

ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ BEI PSYCHIATRISCHEN ERKRANKUNGEN



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

DANIEL SIMON BRAUN

aus EHEKIRCHEN

im Jahr 2022

Promotionsgesuch eingereicht im:

März 2022

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ekkehard Haen

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Professor Dr. rer. nat. Sigurd Elz

Erstgutachter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ekkehard Haen

Zweitgutachter: Professor Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

Drittprüfer: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Guido Jürgenliemk

meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ekkehard Haen, der mir die Bearbeitung dieses hochinteressanten Themas erst ermöglicht hat und mich dabei stets konstruktiv unterstützt hat.

Ein weiterer sehr großer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Jens Schlossmann für die fortlaufende Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas und die fachlichen Anregungen während der Seminare.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Frieder Kees und Herrn Dr. rer. nat. habil. med. Christoph Dorn für die große Unterstützung bei der analytischen Bearbeitung dieses Themas.

Außerdem danke ich meinen Kolleg/-innen und Freund/-innen aus der Arbeitsgruppe Katharina Endres, Mirjam Schwarz, Ann-Kathrin Geiben, Margarete Silva-Gracia, Nagia Ben Omar, Vanessa Hofmann, Carina Rothammer, Sandra Unholzer, Bianca Fay, Alexandra Köppl, Florian Ridders, Yannick Lipecki, Julian Rauch und Benedikt Stegmann für die große Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Miteinander.

Weiterhin danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Professor Schlossmann für die angenehme Zusammenarbeit und das stets sehr gute Arbeitsklima.

Zusätzlich danke ich Astrid Seefeld für die Durchführung der Blutabnahmen sowie allen Personen, die sich dazu bereit erklärt haben, sich Blut abnehmen zu lassen und damit zur Erstellung der Kontrollgruppe beigetragen haben.

Ich bedanke mich sehr bei meiner Oma, durch deren Hilfe daheim eine Anwesenheit in Regensburg erst möglich wurde. Auch bei Markus Stegmair bedanke ich mich für die Hilfe daheim.

Ein besonders großer herzlicher Dank gilt meinem Bruder Peter für die Motivation und Unterstützung jeglicher Art, sowohl daheim als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Vielen Dank! Auch bei Lydia Braun bedanke ich mich für ihre Unterstützung.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Ute und Franz.

Mein allergrößter und herzlichster Dank gilt meiner Freundin Verena.

Liebe Verena, vielen Dank für Alles!

Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund	7
1.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid für den Organismus	7
1.1.1 Biosynthese von Stickstoffmonoxid	7
1.1.2 Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Endothelfunktion.....	7
1.1.3 Weitere Wirkungen von Stickstoffmonoxid	8
1.2 L-Arginin und seine methylierten Derivate	8
1.2.1 Chemische Strukturen und physiologische Bedeutung.....	8
1.2.2 Biosynthese der methylierten Arginin-Derivate	9
1.2.3 Metabolismus und Elimination der Arginin-Derivate	11
1.2.4 Entstehung einer pathologisch erhöhten ADMA-Konzentration	11
1.3 Erkrankungen mit erhöhter ADMA-Konzentration im Blut	12
1.3.1 Niereninsuffizienz	12
1.3.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen	12
1.3.3 Insulinresistenz und Diabetes mellitus	13
1.3.4 Psychiatrische Erkrankungen.....	13
1.3.4.1 Schizophrenie	13
1.3.4.2 Depression	14
1.3.4.3 Bipolare Störung.....	16
1.3.4.4 Schizoaffektive Störung	16
1.4 Quantifizierung von ADMA	16
1.4.1 Methoden zur Quantifizierung von ADMA.....	16
1.4.2 Ansätze zur Probenaufbereitung	17
1.5 ADMA-Konzentrationen bei gesunden Personen	17
1.6 Psychiatrische Erkrankungen	20
1.6.1 Schizophrenie (F20)	20
1.6.2 Schizoaffektive Störung (F25).....	20
1.6.3 Bipolare Störung (F31)	21
1.6.4 Depression (F32/F33).....	21
2. Fragestellung der Arbeit	22
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Grundlagen der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	24

3.2 Materialien.....	25
3.2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	25
3.2.2 Säulen und Zubehör für Vorextraktion und HPLC	26
3.2.3 Laborgeräte	27
3.2.4 Verbrauchsmaterialien	27
3.2.5 Chromatographisches Trennsystem.....	28
3.2.6 Software	28
3.3 Methoden	29
3.3.1 HPLC-Analytik	29
3.3.1.1 Herstellung von Standards	29
3.3.1.2 Herstellung von Puffern und Fließmitteln.....	30
3.3.1.3 Wahl des Reagenzes für die Derivatisierung	31
3.3.1.4 Herstellung der Stammlösung des OPA-Reagenzes	31
3.3.1.5 Verwendung von Poolserum	32
3.3.1.6 Vorbereitung von Serumproben für das weitere Verfahren	32
3.3.1.7 Probenaufbereitung durch Proteinfällung	32
3.3.1.7.1 Probenvorbereitung	32
3.3.1.7.2 Derivatisierung	32
3.3.1.7.3 Chromatographie.....	33
3.3.1.7.4 Veränderung der Fließmittelzusammensetzung	34
3.3.1.8 Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion	34
3.3.1.9 Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion (SPE)	35
3.3.1.9.1 Probenvorbereitung	35
3.3.1.9.2 Derivatisierung	35
3.3.1.9.3 Chromatographie.....	35
3.3.1.10 Festphasenextraktion ohne Einengen des Eluats	36
3.3.1.10.1 Entwicklung eines neuen Elutionsmittels für die	
Festphasenextraktion	36
3.3.1.10.2 Festphasenextraktion der Proben und Standards.....	37
3.3.1.10.3 Derivatisierung	37
3.3.1.10.4 Chromatographie.....	37
3.3.1.10.5 Auswertung der Chromatogramme.....	37
3.3.1.11 Validierung der Methode	38
3.3.1.11.1 Extraktionsausbeute	38

3.3.1.11.2 Quantifizierungsgrenze (LOQ, Limit of Quantification).....	38
3.3.1.11.3 Linearität	39
3.3.1.11.4 Richtigkeit	39
3.3.1.11.5 Präzision.....	39
3.3.1.11.6 Matrixeffekt	39
3.3.1.12 Zusammenfassung der entwickelten Methode.....	40
3.3.1.12.1 Herstellung der Standards.....	40
3.3.1.12.2 Vorbereitung der Blutproben.....	40
3.3.1.12.3 Festphasenextraktion der Proben und Standards.....	40
3.3.1.12.4 Derivatisierung	41
3.3.1.12.5 Chromatographie.....	41
3.3.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten	41
3.3.2.1 Antrag bei der Ethikkommission	41
3.3.2.2 Patientenproben.....	42
3.3.2.3 Kontrollgruppe	42
3.3.2.4 Erfassung von Daten bei den Patientenproben	43
3.3.2.5 Erfassung von Daten bei der Kontrollgruppe	44
3.3.2.6 Statistische Auswertung	44
3.3.2.6.1 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden	45
3.3.2.6.2 Einfluss des Alters	45
3.3.2.6.3 Einfluss des Geschlechts	45
3.3.2.6.4 Einfluss des Schweregrades der Erkrankung.....	45
3.3.2.6.5 Einfluss einer Zustandsverbesserung unter Therapie	46
3.3.2.6.6 Einfluss der Medikation	46
3.3.2.6.7 Unterschiede zwischen Patient/-innen mit verschiedenen Diagnosen	47
3.3.2.6.8 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung	47
3.3.2.6.9 Unterschiede innerhalb Patientengruppen mit Diagnosen F25 und F31.....	48
3.3.2.6.10 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung zusätzlich kardiovaskuläre Erkrankung vorliegen	48

4. Ergebnisse	49
4.1 HPLC-Analytik	49
4.1.1 Probenvorbereitung durch Proteinfällung	49
4.1.2 Probenvorbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion	50
4.1.3 Festphasenextraktion mit Einengen des Eluats	53
4.1.4 Neues Verfahren der Festphasenextraktion	54
4.1.4.1 Entwicklung eines neuen Elutionsmittels für die Festphasenextraktion.....	54
4.1.4.2 Fließmittel-Zusammensetzung für die Chromatographie.....	54
4.1.4.3 Chromatographie	55
4.1.5 Validierung der Methode	57
4.1.5.1 Extraktionsausbeute.....	57
4.1.5.2 Quantifizierungsgrenze LOQ	57
4.1.5.3 Linearität.....	58
4.1.5.4 Richtigkeit	59
4.1.5.5 Präzision	60
4.1.5.6 Matrixeffekt.....	61
4.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten und Gesunden.....	63
4.2.1 Charakteristika der Gruppen.....	63
4.2.2 Serumkonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen	64
4.2.3 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden	64
4.2.4 Patientenprobe mit sehr hoher ADMA-Konzentration	65
4.2.5 Einfluss des Alters	67
4.2.6 Einfluss des Geschlechtes.....	69
4.2.7 Einfluss des Schweregrades der psychischen Erkrankung.....	71
4.2.8 Einfluss einer Verbesserung unter der Therapie	73
4.2.9 Einfluss der Medikation	75
4.2.10 Unterschiede zwischen Patient/-innen mit verschiedenen Diagnosen	77
4.2.11 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung	79
4.2.12 Unterschiede innerhalb Patientensubgruppen mit Schizoaffectiver und Bipolarer Störung	80

4.2.13 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen	82
5. Diskussion	84
5.1 HPLC-Analytik	84
5.1.1 Probenaufbereitung durch Proteinfällung	84
5.1.2 Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion	84
5.1.3 Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion	85
5.1.4 Festphasenextraktion mit einem neuen Elutionsmittel	86
5.1.5 Wahl des internen Standards.....	87
5.1.6 Weitere Vorteile der Methode.....	88
5.1.7 Validierung der Methode	88
5.1.8 Matrixeffekt	88
5.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten und Gesunden.....	89
5.2.1 Serumkonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen	89
5.2.2 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden	90
5.2.3 Patientenprobe mit sehr hoher ADMA-Konzentration	90
5.2.4 Einfluss des Alters	91
5.2.5 Einfluss des Geschlechtes.....	91
5.2.6 Einfluss des Schweregrades der psychischen Erkrankung.....	92
5.2.7 Einfluss einer Verbesserung unter der Therapie	92
5.2.8 Einfluss der Medikation	92
5.2.9 Unterschiede zwischen Patientengruppen mit verschiedenen Diagnosen.....	95
5.2.10 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung	96
5.2.11 Unterschiede in F25- und F31-Diagnosengruppen	96
5.2.12 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen	97
5.3 Folgen aus den Ergebnissen der ADMA-Bestimmungen	97
5.3.1 Folgen für die Diagnostik	97
5.3.2 Folgen für das Therapiemonitoring psychischer Erkrankungen	98
5.3.3 Folgen für die Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen	99
5.3.3.1 Einsatz von L-Arginin?	99
5.3.3.2 Erhöhung der Aktivität der DDAH?	100

6. Zusammenfassung	103
7. Anhang	106
7.1 Befunde	106
7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	114
7.3 ICD-10-Codes der in dieser Arbeit analysierten Diagnosen	116
7.4 Abbildungsverzeichnis	117
7.5 Tabellenverzeichnis	119
7.6 Posterpräsentationen	121
7.7 Publikationen.....	121
8. Referenzen	122

1. Hintergrund

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogenes Derivat der Aminosäure Arginin. Als kompetitiver Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) schränkt es die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) ein, und hat dadurch vermutlich Einfluss auf die Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, die mit erniedrigten NO-Konzentrationen und damit verbundener endothelialer Dysfunktion einher gehen, wie z. B. Hypertonie oder Atherosklerose (Böger, 2005).

1.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid für den Organismus

1.1.1 Biosynthese von Stickstoffmonoxid

Das freie Radikal NO wird unter anderem in Endothelzellen in einer durch das Enzym NOS katalysierten Reaktion aus der Aminosäure L-Arginin freigesetzt.

Es sind drei Isoformen der NOS bekannt:

- **(konstitutive) endotheliale NOS (eNOS):** Vorkommen in Endothelzellen, in Kardiomyozyten, in Mesangiumzellen der Niere, in Thrombozyten, Aktivität durch Calcium-Ionen und Scherkräfte reguliert
- **(konstitutive) neuronale NOS (nNOS):** Vorkommen in Neuronen, Aktivität durch Calcium-Ionen reguliert
- **induzierbare NOS (iNOS):** Vorkommen in Macrophagen, im Endothel, in glatter Gefäßmuskulatur, calciumunabhängig, induziert durch Zytokine und bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide

Dabei ist L-Arginin das Substrat aller Isoformen der NO-Synthase (Prast and Philippu, 2001; Mutschler et al., 2008).

1.1.2 Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Endothelfunktion

Im kardiovaskulären System ist Stickstoffmonoxid ein Signalmolekül, das vasodilatatorische sowie thrombozytenaggregationshemmende Wirkungen besitzt. Das in den Endothelzellen freigesetzte NO kann sowohl in das Gefäßlumen als auch in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand diffundieren.

In der glatten Muskelzelle stimuliert NO die lösliche Guanylylcyclase (sGC), was zur Bildung von cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) führt. cGMP löst dann über einen Abfall der intrazellulären Calcium-

Konzentration eine Vasodilatation aus. Im Gefäßlumen hemmt Stickstoffmonoxid durch Regulation der cGMP-Konzentration die Adhäsion von Monozyten und die Thrombozytenaggregation an die Endothelschicht. Somit ist NO für eine intakte Endothelfunktion ein sehr bedeutendes Signalmolekül (Moncada et al., 1991; Stühlinger, 2007; Mutschler et al., 2008).

1.1.3 Weitere Wirkungen von Stickstoffmonoxid

- **Thrombozyten:** Auch Thrombozyten besitzen eine eNOS und sind so in der Lage, NO herzustellen, das über einen cGMP-abhängigen Mechanismus deren Aggregation hemmt.
- **Nervensystem:** Die Synthese von NO in Nervenzellen wird durch die nNOS aber auch durch die eNOS katalysiert. NO ist sehr wichtig für die synaptische Plastizität, indem es z. B. an der Langzeit-Potenzierung beteiligt ist. Außerdem beeinflusst es die Freisetzung diverser Neurotransmitter wie Noradrenalin oder Dopamin.
- **Immunsystem:** In einigen Zellen des Immunsystems wie z. B. Makrophagen findet die iNOS-katalysierte Synthese von NO als Reaktion auf Stimuli wie Zytokine statt. Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften stellt es einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Bakterien, Viren und andere Mikroorganismen dar.

(Moncada et al., 1991; Prast and Philippu, 2001; Mutschler et al., 2008; Leiper and Nandi, 2011)

1.2 L-Arginin und seine methylierten Derivate

1.2.1 Chemische Strukturen und physiologische Bedeutung

In **Abb. 1** sind die Strukturformeln der Aminosäure L-Arginin sowie die Strukturformeln der methylierten Arginin-Derivate dargestellt. Man unterscheidet zwischen NG-monomethyl-L-arginin (L-NMMA, Monomethylarginin), bei dem ein Guanidin-Stickstoff-Atom des Arginins einfach methyliert ist, NG,NG-dimethyl-L-arginin (ADMA, asymmetrisches Dimethylarginin), das ein doppelt methyliertes Guanidin-Stickstoff-Atom besitzt, und NG,N'-G-dimethyl-L-arginin (SDMA, symmetrisches Dimethylarginin), bei dem zwei Guanidin-Stickstoff-Atome jeweils einfach methyliert sind (Teerlink, 2007).

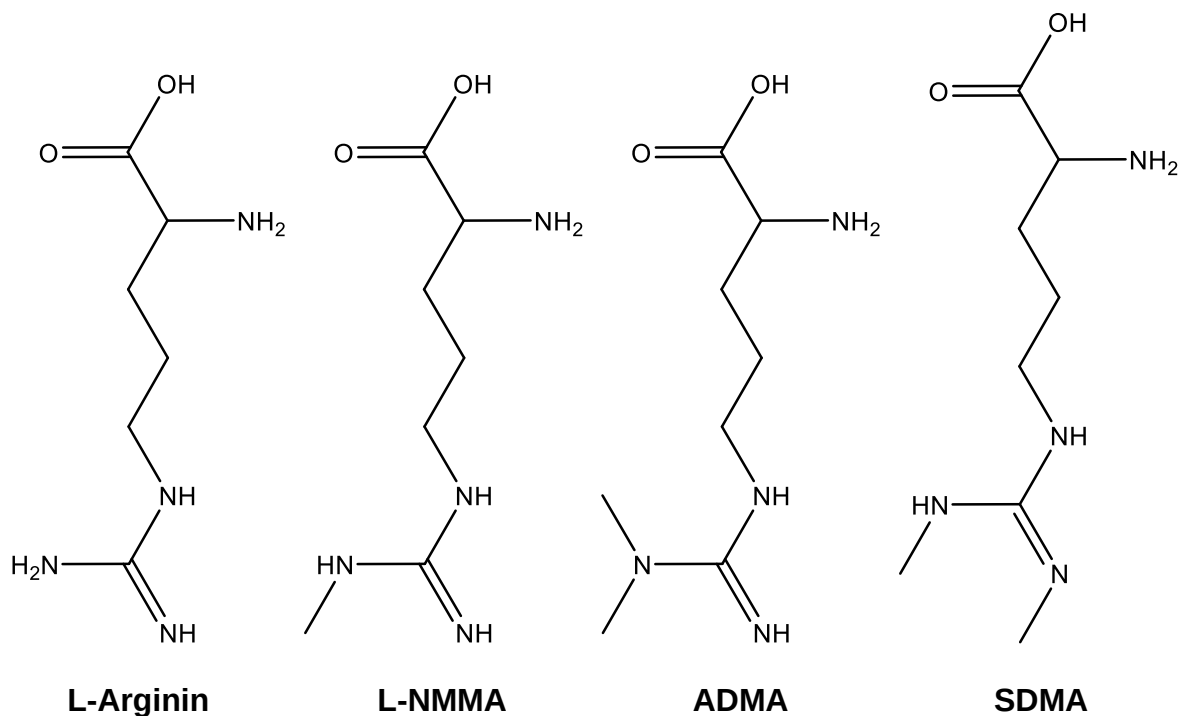


Abb. 1: Chemische Strukturen von L-Arginin und dessen methylierter Derivate; L-NMMA: Monomethylarginin, ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA: Symmetrisches Dimethylarginin; modifiziert nach Teerlink (Teerlink, 2007)

Sowohl ADMA als auch L-NMMA sind in der Lage alle NOS-Isoformen kompetitiv zu hemmen (Tran et al., 2003). Da SDMA nur eine sehr geringe NOS-Hemmung zeigt und die Plasma-Konzentration von ADMA deutlich höher ist als die von L-NMMA, kommt ADMA die größte physiologische und pathophysiologische Bedeutung zu (Tran et al., 2003; Tsikas et al., 2018).

1.2.2 Biosynthese der methylierten Arginin-Derivate

Bisher ist kein Syntheseweg aus freiem L-Arginin bekannt. L-NMMA, ADMA und SDMA entstehen durch Methylierung von Arginin-Resten in Proteinen und späterer Proteolyse.

Bei der Methylierung handelt es sich um eine post-translationale Modifikation, die durch Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) katalysiert wird. Bisher sind elf PRMT-Proteine bekannt von denen sechs in der Lage sind, eine Methylgruppe von S-adenosyl-L-methionin auf ein Guanidin-Stickstoff-Atom eines Arginin-Restes zu übertragen.

Diese sechs PRMT-Enzyme werden in zwei Gruppen unterteilt:

- **Typ-1-PRMT** (PRMT1, PRMT3, PRMT4 und PRMT6) können zusätzlich zur Monomethylierung eine zweite Methylgruppe auf das bereits methylierte Stickstoff-Atom übertragen (asymmetrische Methylierung).
- **Typ-2-PRMT** (PRMT5 und PRMT7) können zusätzlich zur Monomethylierung eine Methylgruppe auf ein noch nicht methyliertes Guanidin-Stickstoff-Atom übertragen (symmetrische Methylierung).

In **Abb. 2** sind die Biosynthesewege von L-NMMA, ADMA und SDMA schematisch dargestellt (Tran et al., 2003; Leiper and Nandi, 2011).

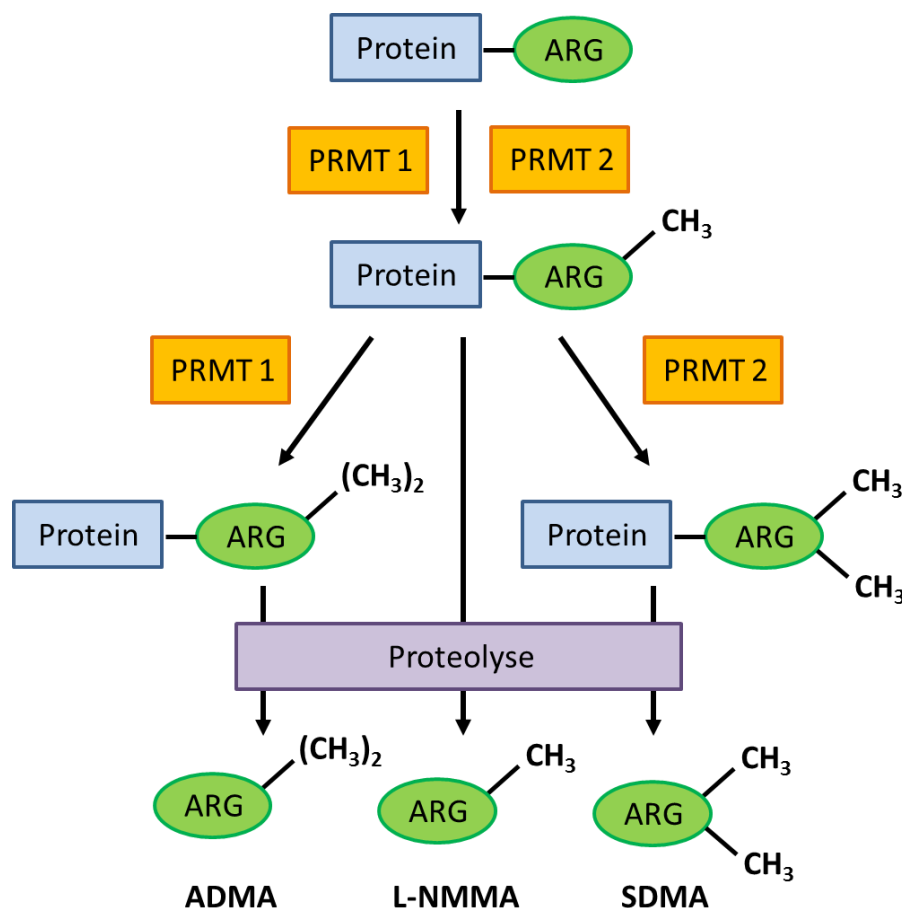


Abb. 2: Biosynthese der methylierten Arginin-Derivate; Sowohl Proteinargininmethyltransferasen vom Typ 1 (PRMT 1) als auch vom Typ 2 (PRMT 2) sind in der Lage, Arginin-Reste (ARG) in Proteinen einfach zu methylieren. Die meisten der monomethylierten Arginin-Reste werden dann durch Typ-1-PRMT asymmetrisch oder durch Typ-2-PRMT symmetrisch dimethyliert. Durch Proteolyse der entstehenden methylierten Proteine werden die methylierten Arginin-Derivate L-NMMA, ADMA und SDMA freigesetzt; modifiziert nach Leiper, Nandi (Leiper and Nandi, 2011)

1.2.3 Metabolismus und Elimination der Arginin-Derivate

L-NMMA, ADMA und SDMA können über die Niere ausgeschieden werden. Die asymmetrisch methylierten Derivate L-NMMA und ADMA (Hemmstoffe der NOS) werden allerdings hauptsächlich durch das Enzym Dimethylarginindimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut, während SDMA (sehr niedrig potenter Hemmstoff der NOS) von diesem Enzym nicht metabolisiert werden kann und hauptsächlich renal ausgeschieden wird.

Es sind zwei Isoformen der DDAH bekannt:

- **DDAH1** ist hauptsächlich in Gehirn, Niere und Endothel exprimiert
- **DDAH2** ist hauptsächlich in Herz, Plazenta, Niere und Immunsystem exprimiert

Beide Isoformen sind in der Lage, ADMA zu metabolisieren, wobei allerdings DDAH1 scheinbar die größere Bedeutung für den Abbau von ADMA besitzt.

Damit ist die DDAH-Aktivität ein sehr wichtiger physiologischer Modulator der ADMA-Konzentration und damit der NO-Konzentration.

Polymorphismen der DDAH wurden bereits in wenigen Studien untersucht. DDAH2-Polymorphismen sind mit einer Verbesserung bei Patient/-innen mit hämorrhagischem Schlaganfall und reduziertem Vasopressor-Bedarf nach Herzoperationen assoziiert. Polymorphismen der DDAH1 sind mit einem erhöhten Risiko für Präeklampsie, Thrombose, Schlaganfall und koronarer Herzkrankheit verbunden.

Es existiert noch ein weiterer enzymatischer Abbauweg sowohl für L-NMMA und ADMA als auch für SDMA, der durch die Alanin-glyoxylat-aminotransferase (AGXT2) katalysiert wird. Dieser spielt allerdings bei der Metabolisierung eine untergeordnete Rolle (Leiper and Nandi, 2011).

1.2.4 Entstehung einer pathologisch erhöhten ADMA-Konzentration

Bei einigen Erkrankungen finden sich erhöhte ADMA-Konzentrationen im Plasma oder Serum. Als Ursache dafür sind mehrere Mechanismen denkbar:

- Vermehrte Methylierung von Arginin-Resten in Proteinen
- Vermehrte Proteolyse von Proteinen, die methylierte Arginin-Reste enthalten
- Verminderte DDAH-Aktivität (z.B. durch Enzymhemmung)
- Verminderte renale Exkretion (z. B. durch Niereninsuffizienz)

Es ist bisher nicht genau bekannt, welche Bedeutung jeder dieser Mechanismen hat, aber vermutlich ist eine verminderte DDAH-Aktivität der ausschlaggebende Grund für eine pathologisch erhöhte ADMA-Konzentration (Tran et al., 2003; Leiper and Nandi, 2011).

1.3 Erkrankungen mit erhöhter ADMA-Konzentration im Blut

Bei Patient/-innen mit verschiedensten Krankheiten wurden bereits im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöhte Konzentrationen von ADMA gemessen. Im Folgenden sind einige dieser Erkrankungen beschrieben.

1.3.1 Niereninsuffizienz

Da ADMA unter anderem über die Niere ausgeschieden wird, ist es naheliegend, dass die ADMA-Konzentration im Plasma oder Serum bei einer Niereninsuffizienz ansteigt. Bei Patient/-innen mit Niereninsuffizienz waren die gemessenen Konzentrationen von SDMA noch wesentlich stärker erhöht als die von ADMA, da SDMA im Gegensatz zu ADMA nicht zusätzlich über die DDAH metabolisiert werden kann.

Es existieren Studien, die zeigen, dass sich die ADMA-Konzentration im Plasma von Patienten mit weit fortgeschrittenem Nierenversagen erhöht, und dass diese Erhöhung mit einer verminderten NO-Produktion korreliert. Bei Dialysepatienten existiert ein Zusammenhang zwischen der ADMA-Konzentration im Plasma und später auftretenden kardiovaskulären Ereignissen. Darüber hinaus scheint die ADMA-Konzentration auch einen Einfluss auf den Verlauf einer bestehenden chronischen Nierenerkrankung zu haben (Vallance et al., 1992; Leiper and Nandi, 2011).

1.3.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Bei verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten finden sich erhöhte ADMA-Konzentrationen im Blutplasma. Beispiele hierfür sind:

- Hypertonie (Surdacki et al., 1999)
- Pulmonale Hypertonie (Pullamsetti et al., 2005)
- Präeklampsie (Savvidou et al., 2003)
- Herzinsuffizienz (Usui et al., 1998)
- Hypercholesterolämie (Vladimirova-Kitova et al., 2008)
- Atherosklerose (Miyazaki et al., 1999)
- Hyperhomocysteinämie (Böger et al., 2001)
- Koronare Herzkrankheit (Xuan et al., 2016)

Bei Patient/-innen mit Hypercholesterolämie wurde eine inverse Korrelation der ADMA-Werte mit der endothelabhängigen Vasodilatation gefunden, was auf eine große Bedeutung von ADMA für die endotheliale Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen hinweist.

Eine Hyperhomocysteinämie erhöht das Risiko einer Atherosklerose, indem Homocystein das Enzym DDAH hemmt, was eine Akkumulation von ADMA und damit eine Störung der Endothelfunktion zur Folge hat (Stühlinger, 2007).

1.3.3 Insulinresistenz und Diabetes mellitus

Bei Patient/-innen mit Diabetes mellitus vom Typ 2 wurden im Vergleich zu einer nicht-diabetischen Kontrollgruppe erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA gefunden, obwohl Cholesterinwerte, Blutdruck und Body-Mass-Index bei beiden Gruppen nicht unterschiedlich waren. Es konnte eine Korrelation zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen im Plasma und der Insulinresistenz nachgewiesen werden, die unabhängig von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren ist.

Die endotheliale Dysfunktion, die man häufig bei Diabetikern feststellt, wird vermutlich von einem Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration und damit verminderter NO-Bioverfügbarkeit verursacht (Abbasi et al., 2001; Stühlinger, 2007; Leiper and Nandi, 2011).

1.3.4 Psychiatrische Erkrankungen

1.3.4.1 Schizophrenie

Die ADMA-Konzentrationen von Patienten mit Schizophrenie (F20) wurden bereits in mehreren Studien analysiert, welche allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. **Tab. 1** gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Das et al., Celik et al. und Yang et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die ADMA-Werte bei Schizophrenie-Patient/-innen, die nicht unter Therapie mit Neuroleptika standen, im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht waren (Das et al., 1996; Celik et al., 2011; Yang et al., 2016).

Zincir et al. untersuchten die ADMA-Konzentrationen von Schizophrenie-Patient/-innen vor einer Therapie mit Neuroleptika und die gleichen Patient/-innen zwei Monate nach Beginn einer Behandlung mit Neuroleptika. In beiden Fällen waren die ADMA-Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht, obwohl sie durch die Therapie signifikant sanken (Zincir et al., 2014). Auch Yu et al. analysierten die ADMA-Werte von Patient/-innen mit Schizophrenie vor Beginn einer Behandlung mit Neuroleptika und nach zwei Monaten Neuroleptikatherapie. Dabei waren die ADMA-Werte vor Therapiebeginn im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht. Nach der Therapie unterschieden sich diese nicht mehr signifikant von den ADMA-Werten der Kontrollgruppe (Yu et al., 2018).

Jorgensen et al. kamen zu einem anderen Ergebnis. Sie analysierten die ADMA-Konzentrationen bei Schizophrenie-Patient/-innen unter Neuroleptika-Therapie. Diese unterschieden sich nicht signifikant von ADMA-Werten gesunder Personen (Jorgensen et al., 2015).

Ustundag et al. untersuchten ebenfalls die ADMA-Werte von Schizophrenie-Patient/-innen unter Neuroleptikatherapie, kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die ADMA-

Konzentrationen der Patient/-innen im Vergleich zu den Gesunden signifikant erhöht waren (Ustundag et al., 2020).

Tab. 1: Bisher publizierte Arbeiten über ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Schizophrenie

c(ADMA): Serum- oder Plasmakonzentration von ADMA

Med.: Patient/-innen bekommen Pharmakotherapie, n: Anzahl der Personen

V: vor Therapie, N: 2 Monate nach Beginn einer Pharmakotherapie

↑: ADMA-Konzentration im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, →: ADMA-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant, V/K↑: ADMA-Konzentration vor Therapie im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, N/K↑: ADMA-Konzentration 2 Monate nach Therapiebeginn im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, V/N↑: ADMA-Konzentration vor Therapie höher als 2 Monate nach Therapiebeginn, N/K→: ADMA-Konzentration unterscheidet sich 2 Monate nach Therapiebeginn nicht von Kontrollgruppe

c(ADMA) [µM] Schizophrenie	c(ADMA) [µM] Kontrollgruppe	Med.	Ergebnis, Signifikanz	Quelle
≈0,8 n=16	≈0,6 n=12	nein	↑ p<0,02	(Das et al., 1996)
3,59±0,39 n=49	0,95±0,16 n=30	nein	↑ p<0,02	(Celik et al., 2011)
V: 3,6±1,5 n=49 N: 1,9±0,6	1,02±1,02 n=30	V: nein N: ja	V/K↑, N/K↑ p<0,001 V/K↑ p<0,001	(Zincir et al., 2014)
0,37±0,08 n=40	0,37±0,08 n=40	ja	→	(Jorgensen et al., 2015)
2,51±0,93 n=47	1,39±0,13 n=45	nein	↑ p<0,001	(Yang et al., 2016)
V: 2,42±0,84 N: 1,55±0,34 n=41+29	1,41±0,14 n=30	V: nein N: ja	V/K↑ p<0,05 V/N↑ p<0,001 N/K→	(Yu et al., 2018)
12,12±3,01 n=30	5,72±1,81 n=30	ja	↑ p<0,001	(Ustundag et al., 2020)

1.3.4.2 Depression

Auch bei Patient/-innen, die an einer Depression (F32/F33) leiden, kamen bisherige Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen. Diese sind in **Tab. 2** zusammengefasst.

