

Aus der Medizinischen Klinik m. S.  
Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

ADMA und Homoarginin – Neue kardiovaskuläre Risikomarker und  
ihre Einflussgrößen in einer Hochrisikokohorte von AICD-Patienten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elli Mann

aus Dresden

Datum der Promotion:

01.03.2019

Meinen Eltern

<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>4</b>
<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	<b>6</b>
<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b>	<b>7</b>
<b><u>Abstract</u></b>	<b>8</b>
<b><u>Abstrakt</u></b>	<b>10</b>
<b><u>Einleitung</u></b>	<b>12</b>
Einführung und Herleitung der Aufgabenstellung	12
ADMA	14
Homoarginin	26
<b><u>Methodik</u></b>	<b>30</b>
Studiendesign	30
Studienablauf	30
Bestimmung der Biomarker im Plasma	32
Erfassung der klinischen Parameter	34
Statistische Auswertung	36
<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>39</b>
Deskriptive Statistik der Gesamtgruppe	39
Methodenvergleich der ADMA-Messungen	41
Auswertung der Messwerte für ADMA	43
Auswertung der Messwerte für Homoarginin	48
<b><u>Diskussion</u></b>	<b>56</b>
Einleitung in die Diskussion	56
Zusammenfassung der Ergebnisse	56
Studienpopulation	56
ADMA	57
Messmethodenvergleich ADMA	61
Homoarginin	62
Limitationen	68
Schlussfolgerung	68
<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>70</b>
<b><u>Eidesstattliche Versicherung</u></b>	<b>81</b>
<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>83</b>
<b><u>Publikationsliste</u></b>	<b>84</b>
<b><u>Danksagung</u></b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAR	Arginin/ADMA Quotient
ACS	akutes Koronarsyndrom
ADMA	N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -dimethyl-L-Arginin / asymmetrisches Dimethylarginin
AGAT	Arginin-Glycin-Aminotransferase
AICD	automatischer implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
ANOVA	Analysis of variance
AP	Angina pectoris
ASR	SDMA/ADMA-Quotient
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
CAT	kationische Aminosäuretransporter
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
DDAH	N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DM	Diabetes mellitus
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDFR	endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FMD	flussvermittelte Dilatation
GAMT	Guanidinoacetat-Methyltransferase
GC	Gaschromatographie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLM	Generalisiertes lineares Modell
HI	Herzinsuffizienz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hsCRP	hoch sensitives C-reaktives Protein
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IQR	Interquartilbereich

KHK	koronare Herzkrankheit
LC	Flüssigchromatographie
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
LVDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MACE	major adverse cardiovascular events
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MI	Myokardinfarkt
MPO	Myeloperoxidase
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethylarginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Superoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	perkutanen Koronarintervention
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung
SDMA	N <sup>G</sup> ,N <sup>G'</sup> -Dimethyl-L-Arginin / symmetrisches Dimethylarginin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Trp	Tryptophan
TMB	Tetramethylbenzidin

## Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1 - Biomarker</u>	<u>32</u>
<u>Tabelle 2 - klinische Parameter der Herzinsuffizienz der Probanden</u>	<u>35</u>
<u>Tabelle 3 - Nierenfunktionsparameter der Probanden</u>	<u>35</u>
<u>Tabelle 4 - ergänzende Daten der Probanden</u>	<u>36</u>
<u>Tabelle 5 - Zusammensetzung des Gesamtkollektivs</u>	<u>39</u>
<u>Tabelle 6 - Verteilung der Biomarker innerhalb der Gesamtgruppe</u>	<u>40</u>
<u>Tabelle 7 - Verteilung von EF und LVDD in der Gesamtgruppe</u>	<u>40</u>
<u>Tabelle 8 - Verteilung von Kreatinin-Konzentration und GFR in der Gesamtgruppe</u>	<u>41</u>
<u>Tabelle 9 - Korrelation von ADMA-HPLC nach Spearman (<math>\rho</math>) für das Gesamtkollektiv</u>	<u>44</u>
<u>Tabelle 10 - Mann-Whitney-Test für alle Faktoren mit einem Paarvergleich und Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehr als 2 Ausprägungen - für ADMA innerhalb des Gesamtkollektivs</u>	<u>45</u>
<u>Tabelle 11 - GLM für ADMA innerhalb der Gesamtkohorte</u>	<u>45</u>
<u>Tabelle 12 - Korrelation von ADMA mit allen Kovariaten nach Spearman (<math>\rho</math>) für Gruppe 2</u>	<u>47</u>
<u>Tabelle 13 - Kruskal-Wallis-Test für alle Variablen mit mehreren Kategorien - für ADMA innerhalb der Gruppe 2</u>	<u>48</u>
<u>Tabelle 14 - Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Kovariaten nach Spearman (<math>\rho</math>) für das Gesamtkollektiv</u>	<u>49</u>
<u>Tabelle 15 - Mann-Whitney-Test für alle Faktoren mit einem Paarvergleich und Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehr als 2 Ausprägungen - für Homoarginin innerhalb des Gesamtkollektivs</u>	<u>50</u>
<u>Tabelle 16 - GLM für Homoarginin innerhalb der Gesamtkohorte</u>	<u>51</u>
<u>Tabelle 17 - Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Variablen nach Spearman (<math>\rho</math>) für Gruppe 2</u>	<u>54</u>
<u>Tabelle 18 - Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehreren Kategorien mit Homoarginin innerhalb der Gruppe 2</u>	<u>55</u>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schema des Kreatin- und Homoarginin-Stoffwechsels	27
Abbildung 2 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs von ADMA mittels HPLC	42
Abbildung 3 - Bland-Altman-Diagramm für den Vergleich der Messmethoden von ADMA	42
Abbildung 4 - Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben	43
Abbildung 5 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs von ADMA und Kreatinin innerhalb der Gesamtkohorte	46
Abbildung 6 - Boxplots der ADMA-Konzentrationen innerhalb der EF-Kategorien für die Gesamtkohorte	46
Abbildung 7 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Zonulin innerhalb der Gesamtkohorte	51
Abbildung 8 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Tryptophan innerhalb der Gesamtkohorte	52
Abbildung 9 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Body Mass Index innerhalb der Gesamtkohorte	52
Abbildung 10 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Körpergewicht innerhalb der Gesamtkohorte	53
Abbildung 11 - Graphische Boxplots der Homarginin-Konzentrationen innerhalb der Gruppen mit einem hsCRP-Wert kleiner und größer 10 für die Gesamtkohorte	53

.

## Abstract

**Background:** Both asymmetric dimethylarginine (ADMA) and homoarginine (hArg) are known to have impact on nitric oxide (NO) metabolism. hArg seems to increase NO availability thereby enhancing endothelial function. ADMA, in turn, is known to be an endogenous inhibitor of NO synthase (NOS) and therefore impairs endothelial function. In addition, hArg seems to be connected to energy metabolism since the key enzyme L-arginin:glycin amidinotransferase (AGAT) for hArg synthesis in the kidneys is also involved in the synthesis of energy metabolites like guanidinoacetate. Former studies indicate that low levels of hArg and raised concentrations of ADMA are linked to cardiovascular disease indicating increased all-cause mortality.

**Aims and Methods:** This study investigated the dependence of plasma hArg and ADMA on various biochemical and clinical factors in 229 patients carrying an automatic implantable cardioverters/defibrillators (AICD), using multiple linear regression analysis (Generalized Linear Model- GLM). Mean age of the subject group was  $67,3 \pm 11,7$ y, 80% were male, 76% were suffering from systolic heart failure (EF below 50%), 66% were suffering from coronary artery disease and 26% were suffering from type 2 diabetes mellitus. All biochemical parameters were measured by ELISA or HPLC, whereas ADMA was determined by both methods aiming to compare them.

**Results:** GLM revealed a highly significant positive association between hArg and zonulin ( $p < 0.000$ ). hArg was also positively correlated with tryptophan ( $p = 0.004$ ), BMI ( $p = 0.02$ ) and bodyweight ( $p = 0.02$ ). Patients with hsCRP above 10 mg/l had significant lower hArg concentrations. In GLM, ADMA was positively associated with kreatinin ( $p = 0.019$ ), while patients with an EF below 25 % had significant higher ADMA levels than patients with an EF between 50-25% ( $p = 0.024$ ). Comparison of ADMA levels between ELISA and HPLC showed poor correlation of both methods.

**Conclusion:** The highly significant positive association of hArg with zonulin is a novel finding which may indicate a different meaning of circulating versus local (gut) zonulin. Further investigation is needed to explore this association. The positive correlation of hArg and Trp also deserves further research because both amino acids might have a protective effect on cardiovascular disease by inhibition of the enzyme alkaline phosphatase. Eventually, our study associates low hArg concentrations with chronic low-grade inflammation and parameters of malnutrition in cardiovascular high-risk patients. Also, this study confirmed ADMA being elevated in patients with systolic heart failure. Its measurement through HPLC seems more



reliable since ELISA might provide imprecise results due to crossreactivity with other monomethylarginines.

## Abstrakt

**Einleitung:** Sowohl asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) als auch Homoarginin (hArg) haben Einfluss auf den Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsel. HArg scheint die Verfügbarkeit von NO zu erhöhen und wirkt so protektiv auf das Endothel, während AMDA als Inhibitor der NO-Synthase (NOS) fungiert und so die endotheliale Funktion beeinträchtigt. Außerdem scheint hArg Einfluss auf den Energiestoffwechsel zu haben. Das Schlüsselenzym der hArg-Synthese in der Niere, die Arginin-Glycin-Aminotransferase (AGAT), ist auch in die Synthese von Produkten des Energiestoffwechsels, wie Guanidinoacetat, involviert. Laut bisherigen Studien gehen verminderte hArg-Spiegel und erhöhte Konzentrationen an ADMA mit einem größeren kardiovaskulären Risiko und einer erhöhten Gesamtsterblichkeit einher.

**Ziel der Studie und Methodik:** Ziel dieser Studie ist es, die Abhängigkeit von ADMA und hArg von verschiedenen klinischen und biochemischen Faktoren mittels multipler linearer Regressionsanalyse (Generalisiertes lineares Modell – GLM) in einer Gruppe von 229 Patienten, die alle einen automatischen implantierbaren Kardioverter-Defibrillator (AICD) trugen, zu untersuchen. Das mittlere Alter der Kohorte lag bei  $67,3 \pm 11,7$  a, davon waren 80% Männer, 76% hatten eine Herzinsuffizienz ( $EF < 50\%$ ), 66% litten an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und 26% waren an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt. Alle biochemischen Parameter wurden mittels ELISA oder HPLC gemessen. ADMA wurde vergleichend mittels beider Methoden gemessen.

**Ergebnisse:** Die GLM bestätigte eine unabhängige hochsignifikante positive Korrelation zwischen hArg und Zonulin ( $p < 0,001$ ). HArg korrelierte außerdem positiv mit Tryptophan ( $p = 0,004$ ), BMI ( $p = 0,02$ ) und Körpergewicht ( $p = 0,02$ ). Patienten mit hsCRP-Werten unter  $10 \text{ mg/l}$  hatten signifikant niedrigere hArg-Spiegel. In der GLM zu ADMA zeigte sich eine positive Korrelation von ADMA mit dem Kreatininwert ( $p = 0,019$ ). Patienten mit einer EF unter 25% hatten signifikant höhere ADMA-Spiegel als Patienten mit einer EF zwischen 50 und 25% ( $p = 0,024$ ). Im zusätzlich durchgeführten Methodenvergleich zwischen ELISA und HPLC zeigte sich eine schlechte Korrelation der erhobenen ADMA-Konzentrationen.

**Schlussfolgerung:** Der hoch signifikante positive Zusammenhang zwischen hArg und Zonulin ist eine neuer Befund, der unterschiedliche Bedeutungen von zirkulierendem und lokalem (intestinalem) Zonulin impliziert. Eine weitere Erforschung dieses Zusammenhangs ist notwendig. Auch der positive Zusammenhang zwischen Tryptophan und hArg sollte weiter untersucht werden, beide könnten protektive Effekte auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben, indem sie die Alkalische Phosphatase hemmen. Außerdem konnte diese Studie niedrige hArg-

Spiegel mit Parametern der chronischen Inflammation und Mangelernährung bei Patienten einer kardiovaskulären Hochrisikokohorte in Verbindung bringen. Zudem konnte eine Erhöhung der ADMA-Konzentration bei Probanden mit Herzinsuffizienz bestätigt werden. Bei der ADMA-Messung schien die HPLC-Messung verlässlichere Daten zu liefern, während die Ergebnisse der ELISA-Messung durch die Kreuzreaktivität des Kits mit anderen Monomethylargininen beeinflusst worden sein könnten.

## Einleitung

### **Einführung und Herleitung der Aufgabenstellung**

In den letzten Jahrzehnten verzeichnete die Forschung große Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. Allerdings stellen Erkrankungen des Herz- und Gefäßsystems laut der europäischen Gesellschaft für Kardiologie weiterhin die Haupttodesursache in Europa und der Welt dar. Derzeit versterben in Europa über 4 Millionen Menschen im Jahr an einer kardiovaskulären Erkrankung (1). Im engeren Sinne zählen zu den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die koronare Herzkrankheit (KHK) und zerebrovaskuläre Erkrankungen. Bei diesen Krankheitsbildern führt eine Verengung der Arterien durch Atherosklerose zu einer Minderversorgung des Herzens, des Gehirns oder der Peripherie. Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Gefäße, die das gesamte arterielle System betrifft und eine entzündliche Veränderung dessen darstellt (2). Als frühes Anzeichen für die Entstehung der Atherosklerose wird die endotheliale Dysfunktion angesehen, ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoff-Spezies (3). Sowohl die endotheliale Dysfunktion in den Koronararterien als auch der Grad des oxidativen Stresses im Gefäßgewebe gelten als Prädiktor für kardiovaskuläre Komplikationen (4). Etablierte Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind bisher das Alter, das Übergewicht, der Bluthochdruck, ein chronischer erhöhter Blutzuckerspiegel, meist durch die Erkrankung an Diabetes mellitus verursacht, der Nikotinabusus und die Hypercholesterinämie. Neben präventiven Maßnahmen besteht die pharmakologische Therapie vor allem aus der Gabe von Antihypertensiva, Statinen und Antidiabetika. Um neue Therapieansätze zu entwickeln, ist die Erforschung der den kardiovaskulären Erkrankungen zugrundeliegenden Stoffwechselwegen und Mechanismen auf molekularer Ebene unabdingbar. Damit einher geht auch die Identifikation und Charakterisierung neuer Risikomarker auf diesem Gebiet, um eine Optimierung von Diagnostik und Therapie zu erreichen. Zu den häufig im klinischen Alltag verwendeten laborchemischen Risikomarkern zählen bisher unter anderem das NT-proBNP (N-terminales pro brain natriuretic peptide), das kardiale Troponin und das C-reaktive Protein (CRP). Viele weitere Risikomarker sind oder werden derzeit erforscht, dabei fokussiert sich diese Arbeit vor allem auf die Aminosäure Homoarginin und ein Aminosäurederivat, das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA). In den letzten Jahren haben eine Vielzahl an Studien niedrige Homoarginin-Spiegel als Risikomarker für kardiovaskuläre und renale Erkrankungen sowie für

die Mortalität identifiziert (5, 6). Diese Erkenntnisse und der Einfluss von Homoarginin auf den Stickstoff- und Energiestoffwechsel führen zu einem großen Interesse an Homoarginin als Risikomarker (7). Im Kontrast dazu gelten erhöhte ADMA-Spiegel als kardiovaskulärer Risikomarker (8). Beide Moleküle scheinen Einfluss auf den Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsel über die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) zu haben. Die zugrunde liegende Pathophysiologie von Homoarginin ist allerdings weitestgehend unbekannt, während auch der inhibitorische Einfluss von ADMA auf die NOS nicht der einzige Mechanismus zu sein scheint, über den es das kardiovaskuläre Risiko beim Menschen beeinflusst (9). Der Vorläufer beider Stoffe ist Arginin. Dennoch scheinen ADMA und Homoarginin antagonistische Effekte im Herz-Kreislaufsystem auszuüben. Im Allgemeinen werden erhöhte Konzentrationen an ADMA und verminderte Konzentrationen an Homoarginin als kardiovaskuläre Risikofaktoren angesehen (9). Die vorliegende Studie zielt darauf ab, die Zusammenhänge von Homoarginin und ADMA mit anderen Parametern innerhalb einer kardiovaskulären Hochrisikogruppe, die ausschließlich aus Trägern eines automatischen implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (AICD) besteht, zu untersuchen. Dabei werden im Einzelnen die Zusammenhänge von ADMA und Homoarginin mit Plasmabiomarkern des oxidativen Stresses und der endothelialen Dysfunktion sowie mit laborchemischen und klinischen Parametern der renalen und kardialen Dysfunktion mittels multipler linearer Regressionsanalyse (Generalisiertes lineares Modell – GLM) untersucht. Auf der Basis der sich ergebenden Zusammenhänge können dann Rückschlüsse auf die Pathophysiologie gezogen, Ansätze für neue Stoffwechselwege entwickelt und Impulse für weitere Studien auf diesem Gebiet gegeben werden.

## **ADMA**

### **Entdeckung und Geschichte**

Das Asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) wurde im Jahr 1970 entdeckt (10). Kakimoto und Akazawa isolierten damals mittels Ionenaustauschchromatographie verschiedene Derivate der Aminosäuren aus dem menschlichen Urin. Anschließend identifizierten sie NG,NG'-Dimethyl-L-Arginin (SDMA) und NG,NG-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und beschrieben das Vorkommen dieser Substanzen beim Menschen zum ersten Mal in der Literatur. Sie dokumentierten konstante Konzentrationen beider Stoffe im Urin von 13 Probanden. Die Konzentrationen waren von der Ernährung unabhängig und höher als die von Arginin. So gingen sie davon aus, dass beide Moleküle endogen im Körper gebildet werden. Anschließend konnte das Vorkommen von Dimethylarginin auch im Gehirn und in der Leber von Ratten nachgewiesen werden (11). Später konnten NG-Dimethylarginine mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auch im menschlichen Plasma bestimmt werden (12). Im Jahr 1992 beschrieben Vallance et al. erstmals die potentielle pathophysiologische Rolle von ADMA. Sie wiesen die Hemmung der Stickstoffmonoxid Synthase (NOS) durch ADMA in vivo und in vitro nach. Außerdem dokumentierten sie eine Anhäufung von Methylargininen im Plasma von Patienten mit terminalem Nierenversagen. Und sie spekulierten erstmals über erhöhte ADMA-Spiegel als Ursache für Hypertension und Immundefizienz bei Patienten mit chronischem Nierenversagen (13). Seitdem wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, in denen die Rolle von ADMA untersucht wird - es hat sich zu einem vielversprechenden Risikomarker auf dem Gebiet der kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt (14).

### **Funktion und Bedeutung**

ADMA hemmt alle drei Iso-Enzyme der NOS (15) und damit die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin. NO erhält die Homöostase der Gefäße aufrecht, indem es eine Relaxation der Gefäßmuskulatur auslöst und so zur Vasodilatation führt, die Adhäsion von Zellen an das Endothel hemmt, die Plättchenaggregation inhibiert und antiproliferative Eigenschaften hat (16). Die veränderte Biosynthese von NO durch ADMA beeinflusst die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen. So wurden erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Herz- und Gefäßsystems gefunden, unter

anderem bei der Herzinsuffizienz (17), der Myokardhypertrophie (18), der koronaren Herzkrankheit (19) und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (20). Außerdem wurde eine Erhöhung der ADMA-Spiegel bei Patienten mit traditionellen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen nachgewiesen, darunter Rauchen (21), Hypertonie (22), Diabetes mellitus Typ 2 (23) und Hypercholesterinämie (24). Verschiedene Studien haben inzwischen die prädiktive Rolle von ADMA für unerwünschte kardiovaskuläre Komplikationen und die Mortalität von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen nachgewiesen (8).

## **Methylarginine**

### **Definition und Funktion**

Methylarginine entstehen durch die posttranslationale Methylierung von Argininresten in Proteinen. Sie werden bei der Hydrolyse von Proteinen freigesetzt und sind ein Produkt des Proteinstoffwechsels. Die Methylierung der Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin ist eine spezifische Form der posttranslationalen Modifikation, die von den Zellen genutzt wird, um die funktionelle Vielfalt ihres Proteoms zu erweitern (25). Viele dieser modifizierten Proteine interagieren mit den Nukleinsäuren der Zelle und sind an verschiedenen intrazellulären Prozessen beteiligt. Zu diesen Prozessen zählen das Spleißen der mRNA, die Transkription, die Proteintranslation und die Signaltransduktion in den Zellen. Die exakte Funktion der Methylierung von Arginin ist unbekannt. Allerdings ist dieser Prozess in die Regulation der RNA-Bindung, der Transkription, der DNA-Reparation, der Proteinlokalisierung, der Interaktion zwischen Proteinen, der Signaltransduktion, dem Recycling und der Desensibilisierung von Rezeptoren in der Zelle involviert (26).

Aus gebundenem Arginin entsteht durch das Anhängen einer Methylgruppe ein Monomethylarginin. Dieses kann durch Anhängen einer weiteren Methylgruppe zu einem Dimethylarginin umgewandelt werden. Von den Dimethylargininen existieren zwei verschiedenen Isoformen im Körper, ADMA und SDMA.

### **Stoffwechsel**

#### ***Synthese***

Methylarginine werden durch die posttranslationale Methylierung von Argininresten, die an Proteine gebunden vorliegen, gebildet. Es liegen keine Hinweise vor, dass diese Verbindungen

auch aus freiem Arginin gebildet werden können. Vor allem Arginine der Arginin-Glycinreichen Proteinsequenzen werden modifiziert (27). Bei der Synthese der Methylarginine wird die Guanidingruppe des Arginins durch ein Enzym, die Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT), methyliert. Es existieren zwei verschiedene Formen der PRMT (27). Beide Formen katalysieren die Einfachmethylierung von Arginin zu N<sup>G</sup>-Monomethylarginin (NMMA). Das Anfügen der zweiten Methylgruppe durch PRMT Typ 1 oder 2 führt allerdings zu unterschiedlichen Produkten. So wird ADMA durch die PRMT Typ 1 und SDMA durch die PRMT Typ 2 gebildet. Die PRMT nutzt S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor bei der Synthese. SAM wird aus Adenosintriphosphat und Methionin gebildet. Nach der Abgabe der Methylgruppe entsteht aus dem SAM das S-Adenosylhomocystein (SAH). SAH wird entweder zu Homocystein abgebaut oder mittels erneuter Methylierung zu Methionin umgebaut. Es wurde gezeigt, dass die Synthese von ADMA in endothelialen Zellen durch Inkubation mit SAH gehemmt werden kann (28). Erst nach der Proteolyse von Proteinen, die Methylarginine enthalten, werden diese freigesetzt und liegen ungebunden im Plasma der Zelle vor. Nur ungebunden sind ADMA und NMMA in der Lage die NOS zu hemmen.

Die intrazelluläre Bildung von freiem ADMA hängt somit einerseits von der Aktivität der PRMT ab und wird andererseits durch den Proteinumsatz in der Zelle bestimmt. In einer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Synthese von ADMA und dem erhöhten Grad der Expression der PRMT durch erhöhte LDL (Lipoprotein niedriger Dichte)-Spiegel im Blut nachgewiesen werden (28). Im kardiovaskulären System kommt die PRMT Typ 1 im Herzen, in glatten Muskelzellen und in Endothelzellen vor. Das Genexpressionsmuster ist noch nicht im Detail bekannt, aber alle Formen der PRMT Typ 1 liegen in Zellen von Gefäßen vor (26). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in Folge von einer erhöhten Scherbeanspruchung die Expression der PRMT Typ 1 von Endothelzellen hochreguliert wird (29). Die posttranslationale Methylierung von Proteinen ist im Gegensatz zur Phosphorylierung nicht reversibel, daher müssen methylierte Proteine vollständig abgebaut werden, um erneut als Aminosäurebausteine für die Proteinsynthese zur Verfügung zu stehen (25).

