit der LC-MS/MS-Methode nach Atzler et al. (2011) generiert wurden, wurden in dieser Arbeit nun Referenzintervalle für den hArg-ELISA der Firma DLD Diagnostika GmbH bestimmt. Insgesamt waren die hArg-Werte in den Frauen niedriger als in den Männern. Interessanterweise wiesen Frauen im Alter von 20-29 Jahren höheres hArg im Vergleich zu gleichaltrigen Männern auf. Gleiches zeigte sich auch in den LC-MS/MS-Referenzwerten von Atzler et al. (Atzler et al., 2014b). Im Alter von 30-49 Jahren unterschied sich hArg nicht zwischen den Geschlechtern und ab einem Alter von 50 Jahren hatten Frauen niedrigeres hArg als gleichaltrige Männer. Kriskó und Walker zeigten 1966 in Ratten, dass Testosteron und Östrogen die AGAT-Aktivität in der Niere steigern können (Kriskó und Walker, 1966). Auch steigerte die Gabe von Östrogen die AGAT-mRNA-Expression in Hühnerleber (Zhu und Evans, 2001). Im Laufe des Lebens nehmen die Sexualhormonspiegel in der Frau ab (Bale und Epperson, 2017), sodass eine erniedrigte AGAT-Aktivität möglicherweise zu einer altersabhängigen Abnahme der hArg-Konzentrationen in der Frau beitragen könnte. In gesunden Schwangeren (2. und 3. Trimester) fanden Valtonen et al. im Vergleich zu alters- und Rauchstatus-gematchten Kontrollen höhere hArg-Serumkonzentrationen ($4,8 \pm 1,7$ und $5,3 \pm 1,5$ vs. $2,7 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/L}$) (Valtonen et al., 2008). Die Autoren vermuteten, dass die höheren hArg-Konzentrationen auch hier eventuell durch eine Estrogen-abhängige gesteigerte AGAT-Expression verursacht sein könnten. Frauen, die zur Kontrazeption Östrogen einnehmen, haben um 47% höhere hArg-Plasmakonzentrationen als Frauen, die keine Östrogene einnehmen (Median $2,39$ vs. $1,63$ $\mu\text{mol/L}$) (Helm et al., 2018). In 3.305 KHK-Patienten fanden März et al. hingegen in beiden Geschlechtern eine inverse Assoziation von hArg mit dem Alter (März et al., 2010). Auch die eGFR war in beiden Geschlechtern positiv mit hArg assoziiert (auch nach Adjustierung für das Alter). So könnte auch die Nierenfunktion einen Einfluss auf die hArg-Konzentration haben. Die Nierenfunktion nimmt zwischen 6 und 12 mL/min/1,73 m² pro Lebensdekade ab (Delanaye et al., 2012). Da die Nieren zu den Hauptorganen der hArg-Synthese (via der AGAT) zählen, könnte eine zunehmend eingeschränkte Nierenfunktion zu der altersabhängigen Abnahme der hArg-

Konzentration beitragen (Cullen et al., 2006). In der populationsbasierten DHS-Studie zeigte sich ein positiver Zusammenhang der Nierenfunktion mit hArg (Atzler et al., 2014a), während in einer Population älterer Teilnehmer kein Zusammenhang bestand (Pilz et al., 2014b). Auch in Herzinsuffizienzpatienten (Atzler et al., 2013) und PAH-Patienten (Atzler et al., 2016c) zeigte sich kein Zusammenhang mit der Nierenfunktion und in Patienten mit DD oder DD-Risiko (Pilz et al., 2014a) nur in der nicht adjustierten Analyse. Positive Korrelationen fand man dagegen für Patienten, bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde (Atzler et al., 2016b; März et al., 2010), Schlaganfallpatienten (Choe et al., 2013), Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen (Drechsler et al., 2013) und Patienten nach einer Nierentransplantation (Drechsler et al., 2015). Auf Grund eines möglichen Zusammenhanges der Nierenfunktion mit hArg wurden in unserer gesunden Referenzkohorte in einer Sensitivitätsanalyse Probanden mit einer eGFR <90 mL/min/1,73 m² ausgeschlossen, was jedoch zu keiner wesentlichen Veränderung der Referenzintervalle führte. Über Assoziationen von hArg mit den Blutlipiden gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur. So fand man in den Teilnehmern der DHS-Studie (Atzler et al., 2014a) und in Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung (Hov et al., 2015) eine positive Assoziation mit dem Gesamtcholesterol, während in Patienten mit Brustschmerzen (Atzler et al., 2016b) und in nierentransplantierten Patienten (Drechsler et al., 2015) kein Zusammenhang bestand. In Patienten mit Brustschmerzen (Atzler et al., 2016b) und der populationsbasierten DHS-Studie (Atzler et al., 2014a) fanden Atzler et al. in nicht adjustierten Analysen inverse Assoziationen mit HDL, die in multivariaten Modellen nicht mehr signifikant waren. Auch Pilz et al. fanden in Patienten mit DD oder DD-Risiko (Pilz et al., 2014a) eine inverse Assoziation mit dem HDL, andere Studien fanden hingegen keine Assoziationen (Drechsler et al., 2015; Pilz et al., 2014b, 2011a). Mit LDL zeigen manche Arbeiten einen positiven Zusammenhang (Atzler et al., 2014a; März et al., 2010), andere wiederum keine Assoziationen (Atzler et al., 2016b; Drechsler et al., 2015; Pilz et al., 2014b, 2014a, 2011a). In der Analyse einer älteren Population (Pilz et al., 2014b) fanden die Autoren keine Assoziation mit den Triglyceriden, während andere Studien eine positive Assoziation zeigten (Atzler et al., 2014a, 2016b; Pilz et al., 2011a). Zusammengefasst zeigte sich bezüglich der Blutlipide entweder keine Assoziation oder eine Assoziation von hArg mit einem schlechteren Lipidprofil (positive Assoziationen mit dem Gesamtcholesterol, LDL und

Triglyceriden sowie ein inverser Zusammenhang mit HDL). In dieser Arbeit wurden daher in einer weiteren Sensitivitätsanalyse die Referenzbereiche der Probanden mit einem Lipidprofil innerhalb der definierten Grenzwerte von Triglyceriden $\leq 1,9$ mmol/L, Gesamtcholesterol ≤ 6 mmol/L, HDL $\geq 1,03$ mmol/L und LDL $\leq 3,34$ mmol/L berechnet. Auch hier zeigte sich keine wesentliche Veränderung des Referenzbereiches gegenüber der gesamten Population. Bezüglich einer Assoziation von hArg mit dem BMI zeigte sich in allen Publikationen, die für diese Arbeit recherchiert wurden, eine positive Assoziation. So z.B. in Patienten mit Nierenerkrankungen (Drechsler et al., 2015, 2013; Hov et al., 2015; März et al., 2010), in pAVK-Patienten (Vogl et al., 2015), in Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen (Atzler et al., 2016b; März et al., 2010) und in Patienten mit DD oder DD-Risiko (Pilz et al., 2014a). Auch in einer älteren Population (Pilz et al., 2014b) und in der populationsbasierten DHS (Atzler et al., 2014a) wurde dieser Zusammenhang gezeigt. In der in dieser Arbeit beschriebenen gesunden Referenzkohorte hatte der Ausschluss von Probanden mit einem BMI >25 kg/m² keinen wesentlichen Einfluss auf die Referenzintervalle in Männern und Frauen. In vielen Studien beschreiben die Autoren eine Assoziation des Rauchens mit der hArg-Konzentration. In 231 gesunden männlichen Arbeitern einer Zink- und Bleierz-Mine im Alter zwischen 20-60 Jahren mit 120 Rauchern und 111 Nichtrauchern fanden Sobczak et al. erniedrigtes Plasma-hArg in den Rauchern (Mittelwert [95% CI] 1,53 [1,42–1,63] vs. 1,98 [1,86–2,09] μ mol/L) (Sobczak et al., 2014). Auch nach Adjustierung für Alter, BMI, Bluteisen und Plasmakreatinin zeigten die Raucher um 16% niedrigeres hArg. Die hArg-Konzentration korrelierte dabei invers mit den konsumierten Zigaretten/Tag. Auch in verschiedenen Patientenkollektiven zeigten sich erniedrigte hArg-Konzentrationen in Rauchern (Atzler et al., 2016b; Drechsler et al., 2015; Vogl et al., 2015), während Pilz et al. in einem Patientenkollektiv mit KHK-Patienten erhöhtes hArg in den Rauchern der Studie fand (Pilz et al., 2011a). In einer Studie mit pAVK-Patienten war das altersadjustierte hArg z.B. wiederum niedriger in den Rauchern verglichen mit Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern (1,60 vs. 1,97 μ mol/L) (Vogl et al., 2015). In den beiden populationsbasierten Studien DHS und Hoorn fanden die Autoren ebenfalls niedrigeres hArg in den rauchenden Teilnehmern (Atzler et al., 2014a; Pilz et al., 2014b). In der in dieser Arbeit beschriebenen gesunden Referenzkohorte hatte der Ausschluss von Rauchern keinen wesentlichen Einfluss auf die Referenzintervalle für Männern und Frauen. Der Median der in dieser Arbeit ermittelten ELISA-Serum-Referenzwerte betrug in Frauen

1,93 $\mu\text{mol/L}$ (Median Alter 41) und in Männern 2,02 $\mu\text{mol/L}$ (Median Alter 39 Jahre). Der Median der LC-MS/MS-Serum-Referenzwerte lag bei den Frauen bei 2,56 $\mu\text{mol/L}$ (Median Alter 36 Jahre) und bei den Männern bei 2,72 $\mu\text{mol/L}$ (Median Alter 35 Jahre) in der SHIP Kohorte (Atzler et al., 2014b). Damit lag der Median der LC-MS/MS-Referenzwerte bei den Frauen 33% und bei den Männern 35% höher als die korrespondierenden ELISA-Referenzwerte, was ähnlich der 31% höheren Werte, die in dem Methodenvergleich ermittelt wurden, ist. Da es sich bei SHIP-Studie und der in dieser Arbeit untersuchten SHIP-Trend-Studie um zwei verschiedene Kohorten handelt, ist ein direkter Vergleich beider Studien allerdings nicht möglich. Die Mediane der ELISA-Referenzwerte lagen in beiden Geschlechtern bei ~ 2 $\mu\text{mol/L}$, sodass dies als Grenzwert des ELISA-Schnelltestes gesetzt wurde. Patienten mit einer hArg-Konzentration < 2 $\mu\text{mol/L}$ und damit $<$ des Medians der Referenzkohorte können nun in der Klinik als Patienten mit einem erniedrigten hArg-Wert und damit erhöhtem Risiko für z.B. kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Ereignisse und Mortalität schnell identifiziert werden.

Tabelle 26: Homoargininkonzentrationen in gesunden Erwachsenen der verschiedenen analytischen Methoden.

Quelle	Methode	Matrix	n-Zahl	Alter ¹ (Jahre)	Männlich (%)	Homoarginin ² ($\mu\text{mol/L}$)
Atzler et al., 2011	LC-MS/MS	Plasma	136	48,5 \pm 11,0	51	2,5 \pm 1,0
Blackwell et al., 2007	HPLC	Plasma	100	23-65	49	1,87 (0,30–3,68) ³
Davids et al., 2012b	LC-MS/MS	Plasma	27	k.A.	k.A.	2,01 \pm 0,65
Di Gangi et al., 2010	UPLC-MS/MS	Plasma	20	42,5 \pm 5,0	k.A.	0,99 \pm 0,56
Di Gangi et al., 2010	UPLC-MS/MS	Serum	20	42,5 \pm 5,0	k.A.	0,77 \pm 0,48
DLD Diagnostika GmbH, 2014	ELISA	Plasma, Serum	252 ⁵	k.A.	k.A.	2,0 \pm 0,7
Hanff et al., 2016	GC-MS	Plasma	17	19–35	100	1,7 \pm 0,6
Jones et al., 2010	HPLC	Plasma	30	16-61	40	2,15 \pm 0,75
Kayacelebi et al., 2014	GC-MS/MS	Plasma, Serum	10	k.A.	k.A.	1,87 \pm 0,67
Meinitzer et al., 2007	HPLC	Plasma	78	26,7 \pm 4,0	100	2,48 (1,42-4,62) ³
			93	41,6 \pm 4,0		2,58 (1,38-5,29) ³
			82	57,5 \pm 4,2		2,37 (1,43-4,69) ³
			39	69,6 \pm 3,3		2,49 (1,11-4,68) ³
Midttun et al., 2013	LC-MS/MS	Plasma	171	21-68	60,2	1,93 (1,17-3,31) ⁴
van Dyk et al., 2015	UPLC-MS	Plasma	125	60-85	50,4	0,987 \pm 0,353

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung oder Bereich (Minimum-Maximum); ² Mittelwert \pm Standardabweichung oder ³ Median (2,5.-97,5. Perzentil) oder ⁴ Median [5-95. Perzentil]; ⁵ (DLD Diagnostika GmbH, persönliche Kommunikation, 2015). ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; GC, Gaschromatographie; HPLC, Hochleistungsflüssigchromatographie; k.A., keine Angabe; LC, Flüssigchromatographie; MS, Massenspektrometrie; MS/MS, Tandem-Massenspektrometrie; UPLC, Ultrahochleistungsflüssigchromatographie.

Tabelle 27: Alters- und geschlechtsabhängige Homoarginin-Referenzintervalle in gesunden Populationen.