Selley beschrieb erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Depressions-Patient/-innen, die keine Antidepressiva erhielten, im Vergleich zu Gesunden (Selley, 2004). Baranyi et al. analysierten die ADMA-Werte von Patient/-innen mit Depression bei stationärer Aufnahme mit Beginn einer Pharmakotherapie sowie bei Entlassung aufgrund einer Verbesserung des Gesundheitszustandes während Therapie mit Antidepressiva. Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme waren die ADMA-Konzentrationen der Patient/-innen im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöht. Die ADMA-Werte der Patient/-innen unterschieden sich bei der Entlassung nicht signifikant von den Werten zum Zeitpunkt der Aufnahme. (Baranyi et al., 2015).

Piletz et al. und Ozden et al. untersuchten die ADMA-Werte bei Patient/-innen mit Depression, die nicht unter Pharmakotherapie mit Antidepressiva standen. Piletz et al. fanden keinen signifikanten Unterschied in den ADMA-Werten depressiver und gesunder Personen (Piletz et al., 2009). Ozden et al. beschrieben erniedrigte ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Depression im Vergleich zu Gesunden (Ozden et al., 2020).

Ali-Sisto et al. analysierten die ADMA-Werte von Patienten, die teils Pharmakotherapie bekamen und teils nicht, und kamen zu dem Ergebnis, dass die ADMA-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht waren (Ali-Sisto et al., 2018).

Tab. 2: Bisher publizierte Arbeiten über ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Depression

c(ADMA): Serum- oder Plasmakonzentration von ADMA

Med.: Patient/-innen bekommen Pharmakotherapie, n: Anzahl der Personen

A: bei stationärer Aufnahme, E: bei Entlassung aufgrund klinischer Besserung

↑: ADMA-Konzentration im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, →: ADMA-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant, ↓: ADMA-Konzentration im Vergleich zu Kontrollgruppe erniedrigt, A/K↑: ADMA-Konzentration bei stationärer Aufnahme im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, A/E→: ADMA-Konzentration bei Aufnahme und Entlassung unterscheiden sich nicht signifikant.

c(ADMA) [µM] Depression	c(ADMA) [µM] Kontrollgruppe	Med.	Ergebnis, Signifikanz	Quelle
1,66±0,06 n=25	1,34±0,05 n=25	nein	↑ p=0,0002	(Selley, 2004)
2,1±0,3 n=22	2,1±0,3 n=17	nein	→	(Piletz et al., 2009)
A: 0,645±0,09 n=71 E: 0,629±0,11	0,612±0,08 n=48	A: nein E: ja	A/K↑ p=0,042 A/E→	(Baranyi et al., 2015)
0,76 (0,58-0,97) n=99	0,79 (0,56-1,02) n=253	teils ja/nein	→	(Ali-Sisto et al., 2018)
0,10±0,03 n=77	0,16±0,08 n=27	nein	↓ p=0,002	(Ozden et al., 2020)

1.3.4.3 Bipolare Störung

Es existieren bisher nur wenige Studien, welche die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit Bipolarer affektiver Störung (F31) beschreiben.

Tiryaki et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die ADMA-Werte durch eine Lithium-Therapie sinken. Allerdings wurde in diese Studie keine Kontrollgruppe aus gesunden Personen integriert, sodass hier keine vergleichende Aussage über die ADMA-Konzentrationen von Kranken und Gesunden möglich war (Tiryaki et al., 2017). Ustundag et al. verglichen die ADMA-Werte von Patient/-innen mit Bipolarer Störung mit den ADMA-Werten von gesunden Personen und kamen zu dem Ergebnis, dass ADMA bei Personen mit Bipolarer Störung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Allerdings befanden sich alle Patient/-innen in einer manischen Phase (Ustundag et al., 2020).

1.3.4.4 Schizoaffective Störung

Bisher sind in der Fachliteratur keine Studien zu ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit schizoaffectiver Störung (F25) beschrieben. Diese sollen in dieser Arbeit erstmalig untersucht werden.

1.4 Quantifizierung von ADMA

Es wird eine sichere und zuverlässige Methode zur quantitativen Erfassung von ADMA im Plasma oder Serum benötigt.

1.4.1 Methoden zur Quantifizierung von ADMA

Die Quantifizierung von ADMA im Plasma oder Serum ist eine analytische Herausforderung, da es eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu SDMA, L-NMMA und anderen Aminosäuren, insbesondere L-Arginin, besitzt und da die ADMA-Konzentration im Plasma ca. zwei bis drei Größenordnungen unter den Konzentrationen anderer Aminosäuren liegt (Teerlink, 2007).

Folgende analytischen Verfahren zur quantitativen Erfassung von ADMA wurden u. a. bereits beschrieben:

- HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie)/Fluoreszenz-Detektor
- LC-MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie)
- GC-MS (Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie)
- ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

(Horowitz and Heresztyn, 2007)

Eine HPLC-Methode mit Fluoreszenz-Detektor ist wesentlich kostensparender als ein MS-gekoppeltes Verfahren (Horowitz and Heresztyn, 2007) und präziser als eine ELISA-Methode (Valtonen et al., 2005). Aufgrund dieser Vorteile wurde in der vorliegenden Arbeit ADMA mit HPLC und Fluorimeter quantifiziert.

Eine wichtige Voraussetzung für die Detektion mit Fluorimeter ist eine fluoreszierende Verbindung als Analyt. Da dies für ADMA nicht erfüllt ist, muss während der Probenvorbereitung eine Derivatisierung durchgeführt werden, sodass aus ADMA eine fluoreszierende Verbindung entsteht.

1.4.2 Ansätze zur Probenaufbereitung

Bei den meisten bisher publizierten Methoden zur Bestimmung von ADMA erfolgt die Probenaufbereitung mithilfe einer Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) (Teerlink, 2007). Bei diesem Verfahren werden Kartuschen, die ein Adsorbens enthalten, mit den Serumproben beladen und nach mehreren Waschschritten wieder eluiert. Ein Vorteil der SPE ist, dass danach meist sehr saubere Chromatogramme entstehen, die eine gute analytische Auswertung ermöglichen. Allerdings müssen die Proben nach der Elution meist eingeeengt und wiederaufgenommen werden, da die Elutionsmittel in der Regel Ammoniak enthalten, der bei der nachfolgenden Derivatisierung stört. Dieser Schritt ist aufwändig und kann mehrere Stunden in Anspruch nehmen.

Es existieren allerdings auch Arbeiten, bei denen die Probenvorbereitung lediglich aus einer Abtrennung der Plasmaproteine, z. B. durch Zugabe von 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) und anschließender Zentrifugation, besteht (Chen et al., 1997). Dieses Verfahren ist zeitsparender. Allerdings wird dabei ADMA nicht von den anderen freien Aminosäuren separiert. Da alle Aminosäuren mit dem Derivatisierungsreagenz reagieren, sind sie auch später alle im Chromatogramm zu finden, wodurch dieses wesentlich komplexer wird.

1.5 ADMA-Konzentrationen bei gesunden Personen

Um einen Referenzwert für eine „normale“ ADMA-Konzentration zu etablieren, ist es notwendig, ADMA bei gesunden Personen zu quantifizieren.

Es existieren bereits einige Arbeiten zur Untersuchung der ADMA-Konzentrationen gesunder Personen. **Tab. 3** zeigt eine Auswahl verschiedener Studien zur Ermittlung der durchschnittlichen ADMA-Konzentrationen bei Gesunden.

Tab. 3: Bisher publizierte Serum- oder Plasmakonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen

AccQ Derivatisierung mit Derivatisierungs-Kit von Waters

OPA Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd

NDA Derivatisierung mit Naphthalin-2,3-dicarboxaldehyd

c(ADMA) Serum- oder Plasmakonzentrationen von ADMA als Mittelwert (M) oder Intervall, CV Variationskoeffizient

n Anzahl der Personen in der Studie

Alter der Personen in der Studie als Mittelwert oder Intervall

Modifiziert nach Horowitz (Horowitz and Heresztyn, 2007)

Methode	c(ADMA) M [µM]	c(ADMA) CV [%]	n	Alter	Quelle
HPLC/AccQ	0,36	22	7	-	(Anderstam et al., 1997)
	0,44	18	12	33±10	(Heresztyn et al., 2004)
	0,5	17	157	52±19	(Horowitz and Heresztyn, 2007)
HPLC/OPA	0,58	11	10	40±6	(Pettersson et al., 1997)
	1,03	49	31	45±14	(Boger et al., 1998)
	1,0	61	37	68±7	(Kielstein et al., 1999)
	0,51	21	116	52±11	(Miyazaki et al., 1999)
	1,1	64	11	41±9	(Surdacki et al., 1999)
	0,3	17	7	25-35	(Pi et al., 2000)
	0,69	25	18	54±8	(Abbasi et al., 2001)
	0,73	39	22	47±8	(Fleck et al., 2001)
	0,42	14	53	20-40	(Teerlink et al., 2002)
	2,38	16	12	69±7	(Kielstein et al., 2003)
	0,37	16	16	58±12	(Hori et al., 2003)
	0,76	15	35	ca. 48	(Zhang and Kaye, 2004)
	1,57	54	48	55±7	(Bae et al., 2005)
	4,02	44	20	22±2	(Cakir et al., 2005)
	0,40	23	8	45±6	(Perticone et al., 2005)
	0,50	12	726	64±7	(Teerlink, 2005)
	0,95	0,17	30	25±5	(Celik et al., 2011)
	1,02	100	30	-	(Zincir et al., 2014)
	0,612	13	48	40	(Baranyi et al., 2015)
	0,37	22	40	31±10	(Jorgensen et al., 2015)
	1,39	9,4	45	32±8	(Yang et al., 2016)
	1,41	9,9	30	32±8	(Yu et al., 2018)
	0,16	50	27	38±12	(Ozden et al., 2020)
HPLC/NDA	0,38–1,3	-	50	48±5	(Marra et al., 2003)

Methode	c(ADMA) M [μM]	c(ADMA) CV [%]	n	Alter	Quelle
GC-MS	0,60	13	10	30±6	(Albsmeier et al., 2004)
GC-MS-MS	0,39	15	12	ca. 32	(Tsikas et al., 2003)
LC-MS	0,48	15	40	15-35	(Huang et al., 2004)
	0,36	19	47	20-56	(Martens-Lobenhoffer et al., 2004)
LC-MS-MS	0,12	37	20	-	(Vishwanathan et al., 2000)
	1,34	19	25	47±10	(Selley, 2004)
	0,55	25	22	-	(Schwedhelm et al., 2005)
	0,46	-	42	43	(Kirchherr and Kühn-Velten, 2005)
	0,37	16	14	22-32	(Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2006)
	0,45	16	24	48±11	(Elesber et al., 2006)
	0,79 (0,56-1,02)	-	253	55±10	(Ali-Sisto et al., 2018)
ELISA	0,65	20	10	-	(Schulze et al., 2004)
	0,69	29	500	41±14	(Schulze et al., 2005)
	0,59	39	40	63±8	(Krempel et al., 2005)
	0,82	35	31	31±10	(Siroká et al., 2005)
	0,72	15	11	-	(Martens-Lobenhoffer et al., 2005)
	0,67	30	25	48±5	(Dooley et al., 2006)
	2,1	14	17	40±2	(Piletz et al., 2009)

Wie in **Tab. 3** zu sehen ist, variieren die in den Studien gemessenen mittleren ADMA-Konzentrationen sehr stark innerhalb eines Intervalls von ca. 0,12μM bis 4,02μM (Horowitz and Heresztyn, 2007).

Es ist daher notwendig, weitere Studien durchzuführen, um einen ADMA-Referenzbereich für gesunde Personen zu etablieren.

Außerdem sind intra- und interindividuelle Vergleiche der ADMA-Werte wesentlich aussagekräftiger, wenn diese jeweils mit der gleichen Methode ermittelt wurden.

1.6 Psychiatrische Erkrankungen

Nachfolgend ist ein Überblick über die in dieser Arbeit auftretenden psychiatrischen Erkrankungen dargestellt.

1.6.1 Schizophrenie (F20)

Als Schizophrenie oder Schizophrene Psychosen werden psychische Störungen bezeichnet, bei denen charakteristische Veränderungen u. a. des Denkens, der Wahrnehmung, des Willens und der Psychomotorik auftreten. Aufgrund des Ausmaßes dieser Veränderungen ist bei Patienten mit Schizophrenie die Fähigkeit zu adäquatem Realitätsbezug und sozialer Lebensbewältigung beeinträchtigt.

Die Lebenszeitprävalenz der Schizophrenie wird mit 4,8-7,2 Fällen pro 1000 Einwohner angegeben. Die Erstmanifestation findet meist zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr statt. Die Lebenserwartung von Menschen, die unter Schizophrenen Psychosen leiden, liegt ca. 15 Jahre unter dem Bevölkerungsdurchschnitt.

Bei der Schizophrenie ist die Ätiologie bisher ungeklärt, wobei eine multifaktorielle Genese angenommen wird. Als Biochemische Faktoren werden die Dopamin-Hypothese (Erhöhte Dopamin-Konzentration im mesolimbischen System und erniedrigte Dopamin-Konzentration im mesokortikalen System) und die Glutamat-Hypothese (Unterfunktion des Glutamatergen Systems) diskutiert. Darüber hinaus sind vermutlich eine genetische Disposition, neuropathologische sowie psychologische Faktoren beteiligt.

Die Leitsymptome der Schizophrenie werden in sogenannte Plus- und Minus-Symptome unterteilt:

- **Plus-Symptomatik:** Halluzinationen, Wahn, bizarres und desorganisiertes Verhalten
- **Minus-Symptomatik:** Apathie, Verarmung an Sprache und Affekt, Störungen der Aufmerksamkeit

Die medikamentöse Behandlung der Schizophrenen Psychose erfolgt hauptsächlich durch Neuroleptika (Rentrop et al., 2020).

1.6.2 Schizoaffective Störung (F25)

Bei der Schizoaffectiven Störungen treten schizophrene und affektive Symptome gleichzeitig oder nur wenige Tage getrennt voneinander auf. Dabei können als affektive Symptome manische (Schizomanische Störung) oder depressive (Schizodepressive Störung) Symptome auftreten. Auch gemischte schizoaffective Störungen sind möglich (Rentrop et al., 2020).

1.6.3 Bipolare Störung (F31)

Die Bipolare affektive Störung ist durch einen Wechsel von manischen, hypomanischen, depressiven sowie gemischten Episoden gekennzeichnet. Dabei können die Episoden durch Remissionsphasen voneinander abgetrennt sein. Manische Episoden dauern im Mittel ca. vier Monate, während depressive Episoden meist ca. sechs Monate dauern. Bei einer gemischten Episode kommt es zu einem gleichzeitigen Auftreten oder schnellen Wechsel von manischen, hypomanischen und depressiven Symptomen.

Eine Bipolare Störung kann in jedem Lebensalter beginnen, wobei sie meist zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr zuerst auftritt. Die Episoden treten meist nach belastenden Situationen auf. Bei der Entstehung einer Bipolaren affektiven Störung spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Die Prävalenz liegt bei ca. 1-2,5% (Kölch et al., 2020). Mit einer Suizidmortalität von ca. 15% besteht bei der Bipolaren Störung das höchste Suizidrisiko aller affektiven Erkrankungen (Rentrop et al., 2020).

1.6.4 Depression (F32/F33)

Es wird zwischen dem Auftreten einer depressiven Episode (F32) und einer rezidivierenden depressiven Störung (F33) differenziert. Bei letzterer Diagnose handelt es sich um wiederkehrende depressive Störungen, deren Episoden im Mittel sechs Monate dauern und durch Remissionsphasen voneinander abgetrennt sind. Im Unterschied zur Bipolaren affektiven Störung traten in der Vorgeschichte keine manischen oder hypomanischen Episoden auf.

Die Lebenszeitprävalenz der Depression liegt bei 14,9%. Die Krankheit beginnt meist zwischen dem 30. und 45. Lebensjahr wobei 10% aller Menschen über 65 Jahren an einer Altersdepression leiden.

Bisher ist die Ätiologie einer Depression weitgehend ungeklärt. Bei der Entstehung der Krankheit wird eine multikausale Pathogenese angenommen. Dabei sind vermutlich eine genetische Disposition, eine neurochemische Imbalance sowie belastende Situationen im Leben beteiligt. Als eine mögliche neurochemische Imbalance wird z. B. die Monoaminmangel-Hypothese (Mangel an Noradrenalin, Serotonin und Dopamin) diskutiert.

Typische Symptome einer Depression sind neben einer gedrückten Stimmung ein Verlust an Interesse, die Unfähigkeit, Freude zu empfinden, sowie eine Verminderung von Antrieb und Energie, was mit Aktivitätseinschränkungen einhergeht. Weitere mögliche Symptome sind Verlust von Konzentration und Aufmerksamkeit, vermindertes Selbstvertrauen, Schuldgefühle, pessimistischer Blick auf die Zukunft sowie Suizidgedanken und -handlungen. Auch somatische Symptome wie Appetitverlust, Schlafstörungen mit zu frühem Erwachen und Libidoverlust sind möglich (Rentrop et al., 2020).

2. Fragestellung der Arbeit

Bisher publizierte HPLC-Methoden zur quantitativen Bestimmung von ADMA in humanem Serum sind meist sehr zeitaufwändig, insbesondere aufgrund deren Probenvorbereitung, die ein Abdampfen des Elutionsmittels nach der Festphasenextraktion erforderlich macht. Dieses Abdampfen eines meist wasserhaltigen Gemisches kann mehrere Stunden dauern.

- 1) Ist es möglich, eine Methode mit zeitsparenderer Probenaufbereitung zur HPLC-Quantifizierung von ADMA in humanem Serum zu entwickeln, bei der ein Abdampfen nach der SPE nicht notwendig ist?
- 2) Ist die entwickelte Methode valide?

In der Fachliteratur existieren bisher unterschiedliche Aussagen darüber, welche Serumkonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen normal sind. Außerdem kommen bisher publizierte Arbeiten zu widersprüchlichen Ergebnissen bei der Frage, ob die Serumkonzentration von ADMA bei Patient/-innen mit Schizophrenie oder Depression im Vergleich zu gesunden Personen erhöht ist. Zu den ADMA-Werten von Patient/-innen mit Bipolarer Störung existieren bisher sehr wenige Studien, während die ADMA-Werte von Patient/-innen mit Schizoaffectiver Störung in noch keiner Publikation mit den ADMA-Werten gesunder Personen verglichen wurden.

- 3) Welche ADMA-Konzentrationen werden mit der entwickelten HPLC-Methode im Serum gesunder Personen gemessen und unterscheiden sich diese Konzentrationen von bisher publizierten Werten, die mit anderen analytischen Methoden ermittelt wurden?
- 4) Sind die mit der entwickelten Methode bestimmten ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen höher als die gesunder Kontrollpersonen?
- 5) Korreliert die Serumkonzentration von ADMA mit dem Alter der Probanden?
- 6) Existieren zwischen Frauen und Männern Unterschiede in den ADMA-Werten?
- 7) Haben Patient/-innen mit verschiedenen Schweregraden einer psychiatrischen Erkrankung auch unterschiedliche ADMA-Konzentrationen im Serum?

- 8) Unterscheiden sich die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen, die während der Therapie besser wurden, von den ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen, die nicht besser wurden?
- 9) Hat die Wahl der Medikation einen Einfluss auf die Serumkonzentration von ADMA?
- 10) Sind die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit Schizophrenie, Depression, Bipolarer Störung oder Schizoaffectiver Störung jeweils im Vergleich zu Gesunden erhöht und unterscheiden sich die ADMA-Konzentrationen dieser Patientengruppen untereinander?
- 11) Unterscheiden sich die ADMA-Werte von Patient/-innen mit einer depressiven Episode von den ADMA-Werten von Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung?
- 12) Existieren bei Patient/-innen mit Schizoaffectiver oder Bipolarer Störung Unterschiede in den ADMA-Konzentrationen je nachdem, ob sich diese in einer manischen, depressiven oder gemischten Phase befinden?
- 13) Unterscheiden sich die ADMA-Konzentrationen von psychisch erkrankten Personen signifikant von den ADMA-Konzentrationen von psychisch und gleichzeitig kardiovaskulär erkrankten Personen?

3. Material und Methoden

3.1 Grundlagen der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Chromatographische Methoden sind Verfahren, bei denen Stoffgemische unter Verwendung von stationären und mobilen Phasen aufgetrennt werden. Bei der HPLC wird die mobile Phase (Fließmittel, Eluent) mithilfe spezieller Pumpen durch eine Säule gepumpt, in der sich die stationäre Phase befindet. Dabei gehen die in der mobilen Phase gelösten Bestandteile der zu analysierenden Probe ständig in die stationäre Phase über und umgekehrt. Die Trennung des Stoffgemisches beruht darauf, dass die einzelnen Komponenten verschiedene Affinitäten zur stationären Phase (Säulenmaterial) besitzen und daher bei einer bestimmten Flussrate der mobilen Phase unterschiedlich schnell die Säule durchlaufen. Aus diesem Grund werden die Proben-Komponenten zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Säule eluiert und können nacheinander von einem Detektor erfasst werden. Bei der Trennung des Stoffgemisches in der Säule spielen Adsorptions- und Verteilungsvorgänge, sowie ionische Wechselwirkungen und Ausschlussvorgänge eine Rolle. Die Zeit, die eine Substanz benötigt bis sie aus der Säule eluiert wird, wird als Retentionszeit bezeichnet. In **Abb. 3** ist der Aufbau einer HPLC-Anlage schematisch dargestellt (Dominik and Steinhilber, 2002).

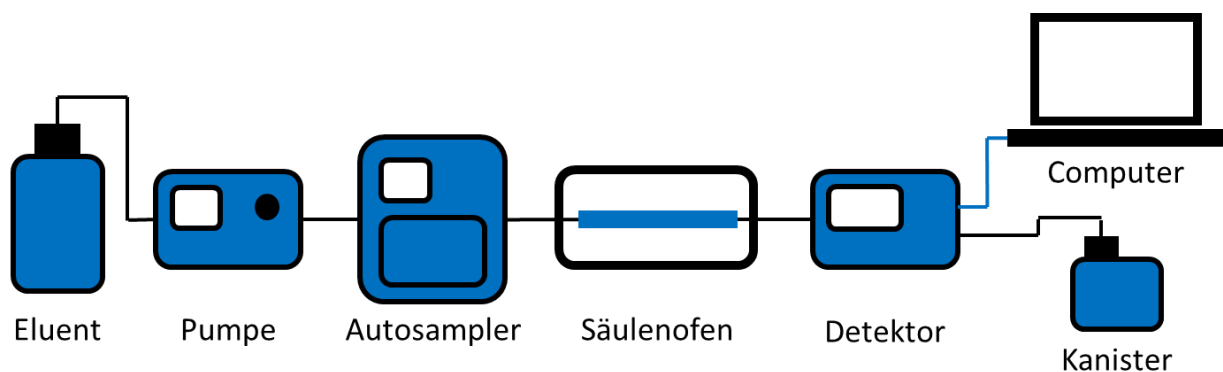


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage

Eine HPLC-Anlage besteht in der Regel aus diesen Komponenten:

- Der **Eluent** ist das Fließmittel bzw. die mobile Phase der chromatographischen Analyse. Es können auch mehrere Fließmittel zum Einsatz kommen.
- Die **Pumpe** sorgt dafür, dass der Eluent mit einer bestimmten Flussrate (Flow) durch die Bestandteile der HPLC-Anlage befördert wird. Meist werden mehrere Pumpen verwendet, um verschiedene Fließmittel in einem bestimmten Verhältnis zu vermengen.
- Im **Autosampler** befindet sich der Injektor, der die zu analysierenden Proben in das chromatographische System injiziert. Es können in der Regel mehrere Proben in den Autosampler gestellt werden, die nacheinander automatisch injiziert und analysiert werden.
- Im **Säulenofen** wird die HPLC-Säule als stationäre Phase positioniert, in der die eigentliche chromatographische Trennung stattfindet. Häufig werden C18-Säulen verwendet, die Kieselgel enthalten, das mit C18-Gruppen verestert ist. Dabei sorgt der Säulenofen für eine bestimmte Temperatur während des Trennvorgangs.
- Es können verschiedene **Detektoren** eingesetzt werden, die Bestandteile der Probe erfassen und in Signale umwandeln, z. B. UV/VIS-Detektor, Fluoreszenz-Detektor, elektrochemischer Detektor, MS-Detektor. Ein Fluoreszenz-Detektor kann fluoreszierende Verbindungen mit sehr hoher Sensitivität erfassen. Moleküle, die nicht fluoreszieren, können zuvor derivatisiert werden, sodass fluoreszierende Verbindungen entstehen.
- Aus den Signalen des Detektors wird am **Computer** ein Chromatogramm erstellt. Durch Auswertung von Chromatogrammen können einzelne Komponenten der zu analysierenden Probe qualitativ und quantitativ erfasst werden.
- Nach Passieren des Detektors wird das Fließmittel, das die analysierte Probe enthält, in der Regel in einem **Kanister** zur Entsorgung gesammelt.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Für die Durchführung aller in dieser Arbeit genannten Versuche wurden organische Lösungsmittel in HPLC-Qualität und Chemikalien der Qualitätsstufe „pro analysi“ verwendet. **Tab. 4** gibt einen Überblick über alle im Verlauf dieser Arbeit benötigten Reagenzien und Chemikalien.

Tab. 4: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
3-Mercaptopropionsäure (MPA)	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
5-Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dichlormethan	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NG,NG-Dimethylarginindihydrochlorid (ADMA)	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
NG-Monoethyl-L-arginin (MEA)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Phthaldialdehyd	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
Salzsäure 0,1M	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland)

3.2.2 Säulen und Zubehör für Vorextraktion und HPLC

In **Tab. 5** sind die für das SPE-Verfahren und für die HPLC-Analytik verwendeten Säulen sowie deren Zubehör aufgelistet.

Tab. 5: Verwendete Säulen und Zubehör für SPE und HPLC

Säule	Produkt	Hersteller
Säule für HPLC	Kinetex [®] EVO C18 2,6µm 150x4,6 100A	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Säule für SPE	Oasis [®] MCX 1cc 10mg	Waters (Eschborn, Deutschland)
Vorsäule für HPLC	SecurityGuard [®] Ultra cartridge for EVO-C18	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Vorsäulen-Halterung für HPLC	SecurityGuard [®] Ultra Holder	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

3.2.3 Laborgeräte

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden verschiedenste Geräte verwendet. **Tab. 6** gibt einen Überblick über diese verwendeten Laborgeräte. Für alle Versuche wurde Wasser verwendet, das mit der Wasseraufbereitungsanlage Arium Basic demineralisiert wurde.

Tab. 6: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	BP211D	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag Reo	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mehrfachdispenser	Multipette plus	Eppendorf (Köln/Wesseling, Deutschland)
pH-Messgerät	Lab 850	SI Analytics (Mainz, Deutschland)
Pipette (5ml)	Research plus	Eppendorf (Köln/Wesseling, Deutschland)
Pipetten (20, 200, 1000µl)	Reference 2	Eppendorf (Köln/Wesseling, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 106	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Ultrazentrifuge	Biofuge pico	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Waage	Extend ED3202S-CW	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasseraufbereitungsanlage	Arium Basic	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge	Megafuge 2.0	Heraeus (Osterode, Deutschland)

3.2.4 Verbrauchsmaterialien

Alle für die Erstellung dieser Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien sind in **Tab. 7** dargestellt.

Tab. 7: *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

Material	Typ	Hersteller
HPLC-Vial-Kappen	Schraubkappen N9, blau, Loch	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
HPLC-Vials	Vials N9 1,5ml	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
Mehrfachdispenser-Spitzen	Combitips advanced 5ml, 10ml	Eppendorf (Köln/Wesseling, Deutschland)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 200µl, 1000µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen groß	epT.I.P.S Standard/Bulk 100-5000µl	Eppendorf (Köln/Wesseling, Deutschland)
Reagiergefäße	Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Röhren	Röhren 15ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

3.2.5 Chromatographisches Trennsystem

Für die chromatographische Trennung und Detektion wurde ein Shimadzu Prominence System mit einem RF-10A XL-Fluorimeter verwendet. Dessen in **Tab. 8** aufgeführte Bestandteile sind vom Hersteller Shimadzu (Duisburg, Deutschland).

Tab. 8: *Komponenten des chromatographischen Trennsystems*

Komponente	Typ
Autosampler	SIL-20AC HT
Degasser	DGU-20A 3R
Fluoreszenz-Detektor	RF-10A XL
Pumpen	LC-20AT
Säulenofen	CTO-10AS VP
System-Controller, Schnittstelle	CBM-20A

3.2.6 Software

In **Tab. 9** ist die im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit verwendete Software aufgelistet.

Tab. 9: Verwendete Software

Zweck	Software	Hersteller
Auswertung chromatographischer Daten	Excel 2010	Microsoft (München, Deutschland)
Betriebssystem	Windows 7	Microsoft (München, Deutschland)
Erfassung chromatographischer Daten	LabSolutions	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Graphische Darstellung von Daten	SigmaPlot 13.0	Systat (Erkrath, Deutschland)
Statistische Auswertung	SPSS Statistics 25	IBM (Ehningen, Deutschland)
Textverarbeitung	Word 2010	Microsoft (München, Deutschland)
Zeichnen chemischer Strukturen	ChemDraw 18.1	PerkinElmer (Rodgau, Deutschland)
Zitieren von Literaturquellen	Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, Schweiz)

3.3 Methoden

3.3.1 HPLC-Analytik

3.3.1.1 Herstellung von Standards

Bei der vorliegenden Arbeit wurde MEA als interner Standard verwendet, da es sich hierbei um eine nicht-endogene Substanz handelt. MEA wurde als erstes von Blackwell et al. als interner Standard eingesetzt (Blackwell et al., 2009).

Stammlösungen für ADMA und MEA wurden durch Lösen der Substanzen in 10mM Salzsäure hergestellt, sodass Lösungen von ADMA in der Konzentration 100µg/ml und von MEA in der Konzentration 1mM entstanden. Die Stammlösungen wurden in Aliquoten bei -80°C gelagert. Für ADMA wurden Standards in den Konzentrationen 50ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml durch Verdünnen der Stammlösung mit Wasser hergestellt. Eine Arbeitslösung des internen Standards MEA wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit Wasser auf eine Konzentration von 5µM hergestellt.

3.3.1.2 Herstellung von Puffern und Fließmitteln

Für die Einstellung des pH-Wertes bei Puffern wurde Kaliumhydroxid-Lösung in der Konzentration 5M durch Lösen von Kaliumhydroxid-Plättchen in Wasser hergestellt.

Während der Methodenentwicklung für diese Arbeit wurden verschiedene Fließmittel hergestellt. Eines der verwendeten Fließmittel wurde aus 40% (V/V) Acetonitril, 30% (V/V) Methanol und 30% (V/V) Wasser hergestellt. Für einen Teil der in dieser Arbeit verwendeten Eluenten wurde ein 20mM Kaliumphosphatpuffer pH6,0 hergestellt. Dazu wurde Kaliumdihydrogenphosphat in Wasser gelöst und mit der 5M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH6,0 eingestellt. Durch Mischen des Phosphatpuffers mit Acetonitril in verschiedenen Anteilen wurden ein Fließmittel mit 3% (V/V) Acetonitril und ein Fließmittel mit 35% (V/V) Acetonitril hergestellt. In späteren Versuchen wurden zwei 25mM Kaliumphosphatpuffer pH6,5 mit 3% (V/V) und 35% (V/V) Acetonitril verwendet, die analog den zuvor genannten Fließmitteln hergestellt wurden. Alle Fließmittel wurden vor Gebrauch für mehrere Minuten im Ultraschallbad entgast. Diese verwendeten Eluenten sind in **Tab. 10** aufgeführt.