### **Transport**

Der größte Teil des ADMA wird im Zytosol der gleichen Zelle abgebaut, in der es entstanden ist. Dennoch kann es die Zelle verlassen und gelangt so in die Blutbahn. Der Transport von Aminosäuren durch die Zellmembran erfolgt mittels spezieller Transportsysteme. Es existieren zwei verschiedene Systeme: das y<sup>+</sup>- und das y<sup>+</sup>L-System. Das y<sup>+</sup>-System gehört zur Familie der kationischen Aminosäuretransporter (CAT), während das y<sup>+</sup>L-System sowohl neutrale als auch



kationische Aminosäuren transportiert (30). Diese Systeme regulieren den Transport der Aminosäuren in beide Richtungen und sind daher für die Proteinsynthese, die Biosynthese der Polyamine, die NO-Produktion und den Aminosäureaustausch zwischen den Organen notwendig. Der Transport von Arginin erfolgt mittels beider Systeme und ist essentiell für die NO Synthese in den Endothelzellen (31). Das  $\gamma^+$  System ist in der Lage, ADMA und SDMA durch die Zellmembran zu transportieren (32). Veränderungen in der Expression der CAT haben daher nicht nur Einfluss auf den Austausch und die zelluläre Aufnahme von Arginin, sondern beeinflussen auch den Transport von SDMA und ADMA. Der CAT und die endotheliale NOS (eNOS) liegen benachbart in den Kaveolen der Zellmembran von Endothelzellen vor, sodass Arginin direkt nach Aufnahme in die Zelle als Substrat für die eNOS zur Verfügung steht (33). Da ADMA den gleichen Transporter nutzt, hat auch dies direkten Zugang zur eNOS nach seiner Aufnahme in die Zelle. Eine veränderte Expression der CAT wurde bei verschiedenen klinische Zuständen einschließlich der chronischen Herz - und Niereninsuffizienz beobachtet (34).

### ***Abbau und Ausscheidung***

Am Anfang ging man davon aus, dass ADMA allein über die Niere ausgeschieden wird. Allerdings war die Ausscheidung von SDMA im Urin von Tieren 30 mal höher als die von ADMA und NNMA, sodass nach anderen Stoffwechselwegen für die Elimination gesucht wurde (35). Später wurde erstmals das Enzym  $N^G, N^G$ -Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) aus der Niere von Ratten isoliert und seine metabolische Rolle untersucht (36). Es wurde nachgewiesen, dass der Großteil von ADMA durch die DDAH zu Citrullin und Dimethylamin abgebaut wird, während SDMA kein Substrat der DDAH ist und komplett über die Niere ausgeschieden wird (25).

Zirka 80 Prozent des ADMA werden mittels der DDAH abgebaut (37). Vor allem die Niere und die Leber sind wichtige Organe, in denen ADMA abgebaut wird. Dabei ist die fraktionelle ADMA-Aufnahme der Niere etwas höher als die der Leber (25). Allerdings ist die Durchflussrate der Leber höher als die der Niere, sodass die Leber insgesamt einen höheren Anteil des ADMA metabolisiert (25). Die potentielle Rolle der Leber im ADMA-Stoffwechsel wurde erstmals von Carnegie et al. beschrieben, sie dokumentierten eine erhöhte Urinexkretion von ADMA bei Patienten mit Leberleiden (38). Die Aktivität der DDAH spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären ADMA-Stoffwechsels. Da weder zu hohe noch zu niedrige Plasmaspiegel von ADMA in der Zelle vorliegen sollten, wird die Konzentration eng durch die DDAH reguliert. Die DDAH hat eine relativ hohe Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ )

von 180  $\mu\text{mol/l}$  für ADMA (36). So wird sichergestellt, dass DDAH unter normalen Bedingungen im linearen Bereich der Substrat-Geschwindigkeitskurve arbeitet und der Abbau von ADMA annähernd proportional zu seiner Ausgangskonzentration erfolgt. Ein vermehrter Anfall von ADMA bewirkt eine Zunahme der DDAH-Aktivität, so wird unter normalen Bedingungen eine Akkumulation von ADMA in der Zelle vermieden.

## **Pathophysiologie – ADMA und kardiovaskuläre Erkrankungen**

### **Die Rolle von Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid ist einer der wichtigsten Mediatoren im kardiovaskulären System.

Furchgott und Zawadzki erforschten es ursprünglich unter dem Namen EDNR „endothelium derived relaxing factor“ und zeigten 1980, dass Acetylcholin nur in Anwesenheit von endothelialen Zellen eine Relaxation in der aus Ratten isolierten Aorta auslöst (39). EDNR ist der Mediator dieser Reaktion und wurde später als NO identifiziert, woraufhin Furchgott einen Nobelpreis für Medizin erhielt. NO ist ein lösliches Gas und wird im Endothel aus L-Arginin mittels der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) gebildet (40). Dieses Enzym hat drei Isoformen: die neuronale, endotheliale und induzierbare NOS (41). NO wandert ins Blut und wird dort an Hämoglobin gebunden, zu Nitrat oxidiert und über den Urin ausgeschieden. Außerdem dringt es in die glatten Muskelzellen der Gefäße ein und aktiviert dort die Guanylatzyklase. Dies führt zu einer Ansammlung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), das als Second Messenger an verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt ist, vor allem an der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Die Relaxation der Gefäßmuskulatur kann durch verschiedene Prozesse ausgelöst werden: Hemmung des Kalziumeinstroms in die Zelle durch cGMP, Aktivierung von Kaliumkanälen und folgende Hyperpolarisation der Zelle, sowie Stimulation der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase durch cGMP-abhängige Kinasen. Neben seiner Rolle als Vasodilatator hat NO noch andere wichtige Funktionen, die die Funktionalität der Gefäße gewährleisten. Es hat antithrombotische Eigenschaften, indem es die Plättchenaggregation und -adhäsion inhibiert, außerdem hemmt es Wachstumsfaktoren, die von Thrombozyten und dem Endothel ausgeschüttet werden (42). NO hat antiproliferative Eigenschaften, indem es Matrix-Metalloproteasen hemmt und so zu einer verminderten Proliferation bzw. Remodelling von Muskelzellen der Gefäße führt (43). Somit gilt NO als vasoprotektive Substanz, indem es die Media in einem ruhigen, relaxierten Zustand hält und der Adhäsion und Infiltration von im Blut

zirkulierenden Zellen vorbeugt. NO verzögert außerdem die Entstehung von Arteriosklerose in Versuchsmodellen (41). Bei vielen kardiovaskulären Krankheiten ist die endotheliale Dysfunktion mit der Störung der Stickstoffmonoxid-Synthese verbunden.

### **Der Einfluss von Dimethylargininen auf den NO-Stoffwechsel**

ADMA und NMMA sind kompetitive Inhibitoren aller NOS-Isoformen und beeinflussen die Synthese von NO, vor allem im kardiovaskulärem System (40). SDMA ist kein Inhibitor der NOS (13). NNMA wurde schon vor der Entdeckung von ADMA genutzt, um die Funktionen von NO zu erforschen (41). Es war bereits bekannt, dass NMMA eine Vasokonstriktion auslöst und damit zu Hypertension, erhöhter Plättchenaktivität und verstärkter Artherogenese führt. Erst als Vallance et al. 1992 eine ähnliche physiologische Rolle von ADMA nachwies, fokussierte sich die Forschung auf ADMA, da dies um ein Vielfaches höher im Plasma konzentriert ist (14). ADMA hemmt die NOS konzentrationsabhängig. In einer Tierstudie wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) von  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$  für ADMA bezüglich der NO Produktion bestimmt (44). ADMA könnte über die Hemmung der NO-Produktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulärer Erkrankungen spielen.

### **Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress scheint nicht nur zu einer endothelialen Dysfunktion zu führen, sondern bestimmt auch die Prognose von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren (45). Der Stoffwechsel von NO wird durch oxidativen Stress gestört. Er führt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO und stört damit die Funktionen des Endothels. Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies, Superoxiden, führt zu einer verminderten endothel-vermittelten Gefäßdilatation durch NO in isolierten Arterien (46). Neben NO spielt auch ADMA eine Rolle in der Pathophysiologie des oxidativen Stresses. Es wurden in verschiedenen Studien untersucht ob ADMA oxidativen Stress verursacht oder davon beeinflusst wird. Dabei zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen ADMA und oxidativem Stress (47). Die PMRT und DDAH können mittels Oxidation inaktiviert werden, dies führt zu einer erhöhten ADMA-Produktion und vermindertem ADMA-Abbau. Außerdem kann ADMA durch Entkopplung der endothelialen

NOS zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen. Durch die Entkopplung der NOS werden Elektronen auf Sauerstoff statt auf Arginin übertragen, was zur Bildung von Superoxid führt. Eine Studie zeigte, dass ADMA die Produktion von Superoxid erhöht, wahrscheinlich aktiviert ADMA das Renin-Angiotensin-System und dabei gebildetes Angiotensin II stimuliert die NADPH-Oxidase, dies führt zur Bildung von Superoxid ( $O_2^{2-}$ ) (48). Antoniades et al. dokumentierten erstmals eine Korrelation von erhöhten ADMA-Spiegeln mit einer erhöhten  $O_2^{2-}$ -Produktion und einer verminderten NO-Verfügbarkeit in den Gefäßen von Probanden mit Arteriosklerose (49). Dabei konnte allerdings keine Verbindung von ADMA zum Angiotensin II-NADPH-Weg festgestellt werden. Eine Studie an Endothelzellen der Vena umbilicalis zeigte stattdessen, dass bei der Entstehung von oxidativem Stress der CAT und die eNOS involviert sind anstelle des Angiotensin II- NADPH Systems (50).

### **Endotheliale Dysfunktion**

Das Endothel moduliert die vaskuläre Reaktion auf hämodynamische Kräfte, humorale Stimulation und neuronale Aktivierung. Die strömungsabhängige Dilatation in Gefäßen wird durch das Endothel vermittelt. Durch die Traktionskraft des Blutflusses kommt es zur Hyperpolarisation des Endothels und einer Ausschüttung von vasodilatativ wirkenden Substanzen. Die dadurch ausgelöste Relaxation der darunter liegenden glatten Gefäßmuskulatur wirkt Scherkräften entgegen. Außerdem reguliert das Endothel die Antwort auf humorale, neuronale und parakrine Transmitter. Es besitzt unter anderem Rezeptoren für Noradrenalin, Serotonin, Endothelin und Vasopressin, ebenso wie die glatte Muskulatur (51). Die Stimulation der glatten Muskulatur durch diese Transmitter führt generell zu einer Vasokonstriktion, während das Endothel in der Regel bei Stimulation vasodilatatorische Stoffe (z.B. NO) ausschüttet. Wenn das Endothel also gesund ist, überwiegt seine senkende Wirkung auf den Gefäßtonus. Ist es aber beschädigt, überwiegt die vasokonstriktorische Wirkung dieser Stimulantien. Außerdem wirkt das intakte Endothel wie eine Teflonbeschichtung, die die Adhäsion von Immunzellen verhindert, unter anderem durch die Aktivität von NO (51). Die Abnahme der NO-Aktivität, die durch eine Erhöhung der ADMA Spiegel bedingt sein kann, führt zu einer Fehlfunktion des Endothels. In einer Studie an jungen gesunden Finnen wurde eine verminderte flussvermittelte Dilatation (FMD) der Arteria brachialis bei Probanden mit erhöhten

ADMA-Konzentrationen nachgewiesen (52). Dies zeigt, dass ADMA mit der endothelialen Dysfunktion assoziiert ist. Außerdem konnte in einer Folgestudie der prädiktive Wert von ADMA für die FMD in der gleichen Kohorte nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine verminderte FMD bei Probanden mit erhöhten ADMA-Plasmaspiegeln, die sechs Jahre zuvor gemessen wurden (53). Außerdem wurde eine durch ADMA vermittelte endotheliale Dysfunktion auch an bereits erkrankten Probanden mit Atherosklerose nachgewiesen, wobei vermutet wird, dass erhöhte ADMA-Spiegel mit der vorliegenden geringfügigen Entzündung in Verbindung stehen (54).

## **ADMA und traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren**

### **Hypertension**

Die Hypertension ist einer der Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Der Zusammenhang zwischen ADMA und Hypertonie hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit als Risikomarker und als Prädiktor für kardiovaskuläre Komplikationen wurde in vielen Studien untersucht. In einer Studie an spontan hypertensiven Ratten wurden die Konzentrationen von L-Arginin, ADMA und SDMA bei Tieren verschiedenen Alters untersucht. Dabei waren die vier Wochen alten Ratten prähypertensiv, die 12-wöchigen hypertensiv und die 24 Wochen alten Ratten hatten bereits Endorganschäden durch Hypertension. Es wurde der Arginin/ADMA Quotient (AAR) genutzt, um die NO-Verfügbarkeit zu repräsentieren, und der SDMA/ADMA Quotient (ASR), um die Aktivität der DDAH einzuschätzen. Dabei zeigten sich schon bei den 4-wöchigen spontan hypertensiven Ratten erhöhte ADMA-Spiegel in Plasma und Niere und der AAR in Niere und Plasma erniedrigt im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren mit normalem Blutdruck. Auch bei den 24-wöchigen spontan hypertensiven Ratten wurden erhöhte ADMA-Konzentrationen im Plasma und ein erniedrigter AAR im Plasma festgestellt. Außerdem wurden erniedrigte Nitratwerte im Urin der älteren Tiere mit Hypertension festgestellt. Diese Studie zeigt eine Verbindung zwischen der verminderten Bioaktivität von NO, erhöhten ADMA-Werten und der Entwicklung von Bluthochdruck und Endorganschäden (55). Außerdem konnte in einer Studie an Probanden mit essentieller Hypertonie gezeigt werden, dass die Konzentration von ADMA im Plasma mit dem Grad der Hypertonie ansteigt und mit den systolischen Blutdruckwerten positiv korreliert (56). In einer weiteren Studie an Probanden mit essentieller

Hypertonie korrelierten erhöhte ADMA-Werte mit einer verminderten GFR und mit einer verminderten Flussgeschwindigkeit in den koronaren Reservegefäßen. So wird vermutet, dass ADMA ein Frühmarker für mikrovaskuläre Schäden in Herz und Niere bei Patienten mit Hypertonie ist und eine Rolle bei deren Entstehung spielen könnte (57). In einer weiteren Studie an Probanden mit essentieller Hypertonie konnte gezeigt werden, dass höhere ADMA-Konzentrationen bei unbehandelten Probanden vorlagen und der durch Acetylcholin induzierte Blutfluss im Unterarm dieser Gruppe geringer war. So scheinen ADMA-Spiegel mit dem Grad der endothelialen Schädigung bei hypertensiven Probanden zusammen zu hängen (58). ADMA korreliert außerdem mit der Linksventrikulären Hypertrophie bei Patienten mit Hypertension und stellt einen unabhängigen Risikofaktor dafür dar (18, 59). Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen ADMA und Hypertension könnten folgendermaßen erklärt werden. Einerseits kann das Vorliegen erhöhter Scherkräfte auf die Gefäßwände bei Hypertension zu einer erhöhten ADMA-Produktion führen, andererseits kommt es durch oxidativen Stress zu einer verminderten DDAH-Aktivität, was ebenfalls zu erhöhten ADMA Konzentrationen im Organismus führt (45).

### **Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und die endotheliale Dysfunktion ist einer der Frühfolgen dieser Krankheit. Die Beziehung zwischen Diabetes mellitus und ADMA wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht. Eine große Rolle scheint der durch erhöhte Glucose-Spiegel ausgelöste oxidative Stress zu spielen, da er die DDAH-Aktivität senkt und so Einfluss auf die ADMA-Konzentration nimmt (60). Außerdem korreliert ADMA mit der Insulinresistenz und Medikamente wie Rosiglitazone, die die Insulinsensitivität steigern, können den ADMA-Spiegel senken (61). Erhöhte ADMA-Werte korrelieren mit der diabetischen Makro- und Mikroangiopathie sowie nicht-therapierter Hyperglykämie und sind ein erstes Anzeichen für das Vorliegen einer Gefäßdysfunktion und Insulinresistenz (62). In einer Studie an Probanden mit DMT2 waren erhöhte ADMA-Werte mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen verbunden (63). Dies zeigt den prädiktiven Wert von ADMA bei Patienten mit DMT2 für kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine japanische Studie bestätigte, dass erhöhte ADMA-Werte bei DMT2-Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden sind und mit den Risikomarkern für Artherosklerose korrelieren (64). Insgesamt scheint ADMA ein wichtiger Risikomarker für kardiovaskuläre

Erkrankungen bei Patienten mit Diabetes mellitus zu sein. Allerdings konnte in der Framingham Offspring Studie innerhalb der DMT2- Probandengruppe kein prognostischer Wert von ADMA nachgewiesen werden, während ADMA in der DMT2-freien Kohorte als ein Prädiktor für die Gesamtmortalität galt (8). Auch in einer Studie an Probanden mit KHK konnte der prognostische Wert von ADMA als Marker für die Gesamtmortalität und kardiovaskuläre Komplikationen nachgewiesen werden, dies traf aber in der Gruppe der DMT2-Patienten nicht zu (65).

## **ADMA und kardiovaskuläre Krankheiten**

### **Koronare Herzkrankheit**

Der Wert von ADMA als Risikofaktor für die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist sehr gut untersucht. Die erste prospektive Studie, in der die Rolle von ADMA als kardiovaskulärer Risikomarker untersucht wird, wurde von Zocalli et al. veröffentlicht. Sie zeigten, dass erhöhte ADMA-Spiegel im Plasma bei Hämodialyse-Patienten das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen und die Gesamtmortalität voraussagen (66). Zur gleichen Zeit wiesen Valkonen et al. in einer Fall-Kontroll-Studie nach, dass männliche Nichtraucher mit erhöhten ADMA-Werten ein höheres Risiko für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms (ACS) haben als Probanden mit niedrigeren ADMA-Spiegeln (67). Außerdem hatten Probanden mit ACS im Vergleich zu gesunden Probanden des gleichen Alters deutlich höhere ADMA-Konzentrationen im Blut und diese ADMA-Spiegel sanken nach kurzer Zeit unter medikamentöser Therapie (19). Zeller et al. konnten in einer Studie an Probanden mit frischem Myokardinfarkt zeigen, dass Probanden mit höheren ADMA-Werten zum Ereigniszeitpunkt ein erhöhtes Risiko hatten, innerhalb eines Jahres zu versterben, als Probanden, die nach dem Ereignis niedrigere ADMA-Spiegel hatten (68). In einer weiteren Studie hatten Probanden mit instabiler Angina pectoris (AP) erhöhte ADMA-Werte im Vergleich zu Probanden mit stabiler AP und Probanden ohne KHK (69). Später wurden dann auch erhöhte ADMA-Werte bei Patienten mit stabiler AP beobachtet und die ADMA-Spiegel korrelierten mit dem Schweregrad der ischämischen Herzkrankheit (70). So waren die ADMA-Werte bei Probanden mit akutem Myokardinfarkt (MI) am höchsten und bei Probanden mit instabiler AP höher als bei Probanden mit stabiler AP (70). Es liegen außerdem Studien an Probanden mit KHK vor, die sich invasiver Diagnostik oder Therapie mittels Koronarangiographie oder Ballondilatation unterzogen. Erhöhte ADMA-Spiegel waren mit einer verminderten Myokardperfusion und einer erhöhter 1-Jahres-Mortalität

bei Patienten mit einem ST-Hebungsinfarkt, die sich einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unterzogen, verbunden (71). Und bei Probanden mit stabiler Angina pectoris, die sich einer PCI unterzogen, korrelierten die im Voraus gemessenen ADMA-Werte mit dem Eintreten kardiovaskulärer Komplikationen in einem Zeitraum von bis zu 16 Monaten nach der PCI (72). Bei diesen Patienten könnte ADMA also zur Risikostratifizierung vor der Intervention genutzt werden (72). In einer anderen Studie von Lu et al. konnte gezeigt werden, dass die ADMA-Werte mit dem angiographisch gemessenen Stenosegrad der KHK-Patienten korrelierten und dass ADMA, vor allem bei Nicht-Diabetikern, als Prädiktor für unerwünschte klinische Ereignisse gilt (65). Außerdem waren bei Probanden mit höheren ADMA-Spiegeln vor der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) die Re-stenose-Raten höher (73). In drei großen klinischen Studien wurde die Rolle von ADMA als Risikofaktor und Biomarker für die KHK bestätigt. In der CARDIAC-Studie wurde nachgewiesen, dass ADMA ein unabhängiger Risikofaktor für die KHK ist (74). In der ArtheroGene-Studie wurde an 1874 Probanden mit KHK nachgewiesen, dass ADMA als unabhängiger Marker für das kardiovaskuläre Risiko von Patienten gilt (75). Dies bestätigte sich auch in der LURIC-Studie an 2543 Probanden mit KHK (76).

### **Herzinsuffizienz**

Die endotheliale Dysfunktion führt zum Umbau („Remodeling“) der Gefäße, dadurch ist sie mit einer Verschlechterung der peripheren Perfusion, einer verminderten Compliance des linken Ventrikels und einer daraus resultierenden linksventrikulären Dysfunktion verbunden. Erhöhte ADMA-Spiegel stehen mit der endothelialen Dysfunktion in Verbindung und könnten sich daher als Risikomarker, neben anderen schon etablierten Makern wie NT-proBNP, CRP und Troponin, für die Herzinsuffizienz eignen. Bei Hämodialyse-Patienten korrelierte ADMA direkt mit der linksventrikulären konzentrischen Hypertrophie und indirekt mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) (18). An Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz konnte nachgewiesen werden, dass ADMA ein unabhängiger Risikofaktor für die linksventrikuläre Hypertrophie ist und das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen anzeigt (77). Die ADMA-Spiegel scheinen bei Herzinsuffizienz nicht nur erhöht zu sein, sondern sie korrelieren auch mit der New York Heart Association (NYHA)-Klasse der Probanden (78). Und bei Probanden mit ischämischer Herzinsuffizienz wurde der Wert von ADMA als Prädiktor unerwünschter Langzeitkomplikationen nachgewiesen (79). In einer prospektiven Studie an 253



Herzinsuffizienzpatienten konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der Bestimmung von NT-proBNP mit ADMA die Risikostratifizierung dieser Patienten verbessert. Probanden mit erhöhten NT-proBNP und ADMA-Werten hatten ein 4,5-fach erhöhtes Risiko für das Eintreten kardialer Dekompensation, schwerwiegender Komplikationen oder des Todes (80). Außerdem spielt ADMA auch eine Rolle bei kritisch Kranken mit dekompensierter Herzinsuffizienz. Es wurde gezeigt, dass Probanden im kardiogenen Schock nach Myokardinfarkt mit den höchsten ADMA-Konzentrationen ein 3,5-fach erhöhtes Risiko hatten, in den folgenden 30 Tagen zu versterben, im Gegensatz zu Patienten mit niedrigeren ADMA-Konzentrationen (81). Generell hatten Probanden mit akut dekompensierter HI höhere ADMA-Spiegel als Probanden mit chronischer HI (82, 83). Und ADMA war ein unabhängiger Prädiktor für Kurz- und Langzeitmortalität bei Patienten der NYHA Klassen III/IV und einer LVEF <35% (84).

## **Homoarginin**

### **Entdeckung und Geschichte**

1962 gelang es Steib erstmalig, Homoarginin zu synthetisieren (85). Anschließend wurde es durch Stevens und Bush als natürlich vorkommende Substanz identifiziert (86). In den 60er Jahren konnte Homoarginin aus verschiedenen Arten der Platterbse, darunter *Lathyrus cicero*, isoliert werden (87, 88). Später wurde die Synthese und Freisetzung von Homoarginin durch die Niere entdeckt (89, 90). Außerdem wurde seine Rolle als Inhibitor verschiedener Isoenzyme der alkalischen Phosphatase in Leber und Knochen nachgewiesen (91). Lange wurde die Bedeutung von Homoarginin für den menschlichen Organismus unterschätzt und es wurde lediglich als endogene Aminosäure ohne relevante Funktion gehandelt. Die Homoarginin-Konzentration galt damals als interner Standard bei der HPLC-Messung anderer Arginin-Metabolite, darunter ADMA und SDMA (92). Das Interesse an der Substanz wuchs, als Lambert et al. seine Funktion als Substrat bei der Stickstoffmonoxid-Synthese in Hirn, Makrophagen und Endothel darlegten (93). Und mit der Entdeckung erhöhter Homoarginin-Spiegel im zweiten und dritten Trimester bei Schwangeren ergaben sich erste Hinweise auf die potentielle pathophysiologische Rolle des Moleküls im Bezug auf die endotheliale Funktion (94). Aktuell gelten erniedrigte Homoarginin-Spiegel als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen (95).