Publikation	Studie	N-Zahl	Matrix	Bestimmungsmethode	Homoarginin-Referenzwerte (µmol/L) (Median [2,5.-97,5. Perzentil])		
					Altersgruppe	Frauen	Männer
Atzler et al., 2014b	SHIP	1359	Serum	LC-MS/MS (Atzler et al., 2011)	20-<30 Jahre:	2,95 [1,38-6,26]	2,67 [1,48-4,70]
					30-<40 Jahre:	2,53 [1,19-5,49]	2,81 [1,39-5,21]
					40-<50 Jahre:	2,45 [1,12-5,02]	2,83 [1,33-5,34]
					50-<60 Jahre:	2,32 [1,14-4,82]	2,51 [1,29-5,12]
					60-<70 Jahre:	2,26 [1,20-4,73]	2,51 [1,27-4,74]
					Alle 35 (28-48): ¹	2,56 [1,20-5,53]	2,72 [1,41-5,00]
Atzler et al., 2016a	GHS	786	Plasma	LC-MS/MS (Atzler et al., 2011)	35-<40 Jahre:	1,95 [0,8-3,93]	2,04 [0,77-3,83]
					40-<50 Jahre:	1,87 [0,89-3,85]	2,09 [0,98-4,48]
					50-<60 Jahre:	1,71 [0,80-4,3]	1,9 [1,00-4,02]
					60-<70 Jahre:	1,75 [0,83-3,38]	1,95 [1,14-4,52]
					70-74 Jahre:	1,48 [0,99-3,89]	1,78 [0,65-2,81]
					Alle 49,7±10,4: ²	1,77 [0,84-3,89]	2,01 [0,98-4,10]

¹ Median (25.-75. Perzentil); ² Mittelwert±Standardabweichung. GHS, Gutenberg health study; LC-MS/MS, Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie; SHIP, Study of health in Pomerania.

6.2. Studien zu kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen

6.2.1. Schlaganfall und Schlaganfallrisiko

In den hier untersuchten Schlaganfallrisikopatienten, die in der Vergangenheit schon einen Schlaganfall erlitten haben, zeigte sich in der multivariaten Regressionsanalyse ein Zusammenhang von niedrigem hArg mit territorialen Infarkten. In der Leeds-Stroke-Studie mit Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall berichteten Choe et al. schon 2013 von niedrigerem hArg in Patienten mit territorialen Infarkten als in Patienten mit lakunären Infarkten (Choe et al., 2013), was in dieser Arbeit durch univariate und multivariate Regressionsanalysen bestätigt wurde. Auch in der Metaanalyse beider Studien war dieser Zusammenhang signifikant. Hauptursachen territorialer Schlaganfälle sind atherosklerotische Veränderungen der großen Gefäße und Kardioembolien. Auch hier zeigte sich in den Risikopatienten mit vorangegangenem Schlaganfall in der Vergangenheit im adjustierten Modell ein Zusammenhang niedriger hArg-Plasmakonzentrationen mit einem Schlaganfall hervorgerufen durch Kardioembolien oder eine Atherosklerose der großen Gefäße. In der Harburg-Stroke-Studie sowie in der Metaanalyse konnte dieser Zusammenhang in noch stärkerer Ausprägung in allen Modellen bestätigt werden. Somit zeigten sich diese Zusammenhänge, niedriges hArg mit territorialen Schlaganfällen sowie Kardioembolien oder Atherosklerosen der großen Gefäße, nicht nur in Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall, sondern auch in Patienten mit einem sekundären Infarktrisiko, bei denen der Schlaganfall schon in der Vergangenheit stattfand. VHF ist eine Ursache von Thromboembolien, die einen Schlaganfall verursachen können (Kirchhof et al., 2016). In den Schlaganfallrisikopatienten sowie in der Harburg-Stroke-Studie hatten Patienten mit vorliegendem VHF tendenziell niedrigere hArg-Konzentrationen, während sich in der Leeds-Kohorte deutlich erniedrigte hArg-Konzentrationen bei Patienten mit Vorhofflimmern zeigten. In dieser Studie sowie der Metaanalyse war dieser Zusammenhang nur in univariaten, nicht in der adjustierten logistischen Regressionsanalysen signifikant. In der populationsbasierten GHS-Studie bestand kein Zusammenhang zwischen hArg und dem Vorliegen von VHF in der allgemeinen Bevölkerung (Niekamp et al., 2018), allerdings fanden Atzler et al. in Brustschmerz-Patienten mit Verdacht auf ACS eine 17% niedrigere Wahrscheinlichkeit für prävalentes VHF bei steigender hArg-Plasmakonzentration (Atzler et al., 2016b). In dieser Studie wurden 1.649 Patienten

untersucht, von denen 228 (18%) unter VHF litten, während bei den hier beschriebenen Studien weitaus kleinere Fallzahlen vorkamen (21 von 272 [8%] in der UKE-Kohorte; 65 von 394 [16%] in der Leeds-Stroke-Studie und 30 von 137 [22%] in der Harburg-Studie). Bei einer größeren Fallzahl der hier untersuchten Schlaganfall(risiko)patienten könnte sich dieser Trend möglicherweise ebenfalls als ein Zusammenhang herausstellen, wobei weitere klinische und experimentelle Studien nötig sind, um den zu Grunde liegenden Mechanismus aufzuklären. In den in dieser Arbeit untersuchten Schlaganfall(risiko)patienten war niedriges hArg mit einer Kardioembolie, aber auch einer Atherosklerose der großen Gefäße als Schlaganfallursache assoziiert. Eine Untersuchung auf eine Atherosklerose der großen Gefäße umfasst z.B. die Bestimmung der IMT der *Carotis interna*. In der UKE-Kohorte war hArg nicht mit der IMT oder dem Vorliegen einer Stenose bzw. Okklusion der *Carotis interna* assoziiert. In der Harburg-Stroke-Studie hingegen zeigte sich eine starke Assoziation niedriger hArg-Konzentrationen mit Stenosen bzw. einem Verschluss der Carotis. Auch in der Metaanalyse zeigte sich dieser Zusammenhang. Diese Analysen zeigen, dass in diesen Studien ein Zusammenhang zwischen niedrigem hArg in Patienten mit akutem Schlaganfall besteht, nicht aber in den Schlaganfallrisikopatienten der UKE-Kohorte. Mels et al. beobachteten in einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von drei Jahren bei den männlichen Teilnehmern ihrer Studie eine progressive Atherosklerose der *Carotis* bei gleichzeitiger Abnahme der hArg-Konzentration, fanden jedoch keinen Zusammenhang der IMT der *Carotis* mit hArg (Mels et al., 2017). In der populationsbasierten DHS-Studie zeigten Atzler et al. Assoziationen niedriger hArg-Plasmakonzentrationen mit makroangiopathischen Veränderungen der Aorta (erhöhte Aortenwanddicke und aortale Plaquebelastung), nicht aber mit der Kalzifizierung der Koronararterien (Atzler et al., 2014a). In Patienten mit Schlaganfall oder transitorischer ischämischer Attacke zeigten Haghikia et al. hingegen keinen Zusammenhang mit der aortalen IMT (Haghikia et al., 2017). In der Pathogenese der Atherosklerose kommt es zu Veränderung der Morphologie und Funktion der Gefäße (Zmysłowski und Szterk, 2017). Nach z.B. einer Verletzung des Gefäßes werden extrazelluläre Matrixproteine und Matrixmetalloproteinasen freigesetzt, welche einen Gefäßwandumbau und Reparaturmechanismen sowie die Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. *Transforming Growth Factor-β*) induzieren. Inflammatorische Prozesse werden unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of*

activated B-cells (NF- κ B) initiiert, wobei die Expression von z.B. Adhäsionsmolekülen (z.B. interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 und vaskuläres Adhäsionsmolekül 1) und Zytokinen (z.B. Tumornekrosefaktor- α , Interleukine-1, -6 und -12) stimuliert wird. März et al. fanden inverse Assoziationen zwischen hArg und dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 sowie dem vaskulären Adhäsionsmolekül 1 bei KHK-Patienten (März et al., 2010). Atzler et al. konnten diesen Zusammenhang in der DHS-Studie nicht bestätigen, fanden hingegen einen inversen Zusammenhang mit dem Endothelzell-selektiven Adhäsionsmolekül, sodass hArg im Zusammenhang mit der Monozytenadhäsion sowie auch der Transmigration neutrophiler Granulozyten in der Pathogenese der Atherosklerose stehen könnte (Atzler et al., 2014a). Da atherosklerotische Veränderungen mit entzündlichen Prozessen einhergehen, spielen auch Entzündungsmarker wie CRP eine Rolle bei der Beurteilung der Atherosklerose. Während in einigen Studien kein Zusammenhang mit hArg gefunden wurde (Drechsler et al., 2015; Hov et al., 2015; Pilz et al., 2014a, 2014b), bestand in anderen Studien ein inverser Zusammenhang zwischen hArg und CRP (Choe et al., 2013; März et al., 2010; Pilz et al., 2011a; Vogl et al., 2015). Darunter sind auch einige Kollektive, deren Erkrankung atherosklerotische Veränderungen vorausgehen können, z.B. KHK-Patienten (Pilz et al., 2011a), pAVK-Patienten (Vogl et al., 2015) und Schlaganfallpatienten (Choe et al., 2013; Haghikia et al., 2017). Auch in den Schlaganfallrisikopatienten der UKE-Kohorte zeigte sich eine inverse Assoziation von hArg mit CRP, sodass zumindest in manchen Patientenkollektiven ein Zusammenhang niedriger hArg-Konzentrationen mit einem erhöhten entzündlichen Geschehen angenommen werden kann. Des Weiteren zeigen manche Arbeiten auch einen möglichen Zusammenhang von hArg mit antithrombotischen Effekten. Radomski et al. zeigten eine Hemmung der Thrombozytenaggregation durch hArg, allerdings durch sehr hohe Konzentrationen von 100 μ mol/L (Radomski et al., 1990). In klinischen Studien sind inverse Assoziationen mit verschiedenen Faktoren der Gerinnung beschrieben, z.B. für Fibrinogen (Choe et al., 2013; März et al., 2010), von-Willebrand-Faktor (Choe et al., 2013), D-Dimere (März et al., 2010) und β -Thromboglobulin (Choe et al., 2013). Der Mechanismus, wie hArg mit der Pathogenese der Atherosklerose zusammenhängen könnte, ist bisher unzureichend untersucht. Als Substrat der NOS wird aus hArg NO gebildet, welches über seine vasodilatatorische (Palmer et al., 1987) und antiatherogene Wirkung (z.B. Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Monozytenadhäsion und Proliferation glatter Muskelzellen) (Garg und Hassid, 1989;

Kubes et al., 1991; Radomski et al., 1987a) die Pathogenese der Atherosklerose beeinflusst. In Ratten, die mit hArg behandelt wurden, hemmte hArg eine Hyperplasie der Neointima nach Gefäßverletzung der Carotis (Dellera et al., 2016). Ebenfalls in Ratten gezeigt führte eine Hemmung der Arginasen zu einer reduzierten Zellproliferation im Gefäßverletzungsmodell (Peyton et al., 2009), sodass eine hArg-Administration möglicherweise über diesen Mechanismus zu der reduzierten IMT beitragen könnte. Dafür könnte sprechen, dass sich in den hArg-supplementierten Ratten eine erhöhte Verfügbarkeit für Arg und eine erhöhte NO-Produktion zeigte (Dellera et al., 2016). Zur Abschätzung des Schlaganfallrisikos wurde der CHA₂DS₂-VASc-Score herangezogen (Lip et al., 2010). In der Kalkulation werden das Alter und Geschlecht der Patienten, das Vorliegen verschiedener weiterer Grunderkrankungen (Herzinsuffizienz, Hypertonus, Diabetes mellitus oder vaskuläre Erkrankungen) sowie vorherige Schlaganfälle, transitorische ischämische Attacken oder Thromboembolien berücksichtigt. Der Score wurde ursprünglich entwickelt, um das Schlaganfallrisiko in Patienten mit VHF abzuschätzen (Lip et al., 2010), jedoch gibt es zahlreiche Studien, die ebenfalls einen Nutzen in Patienten ohne VHF gezeigt haben, beispielsweise in ACS-Patienten (Mitchell et al., 2014), in Schlaganfall-Patienten (Ntaios et al., 2016, 2013; Tu et al., 2013) und auch in populationsbasierten Kohorten (Saliba et al., 2016). In dieser Arbeit zeigte sich ein inverser Zusammenhang von hArg mit dem CHA₂DS₂-VASc-Score in den Schlaganfallrisikopatienten der UKE-Kohorte. Eine sogar noch stärkere Assoziation niedriger hArg-Konzentrationen mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko zeigte sich in den Patienten mit akutem Schlaganfall der Harburg- und Leeds-Stroke-Studien. In tierexperimentellen Studien konnten Choe et al. zeigen, dass AGAT-defiziente Mäuse mit stark erniedrigten hArg- und Kreatin-Konzentrationen nach experimentellen Schlaganfällen um das dreifach erhöhte Infarktvolumina, verglichen mit den Wildtyp-Geschwistertieren aufwiesen (Choe et al., 2013). Während eine Kreatinsupplementation der AGAT-defizienten Mäuse zu keiner Verbesserung führten, resultierte eine zusätzliche Supplementation mit hArg sogar in kleineren Infarktvolumina. Die hArg-Plasmakonzentration korrelierte dabei sowohl mit dem Infarktvolumen, als auch mit dem neurologischen Score. Gleiches zeigten sie auch in C57BL6-Mäusen, welche um 22% niedrigere Infarktvolumina aufwiesen, wenn sie mit hArg supplementiert wurden (59,0±1,7% vs. 37,4±6,7%; Vehikel vs. hArg). Auch hier korrelierte die hArg-Plasmakonzentration mit dem Infarktvolumen. In beiden Modellen zeigten die mit hArg supplementierten Tiere einen verbesserten neurologischen Score.