Tab. 10: Verwendete Fließmittel

Alle %-Angaben verstehen sich als Volumenprozent

Name	Zusammensetzung
FM A1	Kaliumphosphatpuffer 20mM pH6,0 mit 3% Acetonitril
FM B1	40% Acetonitril, 30% Methanol, 30% Wasser
FM A2	Kaliumphosphatpuffer 20mM pH6,0 mit 3% Acetonitril
FM B2	Kaliumphosphatpuffer 20mM pH6,0 mit 35% Acetonitril
FM A	Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5 mit 3% Acetonitril
FM B	Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5 mit 35% Acetonitril

Für die Methodenentwicklung wurden die Fließmittel in verschiedenen Anteilen durch unterschiedliche Einstellungen der Pumpen vermischt und die Chromatogramme ausgewertet, um festzustellen, welche die ideale Fließmittelzusammensetzung für die Chromatographie ist.

Zum Spülen der Anlage nach Ende mehrerer HPLC-Analysen wurde ein Gemisch aus 60% Acetonitril und 40% Wasser hergestellt und im Ultraschallbad entgast.

3.3.1.3 Wahl des Reagenzes für die Derivatisierung

Da ADMA selbst keine Fluoreszenz zeigt, muss es vor der Chromatographie durch Derivatisierung in eine fluoreszierende Verbindung überführt werden. In der Literatur wurden bisher folgende Reagenzien für eine Derivatisierung von ADMA beschrieben (Teerlink, 2007):

- o-Phthaldialdehyd (OPA) kombiniert mit 3-Mercaptopropionsäure (MPA)
- Naphthalin-2,3-dicarboxaldehyd (NDA)
- 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC)
- 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F)
- Phenylisothiocyanat (PITC)

Der Einsatz von OPA als Derivatisierungsreagenz bietet verschiedene Vorteile:

- Die Reaktion läuft bereits bei Raumtemperatur ab wodurch das Verfahren der Derivatisierung unkompliziert durchführbar ist (Teerlink, 2007).
- Im Gegensatz zum entstehenden Derivat fluoresziert OPA selbst nicht. Dadurch treten weniger Störpeaks auf (Teerlink, 2007).
- Das Reagenz kann kostengünstig hergestellt werden.

Aufgrund dieser Eigenschaften wurde bei der Methode OPA als Reagenz für die Derivatisierung verwendet.

Der genaue Reaktionsmechanismus der OPA-Derivatisierung ist unbekannt. Damit eine fluoreszierende Verbindung entsteht, sind ein basischer pH und ein Thiol notwendig. Als Thiol können 2-Mercaptoethanol (ME) oder 3-Mercaptopropionsäure (MPA) eingesetzt werden. Da bei der Reaktion mit ME allerdings sehr instabile Produkte entstehen (Teerlink, 2007), wurde für die Derivatisierung in dieser Arbeit MPA eingesetzt.

3.3.1.4 Herstellung der Stammlösung des OPA-Reagenzes

Es wurde ein 0,2M Boratpuffer pH9,5 hergestellt, indem Borsäure in Wasser gelöst und anschließend mit der 5M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH9,5 eingestellt wurde.

Für die Stammlösung des Derivatisierungsreagenzes wurden 10mg o-Phthaldialdehyd (OPA) in 0,2ml Methanol gelöst und 1,8ml des Kaliumboratpuffers (0,2M, pH9,5) sowie 10µl 3-Mercaptopropionsäure (MPA) hinzugegeben. Diese Stammlösung ist bei Aufbewahrung im Kühlschrank zwei Tage haltbar (Teerlink et al., 2002).

3.3.1.5 Verwendung von Poolserum

Für die Methodenentwicklung und für die Validierung wurde humanes Poolserum verwendet. Dabei handelte es sich um ein Gemisch aus mehreren Serumproben von Angestellten des Bezirksklinikums. Dafür wurde Blut von mehreren Angestellten in Serummonovetten der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und anonym zur Verfügung gestellt. Nachdem die Blutproben bei 4000UPM für 10min in einer Megafuge 2.0 (Heraeus) zentrifugiert wurden, wurde das Serum der verschiedenen Proben abpipettiert, vermengt und in 10ml-Röhrchen bei -80°C gelagert.

3.3.1.6 Vorbereitung von Serumproben für das weitere Verfahren

Das bei -80°C gelagerte Serum wurde zunächst aufgetaut und danach in Eppendorf Cups mittels einer Ultrazentrifuge (Biofuge pico) 3min lang bei 13.000UPM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand für die weitere Probenvorbereitung verwendet.

3.3.1.7 Probenaufbereitung durch Proteinfällung

Um eine möglichst zeitsparende Methode zu entwickeln, wurde zunächst versucht, die Probenvorbereitung auf eine Abtrennung der Proteine zu beschränken.

3.3.1.7.1 Probenvorbereitung

Dazu wurden 20mg 5-Sulfosalicylsäure in einem 1,5ml-Eppendorf-Cup vorgelegt und 1ml Poolserum hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups gevortext und in ein Eisbad gestellt. Nach 10min im Eisbad wurden diese mittels einer Ultrazentrifuge (Biofuge pico) 3min lang bei 13.000UPM zentrifugiert (Chen et al., 1997). Der Überstand wurde für die Derivatisierung verwendet.

3.3.1.7.2 Derivatisierung

In einem HPLC-Vial wurden 10µl des Überstandes, 70µl Borat-Puffer und 20µl der Stammlösung des OPA-Reagenzes vermengt. Die Lösung wurde 3min bei Raumtemperatur inkubiert und in den Autosampler gestellt (Chen et al., 1997).

In **Abb. 4** ist die Reaktionsgleichung der Derivatisierung dargestellt. Der genaue Reaktionsmechanismus ist allerdings bisher ungeklärt. Bei dem OPA-Derivat von ADMA handelt es sich um eine fluoreszierende Verbindung.

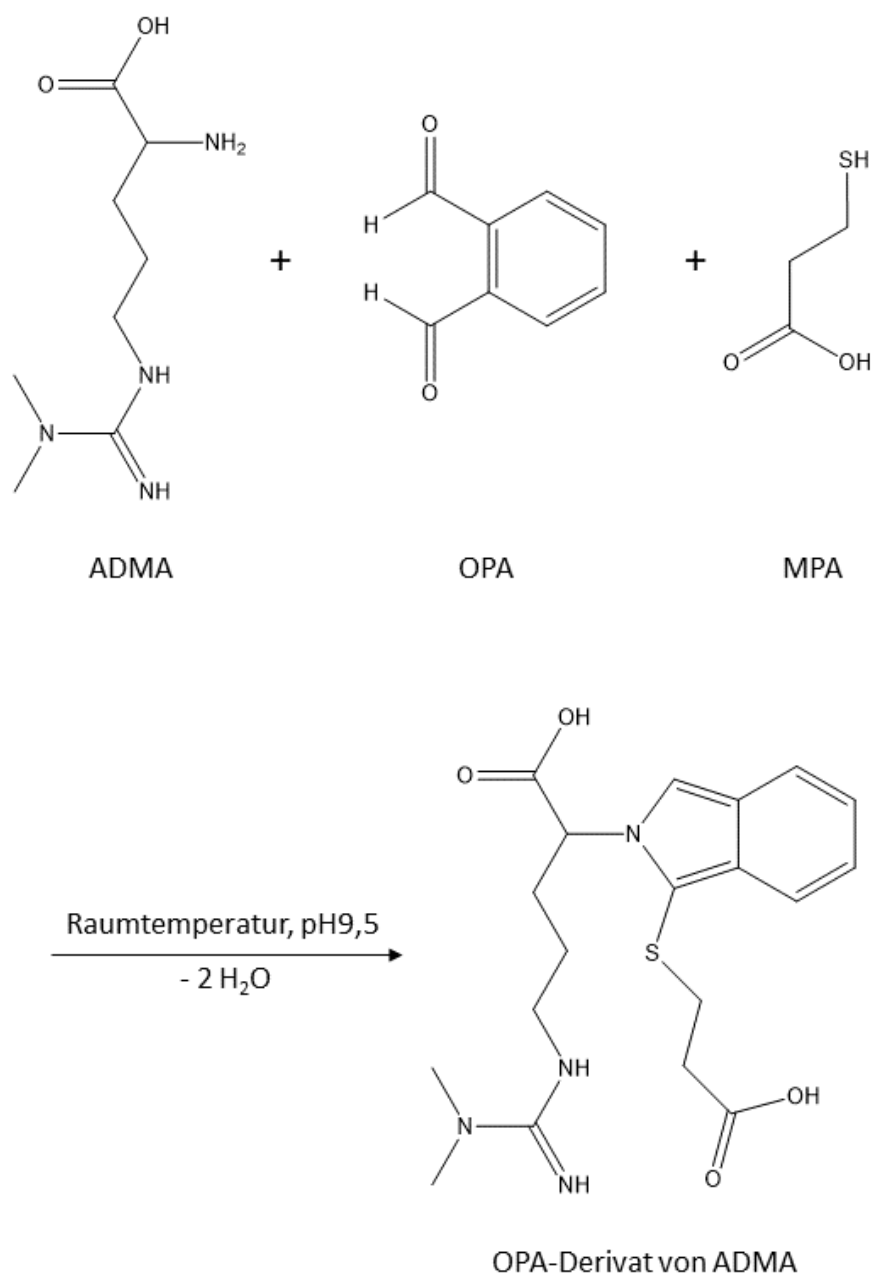


Abb. 4: Reaktion der Derivatisierung von ADMA mit dem OPA-Reagenz; modifiziert nach Teerlink (Teerlink, 2007)

3.3.1.7.3 Chromatographie

Für die chromatographische Trennung wurde die Säule Kinetex® EVO C18 2,6µm 150x4,6 100A (Phenomenex), geschützt durch die Vorsäule SecurityGuard® Ultra cartridge for EVO-C18 (Phenomenex), verwendet.

Die isokratische Trennung erfolgte mit 90% FM A1 und 10% FM B1. Somit enthielt der Eluent in der Summe 87,3% Kaliumphosphatpuffer 20mM pH6,0, 6,7% Acetonitril, 3% Methanol und 3% Wasser. Es wurden 20µl der derivatisierten Probe in das System injiziert und 30min bei einem Flow von 0,9ml/min und einer Säulenofentemperatur von 34°C getrennt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge (λ_{EX}) von 340nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{EM}) von 455nm gemessen. Die Wahl des Eluenten und die chromatographischen Bedingungen orientierten sich an Zhang et al (Zhang and Kaye, 2004).

Um festzustellen, bei welchem Peak es sich um ADMA handelt, wurde zum Vergleich ein Poolserum, dem 10µg/ml ADMA zugesetzt wurden, mit dem gleichen Verfahren aufbereitet und analysiert.

3.3.1.7.4 Veränderung der Fließmittelzusammensetzung

Für den Versuch, eine bessere Auflösung zu erreichen, wurde die Zusammensetzung des Fließmittels verändert. FM A2 bestand wie FM A1 aus einem Kaliumphosphatpuffer 20mM pH6,0, der 3% Acetonitril enthielt, während FM B2 der gleiche Phosphatpuffer mit 35% Acetonitril war. Die Fließmittel wurden in verschiedenen Anteilen durch die Pumpen vermischt. Die weiteren chromatographischen Bedingungen wurden unverändert beibehalten.

3.3.1.8 Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Um ein sauberes Chromatogramm mit besserer Auflösung des ADMA-Peaks zu erhalten, wurde versucht, störende Aminosäuren durch Ausschütteln abzutrennen. Dabei sollten deren unterschiedliche Löslichkeiten aufgrund verschiedener isoelektrischer Punkte (IEP) genutzt werden. Viele Aminosäuren besitzen ihren IEP und damit ihre geringste Wasserlöslichkeit bei einem pH von ca. 6, während der IEP von ADMA bei einem pH von über 10 liegt.

Dazu wurde ein Natriumphosphatpuffer 50mM pH6,0 hergestellt. In einem 4ml-Röhrchen wurden zu 100µl Serum 200µl dieses Puffers und zur Abtrennung der Proteine 500µl Acetonitril pipettiert. Anschließend wurde mit 1,3ml Dichlormethan ausgeschüttelt. 20µl der oberen Wasserphase wurden abpipettiert und wie oben beschrieben derivatisiert.

Für einen Vergleich wurde Serum mit Wasser 1:3 verdünnt, sodass ADMA theoretisch die gleiche Konzentration erreicht, wie in der Wasserphase nach dem Ausschütteln. Anschließend wurde es wie oben beschrieben durch Proteinfällung mit 5-SSA aufbereitet und gleichermaßen derivatisiert.

Das Fließmittel bestand aus 14% FM B2 und 86% FM A2. Die Laufzeit wurde auf 25min verkürzt. Alle anderen chromatographischen Bedingungen wurden beibehalten.

3.3.1.9 Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion (SPE)

Im Folgenden wurde versucht, die Auflösung durch eine SPE zu verbessern. Ausgangspunkt dafür war die Methode von Teerlink et al. (Teerlink et al., 2002), an der einige Modifikationen durchgeführt wurden. Hier wurde auch der interne Standard MEA (Blackwell et al., 2009) in die Methode integriert.

3.3.1.9.1 Probenvorbereitung

Alle Wasch-, Beladungs- und Elutionsschritte wurden mittels Zentrifugation bei 1000UPM über eine Minute in der Megafuge 2.0 durchgeführt. Dazu wurden die SPE-Säulen auf 15ml-Röhren gesetzt, welche in die Einsätze der Zentrifuge gestellt wurden. Vor der Elution wurden HPLC-Vials in frische Röhren gestellt, auf welche die SPE-Säulen gesetzt wurden, sodass direkt in die Vials eluiert werden konnte.

Das Elutionsmittel wurde durch Vermischen von Ammoniumhydroxidlösung, Wasser und Methanol im Volumenverhältnis 1:4:5 hergestellt.

Die SPE-Säulen wurden zunächst mit 0,5ml des Elutionsmittels präkonditioniert und anschließend mit 0,5ml Wasser equilibriert. 100µl Serum werden mit 50µl der Arbeitslösung des internen Standards MEA und 350µl Wasser versetzt und auf die Säulen pipettiert. Nach dem Beladen wurden die Säulen zuerst mit 0,5ml 0,1M Salzsäure und dann mit 0,5ml Methanol gewaschen. Anschließend wurde mit 0,5ml des Elutionsmittels in saubere 15ml-Röhrchen eluiert. Die Eluate wurden dann für ca. 1 Stunde in einer Vakuumzentrifuge bei 60°C unter Verwendung von flüssigem Stickstoff eingengt. Der Rückstand wurde in 50µl Wasser aufgenommen.

3.3.1.9.2 Derivatisierung

Zur Herstellung der Arbeitslösung des OPA-Reagenzes wurde dessen Stammlösung 1:5 mit Kaliumboratpuffer (0,2M, pH9,5) verdünnt. Anschließend wurden 50µl der Arbeitslösung zu dem in 50µl Wasser aufgenommenem Rückstand pipettiert und 3min bei Raumtemperatur inkubiert (Teerlink et al., 2002).

3.3.1.9.3 Chromatographie

Für die Methodenoptimierung wurden die Fließmittel A und B in verschiedenen Anteilen durch unterschiedliche Einstellungen der Pumpen vermischt und die Chromatogramme ausgewertet, um festzustellen, welche die ideale Fließmittelzusammensetzung für die Chromatographie ist. Das ermittelte Fließmittel für die isokratische Trennung war ein Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5, der 9,7% Acetonitril enthielt. Dazu wurde die Pumpe für FM A (3% Acetonitril) auf 79% und die

Pumpe für FM B (35% Acetonitril) auf 21% eingestellt. Es wurden 5µl der derivatisierten Probe (Serum bzw. Standard) in das System injiziert und 14min bei einem Flow von 1ml/min und einer Säulenofentemperatur von 40°C getrennt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge (λ_{EX}) von 340nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{EM}) von 455nm gemessen.

3.3.1.10 Festphasenextraktion ohne Einengen des Eluats

3.3.1.10.1 Entwicklung eines neuen Elutionsmittels für die Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) wurden die Säulen Oasis[®] MCX 10mg 1cc von Waters, die ein starkes Kationen-Austausch-Polymer enthalten, verwendet. Um ADMA und MEA erfolgreich zu eluieren, müssen deren Bindungen an das Polymer gelöst werden. Dafür muss das Elutionsmittel sowohl einen ausreichend basischen pH als auch eine ausreichende Ionenkonzentration aufweisen.

Teerlink et al (2002) verwendeten als Elutionsmittel 10% konz. Ammoniak, 40% Methanol, 50% Wasser. Der Ammoniak sorgt dabei für die ausreichend hohe Basizität und Ionenkonzentration. Allerdings wird die Derivatisierung von ADMA und MEA durch Ammoniak gestört, da o-Phthaldialdehyd (OPA) auch mit dem reichlich vorhandenen Ammoniak reagiert und damit weniger OPA für die Reaktion mit den Analyten zur Verfügung steht. Das würde dazu führen, dass die Derivatisierung von ADMA unvollständig abläuft, was eine Verfälschung des Messergebnisses zur Folge hätte. Außerdem würde dann ein weiterer störender Peak im Chromatogramm auftreten. Deshalb musste bei Teerlink et al (2002) vor der Derivatisierung das Elutionsmittel abgedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen werden. Das Abdampfen ist allerdings ein sehr zeitaufwändiger Vorgang, insbesondere aufgrund des Wasser-Gehaltes.

Um ein Abdampfen zu vermeiden, wurde versucht, Ammoniak im Elutionsmittel durch Komponenten zu ersetzen, welche die nachfolgenden Schritte nicht stören und deshalb vor der Derivatisierung nicht entfernt werden mussten. Um festzustellen, ob das „neue“ Elutionsmittel zuverlässig funktioniert, wurde jeweils die Extraktionsausbeute von ADMA und MEA ermittelt. (s. Kapitel 3.3.1.11.1 Extraktionsausbeute)

3.3.1.10.2 Festphasenextraktion der Proben und Standards

Alle Wasch-, Beladungs- und Elutionsschritte wurden analog *Kapitel 3.3.1.9.1 (Probenvorbereitung)* durchgeführt. Für die Herstellung des Elutionsmittels wurden 0,4g Kaliumchlorid in 5,96ml Wasser gelöst und 0,04ml 5M Kaliumhydroxid-Lösung sowie 4ml Methanol zugegeben. Am Ende des SPE-Verfahrens wurde mit 0,3ml des Elutionsmittels in die HPLC-Vials eluiert.

3.3.1.10.3 Derivatisierung

0,3ml der Arbeitslösung des Derivatisierungsreagenzes wurden in die HPLC-Vials pipettiert, die den eluierten Analyten enthalten, und mindestens 3min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Vials in den Autosampler gestellt.

3.3.1.10.4 Chromatographie

Die chromatographische Laufzeit wurde auf 13min reduziert. Alle weiteren chromatographischen Bedingungen wurden beibehalten.

Nach jeder Probe wurde die Säule 10min lang mit einem Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5, der 35% Acetonitril enthielt (100% FM B), gespült. Nach dem Spülen der Säule wurde sie 6min mit der mobilen Phase für die chromatographische Trennung equilibriert (79% FM A und 21% FM B). Somit beträgt die Zeit zwischen zwei Injektionen insgesamt 29min.

Nach Ende eines Batchs wurden die Anlage und die Säule mit 60% Acetonitril in Wasser für 30min bei einem Flow von 1ml/min gespült.

3.3.1.10.5 Auswertung der Chromatogramme

Die Aufzeichnung der Chromatogramme und die Berechnung der Peakflächen wurden mit dem Programm LabSolutions (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden und die Berechnung der ADMA-Konzentrationen wurde Excel 2010 (Microsoft, München, Deutschland) verwendet.

Alle Substanzen wurden über die Peakfläche quantifiziert. Für jeden Lauf wurde eine Kalibriergerade durch lineare Regression erstellt, indem der Quotient der Peakflächen von ADMA und MEA gegen die ADMA-Konzentration der drei Standards (50ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml) aufgetragen wurde.

Die Gleichung dieser Regressionsgeraden hat die Form

$$y = a * x + b$$

y: Peakflächenverhältnis $100 * \text{Peakfläche(ADMA)} / \text{Peakfläche(MEA)}$

a: Steigung der Regressionsgeraden

x: Serumkonzentration von ADMA

b: y-Achsenabschnitt

Mithilfe der Gleichung dieser Geraden konnte für alle Serumproben im gleichen Lauf aus dem Peakflächenverhältnis y die ADMA-Konzentration x ermittelt werden.

$$x = \frac{y - b}{a}$$

3.3.1.11 Validierung der Methode

3.3.1.11.1 Extraktionsausbeute

Um festzustellen, ob das neu entwickelte Elutionsmittel zuverlässig eluiert, wurde jeweils die Extraktionsausbeute von ADMA und MEA nach der SPE bestimmt. Dazu wurde eine wässrige Lösung von ADMA in der Konzentration 100ng/ml nach der beschriebenen Methode sechsmal aufbereitet und gemessen. Zum Vergleich wurden 100µl dieser Lösung mit 50µl MEA-Arbeitslösung und 150µl Wasser versetzt und ohne SPE sechsmal sofort derivatisiert und gemessen. Anschließend wurden die Extraktionsausbeuten von ADMA und MEA berechnet, indem jeweils die Peakflächen nach SPE durch die Peakflächen ohne SPE dividiert wurden. Die relative Extraktionsausbeute wurde ermittelt, indem der Quotient der Extraktionsausbeuten von ADMA und MEA berechnet wurde. Eine Extraktionsausbeute von jeweils über 80% wurde als akzeptabel erachtet.

3.3.1.11.2 Quantifizierungsgrenze (LOQ, Limit of Quantification)

Da bisher keine Fälle bekannt sind, in denen humanes Blut frei von ADMA ist, kann davon ausgegangen werden, dass jedes Serum diesen endogenen NOS-Inhibitor enthält. Daher wurde auf die Ermittlung der Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) verzichtet. Allerdings wurde die Quantifizierungsgrenze ermittelt. Es wurde untersucht, bei welcher ADMA-Konzentration in der Probe das Signal-Rausch-Verhältnis nach Aufbereitung und Chromatographie 1:10 beträgt. Die ermittelte Konzentration wurde als LOQ definiert.

3.3.1.11.3 Linearität

Um festzustellen, ob die Methode linear ist, wurde eine Kalibriergerade aus sechs Punkten erstellt, deren niedrigster Punkt die Quantifizierungsgrenze darstellt. Dafür wurden durch Verdünnen der ADMA-Stammlösung mit Wasser ADMA-Lösungen mit den Konzentrationen 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 400ng/ml und 800ng/ml hergestellt. Jede dieser Lösungen wurde dreimal mit der beschriebenen Methode aufbereitet und chromatographisch analysiert. Dann wurde das Peakflächenverhältnis von ADMA zu MEA gegen die ADMA-Konzentration graphisch aufgetragen und die Gleichung sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 der Kalibriergerade ermittelt. Die Methode wurde als ausreichend linear erachtet, wenn das Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,98$ war.

3.3.1.11.4 Richtigkeit

Für die Bestimmung der Richtigkeit einer HPLC-Methode werden üblicherweise zertifizierte Referenz-Standards verwendet. Da es allerdings für ADMA solche Referenz-Standards nicht gibt, wurde die Richtigkeit mithilfe der Kalibriergeraden ermittelt. Dazu wurde für jeden der sechs Kalibrierpunkte die ADMA-Konzentration aus dem Peakflächenverhältnis von ADMA zu MEA mithilfe der Geradengleichung berechnet. Anschließend wurde an jedem Punkt die Abweichung der berechneten ADMA-Konzentration von der wahren ADMA-Konzentration bestimmt und als Bias ausgedrückt. Für den Bias wurden Werte unter 10% und nahe des LOQ unter 20% als akzeptabel erachtet.

3.3.1.11.5 Präzision

Es wurde eine Serumprobe mit niedriger ADMA-Konzentration und eine Serumprobe mit hoher ADMA-Konzentration verwendet. Beide Serumproben wurden jeweils dreimal am Tag an sechs verschiedenen Tagen mit der beschriebenen Methode aufbereitet und gemessen. Aus den gemessenen ADMA-Konzentrationen wurden die Variationskoeffizienten $CV_{\text{intra-assay}}$ und $CV_{\text{inter-assay}}$ berechnet. Die Methode wurde als ausreichend präzise erachtet, wenn $CV_{\text{intra-assay}}$ und $CV_{\text{inter-assay}}$ jeweils kleiner als 5% waren.

3.3.1.11.6 Matrixeffekt

Der Matrixeffekt der entwickelten Methode wurde gemäß Teerlink et al. bestimmt (Teerlink et al., 2002). Sechs verschiedene Volumina eines Poolserums (25µl, 50µl, 100µl, 150µl, 200µl und 250µl) wurden mit 50µl MEA-Arbeitslösung versetzt und mit Wasser auf 500µl aufgefüllt. Diese sechs Proben wurden mit der beschriebenen Methode aufbereitet und chromatographisch bestimmt. Die gemessenen ADMA-

Konzentrationen wurden graphisch gegen die eingesetzten Volumina an Poolserum aufgetragen und das Bestimmtheitsmaß R^2_{Matrix} der zugehörigen Geraden ermittelt. Wenn R^2_{Matrix} größer als 0,98 war, wurde der Matrixeffekt als vernachlässigbar eingestuft.

3.3.1.12 Zusammenfassung der entwickelten Methode

Nachfolgend ist die entwickelte und validierte Methode zusammengefasst. Alle Analysen von ADMA-Konzentrationen im Serum von Probanden wurden mit dieser Methode durchgeführt.

3.3.1.12.1 Herstellung der Standards

- ADMA-Stammlösung: Lösen von ADMA zu 100µg/ml in 10mM Salzsäure, Lagerung bei -80°C
- MEA-Stammlösung: Lösen von MEA zu 1mM in 10mM Salzsäure, Lagerung bei -80°C
- Kalibrations-Standards: Verdünnen der ADMA-Stammlösung mit Wasser zu 50ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml
- Interner Standard: Verdünnen der MEA-Stammlösung mit Wasser zu 5µM

3.3.1.12.2 Vorbereitung der Blutproben

- Zentrifugation bei 4000UPM für 10min in einer Megafuge 2.0 (Heraeus)
- Abpipettieren des Serums in Eppendorf-Cups, Lagerung bei -80°C
- Zentrifugation des (aufgetauten) Serums bei 13000UPM für 3min in einer Biofuge pico (Heraeus)

3.3.1.12.3 Festphasenextraktion der Proben und Standards

- Verwendete Säulen: Oasis® MCX 10mg 1cc (Waters)
- Durchführung aller SPE-Schritte jeweils mittels Zentrifugation der auf 15ml-Röhrchen gesetzten SPE-Säulen bei 1000UPM für 1min in Megafuge 2.0; Elution direkt in HPLC-Vials
- SPE-Elutionsmittel: 0,4g Kaliumchlorid, 5,96ml Wasser, 0,04ml 5M Kaliumhydroxid-Lösung, 4ml Methanol
- Präkonditionieren: 0,5ml Elutionsmittel
- Equilibrieren: 0,5ml Wasser
- Beladen: 100µl Serum bzw. Standard, 50µl interner Standard, 350µl Wasser
- Waschen 1: 0,5ml 0,1M Salzsäure

- Waschen 2: 0,5ml Methanol
- Elution: 0,3ml SPE-Elutionsmittel

3.3.1.12.4 Derivatisierung

- OPA-Reagenz-Stammlösung: 10mg OPA, 0,2ml Methanol, 1,8ml Kaliumboratpuffer 0,2M pH9,5, 10µl MPA
- OPA-Reagenz: Verdünnen dieser Stammlösung 1:5 mit Kaliumboratpuffer
- Derivatisierung: 0,3ml OPA-Reagenz zu Vial mit SPE-Eluat pipettieren, 3min bei Raumtemperatur inkubieren, Vial in Autosampler positionieren

3.3.1.12.5 Chromatographie

- Säule: Kinetex® EVO C18 2,6µm 150x4,6 100A (Phenomenex)
- Vorsäule: SecurityGuard® Ultra cartridge for EVO-C18 (Phenomenex)
- Eluent: Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5 mit 9,7% Acetonitril (V/V)
- Injektion: 5µl
- Laufzeit: 13min
- Flow: 1ml/min
- Säulenofentemperatur: 40°C
- Fluoreszenz-Detektion: $\lambda_{EX} = 340\text{nm}$; $\lambda_{EM} = 455\text{nm}$
- Waschen: 10min, Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5 mit 35% Acetonitril (V/V), 1ml/min, 40°C
- Equilibrieren: 6min, Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5 mit 9,7% Acetonitril (V/V), 1ml/min, 40°C

(Braun et al., 2020)

3.3.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten

3.3.2.1 Antrag bei der Ethikkommission

Für die folgenden Analysen musste bei gesunden Personen Blut abgenommen werden. Dabei handelte es sich um ein invasives Verfahren, das medizinisch nicht notwendig war und mit Risiken wie z. B. Infektionen verbunden war. Da allerdings die Blutabnahme von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt wurde, ergab sich ein stark minimiertes Risiko für Komplikationen. Außerdem wurden alle Personen der Kontrollgruppe über die Studie und mögliche damit verbundene Risiken aufgeklärt. Alle Kontrollpersonen waren volljährig und einwilligungsfähig und gaben ihre Einwilligung

für die durchzuführenden Analysen. Dennoch musste im Vorfeld dieser Studie ein Antrag bei der Ethikkommission der Universität Regensburg eingereicht werden.

Die Ethikkommission kam zu dem Votum, dass keine ethischen Bedenken gegen die Untersuchungen für diese Studie vorlagen. Sie stellte dafür die Bedingung, dass die Blutabnahme ausschließlich von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden darf. Diese Voraussetzung wurde durchgehend eingehalten.

3.3.2.2 Patientenproben

Zur Bestimmung der Serumkonzentration von ADMA bei Patient/-innen mit psychischen Erkrankungen wurden Blutproben verwendet, die zuvor für den Zweck eines Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) abgenommen wurden. Die Blutproben stammen von Patient/-innen aus verschiedenen Kliniken und Arztpraxen innerhalb Deutschlands und wurden zusammen mit einem Anforderungsschein an das TDM-Labor der Klinischen Pharmakologie am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg gesendet. Nachdem dort die Wirkstoffkonzentration von Psychopharmaka bestimmt und befundet wurde, konnte übrig gebliebenes Serum für eine Bestimmung der ADMA-Konzentration verwendet werden.

Für die Blutabnahme in den Kliniken und Praxen wurden Serum-Monovetten von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden nach Ankunft im TDM-Labor 10min bei 4000UPM mit einer Heraeus Megafuge 2.0 zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert sodass damit eine Wirkstoffkonzentrationsbestimmung durchgeführt werden konnte. Der Rest des Serums wurde bei -80°C gelagert und für die Bestimmung der ADMA-Konzentration nach oben beschriebener Methode verwendet.

Von der Bestimmung der ADMA-Konzentration wurden Patient/-innen ausgeschlossen, bei denen neben einer psychischen Erkrankung noch weitere Erkrankungen diagnostiziert wurden, welche die Serumkonzentration von ADMA erhöhen können, z. B.: Niereninsuffizienz, Hypertonie oder Diabetes mellitus.

3.3.2.3 Kontrollgruppe

Zur Bestimmung der ADMA-Konzentration bei der Kontrollgruppe wurde Blut von gesunden Personen abgenommen. Dabei handelt es sich um Personen aus dem Bekanntenkreis. Für die Blutabnahme wurden Serum-Monovetten von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Das Blut wurde von qualifiziertem Fachpersonal abgenommen und genauso aufbereitet wie das Blut der Patientengruppen. Danach wurde mit der beschriebenen Methode die ADMA-Konzentration im Serum bestimmt.

Bei den Kontrollpersonen wurde ausgeschlossen, wer an einer psychischen Erkrankung oder weiteren Erkrankungen leidet, die die ADMA-Konzentration erhöhen

können. Damit mögliche Komplikationen bei der Blutabnahme vermieden wurden, waren außerdem die Einnahme von Antikoagulantien oder das Vorliegen einer Hämophilie oder anderer Störungen der Blutgerinnung Ausschlussgründe.

3.3.2.4 Erfassung von Daten bei den Patientenproben

Bei den Patientenproben wurden folgende Daten jeweils aus dem TDM-Anforderungsschein erfasst:

- Alter
- Geschlecht
- Körpergröße
- Körpergewicht
- Raucherstatus
- Diagnose(n)
- Medikation
- Ausmaß der Erkrankung
- Veränderung des Zustandes während der Therapie

Das Ausmaß der Erkrankung wurde von dem Arzt, der die Wirkstoffkonzentrationsbestimmung anforderte, objektiv beurteilt. Dabei konnten folgende Zustände angegeben werden:

Patient/-in ist...