### **Synthese, Funktion und Pathophysiologie**

Homoarginin ist eine nicht essentielle, nicht proteinogene Aminosäure. Der griechische Präfix Homo- wird in der organischen Chemie dem Namen einer Substanz vorangestellt, die sich nur durch eine Methylgruppe von der Benannten unterscheidet. So besitzt Homoarginin eine zusätzliche Methylgruppe zu dem anderweitig identisch aufgebauten Molekül Arginin. Hauptsächlich wird Homoarginin durch das Enzym AGAT (Arginin-Glycin–Aminotransferase) aus L-Arginin und L-Lysin synthetisiert (96). In verschiedenen populationsbasierten Studien konnte die Abhängigkeit der zirkulierenden Homoarginin-Konzentration von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) des AGAT-Gens nachgewiesen werden (97, 98). AGAT gilt als Schlüsselenzym der Kreatin-Synthese. In der Niere katalysiert AGAT den Transfer der Guanidin-Gruppe von L-Arginin zu L-Glycin wodurch Guanidinoacetat und Ornithin gebildet werden (Abb. 1) (5). In der Leber wird anschließend die Methylierung von Guanidinoacetat durch die Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) katalysiert, wodurch Kreatin gebildet wird (99). Kreatin dient als schnell verfügbarer Energiespeicher. Bei AGAT-Knockout Mäusen kommt es

neben einem Mangel an Kreatin und Guanidinoacetat zur Ausbildung einer Muskeldystrophie, die sich durch Kreatin-Substitution reversibel zeigt (100, 101). Außerdem kommt es bei Menschen und Mäusen mit AGAT-Mangel zu einer Störung der Homoarginin-Synthese aus L-Arginin und L-Glycin (96, 97). Da AGAT die Guanidin-Gruppe von L-Arginin nicht nur auf Glycin, sondern auch auf L-Lysin übertragen kann, wird dadurch L-Homoarginin statt Guanidinoacetat bildet (Abb. 1) (5).

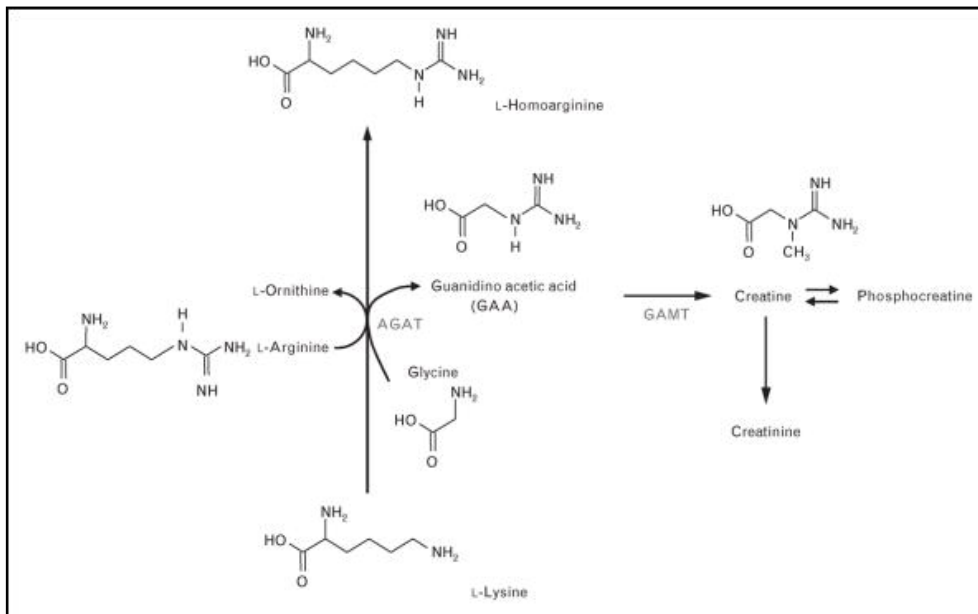


Abb. 1 Schema des Kreatin- und Homoarginin-Stoffwechsels (5)

Außerdem kann eine Lysin-Supplementation zu erhöhten Homoarginin-Spiegeln führen (102). Das erste Enzym des Harnstoffzyklus, die Ornithin-Transcarbamylase, kann Lysin statt Ornithin verstoffwechseln und bildet so Homoarginin (103). Zusätzlich kann die Homoarginin-Konzentration durch die Arginase beeinflusst werden, diese ist in der Lage Homoarginin zu Lysin und Harnstoff abzubauen (104). Die Synthese und die Stoffwechselwege von Homoarginin sind zum Großteil noch nicht ausreichend erforscht. Grundlegende Aspekte des Homoarginin-Metabolismus sind derzeit unklar.

Außerdem existiert bisher keine kohärente Theorie zu der Funktion von Homoarginin. Neben seiner Funktion als Inhibitor der Alkalischen Phosphatase (91) legen neuere Studien einen Einfluss von Homoarginin auf den Arginin-Stoffwechsel aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit beider Moleküle nahe (5). Arginin dient hauptsächlich als Substrat der NOS bei der Bildung von NO. Dabei wird Arginin zu L-Citrullin und NO verstoffwechselt. Alternativ kann auch Homoarginin als Substrat der NOS dienen (105, 106). Es zeigt sich jedoch eine insgesamt

10- bis 20-fach geringere Bindungsaffinität von Homoarginin gegenüber der NOS im Vergleich zu L-Arginin (106). Daher ist Homoarginin eher als schwaches Substrat der NOS anzusehen. Dies könnte allerdings einen Erklärungsansatz für die pathophysiologische Rolle von Homoarginin und den damit verbundenen Einfluss auf das vaskuläre Gleichgewicht darstellen.

### **Klinische Relevanz**

In den letzten Jahren wurden zunehmend Studien veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen im Blut zirkulierendem Homoarginin und klinischen sowie laborchemischen Merkmalen verschiedener Probandengruppen untersuchen. An 3305 Probanden der LURIC-Studie, deren Teilnehmer zur Koronarangiographie stationär aufgenommen wurden, und 1224 Patienten der 4D-Studie, deren Teilnehmer an einem DMT2 erkrankt und bei terminaler Niereninsuffizienz dialysepflichtig waren, konnten März et al. zeigen, dass niedrige Homoarginin-Spiegel mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und einer erhöhten Gesamtmortalität in diesen Probandenkohorten einhergehen (107). Diese Zusammenhänge konnten an 606 Probanden der Hoorn-Studie, einer populationsbasierten Studie an älteren Frauen und Männern, bestätigt werden (108). Außerdem wurde an Probanden der LURIC-Studie nachgewiesen, dass Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen niedrigere Homoarginin-Konzentrationen aufweisen und verminderte Homoarginin-Spiegel ein Risikofaktor für den Apoplex darstellen (109). In der 4D-Studie gingen verminderte Homoarginin-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für das Versterben am plötzlichen Herztod und an der Herzinsuffizienz einher (103). Außerdem konnten in verschiedenen Studien klinische, laborchemische und angiographische Merkmale der Herzinsuffizienz mit verminderten Homoarginin-Spiegeln in Verbindung gebracht werden. So korrelierten eine verminderte angiographische EF, erhöhte NTproBNP-Spiegel und Symptome der NYHA-Klasse III und IV mit verminderten Homoarginin-Konzentrationen in verschiedenen Studien (95, 103, 110). Diese Entdeckungen sprechen für einen Zusammenhang zwischen der reduzierten myokardialen Funktion und dem Homoarginin-Mangel, dabei bleibt der genau pathophysiologische Zusammenhang bisher unklar. Einen Erklärungsansatz bietet ein durch niedrige Homoarginin-Spiegel verursachter Mangel an intrazellulären Energiespeichern. Kreatinphosphat dient als Energiespeicher in der Muskelzelle, indem es über die Kreatinkinase zur Regeneration von ATP dient. Bei der Herzinsuffizienz sind die Schlüsselenzyme dieses Kreatinkinase-Systems herunterreguliert (111). In Experimenten an Mäusen konnte ein protektiver Effekt von erhöhten Kreatin-Spiegeln gegen eine Myokardischämie nachgewiesen werden (112). Sowohl in Studien an Mäusen als auch am

Menschen konnte nachgewiesen werden, dass die Kreatin- und die Homoarginin-Konzentration von der Aktivität der AGAT abhängen und positiv miteinander korrelieren (97, 98, 100). Dies führt zu der Annahme, dass zirkulierendes Homoarginin die Verfügbarkeit intrazellulärer Energiespeicher bei der Herzinsuffizienz widerspiegelt (5). Neben der Verbindung zwischen Homoarginin und der kardialen Funktion sind außerdem inzwischen verschiedene Zusammenhänge zwischen Homoarginin und kardiovaskulären Risikofaktoren beschrieben worden. So korrelierte die Homoarginin-Konzentration positiv mit dem diastolischen und systolischem Blutdruck, sowohl in der LURIC-Studie als auch in der Hoorn-Studie (95, 108). Im Gegensatz dazu konnten Chen et al. nachweisen, dass die Supplementation von Homoarginin am Modell der Ratte zur Senkung des Blutdruckes führt (113). Außerdem traten bei Rauchern signifikant niedrigere Homoarginin-Spiegel im Blut auf (114). Und eine prospektive Studie an Patienten mit Claudicatio intermittens zeigte eine Assoziation zwischen Homoarginin und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (115). An Patienten der Dallas Heart Studie, einer populationsbasierten Studie, konnte eine inverse Beziehung zwischen der Wanddicke der Aorta und den Homoarginin-Spiegeln im Blut nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich keine Verbindung zum Plaquebefall der Aorta oder dem Calciumgehalt der Koronararterien (116). Die Konzentration an im Blut zirkulierendem Homoarginin konnte außerdem mit der Erkrankung an der chronischen Niereninsuffizienz in Verbindung gebracht werden. Die 4D-Studie, die LURIC-Studie und eine Studie an Apoplex-Patienten weisen einen Zusammenhang zwischen niedrigen Homoarginin-Spiegeln und Parametern der verminderten Nierenfunktion nach, darunter eine verminderte geschätzte GFR und erhöhte Kreatinin-Spiegel (95, 97, 107). Dies lässt sich zum Einen durch die renale Expression von AGAT erklären, woraufhin es bei einer Dysfunktion der Niere zu einer verminderten Produktion von AGAT kommt und dadurch die Homoarginin-Konzentrationen sinken. Andererseits besteht die Möglichkeit des Zusammenhangs über den NO-Stoffwechsel, wobei es durch eine Schädigung der Niere zu einer veränderten renalen Expression der NOS und damit zu einer Auswirkung auf die Homoarginin-Konzentration kommen könnte (5).

## Methodik

### **Studiendesign**

In der Zeit von April 2013 bis Oktober 2014 wurde an ambulanten Patienten, die sich elektiv in der AICD-Sprechstunde der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Charité (Campus Mitte) vorstellten, eine klinische Querschnittsstudie durchgeführt.

### **Einschlusskriterien**

In die Studie wurden alle Patienten aufgenommen, die einen geplanten Vorstellungstermin in der AICD-Sprechstunde unserer Klinik hatten und die sich außerdem zum Zeitpunkt der Untersuchung in einem klinisch stabilen Zustand befanden, so dass keine stationäre Einweisung erforderlich war.

### **Ausschlusskriterien**

In die Studie wurden Patienten nicht aufgenommen, wenn:

- diese die Einschlusskriterien nicht erfüllten
- sie nicht ausdrücklich ihr Einverständnis zur Aufnahme in die Studie gaben oder geben konnten
- sie bereits Teilnehmer an einer anderen klinischen Studie waren
- ein stationärer Krankenhausaufenthalt in den letzten vier Wochen stattgefunden hatte
- eine Schwangerschaft bestand
- oder ein malignes Tumorleiden vorlag.

### **Studienablauf**

Von allen diesen Patienten wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung eine standardisierte Reihe persönlicher Daten, klinischer Parameter und Laborwerte erhoben. Anschließend wurden diese Informationen aufbereitet und statistisch analysiert.

### **Patientenauswahl und Aufklärung**

Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt (EA1/004/13).

Für die Rekrutierung wurden alle Patienten der ambulanten AICD-Sprechstunde, die den Einschlusskriterien entsprachen, angesprochen. Zu Beginn wurden die Patienten über Inhalt, Wesen, Bedeutung, Tragweite sowie Risiken der Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt. Dabei wurde stets darauf aufmerksam gemacht, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig und ein Ausscheiden aus der Studie zu jedem Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen möglich sei. Die Patienten wurden darauf hingewiesen, dass eine Teilnahme oder eine Ablehnung der Teilnahme an der Studie keine Auswirkungen auf die Behandlung habe. Weitere Schritte wurden erst eingeleitet, nachdem die Studienteilnehmer ihr ausdrückliches Einverständnis in mündlicher und schriftlicher Form erteilten.

### **Datenerhebung und Probenentnahme**

Zunächst wurden in einem Patientengespräch anamnestische Informationen zu Basisdaten, Vorerkrankungen, Lebensgewohnheiten und aktuellem Gesundheitsbefinden erhoben und auf einem Anamnesebogen vermerkt. Diese Angaben wurden mit Hilfe der Daten aus der Patientenakte vervollständigt und um klinische Parameter wie die Ejektionsfraktion (EF) und den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVDD) erweitert. Anschließend erfolgte eine nicht in der medizinischen Routine vorgesehene venöse Blutentnahme aus einer kubitalen Vene mittels Butterfly- und Vacutainer®-System (REF367282, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) in ein 10 ml EDTA-Röhrchen (REF367525, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **Datenschutz**

Die Studie wurde gemäß den Datenschutzbestimmungen der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Den Studienteilnehmern wurde eine eindeutige Kombination aus Buchstaben und Ziffern zugeordnet. Die gewonnenen Proben wurden ausschließlich mit dieser Kombination markiert. Damit ist für Außenstehende eine Zuordnung der Daten oder der Proben auf einen Teilnehmer ausgeschlossen. Die gewonnenen Daten wurden unter Wahrung der Anonymität und der Datenschutzvorschriften elektronisch gespeichert und weiterverarbeitet.

## Konservierung der Blutproben

Nach Abnahme wurden die Blutproben wie folgt verarbeitet: Zur Konservierung wurden die gefüllten EDTA- und Serumröhrchen bei 4000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten in einer Zentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufbereitet. Anschließend wurde ausschließlich das Plasma abpipettiert, in Eppendorfgläser der Größe 0,2 und 0,5ml gefüllt und bei -80°C eingefroren. Die EDTA- und Serumreste wurden entsorgt. Die Blutproben wurden stets am Tag der Abnahme weiterverarbeitet und eingefroren.

## Bestimmung der Biomarker im Plasma

Die Bestimmung der Biomarker erfolgte durch die Immundiagnostik AG in Bensheim, Deutschland. Dazu wurden die eingefrorenen Proben über den Zeitraum der Studie gesammelt, im Anschluss auf Trockeneis versandt und im Block analysiert. Die Biomarker, deren Bestimmung nach Bensheim ausgelagert wurde, sind in Tabelle 1 dargestellt. Dabei wurden die Konzentrationen mittels verschiedener Methoden bestimmt, diese werden anschließend näher erläutert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>in Biomarker</b>	<b>Einheit</b>	<b>Bestimmungsmethode</b>
<b>NTy</b>	Nitrotyrosin	nmol/L	Sandwich-ELISA
<b>Zonulin</b>	Zonulin	ng/ml	ELISA
<b>CPneu</b>	Carbonylproteine	U/ml	Sandwich-ELISA
<b>hsCrP</b>	hochsensitives CRP	mg/L	Sandwich-ELISA
<b>ADMAELISA</b>	ADMA mittels ELISA	µmol/L	ELISA
<b>ADMAHLC</b>	ADMA mittels HPLC	µmol/L	HPLC
<b>Homoarginin</b>	Homoarginin	µmol/L	HPLC
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase	ng/ml	Sandwich-ELISA
<b>Kynurenin</b>	Kynurenin	µmol/L	ELISA
<b>Tryptophan</b>	Tryptophan	µmol/L	ELISA
<b>oxLDL</b>	Oxidiertes LDL	ng/ml	Sandwich-ELISA
<b>CMLcalp</b>	Carboxymethyllysins- Calprotectin	pg/ml	Sandwich-ELISA

Tabelle 1 – Biomarker



## ***ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay***

Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das *in vitro* zur quantitativen Bestimmung von Biomarkern im Humanserum und -plasma angewendet werden kann. Es wird grundsätzlich zwischen einem kompetitiven und einem nicht-kompetitiven Verfahren unterschieden:

### **Kompetitives Verfahren**

Das Testverfahren arbeitet mit der Konkurrenz um die Bindung an den auf einer Mikrotiterplatte aufgetragenen Tracer. Dazu wird das Probenreagenz gemeinsam mit einem Antiserum auf eine mit Tracern beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen und inkubiert. In der Inkubationsphase konkurrieren die Zielantigene in der Probe mit den auf der Platte gebundenen Tracern um die Bindung der Antikörper. Die Menge der an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper ist daher indirekt proportional zur Konzentration des Biomarkers in der Patientenprobe. In der zweiten Inkubationsphase wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der an die Antikörper bindet. Anschließend werden die ungebundenen Komponenten ausgewaschen und das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Durch die Reaktion des TMB erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die chromogene Verbindung wird dann bei 450nm photometrisch gemessen. Mit steigenden Konzentrationen des Biomarkers reduziert sich das in der Probe gemessene Signal. Die Konzentration wird anschließend mittels einer Standardkurve – Adsorption bei 450nm versus Standardkonzentration – abgelesen.

### **Nicht-kompetitives Verfahren (Sandwich-ELISA)**

Das Testverfahren arbeitet mit zwei Antikörpern, zwischen denen der Biomarker gebunden wird. Dazu wird das Probenreagenz auf eine mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. In der ersten Inkubationsphase wird das Substrat in der Probe von den gekoppelten Fängerantikörpern gebunden. Dann wird ein Peroxidase-markierter Antikörper hinzugegeben, und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – Substrat – Peroxidasekonjugat. Anschließend wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Durch die Reaktion des TMB erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die chromogene Verbindung wird dann bei 450nm photometrisch gemessen. Die Intensität

der Farbe ist mit dem Substrat-Gehalt direkt proportional. Die Konzentration wird anschließend mittels einer Standardkurve – Adsorption bei 450nm versus Standardkonzentration – abgelesen.

### ***HPLC – High Performance Liquid Chromatography***

Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das in vitro zur quantitativen Bestimmung von Biomarkern eingesetzt werden kann.

Dies erfolgt nach dem Prinzip der Säulenchromatographie. Dabei wird das fluoreszierende Produkt mit einem Laufmittel (flüssige Phase) unter hohem Druck durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen des Substrates mit der stationären Phase wird dieses unterschiedlich schnell weitertransportiert und somit getrennt. Anschließend werden die Chromatogramme durch Fluoreszenzdetektoren aufgezeichnet. Dabei ist die Absorptionsmessung für jeden Stoff charakteristisch, und die Konzentration kann anhand der Fläche des Signals mittels Eichkurven abgelesen werden.

In dieser Studie wurde die Homorarginin- und ADMA-Konzentrationen mittels HPLC mit Festphasenextraktion und Vorsäulenderivatisierung, wie von Meinitzer et al. 2007 beschrieben, bestimmt (117). Dabei liegen die Variationskoeffizienten innerhalb eines Tages für ADMA bei 1,4% (Mittelwert 0,77 µmol/L) und 2,1% (Mittelwert 0,58 µmol/L) und für Homoarginin bei 4,7% (Mittelwert 1,21 µmol/L) und 2,2% (Mittelwert 3,53 µmol/L) (117).

## **Erfassung der klinischen Parameter**

### **Parameter der Herzfunktion**

Die klinischen Parameter zur näheren Charakterisierung der Herzfunktion wurden bei Vorstellung der Patienten aus deren Akte und bereits vorliegenden Echokardiographiebefunden entnommen.

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>in Parameter</b>	<b>Einheit</b>
--------------------	---------------------	----------------

---

**Mastertabelle**

---

<b>EF</b>	Ejektionsfraktion	%
<b>LVDD</b>	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser	mm
<b>EF-Klasse</b>	EF Kategorie	Kategorie 1-3

Tabelle 2 – klinische Parameter der Herzinsuffizienz der Probanden

Die echokardiographisch bestimmte Ejektionsfraktion wurde in drei Kategorien unterteilt. Dabei ist Kategorie 1 mit einer EF größer 50 % definiert. In Kategorie 2 liegt die EF zwischen 50 und 25 % und in Kategorie 3 ist sie kleiner als 25 %.

### Parameter der Nierenfunktion

Die Kreatinin-Konzentration im Plasma wurde durch die Immundiagnostik AG in Bensheim bestimmt. Anhand der Plasmakreatininwerte wurde die Glomerulärefiltrationsrate mittels der vereinfachten MDRD-Formel berechnet:

$$\text{GFR (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 186 \times \text{Kreatinin [mg/dl]}^{-1,154} \times \text{Alter [Jahren]}^{-0,203} (\times 0,742 \text{ bei Frauen})$$

<b>Bezeichnung</b>	<b>in Parameter</b>	<b>Einheit</b>
<b>Mastertabelle</b>		
<b>Kreatinin</b>	Plasmakreatinin	mg/dl
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate	ml/min
<b>GFRClass</b>	GFR-Klasse	Klasse 1-3
<b>GFRClassextended</b>	erweiterte GFR-Klasse	Klasse 1-4

Tabelle 3 - Nierenfunktionsparameter der Probanden

Die berechnete GFR wurde anschließend in zwei verschiedenen Klassifikationssystemen unterteilt. Im ersten System, die GFR-Klasse, ist die erste Klasse als  $\text{GFR} \geq 60 \text{ ml/min}$ , die zweite Klasse als  $\text{GFR} < 60; \geq 30 \text{ ml/min}$  und die Dritten als  $\text{GFR} < 30 \text{ ml/min}$  definiert. Das zweite Klassifikationssystem, die erweiterte GFR-Klasse, nutzt vier Klassen. Dabei ist die erste Klasse als  $\text{GFR} \geq 60 \text{ ml/min}$ , die zweite Klasse als  $\text{GFR} < 60; \geq 45 \text{ ml/min}$ , die dritte Klasse als  $\text{GFR} < 45; \geq 30 \text{ ml/min}$  und die vierte Klasse als  $\text{GFR} < 30 \text{ ml/min}$  festgelegt.

### Standardisierte persönliche Daten

Zur Charakterisierung der Probandengruppe und zur Untersuchung von zusätzlichen Einflüssen auf die Plasma- und Serumparameter wurden allgemeine Parameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren der Patienten erfasst.

<b>Bezeichnung in Mastertabelle</b>	<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>
<b>Alter</b>	Lebensalter	a
<b>Sex</b>	Geschlecht	0-weiblich 1-männlich
<b>KGröße</b>	Körpergröße	cm
<b>KGewicht</b>	Körpergewicht	kg
<b>BMI</b>	Body Mass Index	kg/m <sup>2</sup>
<b>py</b>	Nikotinabusus	pack years
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit	Anzahl der betroffenen Gefäße
<b>AP</b>	Angina pectoris	0-keine 1-wird angegeben
<b>D.m</b>	Diabetes mellitus	0-kein 1-Typ 1 2-Typ 2
<b>T2D</b>	Diabetes mellitus Typ 2	0-liegt nicht vor 1-liegt vor

Tabelle 4 – ergänzende Daten der Probanden

Die Berechnung des Body Mass Index (BMI) erfolgte nach der Formel: BMI [in kg/m<sup>2</sup>] = Körpergewicht [kg] / Körpergröße [m]<sup>2</sup>. Der Risikofaktor arterieller Hypertonus konnte wegen Dokumentationsproblemen bei der statistischen Auswertung nicht mit einbezogen werden.

### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 22 (IBM® SPSS® Statistics IBM Cooperation, Armonk, USA). Es sollten die Determinanten der Parameter ADMA und Homoarginin bestimmt werden; dazu wurden zwei verschiedene Untersuchungsgruppen statistisch ausgewertet. In jeder Gruppe erfolgte zunächst die Prüfung auf univariaten Zusammenhang der einzelnen Parameter mit ADMA bzw. Homoarginin; die univariat bestimmten Kandidaten-Parameter wurden danach mittels multivariater linearer Regression (Generalisiertes Lineares Modell) bezüglich ihres Einflusses auf ADMA oder Homoarginin untersucht.

Gruppe 1 schließt alle Patienten ein und besteht aus insgesamt 229 Patienten. Gruppe 2 umfasst alle Patienten, die an einem Diabetes mellitus Typ 2 litten, mit einem hochsensitivem CRP-Wert unter 10mg/dl, insgesamt 51 Individuen.

### *Stetige Variablen*

Zur beschreibenden Statistik wurden Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median und Interquartilbereich (IQR) berechnet. Zur graphischen Darstellung der Häufigkeitsverteilung dienten Histogramme. Folgende Parameter wurden wegen einer Linksverschiebung der Werte zur Basis  $e$  logarithmiert: Nitrotyrosin, Zonulin, Kreatinin, hochsensitives CRP, ADMA mittels ELISA und HPLC, Homoarginin, Myeloperoxidase (MPO), Kynurenin, oxidiertes LDL und Calprotectin. Die Messwerte wurden mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung überprüft. Da sich bei dem überwiegenden Anteil aller metrischen Daten auch nach Logarithmierung keine hinreichende Normalverteilung ergab, kamen im Folgenden nur nicht-parametrische Verfahren zum Einsatz. Zum Nachweis eines Zusammenhangs der metrischen Parameter untereinander wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman ( $Rho, \rho$ ) bestimmt. Korrelationen mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

### *Kategoriale Variablen*

Zur graphischen Darstellung der ADMA- bzw. Homoarginin-Werte in den Gruppen der kategorialen Variablen wurden Boxplots zum visuellen Vergleich der Lage und des Verteilungsbereichs der Werte innerhalb dieser Gruppen verwendet. Bei kategorialen Parametern mit mehr als 2 Ausprägungen (z. Bsp. KHK-0, -1, -2 und -3) wurden die Mittelwerte mittels Kruskal-Wallis-ANOVA verglichen. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als signifikante Unterschiede angesehen; dieser Globaltest qualifizierte zum Einschluss in die GLM. Ergaben sich im Globaltest signifikante Unterschiede, folgten paarweise Vergleiche mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Bei diesen Tests wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Korrektur adjustiert und ist später im Einzelnen aufgeführt. Bei kategorialen Parametern mit zwei Ausprägungen wurde sofort der Mann-Whitney-U-Test genutzt.

### *Generalisiertes lineares Modell (GLM)*

Anschließend wurden signifikant mit ADMA bzw. Homoarginin korrelierende metrische Parameter und kategoriale Parameter mit Ausprägungs-abhängigen signifikanten Unterschieden der beiden Zielparameter mittels GLM-Analyse überprüft. Dabei wurden Variablen, die direkt

auseinander hervorgehen (Kollinearität), getrennt in der GLM betrachtet. Dies gilt für die GFR und die daraus hervorgehenden GFR-Klassen, die EF und daraus hervorgehende EF-Klassen, sowie das Körpergewicht und den daraus berechneten BMI. Es wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## Ergebnisse

Im oben beschriebenen Zeitraum wurden insgesamt 232 Probanden in die Studie eingeschlossen. Davon entfielen 3 Teilnehmer wegen fehlender klinischer und laborchemischer Daten, so dass insgesamt 229 Probanden das Gesamtkollektiv für die statistische Auswertung bildeten.

### **Deskriptive Statistik der Gesamtgruppe**

Von 229 Probanden waren 45 (19,7 %) weiblich und 184 (80,3 %) männlich. 61,6 % der Patienten hatten eine nachgewiesene koronare Herzerkrankung. Bei der Befragung gaben 12,8 % der Probanden Angina pectoris-Beschwerden an. Außerdem waren 26,2 % der Teilnehmer zum Untersuchungszeitpunkt an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt. Insgesamt gaben 69,4 % der Individuen einen Nikotinabusus an. Die weitere Beschreibung der Gesamtkohorte ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

<b>Variable</b>	<b>Einheit</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>± SD</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>
<b>Alter</b>	a	229	67,34	11,72	69,0	60-76
<b>KGr.</b>	cm	228	174,43	8,43	175	170-180
<b>KGew.</b>	kg	228	84,75	17,87	83,0	74-92,75
<b>BMI</b>	kg/m <sup>2</sup>	228	27,8	5	27,2	24,3-30,49

Tabelle 5 – Zusammensetzung des Gesamtkollektivs

SD: Standardabweichung; IQR: Interquartilbereich; KGr.: Körpergröße; KGew.: Körpergewicht; BMI: Body Mass Index

### **Deskriptive Statistik der Biomarker**

Die Werte aller Biomarker innerhalb der Gesamtgruppe sind in Tabelle 6 dargestellt.

<b>Biomarker</b>	<b>Einheit</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>±SD</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>
<b>Nitrotyrosin</b>	nmol/L	229	608,68	503,85	460,93	382-623,62
<b>Zonulin</b>	ng/ml	229	10,61	2,92	10,24	8,66-11,8
<b>Carbonylproteine</b>	U/ml	224	182,15	77,43	176,95	122,15-224,53
<b>Kreatinin</b>	mg/dl	229	1,35	0,63	1,18	1,02-1,53

<b>hs CRP</b>	mg/L	229	4,83	9,17	2,32	1,08-5,23
<b>ADMA ELISA</b>	µmol/L	228	0,71	0,19	0,67	0,57-0,81
<b>ADMA HPLC</b>	µmol/L	213	0,78	0,13	0,76	0,7-0,85
<b>Homoarginin</b>	µmol/L	213	1,65	0,79	1,53	1,16-1,95
<b>MPO</b>	ng/ml	227	145,29	131,56	110,2	91,4-140,6
<b>Kynurenin</b>	µmol/L	227	3,66	1,72	3,3	2,6-4,2
<b>Tryptophan</b>	µmol/L	226	69,11	16,19	68,4	58,9-77,43
<b>oxidiertes LDL</b>	ng/ml	225	233,37	385,53	101,3	60,85-199,1
<b>CMLCalprotectin</b>	pg/ml	218	198,49	302,1	102,9	15,23-353,03

Tabelle 6 – Verteilung der Biomarker innerhalb der Gesamtgruppe

SD: Standardabweichung; IQR: Interquartilbereich; hs CRP: hochsensitives C-Reaktives Protein; MPO: Myeloperoxidase; LDL: low density lipoprotein

### Deskriptive Statistik der kardialen Parameter

Von 213 Probanden, bei denen Informationen zum Status der Herzkranzgefäße vorlagen, litten 141 Probanden (66,2 %) an einer KHK. Von diesen 213 Probanden hatten 16,9 % eine Ein-Gefäß-KHK, 18,8 % eine Zwei-Gefäß-KHK und 30,5 % eine Drei-Gefäß-KHK. Die Verteilung von EF und LVDD innerhalb der Probandengruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Anhand der EF konnten die 220 Patienten in 3 Klassen unterteilt werden. 24 % dieser Probanden hatten eine normale EF (EF über 50 % = EF-Klasse 1), 64,5 % hatten eine moderate Insuffizienz (EF 50-25 % = EF-Klasse 2) und 11,4 % litten an einer schweren Insuffizienz (EF unter 25% = EF-Klasse 3).

<b>Variable</b>	<b>Einheit</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>±SD</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>
<b>EF</b>	%	220	37,31	13,1	35,0	28,25-45
<b>LVDD</b>	mm	202	57,40	9,12	57,0	52-63

Tabelle 7 – Verteilung von EF und LVDD in der Gesamtgruppe

SD: Standardabweichung; IQR: Interquartilbereich; EF: Ejektionsfraktion; LVDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

### Deskriptive Statistik der nephrologischen Parameter

Von allen 229 Patienten wurde der Plasmakreatinin-Spiegel bestimmt und daraus die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) berechnet. In Tabelle 8 ist die Verteilung beider Parameter



innerhalb der gesamten Patientenkohorte dargestellt. Die Patienten wurden anschließend nach ihrer GFR in zwei verschiedenen Klassifikationssystemen eingeteilt. Innerhalb des ersten Klassifikationssystems, der GFR-Klasse, hatten 54,6 % eine normale GFR (GFR über 60ml/min=GFR-Klasse 1), 38,4 % eine moderat eingeschränkte GFR (GFR zwischen 60 und 30 ml/min=GFR-Klasse 2) und 7 % eine schwer eingeschränkte GFR (GFR unter 30ml/min=GFR-Klasse 3). Innerhalb des zweiten Klassifikationssystems, der erweiterten GFR-Klasse, wurde die GFR-Klasse 2 der vorangegangenen Klassifikation in zwei Untergruppen unterteilt. Nach dieser Einteilung hatten 24,9 % aller Probanden eine mild eingeschränkte GFR (zwischen 60 und 45 ml/min) und 13,5 % eine moderat eingeschränkte GFR (zwischen 45 und 30 ml/min).

<b>Variable</b>	<b>Einheit</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>±SD</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>
<b>Kreatinin</b>	mg/dl	229	1,35	0,63	1,18	1,02-1,53
<b>GFR</b>	ml/min	229	61,39	20,44	63,0	46-75

Tabelle 8 – Verteilung von Kreatinin-Konzentration und GFR in der Gesamtgruppe  
SD: Standardabweichung; IQR: Interquartilbereich; GFR: Glomeruläre Filtrationsrate

### **Methodenvergleich der ADMA-Messungen**

Es wurden die Bestimmungen von ADMA mittels ELISA und HPLC verglichen. In der Korrelation nach Spearman ( $\rho$ ) zeigte sich nur eine moderate Übereinstimmung von  $\rho = 0,324$  beider Messmethoden ( $p=0,004$ ). Die lineare Korrelation nach Pearson ergab ebenfalls eine geringere Übereinstimmung beider Messmethoden als erwartet (siehe Abbildung 2). Mittels eines Bland-Altman-Diagramms (siehe Abbildung 3) wurde dargestellt, dass die Messwerte der HPLC-Messung im Bereich der niedrigeren Messwerte größer als die Messwerte der ELISA-Messung waren, wohingegen im oberen Messbereich die Messwerte der HPLC-Messung kleiner waren als die der ELISA-Messung. Im Wilcoxon-Test zeigte sich, dass in der gesamten Probandengruppe die Messung mittels HPLC signifikant höhere Werte als die Messung mittels ELISA erbrachte (siehe Abbildung 4).

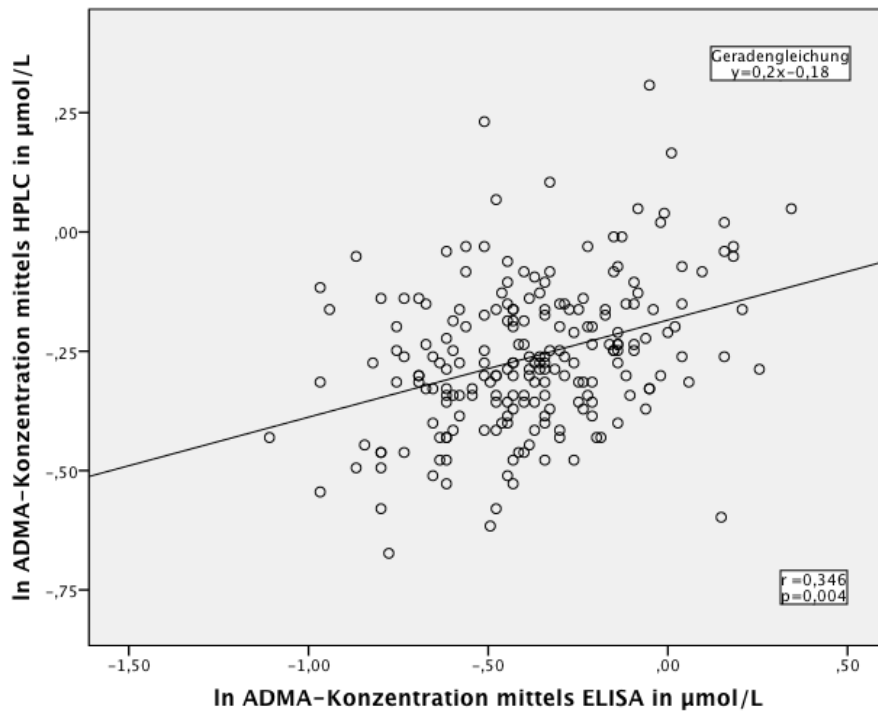


Abbildung 2 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs von ADMA mittels HPLC gemessen und ADMA mittels ELISA gemessen innerhalb der Gesamtkohorte. r: Korrelationskoeffizient nach Pearson

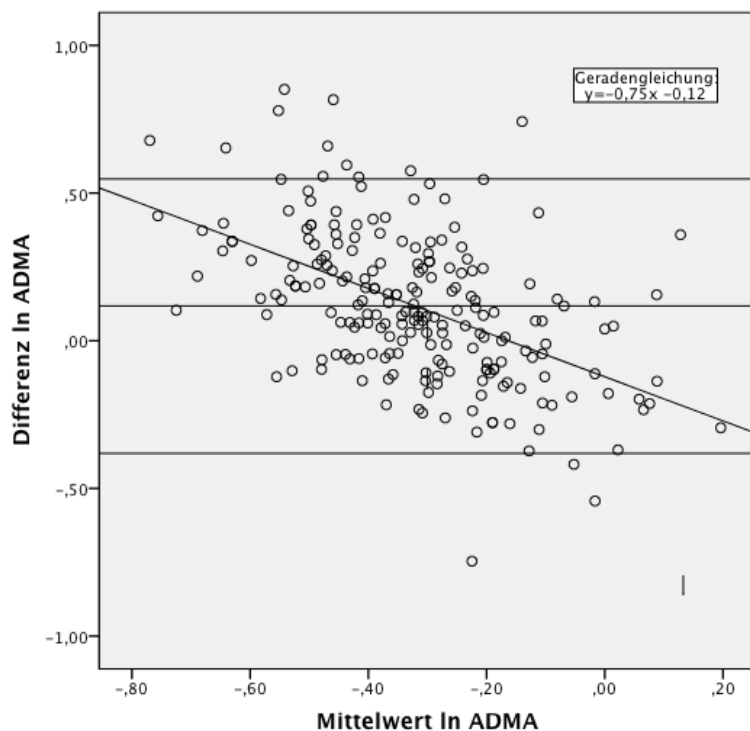


Abbildung 3 – Bland-Altman-Diagramm für den Vergleich der Messmethoden von ADMA  
 Differenz ln ADMA = ln ADMA HPLC- ln ADMA ELISA  
 Mittelwert ln ADMA= (ln ADMA HPLC+ ln ADMA ELISA)/2  
 Linien: oberes und unteres 95% Vertrauensintervall und Mittelwert

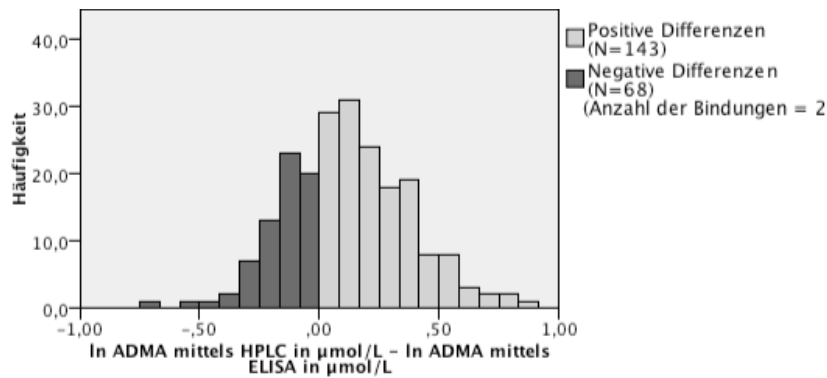


Abbildung 4 - Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben ( $p < 0,001$ )

Aufgrund der Abweichung beider Messmethoden voneinander wurden in der folgenden Regressionsanalyse nur die mittels HPLC bestimmten ADMA-Konzentrationen berücksichtigt, da die HPLC-Messmethode nach aktuellem Stand der Forschung die höchste Sensitivität und Selektivität aufweist (118). Die mittels ELISA bestimmten ADMA-Konzentrationen wurden nicht mit in die folgende Auswertung einbezogen.

### Auswertung der Messwerte für ADMA

#### Korrelation von ADMA mit allen metrischen Kovariaten für die Gruppe 1

Die ADMA-Konzentrationen nahmen mit steigenden Zonulin-Konzentrationen signifikant ab ( $p = 0,003$ ). Bei höherer GFR wurden signifikant niedrigere ADMA-Spiegel gemessen ( $p = 0,01$ ). Außerdem nahmen die ADMA-Konzentrationen mit steigenden Kreatinin-Konzentrationen signifikant zu ( $p = 0,013$ ). Und es zeigten sich signifikant höhere ADMA-Werte bei steigendem Kynurenin-Spiegel ( $p = 0,006$ ). Die Ergebnisse der Korrelation nach Spearman ( $\rho$ ) von ADMA mit allen metrischen Kovariaten für das Gesamtkollektiv sind in Tabelle 9 dargestellt.

Variable	Korrelationskoeffizient $\rho$	p-Wert
In Homoarginin	-0,007	0,922
In Nitrotyrosin	-0,003	0,962
<b>In Zonulin</b>	<b>-0,203</b>	<b>0,003</b>

Carbonylproteine	0,085	0,217
<b>ln Kreatinin</b>	<b>0,169</b>	<b>0,013</b>
ln hs CRP	0,072	0,292
ln MPO	-0,032	0,645
<b>ln Kynurenin</b>	<b>0,189</b>	<b>0,006</b>
Tryptophan	0,081	0,241
ln oxLDL	0,095	0,168
ln CMLCalprotectin	-0,041	0,554
Körpergröße	-0,021	0,765
Körpergewicht	-0,073	0,289
pack years	0,018	0,793
EF	-0,064	0,362
LVDD	-0,006	0,939
<b>GFR</b>	<b>-0,177</b>	<b>0,010</b>
Alter	0,123	0,073
BMI	-0,61	0,377

Tabelle 9 – Korrelation von ADMA-HPLC nach Spearman ( $\rho$ ) für das Gesamtkollektiv

### ADMA in Abhängigkeit von kategorialen Faktoren innerhalb der Gruppe 1

Probanden mit einer schwer eingeschränkten Ejektionsfraktion (unter 25%) hatten signifikant höhere ADMA-Spiegel als Probanden mit normaler oder moderat eingeschränkter Ejektionsfraktion ( $p=0,009 / 0,002$ ). Die Ergebnisse für ADMA in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren für das Gesamtkollektiv sind in Tabelle 10 dargestellt.

Variable	Testwert	p-Wert
Geschlecht	-0,113	0,910
<b>EF-Klassen</b>	<b>9,585</b>	<b>0,008</b>
EF-Klasse: 1vs 2	-0,227	0,821(Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ )
EF-Klasse: 1vs 3	<b>-2,600</b>	<b>0,009</b> (Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ )
EF-Klasse: 2vs 3	<b>-3,055</b>	<b>0,002</b> (Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ )
Angina pectoris	-0,758	0,449
KHK	4,340	0,227

<b>Diabetes mellitus Typ 2</b>	-0,838	0,402
<b>GFR-Klassen</b>	3,941	0,139
<b>GFR-Klassen extended</b>	6,244	0,100
<b>Hochsensitives CRP&lt;10</b>	-0,868	0,386

Tabelle 10 – Mann-Whitney-Test für alle Faktoren mit einem Paarvergleich und Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehr als zwei Ausprägungen – für ADMA innerhalb des Gesamtkollektivs

### Generalisiertes Lineares Model für ADMA innerhalb der Gruppe 1

Die Kreatinin-Konzentration war eine signifikante Kovariate von ADMA in diesem Modell, es zeigte sich ein positiver Zusammenhang ( $p=0,019$ ) (siehe Abbildung 5). Außerdem hatten Probanden mit einer schwer eingeschränkten EF (Klasse 3) signifikant höhere ADMA-Spiegel als Probanden mit einer moderat eingeschränkten EF (Klasse 2) ( $p=0,024$ ) (siehe Abbildung 6). Alle Ergebnisse des GLM für ADMA in Gruppe 1 sind in Tabelle 11 dargestellt. Aufgrund der Kollinearität von Plasmakreatinin-Spiegel und daraus errechneter GFR wurden die Kreatinin-Konzentration und die GFR getrennt in dem GLM berücksichtigt.

Variable	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	p-Wert
<b>ln Zonulin</b>	-0,57	0,0438	0,194
<b>ln Kynurenin</b>	0,002	0,0299	0,946
<b>EF-Klasse= 1</b>	-0,052	0,0387	0,178
<b>EF-Klasse= 2</b>	<b>-0,076</b>	0,0335	<b>0,024</b>
<b>EF-Klasse= 3</b>	<b>0 (Bezugsklasse)</b>	-	-
<b>ln Kreatinin</b>	<b>0,086</b>	0,0367	<b>0,019</b>
<b>GFR</b>	-0,001	0,0006	0,074

Tabelle 11- GLM für ADMA innerhalb der Gesamtkohorte

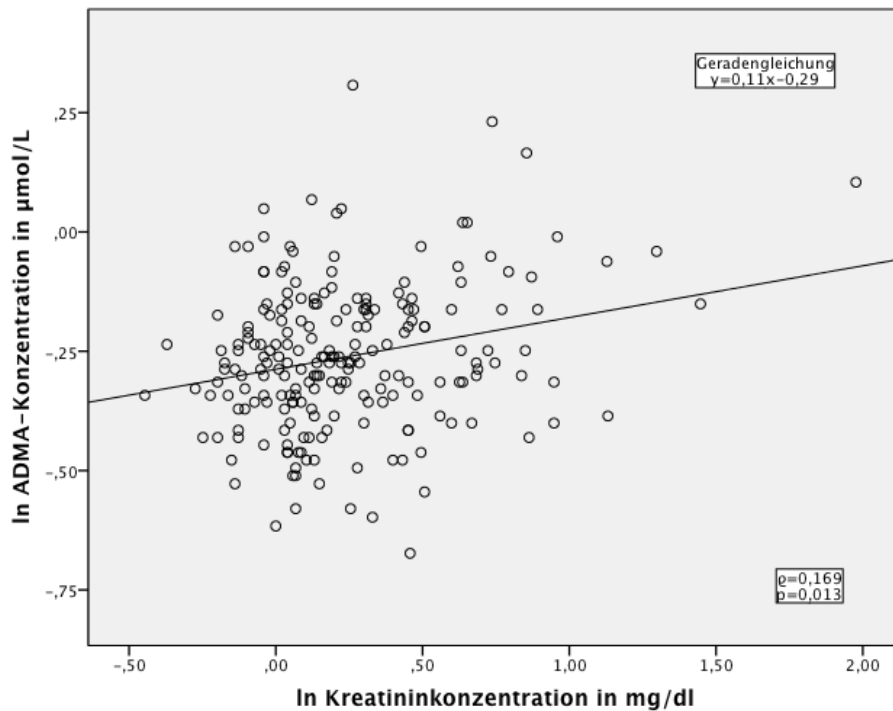


Abbildung 5 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs von ADMA und Kreatinin innerhalb der Gesamtkohorte.  $\rho$ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

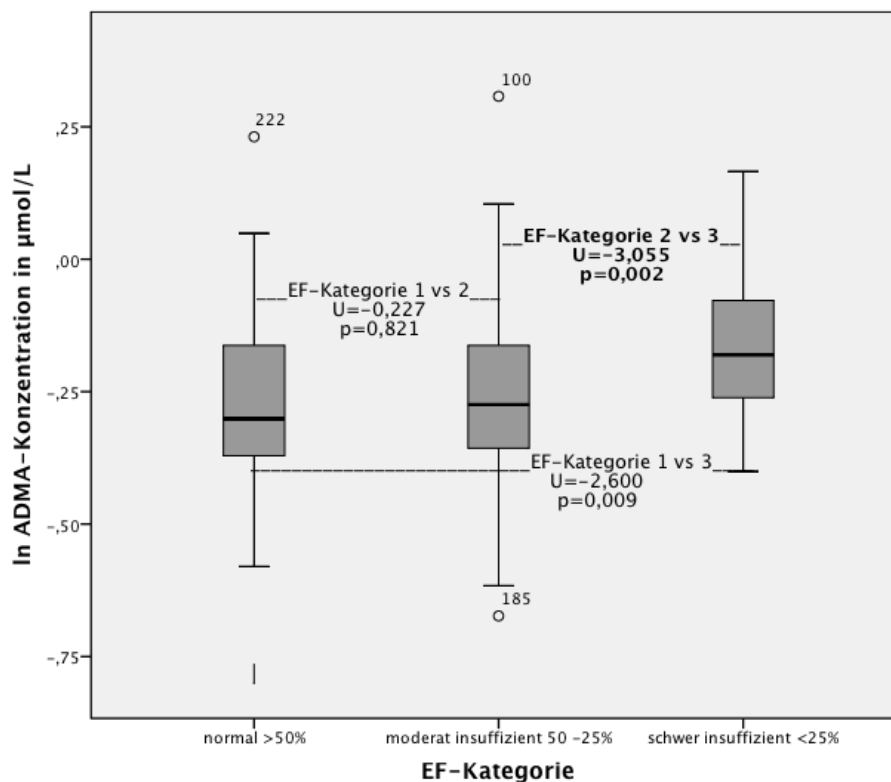


Abbildung 6 - Boxplots der ADMA-Konzentrationen innerhalb der EF-Kategorien für die Gesamtkohorte. U: Testwert des Kruskal-Wallis-Test

**Zu beachten:** In der GLM ist nur EF-Kategorie 2 vs 3 signifikant.

## Korrelation von ADMA mit allen metrischen Kovariaten für die Gruppe 2

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der ADMA-Konzentrationen innerhalb einzelner Kovariaten in der Gruppe 2 festgestellt werden.