Auch in Patienten nach einem akuten Schlaganfall konnten Choe et al. einen Zusammenhang schwererer neurologischer Symptome mit erniedrigten hArg-Plasmakonzentrationen zeigen (Choe et al., 2013). Diese Daten weisen darauf hin, dass Schlaganfallpatienten bzw. Schlaganfallrisikopatienten von einer oralen Supplementation mit hArg profitieren können. In 20 jungen, gesunden Probanden wurde über einen Zeitraum von vier Wochen die Verträglichkeit der Einnahme von 125 mg hArg als Kapseln untersucht (Atzler et al., 2016d). Die Supplementation wurde von den Probanden gut vertragen, sodass nun auch Patienten mit niedrigen hArg-Konzentrationen mit hArg-Kapseln supplementiert werden können. Die Daten von Choe et al. (2013) zeigen, dass vor allem Patienten mit erniedrigtem hArg und einem erhöhten Risiko für Schlaganfälle von einer Supplementation profitieren können und die Schwere eines möglichen zukünftigen Schlaganfalles durch die Anhebung der hArg-Plasmakonzentration positiv beeinflusst werden kann. Ob auch Patienten mit einem akuten Schlaganfall von einer zeitnah nach dem Ereignis beginnenden hArg-Supplementation profitieren können, ist Gegenstand aktueller Forschung. Zumindest bei einem auftretenden sekundären Schlaganfall könnte die hArg-Supplementation zu einer geminderten Schwere des Ereignisses beitragen.

6.2.2. Hypertrophe Kardiomyopathie

In 1.244 dialysepflichtigen Typ 2 Diabetes-Patienten fanden Drechsler et al. eine Assoziation niedriger hArg-Konzentrationen mit einer höheren Prävalenz einer Hypertrophie des linken Ventrikels (Drechsler et al., 2011). Die mittlere hArg-Plasmakonzentration der in dieser Arbeit untersuchten HCM-Patienten lag mit $1,6 \mu\text{mol/L}$ etwas niedriger als die von Atzler et al. beschriebene Konzentration von $1,88 \mu\text{mol/L}$ (Median) einer gesunden Referenzkohorte (Atzler et al., 2016a). In Patienten mit DD oder DD-Risiko (Bluthochdruck, DM, Schlafapnoe, Atherosklerose) fanden Pilz et al. keine Assoziation von hArg mit der Prävalenz einer linksventrikulären Hypertrophie, jedoch hatten Patienten mit vorliegender DD niedrigeres hArg als Patienten mit normaler diastolischer Funktion ($2,35 \pm 0,91$ vs $2,54 \pm 1,06 \mu\text{mol/L}$) (Pilz et al., 2014a). Bei der Betrachtung der absoluten Werte der hArg-Plasmakonzentrationen dieser Studien scheint hArg in dieser Kohorte höher zu sein als in den HCM-Patienten, jedoch liegen auch die Referenzwerte der Methode, die von Pilz et al. angewandt wurde, im Bereich zwischen $2,37$ - $2,58 \mu\text{mol/L}$ (Bereich der Mediane männlicher Probanden in verschiedenen Altersgruppen) (Meinitzer et al., 2007). Die in dieser

Arbeit untersuchten HCM-Patienten mit DD hatten niedrigeres hArg, verglichen mit den Patienten mit einer normalen diastolischen Funktion ($1,54 \pm 0,68$ vs. $1,76 \pm 0,64$ $\mu\text{mol/L}$). In der voll adjustierten Regressionsanalyse zeigte sich tendenziell der gleiche Trend. In den DD- und DD-Risikopatienten von Pilz et al. sank die Wahrscheinlichkeit für eine DD pro Anstieg der hArg-Konzentration um $0,94$ $\mu\text{mol/L}$ in der gesamten Kohorte um 16% (Pilz et al., 2014a). Sie fanden auch einen Zusammenhang zwischen niedrigerem hArg und dem Vorkommen einer moderaten bis schweren DD im Vergleich zur milden Form, welcher jedoch nach Adjustierung nicht mehr signifikant war. In den HCM-Patienten dieser Arbeit unterschied sich hArg der Patienten mit einer milden DD hingegen nicht von den Patienten mit einer moderaten bis schweren DD. Nur in univariaten Korrelationsanalysen mit den echokardiographischen Parametern der diastolischen Funktion zeigte sich eine positive Assoziation mit dem septalen und dem mittleren E' sowie eine inverse Assoziation mit der septalen und lateralen IVRT. E' gibt dabei die frühdiastolische passive Mitralanulusgeschwindigkeit an und dient als Maß für die Relaxation des linken Ventrikels, der unabhängig vom Füllungsdruck ist (Nagueh et al., 1997). Die IVRT ist bei einer gestörten Relaxation des linken Ventrikels verlängert (Nagueh et al., 2016). Niedriges hArg ist in den untersuchten HCM-Patienten in univariaten Analysen mit Parametern einer gestörten linksventrikulären Relaxation assoziiert. Die myokardiale Relaxation ist, zumindest teilweise, von NO beeinflusst (Shah und MacCarthy, 2000). In perfundiertem Meerschweinchenherzen verbesserte exogen zugeführtes sowie endogen freigesetztes NO die Relaxation mit einer früheren und schnelleren Relaxation und einem leicht reduzierten linksventrikulären Druck, ohne dabei die Kontraktilität zu beeinflussen (Grocott-Mason et al., 1994a, 1994b). Auch im Menschen zeigten sich diese Effekte bei einer lokalen Applikation von Nitroprussid-Natrium während einer Herzkatheteruntersuchung (Paulus et al., 1994). In aus Ratten isolierten Kardiomyozyten zeigten Shah et al. eine erhöhte cGMP-induzierte Dehnbarkeit des linken Ventrikels und eine erhöhte Länge der Myozyten in der Diastole (Shah et al., 1994). In tierexperimentellen Versuchen zeigten Faller et al. in AGAT- und damit Kreatin- und hArg-defizienten Mäusen eine gestörte Kontraktilität und Relaxation sowie eine verschlechterte kontraktile Reserve (Faller et al., 2018). Im Gegensatz zum Kreatin normalisierte eine Supplementation der Tiere mit hArg alle genannten funktionellen Einschränkungen, inklusive der Relaxation. In einem experimentellen Herzinsuffizienz-Mausmodell, in denen C57BL/6J-Mäuse mit hArg supplementiert wurden, zeigten Atzler et al. eine besser

erhaltene isovolumetrische Funktion in den supplementierten Tieren sowie unter adrenerger Stimulation eine verbesserte kontraktile Reserve – ein Indiz dafür, dass eine hArg-Supplementation von Patienten mit einer Herzinsuffizienz zu einer Verbesserung der Symptome führen könnte (Atzler et al., 2017). Es gibt bereits viele Studien, die einen Zusammenhang niedriger hArg-Konzentrationen mit Parametern der Herzinsuffizienz zeigen. Die Patienten einer Studie mit 282 Herzinsuffizienzpatienten mit reduzierter Auswurfleistung hatten im Median eine Plasmakonzentration von 1,78 $\mu\text{mol/L}$ hArg, mit niedrigeren Werten in Patienten mit einer moderaten/schweren HF (NYHA III/IV) verglichen mit Patienten ohne oder mit milden Symptomen (NYHA I/II) (1,59 vs. 1,97 $\mu\text{mol/L}$) (Atzler et al., 2013). hArg war in zahlreichen Studien invers mit BNP (Atzler et al., 2016b; Pilz et al., 2014b) und NT-proBNP (Atzler et al., 2013; Drechsler et al., 2011; Pilz et al., 2014a, 2011a; Vogl et al., 2015) assoziiert. In den in dieser Arbeit untersuchten HCM-Patienten korrelierte hArg ebenfalls invers mit NT-proBNP und war niedriger in Patienten mit einer moderaten bis schweren Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit (NYHA III-IV), verglichen mit den Patienten mit keiner oder einer milden Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit, wobei letztgenannter Zusammenhang in adjustierten Regressionsanalysen nicht signifikant war. In Herzinsuffizienzpatienten war hArg in den Patienten reduziert, die im Beobachtungszeitraum von 3 Jahren verstarben (1,63 vs. 1,89 $\mu\text{mol/L}$) (Atzler et al., 2013). Die Patienten hatten pro Anstieg des hArg um 1,55 $\mu\text{mol/L}$ (anti-log) ein um 28% niedrigeres Mortalitätsrisiko. In 3.305 Patienten mit Brustschmerzen, die sich routinemäßig einer Koronarangiographie unterzogen, fanden Pilz et al. in einer multivariaten COX-Regressionsanalyse ein um 39% erniedrigtes Risiko für ein durch eine Herzinsuffizienz begründetes Versterben mit steigendem hArg (Pilz et al., 2011a). In der populationsbasierten DHS mit 3.514 Teilnehmern zeigte sich keine Assoziation niedriger hArg-Plasmakonzentrationen mit kongestiver HF (Atzler et al., 2014a). Zu Assoziationen von hArg mit der Mortalität in Patienten mit HCM oder DD gibt es bisher noch keine Daten, sodass hierüber bisher noch keine Aussage getroffen werden kann. Eine DD ist ein Risikofaktor für VHF, die in HCM-Patienten am häufigsten auftretende Arrhythmie (Elliott et al., 2014). Patienten mit VHF haben ein erhöhtes Risiko an z.B. plötzlichem Herztod, einer Herzinsuffizienz oder einem Schlaganfall zu versterben (Kirchhof et al., 2016). Für die in dieser Studie untersuchten HCM-Patienten wurde VHF auf zwei Weisen dokumentiert. Zum einen wurde beurteilt, ob in einer aktuell vorliegenden EKG-Aufzeichnung VHF vorlag und

zum anderen wurde dokumentiert, ob VHF innerhalb der letzten fünf Jahre aufgetreten war. Die Patienten mit aktuell vorliegendem VHF hatten tendenziell niedrigeres hArg als Patienten mit einem Sinusrhythmus, wobei die Fallzahl hier mit nur 12 Patienten sehr gering war. Weiter wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen hArg und einem Auftreten von VHF in der Vergangenheit gab. Dabei zeigte sich eine signifikante und in adjustierten Analysen unabhängige Assoziation niedriger hArg-Konzentrationen mit VHF. Auch wenn niedriges hArg nicht in der allgemeinen Bevölkerung mit dem Vorliegen von VHF assoziiert ist (Niekamp et al., 2018), könnte es jedoch in manchen Patientenkollektiven, wie z.B. HCM- oder Brustschmerzpatienten eine Rolle spielen.

6.2.3. Chronische Hypoxie bei Höhengaufenthalt

In dieser Arbeit wurden 99 junge, männliche, chilenische Soldaten untersucht, die einer chronisch-intermittierenden Hypoxie durch einen Aufenthalt in der Höhe ausgesetzt waren. Die mittlere hArg-Konzentration zu Studienbeginn lag innerhalb der in dieser Arbeit ermittelten Referenzintervalle, wobei die Soldaten jünger waren und die Konzentrationen im Plasma ermittelt wurden, die Referenzintervalle aber im Serum bestimmt und erst Konzentrationen ab einem Alter von 20 Jahren verfügbar sind. Nach sechs Monaten war hArg um 26% niedriger als vor dem Höhengaufenthalt ($1,76 \pm 0,62$ vs. $2,44 \pm 0,71$ $\mu\text{mol/L}$). Mögliche Ursachen könnten eine verminderte hArg-Synthese oder ein gesteigerter Abbau unter hypoxischen Bedingungen sein. Für das Enzym Dimethylamin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), welches den Abbau von ADMA katalysiert (Tran et al., 2003), konnte beispielsweise in Hypoxie-exponierten Ratten eine reduzierte Expression und Aktivität bei erhöhten ADMA-Konzentrationen im Lungengewebe gezeigt werden (Lüneburg et al., 2016). Im Menschen war die ADMA-Konzentration bei chronischer sowie nach chronisch intermittierender Hypoxie ebenfalls im Plasma erhöht (Lüneburg et al., 2017), was darauf hinweisen könnte, dass unter hypoxischen Bedingungen die DDAH-Expression möglicherweise im gesamten Organismus, z.B. auch in einem der Hauptsyntheseorte, den Nieren (Leiper et al., 1999), reduziert ist. Die Nieren gehören ebenfalls zu den Hauptexpressionsorten der AGAT (Cullen et al., 2006). Eine verminderte Aktivität oder eine verminderte Expression dieses Enzyms könnte in den in dieser Arbeit untersuchten Soldaten möglicherweise zu den erniedrigten hArg-Plasmakonzentrationen nach dem Höhengaufenthalt führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass hArg vermehrt abgebaut

wird. Ein Teil des hArg wird über die AGXT2 verstoffwechselt (Rodionov et al., 2016). SDMA, welches ebenfalls über die AGXT2 abgebaut wird (Lüneburg et al., 2014), veränderte sich nicht bei einer chronisch-intermittierenden Hypoxie (Lüneburg et al., 2017). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die AGXT2-Expression hier unbeeinflusst bleibt und somit in der Studie dieser Arbeit keinen Einfluss auf die endogene hArg-Konzentration hätte. In der Höhe findet sich ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck, wodurch ebenfalls die Sauerstoffsättigung im Blut abnimmt (Grocott et al., 2009). Nach einer Vasokonstriktion der Lungengefäße mit einer Druckerhöhung im Lungenkreislauf (Euler und Liljestrand, 1946) wird das Atemzentrum zur Gegenregulation der Unterversorgung mit Sauerstoff durch Hyperventilation aktiviert (Bärtsch und Gibbs, 2007). Im großen Kreislauf kommt es zu einer Vasodilatation und es erhöhen sich zunächst der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz auf Grund einer Aktivierung des Sympathikotonus. Viele Studien zeigen einen positiven Zusammenhang von hArg mit dem systolischen (Atzler et al., 2014a, 2016b; Pilz et al., 2011a; van der Zwan et al., 2013) und diastolischen Blutdruck (Atzler et al., 2014a, 2016b; Pilz et al., 2011a, 2014a; van der Zwan et al., 2013), während andere keine Assoziation mit dem systolischen Blutdruck zeigen (Drechsler et al., 2015; Hov et al., 2015; Pilz et al., 2014a). In einigen Patientenkollektiven war hArg nicht mit dem Vorliegen einer Hypertonie assoziiert (Drechsler et al., 2015; Pilz et al., 2014a, 2011a), in zwei populationsbasierten Studien, der DHS-Studie (Atzler et al., 2014a) und der Hoorn-Studie (Pilz et al., 2014b) zeigte sich dagegen eine positive Assoziation von hArg mit einer erhöhten Prävalenz der Hypertonie. In Ratten fanden Dellera et al. keinen Einfluss einer hArg-Administration auf den systolischen Blutdruck (Dellera et al., 2016), in hypertensiven Ratten hingegen fanden Chen und Sanders eine Erniedrigung des Blutdruckes in den normotensiven Bereich nach Infusion von hArg (Chen und Sanders, 1993). In gesunden Schwangeren fanden Valtonen et al. sowohl höheres hArg, als auch eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation, die beide nach der Geburt wieder absanken (Valtonen et al., 2008). Es scheint, dass hArg zumindest in einigen Kollektiven mit dem Blutdruck zusammenhängen könnte. Ob hArg auch in der hier untersuchten Studie mit dem Ausmaß der Blutdrucksteigerung zusammenhängt, soll in der Zukunft noch untersucht werden.