- Grenzfall psychischer Erkrankung
- leicht krank
- mäßig krank
- deutlich krank
- schwer krank
- extrem schwer krank

Auch die mögliche Veränderung des Zustandes unter Therapie konnte der anfordernde Arzt auf dem Anforderungsschein vermerken. Dafür gab es folgende Möglichkeiten:

Patient/-in wurde unter der Therapie in den letzten Tagen...

- deutlich schlechter
- schlechter
- etwas schlechter
- nicht besser (Patient/-in blieb gleich)
- etwas besser
- besser
- deutlich besser

Außer den Daten aus den Anforderungsschein wurde bei den Patientenproben noch erfasst:

- Serumkonzentration des angeforderten Wirkstoffes
- Serumkonzentration von ADMA

Die Wirkstoffkonzentration wurde im Rahmen des TDM bestimmt. ADMA wurde mit der beschriebenen Methode quantifiziert.

Sowohl die Daten aus dem Anforderungsbogen als auch die gemessene Wirkstoffkonzentration und die ADMA-Konzentration wurden durch Vergabe einer Probennummer pseudonymisiert.

3.2.2.5 Erfassung von Daten bei der Kontrollgruppe

Bei den gesunden Kontrollpersonen wurden folgende Daten bei der Blutabnahme erfasst:

- Alter
- Geschlecht
- Körpergröße
- Körpergewicht
- Raucherstatus

Außerdem wurde noch erfasst:

- Serumkonzentration von ADMA

Die ADMA-Konzentration wurde mit der beschriebenen Methodik bestimmt.

Auch bei der Kontrollgruppe wurden Alter, Geschlecht, Körpergröße, Körpergewicht, Raucherstatus und Serumkonzentration von ADMA durch Vergabe einer Probennummer pseudonymisiert.

3.3.2.6 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS Statistics 25 von IBM durchgeführt.

Alle Werte wurden zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht, um danach einen geeigneten Test zu wählen. Für alle durchgeführten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgesetzt. Die Signifikanzen aller Post-hoc-Analysen wurden mit der Bonferroni-Korrektur angepasst.

3.3.2.6.1 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden

Die Probanden wurden in folgende drei Gruppen eingeteilt:

- Gesunde: Kontrollgruppe
- Patient/-innen mit F2X-Diagnose (Schizophrenie oder Schizoaffective Störung)
- Patient/-innen mit F3X-Diagnose (affektive Störungen)

Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um festzustellen, ob die Serumkonzentrationen von ADMA in der F2X- bzw. in der F3X-Gruppe im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht sind.

3.3.2.6.2 Einfluss des Alters

Es wurde bei F2X- und F3X-Patient/-innen sowie bei Gesunden mittels Analyse der Spearman-Rho-Korrelation ermittelt, ob die Serumkonzentration von ADMA mit dem Alter der Probanden korreliert.

3.3.2.6.3 Einfluss des Geschlechts

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde jeweils bei F2X-Patient/-innen, bei F3X-Patient/-innen und Gesunden ermittelt, ob sich die ADMA-Konzentrationen von Frauen signifikant von denen von Männern unterscheiden.

3.3.2.6.4 Einfluss des Schweregrades der Erkrankung

Außerdem wurde untersucht, ob der Schweregrad der Erkrankung einen Einfluss auf die ADMA-Konzentration hat. Dazu wurden die F2X- und F3X-Patient/-innen jeweils in Gruppen nach dem Schweregrad ihrer Erkrankung eingeteilt. Dieser wurde durch einen Arzt beurteilt und auf dem TDM-Anforderungsbogen vermerkt. Die Patient/-innen wurden in folgende Schweregrade bzw. Gruppen eingeteilt:

- Patient/-in ist mäßig krank
- Patient/-in ist deutlich krank
- Patient/-in ist schwer krank

Dabei wurden Personen deren Zustand auf dem Anforderungsschein als „leicht krank“ angegeben wurde, in die Gruppe „mäßig krank“ integriert. Personen mit dem Zustand „extrem schwer krank“ wurden analog dazu mit den „schwer kranken“ Probanden zusammengefasst. Keine in diese Analysen eingeschlossene Person war „Grenzfall psychischer Erkrankung“. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurde dann bei Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffectiver Störung untersucht, ob die verschiedenen Gruppen signifikant unterschiedliche Serumkonzentrationen von

ADMA aufweisen. Bei Patient/-innen mit affektiven Störungen wurde dafür die einfaktorielle ANOVA verwendet.

3.3.2.6.5 Einfluss einer Zustandsverbesserung unter Therapie

Auf den Anforderungsbögen gab es für die behandelnden Ärzte diverse Möglichkeiten, die Veränderung des Zustandes der Erkrankung zu vermerken. Da für die Studie nur von Interesse war, ob eine Zustandsverbesserung Auswirkungen auf die ADMA-Konzentration hat, wurden diese Angaben zu folgenden Optionen zusammengefasst:

- Patient/-in wurde in den letzten Tagen besser
- Patient/-in wurde in den letzten Tagen nicht besser

Sowohl die Personen mit Schizophrenie oder Schizoaffectiver Störung als auch die Personen mit affektiven Störungen wurden in diese zwei Gruppen eingeteilt. Ob sich die beiden Gruppen signifikant in der Serumkonzentration von ADMA unterscheiden, wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test (F2X-Patient/-innen) bzw. mit dem t-Test (F3X-Patient/-innen) analysiert.

3.3.2.6.6 Einfluss der Medikation

Es wurde analysiert, ob die Einnahme verschiedener Arzneistoffe zu unterschiedlichen Serumkonzentrationen von ADMA führt. Da sichergestellt werden sollte, dass von der verordneten Medikation eine ausreichende Wirkung zu erwarten war, wurden nur die Fälle berücksichtigt, bei denen die Wirkstoffkonzentration mindestens 50% der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug. Somit wurden mögliche Verzerrungen wie Compliance-Probleme oder niedrige Konzentrationen durch CYP-Interaktionen ausgeschlossen.

Deshalb wurden die Personen in verschiedene Gruppen nach Arzneistoff unterteilt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde dann untersucht, ob die ADMA-Konzentrationen in den verschiedenen Arzneistoffgruppen unterschiedlich verteilt sind.

3.3.2.6.7 Unterschiede zwischen Patient/-innen mit verschiedenen Diagnosen

Für die weiteren Auswertungen wurden die Probanden nach Diagnose in folgende Gruppen unterteilt:

- Gesunde
- F2X Schizophrenie oder Schizoaffective Störung
 - F20 Schizophrenie
 - F25 Schizoaffective Störung
- F3X Affektive Störungen
 - F31 Bipolare affektive Störung
 - F32/F33 Depression

Alle Gruppen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests für unabhängige Stichproben auf Unterschiede in den Serumkonzentrationen von ADMA untersucht.

3.3.2.6.8 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung

Die Patient/-innen mit Depression, bei denen die Diagnose genauer angegeben wurde, wurden zur weiteren Auswertung in zwei Subgruppen unterteilt:

F32/F33 Depression

- F32 Depressive Episode
- F33 Rezidivierende depressive Störung

Mit dem t-Test wurde untersucht, ob Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung (F33) höhere ADMA-Werte besitzen als Patient/-innen mit einer depressiven Episode (F32).

3.3.2.6.9 Unterschiede innerhalb Patientengruppen mit Diagnosen F25 und F31

Außerdem wurde ermittelt, ob Patient/-innen, die sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme in manischer, depressiver oder gemischter Phase einer Schizoaffektiven oder Bipolaren Störung befanden, unterschiedliche Serumkonzentrationen von ADMA aufweisen. Dazu wurden die Personen mit Schizoaffectiver Störung und Bipolarer Störung nach ihrem gegenwärtigen Zustand, der aus dem ICD-10-Code der Diagnose entnommen wurde, in Subgruppen unterteilt:

- Gegenwärtig manisch
- Gegenwärtig depressiv
- Gemischt

Diese Patient/-innen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA auf Unterschiede zwischen den Subgruppen untersucht.

3.3.2.6.10 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung zusätzlich kardiovaskuläre Erkrankung vorliegen

Zusätzlich wurden die ADMA-Konzentrationen von Personen, welche außer einer psychiatrischen Erkrankung noch an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung leiden, gemessen. Diese Patient/-innen erhielten zusätzlich zu Psychopharmaka noch eine Medikation mit Antihypertensiva oder Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase. Es wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Test analysiert, ob sich die ADMA-Konzentrationen dieser Patient/-innen signifikant von den ADMA-Konzentrationen gesunder Personen oder Patient/-innen, welche nur psychisch erkrankt sind, unterscheiden.

4. Ergebnisse

4.1 HPLC-Analytik

4.1.1 Probenvorbereitung durch Proteinfällung

Abb. 5 zeigt ein Chromatogramm nach Proteinfällung mit 5-SSA und Derivatisierung von Poolserum, dem ADMA in höherer Konzentration zugesetzt wurde sowie ein Chromatogramm eines Poolserums ohne hinzugefügtem ADMA. Das Fließmittel für diese Läufe setzte sich aus 90% FM A1 und 10% FM B1 zusammen.

Im oberen Chromatogramm ist die Lage des ADMA-Peaks gut zu erkennen. Im Chromatogramm des Poolserums, dass ADMA in physiologischer Konzentration enthält, ist keine ausreichende Auflösung des ADMA-Peaks gewährleistet. Außerdem ist die Retentionszeit von ADMA mit ca. 21min sehr lang.

Auch durch eine Veränderung der Anteile von FM A1 und FM B1 konnte keine bessere Auflösung des ADMA-Peaks erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Fließmittel verändert. Doch die Verwendung von FM A2 und FM B2 in verschiedenen Anteilen führte ebenfalls zu keiner Verbesserung der Auflösung des ADMA-Peaks oder seiner Retentionszeit.

Da diese Überlagerungen vermutlich hauptsächlich durch Aminosäuren oder andere Substanzen, die Aminogruppen enthalten, zustande kommen, wurde angestrebt, das Serum durch Abtrennung der störenden Substanzen weiter aufzureinigen.

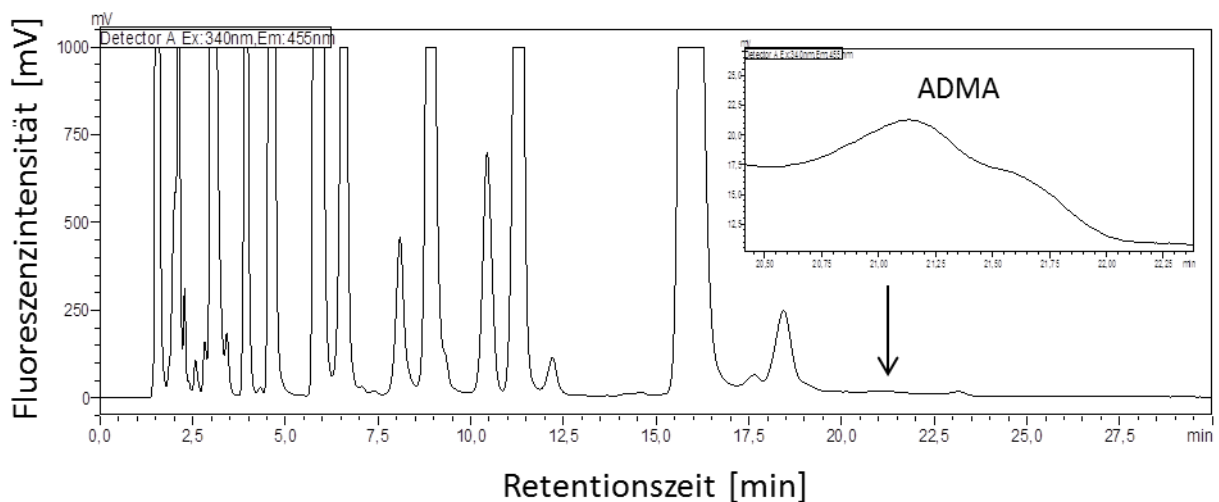
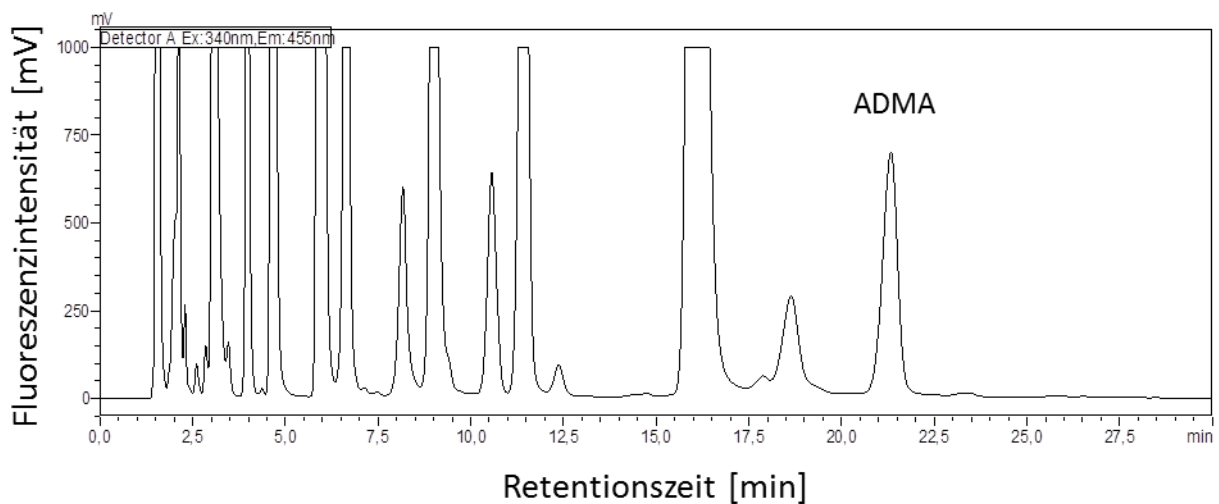


Abb. 5: Chromatogramme von Serum-Proben, die durch Proteinfällung mit 5-SSA aufbereitet wurden; der ADMA-Peak ist bei physiologischen ADMA-Konzentrationen unzureichend aufgelöst

oben: Poolserum, dem eine ADMA-Lösung zugesetzt wurde

unten: Poolserum

ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt

4.1.2 Probenvorbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

In **Abb. 6** ist ein Chromatogramm eines Poolserums, dem ADMA zugesetzt wurde, sowie ein Chromatogramm eines Poolserums mit physiologischer ADMA-Konzentration abgebildet. Die Probenaufbereitung erfolgte in beiden Fällen durch Flüssig-Flüssig-Extraktion.

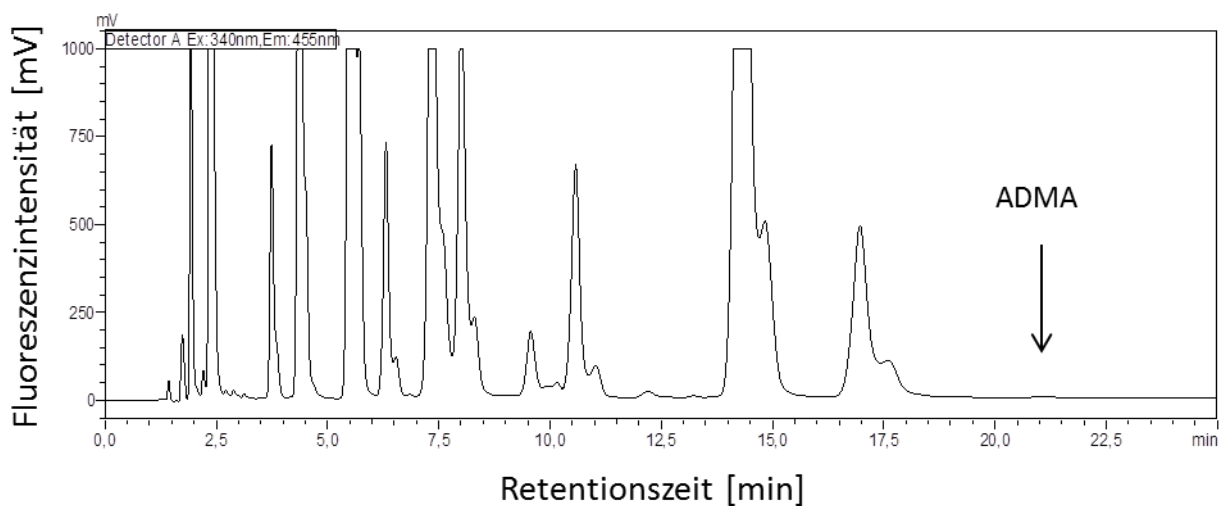
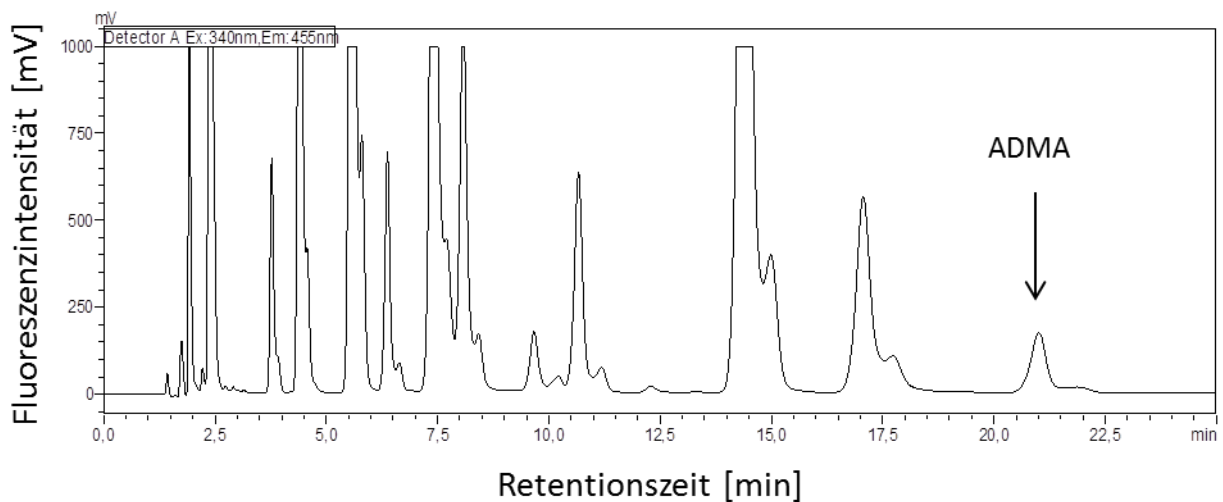


Abb. 6: Chromatogramme von Serum-Proben, die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion aufbereitet wurden; der ADMA-Peak ist bei physiologischen ADMA-Konzentrationen unzureichend aufgelöst

oben: Poolserum, dem eine ADMA-Lösung zugesetzt wurde

unten: Poolserum

ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt

Abb. 7 zeigt ein Chromatogramm eines Poolserums, dass durch Flüssig-Flüssig-Extraktion aufbereitet wurde und zum Vergleich ein Chromatogramm desselben Poolserums, dass durch eine Proteinpräzipitation mit 5-SSA vorbereitet wurde.

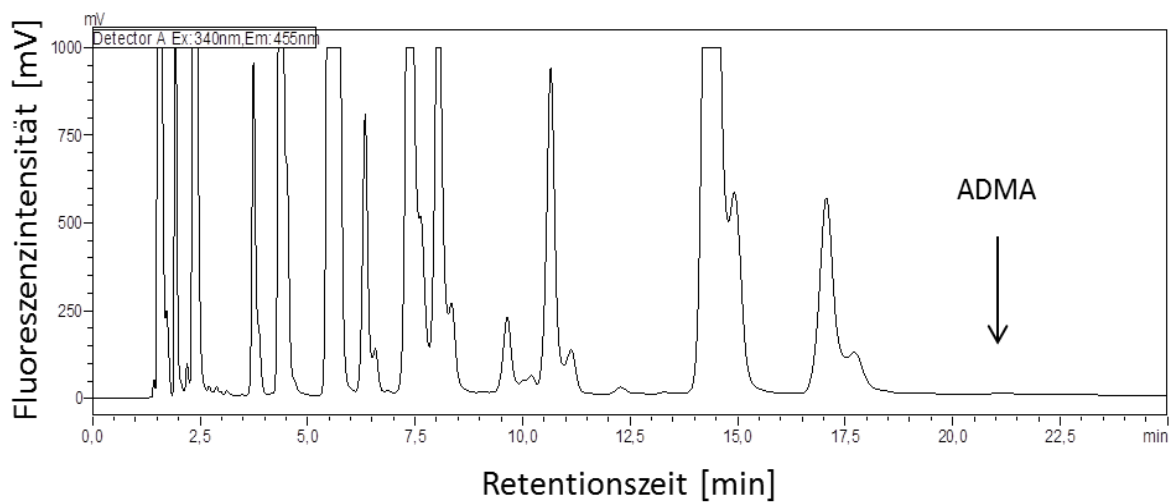
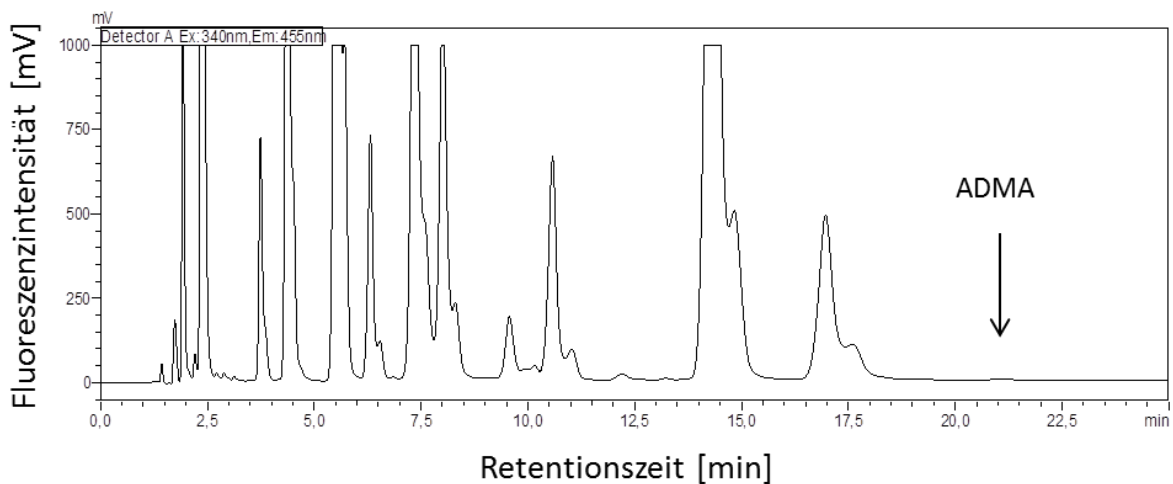


Abb. 7: Vergleich von Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und Probenaufbereitung durch Proteinfällung; im Vergleich zur Proteinfällung ist die Auflösung des ADMA-Peaks nach Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht verbessert
oben: Poolserum, durch Flüssig-Flüssig-Extraktion aufbereitet
unten: Poolserum, durch Proteinfällung mit 5-SSA aufbereitet
ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt

ADMA war nach der Extraktion zu nahezu 100% in der Wasserphase zu finden. Alle weiteren Aminosäuren und störenden Substanzen blieben allerdings auch in der Wasserphase, wenn auch in geringfügig niedrigeren Konzentrationen. Weder die Auflösung noch die Retentionszeit des ADMA-Peaks konnte somit durch das Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion im Vergleich zu einer Proteinfällung mit 5-SSA verbessert werden.

4.1.3 Festphasenextraktion mit Einengen des Eluats

In **Abb. 8** ist ein Chromatogramm eines Poolserums dargestellt, das ähnlich wie von Teerlink et al. (Teerlink et al., 2002) beschrieben durch Festphasenextraktion an Oasis® MCX und anschließendem Einengen und Wiederaufnehmen vorbereitet wurde.

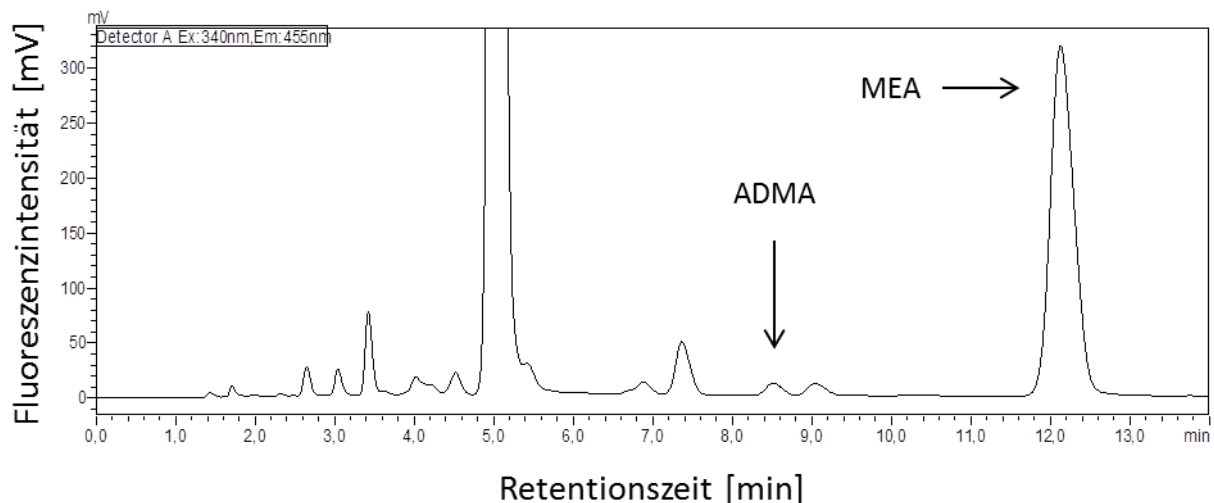


Abb. 8: Chromatogramm von Poolserum, aufgereinigt durch SPE, Einengen und Wiederaufnehmen des SPE-Eluats; der ADMA-Peak ist ausreichend aufgelöst. Außer dem ADMA-Peak ist auch der Peak des internen Standards MEA dargestellt. ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt
MEA: Monoethylarginin, interner Standard

Diese Methode zur Probenvorbereitung führte zu einer Basislinientrennung des ADMA-Peaks sowie des Peaks des internen Standards MEA. Dadurch ist es möglich, die Peaks zuverlässig zu integrieren und quantitativ auszuwerten. Auch die Retentionszeit von ADMA ist mit ca. 8,5min deutlich niedriger und damit besser als bei einer Probenvorbereitung durch Proteinpräzipitation oder Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Allerdings ist die Probenvorbereitung sehr zeitaufwändig, da die Verwendung eines Ammoniak-haltigen Elutionsmittels ein Einengen und Wiederaufnehmen des Eluats notwendig macht. Insbesondere aufgrund des hohen Wassergehaltes nimmt das Abdampfen sehr viel Zeit in Anspruch.

4.1.4 Neues Verfahren der Festphasenextraktion

4.1.4.1 Entwicklung eines neuen Elutionsmittels für die Festphasenextraktion

Für das neu entwickelte Elutionsmittel wurde der von Teerlink et al. verwendete Ammoniak (Teerlink et al., 2002) durch Kaliumhydroxid-Lösung ersetzt. Da Kaliumhydroxid allerdings eine wesentlich stärkere Base ist als Ammoniak, wurde nur eine geringe Konzentration von 0,02M benötigt, um einen ausreichend hohen pH-Wert zu erreichen. Um die Konzentration der Kationen im Elutionsmittel zu erhöhen, wurde zusätzlich Kaliumchlorid eingesetzt. Außerdem wurde der Anteil an Methanol reduziert, um zu vermeiden, dass später bei der Injektion in das chromatographische System der organische Anteil zu hoch ausfällt, was sich negativ auf die Auflösung auswirken würde.

Es ergab sich folgende Zusammensetzung für 10ml Elutionsmittel:

- 0,4g Kaliumchlorid
- 5,96ml Wasser
- 0,04ml 5M Kaliumhydroxid-Lösung
- 4ml Methanol

Die Versuche zur Validierung zeigten, dass mit diesem Elutionsmittel ausreichende Extraktionsausbeuten von ADMA und MEA erzielt wurden. (s. Kapitel 4.1.5.1 Extraktionsausbeute)

4.1.4.2 Fließmittel-Zusammensetzung für die Chromatographie

Bei einem Anteil der Pumpe A von 79% und der Pumpe B von 21% an der gesamten Flussrate wurden die besten Ergebnisse für das Chromatogramm erzielt. Bei niedrigeren Anteilen der Pumpe B waren die Retentionszeiten aufgrund des niedrigen organischen Anteils zu lang. Da vor dem MEA-Peak noch Platz im Chromatogramm ist, wurde versucht, durch eine höhere Beteiligung der Pumpe B die Retentionszeit des internen Standards zu verkürzen. Allerdings führte dies zu Überlagerungen des MEA-Peaks mit Störpeaks, während sich die Retentionszeit von MEA kaum verkürzte.

Damit wurde folgende optimale Fließmittelzusammensetzung für einen isokratischen chromatographischen Lauf ermittelt:

Kaliumphosphat-Puffer 25mM pH6,5 mit 9,7% Acetonitril (V/V)

4.1.4.3 Chromatographie

In **Abb. 9** ist ein typisches Chromatogramm einer Serum-Probe abgebildet. Aufgrund der Probenvorbereitung und der Wahl der chromatographischen Bedingungen ist es gelungen, eine Basislinientrennung der Peaks von ADMA und MEA herbeizuführen. Außerdem konnte die Laufzeit des Chromatogramms noch auf 13min verkürzt werden.

Unter diesen Bedingungen ist eine gute Integration der Peaks und damit eine zuverlässige quantitative Erfassung von ADMA im Serum möglich.

Die Lage der Peaks von ADMA und MEA ergibt sich aus dem Vergleich mit den Chromatogrammen der wässrigen Kalibrations-Lösungen (externe Standards, siehe **Abb. 10**). Der Peak rechts neben dem ADMA-Peak stellt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sein Isomer SDMA dar. In der Serum-Probe, deren Chromatogramm in **Abb. 9** dargestellt ist, wurde mit der entwickelten Methode eine ADMA-Konzentration von 92,9ng/ml gemessen.

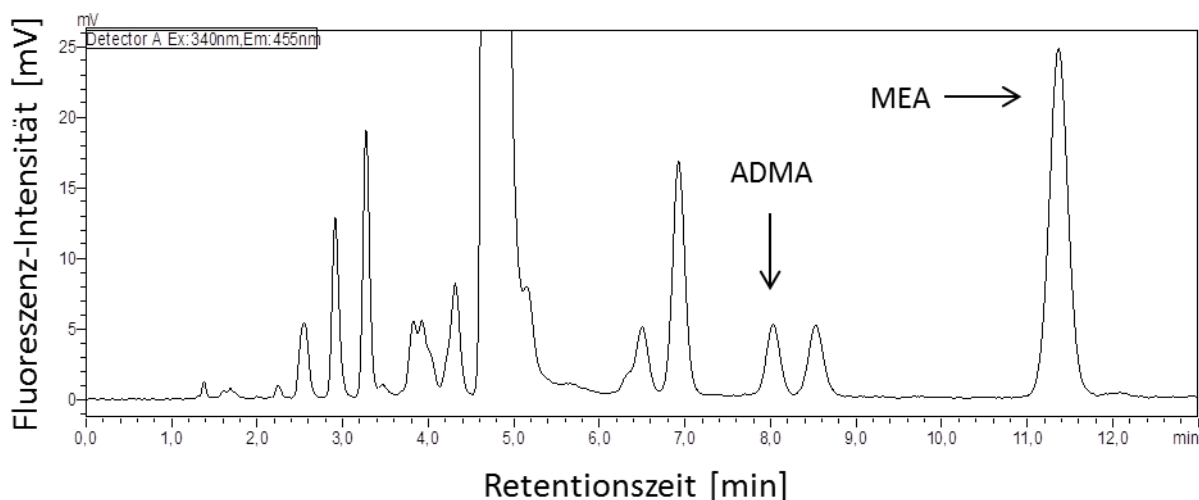


Abb. 9: Repräsentatives Chromatogramm einer Serum-Probe, aufgereinigt durch SPE unter Einsatz des entwickelten Elutionsmittels; die Auflösung des ADMA-Peaks ist sehr gut

ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt

MEA: Monoethylarginin, interner Standard

Folgende Retentionszeiten (t) ergeben sich für den Analyt ADMA und den internen Standard MEA:

$$t_{ADMA} = 8,0 \text{ min} \quad [8,0 \text{ min} - 8,5 \text{ min}] \text{ inter-assay}$$

$$t_{MEA} = 11,4 \text{ min} \quad [11,3 \text{ min} - 12,1 \text{ min}] \text{ inter-assay}$$

Abb. 10 zeigt ein Chromatogramm eines wässrigen externen Standards, der zur Kalibration verwendet wurde, mit der ADMA-Konzentration 100ng/ml. Dieser Standard wurde ebenso wie die Serum-Probe in **Abb. 9** mit der entwickelten Methode vorbereitet und analysiert.