Alle Ergebnisse der Korrelation nach Spearman ( $\rho$ ) für ADMA in der Gruppe 2 sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

<b>Variable</b>	<b>Korrelationskoeffizient <math>\rho</math></b>	<b>p-Wert</b>
<b>ln ADMA ELISA</b>	0,166	0,260
<b>ln Homoarginin</b>	0,259	0,076
<b>ln Nitrotyrosin</b>	-0,087	0,555
<b>ln Zonulin</b>	0,263	0,071
<b>Carbonylproteine</b>	0,250	0,086
<b>ln Kreatinin</b>	0,155	0,293
<b>ln hochsensitives CRP</b>	-0,032	0,829
<b>ln Myeloperoxidase</b>	0,056	0,707
<b>ln Kynurenin</b>	0,189	0,197
<b>Tryptophan</b>	-0,040	0,788
<b>ln oxidiertes LDL</b>	0,246	0,091
<b>ln CMLCalprotectin</b>	-0,229	0,130
<b>Körpergröße</b>	0,112	0,447
<b>Körpergewicht</b>	0,039	0,790
<b>pack years</b>	-0,211	0,150
<b>EF</b>	-0,136	0,362
<b>LVDD</b>	0,055	0,729
<b>GFR</b>	-0,129	0,381
<b>Alter</b>	-0,167	0,256
<b>BMI</b>	-0,007	0,960

Tabelle 12– Korrelation von ADMA mit allen Kovariaten nach Spearman ( $\rho$ ) für Gruppe 2

## ADMA in Abhängigkeit von kategorialen Faktoren innerhalb der Gruppe 2

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ADMA-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Faktoren in der Gruppe 2 festgestellt werden. Die Ergebnisse für ADMA in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren für Gruppe 2 sind in Tabelle 13 dargestellt.

<b>Variable</b>	<b>Chi-Quadrat</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Geschlecht</b>	0,041	0,839
<b>EF-Klassen</b>	4,809	0,090
<b>Angina pectoris</b>	0,025	0,873
<b>KHK</b>	3,030	0,387
<b>GFR-Klassen</b>	4,914	0,086
<b>GFR-Klassen extended</b>	7,574	0,056

Tabelle 13 – Kruskal-Wallis-Test für alle Variablen mit mehreren Kategorien – für ADMA innerhalb der Gruppe 2

### **Generalisiertes Lineares Model für ADMA innerhalb der Gruppe 2**

Es wurde keine GLM durchgeführt.

### **Auswertung der Messwerte für Homoarginin**

#### **Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Kovariaten für die Gruppe 1**

Die Homoarginin-Konzentrationen nahmen mit steigenden Zonulin-Konzentrationen signifikant zu ( $p < 0,001$ ). Außerdem gingen mit steigenden Tryptophan-Spiegeln signifikant höhere Homoarginin-Konzentrationen einher ( $p = 0,006$ ). Probanden mit einer höheren GFR hatten signifikant höhere Homoarginin-Spiegel ( $p = 0,023$ ), und bei höherem BMI und größerem Körpergewicht zeigten sich signifikant höhere Homoarginin-Werte ( $p = 0,004 / 0,021$ ). Die Ergebnisse der Korrelation nach Spearman ( $\rho$ ) von Homoarginin mit allen metrischen Kovariaten für das Gesamtkollektiv sind in Tabelle 14 dargestellt.



Variable	Korrelationskoeffizient $\rho$	p-Wert
ln ADMA	-0,007	0,922
ln Nitrotyrosin	-0,110	0,109
<b>ln Zonulin</b>	<b>0,245</b>	<b>&lt;0,001</b>
Carbonylproteine	-0,011	0,876
ln Kreatinin	-0,098	0,155
ln hs CRP	-0,067	0,329
ln MPO	0,023	0,738
ln Kynurenin	-0,097	0,158
<b>Tryptophan</b>	<b>0,189</b>	<b>0,006</b>
ln oxLDL	-0,015	0,833
ln CMLCalprotectin	0,013	0,851
Körpergröße	0,017	0,806
<b>Körpergewicht</b>	<b>0,158</b>	<b>0,021</b>
pack years	-0,055	0,427
EF	0,052	0,455
LVDD	-0,091	0,212
<b>GFR</b>	<b>0,156</b>	<b>0,023</b>
Alter	-0,077	0,266
<b>BMI</b>	<b>0,194</b>	<b>0,004</b>

Tabelle 14 – Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Kovariaten nach Spearman ( $\rho$ ) für das Gesamtkollektiv

### Homoarginin in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren innerhalb der Gruppe 1

Die Konzentration von Homoarginin war bei Probanden mit einer GFR unter 30ml/min signifikant niedriger als bei Probanden mit einer normalen GFR (über 60ml/min) ( $p= 0,01$ ). Außerdem waren die Homoarginin-Spiegel bei Probanden mit einem hsCRP-Wert kleiner 10 mg/l signifikant höher als bei Probanden mit einem hsCRP-Wert über 10mg/l ( $p=0,025$ ).

Die Ergebnisse für Homoarginin in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren für das Gesamtkollektiv sind in Tabelle 15 dargestellt.

Variable	Testwert	p-Wert
Geschlecht	-1,901	0,057
EF-Klassen	2,225	0,329
Angina pectoris	-0,679	0,497
KHK	0,665	0,881
Diabetes mellitus Typ 2	-0,225	0,822
<b>GFR-Klassen</b>	<b>7,440</b>	<b>0,024</b>
<b>GFR-Klasse: 1 vs 3</b>	<b>-2,560</b>	<b>0,010</b> (Bonferroni -Korrektur $p < 0,0167$ )
<b>GFR-Klasse: 2 vs 3</b>	<b>-1,756</b>	<b>0,079</b> (Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ )
<b>GFR-Klasse: 1 vs 2</b>	<b>-1,456</b>	<b>0,146</b> (Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ )
<b>GFR-Klassen extended</b>	<b>7,440</b>	<b>0,059</b>
<b>Hochsensitives CRP&lt;10</b>	<b>-2,239</b>	<b>0,025</b>

Tabelle 15 – Mann-Whitney-Test für alle Faktoren mit einem Paarvergleich und Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehr als zwei Ausprägungen - für Homoarginin innerhalb des Gesamtkollektivs

### Generalisiertes Lineares Model für Homoarginin innerhalb der Gruppe 1

Die Konzentration von Homoarginin stieg bei höheren Zonulin-Konzentrationen signifikant an ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 7). Außerdem konnten bei höheren Tryptophan-Konzentrationen auch signifikant höhere Homoarginin-Spiegel gemessen werden ( $p = 0,004$ ) (siehe Abbildung 8). Und mit einem erhöhten BMI gingen signifikant größere Homoarginin-Konzentrationen einher ( $p = 0,02$ ) (siehe Abbildung 9). Außerdem hatten Probanden mit einem höheren Körpergewicht signifikant höhere Homoarginin-Spiegel ( $p = 0,02$ ) (siehe Abbildung 10). Bei Probanden mit einem hsCRP unter 10 mg/l war die Homoarginin-Konzentration signifikant höher als bei Probanden mit erhöhten hsCRP-Werten ( $p = 0,001$ ) (siehe Abbildung 11). Alle Ergebnisse des GLM für Homoarginin sind in Tabelle 16 dargestellt. Aufgrund der Kollinearität von Körpergewicht und daraus errechnetem BMI wurden der BMI und das Körpergewicht getrennt in dem GLM berücksichtigt, das gleiche gilt für GFR und GFR-Klassen.

Variable	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	p-Wert
<b>ln Zonulin</b>	<b>0,417</b>	0,1130	<b>&lt;0,001</b>
<b>hs CRP &gt;10 vs &lt;10</b>	<b>-0,305</b>	0,0926	<b>0,001</b>
<b>GFR</b>	0,000	0,0014	0,871
<b>Tryptophan</b>	<b>0,005</b>	0,0017	<b>0,004</b>

<b>BMI</b>	<b>0,013</b>	0,0056	<b>0,020</b>
<b>Körpergewicht</b>	<b>0,004</b>	0,0016	<b>0,020</b>
<b>GFR-Klasse =1</b>	0,127	0,1125	0,259
<b>GFR-Klasse =2</b>	0,128	0,1111	0,248
<b>GFR-Klasse =3</b>	0 (Bezugsklasse)		

Tabelle 16 - GLM für Homoarginin innerhalb der Gesamtkohorte

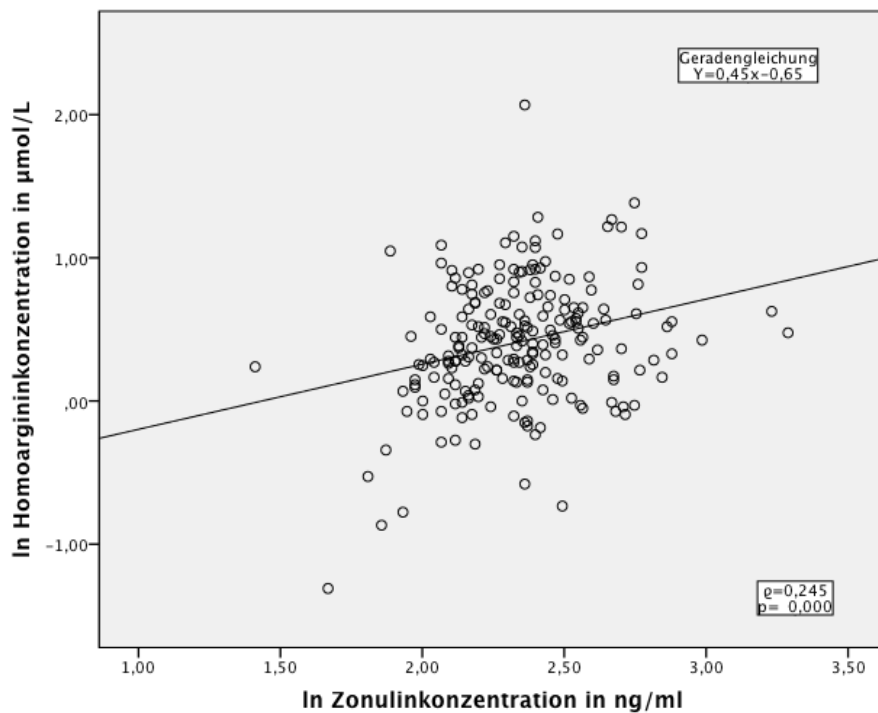


Abbildung 7- Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Zonulin innerhalb der Gesamtkohorte.  $q$ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

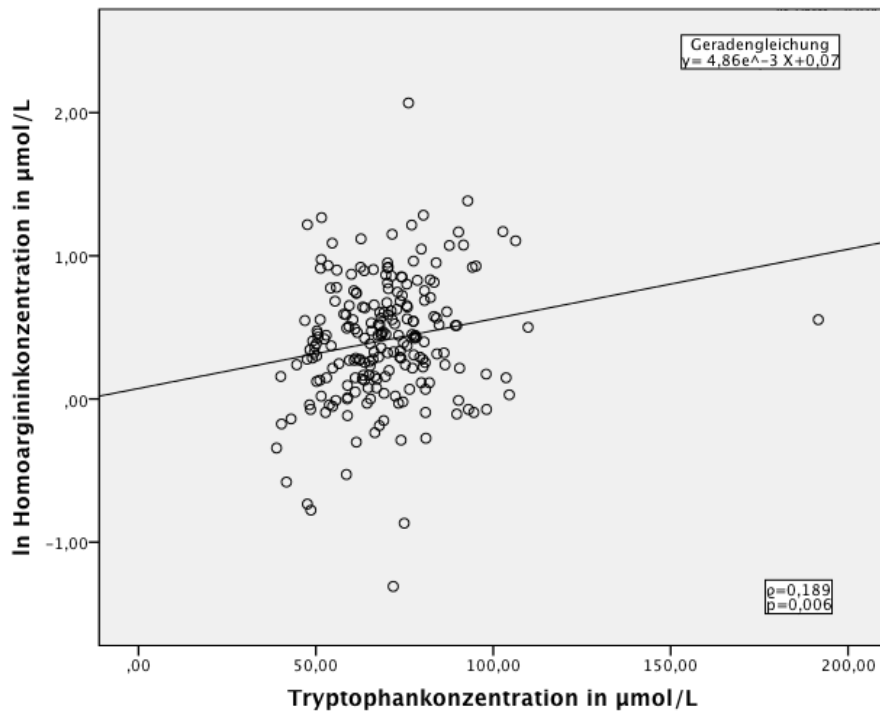


Abbildung 8- Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Tryptophan innerhalb der Gesamtkohorte.  $\rho$ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

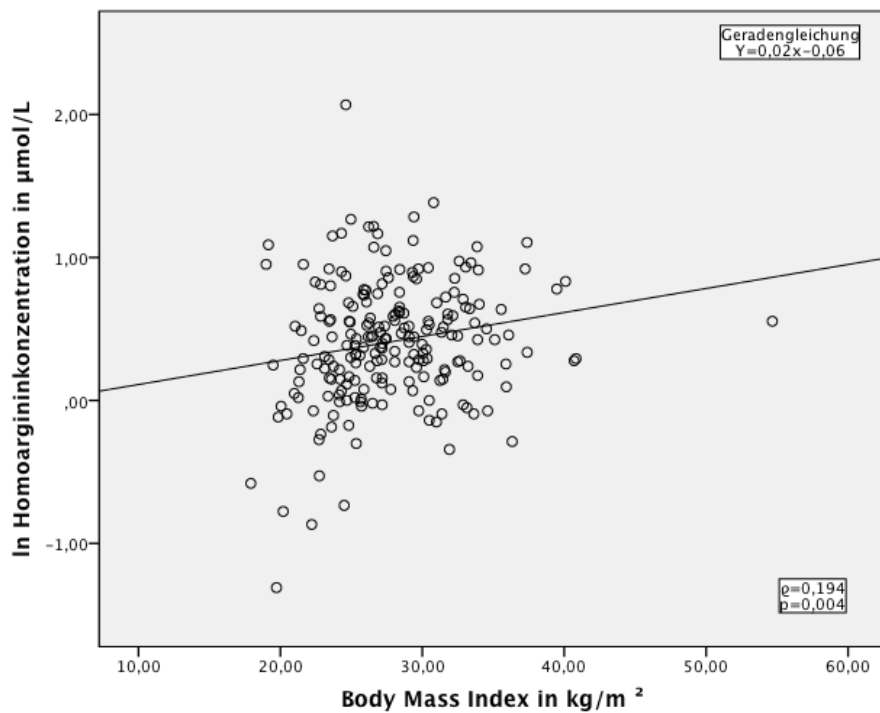


Abbildung 9 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Body Mass Index innerhalb der Gesamtkohorte.  $\rho$ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

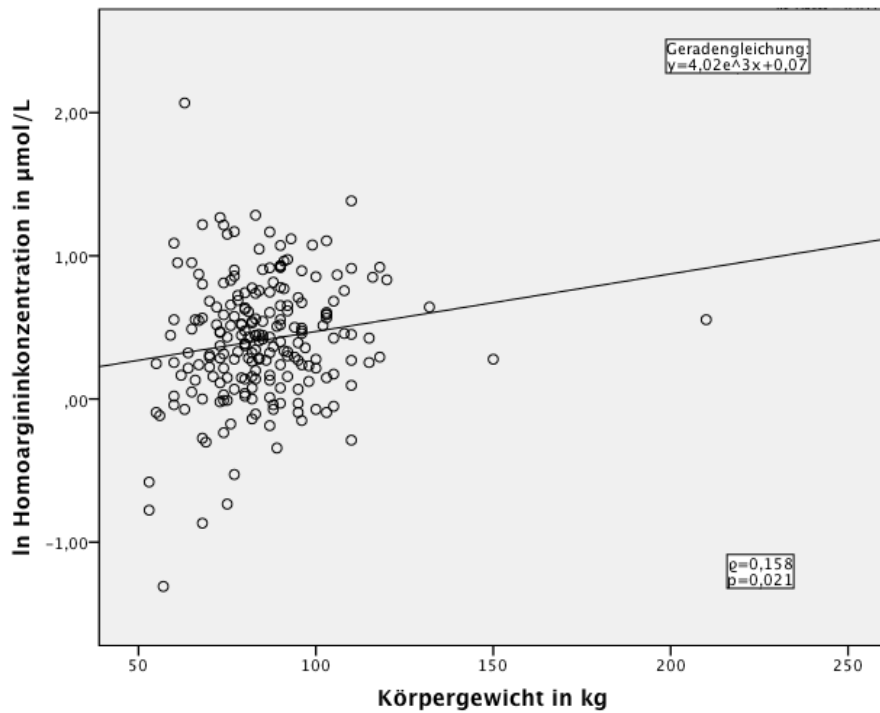


Abbildung 10 - Graphische Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen Homoarginin und Körpergewicht innerhalb der Gesamtkohorte.  $\rho$ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

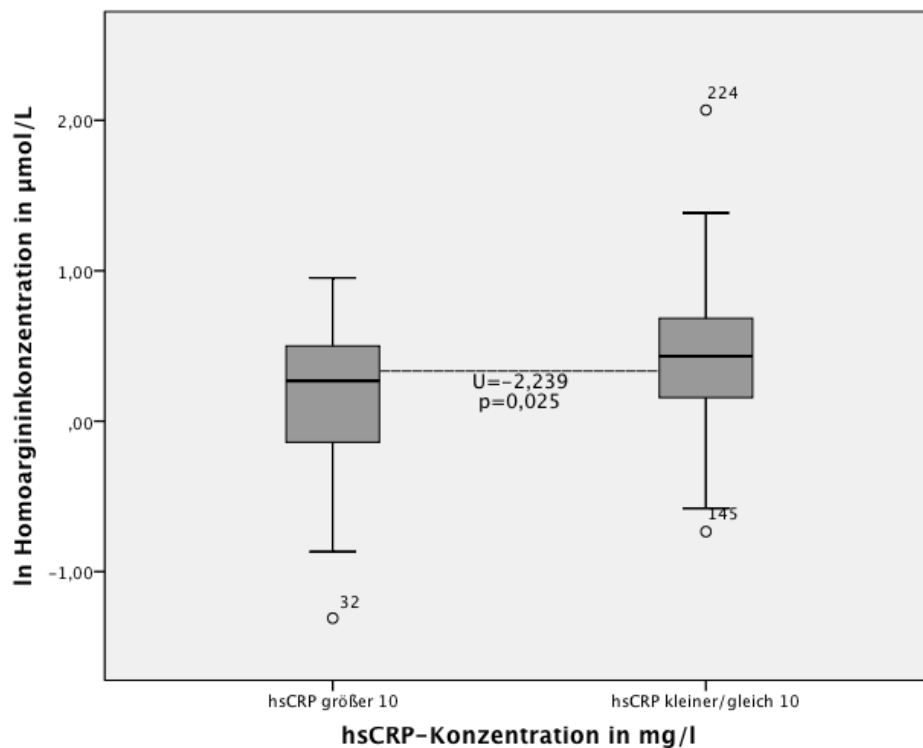


Abbildung 11 - Graphische Boxplots der Homarginin-Konzentrationen innerhalb der Gruppen mit einem hsCRP-Wert kleiner und größer 10 für die Gesamtkohorte. U: Testwert im Mann-Whitney-Test

## Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Kovariaten für die Gruppe 2

Es konnten keine signifikanten univariaten Korrelationen der Homoarginin-Konzentrationen mit einzelnen metrischen Kovariaten in der Gruppe 2 festgestellt werden.

Alle Ergebnisse der Korrelation nach Spearman ( $\rho$ ) für Homoarginin innerhalb der Gruppe 2 sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

<b>Variable</b>	<b>Korrelationskoeffizient <math>\rho</math></b>	<b>p-Wert</b>
<b>ln ADMA HPLC</b>	0,259	0,076
<b>ln Nitrotyrosin</b>	-0,239	0,101
<b>ln Zonulin</b>	0,100	0,500
<b>Carbonylproteine</b>	0,266	0,068
<b>ln Kreatinin</b>	-0,045	0,760
<b>ln hochsensitives CRP</b>	0,087	0,557
<b>ln Myeloperoxidase</b>	-0,005	0,974
<b>ln Kynurenin</b>	0,133	0,367
<b>Tryptophan</b>	-0,016	0,914
<b>ln oxidiertes LDL</b>	0,075	0,614
<b>ln CMLCalprotectin</b>	0,021	0,891
<b>Körpergröße</b>	-0,006	0,969
<b>Körpergewicht</b>	0,158	0,282
<b>pack years</b>	-0,057	0,698
<b>EF</b>	0,063	0,674
<b>LVDD</b>	-0,050	0,754
<b>GFR</b>	0,75	0,613
<b>Alter</b>	-0,210	0,151
<b>BMI</b>	0,229	0,118

Tabelle 17 – Korrelation von Homoarginin mit allen metrischen Variablen nach Spearman ( $\rho$ ) für Gruppe 2

## Homoarginin in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren innerhalb der Gruppe 2

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Homoarginin-Konzentrationen innerhalb der einzelnen kategorialen Faktoren in der Gruppe 2 festgestellt werden. Die Ergebnisse für

Homoarginin in Abhängigkeit von den kategorialen Faktoren für Gruppe 2 sind in Tabelle 18 dargestellt.

<b>Variable</b>	<b>Chi-Quadrat</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Geschlecht</b>	0,012	0,913
<b>EF-Klassen</b>	1,428	0,490
<b>Angina pectoris</b>	0,121	0,728
<b>KHK</b>	1,207	0,751
<b>GFR-Klassen</b>	2,059	0,357
<b>GFR-Klassen extended</b>	2,374	0,498

Tabelle 18 – Kruskal-Wallis-Test für alle Faktoren mit mehreren Kategorien mit Homoarginin innerhalb der Gruppe 2

### **Generalisiertes Lineares Model für Homoarginin innerhalb der Gruppe 2**

Es wurde keine GLM durchgeführt.