ADMA, ein direkter NOS-Inhibitor, ist durch einen verminderten Abbau nach Hypoxieexposition erhöht und mit einer verschlechterten Fähigkeit, sich an die Gegebenheiten der Höhe anzupassen, assoziiert (Lüneburg et al., 2017, 2016). Die

exakten Vorgänge, die zu den Symptomen einer akuten Höhenkrankheit führen, sind nicht bekannt (Hackett und Roach, 2001). Während es in der Lunge zu einer Vasokonstriktion kommt, findet in der zerebralen Vaskulatur z.B. durch die Freisetzung von NO eine Vasodilatation statt, wodurch vermutlich der Kopfschmerz ausgelöst wird. Die Therapie der akuten Höhenkrankheit besteht vor allem darin, auf eine Höhe herabzusteigen, bei der der Betroffene ohne Symptome war (León-Velarde et al., 2005). Risikofaktoren für eine akute Höhenkrankheit sind eine bereits zuvor aufgetretene Höhenkrankheit, ein dauerhaftes Leben unterhalb von 900 m über dem Meeresspiegel, Überanstrengung und kardiopulmonale Vorerkrankungen (Hackett und Roach, 2001). Während sich die Konzentration von ADMA im Menschen bisher noch nicht therapeutisch beeinflussen lässt, könnte hArg z.B. supplementiert werden, um bei einem eventuellen kausalen Zusammenhang die Entwicklung einer akuten Höhenkrankheit abzuschwächen oder zu vermeiden.

In einer Studie mit behandlungsnaiven PAH-Patienten zeigten sich verglichen mit einer gesunden Referenzpopulation erniedrigte hArg-Plasmakonzentrationen (Median 1,38 vs. 1,88 $\mu\text{mol/L}$) (Atzler et al., 2016d, 2016a). hArg war in der gesamten Kohorte mit der Schwere der Erkrankung assoziiert (positiv mit der 6-Minuten-Gehstrecke und der Auswurfraction sowie invers mit dem rechten atrialen Druck, Big Endothelin 1 und NT-proBNP). Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Jahren verstarben, hatten niedrigeres hArg als die Überlebenden ($1,26 \pm 0,48$ vs. $1,64 \pm 0,69$ $\mu\text{mol/L}$). Pro Anstieg der Plasmakonzentration um 0,66 $\mu\text{mol/L}$ hArg sank das Mortalitätsrisiko um 49%, in einer Subgruppenanalyse nur der Patienten mit idiopathischer PAH sogar um 59%. Die PAH ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 3,9/Mio. Erwachsenen und einer Prävalenz von 25,9/Mio. Erwachsenen in Deutschland (Hoepfer et al., 2016) und ist gekennzeichnet durch einen erhöhten mittleren pulmonalen arteriellen Druck, einen erniedrigten pulmonal arteriellen Wedge-Druck und einen gesteigerten pulmonal vaskulären Widerstand (Galiè et al., 2016). Unter anderem spielt die endotheliale Dysfunktion mit einer chronisch beeinträchtigten Produktion des Vasodilatators NO eine Rolle in der Pathogenese der PAH (Galiè et al., 2016). Ob die in dieser Arbeit gezeigten erniedrigten hArg-Konzentrationen nach chronisch-intermittierender Hypoxie einen Einfluss auf die Pathogenese der hypoxieinduzierten PAH haben und hier eventuell von einer prophylaktischen hArg-Supplementation profitiert werden könnte, muss in weiteren Studien untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, H.P., Bendixen, B.H., Kappelle, L.J., Biller, J., Love, B.B., Gordon, D.L., Marsh, E.E., 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35–41. <https://doi.org/10.1161/01.STR.24.1.35>
- Alesutan, I., Feger, M., Tuffaha, R., Castor, T., Musculus, K., Buehling, S.S., Heine, C.L., Kuro-O, M., Pieske, B., Schmidt, K., Tomaschitz, A., Maerz, W., Pilz, S., Meinitzer, A., Voelkl, J., Lang, F., 2016. Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc. Res.* 110, 408–418. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw062>
- Andries, G., Yandrapalli, S., Naidu, S.S., Panza, J.A., 2018. Novel Pharmacotherapy in Hypertrophic Cardiomyopathy: *Cardiol. Rev.* 1. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000211>
- Atzler, D., Appelbaum, S., Cordts, K., Ojeda, F.M., Wild, P.S., Münzel, T., Blankenberg, S., Böger, R.H., Blettner, M., Beutel, M.E., Pfeiffer, N., Zeller, T., Lackner, K.J., Schwedhelm, E., 2016a. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 54, 1231–1237. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0785>
- Atzler, D., Baum, C., Ojeda, F., Keller, T., Cordts, K., Schnabel, R.B., Choe, C., Lackner, K.J., Münzel, T., Böger, R.H., Blankenberg, S., Schwedhelm, E., Zeller, T., 2016b. Low Homoarginine Levels in the Prognosis of Patients With Acute Chest Pain. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002565. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002565>
- Atzler, D., Cracowski, J.-L., Cordts, K., Böger, R.H., Humbert, M., Schwedhelm, E., 2016c. Homoarginine predicts mortality in treatment-naïve patients with pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* 217, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.161>
- Atzler, D., Gore, M.O., Ayers, C.R., Choe, C. -u., Böger, R.H., de Lemos, J.A., McGuire, D.K., Schwedhelm, E., 2014a. Homoarginine and Cardiovascular Outcome in the Population-Based Dallas Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2501–2507. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304398>
- Atzler, D., McAndrew, D.J., Cordts, K., Schneider, J.E., Zervou, S., Schwedhelm, E., Neubauer, S., Lygate, C.A., 2017. Dietary Supplementation with Homoarginine Preserves Cardiac Function in a Murine Model of Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *Circulation* 135, 400–402. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025673>
- Atzler, D., Mieth, M., Maas, R., Böger, R.H., Schwedhelm, E., 2011. Stable isotope dilution assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of L-homoarginine in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 879, 2294–2298. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.016>
- Atzler, D., Rosenberg, M., Anderssohn, M., Choe, C., Lutz, M., Zugck, C., Böger, R.H., Frey, N., Schwedhelm, E., 2013. Homoarginine - an independent marker of mortality in heart failure. *Int. J. Cardiol.* 168, 4907–4909. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.07.099>
- Atzler, D., Schönhoff, M., Cordts, K., Ortland, I., Hoppe, J., Hummel, F.C., Gerloff, C., Jaehde, U., Jagodzinski, A., Böger, R.H., Choe, C.-U., Schwedhelm, E., 2016d. Oral supplementation with L-homoarginine in young volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82, 1477–1485. <https://doi.org/10.1111/bcp.13068>

- Atzler, D., Schwedhelm, E., Choe, C., 2015. L-Homoarginine and cardiovascular disease: Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 18, 83–88. <https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000123>
- Atzler, D., Schwedhelm, E., Nauck, M., Ittermann, T., Böger, R.H., Friedrich, N., 2014b. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania. Clin. Chem. Lab. Med. 52, 1835–1842. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0314>
- Bale, T.L., Epperson, C.N., 2017. Sex as a Biological Variable: Who, What, When, Why, and How. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 42, 386–396. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.215>
- Balligand, J.L., Cannon, P.J., 1997. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 1846–1858.
- Bamford, J., Sandercock, P., Dennis, M., Warlow, C., Burn, J., 1991. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. The Lancet 337, 1521–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93206-O](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93206-O)
- Bärtsch, P., Gibbs, J.S.R., 2007. Effect of Altitude on the Heart and the Lungs. Circulation 116, 2191–2202. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.650796>
- Bell, E.A., 1962a. Associations of ninhydrin-reacting compounds in the seeds of 49 species of Lathyrus. Biochem. J. 83, 225–229.
- Bell, E.A., 1962b. The isolation of L-homoarginine from seeds of Lathyrus cicera. Biochem. J. 85, 91–93.
- Bell, E.A., 1962c. alpha,gamma-Diaminobutyric acid in seeds of twelve species of Lathyrus and identification of a new natural amino-acid, L-homoarginine, in seeds of other species toxic to man and domestic animals. Nature 193, 1078–1079.
- Bernstein, H.-G., Jäger, K., Dobrowolny, H., Steiner, J., Keilhoff, G., Bogerts, B., Laube, G., 2015. Possible sources and functions of l-homoarginine in the brain: review of the literature and own findings. Amino Acids 47, 1729–1740. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1960-y>
- Berüter, J., Colombo, J.P., Bachmann, C., 1978. Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. Biochem. J. 175, 449–454.
- Blackwell, S., O'Reilly, D.S.J., Talwar, D., 2007. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. Eur. J. Clin. Invest. 37, 364–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01798.x>
- Bork, N.I., Nikolaev, V.O., 2018. cGMP Signaling in the Cardiovascular System-The Role of Compartmentation and Its Live Cell Imaging. Int. J. Mol. Sci. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030801>
- Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1994. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger Molecule. Annu. Rev. Biochem. 63, 175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.001135>
- Bretscher, L.E., Li, H., Poulos, T.L., Griffith, O.W., 2003. Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines. J. Biol. Chem. 278, 46789–46797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306787200>
- Busch, M.A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., Gößwald, A., 2013. Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1).

- Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 56, 656–660. <https://doi.org/10.1007/s00103-012-1659-0>
- Carter, A.M., Catto, A.J., Mansfield, M.W., Bamford, J.M., Grant, P.J., 2007. Predictive variables for mortality after acute ischemic stroke. *Stroke* 38, 1873–1880. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.474569>
- Chafai, A., Fromm, M.F., König, J., Maas, R., 2017. The prognostic biomarker L-homoarginine is a substrate of the cationic amino acid transporters CAT1, CAT2A and CAT2B. *Sci. Rep.* 7, 4767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04965-2>
- Chen, P.Y., Sanders, P.W., 1993. Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 22, 812–818.
- Choe, C.-u., Atzler, D., Wild, P.S., Carter, A.M., Boger, R.H., Ojeda, F., Simova, O., Stockebrand, M., Lackner, K., Nabuurs, C., Marescau, B., Streichert, T., Müller, C., Luneburg, N., De Deyn, P.P., Benndorf, R.A., Baldus, S., Gerloff, C., Blankenberg, S., Heerschap, A., Grant, P.J., Magnus, T., Zeller, T., Isbrandt, D., Schwedhelm, E., 2013. Homoarginine Levels Are Regulated by L-Arginine:Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome: Results From Human and Murine Studies. *Circulation* 128, 1451–1461. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580>
- Closs, E.I., Boissel, J.-P., Habermeier, A., Rotmann, A., 2006. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* 213, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>
- Colleluori, D.M., Ash, D.E., 2001. Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry* 40, 9356–9362.
- Cordts, K., Atzler, D., Qaderi, V., Sydow, K., Böger, R.H., Choe, C.-U., Schwedhelm, E., 2015. Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC-MS/MS and ELISA: a comparison and a biological application. *Amino Acids* 47, 2015–2022. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2037-7>
- Cullen, M.E., Yuen, A.H.Y., Felkin, L.E., Smolenski, R.T., Hall, J.L., Grindle, S., Miller, L.W., Birks, E.J., Yacoub, M.H., Barton, P.J.R., 2006. Myocardial expression of the arginine:glycine amidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation* 114, 116–20. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000448>
- Davids, M., Ndika, J.D.T., Salomons, G.S., Blom, H.J., Teerlink, T., 2012a. Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett.* 586, 3653–3657. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.020>
- Davids, M., Swieringa, E., Palm, F., Smith, D.E.C., Smulders, Y.M., Scheffer, P.G., Blom, H.J., Teerlink, T., 2012b. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, L-monomethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 900, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.025>
- Davids, M., Teerlink, T., 2013. Plasma concentrations of arginine and asymmetric dimethylarginine do not reflect their intracellular concentrations in peripheral blood mononuclear cells. *Metabolism* 62, 1455–1461. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.05.017>
- Delanaye, P., Schaeffner, E., Ebert, N., Cavalier, E., Mariat, C., Krzesinski, J.-M., Moranne, O., 2012. Normal reference values for glomerular filtration rate: what