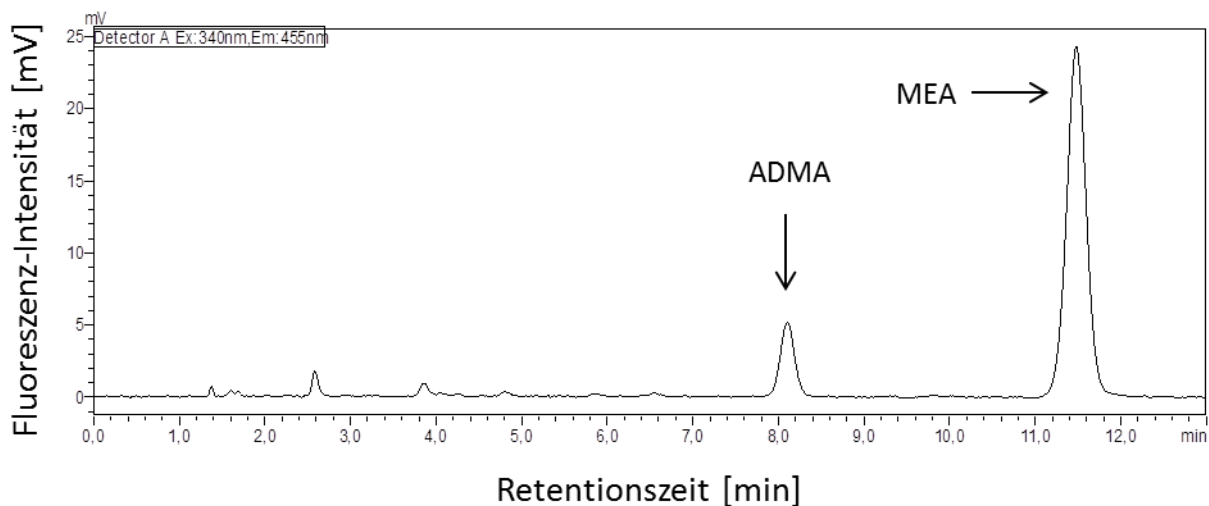


Abb. 10: Repräsentatives Chromatogramm einer wässrigen Lösung, die zur Kalibration verwendet wurde; hier ist die Lage der Peaks von ADMA und MEA gut zu erkennen

ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin, Analyt

MEA: Monoethylarginin, interner Standard

4.1.5 Validierung der Methode

4.1.5.1 Extraktionsausbeute

In **Tab. 11** sind die Mittelwerte der Peakflächen der extrahierten Proben und der Vergleichsproben ohne SPE sowie die daraus berechneten Extraktionsausbeuten für ADMA und MEA dargestellt.

Tab. 11: Ergebnisse der Ermittlung der Extraktionsausbeuten von ADMA und MEA. Bei den Peakflächen sind jeweils Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) sowie der Variationskoeffizient (CV) angegeben;
ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin; EA: Extraktionsausbeute; MEA: Monoethylarginin, interner Standard; n: Fallzahl

	Peakfläche nach SPE n=6		Peakfläche ohne SPE n=6		EA
	M ± SD	CV	M ± SD	CV	
ADMA	76162 ± 1964	2,6 %	81504 ± 1234	1,5 %	93,4 %
MEA	522172 ± 14295	2,7 %	562724 ± 11005	2,0 %	92,8 %

Die sehr hohen Werte für die Extraktionsausbeuten von ADMA (93,4%) und MEA (92,8%) zeigen, dass das neu entwickelte Elutionsmittel zuverlässig und effektiv eluiert.

Aus den beiden Werten ergibt sich folgende relative Extraktionsausbeute:

$$EA_{rel} = \frac{EA_{ADMA}}{EA_{MEA}} = 101 \%$$

EA_{rel}: relative Extraktionsausbeute

EA_{ADMA}: Extraktionsausbeute von ADMA

EA_{MEA}: Extraktionsausbeute von MEA

Die relative Extraktionsausbeute von annähernd 100% zeigt, dass MEA als interner Standard für diese Methode sehr gut geeignet ist.

4.1.5.2 Quantifizierungsgrenze LOQ

Es wurde ermittelt, dass bei einer ADMA-Konzentration von 25ng/ml das Signal-Rausch-Verhältnis 1:10 beträgt. Somit wurde diese Konzentration als LOQ der entwickelten Methode definiert.

Die niedrigste ADMA-Konzentration aller für diese Arbeit gemessenen Serumproben liegt mit einem Wert von 67,4ng/ml deutlich über dem LOQ. Somit wurde ein vollkommen ausreichendes Ergebnis für die Quantifizierungsgrenze erzielt.

4.1.5.3 Linearität

Die Ergebnisse zur Linearität sind in **Tab. 12** zusammengefasst.

Tab. 12: Daten zur Ermittlung der Linearität: Mittelwerte des hundert fachen Peakflächenverhältnisses ADMA/MEA bei dreimaliger Quantifizierung einer wässrigen ADMA-Lösung

c(ADMA): Konzentration der hergestellten wässrigen Lösung von Asymmetrischem Dimethylarginin; CV: Variationskoeffizient; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Fallzahl

c(ADMA) [ng/ml] n=3	100*Peakfläche(ADMA)/Peakfläche(MEA)	
	M $\pm$ SD	CV
25	4,1 $\pm$ 0,016	0,39 %
50	8,4 $\pm$ 0,21	2,5 %
100	16 $\pm$ 0,12	2,8 %
200	34 $\pm$ 0,073	0,21 %
400	68 $\pm$ 1,5	2,1 %
800	140 $\pm$ 2,1	1,5 %

In **Abb. 11** ist das hundert fache Verhältnis der Peakflächen von ADMA und MEA gegen die ADMA-Konzentration aufgetragen und die daraus resultierende Regressionsgerade abgebildet.

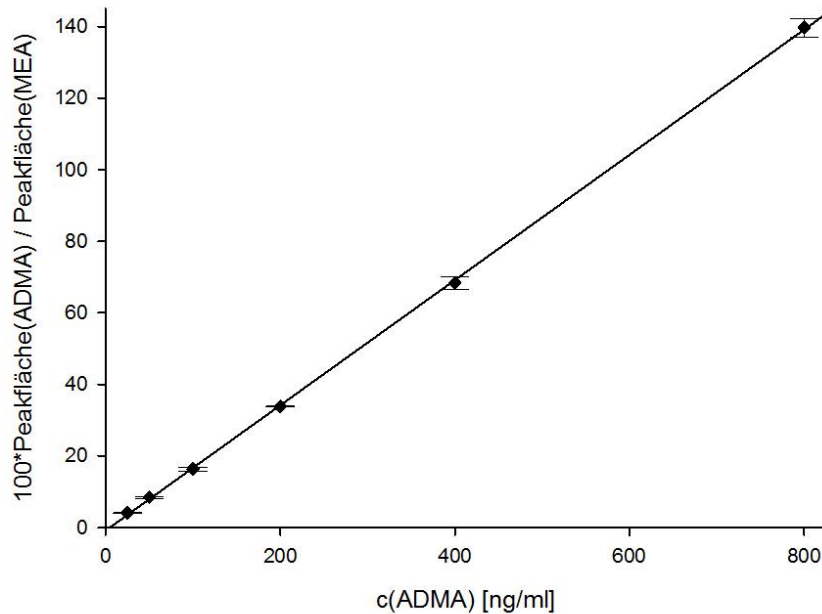


Abb. 11: Regressionsgerade zur Ermittlung der Linearität: das Peakflächenverhältnis von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) und Monoethylarginin (MEA) ist gegen die ADMA-Konzentration $c(\text{ADMA})$ der hergestellten wässrigen Lösung aufgetragen. Ferner sind die Standardabweichungen an den einzelnen Punkten dargestellt

Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden beträgt

$$R^2 = 0,9999$$

Damit erfüllt die entwickelte Methode deutlich die Anforderung für eine ausreichende Linearität.

4.1.5.4 Richtigkeit

Die oben in **Abb. 11** dargestellte Regressionsgerade hat folgende Formel:

$$y = 0,1750 * x - 0,8012$$

y: Peakflächenverhältnis, $100 * \text{Peakfläche}(\text{ADMA}) / \text{Peakfläche}(\text{MEA})$

x: Serumkonzentration von ADMA, $c(\text{ADMA})$

Mit dieser Geradengleichung wurden die ADMA-Konzentrationen aus den Peakflächenverhältnissen zurückberechnet und mit den ADMA-Konzentrationen der Kalibrationslösungen verglichen. Die Ergebnisse sind in **Tab. 13** dargestellt.

Tab. 13: Ermittlung der Richtigkeit: Vergleich der wahren Konzentrationen von Asymmetrischem Dimethalarginin (ADMA) mit den berechneten ADMA-Konzentrationen und Angabe des Fehlers (Bias)

c(ADMA) wahr: Konzentration der hergestellten wässrigen Lösung von ADMA (wahre ADMA-Konzentration)

c(ADMA) berechnet: aus dem Peakflächenverhältnis mithilfe der Geradengleichung zurückberechnete ADMA-Konzentration

n: Fallzahl

c(ADMA) [ng/ml] wahr	c(ADMA) [ng/ml] berechnet	Bias (n=3)
25	28,0	12,0 %
50	52,8	5,61 %
100	98,1	2,96 %
200	197,9	1,07 %
400	395,6	2,32 %
800	802,9	1,24 %

Der berechnete Fehler beträgt an der Quantifizierungsgrenze 12,0% und bei einer Konzentration von 50ng/ml 5,61%. Bei allen höheren Konzentrationen liegt der Fehler unter 3,0%.

Somit werden die Bedingungen für die Richtigkeit vollkommen ausreichend von der entwickelten Methode erfüllt.

4.1.5.5 Präzision

Für die Ermittlung der Präzision wurden jeweils eine Serumprobe mit hoher ADMA-Konzentration und eine mit niedriger ADMA-Konzentration dreimal am Tag an sechs verschiedenen Tagen mit der entwickelten Methode quantifiziert. In **Tab. 14** sind die gemessenen Mittelwerte jedes Tages mit Standardabweichung und den daraus berechneten Variationskoeffizienten angegeben.

Tab. 14: Ermittlung der Präzision: Gemessene ADMA-Konzentration in einer Serumprobe mit hoher und einer mit niedriger ADMA-Konzentration an sechs verschiedenen Tagen;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; n:Fallzahl

	niedrig (n=3) c(ADMA) [ng/ml]		hoch (n=3) c(ADMA) [ng/ml]	
	M ± SD	CV	M ± SD	CV
Tag 1	62,6 ± 0,762	1,21 %	194 ± 5,61	2,89 %
Tag 2	61,3 ± 1,76	2,88 %	186 ± 5,60	3,00 %
Tag 3	63,9 ± 1,44	2,25 %	186 ± 2,24	1,20 %
Tag 4	63,8 ± 1,43	2,24 %	187 ± 1,17	0,624 %
Tag 5	65,0 ± 1,68	2,59 %	194 ± 2,98	1,54 %
Tag 6	65,6 ± 0,836	1,28 %	192 ± 4,59	2,39 %

Daraus ergeben sich die in **Tab. 15** dargestellten Werte für die intra-assay-Präzision und die inter-assay-Präzision.

Tab. 15: Ermittlung der Präzision: Berechnete Variationskoeffizienten für die intra-assay-Präzision und die inter-assay-Präzision; CV: Variationskoeffizient

	CV _{intra-assay}	CV _{inter-assay}
ADMA niedrig	2,1 %	3,1 %
ADMA hoch	1,9 %	2,8 %

Aufgrund dieser niedrigen Variationskoeffizienten wurde die beschriebene Methode als ausreichend präzise erachtet.

4.1.5.6 Matrixeffekt

Tab. 16 zeigt die Daten zur Ermittlung des Matrixeffektes. Das angegebene Volumen des Serumpools wurde jeweils mit 50µl MEA-Arbeitslösung versetzt und mit Wasser auf 500µl aufgefüllt.

Tab. 16: Ermittlung des Matrixeffektes: eingesetztes Volumen an Poolserum und das sich daraus ergebende Peakflächenverhältnis; ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin; MEA: Monoethylarginin

Volumen an Poolserum [μ l]	100*Peakfläche(ADMA)/Peakfläche(MEA)
25	3,9
50	6,8
100	16
150	23
200	29
250	38

Das Peakflächenverhältnis wurde gegen das Volumen an Poolserum aufgetragen. Die zugehörige Regressionsgerade ist in **Abb. 12** dargestellt.

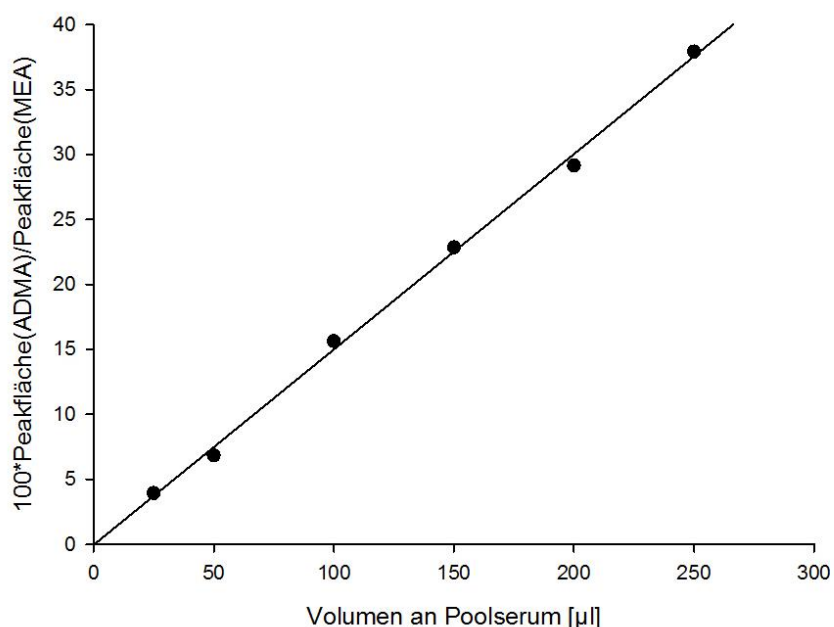


Abb. 12: Regressionsgerade des Matrixeffektes: Das hundert fache Peakflächenverhältnis von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) zu Monoethylarginin (MEA) wurde gegen das eingesetzte Volumen an Poolserum aufgetragen.

Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden beträgt:

$$R^2_{Matrix} = 0,9978$$

Somit ist ein evtl. auftretender Matrixeffekt vernachlässigbar.

4.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten und Gesunden

4.2.1 Charakteristika der Gruppen

In **Tab. 17** sind die Charakteristika der verschiedenen Personengruppen dargestellt. Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde untersucht, ob sich die Patientengruppen im Anteil der Frauen bzw. Raucher signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden. Außerdem wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert, ob sich die Patientengruppen bzgl. Alter und BMI signifikant von den Gesunden unterscheiden.

Tab. 17: Eigenschaften des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe; angegeben sind die korrigierten (Bonferroni) Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe (Gesunde); als statistische Tests wurden der Chi-Quadrat-Test und der Kruskal-Wallis-Test verwendet; n: Anzahl der Personen (Braun et al., 2021)

Diagnose	n	Geschlecht [%w]	Alter [Jahre] Median (range)	BMI [kg/m ²] Median (range)	Raucher [%]
Gesunde	16	50,0	31 (25 – 71)	24,3 (19,4 – 32,1)	31,3
F20	62	41,9 $p > 0,9$	42 (20 – 69) $p > 0,6$	26,2 (18,8 – 39,2) $p > 0,3$	50,0 $p > 0,7$
F25	18	61,1 $p > 0,9$	45 (24 – 70) $p > 0,1$	28,4 (21,9 – 37,0) $p > 0,5$	44,4 $p > 0,9$
F31	14	64,3 $p > 0,9$	52 (33 – 68) $p < 0,01$	27,7 (20,7 – 45,0) $p > 0,1$	35,7 $p > 0,9$
F32/F33	44	61,4 $p > 0,9$	50 (22 – 82) $p < 0,02$	23,9 (15,2 – 34,3) $p > 0,9$	27,3 $p > 0,9$

Die Patientengruppen unterscheiden sich im Geschlecht, BMI und der Anzahl der Raucher nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffektiver Störung unterscheiden sich im Alter nicht signifikant von den Gesunden. Allerdings sind die Personen der Gruppen Bipolare Störung und Depression signifikant älter als die gesunden Personen. Unter allen Probanden war kein Fall von Alkohol-Abusus bekannt (Braun et al., 2021).

4.2.2 Serumkonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen

Die ADMA-Konzentrationen sind normalverteilt (*Shapiro-Wilk-Test*, $p > 0,4$). Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik wurde folgende mittlere ADMA-Konzentration (Angabe in $M \pm SD$) bei gesunden Personen gemessen:

$$c(ADMA) = 84,8 \pm 12,3 \text{ ng/ml (n=16)}$$

Im Median beträgt die ADMA-Konzentration bei diesen Kontrollpersonen:

$$c(ADMA) = 82,0 \text{ ng/ml (n=16)}$$

4.2.3 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden

Sowohl bei den gesunden Kontrollpersonen als auch bei den Personen mit F3X-Diagnose sind die gemessenen Serumkonzentrationen von ADMA normalverteilt (*Shapiro-Wilk-Test*, Gesunde: $p > 0,4$; F3X: $p > 0,1$). Bei den Personen mit F2X-Diagnose ist das nicht der Fall (*Shapiro-Wilk-Test*, $p < 0,1$).

Die ADMA-Konzentrationen aller drei Gruppen sind als Mediane in **Tab. 18** zusammengefasst und in **Abb. 13** als Boxplot dargestellt.

Tab. 18: Serumkonzentrationen von ADMA in allen Gruppen; bei nicht normalverteilten Daten sind die Mittelwerte in Klammern angegeben;

F2X: Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffectiver Störung, F3X: Patient/-innen mit affektiver Störung,

$c(ADMA)$: Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n : Anzahl der Personen

Diagnose	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	16	$84,8 \pm 12,3$	82,0	67,4 – 107
F2X	80	(161 ± 311)	116	80,2 – 2892
F3X	58	$135 \pm 32,6$	141	73,7 – 197

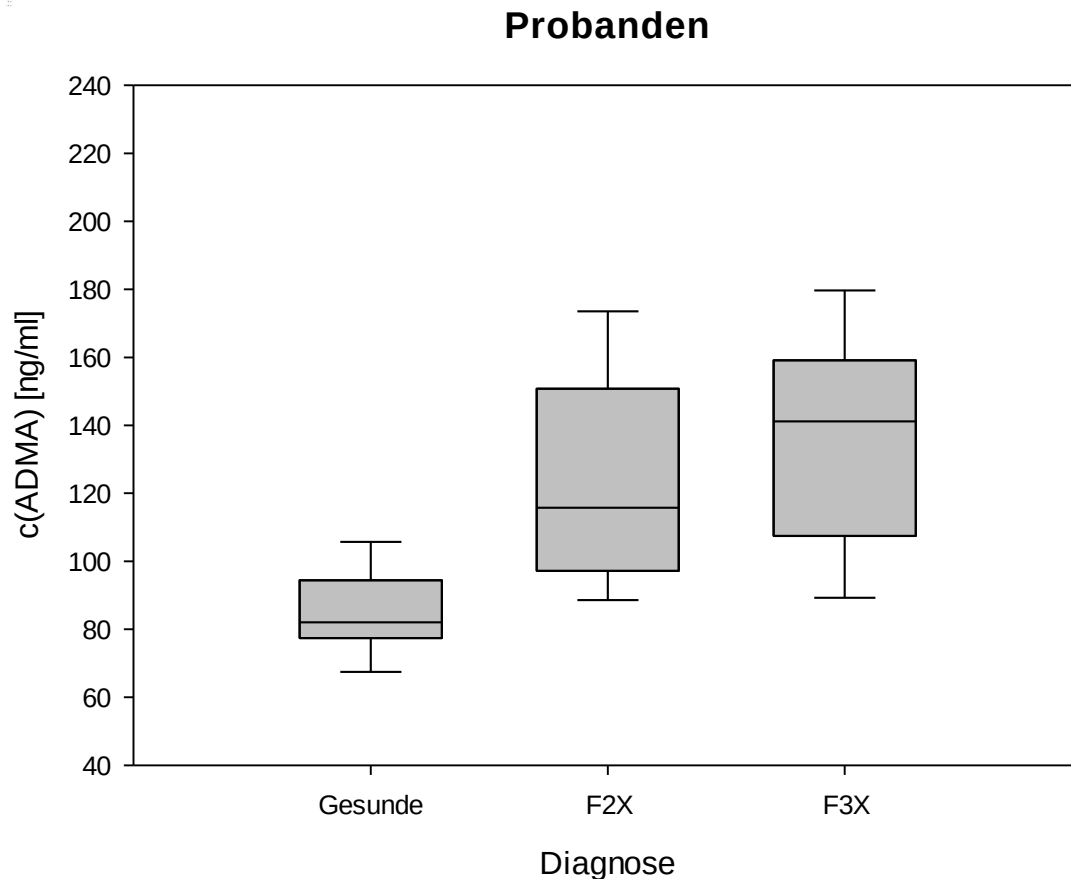


Abb. 13: gemessene ADMA-Konzentrationen im Serum bei der Kontrollgruppe, bei Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffectiver Störung und bei Patient/-innen mit affektiven Störungen;

F2X: Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffectiver Störung, F3X: Patient/-innen mit affektiver Störung

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

Die statistische Auswertung mittels *Kruskal-Wallis-Test* führte zu dem Ergebnis, dass die gemessene Serumkonzentration von ADMA über alle drei Gruppen unterschiedlich verteilt ist ($p < 0,0000003$; $Z = 30,277$; $r = 2,440$). Die Post-hoc-Tests ergaben, dass sowohl bei Patient/-innen mit F2X-Diagnose ($p < 0,000006$; $Z = -4,765$; $r = 0,486$) als auch bei Patient/-innen mit F3X-Diagnose ($p < 0,0000001$; $Z = -5,472$; $r = 0,636$) die ADMA-Konzentrationen im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht sind. Dabei besteht kein signifikanter Unterschied zwischen F2X- und F3X-Patient/-innen ($p > 0,4$; $Z = -1,393$).

4.2.4 Patientenprobe mit sehr hoher ADMA-Konzentration

Bei den Schizophrenie-Patient/-innen fiel eine Serumprobe mit ungewöhnlich hoher ADMA-Konzentration auf. Die darin gemessene ADMA-Konzentration lag mit einem Wert von 2892ng/ml deutlich über den ADMA-Konzentrationen aller weiteren Proben. Der zweithöchste Wert betrug 223ng/ml.

Um mögliche Fehler bei der Probenaufbereitung und Messung auszuschließen, wurde ADMA aus derselben Probe zu einem späteren Zeitpunkt nochmals quantifiziert. Die bei der zweiten Messung ermittelte Konzentration lag allerdings mit 2913ng/ml in der gleichen Größenordnung.

Abb. 14 zeigt das Chromatogramm dieser Probe verglichen mit einem Chromatogramm einer Serum-Probe einer weiteren Patientin mit Schizophrenie.

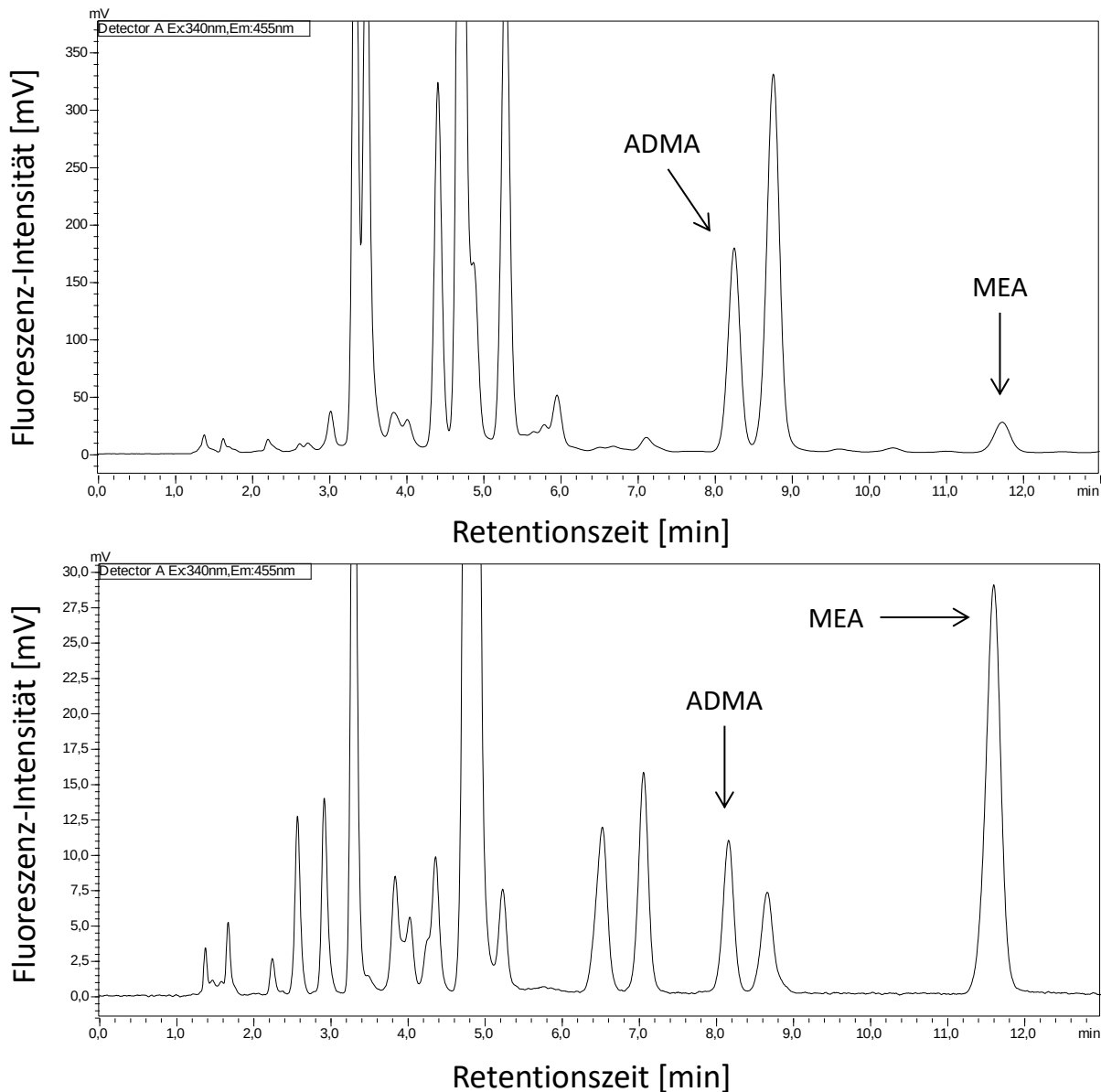


Abb. 14: Chromatogramm der Serum-Probe, die eine ungewöhnlich hohe ADMA-Konzentration von 2892ng/ml enthält (oben), verglichen mit dem Chromatogramm einer Serumprobe einer Schizophrenie-Patientin mit einer ADMA-Konzentration von 157ng/ml (unten)

ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin; MEA: Monoethylarginin, interner Standard

In den folgenden graphischen Darstellungen wurde diese hohe ADMA-Konzentration aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt. Jedoch wurde sie bei allen statistischen Auswertungen berücksichtigt.

4.2.5 Einfluss des Alters

In **Abb. 15** sind für alle drei Gruppen jeweils die gemessenen Serumkonzentrationen von ADMA gegen das Alter der Personen graphisch aufgetragen.

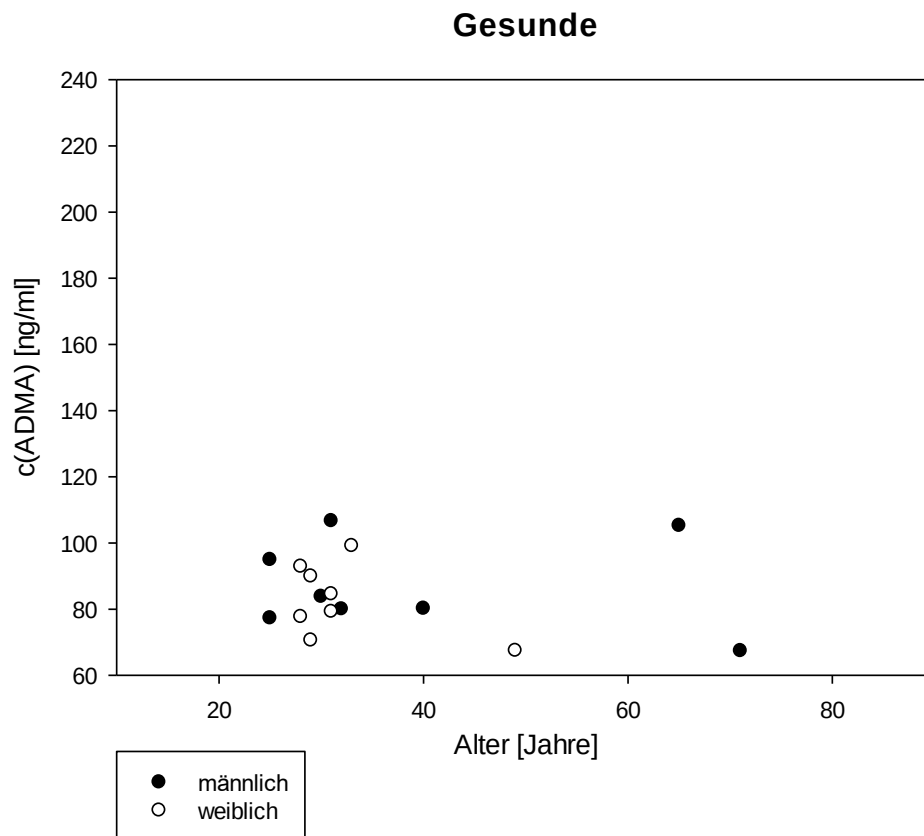


Abb. 15: Alter, Geschlecht und gemessene ADMA-Konzentration;
F2X: Schizophrenie oder Schizoaffektive Störung, F3X: Affektive Störungen
c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin
(Fortsetzung auf nächster Seite)

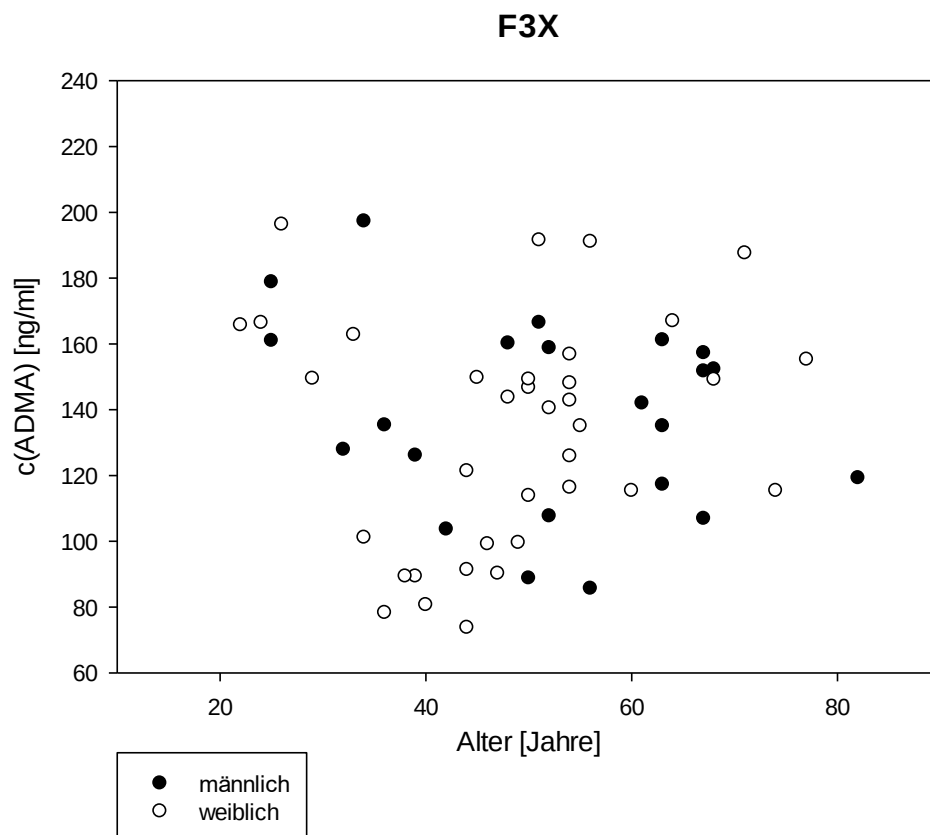
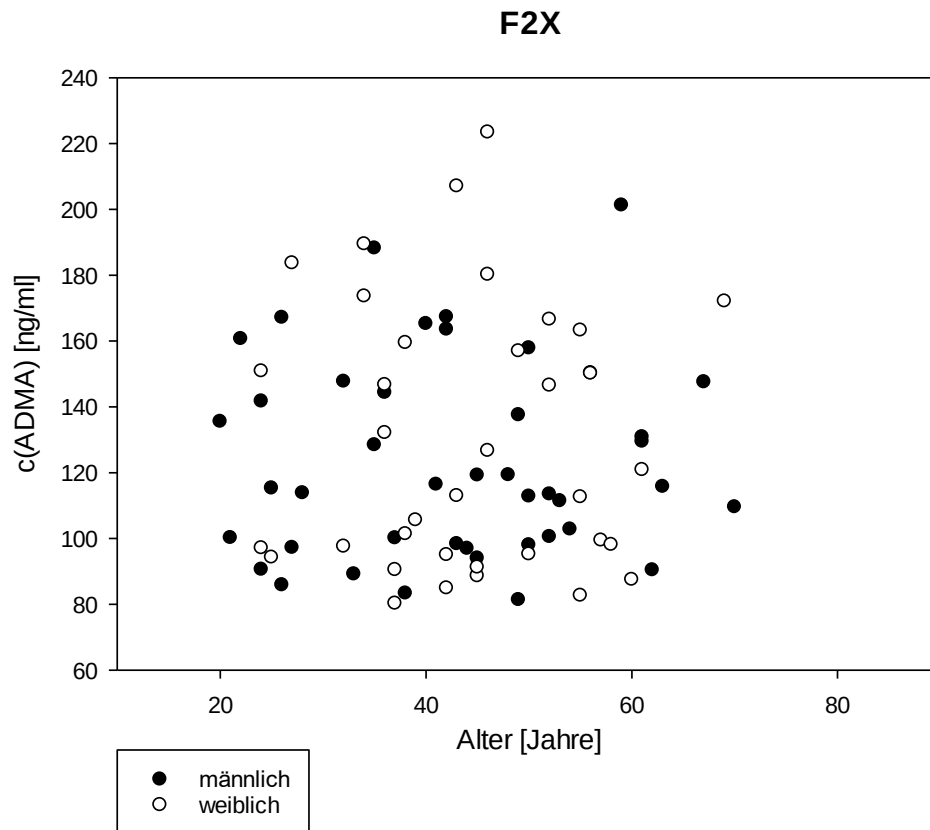


Abb. 15 (Fortsetzung): Alter, Geschlecht und gemessene ADMA-Konzentration
F2X: Schizophrenie oder Schizoaffective Störung, F3X: Affektive Störungen;
c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

Eine Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho zeigte, dass wie in **Tab. 19** dargestellt zwischen dem Alter und der ADMA-Konzentration keine Korrelation existiert.