## Diskussion

### **Einleitung in die Diskussion**

In dieser Studie wurden die Zusammenhänge von ADMA und Homoarginin mit anderen Plasmabiomarkern des oxidativen Stresses und der endothelialen Dysfunktion sowie klinischen Parametern der renalen und kardialen Funktion innerhalb einer kardiovaskulären Hochrisikogruppe untersucht. Es sollten dadurch die Interaktion dieser Parameter untersucht und Rückschlüsse auf die Pathophysiologie gezogen werden, um Impulse für die weitere Erforschung dieser Biomarker zu setzen.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Innerhalb der gesamten Kohorte konnte durch die multivariate Analyse ein hochsignifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Homoarginin-Konzentration und der Zonulin-Konzentration nachgewiesen werden. Die Homoarginin-Spiegel und die Tryptophan-Spiegel der Probanden korrelierten positiv. Bei Probanden ohne akute Entzündung (hsCRP-Konzentrationen unter 10 mg/l) wurden signifikant höhere Homoarginin-Spiegel als bei Probanden mit akuter Entzündung gemessen. Außerdem korrelierten die Homoarginin-Spiegel signifikant positiv mit dem BMI der Patienten und ihrem Körpergewicht.

Des Weiteren konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der zirkulierenden ADMA-Konzentration und dem Plasmakreatinin-Wert der Patienten nachgewiesen werden. Bei Probanden mit schwerer Herzinsuffizienz (EF unter 25%) wurden signifikant höhere ADMA-Konzentrationen im Vergleich zu Probanden mit moderater Einschränkung oder normaler EF gemessen.

Im Methodenvergleich ergab sich eine insgesamt geringe Übereinstimmung der ADMA-Konzentrationen, die mittels HPLC und ELISA gemessen wurden. Diese könnte durch die Kreuzreaktivität der ELISA-Antikörper mit anderen Monomethylargininen bedingt sein (119).

In der Gruppe der Diabetiker ohne akute Entzündung konnten keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.

### **Studienpopulation**

Die Zusammenhänge der einzelnen Parameter wurden in einer kardiovaskulären Hochrisikokohorte von AICD-Trägern untersucht. Davon trug der überwiegende Anteil der Gruppe einen AICD zur primären Prävention (69%) des plötzlichen Herztodes, während er bei



dem geringeren Anteil (31%) zur Sekundärprävention diene. Die Größe der Kohorte ist vergleichbar mit der anderer Studien zu diesem Thema (110, 115).

## **ADMA**

Die mittlere mittels HPLC gemessene ADMA-Konzentration in dieser Kohorte lag bei  $0,78 \pm 0,19$   $\mu\text{mol/L}$ , dies entspricht in etwa den gemessenen ADMA-Konzentrationen in der CAVASIC- und LURIC-Studie an Patienten mit pAVK oder KHK (107, 115). In populationsbasierten Studien wurden niedrigere ADMA-Konzentrationen gemessen (22, 120), während in der 4D-Studie an dialysepflichtigen Diabetikern die ADMA-Konzentration im Vergleich höher lag (107). Dies spricht insgesamt für eine Erhöhung der ADMA-Konzentration mit zunehmender Schwere des Krankheitsbildes der Probanden.

Zwischen dem Alter der Probanden und ihren ADMA-Spiegeln im Plasma konnte in dieser Studie kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Allerdings wurde in dieser Studie eine deutlich geringere Altersspanne (IQR: 60-76a) untersucht. In anderen größeren Studien nahm die ADMA-Konzentration mit zunehmendem Alter zu (22, 76).

Es ist erwiesen, dass postmenopausale Frauen signifikant höhere ADMA-Konzentrationen im Blut haben als Männer (76). Dieser Unterschied könnte hormonell bedingt sein, da eine Hormontherapie bei postmenopausalen Frauen zu einer Senkung der ADMA-Spiegel führte (121).

In dieser Studie konnte kein geschlechterspezifischer Unterschied der ADMA-Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies ist sicherlich durch die Ungleichverteilung der Geschlechter (80% männlich) in der Probandengruppe bedingt.

ADMA wird nur zu einem geringen Teil direkt über die Niere ausgeschieden, hauptsächlich wird es durch die DDAH abgebaut (37). Die Abbauprodukte, Dimethylamin und Citrullin, werden anschließend direkt über die Niere ausgeschieden. Es ist erwiesen, dass ADMA bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz akkumuliert (13). In dieser Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und den Plasmakreatinin-Spiegel der Patienten nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich in der univariaten Korrelation zunächst eine negative Korrelation zwischen ADMA und der GFR nachweisen, diese war jedoch in der multivariaten Analyse nicht mehr signifikant. Ein Großteil der Probanden hatte eine normale GFR über 60ml/min, während nur ein geringer Anteil der Probanden (7 %) eine GFR unter 30ml/min hatte. Dieses Ungleichgewicht könnte die fehlende Signifikanz der Studie bedingen. Andere Studien konnten eine negative Korrelation zwischen der GFR und dem ADMA-Spiegel der Probanden

nachweisen (22, 75, 76, 122). Erhöhte ADMA-Konzentrationen bei abnehmender GFR könnten durch die verminderte DDAH-Aktivität bei Patienten mit Nierenversagen bedingt sein oder eine ADMA-induzierte renale Schädigung durch verminderte NO-Verfügbarkeit widerspiegeln (123). Außerdem konnte in einer prospektiven Studie an Patienten mit terminalen Nierenversagen nachgewiesen werden, dass erhöhte ADMA-Konzentrationen ein unabhängiger Risikomarker für die Gesamtmortalität und das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen sind (66).

ADMA ist ein natürlich vorkommender endogener Inhibitor der eNOS13. Dadurch hemmt ADMA die NO-Produktion und führt zu einer lokalen Vasokonstriktion bei intraarterieller Applikation (124). Erhöhte ADMA-Konzentration gehen mit einem erhöhten systolischen Blutdruck am Menschen einher (37). Auch bei Patienten mit essentieller Hypertonie konnten erhöhte ADMA-Konzentrationen nachgewiesen werden (58). In der populationsbasierten Studie aus Pommern korrelierte ADMA positiv mit dem systolischen und diastolischen Blutdruck der Probanden (22). Aufgrund fehlender Werte konnte der Einfluss von ADMA auf den Blutdruck in dieser Studie nicht untersucht werden. Es liegen allerdings auch Studien vor, in denen kein Zusammenhang zwischen dem Hypertonus und der ADMA-Konzentration der Probanden nachgewiesen werden konnte (75, 76, 125).

Außerdem sind in der Literatur Zusammenhänge zwischen ADMA und den anderen Faktoren des metabolischen Syndroms beschrieben. In einer Studie an adipösen Frauen konnten eine signifikante Verringerung der ADMA-Konzentration nach Gewichtsreduktion durch eine bariatrische Operation nachgewiesen werden (125).

Es liegen weitere Studien vor, in denen eine positive Korrelation zwischen ADMA und dem BMI der Probanden nachgewiesen werden konnte (22, 74, 120). In dieser Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen ADMA und dem BMI der Probanden nachgewiesen werden, und auch in anderen größeren Studien zeigte sich keine Verbindung zwischen der ADMA-Konzentration und dem BMI der Probanden (75, 76). Der Zusammenhang zwischen ADMA und dem BMI bleibt ungeklärt und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

In der Literatur sind erhöhte ADMA-Spiegel bei Patienten mit DMT2 beschrieben (23). In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der ADMA-Konzentration im Blut der Probanden und der Erkrankung an DMT2 nachgewiesen werden. Dies ist einerseits auf die geringe Anzahl der Probanden mit DMT2 zurückzuführen. Andererseits wurde keine erneute Bestimmung der Blutglukosespiegel bei den Patienten vorgenommen, sondern allein die anamnestische Angabe einer Erkrankung an DMT2 führte zur Einteilung in die Gruppe der Diabetiker. In einer Studie konnte eine Erhöhung der ADMA-Spiegel bei Patienten mit einer Insulinsresistenz nachgewiesen werden (61). In der LURIC-Studie wurde eine positive Korrelation der ADMA-

Spiegel mit der Erkrankung der Probanden an DMT2 nachgewiesen (76). Allerdings existieren auch Studien, in denen keine Verbindung zwischen erhöhten ADMA-Spiegeln und der Erkrankung an DMT2 nachgewiesen werden konnten (20, 120). Dies spricht eher für einen Zusammenhang der ADMA-Konzentrationen mit dem Grad der Endorganschädigung und dem daraus hervorgehenden kardiovaskulärem Risiko als mit der Erkrankung per se. Damit einher geht außerdem, dass kein Zusammenhang zwischen Carboxymethyllysine–Calprotectin, einem Endprodukt der fortgeschrittenen Glykierung, und ADMA nachgewiesen werden konnte.

Außerdem konnte keine Verbindung zwischen der Anzahl der pack years der Probanden und den ADMA-Spiegeln in ihrem Blut nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie eine deutliche Erhöhung der ADMA-Konzentrationen bei aktiven Rauchern nachgewiesen werden (126). In einer Querschnittsstudie an gesunden Männern konnte nur eine geringer Erhöhung (um 6 %) der ADMA-Spiegel von Rauchern, verglichen mit Nichtrauchern, nachgewiesen werden (114). Und in der LURIC-Studie war der positive Zusammenhang zwischen ehemaligem und aktuellem Nikotinabusus und der ADMA-Konzentration nach Berücksichtigung anderer Einflussgrößen nicht mehr signifikant (76). Das Fehlen eines signifikanten Zusammenhangs in dieser Studie könnte durch die fehlende Differenzierung aktiver und ehemaliger Raucher bedingt sein, insgesamt spricht die Datenlage in der Literatur allerdings dafür, dass erhöhte ADMA-Spiegel bei Nikotinabusus auftreten.

In dieser Probandengruppe konnte kein Zusammenhang zwischen der hsCRP- und ADMA-Konzentration der Probanden nachgewiesen werden. An Dialysepatienten konnte eine positive Korrelation zwischen ADMA und CRP nachgewiesen werden und beide galten nachweislich als Prädiktor für das Fortschreiten von Intimaschäden in der Carotis (127). Auch in anderen Studien konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der ADMA-Konzentration und dem hsCRP-Spiegel der Patienten nachgewiesen werden, dies spricht insgesamt für ADMA als Indikator der chronischen Inflammation (76, 125). Der fehlende Zusammenhang in dieser Studie könnte durch die Probandenzahl bedingt sein, allerdings existieren weitere Studien, in denen kein Zusammenhang zwischen dem hsCRP- und ADMA-Spiegel der Probanden nachgewiesen werden konnte (20, 75). Die Rolle von ADMA im Hinblick auf die chronische Inflammation sollte in weiteren Studien untersucht werden.

In dieser Studie wurde außerdem der Zusammenhang von Biomarkern des nitrosativen und oxidativen Stresses mit der Homoarginin-Konzentration im Plasma untersucht.

Dabei ergab sich kein Zusammenhang zwischen der ADMA –Konzentration und Nitrotyrosin oder Carbonylproteinen.

In einer Studie konnten, nach Inkubation von Zellen mit oxLDL, erhöhte ADMA-Konzentrationen durch Hemmung der DDAH-Aktivität nachgewiesen werden (128). Es wird angenommen, dass die Ausschüttung von ADMA aus den Endothelzellen durch natives oder oxidiertes LDL gesteigert wird. So könnte die Hypercholesterinämie mit erhöhten ADMA-Spiegeln einhergehen und zu endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose führen (28). In dieser Studie konnte keine Korrelation zwischen den ADMA-Spiegeln und der oxLDL-Konzentration der Probanden nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie an Patienten mit polyzystischem Nierenversagen und erhaltener Nierenfunktion, in der ADMA und oxLDL positiv korrelierten (129). Generell liegen allerdings weitere Studien vor, in denen keine Korrelation zwischen normalem LDL und der ADMA-Konzentration nachgewiesen werden konnte (76). Damit einher geht auch ein fehlender Zusammenhang zwischen ADMA und der Myeloperoxidase in dieser Studie.

Die myokardiale Funktion könnte durch die ADMA-induzierte Hemmung der NO-Synthese beeinträchtigt werden (130). Durch die verminderte NO-Verfügbarkeit kommt es zu einer gestörten Relaxation der Koronararterien, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Verstärkung von proinflammatorischen Prozessen (130). Es sind bereits erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Patienten mit Herzinsuffizienz beschrieben (17, 131). Außerdem konnten erhöhte ADMA-Konzentration bei Patienten mit kardiogenem Schock im Vergleich zu KHK-Patienten ohne kardiogenen Schock nachgewiesen werden (81). Patienten mit akuter Herzinsuffizienz hatten höhere ADMA-Spiegel als Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (82). In dieser Studie konnte eine Erhöhung der ADMA-Konzentration bei Patienten mit einer EF von unter 25 % im Vergleich zu Patienten mit einer EF zwischen 50 und 25 % nachgewiesen werden. In der Literatur korrelierte ADMA positiv mit NTproBNP bei 1396 kardiovaskulären Risikopatienten mit erhaltener LVEF (122), und es wurde eine positive Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und der NYHA-Klasse von Patienten nachgewiesen (131). Zusammenfassend korreliert ADMA mit der kardialen Funktion von Herzinsuffizienten in der Mehrzahl der Studien.

Außerdem könnte ADMA zur Pathogenese der Artherosklerose beitragen, da es Anteil an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion durch Hemmung der NO-Synthase hat (13, 24, 47). Die endotheliale Dysfunktion führt wiederum zur Entstehung der Artherosklerose (2). In der AthroGene-Studie und der CARDIAC-Studie an Probanden mit KHK konnten erhöhte ADMA-Konzentrationen im Blut nachgewiesen werden (74, 75). In dieser Studie gelang kein Nachweis einer Abhängigkeit der ADMA-Konzentration von der Anzahl der von Artherosklerose betroffenen Anzahl der Herzkrankgefäße. Auch in der LURIC-Studie konnten keine signifikanten

Unterschiede der ADMA-Konzentrationen bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Erkrankung an KHK und Patienten ohne KHK nachgewiesen werden (76). Allerdings wurde die Rolle von ADMA als unabhängiger Risikomarker für die kardiovaskuläre Mortalität und die Gesamtmortalität in dieser Studie bestätigt (76).

Insgesamt gilt ADMA inzwischen als etablierter kardiovaskulärer Risikomarker bei Patienten mit DMT2 (63), mit pAVK (20), mit NI (66), Herzinsuffizienz (80), mit KHK (65, 67, 75) und bei initial gesunden Probanden (120).

### **Messmethodenvergleich ADMA**

Die quantitative und qualitative Analyse von Aminosäuren in biologischen Proben stellt eine große Herausforderung dar. Dies liegt zum einen an der hohen Anzahl verschiedener Aminosäuren und deren unterschiedlichen chemischen Strukturen sowie physikalisch-chemischen Eigenschaften (Stabilität). Andererseits liegen Aminosäuren zum Teil in stark differierenden Konzentrationsdimensionen vor (9). Bei der Bestimmung von ADMA muss dieses sowohl von in vergleichsweise viel größeren Mengen vorliegendem Arginin getrennt werden als auch von anderen Monomethylargininen. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine zuverlässige und oft genutzte Methode zur Bestimmung von Homoarginin und ADMA. Auch die Massenspektrometrie (MS) kombiniert mit der Flüssigchromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC) ist eine validierte Messmethode. Der Nachteil dieser Methoden liegt allerdings in der erschwerten Reproduktion von Ergebnissen und den hohen Kosten dieser Methoden. 2004 beschrieben Schulze et al. erstmals den enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) für die ADMA-Bestimmung, der durch die hohen Verarbeitungszahlen einen Vorteil bietet (119). Im Methodenvergleich unserer Studie ergab sich eine insgesamt geringe Übereinstimmung der ADMA-Konzentrationen, die mittels HPLC und ELISA gemessen wurden. Eine geringe Übereinstimmung der quantitativen ADMA-Analyse zwischen ELISA und HPLC wurde auch von Valtonen et al. 2005 beschrieben. Dabei hatte die HPLC-Methode eine bessere Sensitivität und Selektivität im Vergleich zum ELISA-Test, der einen höheren Probendurchlauf erlaubte (118). Im Gegensatz dazu beschrieben Schulze et al. eine hohe Sensitivität und Spezifität des ELISA Test-Kits mit einer zu vernachlässigenden Kreuzreaktivität mit L-Arginin (119). Allerdings hatten bei Schulze et al. nur wenige der gemessenen Proben eine ADMA-Konzentration unterhalb 1µM, während bei Valtonen et al. Unterschiede zwischen beiden Messmethoden, vor allem im Bereich der kleineren Konzentrationen, auftraten. In dieser Studie lag der Mittelwert der ADMA-Konzentration

zwischen 0,71  $\mu\text{M}$  (mittels ELISA) und 0,78  $\mu\text{M}$  (mittels HPLC) und damit deutlich unterhalb des von Schulze et al. getesteten Konzentrationsbereiches. Die geringe Übereinstimmung beider Messmethoden in dieser Studie könnte durch die Kreuzreaktivität der ELISA- Antikörper mit anderen Monomethylargininen bedingt sein. Erschwerend kommt hinzu, dass ADMA insgesamt ein sehr kleines Referenzintervall aufweist, so dass der Unterschied der ADMA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Probandengruppen sehr klein ist und daher nur mit einer großen Fallzahl signifikante Unterschiede detektiert werden können (117).

## **Homoarginin**

Die mittlere Homoarginin-Konzentration dieser Hochrisikohorte lag bei  $1,65 \pm 0,79 \mu\text{mol/l}$ . Sie ist vergleichbar mit den dokumentierten Homoarginin-Konzentrationen anderer Studien ähnlicher Größe an kardial und vaskulär erkrankten Patienten, die sich der gleichen Messmethode bedienten (110, 115). In der Dallas Heart Studie, einer größeren prospektiven Bevölkerungsstudie an 3514 Patienten, und in der LURIC-Studie an 3305 Patienten, die zur Koronarangiographie aufgenommen wurden, sind höhere durchschnittliche Homoarginin-Konzentrationen im Plasma beschrieben (107, 116). Auch eine Studie an 1395 gesunden Probanden in Pommern ergab ein deutlich höheres Referenzintervall von 2.63 (IQR 2.08; 3.32)  $\mu\text{mol/l}$  für die Homoarginin-Konzentration im Plasma (132). Die niedrigeren Homoarginin-Konzentrationen in dieser Kohorte könnten an dem fortgeschrittenen Krankheitsstadium der Patienten liegen und sprechen für eine Verminderung der zirkulierenden Homoarginin-Konzentration bei schwerer kardiovaskulär erkrankten Probanden.

Zwischen dem Alter der Probanden und ihren Homoarginin-Spiegeln im Plasma konnte in dieser Studie kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Allerdings wurde in dieser Studie eine deutlich geringer Alterspanne (IQR: 60-76a) untersucht. In anderen größeren Bevölkerungsstudien nahm die Homoarginin-Konzentration mit zunehmendem Alter ab (107, 108, 132). Dies ist zum Teil auf eine verminderte renale Funktion der älteren Probanden zurückzuführen (7). So konnte in einer anderen großen Bevölkerungsstudie an im Durchschnitt jüngeren Patienten kein Zusammenhang zwischen der Homoarginin-Konzentration und dem Alter der Probanden nachgewiesen werden (116).

In dieser Studie ergab sich kein Unterschied der Homoarginin-Spiegel zwischen den beiden Geschlechtern. Dagegen waren in größeren Studien die Homoarginin-Konzentrationen im Plasma bei Männern höher als bei Frauen (107, 108, 116, 132). Der fehlende Unterschied in

dieser Studie könnte durch die Ungleichverteilung der Geschlechter in der vorliegenden Probandengruppe, in der 80% männlich waren, bedingt sein.

Homoarginin ist unter anderem in den Energiestoffwechsel involviert. Das Schlüsselenzym der Homoarginin-Synthese, AGAT, katalysiert die Synthese von Guanidinoacetat, einer Vorstufe von Kreatin (133). Cullen stellte in diesem Zusammenhang die Hypothese auf, dass Energiemangel zu einer erhöhten Expression von AGAT im Myokard bei Herzinsuffizienten führt und so die Kreatin-Synthese gesteigert wird (133). In dieser Studie konnten reduzierte Homoarginin-Spiegel bei Patienten mit einem niedrigen BMI nachgewiesen werden, das heißt die Homoarginin-Konzentration im Plasma nahm mit sinkendem Körpergewicht der Probanden ab. Auch in anderen Studien konnte dieser Zusammenhang zwischen verminderten Homoarginin-Konzentrationen und einem niedrigen BMI, sowohl an gesunden als auch an kardial, renal und vaskulär erkrankten Individuen, nachgewiesen werden (6, 107, 108, 115, 116, 134). Auch in einer experimentellen Studie an Mäusen mit AGAT-Mangel konnten ein reduzierter BMI sowie ein Kreatin-Mangel nachgewiesen werden. Damit einher gingen die Aktivierung der AMP-Kinase und eine katabole Stoffwechsellaage (100). Es scheint daher möglich, dass niedrige Homoarginin-Spiegel ein katabole Stoffwechsellaage indizieren.

Obwohl in der zuvor erwähnten experimentellen Studie an Mäusen mit AGAT-Mangel eine verminderte Gluconeogenese und eine erhöhte Glucosetoleranz nachgewiesen werden konnten (100), konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen Homoarginin und der Erkrankung an DMT2 nachgewiesen werden. In der Literatur sind uneinheitliche Zusammenhänge zwischen der Erkrankung an DMT2 und der Homoarginin-Konzentration von Patienten dokumentiert. So konnten einerseits erniedrigte Homoarginin-Spiegel bei Patienten mit DMT2 nachgewiesen werden (116). Und niedrige Homoarginin-Spiegel korrelierten mit der Länge der Erkrankung an DMT2 in einer Studie an dialysepflichtigen Diabetikern (107). Andererseits konnten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die noch nicht dialysepflichtig waren, höhere Homoarginin-Spiegel bei an DMT2 Erkrankten festgestellt werden (134). Die Homoarginin-Konzentrationen könnte daher eher mit dem Grad der Endorganschädigung durch DMT2 zusammenhängen als mit dem direkten Auftreten der Erkrankung. Insgesamt bleibt der Zusammenhang zwischen DMT2 und Homoarginin unklar und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

In dieser Studie ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem Nikotinabusus und den Homoarginin-Spiegeln der Probanden. Interessanterweise konnten in Studien an Patienten mit pAVK, an gesunden Probanden und an älteren Probanden niedrigere Homoarginin-Konzentrationen im Plasma von Rauchern, verglichen mit Nichtrauchern und ehemaligen

Rauchern, nachgewiesen werden (114-116). In dieser Studie wurde nicht zwischen ehemaligen und aktiven Rauchern unterschieden, sondern die generelle Anzahl der pack years unabhängig vom aktuellen Status des Nikotinabusus verglichen. Das könnte eine Erklärung für den nicht nachweisbaren Zusammenhang zwischen der Rauchexposition der Probanden und der Homoarginin-Konzentration in deren Blut sein.

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Status der Inflammation und den Homoarginin-Konzentrationen der Probanden nachgewiesen werden. Probanden mit einer akuten Entzündung, gemessen an der hsCRP-Konzentration über 10 mg/L dieser Patienten, hatten verminderte Homoarginin-Spiegel. Eine inverse Beziehungen zwischen dem hsCRP-Spiegel und der Homoarginin-Konzentration konnten auch in anderen Studien festgestellt werden (97, 107, 115, 134).

Die Nierenfunktion und der Homoarginin-Stoffwechsel hängen laut aktueller Literatur eng zusammen. Die Niere ist einer der Orte, an dem die Transamidierung von L-Lysin zu Homoarginin stattfindet (89, 102). Diese Reaktion wird durch AGAT katalysiert, das hauptsächlich in der Niere exprimiert wird (133). Da die Homoarginin-Konzentration von der AGAT-Expression abhängt (96, 97), ist sie eng mit der Nierenfunktion verbunden. Zahlreiche klinische Studien belegen verminderte Homoarginin-Konzentrationen bei Patienten mit gestörter Nierenfunktion und eine positive Korrelation zwischen der GFR und der Homoarginin-Konzentration (6, 97, 107, 116, 134). In dieser Studie konnte dieser Zusammenhang nicht reproduziert werden. In der univariaten Analyse korrelierte die Homoarginin-Konzentration positiv mit der GFR und die Probanden mit einer schwer eingeschränkten GFR unter 30ml/min hatten geringere Homoarginin-Konzentrationen als Patienten mit einer normalen GFR über 90ml/min. Allerdings war dieser Zusammenhang in der multivariaten Analyse nicht mehr signifikant. Dies könnte daran liegen, dass nur 7 % der Probanden eine GFR unter 30ml/min hatten und diese Gruppe damit statistisch zu klein ist, um signifikante Unterschiede nachzuweisen.