- do we really know? *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 2664–2672. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs265>
- Dellera, F., Ganzetti, G.S., Froio, A., Manzini, S., Busnelli, M., Meinitzer, A., Sirtori, C.R., Chiesa, G., Parolini, C., 2016. L-homoarginine administration reduces neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotids. *Thromb. Haemost.* 116, 400–402. <https://doi.org/10.1160/TH15-10-0831>
- Di Gangi, I.M., Chiandetti, L., Gucciardi, A., Moret, V., Naturale, M., Giordano, G., 2010. Simultaneous quantitative determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 677, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.011>
- DLD Diagnostika GmbH, 2014. Arbeitsanleitung Homoarginin ELISA.
- Drechsler, C., Kollerits, B., Meinitzer, A., März, W., Ritz, E., König, P., Neyer, U., Pilz, S., Wanner, C., Kronenberg, F., for the MMKD Study Group, 2013. Homoarginine and Progression of Chronic Kidney Disease: Results from the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *PLoS ONE* 8, e63560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063560>
- Drechsler, C., Meinitzer, A., Pilz, S., Krane, V., Tomaschitz, A., Ritz, E., März, W., Wanner, C., 2011. Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur. J. Heart Fail.* 13, 852–859. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr056>
- Drechsler, C., Pihlstrøm, H., Meinitzer, A., Pilz, S., Tomaschitz, A., Abedini, S., Fellstrom, B., Jardine, A.G., Wanner, C., März, W., Holdaas, H., 2015. Homoarginine and Clinical Outcomes in Renal Transplant Recipients: Results From the Assessment of Lescol in Renal Transplantation Study. *Transplantation* 99, 1470–1476. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000568>
- Elliott, P.M., Anastasakis, A., Borger, M.A., Borggrefe, M., Cecchi, F., Charron, P., Hagege, A.A., Lafont, A., Limongelli, G., Mahrholdt, H., McKenna, W.J., Mogensen, J., Nihoyannopoulos, P., Nistri, S., Pieper, P.G., Pieske, B., Rapezzi, C., Rutten, F.H., Tillmanns, C., Watkins, H., 2014. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 35, 2733–2779. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu284>
- Euler, U.S. v., Liljestrand, G., 1946. Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiol. Scand.* 12, 301–320. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1946.tb00389.x>
- Faller, K.M.E., Atzler, D., McAndrew, D.J., Zervou, S., Whittington, H.J., Simon, J.N., Aksentijevic, D., ten Hove, M., Choe, C., Isbrandt, D., Casadei, B., Schneider, J.E., Neubauer, S., Lygate, C.A., 2018. Impaired cardiac contractile function in arginine:glycine amidinotransferase knockout mice devoid of creatine is rescued by homoarginine but not creatine. *Cardiovasc. Res.* 114, 417–430. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx242>
- Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U., Hofmann, F., 2003. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ. Res.* 93, 907–916. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000100390.68771.CC>
- Finger, J.D., Busch, M.A., Du, Y., Heidemann, C., Knopf, H., Kuhnert, R., Lampert, T., Mensink, G.B.M., Neuhauser, H.K., Rosario, A.S., Scheidt-Nave, C., Schienkiewitz, A., Truthmann, J., Kurth, B.-M., 2016. Time Trends in

- Cardiometabolic Risk Factors in Adults. Dtsch. Aerzteblatt Online. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0712>
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H., 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertens. Dallas Tex* 23, 1121–1131.
- Fuchs, S.A., Berger, R., Klomp, L.W.J., de Koning, T.J., 2005. D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Mol. Genet. Metab.* 85, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.03.003>
- Furchgott, R.F., Cherry, P.D., Zawadzki, J.V., Jothianandan, D., 1984. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 Suppl 2, S336-343.
- Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade, P.T., Zompatori, M., Hoeper, M., 2016. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 37, 67–119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>
- Garg, U.C., Hassid, A., 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 83, 1774–1777. <https://doi.org/10.1172/JCI114081>
- Genchi, G., 2017. An overview on D-amino acids. *Amino Acids* 49, 1521–1533. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2459-5>
- Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., Busch, M.A., 2013. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56, 650–655. <https://doi.org/10.1007/s00103-013-1666-9>
- Greenstein, J.P., 1937. A syntheses of homoarginine. *J Org Chem* 2, 1.
- Greenstein, J.P., Jenrett, W.V., Mider, G.B., White, J., 1941. Chemical Studies on the Components of Normal and Neoplastic Tissues. *J Nat Cancer Inst* 1, 687.
- Grocott, M.P.W., Martin, D.S., Levett, D.Z.H., McMorrow, R., Windsor, J., Montgomery, H.E., Caudwell Xtreme Everest Research Group, 2009. Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest. *N. Engl. J. Med.* 360, 140–149. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0801581>
- Grocott-Mason, R., Anning, P., Evans, H., Lewis, M.J., Shah, A.M., 1994a. Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 267, H1804-1813. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.5.H1804>
- Grocott-Mason, R., Fort, S., Lewis, M.J., Shah, A.M., 1994b. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am. J. Physiol.* 266, H1699-1705. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.5.H1699>
- Hackett, P.H., Roach, R.C., 2001. High-altitude illness. *N. Engl. J. Med.* 345, 107–114. <https://doi.org/10.1056/NEJM200107123450206>
- Hafner, F., Kieninger, A., Meinitzer, A., Gary, T., Froehlich, H., Haas, E., Hackl, G., Eller, P., Brodmann, M., Seino, G., 2014. Endothelial Dysfunction and Brachial

- Intima-Media Thickness: Long Term Cardiovascular Risk with Claudication Related to Peripheral Arterial Disease: A Prospective Analysis. *PLoS ONE* 9, e93357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093357>
- Haghikia, Arash, Yanchev, G.R., Kayacelebi, A.A., Hanff, E., Bledau, N., Widera, C., Sonnenschein, K., Haghikia, Aiden, Weissenborn, K., Bauersachs, J., Bavendiek, U., Tsikas, D., 2017. The role of L-arginine/L-homoarginine/nitric oxide pathway for aortic distensibility and intima-media thickness in stroke patients. *Amino Acids* 49, 1111–1121. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2409-2>
- Hanff, E., Kayacelebi, A.A., Yanchev, G.R., Maassen, N., Haghikia, A., Tsikas, D., 2016. Simultaneous stable-isotope dilution GC–MS measurement of homoarginine, guanidinoacetate and their common precursor arginine in plasma and their interrelationships in healthy and diseased humans. *Amino Acids* 48, 721–732. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2120-0>
- Hecker, M., Walsh, D.T., Vane, J.R., 1991. On the substrate specificity of nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 294, 221–224.
- Helm, T., Varsi, K., Fløtre, C.H., Lund, A., Svingen, G.F.T., Ueland, P.M., Bjørke-Monsen, A.-L., 2018. Plasma Homoarginine Concentrations According to Use of Hormonal Contraception. *Sci. Rep.* 8, 12217. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30708-y>
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473–476.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87–94.
- Hoepfer, M.M., Huscher, D., Pittrow, D., 2016. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int. J. Cardiol.* 203, 612–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.001>
- Hov, G.G., Aasarød, K.I., Sagen, E., Åsberg, A., 2015. Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clin. Biochem.* 48, 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.012>
- Hrabák, A., Bajor, T., Temesi, A., 1994. Comparison of substrate and inhibitor specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogues and related compounds in murine and rat macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 206–212.
- Ikemoto, M., Tabata, M., Miyake, T., Kono, T., Mori, M., Totani, M., Murachi, T., 1990. Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product. *Biochem. J.* 270, 697–703.
- Iyengar, R., Stuehr, D.J., Marletta, M.A., 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 6369–6373.
- Iyer, R., Jenkinson, C.P., Vockley, J.G., Kern, R.M., Grody, W.W., Cederbaum, S., 1998. The human arginases and arginase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21 Suppl 1, 86–100.
- Jenkinson, C.P., Grody, W.W., Cederbaum, S.D., 1996. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 114, 107–132. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02138-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02138-8)
- Jones, C.E., Darcy, C.J., Woodberry, T., Anstey, N.M., McNeil, Y.R., 2010. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, homoarginine and arginine in small plasma volumes using a Gemini-NX column

- at high pH. *J. Chromatogr. B* 878, 8–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.035>
- Kayacelebi, A.A., Beckmann, B., Gutzki, F.-M., Jordan, J., Tsikas, D., 2014. GC–MS and GC–MS/MS measurement of the cardiovascular risk factor homoarginine in biological samples. *Amino Acids* 46, 2205–2217.
<https://doi.org/10.1007/s00726-014-1774-3>
- Kirchhof, P., Benussi, S., Kotecha, D., Ahlsson, A., Atar, D., Casadei, B., Castella, M., Diener, H.-C., Heidbuchel, H., Hendriks, J., Hindricks, G., Manolis, A.S., Oldgren, J., Popescu, B.A., Schotten, U., Van Putte, B., Vardas, P., Agewall, S., Camm, J., Baron Esquivias, G., Budts, W., Carerj, S., Casselman, F., Coca, A., De Caterina, R., Deffereos, S., Dobrev, D., Ferro, J.M., Filippatos, G., Fitzsimons, D., Gorenek, B., Guenoun, M., Hohnloser, S.H., Kolh, P., Lip, G.Y.H., Manolis, A., McMurray, J., Ponikowski, P., Rosenhek, R., Ruschitzka, F., Savelieva, I., Sharma, S., Suwalski, P., Tamargo, J.L., Taylor, C.J., Van Gelder, I.C., Voors, A.A., Windecker, S., Zamorano, J.L., Zeppenfeld, K., 2016. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur. Heart J.* 37, 2893–2962.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw210>
- Kleber, M.E., Seppala, I., Pilz, S., Hoffmann, M.M., Tomaschitz, A., Oksala, N., Raitoharju, E., Lyytikainen, L.-P., Makela, K.-M., Laaksonen, R., Kahonen, M., Raitakari, O.T., Huang, J., Kienreich, K., Fahrleitner-Pammer, A., Drechsler, C., Krane, V., Boehm, B.O., Koenig, W., Wanner, C., Lehtimaki, T., Marz, W., Meinitzer, A., 2013. Genome-Wide Association Study Identifies 3 Genomic Loci Significantly Associated With Serum Levels of Homoarginine: The AtheroRemo Consortium. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 505–513.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000108>
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M., Moncada, S., 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5159–5162.
- Koenker, R., 2005. *Quantile Regression*. Cambridge University Press, Cambridge.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511754098>
- Kriskó, I., Walker, J.B., 1966. Influence of sex hormones on amidinotransferase levels. Metabolic control of creatine biosynthesis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 53, 655–662. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0530655>
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N., 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4651–4655.
- Lehman, L.J., Olson, A.L., Rebouche, C.J., 1987. Measurement of epsilon-N-trimethyllysine in human blood plasma and urine. *Anal. Biochem.* 162, 137–142.
- Leiper, J.M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R.J., Charles, I.G., Whitley, G.S., Vallance, P., 1999. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.* 343 Pt 1, 209–214.
- León-Velarde, F., Maggiorini, M., Reeves, J.T., Aldashev, A., Asmus, I., Bernardi, L., Ge, R.-L., Hackett, P., Kobayashi, T., Moore, L.G., Penalzoza, D., Richalet, J.-P., Roach, R., Wu, T., Vargas, E., Zubieta-Castillo, G., Zubieta-Calleja, G., 2005. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt. Med. Biol.* 6, 147–157. <https://doi.org/10.1089/ham.2005.6.147>
- Lip, G.Y.H., Nieuwlaat, R., Pisters, R., Lane, D.A., Crijns, H.J.G.M., 2010. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial

- fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest* 137, 263–272. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1584>
- Lüneburg, N., Lieb, W., Zeller, T., Chen, M.-H., Maas, R., Carter, A.M., Xanthakis, V., Glazer, N.L., Schwedhelm, E., Seshadri, S., Ikram, M.A., Longstreth, W.T., Fornage, M., König, I.R., Loley, C., Ojeda, F.M., Schillert, A., Wang, T.J., Sticht, H., Kittel, A., König, J., Benjamin, E.J., Sullivan, L.M., Bernges, I., Anderssohn, M., Ziegler, A., Gieger, C., Illig, T., Meisinger, C., Wichmann, H.-E., Wild, P.S., Schunkert, H., Psaty, B.M., Wiggins, K.L., Heckbert, S.R., Smith, N., Lackner, K., Lunetta, K.L., Blankenberg, S., Erdmann, J., Munzel, T., Grant, P.J., Vasan, R.S., Böger, R.H., 2014. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7, 864–872. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000264>
- Lüneburg, N., Siques, P., Brito, J., Arriaza, K., Pena, E., Klose, H., Leon-Velarde, F., Böger, R.H., 2016. Long-Term Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats Causes an Imbalance in the Asymmetric Dimethylarginine/Nitric Oxide Pathway and ROS Activity: A Possible Synergistic Mechanism for Altitude Pulmonary Hypertension? *Pulm. Med.* 2016, 6578578. <https://doi.org/10.1155/2016/6578578>
- Lüneburg, N., Siques, P., Brito, J., De La Cruz, J.J., León-Velarde, F., Hannemann, J., Ibanez, C., Böger, R.H., 2017. Long-Term Intermittent Exposure to High Altitude Elevates Asymmetric Dimethylarginine in First Exposed Young Adults. *High Alt. Med. Biol.* 18, 226–233. <https://doi.org/10.1089/ham.2016.0123>
- Lüneburg, N., von Holten, R.-A., Töpper, R.F., Schwedhelm, E., Maas, R., Böger, R.H., 2012. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 122, 105–111. <https://doi.org/10.1042/CS20110013>
- Marescau, B., Deshmukh, D.R., Kockx, M., Possemiers, I., Qureshi, I.A., Wiechert, P., De Deyn, P.P., 1992. Guanidino compounds in serum, urine, liver, kidney, and brain of man and some ureotelic animals. *Metabolism.* 41, 526–532.
- Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., Wishnok, J.S., 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27, 8706–8711.
- Martens-Lobenhoffer, J., Schwedhelm, E., Tsikas, D., 2009. Quantification of arginine and its mono- and dimethylated analogs NMMA, ADMA and SDMA in biological fluids by LC–MS/MS: Is LC superfluous? *J. Chromatogr. B* 877, 3261–3266. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.003>
- März, W., Meinitzer, A., Drechsler, C., Pilz, S., Krane, V., Kleber, M.E., Fischer, J., Winkelmann, B.R., Böhm, B.O., Ritz, E., Wanner, C., 2010. Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 122, 967–975. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.908988>
- May, M., Kayacelebi, A.A., Batkai, S., Jordan, J., Tsikas, D., Engeli, S., 2015. Plasma and tissue homoarginine concentrations in healthy and obese humans. *Amino Acids* 47, 1847–1852. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1922-4>
- Meinitzer, A., Puchinger, M., Winklhofer-Roob, B.M., Rock, E., Ribalta, J., Roob, J.M., Sundl, I., Halwachs-Baumann, G., März, W., 2007. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta* 384, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.006>
- Mels, C.M.C., Schutte, A.E., Huisman, H.W., Smith, W., Kruger, R., van Rooyen, J.M., Schwedhelm, E., Atzler, D., Böger, R.H., Malan, N.T., Malan, L., 2017.

- Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine prospectively relates to carotid wall thickening in black men: the SABPA study. *Amino Acids* 49, 1843–1853. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2483-5>
- Midttun, Ø., Kvalheim, G., Ueland, P.M., 2013. High-throughput, low-volume, multianalyte quantification of plasma metabolites related to one-carbon metabolism using HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2009–2017. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6602-6>
- Mitchell, L.B., Southern, D.A., Galbraith, D., Ghali, W.A., Knudtson, M., Wilton, S.B., 2014. Prediction of stroke or TIA in patients without atrial fibrillation using CHADS₂ and CHA₂DS₂-VASc scores. *Heart* 100, 1524–1530. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305303>
- Moali, C., Boucher, J.L., Sari, M.A., Stuehr, D.J., Mansuy, D., 1998. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry* 37, 10453–10460. <https://doi.org/10.1021/bi980742t>
- Moncada, S., Higgs, E.A., 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S193-201. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458>
- Montalescot, G., Sechtem, U., Achenbach, S., Andreotti, F., Arden, C., Budaj, A., Bugiardini, R., Crea, F., Cuisset, T., Di Mario, C., Ferreira, J.R., Gersh, B.J., Gitt, A.K., Hulot, J.-S., Marx, N., Opie, L.H., Pfisterer, M., Prescott, E., Ruschitzka, F., Sabaté, M., Senior, R., Taggart, D.P., van der Wall, E.E., Vrints, C.J.M., ESC Committee for Practice Guidelines, Zamorano, J.L., Achenbach, S., Baumgartner, H., Bax, J.J., Bueno, H., Dean, V., Deaton, C., Erol, C., Fagard, R., Ferrari, R., Hasdai, D., Hoes, A.W., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., Lancellotti, P., Linhart, A., Nihoyannopoulos, P., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Sirnes, P.A., Tamargo, J.L., Tendera, M., Torbicki, A., Wijns, W., Windecker, S., Document Reviewers, Knuuti, J., Valgimigli, M., Bueno, H., Claeys, M.J., Donner-Banzhoff, N., Erol, C., Frank, H., Funck-Brentano, C., Gaemperli, O., Gonzalez-Juanatey, J.R., HAMILIOS, M., Hasdai, D., Husted, S., James, S.K., Kervinen, K., Kolh, P., Kristensen, S.D., Lancellotti, P., Maggioni, A.P., Piepoli, M.F., Pries, A.R., Romeo, F., Rydén, L., Simoons-Schotman, M.L., Sirnes, P.A., Steg, P.G., Timmis, A., Wijns, W., Windecker, S., Yildirir, A., Zamorano, J.L., 2013. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 34, 2949–3003. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs296>
- Mori, A., Watanabe, Y., Fujimoto, N., 1982. Fluorometrical analysis of guanidino compounds in human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 38, 448–450.
- Moritz, E., Wegner, D., Groß, S., Bahls, M., Dörr, M., Felix, S.B., Ittermann, T., Oswald, S., Nauck, M., Friedrich, N., Böger, R.H., Daum, G., Schwedhelm, E., Rauch, B.H., 2017. Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 468, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.029>
- Morris, S.M., 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 87–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547>
- Nagueh, S.F., Appleton, C.P., Gillebert, T.C., Marino, P.N., Oh, J.K., Smiseth, O.A., Waggoner, A.D., Flachskampf, F.A., Pellikka, P.A., Evangelisa, A., 2009. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by

- echocardiography. *Eur. J. Echocardiogr. J. Work. Group Echocardiogr. Eur. Soc. Cardiol.* 10, 165–193. <https://doi.org/10.1093/ejehocardi/jep007>
- Nagueh, S.F., Middleton, K.J., Kopelen, H.A., Zoghbi, W.A., Quiñones, M.A., 1997. Doppler Tissue Imaging: A Noninvasive Technique for Evaluation of Left Ventricular Relaxation and Estimation of Filling Pressures. *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 1527–1533. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(97\)00344-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(97)00344-6)
- Nagueh, S.F., Smiseth, O.A., Appleton, C.P., Byrd, B.F., Dokainish, H., Edvardsen, T., Flachskampf, F.A., Gillebert, T.C., Klein, A.L., Lancellotti, P., Marino, P., Oh, J.K., Alexandru Popescu, B., Waggoner, A.D., Houston, Texas; Oslo, Norway; Phoenix, Arizona; Nashville, Tennessee; Hamilton, Ontario, Canada; Uppsala, Sweden; Ghent and Liège, Belgium; Cleveland, Ohio; Novara, Italy; Rochester, Minnesota; Bucharest, Romania; and St. Louis, Missouri, 2016. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* 17, 1321–1360. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew082>
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106, 3143–3421.
- Niekamp, C., Atzler, D., Ojeda, F., Sinning, C., Lackner, K., Böger, R., Munzel, T., Beutel, M., Schmidtman, I., Pfeiffer, N., Leuschner, A., Blankenberg, S., Wild, P., Zeller, T., Schwedhelm, E., Schnabel, R., 2018. Cross-Sectional Associations between Homoarginine, Intermediate Phenotypes, and Atrial Fibrillation in the Community—The Gutenberg Health Study. *Biomolecules* 8, 86. <https://doi.org/10.3390/biom8030086>
- Ntaios, G., Lip, G.Y.H., Makaritsis, K., Papavasileiou, V., Vemmou, A., Koroboki, E., Savvari, P., Manios, E., Milionis, H., Vemmos, K., 2013. CHADS₂, CHA₂DS₂-VASc, and long-term stroke outcome in patients without atrial fibrillation. *Neurology* 80, 1009–1017. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318287281b>
- Ntaios, G., Vemmos, K., Lip, G.Y.H., Koroboki, E., Manios, E., Vemmou, A., Rodríguez-Campello, A., Cuadrado-Godia, E., Giralt-Steinhauer, E., Arnao, V., Caso, V., Paciaroni, M., Díez-Tejedor, E., Fuentes, B., Pérez Lucas, J., Arauz, A., Ameriso, S.F., Hawkes, M.A., Pertierra, L., Gómez-Schneider, M., Bandini, F., Chavarria Cano, B., Iglesias Mohedano, A.M., García Pastor, A., Gil-Núñez, A., Putaala, J., Tatlisumak, T., Barboza, M.A., Athanasakis, G., Makaritsis, K., Papavasileiou, V., 2016. Risk Stratification for Recurrence and Mortality in Embolic Stroke of Undetermined Source. *Stroke* 47, 2278–2285. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013713>
- Nunn, P.B., Bell, E.A., Watson, A.A., Nash, R.J., 2010. Toxicity of non-protein amino acids to humans and domestic animals. *Nat. Prod. Commun.* 5, 485–504.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666. <https://doi.org/10.1038/333664a0>
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>

- Paulus, W.J., Vantrimpont, P.J., Shah, A.M., 1994. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 89, 2070–2078.
- Pentyala, J., Rao, S.L.N., 1999. Sustained nitric oxide generation with L-homoarginine. *Res. Commun. Biochem. Cell Mol. Biol.* 3, 223–232.
- Peyton, K.J., Ensenat, D., Azam, M.A., Keswani, A.N., Kannan, S., Liu, X., Wang, H., Tulis, D.A., Durante, W., 2009. Arginase promotes neointima formation in rat injured carotid arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 488–494. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.183392>
- Pilz, S., Edelmann, F., Meinitzer, A., Gelbrich, G., Döner, U., Dungen, H.-D., Tomaschitz, A., Kienreich, K., Gaksch, M., Duvinage, A., Stahrenberg, R., Kunde, J., Schmidt, A., März, W., Wachter, R., Pieske, B., 2014a. Associations of Methylarginines and Homoarginine With Diastolic Dysfunction and Cardiovascular Risk Factors in Patients With Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *J. Card. Fail.* 20, 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2014.09.004>
- Pilz, S., Meinitzer, A., Gaksch, M., Grübler, M., Verheyen, N., Drechsler, C., Hartaigh, B. ó, Lang, F., Alesutan, I., Voelkl, J., März, W., Tomaschitz, A., 2015. Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids* 47, 1703–1713. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1993-2>
- Pilz, S., Meinitzer, A., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Ritz, E., Krane, V., Wanner, C., Boehm, B.O., März, W., 2011a. Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart* 97, 1222–1227. <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.220731>
- Pilz, S., Teerlink, T., Scheffer, P.G., Meinitzer, A., Rutters, F., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Kienreich, K., Nijpels, G., Stehouwer, C.D.A., März, W., Dekker, J.M., 2014b. Homoarginine and mortality in an older population: the Hoorn study. *Eur. J. Clin. Invest.* 44, 200–208. <https://doi.org/10.1111/eci.12208>
- Pilz, S., Tomaschitz, A., Meinitzer, A., Drechsler, C., Ritz, E., Krane, V., Wanner, C., Bohm, B.O., März, W., 2011b. Low Serum Homoarginine Is a Novel Risk Factor for Fatal Strokes in Patients Undergoing Coronary Angiography. *Stroke* 42, 1132–1134. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.603035>
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5193–5197.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S., 1987a. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 92, 639–646.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S., 1987b. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1482–1489.
- Rao, S.L., Ramachandran, L.K., Adiga, P.R., 1963. The isolation and characterization of L-homoarginine from seeds of *Lathyrus sativus*. *Biochemistry* 2, 298–300.
- Rao, S.L.N., 2011. A look at the brighter facets of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid, homoarginine and the grass pea. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49, 620–622. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.054>
- Reczkowski, R.S., Ash, D.E., 1994. Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism, Alternate Substrates, and Inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 31–37. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1276>

- Rodionov, R.N., Jarzebska, N., Weiss, N., Lentz, S.R., 2014. AGXT2: a promiscuous aminotransferase. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.005>
- Rodionov, R.N., Oppici, E., Martens-Lobenhoffer, J., Jarzebska, N., Brilloff, S., Burdin, D., Demyanov, A., Kolouschek, A., Leiper, J., Maas, R., Cellini, B., Weiss, N., Bode-Böger, S.M., 2016. A Novel Pathway for Metabolism of the Cardiovascular Risk Factor Homoarginine by alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *Sci. Rep.* 6, 35277. <https://doi.org/10.1038/srep35277>
- Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J.J., Borger, M.A., Brotons, C., Chew, D.P., Gencer, B., Hasenfuss, G., Kjeldsen, K., Lancellotti, P., Landmesser, U., Mehilli, J., Mukherjee, D., Storey, R.F., Windecker, S., 2016. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 37, 267–315. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv320>
- Rozañ, P., Kuo, Y.H., Lambein, F., 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry* 58, 281–289.
- Ryan, W.L., Wells, I.C., 1964. Homocitrulline and homoarginine synthesis from lysine. *Science* 144, 1122–1127.
- Saliba, W., Gronich, N., Barnett-Griness, O., Rennert, G., 2016. The role of CHADS₂ and CHA₂DS₂-VASc scores in the prediction of stroke in individuals without atrial fibrillation: a population-based study. *J. Thromb. Haemost.* 14, 1155–1162. <https://doi.org/10.1111/jth.13324>
- 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, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.039>
- Schwedhelm, E., 2005. Quantification of ADMA: analytical approaches. *Vasc. Med.* 10, S89–S95. <https://doi.org/10.1191/1358863x05vm596oa>
- Schwedhelm, E., Maas, R., Tan-Andresen, J., Schulze, F., Riederer, U., Böger, R.H., 2007. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 851, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.052>
- Shah, A.M., MacCarthy, P.A., 2000. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol. Ther.* 86, 49–86.
- Shah, A.M., Spurgeon, H.A., Sollott, S.J., Talo, A., Lakatta, E.G., 1994. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74, 970–978.
- Sitar, M.E., Kayacelebi, A.A., Beckmann, B., Kielstein, J.T., Tsikas, D., 2015. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human blood: effects of extended haemodialysis in the critically ill patient with acute kidney injury, protein binding to human serum albumin and proteolysis by thermolysin. *Amino Acids* 47, 1983–1993. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1991-4>
- Sobczak, A., Prokopowicz, A., Radek, M., Szula, M., Zaciera, M., Kurek, J., Goniewicz, M.L., 2014. Tobacco Smoking Decreases Plasma Concentration of the Emerging Cardiovascular Risk Marker, L-homoarginine. *Circ. J.* 78, 1254–1258. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-13-1334>
- Statistisches Bundesamt, 2018a. Statistisches Jahrbuch Deutschland 2018.