Tab. 19: Korrelationskoeffizienten r und Signifikanzniveaus p für die Analyse der Spearman-Rho-Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und dem Probandenalter; F2X: Schizophrenie oder Schizoaffective Störung, F3X: Affektive Störungen

Gruppe	r	p
Gesunde	- 0,074	> 0,7
F2X	0,021	> 0,8
F3X	0,032	> 0,8

4.2.6 Einfluss des Geschlechtes

Abb. 15 zeigt neben Alter und ADMA-Konzentration auch das Geschlecht der Personen. Die ADMA-Konzentrationen weiblicher und männlicher Probanden sind für alle Gruppen in **Tab. 20** als Mediane zusammengefasst und in **Abb. 16** als Boxplot graphisch dargestellt.

Tab. 20: Geschlecht und ADMA-Konzentrationen; Mittelwerte nicht normalverteilter Daten sind eingeklammert; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n : Anzahl der Personen; F2X: Schizophrenie und Schizoaffective Störung; F3X: Affektive Störungen

Gruppe	Geschlecht	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	w	8	$82,7 \pm 11,0$	81,9	67,5 – 99,2
	m	8	$87,0 \pm 14,0$	82,0	67,4 – 107
F2X	w	37	(130 $\pm$ 39,6)	121	80,2 – 223
	m	43	(187 $\pm$ 423)	116	81,3 – 2892
F3X	w	36	$133 \pm 34,7$	142	73,7 – 196
	m	22	$138 \pm 29,3$	139	85,6 – 197

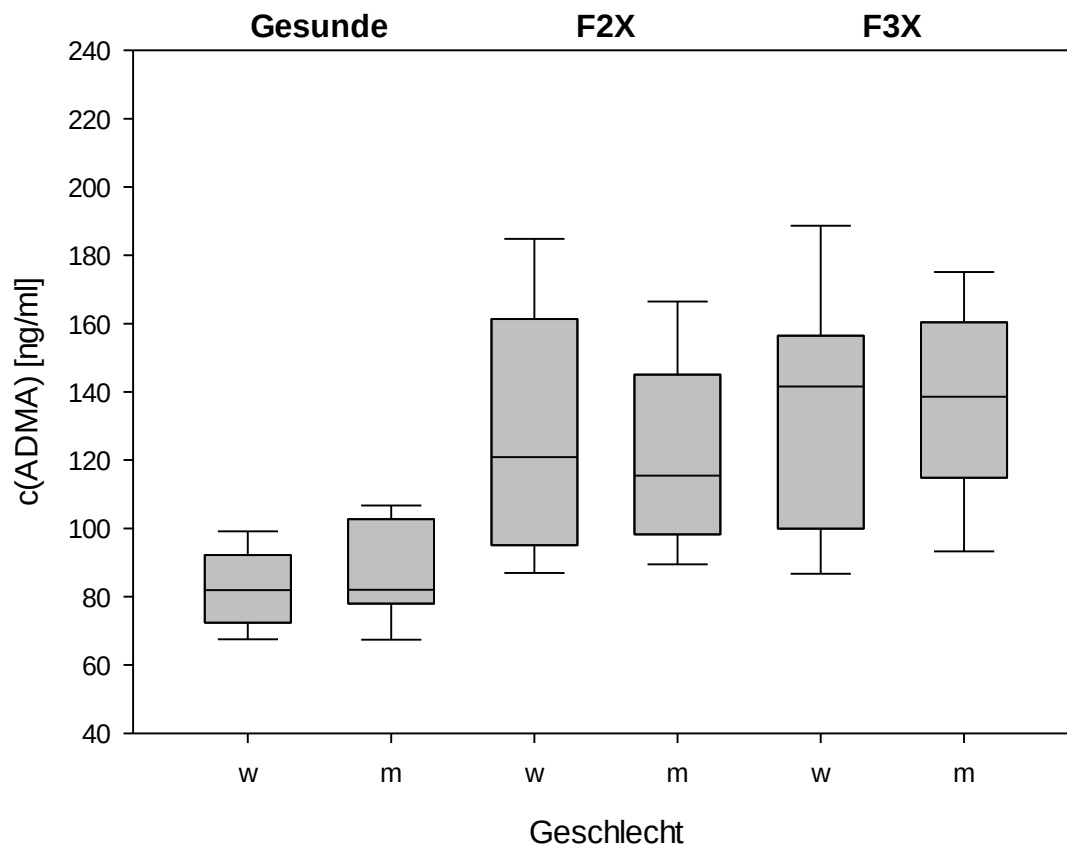


Abb. 16: ADMA-Konzentrationen nach Geschlecht der Probanden; die Serumkonzentrationen von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) bei Frauen unterschieden sich nicht signifikant von denen bei Männern; F2X: Schizophrenie und Schizoaffektive Störung; F3X: Affektive Störungen

Innerhalb aller drei Gruppen (F2X-Patient/-innen, F3X-Patient/-innen, Gesunde Personen) war jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied in den ADMA-Konzentrationen zwischen weiblichen und männlichen Personen feststellbar. **Tab. 21** zeigt die Ergebnisse der statistischen Tests.

Tab. 21: Angewandter statistischer Test und Ergebnis für den Vergleich der ADMA-Konzentrationen von Frauen und Männern in allen drei Gruppen; F2X: Schizophrenie und Schizoaffektive Störung; F3X: Affektive Störungen

Gruppe	Test	Ergebnis
Gesunde	<i>t</i> -Test	$p > 0,5$; $t = -0,675$
F2X	<i>Mann-Whitney-U</i> -Test	$p > 0,8$; $Z = 0,035$
F3X	<i>t</i> -Test	$p > 0,5$; $t = -0,560$

4.2.7 Einfluss des Schweregrades der psychischen Erkrankung

Die Patient/-innen mit F2X-Diagnose und die Patient/-innen mit F3X-Diagnose wurden jeweils nach dem Schweregrad ihrer Erkrankung in Gruppen eingeteilt. Die Serumkonzentrationen von ADMA der verschiedenen Gruppen sind in **Tab. 22** tabellarisch und in **Abb. 17** graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind auch die ADMA-Konzentrationen der gesunden Kontrollpersonen dargestellt.

Tab. 22: ADMA-Konzentration und Zustand der Erkrankten; bei nicht normalverteilten Daten sind die Mittelwerte in Klammern angegeben; berücksichtigt wurden nur Patient/-innen, bei denen Informationen zum Schweregrad der Erkrankung verfügbar waren;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; F2X: Schizophrenie und Schizoaffective Störung; F3X: Affektive Störungen; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Anzahl der Personen

Gruppe	Zustand	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	gesund	16	$84,8 \pm 12,3$	82,0	67,4 - 107
F2X	mäßig krank	9	$134 \pm 41,6$	128	85,8 – 201
	deutlich krank	27	$130 \pm 30,9$	135	80,2 – 189
	schwer krank	31	($116 \pm 30,6$)	106	82,6 – 207
F3X	mäßig krank	16	$132 \pm 28,5$	139	80,7 – 166
	deutlich krank	25	$138 \pm 37,2$	144	73,7 – 197
	schwer krank	10	$130 \pm 23,5$	133	90,2 – 163

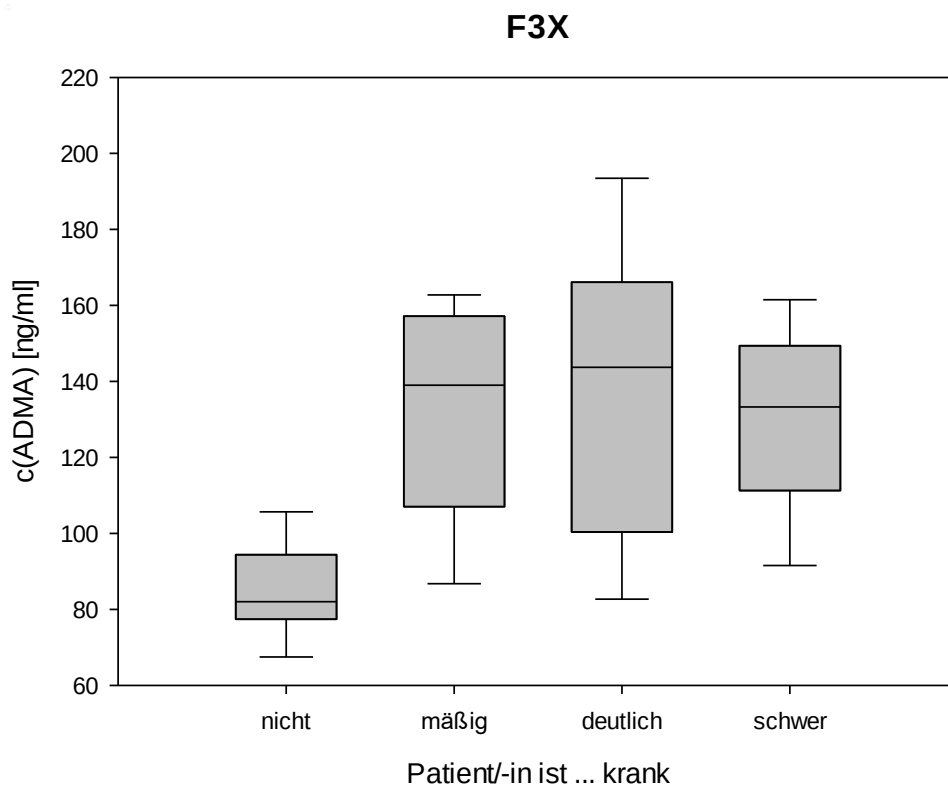
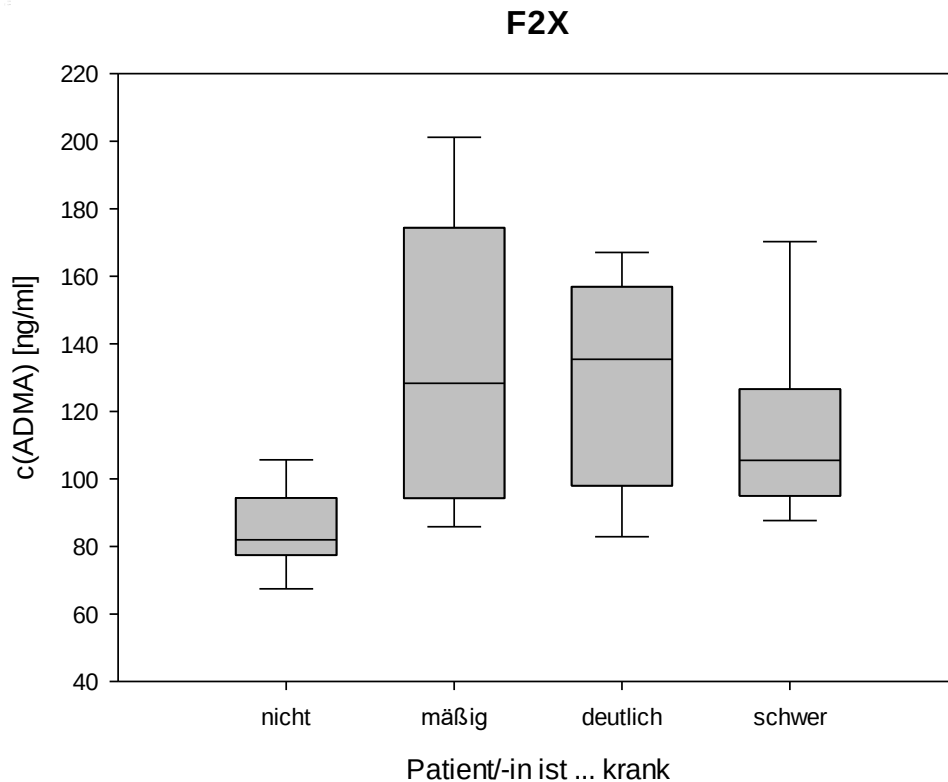


Abb. 17: Schweregrad der Erkrankung und ADMA-Konzentration; oben sind die Werte für schizophrene oder schizoaffektive Personen (F2X) dargestellt, unten für Personen mit affektiven Störungen (F3X); der linke Boxplot stellt jeweils die Kontrollgruppe dar; zwischen den verschiedenen Schweregraden der Erkrankung waren jeweils keine signifikanten Unterschiede in den ADMA-Konzentrationen feststellbar; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

In beiden Patienten-Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentration von ADMA zwischen mäßig kranken, deutlich kranken und schwer kranken Patient/-innen (F2X: *Kruskal-Wallis-Test*, $p > 0,1$; $Z = 3,606$; F3X: *einfaktorielle ANOVA*, $p > 0,6$; $F = 0,436$).

4.2.8 Einfluss einer Verbesserung unter der Therapie

Nach dem Kriterium, ob unter der Therapie eine klinische Verbesserung eintrat oder nicht, wurden die F2X- und F3X-Patient/-innen jeweils in zwei Gruppen eingeteilt. Die Mediane der ADMA-Konzentrationen sind in **Tab. 23** dargestellt. **Abb. 18** zeigt jeweils die Serumkonzentrationen von ADMA der beiden Gruppen verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen als Boxplot.

Tab. 23: ADMA-Konzentration und klinische Veränderung der Patient/-innen unter Therapie; bei nicht normalverteilten Daten sind die Mittelwerte in Klammern angegeben; berücksichtigt wurden nur Patient/-innen, bei denen Informationen zu einer Veränderung unter Therapie verfügbar waren;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; F2X: Schizophrenie und Schizoaffective Störung; F3X: Affektive Störungen; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Anzahl der Personen

Gruppe	Veränderung	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	-	16	$84,8 \pm 12,3$	82,0	67,4 - 107
F2X	wurde besser	40	$(118 \pm 31,3)$	104	80,2 – 207
	wurde nicht besser	16	$118 \pm 28,8$	113	81,3 – 188
F3X	wurde besser	26	$134 \pm 32,0$	141	73,7 – 196
	wurde nicht besser	13	$124 \pm 31,2$	135	80,7 – 167

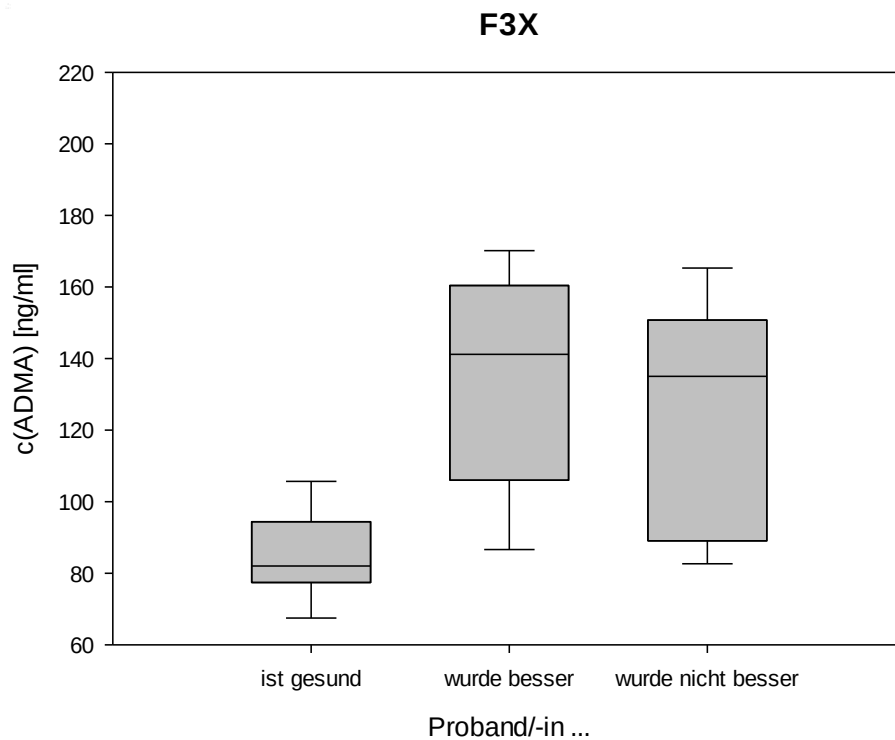
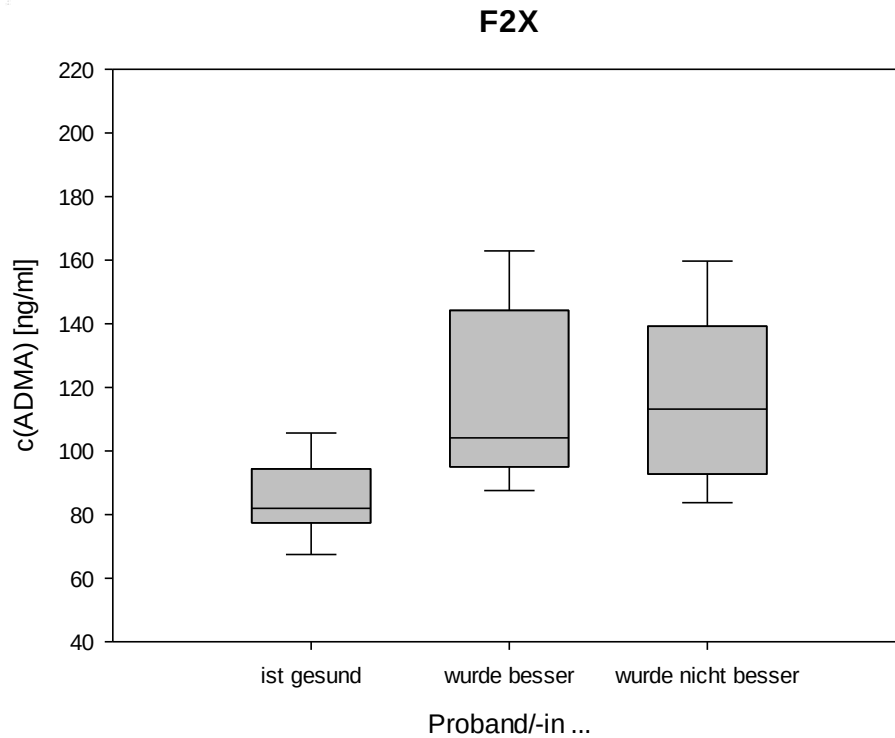


Abb. 18: ADMA-Konzentrationen von gesunden Personen, von Patient/-innen, die sich unter Therapie verbesserten, und Patient/-innen, die sich unter Therapie nicht verbesserten; die obere Graphik zeigt die ADMA-Konzentrationen von Personen mit Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung (F2X), die untere Graphik zeigt die Werte für Personen mit affektiven Störungen (F3X); Patient/-innen, die unter Therapie besser wurden, unterschieden sich nicht signifikant in den ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen, die unter Therapie nicht besser wurden; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

Die statistische Auswertung lieferte jeweils für F2X-Patient/-innen und F3X-Patient/-innen folgende Ergebnisse: Es bestand kein signifikanter Unterschied in der ADMA-Konzentration zwischen Personen, die unter der Therapie besser wurden und Personen, die unter der Therapie nicht besser wurden (F2X: *Mann-Whitney-U-Test*, $p > 0,8$; $Z = 0,056$; F3X: *t-Test*, $p > 0,3$; $t = 0,944$).

4.2.9 Einfluss der Medikation

Die gemessenen Serumkonzentrationen von ADMA in den einzelnen Gruppen, unterteilt nach Medikation, sind für alle psychisch kranken Personen in **Tab. 24** aufgeführt. Dabei wurden nur Personen berücksichtigt, deren Wirkstoffkonzentration mindestens die Hälfte der unteren Grenzkonzentration des Therapeutischen Referenzbereiches betrug. **Abb. 19** zeigt jeweils die ADMA-Konzentrationen in den verschiedenen Medikationsgruppen als Boxplot.

Tab. 24: Gemessene Serumkonzentrationen von ADMA in Gruppen nach Arzneistoff, dessen Serumkonzentration mindestens 50% der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug; bei nicht normalverteilten Daten sind die Mittelwerte in Klammern angegeben

c(ADMA) Serumkonzentrationen von Asymmetrischem Dimethylarginin
 $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; *n*: Anzahl der Personen

Arzneistoffgruppe	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
(9-OH-)Risperidon	17	(119 $\pm$ 30,2)	100	87,5 – 167
Amisulprid	5	155 $\pm$ 47,2	142	99,4 – 207
Aripiprazol	9	135 $\pm$ 32,0	135	89,1 – 189
Clozapin	5	99,6 $\pm$ 13,0	100	83,3 – 119
Duloxetin	3	140 $\pm$ 22,1	149	115 – 157
Escitalopram	7	154 $\pm$ 23,4	150	121 – 196
Flupentixol	5	126 $\pm$ 40,3	116	81,3 – 184
Lamotrigin	5	144 $\pm$ 43,9	150	80,7 – 197
Olanzapin	11	118 $\pm$ 25,9	116	82,7 – 152
Quetiapin	12	146 $\pm$ 41,0	148	84,9 – 223

Arzneistoffgruppe	n	c(ADMA) [ng/ml] M ± SD	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Sertralin	6	127 ± 28,6	135	78,3 – 160
Venlafaxin	13	(124 ± 30,6)	128	88,6 – 166

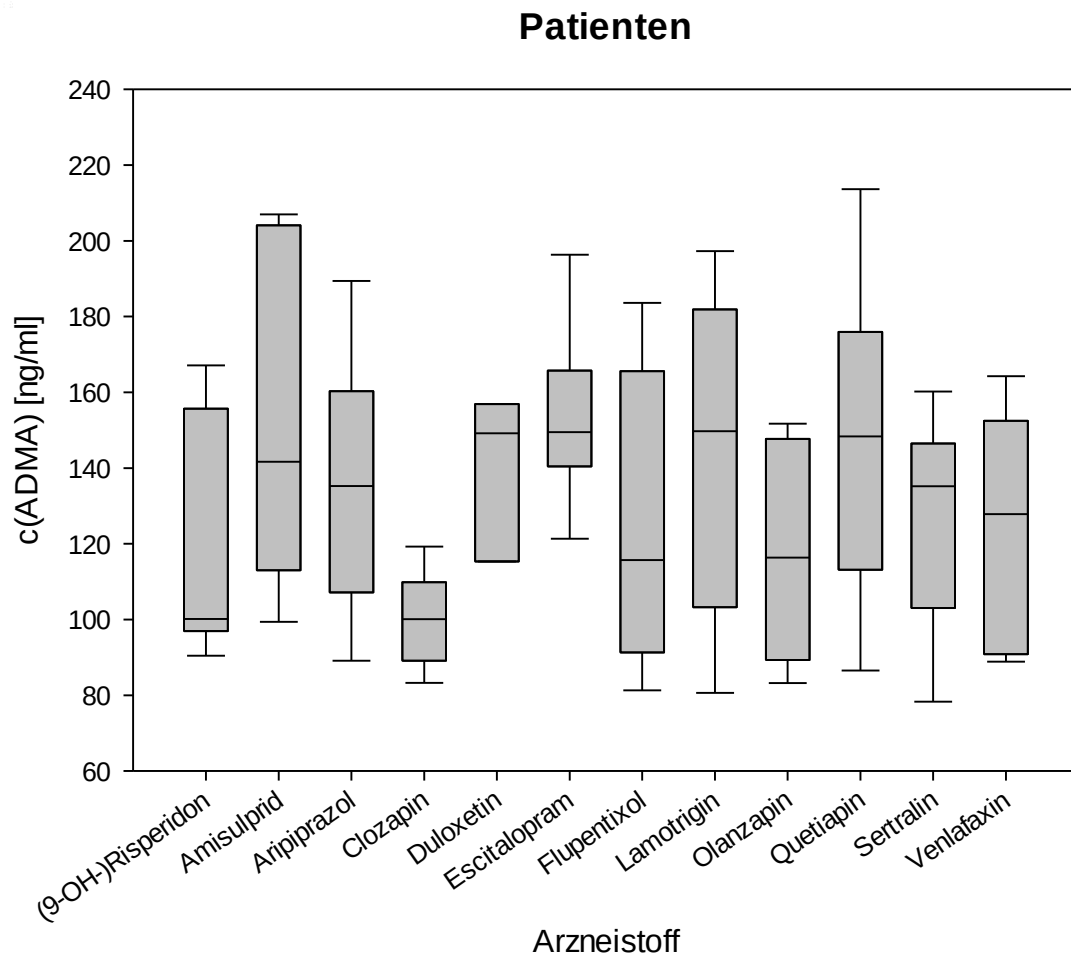


Abb. 19: ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen, unterteilt nach Wirkstoffen, deren Serumkonzentration mindestens die Hälfte der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug; Die ADMA-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

Bei den Patient/-innen war die Verteilung der Serumkonzentration von ADMA über alle Arzneistoffe gleich. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der ADMA-Konzentration zwischen den einzelnen Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,1$; $Z = 14,881$).

4.2.10 Unterschiede zwischen Patient/-innen mit verschiedenen Diagnosen

Tab. 25 zeigt die ADMA-Konzentrationen innerhalb der Patientengruppen bestimmter Diagnosen. Diese Daten sind in **Abb. 20** graphisch als Boxplot dargestellt.

Tab. 25: Gemessene Serumkonzentrationen von ADMA in Gruppen nach Diagnose; die Mittelwerte nicht normalverteilter Daten sind in Klammern angegeben; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Anzahl der Personen (Braun et al., 2021)

Diagnose	n	c(ADMA) [ng/ml] M $\pm$ SD	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	16	84,8 $\pm$ 12,3	82,0	67,4 - 107
F20 Schizophrenie	62	(169 $\pm$ 353)	116	80,2 - 2892
F25 Schizoaffektive Störung	18	132 $\pm$ 38,3	123	82,6 - 207
F31 Bipolare Störung	14	143 $\pm$ 33,9	151	80,7 - 192
F32/F33 Depression	44	133 $\pm$ 32,2	138	73,7 - 197

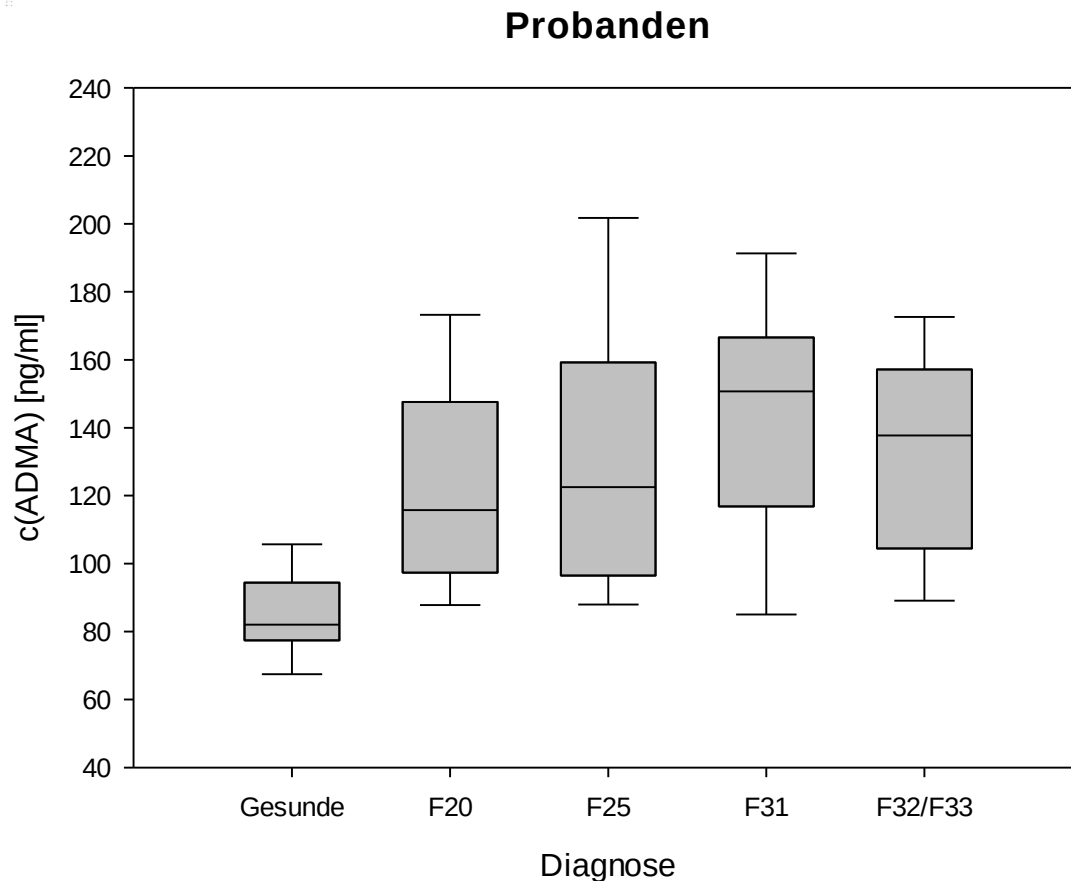


Abb. 20: Serumkonzentrationen von ADMA bei Probanden mit verschiedenen Diagnosen; die ADMA-Konzentrationen aller Patientengruppen sind im Vergleich zu den gesunden Personen hochsignifikant erhöht; dabei unterschieden sich die ADMA-Konzentrationen der verschiedenen Diagnosen-Gruppen nicht signifikant voneinander;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin;

F20: Schizophrenie; F25: Schizoaffective Störung; F31: Bipolare Störung; F32/F33: Depression

Die Serumkonzentration von ADMA ist über die verschiedenen Gruppen unterschiedlich verteilt (*Kruskal-Wallis-Test*, $p < 0,000003$; $Z = 31,497$; $r = 2,538$).