In der Literatur gibt es mehrere Studien, die eine Korrelation zwischen hohen Homoarginin-Spiegeln und einem erhöhten systolischen Blutdruck nachweisen (95, 116). Nicht alle Studien konnten diesen Zusammenhang nachweisen und auf Grund fehlender Daten ließ sich dieser Zusammenhang in der vorliegenden Studie nicht untersuchen. Auch ist bisher ungeklärt, inwiefern Homoarginin einen Einfluss auf den NO-Stoffwechsel hat. Einerseits könnte es über die Konkurrenz mit Arginin als Substrat der NO-Synthase zu einer verminderten NO Synthese führen (105). Andererseits könnte Homoarginin als Substrat der Arginase dienen und so zu einer größeren Verfügbarkeit von Arginin für die NOS zur NO-Synthase führen (135). Im Gegensatz



dazu gilt ADMA nachweislich als ein endogener Inhibitor der NOS. In dieser Studie konnte weder eine positive noch eine negative Korrelation zwischen den ADMA- und Homoarginin-Spiegeln der Patienten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist kohärent mit dem anderer Studien, in denen auch kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Biomarkern nachgewiesen werden konnte (107, 116, 134). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass ADMA und Homoarginin die NO-Verfügbarkeit antagonistisch beeinflussen, so könnte laut Tsikas und Kayacelebi das Homoarginin/ADMA-Verhältnis eine größere Aussagekraft hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos bieten (136).

In dieser Studie wurde außerdem der Zusammenhang von Biomarkern des nitrosativen und oxidativen Stresses mit der Homoarginin-Konzentration im Plasma untersucht. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen Nitrotyrosin, einem Marker für nitrosativen Stress, und Homoarginin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie an 22 Patienten mit Takotsubo-Kardiomyopathie eine negative Korrelation beider Parameter nachgewiesen werden (137). Außerdem ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Carbonylproteinen und Homoarginin im Plasma der Patienten. Carbonylproteine gelten als Oxidationsprodukte von Proteinen und entstehen durch die Einwirkung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies auf die Zelle. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration an oxidiertem LDL und der Myeloperoxidase mit Homoarginin im Plasma der Probanden nachgewiesen werden. Im Allgemeinen führt die Aktivität der Myeloperoxidase zur Oxidierung von LDL, dieses führt nach Aufnahme in die Makrophagen zur Bildung von Schaumzellen, und ist damit direkt in die Entstehung der Artherosklerose involviert (138). Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen Carboxymethyllysine-Calprotectin, einem Endprodukt der fortgeschrittenen Glykierung, und Homoarginin festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist kohärent mit der fehlenden Assoziation zwischen der Erkrankung an DMT2 und den Homoarginin-Konzentrationen der Probanden.

Es konnte eine positive Korrelation zwischen Tryptophan und Homoarginin innerhalb der Kohorte festgestellt werden. Beide inhibieren verschiedene Isoenzyme der ALP (91). Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, die bei Säugertieren über den Kynurenin-Weg abgebaut wird. Allerdings konnte in dieser Studie keine Verbindung von Kynurenin und Homoarginin nachgewiesen werden. Ein erhöhter Abbau von Tryptophan wurde bereits mit der chronisch systemischen Inflammation (139) und der koronaren Herzkrankheit (140) in Verbindung gebracht. Bei Patienten mit DMT2 war eine verminderte Nierenfunktion und chronische Inflammation verbunden mit der Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten des Tryptophan (141). So könnten Homoarginin und Tryptophan in

Verbindung stehen, indem bei beiden Stoffen eine verminderte Konzentration ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko indiziert. Es besteht die Möglichkeit, dass beide einen protektiven Effekt auf das kardiovaskuläre System, durch die Inhibition der ALP, haben. Hohe ALP-Spiegel wurden bereits mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Hämodialyse-Patienten in Verbindung gebracht (142). Homoarginin hemmt die knochenspezifische ALP, sie wird in der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert und ihre erhöhte Aktivität führt zu einer Kalzifikation der Gefäße (143). Tryptophan hemmt die intestinale ALP, deren Erhöhung bei Patienten mit chronischem Nierenversagen nachgewiesen wurde (144). Die Aktivität der intestinale ALP im Rahmen der chronischen Inflammation und dem metabolischen Syndrom ist Gegenstand aktueller Forschung (145). Eine Hemmung der verschiedenen Subtypen der ALP durch Homoarginin und Tryptophan könnte zu einer verminderten Kalzifikation der Gefäße und einer verminderten chronischen systemischen Inflammation führen. Dies wäre ein Erklärungsansatz für den vermeintlichen protektiven Effekt beider Aminosäuren auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Außerdem scheint die Inhibition der ALP eine neue pathophysiologische Verbindung von Homoarginin zum kardiovaskulären Risiko und der Mortalität darzustellen, dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Interessanterweise konnte ein hoch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Homoarginin und zirkulierendem Zonulin innerhalb der Probandengruppe nachgewiesen werden. Zonulin gilt im Allgemeinen als Regulator von intestinalen interzellulären Verbindungen („tight junctions“), deren Modulation mit einer pathologischen Erhöhung der Durchlässigkeit der Darmschleimhaut bei Zöliakie einhergeht (146). Vor kurzem wurden erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem Zonulin mit einem erhöhten Risiko für metabolische Erkrankungen in Verbindung gebracht. In einer Studie wurde eine Verbindung zwischen erhöhten Zonulin-Spiegeln und einem erhöhten Hüftumfang, sowie erhöhtem diastolischen Blutdruck nachgewiesen (147). Bei Patienten unter Hämodialyse konnten signifikant höhere Zonulin-Plasmaspiegel nachgewiesen werden als bei gesunden Vergleichspatienten (148). Dies weist auf eine Verbindung zwischen erhöhten Zonulin-Konzentrationen und der Entstehung von chronischen inflammatorischen Veränderungen bei Patienten mit terminalem Nierenversagen hin. Daher scheint die positive Assoziation mit Homoarginin, dessen Konzentrationszunahme eher mit einer Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Komplikationen einhergeht, zunächst widersprüchlich. Allerdings konnte in einer Studie an HIV-Patienten eine höhere Überlebenschance für Patienten mit hohen Zonulin-Plasmaspiegeln nachgewiesen werden (149). Damit einhergehend könnte die Sekretion von Zonulin einen Abwehrmechanismus repräsentieren, da es vom Dünndarm als Reaktion auf enterische Bakterien ausgeschüttet wird

und zu einer schnellen Elimination dieser beiträgt (150). Außerdem kommen den Konzentrationsveränderungen von im Plasma zirkulierendem Zonulin und lokalen Zonulin-Spiegeln, zum Beispiel in Lunge und Darm, möglicherweise unterschiedliche Bedeutungen zu. Bisher ist der vorliegende Zusammenhang zwischen Zonulin und Homoarginin außerhalb der Kohorte in der Literatur nicht beschrieben und die zu Grunde liegende Physiologie der Verbindung bleibt unklar. Die statistischen Ergebnisse legen jedoch nahe, dass dieser Zusammenhang auch in größeren Probandengruppen Bestand haben wird.

Verschiedene Studien belegen verminderte Homoarginin-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit Herzinsuffizienz (95, 103, 107). In dieser Studie konnte im Gegensatz zu anderen Studien keine entscheidende Veränderung der Homoarginin-Spiegel im Plasma der Patienten in Abhängigkeit von der echokardiographisch bestimmten EF oder LVDD nachgewiesen werden. In einer anderen Studie an herzinsuffizienten Patienten konnte auch keine Verbindung zwischen der LVDD und der Homoarginin-Konzentration nachgewiesen werden (110). Allerdings waren in jener Studie die Homoarginin-Spiegel bei Patienten der NYHA-Klasse 3/4 deutlich niedriger als bei Patienten mit Symptomen der NYHA-Klasse 1/2 und die NTproBNP-Spiegel der Probanden korrelierten negativ mit den Homoarginin-Spiegeln (110). In einer anderen Studie ließ sich ein positiver Zusammenhang der Homoarginin-Konzentration mit der angiographisch bestimmten EF nachweisen (95). Das Fehlen signifikanter Zusammenhänge zwischen der Homoarginin-Konzentration und den Parametern der Herzinsuffizienz in dieser Studie könnte verschiedene Ursachen haben. Einerseits erfolgte zum Zeitpunkt des Einschlusses der Probanden in die Studie keine erneute echokardiographische Untersuchung, und so konnten eventuelle Veränderungen der Parameter seit der letzten Untersuchung nicht erfasst werden. Andererseits konnten entscheidende Parameter der Herzinsuffizienz wie die NYHA-Klassifikation und NTproBNP-Werte nicht erfasst und damit nicht mit in die Auswertung einbezogen werden.

In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der KHK-Erkrankung oder der Angabe von Angina pectoris mit den Homoarginin-Spiegeln der Probanden nachgewiesen werden. Die KHK betreffend wurden in dieser Studie zwischen der dokumentierten Anzahl der erkrankten Herzkranzgefäße unterschieden, während sich andere Studien dem Auftreten von MACE (major adverse cardiovascular events) zur Evaluation des Schweregrades der Erkrankung bedienten. In der überwiegenden Anzahl dieser Studien konnten verminderte Homoarginin-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für MACE in Zusammenhang gebracht werden (97, 107, 108, 116).

## **Limitationen**

Dies ist eine Beobachtungsstudie, und die Ergebnisse könnten durch unbekannte Störfaktoren beeinflusst beziehungsweise verfälscht worden sein. Anhand der Daten lässt sich kein Rückschluss auf die Ursächlichkeit der nachgewiesenen Zusammenhänge ziehen.

Die Parameter wurden jeweils nur einmalig im Labor gemessen, so dass analytische Fehler nicht auszuschließen sind. Außerdem wurden die Messungen nur zu einem Zeitpunkt bei dem jeweiligen Probanden vorgenommen. Um eine höhere Aussagekraft über den Plasmaspiegel der einzelnen Parameter bei dem jeweiligen Probanden zu erreichen und eventuelle kurzfristige Schwankungen auszuschließen, wäre eine serielle Wiederholung der Messung besser geeignet gewesen. Außerdem war vor allem die Gruppe der Diabetiker mit einer chronischen Entzündung eher klein, und Ergebnisse in dieser Gruppe sollten in größeren Studien erneut untersucht werden. Mögliche Variationen der Homoarginin- und ADMA-Spiegel durch die aktuelle Medikation der Probanden wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

## **Schlussfolgerung**

Insgesamt ist der überwiegende Teil der Ergebnisse kohärent mit der Datenlage in der Literatur, in der niedrige Homoarginin-Spiegel als unabhängiger Risikomarker für renale und kardiale Erkrankungen sowie die Gesamtmortalität gelten (7).

Homoarginin ist ein vielversprechender Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und könnte in Zukunft auf Grund seines breiten Referenzintervalls in der klinischen Praxis genutzt werden. Die bisher nicht beschriebene Assoziation zwischen Homoarginin und Zonulin sollte in weiteren Studien untersucht werden und könnte einen neuen pathophysiologischen Zusammenhang darstellen. Es ist davon auszugehen, dass die positive Korrelation zwischen Homoarginin und Zonulin auch in größeren Probandengruppen Bestand haben wird. Bisher gilt Zonulin, über seinen Einfluss auf intestinale tight junctions, als Regulator der intestinalen Permeabilität. Auch der positive Zusammenhang zwischen Tryptophan und hArg sollte weiter untersucht werden, beide könnten protektive Effekte auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben, indem sie die Alkalische Phosphatase hemmen.

Die Bedeutung erhöhter ADMA-Konzentrationen als kardiovaskulärer Risikomarker bestätigt sich auch in dieser Studie, allerdings ist ADMA aufgrund seines kleinen Referenzbereiches eher

weniger für den klinischen Einsatz geeignet. Die HPLC-Messung von ADMA scheint in dieser Studie eine größere Spezifität und Sensitivität als der ELISA-Test zu haben.

## Literaturverzeichnis

1. Nichols, M.; Townsend, N.; Scarborough, P.; Rayner, M., Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 2014, *35* (42), 2950-9.
2. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999, *340* (2), 115-26.
3. Tousoulis, D.; Koutsogiannis, M.; Papageorgiou, N.; Siasos, G.; Antoniades, C.; Tsiamis, E.; Stefanadis, C., Endothelial dysfunction: potential clinical implications. *Minerva Med* 2010, *101* (4), 271-84.
4. Heitzer, T.; Schlinzig, T.; Krohn, K.; Meinertz, T.; Munzel, T., Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, *104* (22), 2673-8.
5. Atzler, D.; Schwedhelm, E.; Choe, C. U., L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015, *18* (1), 83-8.
6. Drechsler, C.; Kollerits, B.; Meinitzer, A.; Marz, W.; Ritz, E.; Konig, P.; Neyer, U.; Pilz, S.; Wanner, C.; Kronenberg, F., Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *PLoS One* 2013, *8* (5), e63560.
7. Pilz, S.; Meinitzer, A.; Gaksch, M.; Grubler, M.; Verheyen, N.; Drechsler, C.; Hartaigh, B. O.; Lang, F.; Alesutan, I.; Voelkl, J.; Marz, W.; Tomaschitz, A., Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids* 2015, *47* (9), 1703-13.
8. Boger, R. H.; Maas, R.; Schulze, F.; Schwedhelm, E., Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 2009, *60* (6), 481-7.
9. Tsikas, D.; Wu, G., Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. *Amino Acids* 2015, *47* (9), 1697-702.
10. Kakimoto, Y.; Akazawa, S., Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970, *245* (21), 5751-8.
11. Nakajima, T.; Matsuoka, Y.; Kakimoto, Y., Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1971, *230* (2), 212-22.
12. Park, K. S.; Lee, H. W.; Hong, S. Y.; Shin, S.; Kim, S.; Paik, W. K., Determination of methylated amino acids in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988, *440*, 225-30.
13. Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J.; Moncada, S., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992, *339* (8793), 572-5.
14. Vallance, P., Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *Lancet* 2001, *358* (9299), 2096-7.
15. Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G., Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001, *357* (Pt 3), 593-615.
16. Tiefenbacher, C. P.; Kreuzer, J., Nitric oxide-mediated endothelial dysfunction--is there need to treat? *Curr Vasc Pharmacol* 2003, *1* (2), 123-33.
17. Kielstein, J. T.; Bode-Boger, S. M.; Klein, G.; Graf, S.; Haller, H.; Fliser, D., Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003, *33* (5), 370-5.
18. Zoccali, C.; Mallamaci, F.; Maas, R.; Benedetto, F. A.; Tripepi, G.; Malatino, L. S.; Cataliotti, A.; Bellanuova, I.; Boger, R., Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling

- and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002, 62 (1), 339-45.
19. Bae, S. W.; Stuhlinger, M. C.; Yoo, H. S.; Yu, K. H.; Park, H. K.; Choi, B. Y.; Lee, Y. S.; Pachinger, O.; Choi, Y. H.; Lee, S. H.; Park, J. E., Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005, 95 (6), 729-33.
  20. Mittermayer, F.; Krzyzanowska, K.; Exner, M.; Mlekusch, W.; Amighi, J.; Sabeti, S.; Minar, E.; Muller, M.; Wolzt, M.; Schillinger, M., Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26 (11), 2536-40.
  21. Kielstein, J. T.; Peter, C.; Adams, M. C., Cigarettes and ADMA: the smoke hasn't cleared yet. In *Hypertension*, United States, 2006; Vol. 48, p E20; author reply E21.
  22. Schwedhelm, E.; Wallaschofski, H.; Atzler, D.; Dorr, M.; Nauck, M.; Volker, U.; Kroemer, H. K.; Volzke, H.; Boger, R. H.; Friedrich, N., Incidence of all-cause and cardiovascular mortality predicted by symmetric dimethylarginine in the population-based study of health in pomerania. *PLoS One* 2014, 9 (5), e96875.
  23. Abbasi, F.; Asagmi, T.; Cooke, J. P.; Lamendola, C.; McLaughlin, T.; Reaven, G. M.; Stuehlinger, M.; Tsao, P. S., Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001, 88 (10), 1201-3.
  24. Boger, R. H.; Bode-Boger, S. M.; Szuba, A.; Tsao, P. S.; Chan, J. R.; Tangphao, O.; Blaschke, T. F.; Cooke, J. P., Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998, 98 (18), 1842-7.
  25. Teerlink, T., ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005, 10 Suppl 1, S73-81.
  26. Vallance, P.; Leiper, J., Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24 (6), 1023-30.
  27. Gary, J. D.; Clarke, S., RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998, 61, 65-131.
  28. Boger, R. H.; Sydow, K.; Borlak, J.; Thum, T.; Lenzen, H.; Schubert, B.; Tsikas, D.; Bode-Boger, S. M., LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000, 87 (2), 99-105.
  29. Osanai, T.; Saitoh, M.; Sasaki, S.; Tomita, H.; Matsunaga, T.; Okumura, K., Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003, 42 (5), 985-90.
  30. Mann, G. E.; Yudilevich, D. L.; Sobrevia, L., Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003, 83 (1), 183-252.
  31. Arancibia-Garavilla, Y.; Toledo, F.; Casanello, P.; Sobrevia, L., Nitric oxide synthesis requires activity of the cationic and neutral amino acid transport system y<sup>+</sup>L in human umbilical vein endothelium. *Exp Physiol* 2003, 88 (6), 699-710.
  32. Closs, E. I.; Basha, F. Z.; Habermeier, A.; Forstermann, U., Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sup>+</sup> carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997, 1 (1), 65-73.
  33. McDonald, K. K.; Zharikov, S.; Block, E. R.; Kilberg, M. S., A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997, 272 (50), 31213-6.

34. Mendes Ribeiro, A. C.; Brunini, T. M.; Ellory, J. C.; Mann, G. E., Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res* 2001, 49 (4), 697-712.
35. McDermott, J. R., Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976, 154 (1), 179-84.
36. Ogawa, T.; Kimoto, M.; Sasaoka, K., Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989, 264 (17), 10205-9.
37. Achan, V.; Broadhead, M.; Malaki, M.; Whitley, G.; Leiper, J.; MacAllister, R.; Vallance, P., Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23 (8), 1455-9.
38. Carnegie, P. R.; Fellows, F. C.; Symington, G. R., Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977, 26 (5), 531-7.
39. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288 (5789), 373-6.
40. Palmer, R. M.; Ashton, D. S.; Moncada, S., Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988, 333 (6174), 664-6.
41. Furchgott, R. F., The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *Jama* 1996, 276 (14), 1186-8.
42. Radomski, M. W.; Moncada, S., The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 1993, 344, 251-64.
43. Upchurch, G. R., Jr.; Ford, J. W.; Weiss, S. J.; Knipp, B. S.; Peterson, D. A.; Thompson, R. W.; Eagleton, M. J.; Broady, A. J.; Proctor, M. C.; Stanley, J. C., Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Surg* 2001, 34 (1), 76-83.
44. Faraci, F. M.; Brian, J. E., Jr.; Heistad, D. D., Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1995, 269 (5 Pt 2), H1522-7.
45. Bouras, G.; Deftereos, S.; Tousoulis, D.; Giannopoulos, G.; Chatzis, G.; Tsounis, D.; Cleman, M. W.; Stefanadis, C., Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem* 2013, 13 (2), 180-200.
46. Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M.; Moncada, S., Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320 (6061), 454-6.
47. Cooke, J. P., Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20 (9), 2032-7.
48. Veresh, Z.; Racz, A.; Lotz, G.; Koller, A., ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway. *Hypertension* 2008, 52 (5), 960-6.
49. Antoniades, C.; Shirodaria, C.; Leeson, P.; Antonopoulos, A.; Warrick, N.; Van-Assche, T.; Cunningham, C.; Tousoulis, D.; Pillai, R.; Ratnatunga, C.; Stefanadis, C.; Channon, K. M., Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009, 30 (9), 1142-50.
50. Mohan, S.; Fung, H. L., Mechanism of cellular oxidation stress induced by asymmetric dimethylarginine. *Int J Mol Sci* 2012, 13 (6), 7521-31.
51. Cooke, J. P., ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005, 10 Suppl 1, S11-7.