- Statistisches Bundesamt, 2018b. Sterbefälle, Sterbeziffer, Ränge, Anteile der häufigsten Todesursachen (ab 1998). Thematische Recherche: Gesundheitliche Lage → Sterblichkeit → Mortalität und Todesursachen → Dokumentart Tabelle (gestaltbar). URL www.gbe-bund.de (Zugriff am 23.11.18).
- Statistisches Bundesamt, 2015. Todesursachen in Deutschland Fachserie 12, Reihe 4.
- Strobel, J., Mieth, M., Endreß, B., Auge, D., König, J., Fromm, M.F., Maas, R., 2012. Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter 1 (CAT1). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.06.002>
- Sulser, H., Sager, F., 1976. Identification of uncommon amino acids in the lentil seed (*Lens culinaris* Med.). *Experientia* 32, 422–423.
- Teerlink, T., Nijveldt, R.J., de Jong, S., van Leeuwen, P.A.M., 2002. Determination of Arginine, Asymmetric Dimethylarginine, and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma and Other Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 303, 131–137. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5575>
- Tomaschitz, A., Meinitzer, A., Pilz, S., Rus-Machan, J., Genser, B., Drechsler, C., Grammer, T., Krane, V., Ritz, E., Kleber, M.E., Pieske, B., Kraigher-Krainer, E., Fahrleitner-Pammer, A., Wanner, C., Boehm, B.O., Marz, W., 2014. Homoarginine, kidney function and cardiovascular mortality risk. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 663–671. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft512>
- Tommasi, S., Elliot, D.J., Da Boit, M., Gray, S.R., Lewis, B.C., Mangoni, A.A., 2018. Homoarginine and inhibition of human arginase activity: kinetic characterization and biological relevance. *Sci. Rep.* 8, 3697. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22099-x>
- Touboul, P.-J., Hennerici, M.G., Meairs, S., Adams, H., Amarenco, P., Bornstein, N., Csiba, L., Desvarieux, M., Ebrahim, S., Hernandez Hernandez, R., Jaff, M., Kownator, S., Naqvi, T., Prati, P., Rundek, T., Sitzer, M., Schminke, U., Tardif, J.-C., Taylor, A., Vicaut, E., Woo, K.S., 2012. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness and Plaque Consensus (2004–2006–2011). *Cerebrovasc. Dis.* 34, 290–296. <https://doi.org/10.1159/000343145>
- Tran, C.T.L., Leiper, J.M., Vallance, P., 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl.* 4, 33–40.
- Tu, H.T.H., Campbell, B.C.V., Meretoja, A., Churilov, L., Lees, K.R., Donnan, G.A., Davis, S.M., on behalf of the VISTA collaborators, 2013. Pre-Stroke CHADS2 and CHA2DS2 -VASc Scores Are Useful in Stratifying Three-Month Outcomes in Patients with and without Atrial Fibrillation. *Cerebrovasc. Dis.* 36, 273–280. <https://doi.org/10.1159/000353670>
- Valtonen, P., Karppi, J., Nyssönen, K., Valkonen, V.-P., Halonen, T., Punnonen, K., 2005. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 828, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.023>
- Valtonen, P., Laitinen, T., Lyyra-Laitinen, T., Raitakari, O.T., Juonala, M., Viikari, J.S.A., Heiskanen, N., Vanninen, E., Punnonen, K., Heinonen, S., 2008. Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 72, 1879–1884.

- van der Zwan, L.P., Davids, M., Scheffer, P.G., Dekker, J.M., Stehouwer, C.D.A., Teerlink, T., 2013. L-Homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population: the Hoorn study. *J. Hypertens.* 31, 1114–1123. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32836037fb>
- van Dyk, M., Mangoni, A.A., McEvoy, M., Attia, J.R., Sorich, M.J., Rowland, A., 2015. Targeted arginine metabolomics: A rapid, simple UPLC-QToF-MSE based approach for assessing the involvement of arginine metabolism in human disease. *Clin. Chim. Acta* 447, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.014>
- Vogelgesang, J., Hädrich, J., 1998. Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accreditation Qual. Assur.* 3, 242–255. <https://doi.org/10.1007/s007690050234>
- Vogl, L., Pohlhammer, J., Meinitzer, A., Rantner, B., Stadler, M., Peric, S., Hammerer-Lercher, A., Klein-Weigel, P., Fraedrich, G., Kronenberg, F., Kollerits, B., 2015. Serum concentrations of L-arginine and L-homoarginine in male patients with intermittent claudication: a cross-sectional and prospective investigation in the CAVASIC Study. *Atherosclerosis* 239, 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.019>
- Völzke, H., Alte, D., Schmidt, C.O., Radke, D., Lorbeer, R., Friedrich, N., Aumann, N., Lau, K., Piontek, M., Born, G., Havemann, C., Ittermann, T., Schipf, S., Haring, R., Baumeister, S.E., Wallaschofski, H., Nauck, M., Frick, S., Arnold, A., Junger, M., Mayerle, J., Kraft, M., Lerch, M.M., Dorr, M., Reffelmann, T., Empen, K., Felix, S.B., Obst, A., Koch, B., Glaser, S., Ewert, R., Fietze, I., Penzel, T., Doren, M., Rathmann, W., Haerting, J., Hannemann, M., Ropcke, J., Schminke, U., Jurgens, C., Tost, F., Rettig, R., Kors, J.A., Ungerer, S., Hegenscheid, K., Kuhn, J.-P., Kuhn, J., Hosten, N., Puls, R., Henke, J., Gloger, O., Teumer, A., Homuth, G., Volker, U., Schwahn, C., Holtfreter, B., Polzer, I., Kohlmann, T., Grabe, H.J., Roskopf, D., Kroemer, H.K., Kocher, T., Biffar, R., John, U., Hoffmann, W., 2011. Cohort Profile: The Study of Health in Pomerania. *Int. J. Epidemiol.* 40, 294–307. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp394>
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80, 1107–1213. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107>
- Zhu, Y., Evans, M.I., 2001. Estrogen modulates the expression of L-arginine:glycine amidinotransferase in chick liver. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 139–145.
- Zmysłowski, A., Szterk, A., 2017. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids Health Dis.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0579-2>

8. Anhang

8.1. Lösungen und Puffer

GC-MS	
Boratpuffer (pH 8,5)	0,4 mol/L Borsäure in Wasser
Methanolische Salzsäure (2 mol/L)	16 mL 37% Salzsäure 80 mL Methanol
Pentafluoropropionsäureanhydrid in Ethylacetat (v/v)	25% Pentafluoropropionsäureanhydrid 75% Ethylacetat
LC-MS/MS	
Butanolische Salzsäure (v/v)	10% Acetylchlorid in 1-Butanol
Fließmittel A (v/v)	0,1% Ameisensäure in Wasser
Fließmittel B (v/v)	50% Acetonitril 50% Methanol 0,1% Ameisensäure
Probenpuffer (v/v)	25% Methanol 75% Wasser 0,1% Ameisensäure pH 5 mit 25% Ammoniak

8.2. Materialien

8.2.1. Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
0,9% NaCl-Lösung	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Acetonitril	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Acetylchlorid zur Synthese	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH (Seelze, Deutschland)
Ammoniumhydroxid-Lösung (25% NH ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
1-Butanol	Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylacetat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
L-Homoarginin ·HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
¹³ C ₆ -Homoarginin	Eigene Synthese (Atzler et al., 2011)
¹⁵ N ₄ ¹³ C ₇ -L-Homoarginin ·HCl	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Pentafluoropropionsäureanhydrid	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Salzsäure 37%	Avantor Performance Materials (Griesheim, Deutschland)
Toluol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Wasser für LC-MS	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)

8.2.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Filterplatte MultiScreen _{HTS}	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Abdeckmatten	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Acetatfolie für 96-Well Platten	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Autosampler-Glasgefäße (1,5 mL)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Combitips advanced®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Glas-Mikroeinsätze (0,2 mL)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Homoarginin-ELISA	DLD Diagnostika GmbH (Hamburg, Deutschland)
Homoarginin-ELISA Sonderversion	WESAMIN GmbH & Co. KG (Winsen, Deutschland)
Injekt® Solo 20 mL-Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Kapillarsäule Optima 17 (15 m Länge, 0.25 mm I.D., 0.25 µm Filmdicke)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Polaris C18-Ether-Säule (50x2,0 mm)	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reagenzreservoir (50 mL)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5; 2 mL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten (10K)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
S-Monovetten® EDTA	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Sterican® Einmalkanülen Größe 12 (22 G)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
U-96-Well-Polypropylen-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

8.2.3. Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
8-Kanalpipette (300 µL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Abzug VintAIR 9000	Vinitex Laboratoriuminrichtlingen BV (Sint-Oedenrode, Niederlande)
Analysenwaage CP225D	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Einkanalpipetten (10, 20, 100, 1.000, 5.000 µL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Gaschromatograph 1310 (ISQ, Autosampler)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Heizblock Stuart SBH130D/3	Cole-Parmer Ltd. (Stone, Staffordshire, UK)
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
MRW Washer AM60	Dynex Technologies (Chantilly, VA, USA)
Orbitalschüttler Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
pH-Meter Five-Easy™ FE20	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Präzisionstemperaturmessgerät P 300 W	TFA Dostmann GmbH & Co. KG (Wertheim-Reicholzheim, Deutschland)
Präzisionswaage BP 3100 S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Schüttel- und Mischgerät Reax top	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Taumel-Rollenmischer RM5-V30	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
Tecan Sunrise™	Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)
TurboVap® LV Evaporator (Zymark)	Biotage (Uppsala, Schweden)
Varian 1200L Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Varian CTC PAL Autosampler	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Varian ProStar model 210 HPLC Pumpen	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Zentrifugen 5415D, 5415R, 5810R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

8.2.4. Software

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
BIOVIA Draw 18.1	BIOVIA (San Diego, CA, USA)	Abbildungen
GraphPad Prism® 5	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)	Statistik und Abbildungen
IBM SPSS Statistics 22	IBM Corporation, Armonk, NY, USA)	Statistik
Magellan™ 4.00	Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)	Auswertung ELISA
Microsoft Office (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)	Statistik, Abbildungen und Textverarbeitung
MS Data Review® (Varian MS Workstation 6.6)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)	Auswertung LC-MS/MS
Xcalibur™ Software 3.063.3	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)	Auswertung GC-MS
Zotero 4.0.29.17	Center for History and New Media, George Mason University (Fairfax, VA, USA)	Literaturverwaltung

8.3. Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS

Bezeichnung	Piktogramme nach GHS	Warnhinweise nach GHS (H- und P-Sätze)
Acetonitril	GHS02, GHS07	H: 225, 302+312+332, 319 P: 210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Acetylchlorid zur Synthese	GHS02, GHS05	H: 225, 314 P: 210, 233, 240, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310, 403+235
Ameisensäure	GHS02, GHS05, GHS06	H: 226, 302, 314, 331 P: 210, 280, 284, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313
Ammoniumhydroxid-Lösung (25% NH ₃)	GHS05, GHS07, GHS09	H: 302, 314, 335, 410 P: 260, 280, 301+312+330, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Borsäure	GHS08	H: 360FD P: 201, 308+313
1-Butanol	GHS02, GHS05, GHS07	H: 226, 302, 315, 318, 335, 336 P: 210, 280, 302+352, 305+351+338, 310
Ethylacetat	GHS02, GHS07	H: 225, 319, 336 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 240, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+233
Pentafluoropropionsäureanhydrid	GHS05	H: 314 P: 280, 260, 264, 304+340, 310, 301+310, 301+330+331, 303+361+353, 311, 305+351+338
Salzsäure 37%	GHS05, GHS07	H: 314, 335 P: 260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310, 405
Toluol	GHS02, GHS07, GHS08	H: 225, 304, 315, 336, 361d, 373 P: 210, 260, 280, 301+310, 370+378, 403+235

GHS-Piktogramme

	Explodierende Bombe (GHS01)
	Flamme (GHS02)
	Flamme über Kreis (GHS03)
	Gasflasche (GHS04)
	Ätzwirkung (GHS05)
	Totenkopf mit Knochen (GHS06)
	Ausrufezeichen (GHS07)
	Gesundheitsgefahr (GHS08)
	Umwelt (GHS09)

H-Sätze (Hazard Statements)

H200	Instabil, explosiv.
H201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
H202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220	Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H227	Brennbare Flüssigkeit.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H229	Behälter steht unter Druck: Kann bei Erwärmung bersten.
H230	Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.
H231	Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.

- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H303 Kann bei Verschlucken gesundheitsschädlich sein.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H305 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege gesundheitsschädlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H313 Kann bei Berührung mit der Haut gesundheitsschädlich sein.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H316 Verursacht leichte Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H320 Verursacht Augenreizungen.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H333 Kann bei Einatmen gesundheitsschädlich sein.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H350 Kann Krebs erzeugen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen <konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen <konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt>
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe <oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H371 Kann die Organe schädigen <oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H372 Schädigt die Organe <alle betroffenen Organe nennen> bei längerer oder wiederholter Exposition <Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H373 Kann die Organe schädigen <alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> bei längerer oder wiederholter Exposition <Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.
- H300 + H310 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt
- H300 + H310 + H330 Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
- H300 + H330 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen
- H301 + H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt

- H301 + H311 + H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
- H301 + H331 Giftig bei Verschlucken oder Einatmen
- H302 + H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt
- H302 + H312 + H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
- H302 + H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen
- H303 + H313 Kann bei Verschlucken oder Hautkontakt gesundheitsschädlich sein.
- H303 + H313 + H333 Kann bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
- H303 + H333 Kann bei Verschlucken oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
- H310 + H330 Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen
- H311 + H331 Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen
- H312 + H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen
- H313 + H333 Kann bei Hautkontakt oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
- H315 + H320 Verursacht Haut- und Augenreizungen.
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H401 Giftig für Wasserorganismen.
- H402 Schädlich für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
- H420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre
- P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung und anderen brennbaren Materialien fernhalten.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.
- P222 Keinen Kontakt mit Luft zulassen.
- P223 Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.
- P230 Feucht halten mit ...
- P231 Inhalt unter inertem Gas/... handhaben und aufbewahren.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur in Originalverpackung aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen/... verwenden.
- P242 Funkenarmes Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
- P244 Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.
- P250 Nicht schleifen/stoßen/reiben/... .
- P251 Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Berührung während Schwangerschaft und Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

- P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- P282 Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung/Gesichtsschild/Augenschutz tragen.
- P283 Schwer entflammbare oder flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
- P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
- P231 + P232 Inhalt unter inertem Gas/... handhaben und aufbewahren. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P301 BEI VERSCHLUCKEN:
- P302 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT:
- P303 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar):
- P304 BEI EINATMEN:
- P305 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:
- P306 BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG:
- P307 BEI Exposition:
- P308 BEI Exposition oder falls betroffen
- P309 BEI Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
- P311 GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- P301 + P330 + P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P302 + P334 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen oder nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser/.../waschen.
- P303 + P361 + P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
- P304 + P312 BEI EINATMEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P304 + P340 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P304 + P341 BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305 + P351 + P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306 + P360 BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P307 + P311 BEI Exposition: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P308 + P311 BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
- P308 + P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P309 + P311 BEI Exposition oder Unwohlsein: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen [oder nassen Verband anlegen].
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:

- P338 Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser/.../waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P364 Und vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr.
- P373 KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.
- P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Bei Undichtigkeit alle Zündquellen entfernen.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
- P361 + P364 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P362 + P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P401 Aufbewahren gemäß
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem/... Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln oder Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/... lbs bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren.
- P420 Getrennt aufbewahren.
- P422 Inhalt in/unter ... aufbewahren
- P402 + P404 An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P403 + P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.