Bei Patient/-innen mit den Diagnosen Schizophrenie (F20), Schizoaffective Störung (F25), Bipolare Störung (F31) und Depression (F32/F33) sind die ADMA-Konzentrationen jeweils im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen hochsignifikant erhöht. Zwischen den einzelnen Diagnosen waren bei paarweisen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die korrigierten Signifikanzen aller paarweisen Vergleiche sind in **Tab. 26** dargestellt (Braun et al., 2021).

Tab. 26: Testergebnisse aller paarweisen Vergleiche der Patientengruppen unterteilt nach Diagnose; diese wurden mit der Bonferroni-Korrektur angepasst; die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen aller analysierter Diagnosen sind im Vergleich zu den Gesunden hochsignifikant erhöht; zwischen den verschiedenen Diagnosen-Gruppen waren jeweils keine signifikanten Unterschiede feststellbar

Gruppe 1	Gruppe 2	Testergebnis
F20 Schizophrenie	Gesunde	p < 0,0001 Z = 4,525; r = 0,512
F25 Schizoaffektive Störung	Gesunde	p < 0,0005 Z = 4,160; r = 0,713
F31 Bipolare Störung	Gesunde	p < 0,00003 Z = 4,812; r = 0,879
F32 / F33 Depression	Gesunde	p < 0,000007 Z = 5,057; r = 0,653
Je alle Diagnosen paarweise		p > 0,9

4.2.11 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung

Tab. 27 zeigt die ADMA-Konzentrationen innerhalb der Patientensubgruppen mit Depression. Die Daten sind in **Abb. 21** graphisch als Boxplot dargestellt.

Tab. 27: Gemessene ADMA-Werte von Patient/-innen mit einer depressiven Episode und von Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung; berücksichtigt wurden nur Patient/-innen, bei denen Informationen zum Typ der Depression verfügbar waren; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; M ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung; n: Anzahl der Personen

Diagnose	n	c(ADMA) [ng/ml] M ± SD	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
F32 Depressive Episode	21	123 ± 30,6	116	73,7 - 179
F33 Rezidivierende depressive Störung	20	146 ± 31,1	148	78,3 - 197

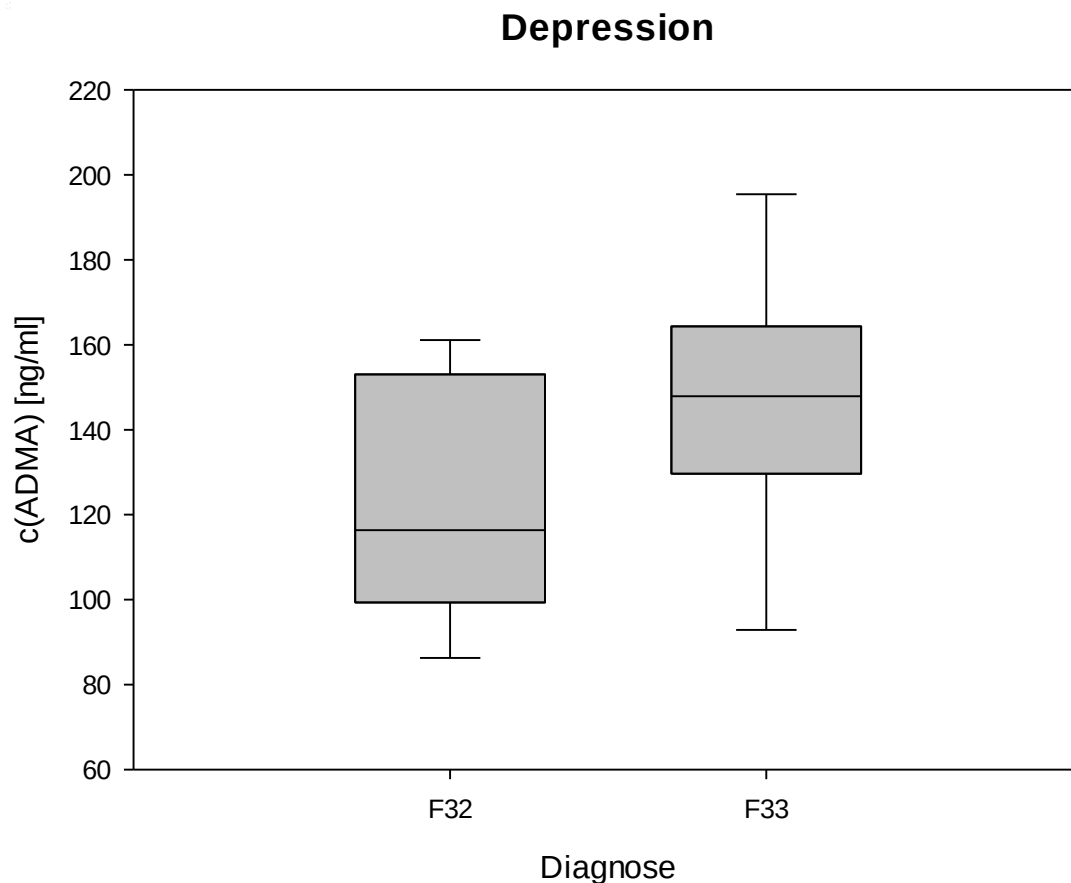


Abb. 21: Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit einer depressiven Episode (F32) und Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung (F33); die ADMA-Konzentration ist bei Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung signifikant höher als bei Patient/-innen mit einer depressiven Episode; c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; F32: Depressive Episode; F33: Rezidivierende depressive Störung

Die ADMA-Werte sind bei Personen mit rezidivierender depressiver Störung (F33) im Vergleich zu Personen mit einer depressiven Episode (F32) signifikant erhöht (*t*-Test, $p < 0,025$; $t = -2,343$; $r = 0,351$) (Braun et al., 2021).

4.2.12 Unterschiede innerhalb Patientensubgruppen mit Schizoaffektiver und Bipolarer Störung

Die ADMA-Konzentrationen von schizoaffektiven oder bipolaren Patient/-innen, die sich gegenwärtig in einer manischen, einer depressiven oder einer gemischten Phase befinden, sind in **Tab. 28** tabellarisch und in **Abb. 22** graphisch dargestellt.

Tab. 28: Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit Schizoaffectiver oder Bipolarer Störung unterteilt nach gegenwärtigem Zustand; berücksichtigt wurden nur Patient/-innen, bei denen Informationen zum gegenwärtigen Zustand verfügbar waren;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Anzahl der Personen

Diagnose	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gegenwärtig manisch	10	$131 \pm 41,2$	126	80,7 - 207
Gegenwärtig depressiv	13	$146 \pm 32,5$	152	88,6 - 192
Gemischt	8	$121 \pm 27,4$	111	89,3 - 158

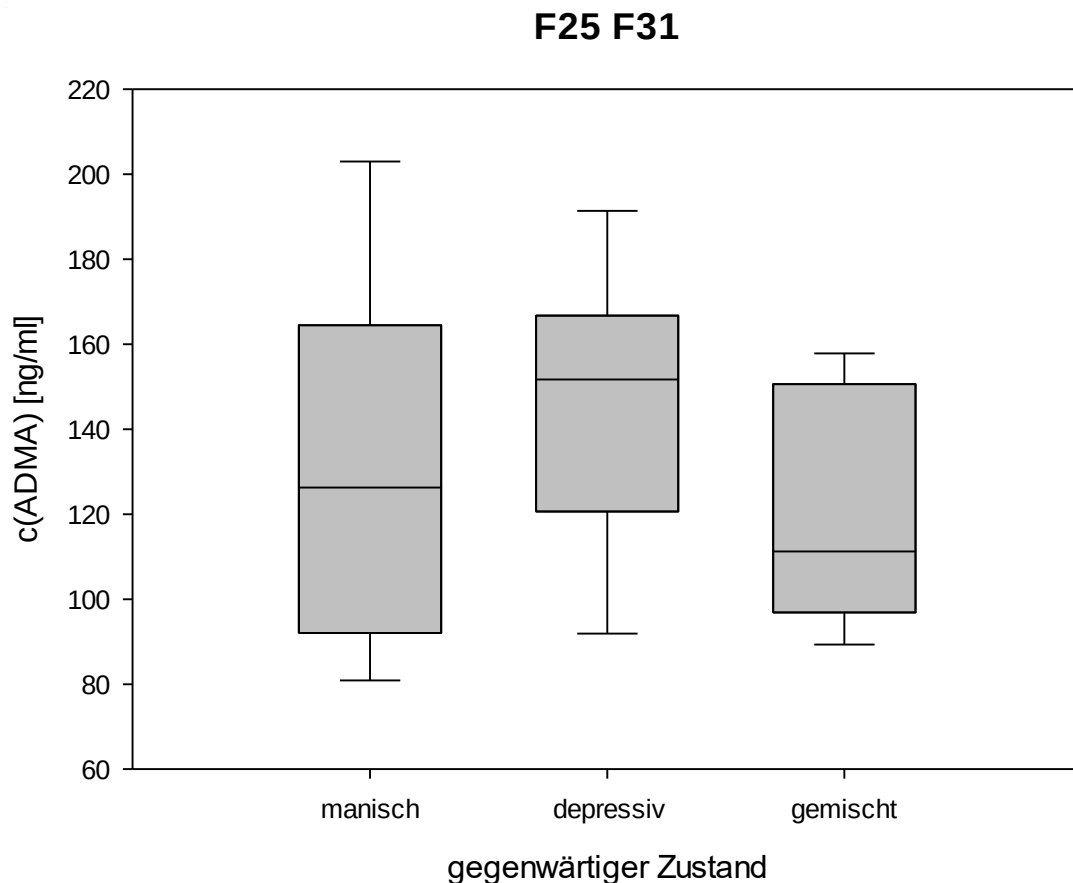


Abb. 22: ADMA-Konzentrationen von schizoaffectiven oder bipolaren Patient/-innen in Subgruppen unterteilt nach gegenwärtigem Zustand; die Serumkonzentrationen von ADMA c(ADMA) manischer Personen, depressiver Personen sowie Personen in einer gemischten Phase unterschieden sich nicht signifikant voneinander

Die gemessenen ADMA-Konzentrationen sind über alle Subgruppen nach gegenwärtigem Zustand von Personen mit den Diagnosen F25 oder F31 gleich verteilt. Es sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar (einfaktorielle ANOVA, $p > 0,2$; $F = 1,338$).

4.2.13 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen

Die Serumkonzentrationen von ADMA der betreffenden Gruppen sind in **Tab. 29** tabellarisch und in **Abb. 23** graphisch dargestellt.

Tab. 29: ADMA-Konzentrationen der Kontrollgruppe, der Personen mit einer psychiatrischen Erkrankung und der Personen, bei denen zusätzlich zu einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen, welche die ADMA-Konzentration erhöhen können; die Mittelwerte nicht normalverteilter Daten sind in Klammern angegeben;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; $M \pm SD$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n: Anzahl der Personen;

Psy: Personen mit psychiatrischer Erkrankung; Psy Kv: Personen mit psychiatrischer und kardiovaskulärer Erkrankung

Diagnose	n	c(ADMA) [ng/ml] $M \pm SD$	c(ADMA) [ng/ml] Median	c(ADMA) [ng/ml] Range
Gesunde	16	$84,8 \pm 12,3$	82,0	67,4 - 107
Psy	138	(150 ± 238)	127	73,7 - 2892
Psy Kv	14	($123 \pm 36,1$)	113	69,6 - 225

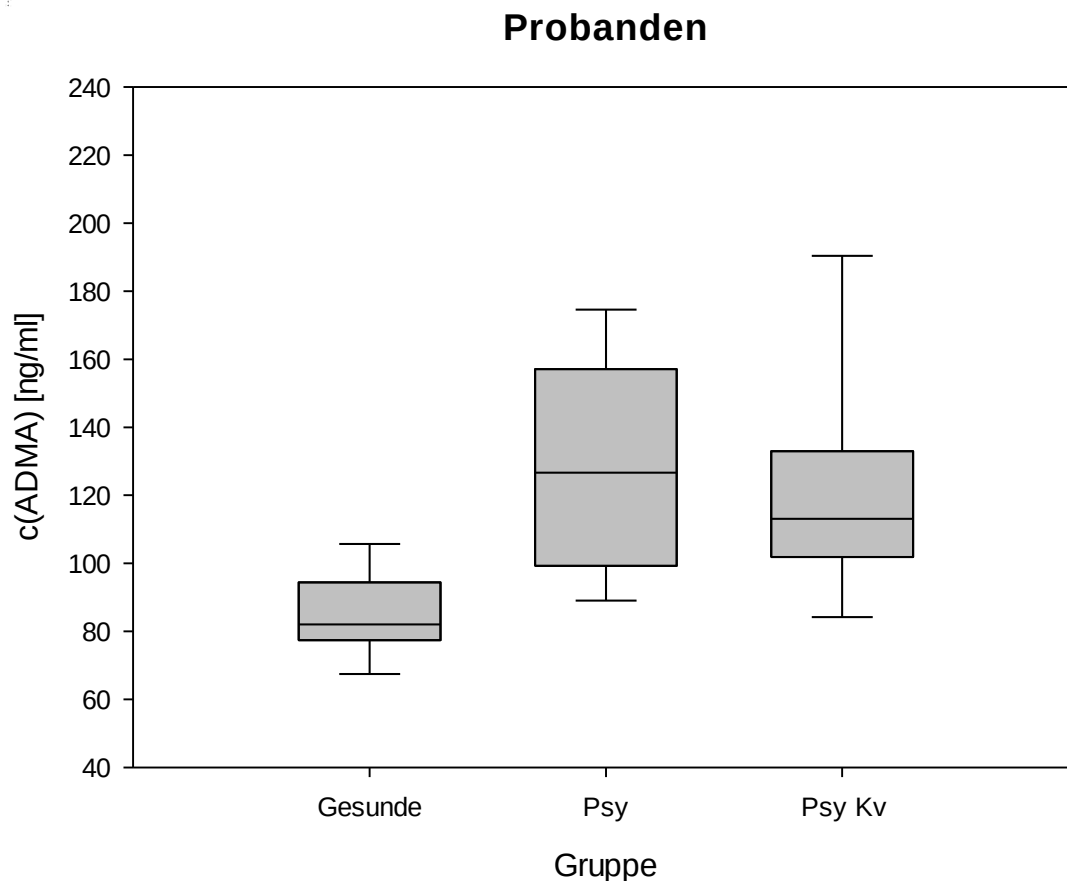


Abb. 23: ADMA-Konzentrationen der Kontrollgruppe, der Personen mit einer psychiatrischen Erkrankung und der Personen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen, welche die ADMA-Konzentration erhöhen können;

c(ADMA): Serumkonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin; Psy: Personen mit psychiatrischer Erkrankung; Psy Kv: Personen mit psychiatrischer und kardiovaskulärer Erkrankung

Die ADMA-Werte waren über alle drei Gruppen unterschiedlich verteilt (*Kruskal-Wallis-Test*, $p > 0,0000005$; $Z = 29,214$; $r = 2,254$). Dabei waren sie sowohl bei nur psychisch Erkrankten als auch bei Patient/-innen, die außer an einer psychischen Erkrankung noch an einer kardiovaskulären Erkrankung leiden, im Vergleich zu den Gesunden signifikant erhöht. (Psy: $p < 0,0000003$; $Z = -5,399$; $r = 0,435$; Psy Kv: $p < 0,004$; $Z = -3,303$; $r = 0,603$). Allerdings bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patient/-innen, welche nur psychisch erkrankt sind, und Patient/-innen, bei denen außer einer psychischen Erkrankung noch weitere Bedingungen vorliegen, die zu einer höheren ADMA-Konzentration führen können ($p > 0,9$; $Z = 0,774$).

5. Diskussion

5.1 HPLC-Analytik

5.1.1 Probenaufbereitung durch Proteinfällung

Die Abtrennung der Proteine ist ein notwendiger Schritt, da diese aufgrund ihrer zahlreichen Aminogruppen die spätere Derivatisierung mit dem OPA-Reagenz stören würden. Außerdem würde das Injizieren von proteinreichem Serum die Säule verstopfen oder die Lebensdauer der Säule stark reduzieren, was zu hohen Kosten führen kann.

Um Zeit zu sparen, wurde im Verlauf der Methodenentwicklung zunächst versucht, die Probenvorbereitung auf eine Abtrennung der Serumproteine zu beschränken. Doch dieses Verfahren führte zu sehr komplexen Chromatogrammen. Die große Menge an Peaks ist dadurch zu erklären, dass im Serum neben ADMA noch zahlreiche weitere primäre Amine wie z. B. Aminosäuren vorhanden sind, die durch die Reaktion mit OPA derivatisiert werden und anschließend nach Anregung fluoreszieren.

Da in diesen Chromatogrammen die Auflösung von ADMA nicht ausreichend war und da die Retentionszeit von ADMA sehr hoch war, wurde der Umstieg auf eine andere Methode zur Probenvorbereitung notwendig.

5.1.2 Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Um die Auflösung zu verbessern, musste ein Chromatogramm angestrebt werden, das weniger störende Peaks enthält. Dazu sollten störende Aminosäuren bei der Probenvorbereitung aus dem Serum entfernt werden. Da es sich bei der Festphasenextraktion um ein kostenintensiveres Verfahren handelt, sollte zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt werden.

Aminosäuren haben Zwitterioncharakter und sind bei einem pH-Wert, der ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (IEP) entspricht, nach außen hin neutral geladen, was deren Hydratation erschwert. Aus diesem Grund ist die Löslichkeit von Aminosäuren in Wasser an ihrem IEP am niedrigsten.

Wie in **Tab. 30** zu erkennen ist, haben viele Aminosäuren ihren IEP bei einem pH-Wert von ca. 6,0.

Tab. 30: Isoelektrischer Punkt ausgewählter Aminosäuren (Liu et al., 2004); die meisten Aminosäuren, welche die HPLC-Analytik von ADMA stören, haben einen Isoelektrischen Punkt (IEP) in der Größenordnung von ca. 6

Name der Aminosäure	IEP
Glutamin	5,65
Serin	5,70
Methionin	5,71
Tryptophan	5,88
Valin	6,02
Leucin	6,04
Isoleucin	6,04
Glycin	6,06
Alanin	6,11
Prolin	6,30
Arginin	10,76

Der IEP von Arginin ist mit einem Wert von 10,76 deutlich von den meisten anderen Aminosäuren entfernt. Der IEP von ADMA liegt in der gleichen Größenordnung.

Es wurde angenommen, dass bei pH6,0 ADMA besser wasserlöslich ist als einige störende Aminosäuren. Aus diesem Grund wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt. Damit sollten Arginin und seine Derivate von störenden Aminosäuren getrennt werden.

Allerdings unterschied sich ein Chromatogramm nach Flüssig-Flüssig-Extraktion nur sehr geringfügig von einem Chromatogramm nach alleiniger Proteinfällung. Neben ADMA traten auch die anderen Aminosäuren in der Wasserphase auf. Die störenden Aminosäuren sind also auch an einem pH-Wert, der ihrem IEP entspricht, immer noch zu stark wasserlöslich, um sie von den Arginin-Derivaten zu separieren.

Die Auflösung von ADMA war nach diesem Verfahren nicht ausreichend und seine Retentionszeit sehr hoch.

5.1.3 Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion

Das SPE-Verfahren wurde an dem starken Kationenaustausch-Polymer Oasis® MCX durchgeführt. In dem Standardprotokoll des Herstellers Waters wird für dieses Polymer ein Elutionsmittel empfohlen, das Ammoniak und Methanol enthält. Allerdings macht der Einsatz von Ammoniak ein zeitaufwendiges Abdampfen nach der Festphasenextraktion unvermeidbar, da er ansonsten beim nächsten Schritt mit dem Derivatisierungsreagenz reagieren würde. In bisher publizierten Methoden zur Quantifizierung von ADMA enthielt das SPE-Elutionsmittel oft 40% Wasser zusätzlich zu Ammoniak und Methanol, da dadurch die Wiederfindung erhöht wurde (Teerlink et al., 2002; Blackwell et al., 2009). Doch insbesondere aufgrund dieses hohen Anteils

an Wasser nimmt das Abdampfen nach der SPE sehr viel Zeit in Anspruch, was die Analysenzeit insgesamt um ca. eine Stunde verlängert.

Nach Aufbereitung der Serumproben durch SPE wurden sehr gut auszuwertende Chromatogramme erhalten, da störende Aminosäuren durch dieses Verfahren zuverlässig abgetrennt werden konnten. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu ADMA konnten Arginin und weitere Arginin-Derivate bei diesem Verfahren nicht aus der Matrix entfernt werden. Dennoch wurde für die Peaks von ADMA und MEA eine Basislinientrennung erreicht. Außerdem waren die Retentionszeit von ADMA und die Laufzeit des Chromatogramms verhältnismäßig kurz. Somit ist die SPE ein wesentlich besser geeignetes Verfahren zur Abtrennung störender Aminosäuren von ADMA als die Flüssig-Flüssig-Extraktion.

5.1.4 Festphasenextraktion mit einem neuen Elutionsmittel

Um allerdings die durch das Einengen des SPE-Eluenten zu lange Probenaufbereitungszeit zu verkürzen, wurde für die in dieser Arbeit entwickelte Methode ein Elutionsmittel ohne Ammoniak entwickelt.

Bei der Aufreinigung des Serums durch das SPE-Verfahren wird das unterschiedliche Bindungsverhalten der einzelnen Substanzen an das Ionenaustausch-Polymer, welches sich in den SPE-Säulen Oasis® MCX befindet, genutzt.

Die Bindung von ADMA an das Polymer erfolgt hauptsächlich aufgrund der ionischen Wechselwirkungen von stark sauren Sulfonsäurefunktionen des Polymers mit den stark basischen Guanidingruppen der ADMA-Moleküle. Arginin und weitere Arginin-Derivate interagieren hauptsächlich durch den gleichen Mechanismus mit dem Polymer.

Um ADMA und MEA bei der Elution von dem starken Kationenaustausch-Polymer zu trennen, muss das Elutionsmittel also eine ausreichend hohe Basizität aufweisen, damit die Guanidin-Gruppen deprotoniert und somit ungeladen vorliegen. Außerdem sollte es eine hohe Kationen-Konzentration besitzen, um ADMA und MEA aus dem Polymer zu verdrängen. Diese Bedingungen wurden durch den Einsatz von Kaliumhydroxid und Kaliumchlorid erfüllt. Durch die Verwendung dieses Elutionsmittels ist ein Abdampf-Schritt nach der SPE nicht mehr notwendig, da es keine Bestandteile enthält, welche den weiteren Verlauf der Analytik stören könnten. Dadurch wird im Vergleich zu früheren Methoden eine deutlich kürzere Analysenzeit erreicht. Darüber hinaus ist das Auslassen eines Abdampf-Schrittes auch mit Einsparungen an Energie verbunden, da ein für diesen Schritt notwendiges langes Erhitzen der Proben auch einen hohen Stromverbrauch zur Folge hätte. Außer den Stromkosten werden dabei zusätzlich noch Kosten für die Arbeitszeit und die dafür benötigten Geräte wie Vakuumzentrifugen und deren Wartung eingespart.

Die bei der Validierung ermittelten Extraktionsausbeuten von ADMA (93,4%) und MEA (92,8%) sowie die relative Extraktionsausbeute von 101% zeigen, dass das neue Elutionsmittel seinen Zweck weitreichend erfüllt.

Insbesondere aufgrund der Einsparungen an Zeit, Energie und Kosten durch das nicht mehr notwendige Abdampfen ist diese Methode zur Probenaufbereitung nachhaltiger als bisher publizierte Methoden, die einen Abdampf-Schritt enthalten.

5.1.5 Wahl des internen Standards

Da die Probenaufbereitung mithilfe einer Festphasenextraktion durchgeführt wird, ist der Einsatz eines internen Standards notwendig. Dadurch werden mögliche Verluste von ADMA bei dem Extraktionsverfahren rechnerisch ausgeglichen. Außerdem ist das Derivatisierungsprodukt von ADMA mit OPA und MPA nicht vollständig stabil, obwohl es wesentlich stabiler ist als ein Produkt mit OPA und ME. Auch ein teilweiser Zerfall des Derivatisierungsproduktes wird durch den Einsatz des internen Standards ausgeglichen (Blackwell et al., 2009).

In früheren Publikationen wurde für die HPLC-Quantifizierung von ADMA mit Fluoreszenzdetektor häufig L-NMMA als interner Standard eingesetzt (Teerlink, 2007). Da es sich dabei um ein endogenes Arginin-Derivat handelt, das in geringen Konzentrationen im Serum vorkommt (Tran et al., 2003), wird es in hohen Konzentrationen als interner Standard der Probe zugesetzt. Allerdings kann die Konzentration von L-NMMA in pathologischen Zuständen wie der Niereninsuffizienz, bei denen ADMA erhöht ist, ebenfalls erhöht sein (Blackwell et al., 2009). Das würde zu Verfälschungen des analytischen Ergebnisses führen. Auch der Einsatz von Homoarginin als interner Standard wurde beschrieben (Zhang and Kaye, 2004), welches den gleichen Nachteil in noch größerem Ausmaß als L-NMMA besitzt.

Deshalb wurde bei dieser Methode das Arginin-Derivat MEA als interner Standard eingesetzt, da es sich dabei nicht um eine endogene Substanz handelt, die allerdings dennoch große strukturelle Ähnlichkeit zu ADMA besitzt.

Ein Nachteil von MEA ist, dass dessen Derivatisierungsprodukt eine geringfügig längere Retentionszeit aufweist als das Derivatisierungsprodukt von L-NMMA. Allerdings besitzt die Methode mit MEA den überwiegenden Vorteil, dass sie aus den oben genannten Gründen weniger fehleranfällig ist und so zu zuverlässigeren Ergebnissen führt als Methoden, die L-NMMA als internen Standard verwenden.

Die relative Extraktionsausbeute von 101% zeigt, dass MEA bei dieser Methode ein geeigneter interner Standard ist.

5.1.6 Weitere Vorteile der Methode

Für die Chromatographie wurde eine halbporöse Säule mit einer kleinen Partikelgröße eingesetzt (Kinetex® EVO C18 2,6µm). Aufgrund der guten Auflösung dieser Säule, konnte ein hoher Anteil von fast 10% Acetonitril im Fließmittel verwendet werden. Daraus resultiert eine kurze chromatographische Laufzeit.

Die im Vergleich zu älteren Methoden (Teerlink et al., 2002) erhöhte Temperatur des Säulenofens von 40°C führte dazu, dass sich die Retentionszeiten aller Peaks ohne Verlust an Auflösung verringerten, was wiederum zur Verkürzung der Laufzeit beiträgt.

Durch diese Maßnahmen wurde die chromatographische Laufzeit auf 13min verkürzt. Zusammen mit dem Auslassen eines Abdampf-Schrittes, was bei der Probenvorbereitung mehr als eine Stunde einspart, führt das zu insgesamt kurzen Analysenzeiten.

Außerdem wurde für diese Methode eine Dreipunkt-Kalibrierung durchgeführt, was zu genaueren Messergebnissen führt als eine Einpunkt-Kalibrierung.

5.1.7 Validierung der Methode

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass die Methode die Anforderungen an Extraktionsausbeute, Linearität, Richtigkeit, Präzision und Matrixeffekt deutlich erfüllt. Damit handelt es sich um ein valides und damit zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung der Serumkonzentration von ADMA per HPLC mit Fluoreszenzdetektor.

5.1.8 Matrixeffekt

Die Analyse des Matrixeffektes ergab, dass ein evtl. auftretender Effekt der Serum-Matrix vernachlässigbar ist. Deshalb können für die Kalibrierung der HPLC-Bestimmung der ADMA-Konzentrationen aus Serumproben wässrige Standards verwendet werden, ohne die Zuverlässigkeit der Methode zu beeinflussen.

5.2 Untersuchung der Serumkonzentrationen von ADMA bei psychisch Erkrankten und Gesunden

5.2.1 Serumkonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen

Um einen Referenzwert zu erhalten, wurde die mittlere Serumkonzentration von ADMA bereits häufig bei gesunden Personen untersucht. Die publizierten Werte variieren allerdings sehr stark innerhalb eines Intervalls von $0,12\mu\text{M}$ bis $4,0\mu\text{M}$ (Horowitz and Heresztyn, 2007). Mögliche Gründe für diese großen Unterschiede sind:

- Messung bei verschiedenen Personengruppen
- Unterschiedliche analytische Methoden
- Systematische Fehler bei der Messung

Laut Horowitz und Heresztyn liegt der wahre Wert für die ADMA-Konzentration bei gesunden Personen zwischen $0,4\mu\text{M}$ und $0,6\mu\text{M}$ (Horowitz and Heresztyn, 2007).

Mit der entwickelten Methode wurde eine mittlere ADMA-Konzentration von $84.8 \pm 11.9\text{ng/ml} = 0.419 \pm 0.059\mu\text{M}$ ($n=16$) im Serum gesunder Personen gemessen.

Dieser Wert liegt in dem Intervall, in dem Horowitz und Heresztyn die wahre Konzentration vermuten (Horowitz and Heresztyn, 2007). Außerdem stimmt er sehr gut mit den Ergebnissen von Teerlink et al. überein, der mithilfe einer HPLC/Fluorimeter-Methode mit OPA-Derivatisierung bei Gesunden eine mittlere ADMA-Konzentration von $0.42 \pm 0.06\mu\text{M}$ ($n=53$) maß (Teerlink et al., 2002). Andere HPLC/Fluorimeter-Assays mit OPA-Derivatisierung kamen zu ähnlichen Ergebnissen, z. B. $0.40 \pm 0.09\mu\text{M}$ ($n=8$) (Perticone et al., 2005) und $0.46 \pm 0.08\mu\text{M}$ ($n=70$) (Blackwell et al., 2009). Heresztyn et al. verwendeten für ihre HPLC/Fluorimeter-Methode AccQ-Fluor® von Waters als Derivatisierungsreagenz und ermittelten eine Konzentration von $0.44 \pm 0.08\mu\text{M}$ ($n=12$) (Heresztyn et al., 2004). Auch der Einsatz anderer analytischer Methoden führte zu ähnlichen Ergebnissen für die mittlere ADMA-Konzentration, z. B. $0.39 \pm 0.06\mu\text{M}$ ($n=12$) (GC-MS-MS) (Tsikas et al., 2003) und $0.355 \pm 0.066\mu\text{M}$ ($n=47$) (LC-MS) (Martens-Lobenhoffer et al., 2004).

Obwohl sich die publizierten ADMA-Konzentrationen bei Gesunden teilweise sehr stark unterscheiden, kamen einige frühere Studien zu Ergebnissen, die den hier ermittelten ADMA-Werten sehr ähnlich sind.

Da der Einsatz verschiedener analytischer Verfahren in der Regel zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen führt, sollten intra- und interindividuelle Vergleiche der ADMA-Konzentrationen immer mit derselben Methode durchgeführt werden.

5.2.2 Unterschiede zwischen psychisch Erkrankten und Gesunden

Sowohl die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit F2X-Diagnosen (Schizophrenie oder schizoaffektive Störung) als auch die von Patient/-innen mit F3X-Diagnosen (affektive Störungen) waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen hochsignifikant erhöht.

Zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen im Serum und dem Auftreten von psychiatrischen Erkrankungen sind folgende pathophysiologische Zusammenhänge möglich:

NO beeinflusst im zentralen Nervensystem die Freisetzung von Neurotransmittern wie Serotonin, Noradrenalin oder Dopamin (Prast and Philippu, 2001). Eine erhöhte Konzentration von ADMA führt durch eine kompetitive Hemmung der NOS zu einem geringeren Angebot von NO. Eine dadurch veränderte Freisetzung von Neurotransmittern könnte zu einer Manifestation einer psychischen Erkrankung beitragen (Braun et al., 2021). Beispielsweise könnte eine erhöhte Dopamin-Konzentration das Auftreten einer Schizophrenie fördern, während eine erniedrigte Serotonin-Konzentration das Auftreten einer Depression begünstigen kann.

Außerdem verursacht ADMA eine Vasokonstriktion zentraler Gefäße durch Hemmung der NOS (Faraci et al., 1995). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der daraus resultierende verminderte zerebrale Blutfluss ebenfalls das Auftreten psychischer Krankheiten begünstigt (Braun et al., 2021).

Dabei könnte eine erniedrigte Aktivität des Enzymes DDAH für die erhöhten ADMA-Konzentrationen verantwortlich sein. Ursachen dafür können Polymorphismen oder eine Inhibition dieses Enzymes sein (Leiper and Nandi, 2011).