52. Juonala, M.; Viikari, J. S.; Alftan, G.; Marniemi, J.; Kahonen, M.; Taittonen, L.; Laitinen, T.; Raitakari, O. T., Brachial artery flow-mediated dilation and asymmetrical dimethylarginine in the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation* 2007, *116* (12), 1367-73.
53. Paiva, H.; Kahonen, M.; Lehtimaki, T.; Alftan, G.; Viikari, J.; Laaksonen, R.; Hutri-Kahonen, N.; Laitinen, T.; Taittonen, L.; Raitakari, O. T.; Juonala, M., Levels of asymmetrical dimethylarginine are predictive of brachial artery flow-mediated dilation 6 years later. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* 2010, *212* (2), 512-5.
54. Antoniades, C.; Demosthenous, M.; Tousoulis, D.; Antonopoulos, A. S.; Vlachopoulos, C.; Toutouza, M.; Marinou, K.; Bakogiannis, C.; Mavragani, K.; Lazaros, G.; Koumallos, N.; Triantafyllou, C.; Lymperiadis, D.; Koutsilieris, M.; Stefanadis, C., Role of asymmetrical dimethylarginine in inflammation-induced endothelial dysfunction in human atherosclerosis. *Hypertension* 2011, *58* (1), 93-8.
55. Hsu, C. N.; Huang, L. T.; Lau, Y. T.; Lin, C. Y.; Tain, Y. L., The combined ratios of L-arginine and asymmetric and symmetric dimethylarginine as biomarkers in spontaneously hypertensive rats. *Transl Res* 2012, *159* (2), 90-8.
56. Wang, H.; Liu, J., Plasma asymmetric dimethylarginine and L-arginine levels in Chinese patients with essential hypertension without coronary artery disease. *J Cardiovasc Dis Res* 2011, *2* (3), 177-80.
57. Fujii, H.; Takiuchi, S.; Kawano, Y.; Fukagawa, M., Putative role of asymmetric dimethylarginine in microvascular disease of kidney and heart in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2008, *21* (6), 650-6.
58. Perticone, F.; Sciacqua, A.; Maio, R.; Perticone, M.; Maas, R.; Boger, R. H.; Tripepi, G.; Sesti, G.; Zoccali, C., Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005, *46* (3), 518-23.
59. Bai, Y.; Hui, R., Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)--a critical regulator of hypertensive left ventricular hypertrophy? *Med Hypotheses* 2008, *70* (5), 962-6.
60. Ellger, B.; Richir, M. C.; van Leeuwen, P. A.; Debaveye, Y.; Langouche, L.; Vanhorebeek, I.; Teerlink, T.; Van den Berghe, G., Glycemic control modulates arginine and asymmetrical-dimethylarginine levels during critical illness by preserving dimethylarginine-dimethylaminohydrolase activity. *Endocrinology* 2008, *149* (6), 3148-57.
61. Stuhlinger, M. C.; Abbasi, F.; Chu, J. W.; Lamendola, C.; McLaughlin, T. L.; Cooke, J. P.; Reaven, G. M.; Tsao, P. S., Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama* 2002, *287* (11), 1420-6.
62. Das, U. N.; Repossi, G.; Dain, A.; Eynard, A. R., L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011, *16*, 13-20.
63. Krzyzanowska, K.; Mittermayer, F.; Wolzt, M.; Schernthaner, G., Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007, *30* (7), 1834-9.
64. Kanazawa, I.; Yano, S.; Notsu, Y.; Yamaguchi, T.; Nabika, T.; Sugimoto, T., Asymmetric dimethylarginine as a risk factor for cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011, *74* (4), 467-72.
65. Lu, T. M.; Chung, M. Y.; Lin, M. W.; Hsu, C. P.; Lin, S. J., Plasma asymmetric dimethylarginine predicts death and major adverse cardiovascular events in individuals referred for coronary angiography. *Int J Cardiol* 2011, *153* (2), 135-40.
66. Zoccali, C.; Bode-Boger, S.; Mallamaci, F.; Benedetto, F.; Tripepi, G.; Malatino, L.; Cataliotti, A.; Bellanuova, I.; Fermo, I.; Frolich, J.; Boger, R., Plasma concentration of

- asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001, 358 (9299), 2113-7.
67. Valkonen, V. P.; Paiva, H.; Salonen, J. T.; Lakka, T. A.; Lehtimäki, T.; Laakso, J.; Laaksonen, R., Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. In *Lancet*, England, 2001; Vol. 358, pp 2127-8.
  68. Zeller, M.; Korandji, C.; Guillard, J. C.; Sicard, P.; Vergely, C.; Lorgis, L.; Beer, J. C.; Duvillard, L.; Lagrost, A. C.; Moreau, D.; Gambert, P.; Cottin, Y.; Rochette, L., Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28 (5), 954-60.
  69. Cao, Y.; Yang, K.; Zhang, Z.; Ouyang, M.; Xiao, L., Correlation between plasma asymmetric dimethylarginine and different types of coronary heart disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010, 35 (4), 301-6.
  70. Djordjevic, B. V.; Pavlovic, R.; Cosic, V.; Deljanin-Ilic, M.; Ristic, T.; Krstic, N.; Jevtovic-Stoimenov, T., High clinical accuracy of asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in patients with ischemic heart disease. *Amino Acids* 2012, 43 (6), 2293-300.
  71. Sen, N.; Ozlu, M. F.; Akgul, E. O.; Kanat, S.; Cayci, T.; Turak, O.; Yaman, H.; Sokmen, E.; Ozcan, F.; Maden, O.; Demir, A. D.; Covic, A.; Kanbay, M., Elevated plasma asymmetric dimethylarginine level in acute myocardial infarction patients as a predictor of poor prognosis and angiographic impaired reperfusion. *Atherosclerosis* 2011, 219 (1), 304-10.
  72. Lu, T. M.; Ding, Y. A.; Lin, S. J.; Lee, W. S.; Tai, H. C., Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003, 24 (21), 1912-9.
  73. Derkacz, A.; Protasiewicz, M.; Poreba, R.; Doroszko, A.; Poreba, M.; Antonowicz-Juchniewicz, J.; Andrzejak, R.; Szuba, A., Plasma asymmetric dimethylarginine predicts restenosis after coronary angioplasty. *Arch Med Sci* 2011, 7 (3), 444-8.
  74. Schulze, F.; Lenzen, H.; Hanefeld, C.; Bartling, A.; Osterziel, K. J.; Goudeva, L.; Schmidt-Lucke, C.; Kusus, M.; Maas, R.; Schwedhelm, E.; Strodter, D.; Simon, B. C.; Mugge, A.; Daniel, W. G.; Tillmanns, H.; Maisch, B.; Streichert, T.; Boger, R. H., Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J* 2006, 152 (3), 493.e1-8.
  75. Schnabel, R.; Blankenberg, S.; Lubos, E.; Lackner, K. J.; Rupprecht, H. J.; Espinola-Klein, C.; Jachmann, N.; Post, F.; Peetz, D.; Bickel, C.; Cambien, F.; Tiret, L.; Munzel, T., Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005, 97 (5), e53-9.
  76. Meinitzer, A.; Seelhorst, U.; Wellnitz, B.; Halwachs-Baumann, G.; Boehm, B. O.; Winkelmann, B. R.; Marz, W., Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007, 53 (2), 273-83.
  77. Shi, B.; Ni, Z.; Zhou, W.; Yu, Z.; Gu, L.; Mou, S.; Fang, W.; Wang, Q.; Cao, L.; Yan, Y.; Qian, J., Circulating levels of asymmetric dimethylarginine are an independent risk factor for left ventricular hypertrophy and predict cardiovascular events in pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Eur J Intern Med* 2010, 21 (5), 444-8.
  78. von Haehling, S.; Bode-Boger, S. M.; Martens-Lobenhoffer, J.; Rauchhaus, M.; Schefold, J. C.; Genth-Zotz, S.; Karhausen, T.; Ciccoira, M.; Anker, S. D.; Doehner, W., Elevated

- levels of asymmetric dimethylarginine in chronic heart failure: a pathophysiologic link between oxygen radical load and impaired vasodilator capacity and the therapeutic effect of allopurinol. *Clin Pharmacol Ther* 2010, 88 (4), 506-12.
79. Hsu, C. P.; Lin, S. J.; Chung, M. Y.; Lu, T. M., Asymmetric dimethylarginine predicts clinical outcomes in ischemic chronic heart failure. *Atherosclerosis* 2012, 225 (2), 504-10.
  80. Duckelmann, C.; Mittermayer, F.; Haider, D. G.; Altenberger, J.; Eichinger, J.; Wolzt, M., Asymmetric dimethylarginine enhances cardiovascular risk prediction in patients with chronic heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27 (9), 2037-42.
  81. Nicholls, S. J.; Wang, Z.; Koeth, R.; Levison, B.; DeFraio, B.; Dzavik, V.; Griffith, O. W.; Hathaway, D.; Panza, J. A.; Nissen, S. E.; Hochman, J. S.; Hazen, S. L., Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation* 2007, 116 (20), 2315-24.
  82. Saitoh, M.; Osanai, T.; Kamada, T.; Matsunaga, T.; Ishizaka, H.; Hanada, H.; Okumura, K., High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003, 18 (4), 177-82.
  83. Shao, Z.; Wang, Z.; Shrestha, K.; Thakur, A.; Borowski, A. G.; Sweet, W.; Thomas, J. D.; Moravec, C. S.; Hazen, S. L.; Tang, W. H., Pulmonary hypertension associated with advanced systolic heart failure: dysregulated arginine metabolism and importance of compensatory dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59 (13), 1150-8.
  84. Zairis, M. N.; Patsourakos, N. G.; Tsiaousis, G. Z.; Theodossis Georgilas, A.; Melidonis, A.; Makrygiannis, S. S.; Velissaris, D.; Batika, P. C.; Argyrakis, K. S.; Tzerefos, S. P.; Prekates, A. A.; Foussas, S. G., Plasma asymmetric dimethylarginine and mortality in patients with acute decompensation of chronic heart failure. *Heart* 2012, 98 (11), 860-4.
  85. H, S., Über d, I- $\alpha$  Methylarginin. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem, 1926; pp 155:279–291.
  86. CM, S.; JA, B., New synthesis of  $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -guanidinon-caproic acid (homoarginine) and its possible conversion in vivo into lysine. *J Biol Chem*, 1950; pp 183:139–147.
  87. Bell, E. A., The isolation of L-homoarginine from seeds of *Lathyrus cicera*. *Biochem J* 1962, 85, 91-3.
  88. Rao, S. L.; Ramachandran, L. K.; Adiga, P. R., The isolation and characterization of l-homoarginine from seeds of *Lathyrus sativus*. *Biochemistry* 1963, 2, 298-300.
  89. Ryan, W. L.; Johnson, R. J.; Dimari, S., Homoarginine synthesis by rat kidney. *Arch Biochem Biophys* 1969, 131 (2), 521-6.
  90. Ryan, W. L.; Barak, A. J.; Johnson, R. J., Lysine, homocitrulline, and homoarginine metabolism by the isolated perfused rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1968, 123 (2), 294-7.
  91. Fishman, W. H.; Sie, H. G., Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L homoarginine. *Enzymologia* 1971, 41 (3), 141-67.
  92. Teerlink, T., HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 851 (1-2), 21-9.
  93. Lambert, L. E.; French, J. F.; Whitten, J. P.; Baron, B. M.; McDonald, I. A., Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol* 1992, 216 (1), 131-4.

94. Valtonen, P.; Laitinen, T.; Lyyra-Laitinen, T.; Raitakari, O. T.; Juonala, M.; Viikari, J. S.; Heiskanen, N.; Vanninen, E.; Punnonen, K.; Heinonen, S., Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ J* 2008, *72* (11), 1879-84.
95. Pilz, S.; Meinitzer, A.; Tomaschitz, A.; Drechsler, C.; Ritz, E.; Krane, V.; Wanner, C.; Boehm, B. O.; Marz, W., Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart* 2011, *97* (15), 1222-7.
96. Davids, M.; Ndika, J. D.; Salomons, G. S.; Blom, H. J.; Teerlink, T., Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett* 2012, *586* (20), 3653-7.
97. 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.; Muller, 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., Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 2013, *128* (13), 1451-61.
98. 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., Genome-wide association study identifies 3 genomic loci significantly associated with serum levels of homoarginine: the AtheroRemo Consortium. *Circ Cardiovasc Genet* 2013, *6* (5), 505-13.
99. Brosnan, J. T.; da Silva, R. P.; Brosnan, M. E., The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* 2011, *40* (5), 1325-31.
100. Choe, C. U.; Nabuurs, C.; Stockebrand, M. C.; Neu, A.; Nunes, P.; Morellini, F.; Sauter, K.; Schillemeit, S.; Hermans-Borgmeyer, I.; Marescau, B.; Heerschap, A.; Isbrandt, D., L-arginine:glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Hum Mol Genet* 2013, *22* (1), 110-23.
101. Nabuurs, C. I.; Choe, C. U.; Veltien, A.; Kan, H. E.; van Loon, L. J.; Rodenburg, R. J.; Matschke, J.; Wieringa, B.; Kemp, G. J.; Isbrandt, D.; Heerschap, A., Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J Physiol* 2013, *591* (2), 571-92.
102. Ryan, W. L.; Wells, I. C., HOMOCITRULLINE AND HOMOARGININE SYNTHESIS FROM LYSINE. *Science* 1964, *144* (3622), 1122-7.
103. Drechsler, C.; Meinitzer, A.; Pilz, S.; Krane, V.; Tomaschitz, A.; Ritz, E.; Marz, W.; Wanner, C., Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur J Heart Fail* 2011, *13* (8), 852-9.
104. Jazwinska-Kozuba, A.; Martens-Lobenhoffer, J.; Kruszelnicka, O.; Rycaj, J.; Chyrchel, B.; Surdacki, A.; Bode-Boger, S. M., Opposite associations of plasma homoarginine and ornithine with arginine in healthy children and adolescents. *Int J Mol Sci* 2013, *14* (11), 21819-32.
105. Moali, C.; Boucher, J. L.; Sari, M. A.; Stuehr, D. J.; Mansuy, D., 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* 1998, *37* (29), 10453-60.
106. Hrabak, A.; Bajor, T.; Temesi, A., 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* 1994, *198* (1), 206-12.

107. Marz, W.; Meinitzer, A.; Drechsler, C.; Pilz, S.; Krane, V.; Kleber, M. E.; Fischer, J.; Winkelmann, B. R.; Bohm, B. O.; Ritz, E.; Wanner, C., Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 2010, *122* (10), 967-75.
108. Pilz, S.; Teerlink, T.; Scheffer, P. G.; Meinitzer, A.; Rutters, F.; Tomaschitz, A.; Drechsler, C.; Kienreich, K.; Nijpels, G.; Stehouwer, C. D.; Marz, W.; Dekker, J. M., Homoarginine and mortality in an older population: the Hoorn study. *Eur J Clin Invest* 2014, *44* (2), 200-8.
109. Pilz, S.; Tomaschitz, A.; Meinitzer, A.; Drechsler, C.; Ritz, E.; Krane, V.; Wanner, C.; Bohm, B. O.; Marz, W., Low serum homoarginine is a novel risk factor for fatal strokes in patients undergoing coronary angiography. *Stroke* 2011, *42* (4), 1132-4.
110. Atzler, D.; Rosenberg, M.; Anderssohn, M.; Choe, C. U.; Lutz, M.; Zugck, C.; Boger, R. H.; Frey, N.; Schwedhelm, E., Homoarginine--an independent marker of mortality in heart failure. *Int J Cardiol* 2013, *168* (5), 4907-9.
111. Lygate, C. A.; Schneider, J. E.; Neubauer, S., Investigating cardiac energetics in heart failure. *Exp Physiol* 2013, *98* (3), 601-5.
112. Lygate, C. A.; Bohl, S.; ten Hove, M.; Faller, K. M.; Ostrowski, P. J.; Zervou, S.; Medway, D. J.; Aksentijevic, D.; Sebag-Montefiore, L.; Wallis, J.; Clarke, K.; Watkins, H.; Schneider, J. E.; Neubauer, S., Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2012, *96* (3), 466-75.
113. Chen, P. Y.; Sanders, P. W., Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension* 1993, *22* (6), 812-8.
114. Sobczak, A.; Prokopowicz, A.; Radek, M.; Szula, M.; Zaciera, M.; Kurek, J.; Goniewicz, M. L., Tobacco smoking decreases plasma concentration of the emerging cardiovascular risk marker, L-homoarginine. *Circ J* 2014, *78* (5), 1254-8.
115. Vogl, L.; Pohlhammer, J.; Meinitzer, A.; Rantner, B.; Stadler, M.; Peric, S.; Hammerer-Lercher, A.; Klein-Weigel, P.; Fraedrich, G.; Kronenberg, F.; Kollerits, B., 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* 2015, *239* (2), 607-14.
116. Atzler, D.; Gore, M. O.; Ayers, C. R.; Choe, C. U.; Boger, R. H.; de Lemos, J. A.; McGuire, D. K.; Schwedhelm, E., Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, *34* (11), 2501-7.
117. Meinitzer, A.; Puchinger, M.; Winklhofer-Roob, B. M.; Rock, E.; Ribalta, J.; Roob, J. M.; Sundl, I.; Halwachs-Baumann, G.; Marz, W., Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin Chim Acta* 2007, *384* (1-2), 141-8.
118. Valtonen, P.; Karppi, J.; Nyssonen, K.; Valkonen, V. P.; Halonen, T.; Punnonen, K., Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, *828* (1-2), 97-102.
119. Schulze, F.; Wesemann, R.; Schwedhelm, E.; Sydow, K.; Albsmeier, J.; Cooke, J. P.; Boger, R. H., Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004, *42* (12), 1377-83.
120. Leong, T.; Zylberstein, D.; Graham, I.; Lissner, L.; Ward, D.; Fogarty, J.; Bengtsson, C.; Bjorkelund, C.; Thelle, D., Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, *28* (5), 961-7.

121. Post, M. S.; Verhoeven, M. O.; van der Mooren, M. J.; Kenemans, P.; Stehouwer, C. D.; Teerlink, T., Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88 (9), 4221-6.
122. Pilz, S.; Edelmann, F.; Meinitzer, A.; Gelbrich, G.; Doner, U.; Dungen, H. D.; Tomaschitz, A.; Kienreich, K.; Gaksch, M.; Duvinage, A.; Stahrenberg, R.; Kunde, J.; Schmidt, A.; Marz, W.; Wachter, R.; Pieske, B., Associations of methylarginines and homoarginine with diastolic dysfunction and cardiovascular risk factors in patients with preserved left ventricular ejection fraction. *J Card Fail* 2014, 20 (12), 923-30.
123. Schwedhelm, E.; Boger, R. H., The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2011, 7 (5), 275-85.
124. Boger, R. H., The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003, 59 (4), 824-33.
125. Krzyzanowska, K.; Mittermayer, F.; Kopp, H. P.; Wolzt, M.; Schernthaner, G., Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89 (12), 6277-81.
126. Zhang, W. Z.; Venardos, K.; Chin-Dusting, J.; Kaye, D. M., Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006, 48 (2), 278-85.
127. Zoccali, C.; Benedetto, F. A.; Maas, R.; Mallamaci, F.; Tripepi, G.; Malatino, L. S.; Boger, R., Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13 (2), 490-6.
128. Ito, A.; Tsao, P. S.; Adimoolam, S.; Kimoto, M.; Ogawa, T.; Cooke, J. P., Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999, 99 (24), 3092-5.
129. Raptis, V.; Georgianos, P. I.; Sarafidis, P. A.; Sioulis, A.; Makedou, K.; Makedou, A.; Grekas, D. M.; Kapoulas, S., Elevated asymmetric dimethylarginine is associated with oxidant stress aggravation in patients with early stage autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2013, 38 (1), 72-82.
130. Visser, M.; Paulus, W. J.; Vermeulen, M. A.; Richir, M. C.; Davids, M.; Wisselink, W.; de Mol, B. A.; van Leeuwen, P. A., The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. *Eur J Heart Fail* 2010, 12 (12), 1274-81.
131. Usui, M.; Matsuoka, H.; Miyazaki, H.; Ueda, S.; Okuda, S.; Imaizumi, T., Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998, 62 (26), 2425-30.
132. Atzler, D.; Schwedhelm, E.; Nauck, M.; Ittermann, T.; Boger, R. H.; Friedrich, N., Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania. *Clin Chem Lab Med* 2014, 52 (12), 1835-42.
133. Cullen, M. E.; Yuen, A. H.; Felkin, L. E.; Smolenski, R. T.; Hall, J. L.; Grindle, S.; Miller, L. W.; Birks, E. J.; Yacoub, M. H.; Barton, P. J., Myocardial expression of the arginine:glycine amidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation* 2006, 114 (1 Suppl), I16-20.
134. Ravani, P.; Maas, R.; Malberti, F.; Pecchini, P.; Mieth, M.; Quinn, R.; Tripepi, G.; Mallamaci, F.; Zoccali, C., Homoarginine and mortality in pre-dialysis chronic kidney disease (CKD) patients. *PLoS One* 2013, 8 (9), e72694.
135. Michel, T., R is for arginine: metabolism of arginine takes off again, in new directions. In *Circulation*, United States, 2013; Vol. 128, pp 1400-4.

136. Kayacelebi, A. A.; Willers, J.; Pham, V. V.; Hahn, A.; Schneider, J. Y.; Rothmann, S.; Frolich, J. C.; Tsikas, D., Plasma homoarginine, arginine, asymmetric dimethylarginine and total homocysteine interrelationships in rheumatoid arthritis, coronary artery disease and peripheral artery occlusion disease. *Amino Acids* 2015, 47 (9), 1885-91.
137. Kayacelebi, A. A.; Nguyen, T. H.; Neil, C.; Horowitz, J. D.; Jordan, J.; Tsikas, D., Homoarginine and 3-nitrotyrosine in patients with takotsubo cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2014, 173 (3), 546-7.
138. Chen, L. Q.; Rohatgi, A.; Ayers, C. R.; Das, S. R.; Khera, A.; Berry, J. D.; McGuire, D. K.; de Lemos, J. A., Race-specific associations of myeloperoxidase with atherosclerosis in a population-based sample: the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 2011, 219 (2), 833-8.
139. Mangge, H.; Summers, K. L.; Meinitzer, A.; Zelzer, S.; Almer, G.; Prassl, R.; Schnedl, W. J.; Reininghaus, E.; Paulmichl, K.; Weghuber, D.; Fuchs, D., Obesity-related dysregulation of the tryptophan-kynurenine metabolism: role of age and parameters of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2014, 22 (1), 195-201.
140. Wirleitner, B.; Rudzite, V.; Neurauter, G.; Murr, C.; Kalnins, U.; Erglis, A.; Trusinskis, K.; Fuchs, D., Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2003, 33 (7), 550-4.
141. Debnath, S.; Velagapudi, C.; Redus, L.; Thameem, F.; Kasinath, B.; Hura, C. E.; Lorenzo, C.; Abboud, H. E.; O'Connor, J. C., Tryptophan Metabolism in Patients With Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers. *Int J Tryptophan Res* 2017, 10, 1178646917694600.
142. Drechsler, C.; Verduijn, M.; Pilz, S.; Krediet, R. T.; Dekker, F. W.; Wanner, C.; Ketteler, M.; Boeschoten, E. W.; Brandenburg, V., Bone alkaline phosphatase and mortality in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011, 6 (7), 1752-9.
143. Haarhaus, M.; Arnqvist, H. J.; Magnusson, P., Calcifying human aortic smooth muscle cells express different bone alkaline phosphatase isoforms, including the novel B1x isoform. *J Vasc Res* 2013, 50 (2), 167-74.
144. Alpers, D. H.; DeSchryver-Kecsckemeti, K.; Goodwin, C. L.; Tindira, C. A.; Harter, H.; Slatopolsky, E., Intestinal alkaline phosphatase in patients with chronic renal failure. *Gastroenterology* 1988, 94 (1), 62-7.
145. Haarhaus, M.; Brandenburg, V.; Kalantar-Zadeh, K.; Stenvinkel, P.; Magnusson, P., Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat Rev Nephrol* 2017, 13 (7), 429-442.
146. Fasano, A.; Not, T.; Wang, W.; Uzzau, S.; Berti, I.; Tommasini, A.; Goldblum, S. E., Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. In *Lancet*, England, 2000; Vol. 355, pp 1518-9.
147. Ohlsson, B.; Orho-Melander, M.; Nilsson, P. M., Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease Manifestations. *Int J Mol Sci* 2017, 18 (3).
148. Ficek, J.; Wyskida, K.; Ficek, R.; Wajda, J.; Klein, D.; Witkiewicz, J.; Rotkegel, S.; Spiechowicz-Zaton, U.; Kocemba-Dyczek, J.; Ciepal, J.; Wiecek, A.; Olszanecka-Glinianowicz, M.; Chudek, J., Relationship between plasma levels of zonulin, bacterial lipopolysaccharides, D-lactate and markers of inflammation in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2017, 49 (4), 717-725.
149. Hunt, P. W.; Sinclair, E.; Rodriguez, B.; Shive, C.; Clagett, B.; Funderburg, N.; Robinson, J.; Huang, Y.; Epling, L.; Martin, J. N.; Deeks, S. G.; Meinert, C. L.; Van Natta, M. L.; Jabs, D. A.; Lederman, M. M., Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis* 2014, 210 (8), 1228-38.

150. El Asmar, R.; Panigrahi, P.; Bamford, P.; Berti, I.; Not, T.; Coppa, G. V.; Catassi, C.; Fasano, A., Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology* 2002, *123* (5), 1607-15.



## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Elli Mann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ADMA und Homoarginin – Neue kardiovaskuläre Risikomarker und ihre Einflussgrößen in einer Hochrisikokohorte von AICD-Patienten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elli Mann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Elli Mann , Robert Klüsener , Felix Boschann , Jana Ruppert , Franz P. Armbruster ,Andreas Meinitzer , Christoph Melzer , Thomas B. Dschietzig; Homoarginine associates with zonulin and tryptophan -findings in a high-risk cohort of patients carrying an AICD; Clinical Laboratory, angenommen für die Ausgabe 11+12/2017

Beitrag im Einzelnen: Verarbeitung der Laborproben, statistische Auswertung der Primärdaten, Entwicklung der Theorie zu möglichen physiologischen Zusammenhängen, Schreiben des gesamten Papers

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin



## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## Publikationsliste

### **Homoarginine associates with zonulin and tryptophan - findings in a high-risk cohort of patients carrying an AICD**

Elli Mann , Robert Klüsener , Felix Boschann , Jana Ruppert , Franz P. Armbruster ,  
Andreas Meinitzer , Christoph Melzer , Thomas B. Dschietzig

Zur Veröffentlichung in der Ausgabe 11+12/2017 in Clinical Laboratory angenommen.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Thomas Dschietzig für die Bereitstellung des Themas und die exzellente kontinuierliche Betreuung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich unterstützt und an mich geglaubt haben.

Ich danke Julia, die mir in schwierigen Zeiten ihr mitfühlendes Herz schenkte und mir mit erhellenden und motivierenden Ratschlägen zur Seite stand.

Christine danke ich für die Inspiration, wir haben diesen Weg zusammen beschritten und am Ende war sie mir ein Vorbild diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Für die Begleitung meiner Arbeit und die wohlwollende Motivation während der gesamten Zeit möchte ich mich bei Birgit Mottl bedanken, sie hat mir die Last von den Schulter genommen und mich die Freude nicht verlieren lassen.