- P403 + P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
- P411 + P235 Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren. Kühl halten.
- P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.
- P502 Informationen zur Wiederverwendung oder Wiederverwertung beim Hersteller oder Lieferanten erfragen.

8.4. Pipettierschemata Homoarginin-ELISA und Schnelltest

Homoarginin-ELISA

Probenvorbereitung (Acylierung)

Acylierungsplatte	
Std, Con, Probe	20 µL
Acylierungspuffer	20 µL
Ausgleichsreagenz	200 µL
10 s schütteln	
Acylierungsreagenz	50 µL
15 min schütteln	

ELISA

ELISA-Platte	
Acylierte Std, Con, Probe	20 µL
Antiserum	50 µL
Platte mit Folie abkleben	
90 min schütteln	
4x Waschen mit 300 µL Waschpuffer	
Enzymkonjugat	100 µL
25 min schütteln	
4x Waschen mit 300 µL Waschpuffer	
Substrat	100 µL
25±5 min schütteln	
Stop-Lösung	100 µL
Messung der Extinktion bei 450 nm	

ELISA „Schnelltest“

Probenvorbereitung (Acylierung)

2 mL Reaktionsgefäße	
Std, Con, Probe	20 µL
Acylierungspuffer	20 µL
Ausgleichsreagenz	200 µL
mischen	
Acylierungsreagenz	50 µL
Jeweils sofort mischen 15 min schütteln	
Aqua dest.	250 µL
mischen	

ELISA

ELISA-Platte	
Acylierte Std, Con, Probe	20 µL
Antiserum 200%	100 µL
Platte mit Folie abkleben	
45 min schütteln	
4x Waschen mit 300 µL Waschpuffer	
Enzymkonjugat	100 µL
15 min schütteln	
4x Waschen mit 300 µL Waschpuffer	
Substrat	100 µL
15±5 min schütteln	
Stop-Lösung	100 µL
Messung der Extinktion bei 450 nm	

8.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kathrin Cordts
 Geburtsdatum/-ort: 18. Juli 1988, Kaltenkirchen
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2014 Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
„Vergleich analytischer Methoden zur quantitativen Bestimmung von Homoarginin und Untersuchung von Homoarginin als kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Risikomarker“

05/2014 – 12/2018 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Drittmittelprojekten des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung
„Arginine derivatives as novel drug targets for vascular disease“ und „Modulation of the L-arginine:glycine amidinotransferase/homoarginine pathway in cardiovascular diseases“

09/2011 – 10/2011 Praktikum, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

03/2011 – 03/2011 Praktika, WESAMIN GmbH & Co. KG, Winsen

09/2010 – 10/2010 Tätigkeitsbereiche: Entwicklung und Produktion von ELISAs

09/2009 – 10/2009

09/2008 – 10/2008

Schulbildung und Studium

10/2014 – 09/2016 Aufbaustudium Molekularbiologie, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg

01/2014 Approbation als Apothekerin

07/2013 – 12/2013 Pharmaziepraktikum, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

01/2013 – 06/2013 Pharmaziepraktikum, Skarabäus-Apotheke, Kiel

09/2008 – 11/2012 Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

08/2005 – 06/2008 Kreisberufsschule Norderstedt, Berufliches Gymnasium, Schwerpunkt Ernährung
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

8.6. Veröffentlichungen

8.6.1. Publikationen

- Cordts, K.**, Grzybowski, R., Lezius, S., Lüneburg, N., Atzler, D., Neu, A., Hornig, S., Böger, R.H., Gerloff, C., Magnus, T., Thomalla, G., Schwedhelm, E., Grant, P.J., Choe, C.-U., 2018. Guanidino compound ratios are associated with stroke etiology, internal carotid artery stenosis and CHA2DS2-VASc score in three cross-sectional studies. *J. Neurol. Sci.* 397, 156–161.
- Loso, J., Lund, N., Avanesov, M., Muschol, N., Lezius, S., **Cordts, K.**, Schwedhelm, E., Patten, M., 2018. Serum Biomarkers of Endothelial Dysfunction in Fabry Associated Cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.* 5, 108.
- Baldassarri, F., Schwedhelm, E., Atzler, D., Böger, R.H., **Cordts, K.**, Haller, B., Pressler, A., Müller, S., Suchy, C., Wachter, R., Düngen, H.-D., Hasenfuss, G., Pieske, B., Halle, M., Edelmann, F., Duvinage, A., 2018. Relationship between exercise intervention and NO pathway in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Biomarkers* 23, 540-550.
- Schönhoff, M., Weineck, G., Hoppe, J., Hornig, S., **Cordts, K.**, Atzler, D., Gerloff, C., Böger, R., Neu, A., Schwedhelm, E., Choe, C.-U., 2018. Cognitive performance of 20 healthy humans supplemented with L-homoarginine for 4 weeks. *J. Clin. Neurosci.* 50, 237–241.
- Nilam, M., Gribbon, P., Reinshagen, J., **Cordts, K.**, Schwedhelm, E., Nau, W.M., Hennig, A., 2017. A Label-Free Continuous Fluorescence-Based Assay for Monitoring Ornithine Decarboxylase Activity with a Synthetic Putrescine Receptor. *SLAS Discov.* 22(7):906-914.
- Atzler, D., McAndrew, D.J., **Cordts, K.**, Schneider, J.E., Zervou, S., Schwedhelm, E., Neubauer, S., Lygate, C.A., 2017. Dietary Supplementation with Homoarginine Preserves Cardiac Function in a Murine Model of Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *Circulation* 135, 400–402.
- Wirth, J., Atzler, D., di Giuseppe, R., **Cordts, K.**, Menzel, J., Böger, R.H., Boeing, H., Weikert, C., Schwedhelm, E., 2017. Higher serum asymmetric dimethylarginine is related to higher risk of heart failure in the EPIC-Potsdam study. *Amino Acids* 49, 173–182.
- Atzler, D., Schönhoff, M., **Cordts, K.**, Ortland, I., Hoppe, J., Hummel, F.C., Gerloff, C., Jaehde, U., Jagodzinski, A., Böger, R.H., Choe, C.-U., Schwedhelm, E., 2016. Oral supplementation with L-homoarginine in young volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82, 1477–1485.
- Atzler, D., Cracowski, J.-L., **Cordts, K.**, Böger, R.H., Humbert, M., Schwedhelm, E., 2016. Homoarginine predicts mortality in treatment-naive patients with pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* 217, 12–15.
- Atzler, D., Baum, C., Ojeda, F., Keller, T., **Cordts, K.**, Schnabel, R.B., Choe, C., Lackner, K.J., Münzel, T., Böger, R.H., Blankenberg, S., Schwedhelm, E., Zeller, T., 2016. Low Homoarginine Levels in the Prognosis of Patients With Acute Chest Pain. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002565.
- Atzler, D., Appelbaum, S., **Cordts, K.**, Ojeda, F.M., Wild, P.S., Münzel, T., Blankenberg, S., Böger, R.H., Blettner, M., Beutel, M.E., Pfeiffer, N., Zeller, T., Lackner, K.J., Schwedhelm, E., 2016. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 54, 1231–1237.

- Cordts, K.**, Atzler, D., Qaderi, V., Sydow, K., Böger, R.H., Choe, C.-U., Schwedhelm, E., 2015. Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC-MS/MS and ELISA: a comparison and a biological application. *Amino Acids* 47, 2015–2022.
- Stockebrand, M., Hornig, S., Neu, A., Atzler, D., **Cordts, K.**, Böger, R.H., Isbrandt, D., Schwedhelm, E., Choe, C.-U., 2015. Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids* 47, 1921–1929.

8.6.2. Kongressbeiträge (Poster)

- Cordts K.**, Seelig D., Krämer E., Carrier L., Böger R.H., Schwedhelm E., Patten M. Association of asymmetric dimethylarginine and diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. ESC (European Society of Cardiology) Congress 2018; München, Deutschland; August 2018.
- Cordts K.**, Schönhoff M., Hoppe J., Ortland I., Hummel F.C., Gerloff C., Jaehde U., Jagodzinski A., Böger R.H., Atzler D., Choe C.-U., Schwedhelm E. Evaluation of kinetic and dynamic parameters of oral L-homoarginine supplementation in young volunteers. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG); München, Deutschland; Oktober, 2016.
- Cordts K.**, Manderscheid M., Choe C.-U., Zeller T., Heeren J., Böger R.H., Atzler D., Schwedhelm E. Development of atherosclerosis in AGAT/apoE deficient mice. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT); Berlin, Deutschland; Februar 2016.
- Cordts K.**, Manderscheid M., Choe C.-U., Zeller T., Böger R.H., Heeren J., Atzler D., Schwedhelm E. Impact of homoarginine on the development of atherosclerosis in AGAT/apoE deficient mice. Young-DZHK-Retreat (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung); Potsdam, Deutschland; September 2015.
- Cordts K.**, Choe C.-U., Qaderi V., Sydow K., Böger R.H., Atzler D., Schwedhelm E. Homoarginine concentrations in human and mouse plasma samples measured by LC-MS/MS and ELISA: a method comparison. 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins; Wien, Österreich; August 2015.
- Cordts K.**, Schwedhelm E., Atzler D. DZHK Shared Expertise Cardiometrics. Young-DZHK-Retreat (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung); Braunlage, Deutschland; September 2014.

9. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Edzard Schwedhelm für seine ausgezeichnete Betreuung, seine ständige Erreichbarkeit und die Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung meiner Projekte ließ. Ich danke ihm für die vielfältigen Projekte, die ich im Laufe der Zeit bearbeiten durfte, bei denen ich Erfahrungen in einem breiten Feld, thematisch und methodisch, sammeln konnte und zahlreiche Arbeitsgruppen und Kooperationspartner kennenlernen durfte. Ich danke ihm für seinen wissenschaftlichen Input, seine konstruktive Kritik, seine freundliche Art und die schöne Zeit, die ich in seiner Arbeitsgruppe verbracht habe.

Ich danke Prof. Dr. Elke Oetjen dafür, dass sie als meine Co-Betreuerin immer da war und ein offenes Ohr für mich hatte. Ich danke ihr für ihre guten Ratschläge und ihre konstruktive Kritik zu meiner Arbeit.

Prof. Dr. Elke Oetjen, PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich und Prof. Dr. Sebastian Wicha danke ich dafür, dass sie sich die Zeit genommen haben, Mitglieder meiner Prüfungskommission zu sein.

Ich danke unserem Institutsdirektor der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme in seinem Institut und seinen wissenschaftlichen Input.

Ich danke auch dem Institutsdirektor der Experimentellen Pharmakologie und Toxikologie Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Zusammenarbeit mit verschiedenen Arbeitsgruppen seines Institutes und die gemeinsame Nutzung von Räumlichkeiten und Geräten.

Allen Mitarbeitern der Klinischen und Experimentellen Pharmakologie und Toxikologie danke ich für ein tolles Arbeitsumfeld, in dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe und gerne zur Arbeit gekommen bin.

Mariola Kastner, Anna Steenpaß, Sabine Schröder und Annegret Ruge danke ich für die schönen Zeiten im Labor und dass sie mich mit ihrem großen Erfahrungsschatz bei meiner Arbeit angeleitet und unterstützt haben. Ich danke Dr. Eileen Moritz, Dr. Anika Laing und Dr. Antonia Glatzel für eine schöne gemeinsame Doktorandenzeit, in der wir zusammen gewachsen sind und immer zusammengehalten haben. Ich danke auch der gesamten AG Oetjen für ihre positive Art, mit der sie einen immer mitreißen und aufbauen konnten. Ein besonderer Dank gilt Simone Bremer für die tolle Zeit, die wir zusammen hatten und die ich wirklich sehr vermissen werde.

Ich danke PD Dr. Chi-un Choe, Ricarda Grzybowski, Vazhma Qaderi, PD Dr. Monica Patten, Doreen Seelig, PD Dr. Nicole Lüneburg, Dr. Dorothee Atzler, Susanne Lezius, Dr. Munif Haddad, PD Dr. Nele Friedrich, Prof. Dr. Dimitrios Tsikas und Erik Hanff für eine großartige Zusammenarbeit in verschiedenen Kooperationsprojekten. Der Wesamin GmbH & Co. KG und DLD Diagnostika GmbH danke ich für die fachliche und materielle Unterstützung meiner Arbeit. Ich danke dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung, welches mich und Teile meiner Projekte finanziert hat.

Meinem Mann Sven Flittiger, meinen Eltern Ingrid und Klaus Cordts, meiner Schwester Anna Lau, Matthias und Julia Lau, meinen Schwiegereltern Linda und Claus Flittiger, meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung, dass sie an mich glauben und immer für mich da sind. „Der Weg ist das Ziel“ (Konfuzius) und ich bin froh, dass wir den Weg gemeinsam gehen.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende, an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte, Dissertation mit dem Titel:

Vergleich analytischer Methoden zur quantitativen Bestimmung von Homoarginin und Untersuchung von Homoarginin als kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Risikomarker

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die Dissertation wurde unter der Betreuung durch Prof. Dr. Edzard Schwedhelm und Prof. Dr. Elke Oetjen im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, Dezember 2018

.....
Kathrin Cordts