5.2.3 Patientenprobe mit sehr hoher ADMA-Konzentration

Bei einem Schizophrenie-Patienten wurde eine sehr hohe Serumkonzentration von ADMA gemessen. Der ermittelte Wert von 2892ng/ml lag deutlich über den ADMA-Konzentrationen aller weiteren Proben. Der zweithöchste gemessene Wert betrug 223ng/ml. Die durchschnittliche ADMA-Konzentration bei Patient/-innen mit F2X-Diagnose betrug im Median 116ng/ml.

Die Wiederholung der Messung führte zu einem Wert in der gleichen Größenordnung. Außerdem waren in den Chromatogrammen keine Peak-Überlagerungen zu sehen. Für diese extreme Konzentration von ADMA waren also keine Messfehler verantwortlich.

In der Fachliteratur wurde bisher nie über einen so hohen Wert für die ADMA-Konzentration berichtet.

Dem Patienten wurde ein schizophreses Residuum (F20.5) diagnostiziert. Man kann also davon ausgehen, dass er seit vielen Jahren an einer Schizophrenie leidet. Die genaue Ursache dieser sehr stark erhöhten ADMA-Konzentration bleibt ungeklärt, wobei der lange Verlauf der Erkrankung zu dieser Konzentration beitragen könnte.

5.2.4 Einfluss des Alters

Alle Patientengruppen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe in Bezug auf Geschlecht, BMI oder Raucherstatus. Außerdem unterschieden sich Patient/-innen mit Schizophrenie oder schizoaffectiver Störung nicht signifikant im Alter von den gesunden Personen. Allerdings waren die Patient/-innen mit affektiven Störungen älter als die der Kontrollgruppe. Der Einfluss des Alters auf die ADMA-Konzentration wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Meinitzer et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die ADMA-Konzentrationen bei Männern über 50 Jahren höher waren als bei Männern unter 50 Jahren und bei Männern über 65 Jahren höher als bei Männern unter 65 Jahren. Sie beschrieben jedoch nur geringe Unterschiede in den ADMA-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Altersgruppen. In der genannten Arbeit betrug die ADMA-Konzentration der Personen im Alter unter 35 Jahren im Median 117ng/ml während sie bei Personen über 65 Jahren im Median 129ng/ml betrug (Meinitzer et al., 2007). Diese um ca. 10% erhöhte Serumkonzentration kann nicht die in der vorliegenden Arbeit deutlich erhöhten ADMA-Werte bei Patient/-innen mit affektiven Störungen im Vergleich zu Gesunden erklären. Auch ein Review kam zu dem Ergebnis, dass das Alter nur einen geringen Einfluss auf die Serumkonzentration von ADMA ausübt (Horowitz and Heresztyn, 2007). Hov et al. fanden keine signifikanten Unterschiede in den ADMA-Konzentrationen zwischen älteren und jüngeren Männern. Sie stellten jedoch fest, dass die ADMA-Konzentrationen bei Frauen über 45 Jahren signifikant höher waren als bei jüngeren Frauen. Auch dieser Unterschied war mit 0,41-0,84 μ M versus 0,38-0,73 μ M (Range) gering (Hov et al., 2007). Jud et al. beschrieben keine signifikant höheren ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit über 65 Jahren als bei Patient/-innen unter 65 Jahren (Jud et al., 2018). Auch in der hier vorliegenden Arbeit war keine Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und dem Personenalter feststellbar. Die erhöhten ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit affektiven Störungen im Vergleich zu gesunden Personen sind also nicht durch das höhere Alter dieser Patient/-innen bedingt.

5.2.5 Einfluss des Geschlechtes

Weder bei Patient/-innen mit Schizophrenie oder schizoaffectiver Störung noch bei Patient/-innen mit affektiven Störungen noch bei gesunden Personen bestand zwischen weiblichen und männlichen Probanden ein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentration von ADMA. Deshalb kann man davon ausgehen, dass das

Geschlecht keinen Einfluss auf die ADMA-Konzentration ausübt und dass ADMA bei Frauen und Männern gleichermaßen an der Pathophysiologie psychiatrischer Krankheiten beteiligt ist. Diese Erkenntnis ist auch mit den Ergebnissen von Horowitz und Heresztyn vereinbar, die keine signifikanten Unterschiede in den ADMA-Konzentrationen zwischen Frauen und Männern beschrieben (Horowitz and Heresztyn, 2007).

5.2.6 Einfluss des Schweregrades der psychischen Erkrankung

Sowohl bei Patient/-innen mit F2X-Diagnose als auch bei Patient/-innen mit F3X-Diagnose bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Schweregraden der Erkrankung.

Diese Tatsache spricht dafür, dass kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer psychiatrischen Erkrankung und der Serumkonzentration von ADMA besteht.

Somit kann ADMA ein Indikator für das Auftreten einer psychischen Erkrankung sein, aber nicht für deren Schweregrad.

5.2.7 Einfluss einer Verbesserung unter der Therapie

Zwischen Patient/-innen, die unter der Therapie besser wurden und Patient/-innen, die nicht besser wurden, war kein signifikanter Unterschied in der ADMA-Konzentration feststellbar.

Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass eine Therapie keinen Einfluss auf die ADMA-Konzentrationen hat, auch wenn sich dabei die Symptome der/des Betroffenen verbessern. Eine Veränderung des Zustandes des Erkrankten kann somit vermutlich nicht in der ADMA-Konzentration gesehen werden.

Allerdings wurden in dieser Arbeit nur interindividuelle Vergleiche gemacht. Eine bessere Beurteilung des Einflusses einer Therapie ist bei intraindividuellen Vergleichen möglich. Dafür sind weitere Studien notwendig, bei denen die ADMA-Konzentration in regelmäßigen Abständen bei der gleichen Person im Verlauf der Therapie ermittelt wird.

5.2.8 Einfluss der Medikation

Zwischen verschiedenen Arzneistoff-Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in den Serumkonzentrationen von ADMA. Es wurden nur Patient/-innen berücksichtigt, bei denen die Wirkstoffkonzentration mindestens 50% der unteren Grenze des therapeutischen Referenzbereiches betrug, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Arzneistoff einen pharmakologischen Einfluss besitzt. Dadurch wurde

ausgeschlossen, dass das Ergebnis durch Compliance-Probleme oder starke Cytochrom-P450-Interaktionen verfälscht wird. Falls also die Medikation einen Einfluss auf die ADMA-Konzentration hätte, würde jeder der betrachteten Wirkstoffe ADMA im gleichen Maße beeinflussen. Das ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da die Psychopharmaka verschiedenste Wirkmechanismen besitzen.

Nach diesem Ergebnis hat die Anwendung dieser Arzneistoffe vermutlich keinen Einfluss auf die ADMA-Konzentration. Auch frühere Studien befassten sich mit dieser Thematik. Zincir et al. untersuchten die ADMA-Werte schizophrener Personen vor einer Therapie mit Neuroleptika und die Werte der gleichen Personen zwei Monate nach Beginn einer Behandlung mit Neuroleptika. Nach diesem Zeitraum waren die ADMA-Konzentrationen signifikant niedriger als vor der Therapie, aber immer noch höher als bei Gesunden (Zincir et al., 2014). Auch Yu et al. (2018) ermittelten, dass Patient/-innen nach einer zweimonatigen Therapie mit Neuroleptika niedrigere ADMA-Werte besitzen als vor der Therapie. Dabei unterschieden sich allerdings die ADMA-Werte zwei Monate nach Therapiebeginn nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (Yu et al., 2018). Baranyi et al. analysierten ADMA-Werte bei Patient/-innen mit Depression zu Beginn einer Pharmakotherapie bei stationärer Aufnahme sowie bei Entlassung aufgrund einer Besserung unter antidepressiver Therapie. Bei stationärer Aufnahme waren die ADMA-Konzentrationen der Patient/-innen im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöht. Bei der Entlassung blieben die ADMA-Werte im Vergleich zur Aufnahme nahezu unverändert (Baranyi et al., 2015). Darüber hinaus gibt es bereits einige Studien, bei denen die ADMA-Konzentration bei psychisch Erkrankten, die (noch) keine Pharmakotherapie erhielten, im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht waren (Das et al., 1996; Selley, 2004; Celik et al., 2011).

Die Ergebnisse von Zincir et al. und Yu et al. widersprechen der Theorie, dass eine Medikation mit Psychopharmaka keinen Einfluss auf die ADMA-Konzentrationen hat (Zincir et al., 2014; Yu et al., 2018). Im Gegensatz dazu lässt sich diese Theorie durch die Ergebnisse von Baranyi et al. und dieser vorliegenden Arbeit bestätigen (Baranyi et al., 2015).

Auch der in **Abb. 24** dargestellte Zusammenhang zwischen ADMA, NO und verschiedenen Neurotransmittern zeigt, dass ein Einfluss der Psychopharmaka auf ADMA unwahrscheinlich ist. Zur Vereinfachung sind dabei eine noradrenerge, serotoninerge und dopaminerge Synapse zu einer Synapse zusammengefasst. Außerdem sind die Angriffswege verschiedener Psychopharmaka-Gruppen dargestellt.

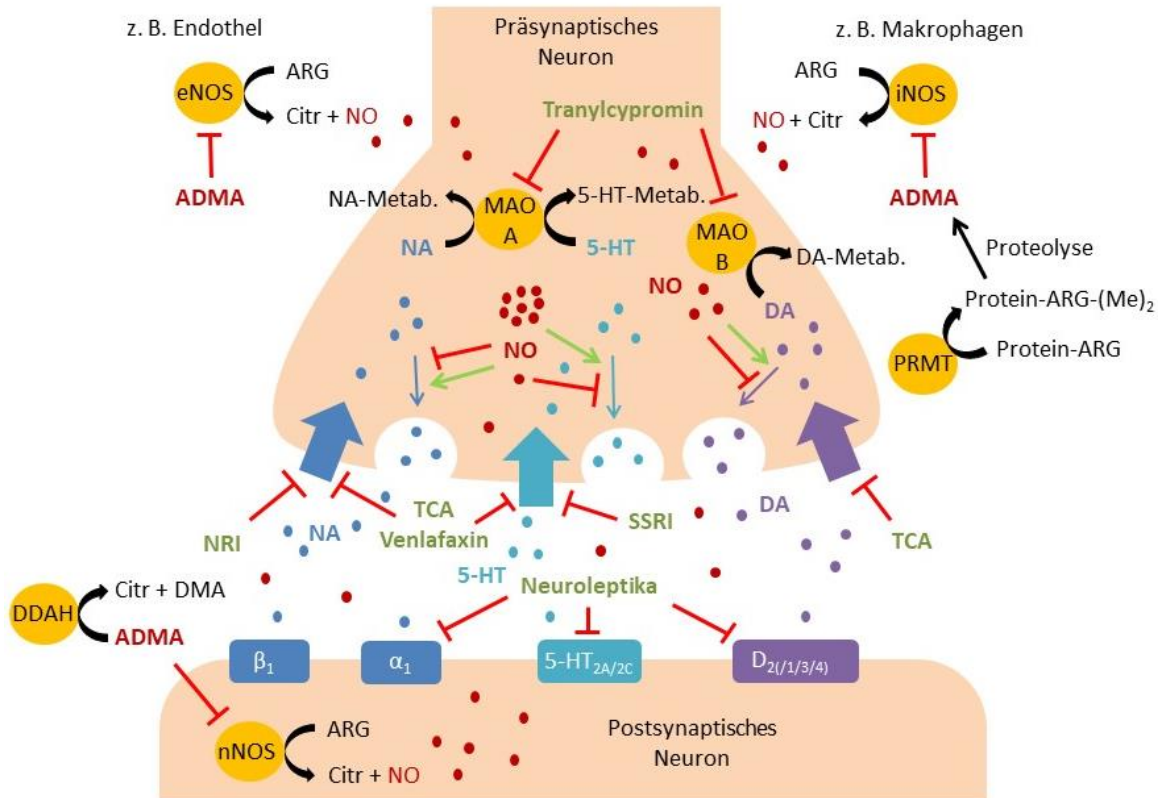


Abb. 24: Einflussnahme von ADMA und Psychopharmaka auf die Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA); Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) entsteht durch Methylierung von proteingebundenem Arginin mittels Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) und anschließende Proteolyse. Die Elimination von ADMA erfolgt hauptsächlich durch Dimethylargininasen (DDAH). Die Freisetzung von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin in den synaptischen Spalt wird durch NO beeinflusst. Dabei führen große Mengen NO zu einer vermehrten Freisetzung von 5-HT, während kleine Mengen NO dessen Freisetzung vermindern. NO besitzt sowohl hemmende als auch induzierende Effekte auf die Freisetzung von NA und DA, wobei die genauen Mechanismen bisher ungeklärt sind. ADMA inhibiert die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS), was zu einem geringeren Angebot an NO führt. Dadurch wird die Freisetzung von NA, 5-HT und DA beeinflusst, was zur Folge hat, dass diese Neurotransmitter in veränderten Konzentrationen an den Rezeptoren vorhanden sind. Psychopharmaka beeinflussen den Verlauf dieser Erkrankungen durch andere Mechanismen. Neuroleptika wirken je nach Vertreter u.a. durch Blockade von α₂-, 5-HT- und D_{1/2/3/4}-Rezeptoren. Trizyklische Antidepressiva (TCA) hemmen u.a. nichtselektiv die Wiederaufnahme von Neurotransmittern, während Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) die 5-HT-Wiederaufnahme und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NRI) die NA-Wiederaufnahme inhibieren. Tranylcypromin hemmt nichtselektiv die Monoaminoxidase (MAO). Keines der Psychopharmaka beeinflusst nach derzeitigen Erkenntnissen die Entstehung bzw. den Abbau von ADMA bzw. dessen Angriff an der NOS (Prast and Philippu, 2001; Leiper and Nandi, 2011).

Wie an **Abb. 24** erkennbar ist, beeinflussen sowohl ADMA als auch die Psychopharmaka die Konzentrationen von Neurotransmittern an ihren Rezeptoren und damit vermutlich den Verlauf psychiatrischer Erkrankungen. Allerdings scheinen die Mechanismen von ADMA und der Psychopharmaka keinen gegenseitigen Einfluss aufeinander zu haben. Die Psychopharmaka haben keinen pharmakologischen Einfluss auf Entstehung und Elimination von ADMA. Deshalb beeinflussen diese Arzneistoffe vermutlich auch nicht die Serumkonzentrationen von ADMA.

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Erhöhung der ADMA-Konzentration bei psychisch erkrankten Personen nicht durch die Psychopharmaka-Therapie, sondern durch die Erkrankung selbst verursacht wurde. Diese Annahme ist mit dem Ergebnis vereinbar, dass zwischen den verschiedenen Arzneistoffgruppen kein signifikanter Unterschied in den ADMA-Konzentrationen feststellbar war.

5.2.9 Unterschiede zwischen Patientengruppen mit verschiedenen Diagnosen

Die statistische Auswertung führte zu dem Ergebnis, dass die ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen, die an folgenden Erkrankungen leiden und eine Pharmakotherapie erhalten, im Vergleich zu Gesunden jeweils hochsignifikant erhöht sind:

- Schizophrenie
- Schizoaffektive Störungen
- Bipolare affektive Störung
- Depression

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit widersprechen somit bzgl. der Schizophrenie den Ergebnissen von Jorgensen et al. und Yu et al. (Jorgensen et al., 2015; Yu et al., 2018). Allerdings bestätigen sie die Ergebnisse anderer Untersuchungen (Zincir et al., 2014; Ustundag et al., 2020). Zusammen mit den Ergebnissen von Das et al., Celik et al. und Yang et al. sprechen sie dafür, dass die ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Schizophrenie im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht sind (Das et al., 1996; Celik et al., 2011; Yang et al., 2016).

In Bezug auf die Depression widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Ergebnissen von Ali-Sisto et al. (Ali-Sisto et al., 2018). Allerdings lassen sie sich sehr gut mit den Erkenntnissen von Baranyi et al. vereinbaren (Baranyi et al., 2015). Zusammen mit den Analysen von Selley sprechen sie für eine signifikante Erhöhung der ADMA-Konzentration bei Depressiven im Vergleich zu Gesunden (Selley, 2004).

In dieser vorliegenden Arbeit bestand die Patientengruppe mit bipolarer Störung sowohl aus Patient/-innen in der manischen Phase als auch aus Patient/-innen in der depressiven Phase oder in Mischphasen. Damit kommt diese Arbeit erstmalig zu dem Ergebnis, dass Personen mit Bipolarer Störung im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöhte ADMA-Werte besitzen, unabhängig davon, in welcher Phase diese

sich befinden (Braun et al., 2021). Dieses Erkenntnis ist auch vereinbar mit den Ergebnissen von Ustundag et al., welche allerdings nur manische Patient/-innen berücksichtigten (Ustundag et al., 2020).

Diese Arbeit kam erstmalig zu dem Ergebnis, dass die Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit schizoaffectiver Störung im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht sind (Braun et al., 2021). Vermutlich existiert auch hier ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen ADMA und dem Auftreten dieser Erkrankung. Eine pathologisch veränderte Freisetzung von Neurotransmittern und ein verminderter zerebraler Blutfluss könnten durch ein erniedrigtes Angebot an NO aufgrund hoher ADMA-Konzentrationen verursacht sein.

5.2.10 Unterschiede zwischen Personen mit einer depressiven Episode und Personen mit rezidivierender depressiver Störung

In einer Subgruppenanalyse der Depressions-Patient/-innen wurden auch die Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit einer depressiven Episode (F32) mit denen von Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung (F33) verglichen. Dabei waren die ADMA-Werte bei Personen mit F33-Diagnose signifikant höher als bei Personen mit F32-Diagnose.

Diese Erhöhung kann dadurch erklärt werden, dass ein längerer Krankheitsverlauf bei Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Episode vermutlich mit stärkeren pathologischen Veränderungen im ADMA-NOS-System verbunden ist (Braun et al., 2021).

Celik et al. kamen zu einem ähnlichen Ergebnis bei Personen mit Schizophrenie. Sie beschrieben höhere ADMA-Werte bei Personen, die an mehreren Episoden einer Schizophrenie leiden, im Vergleich zu Personen, bei denen die Erkrankung erstmalig auftrat (Celik et al., 2011).

Auch die in dieser vorliegenden Arbeit ermittelte sehr hohe ADMA-Konzentration eines Patienten mit schizophrenem Residuum kann vermutlich teilweise durch den damit verbundenen sehr langen Krankheitsverlauf erklärt werden.

5.2.11 Unterschiede in F25- und F31-Diagnosengruppen

In der Subgruppenanalyse innerhalb der Patient/-innen mit schizoaffectiver und bipolarer Störung war kein signifikanter Unterschied in den ADMA-Werten zwischen Personen, die gegenwärtig manisch waren, Personen, die gegenwärtig depressiv waren, und Personen in gemischten Phasen feststellbar. Das deutet darauf hin, dass ADMA bei den pathophysiologischen Prozessen dieser drei Subgruppen eine ähnliche Rolle spielt. Die erhöhte ADMA-Konzentration könnte eine Ursache aller drei untersuchten Typen dieser Erkrankungen sein.

5.2.12 Vergleich mit Patient/-innen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen

Die Tatsache, dass sich die ADMA-Werte von nur psychisch Erkrankten nicht signifikant von den ADMA-Werten psychisch und kardiovaskulär Erkrankter unterscheiden, spricht dafür, dass die Erhöhung der ADMA-Konzentration unabhängig von der Anzahl der ADMA-erhöhenden Bedingungen stattfindet, solange mindestens eine solche Bedingung vorliegt. Möglicherweise ist bei diesen Patient/-innen eine Erhöhung der ADMA-Konzentration die gemeinsame Ursache beider Erkrankungen, da ADMA über eine Hemmung der NOS sowohl zentrale als auch periphere Gefäße beeinflussen kann.

Dies ist ein weiteres Argument für die Notwendigkeit, andere Erkrankungen auszuschließen, falls ADMA als Biomarker für psychiatrische Erkrankungen eingesetzt werden soll.

5.3 Folgen aus den Ergebnissen der ADMA-Bestimmungen

Aus den erhöhten Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen ergeben sich möglicherweise neue Ansatzpunkte für Diagnose, Therapiemonitoring und Therapie dieser Erkrankungen.

5.3.1 Folgen für die Diagnostik

Da sich bisher kein Biomarker für psychische Erkrankungen etabliert hat, erfolgt deren Diagnose derzeit fast ausschließlich anhand klinischer Gesichtspunkte.

Einige Mediatoren wurden bereits als mögliche Biomarker für psychiatrische Krankheiten diskutiert:

- Brain derived neurotrophic factor (BDNF), erniedrigte Konzentration (Fernandes et al., 2014)
- Interleukine IL-4, IL-6, erhöhte Konzentration (Yuan et al., 2019)
- TNF α , erhöhte Konzentration (Munkholm et al., 2013)

Alle hier genannten Mediatoren sind allerdings sehr unspezifisch, da sie auch bei vielen weiteren Erkrankungen wie z. B. Entzündungen in veränderter Konzentration auftreten. Daher sind sie für den Einsatz als Biomarker für psychiatrische Erkrankungen eher ungeeignet.

Die Serumkonzentration von ADMA ist bei allen hier untersuchten psychiatrischen Erkrankungen im Vergleich zu Gesunden erhöht. Allerdings tritt ADMA auch bei anderen pathologischen Zuständen in erhöhter Konzentration auf, z. B.

kardiovaskuläre Erkrankungen, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus. ADMA scheint dennoch spezifischer zu sein als die oben erwähnten Substanzen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kann ADMA möglicherweise als Biomarker die Diagnostik folgender Erkrankungen unterstützen:

- Schizophrenie
- Schizoaffective Störung
- Bipolare Störung
- Depression

Dabei müssen allerdings als wichtige Voraussetzung weitere Erkrankungen, welche die ADMA-Konzentration erhöhen können, ausgeschlossen werden, z. B. Hypertonie, Diabetes mellitus, Atherosklerose, Niereninsuffizienz.

Dennoch sollte die klinische Beurteilung der wichtigste Gesichtspunkt für die Diagnose einer dieser psychiatrischen Erkrankungen bleiben. Die Bestimmung der ADMA-Konzentration im Serum kann diese lediglich unterstützen.

5.3.2 Folgen für das Therapiemonitoring psychischer Erkrankungen

Während Zincir et al. publizierten, dass die ADMA-Werte bei Schizophrenie-Patient/-innen unter Therapie gesunken sind (Zincir et al., 2014), kamen andere Studien zu dem Ergebnis, dass sich die ADMA-Konzentrationen unter Pharmakotherapie nicht veränderten (Baranyi et al., 2015).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und der ADMA-Konzentration besteht:

Die Serumkonzentration von ADMA unterschieden sich nicht signifikant zwischen verschiedenen Schweregraden der Erkrankung, die auf den Anforderungsbögen markiert wurden. Außerdem war kein signifikanter Unterschied zwischen Personen, die unter Therapie besser wurden, und Personen, die unter Therapie nicht besser wurden, feststellbar.

Aufgrund dieser Zusammenhänge kann die Quantifizierung von ADMA die Kontrolle des Therapieverlaufes vermutlich nicht unterstützen.

ADMA ist damit allenfalls als Biomarker für die Diagnostik psychiatrischer Erkrankungen einsetzbar, nicht aber als Biomarker für deren Therapie-Monitoring.

5.3.3 Folgen für die Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen

Obwohl der Medizin neben psychotherapeutischen Methoden viele bewährte Arzneistoffe für die Behandlung psychischer Krankheiten zur Verfügung stehen, treten immer wieder Fälle auf, wo Patient/-innen nur unzureichend auf diese psychologischen und medikamentösen Therapien ansprechen. Daher sind immer wieder neue Therapiemethoden gefragt, um diesen Personen helfen zu können.

Die bei psychischen Erkrankungen erhöhten ADMA-Werte sprechen für eine Beteiligung von ADMA an der Pathophysiologie dieser Erkrankungen. Dadurch ergeben sich möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Pharmakotherapie psychiatrischer Krankheiten.

5.3.3.1 Einsatz von L-Arginin?

Da ADMA alle Isoformen der NOS kompetitiv hemmt, führen erhöhte ADMA-Konzentrationen zu einem verminderten NO-Angebot. Daher wäre ein denkbarer Therapie-Ansatz, Patient/-innen das NOS-Substrat L-Arginin zu verabreichen. Dabei handelt es sich um eine proteinogene Aminosäure, die beispielsweise in Nüssen, Erbsen oder Fleisch natürlicherweise vorkommt. Auch der Einsatz als Nahrungsergänzungsmittel wäre denkbar. Aufgrund einer dadurch erhöhten Konzentration von L-Arginin wäre es möglich, ADMA aus dem aktiven Zentrum der NOS zu verdrängen, was vermutlich zu höheren Konzentrationen von NO führen wird.

Eine Meta-Analyse lieferte bereits Evidenz, dass eine Supplementierung von L-Arginin den systolischen und diastolischen Blutdruck signifikant senkt (Dong et al., 2011). Da auch bei Patient/-innen mit Hypertonie erhöhte ADMA-Konzentration festgestellt wurden (Surdacki et al., 1999), ist dieser positive Effekt von L-Arginin auf den Blutdruck vermutlich durch eine Verdrängung von ADMA aus dem aktiven Zentrum der NOS erklärbar. Eine L-Arginin-Supplementierung könnte ebenso zu einer Verbesserung von Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen führen, indem durch ein höheres NO-Angebot die Freisetzung von Neurotransmittern positiv beeinflusst wird.

5.3.3.2 Erhöhung der Aktivität der DDAH?

Der Haupteliminationsweg von ADMA ist vermutlich dessen Abbau durch das Enzym DDAH. Daher liegt die Hauptursache für erhöhte ADMA-Konzentrationen wahrscheinlich in einer verminderten Funktion der DDAH.

Einige Inhibitoren dieses Enzymes wurden bereits in der Fachliteratur beschrieben:

- NO (erwünschtes negatives Feedback) (Hulin et al., 2019)
- L-Citrullin (Leiper and Nandi, 2011)
- L-Homocystein, S-Nitroso-L-homocystein (Leiper and Nandi, 2011)
- Zn^{2+} -Ionen (Leiper and Nandi, 2011)
- TNF α (Tran et al., 2003)
- Oxidiertes LDL (Entstehung durch oxidativen Stress) (Selley, 2004)
- 4-Hydroxynonenal (4-HNE, Entstehung durch oxidativen Stress) (Selley, 2004)

Eine Erhöhung der Aktivität der DDAH ist ein weiterer denkbarer Ansatz für die Behandlung psychiatrischer Erkrankungen.

Bisher wurden diverse Substanzen beschrieben, die in der Lage sind, die DDAH-Aktivität zu erhöhen:

- **All-trans-retinoinsäure, Pioglitazon, Nebivolol:** bei Einsatz dieser Arzneistoffe wurde in Experimenten eine Erhöhung der DDAH2-Expression beobachtet.
- **Fenofibrat, Probucol, Epigallocatechingallat (aus grünem Tee), Pravastatin:** eine durch oxidativen Stress im Zusammenhang mit oxidiertem LDL und AGE (Advanced Glycosylation Endproduct) verursachte Inhibition der DDAH wurde durch diese Substanzen wieder rückgängig gemacht.
- **Acetylsalicylsäure (in niedriger Dosierung):** auch durch deren Einsatz wurde eine Erhöhung der DDAH-Aktivität beobachtet.

(Leiper and Nandi, 2011)

Durch eine Erhöhung der Aktivität der DDAH mithilfe der genannten Substanzen wäre es möglich, durch einen beschleunigten Abbau von ADMA dessen Konzentration zu erniedrigen und somit das Angebot an NO zu erhöhen.

Abb. 25 zeigt den Zusammenhang zwischen ADMA, DDAH, NO und verschiedenen Neurotransmittern, die bei der Pathophysiologie psychischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Außerdem sind neben den Angriffspunkten wichtiger etablierter Psychopharmaka auch die beschriebenen DDAH-Aktivatoren dargestellt.

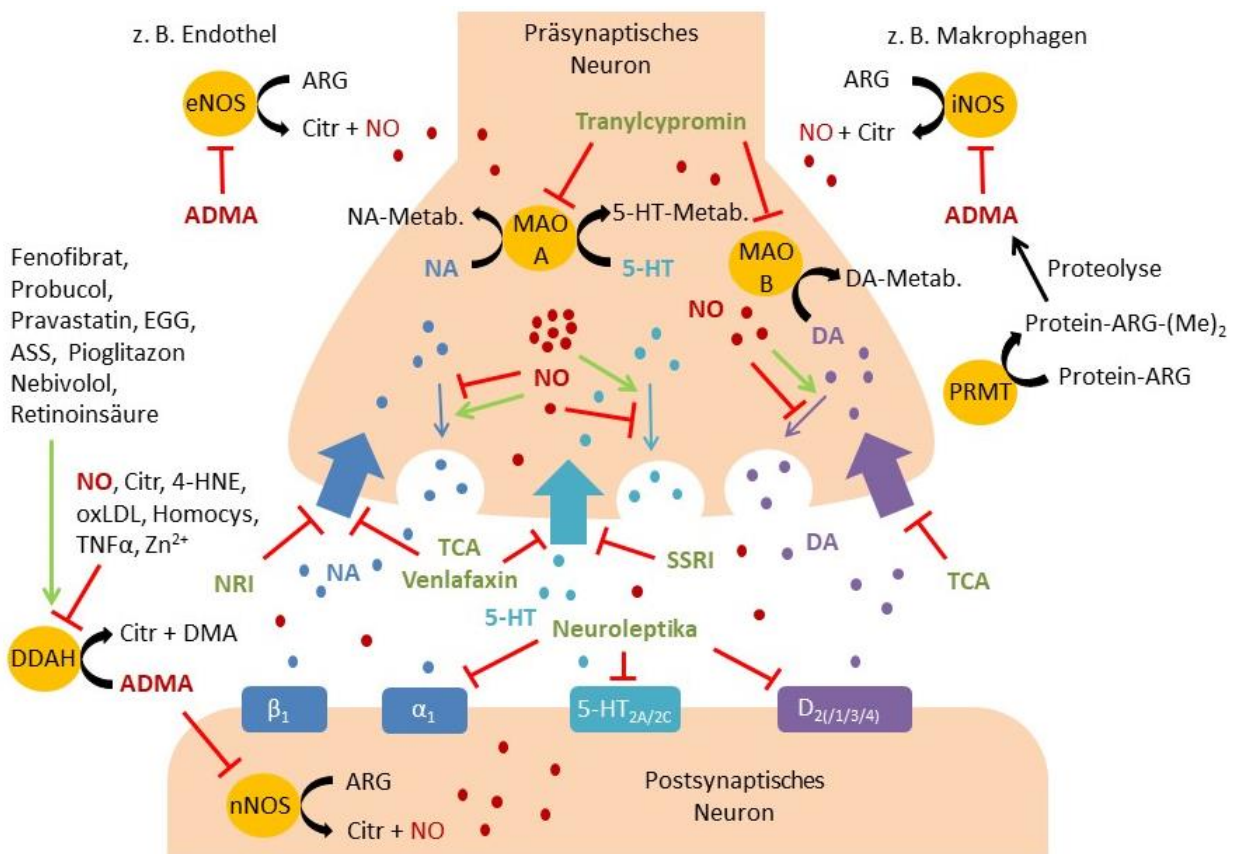


Abb. 25: Einflussnahme von ADMA, Psychopharmaka sowie Aktivatoren und Inhibitoren der DDAH auf die Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA):

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) entsteht durch Methylierung von proteingebundenem Arginin mittels Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) und anschließende Proteolyse. Die Elimination erfolgt hauptsächlich durch Dimethylargininasen (DDAH). Im linken Bereich ist die Rolle der beschriebenen DDAH-Aktivatoren und DDAH-Inhibitoren dargestellt. NO, L-Citrullin (Citr), 4-Hydroxynonenal (4-HNE), oxidiertes LDL (oxLDL), L-Homocystein, TNFα sowie Zn²⁺-Ionen hemmen die DDAH und damit den Metabolismus von ADMA zu L-Citrullin (Citr) und Dimethylamin (DMA). Epigallocatechingallat (EGG), Acetylsalicylsäure (ASS) und andere Arzneistoffe erhöhen die Aktivität von DDAH und damit den Abbau von ADMA. NO fördert in großen Mengen die Freisetzung von 5-HT und hemmt in kleinen Mengen dessen Freisetzung. NO besitzt sowohl hemmende als auch induzierende Effekte auf die Freisetzung von NA und DA, wobei die genauen Mechanismen bisher ungeklärt sind. ADMA inhibiert alle Isoformen der NOS und beeinflusst dadurch die Freisetzung von NA, 5-HT und DA. So könnte ADMA die Entstehung bzw. den Verlauf psychischer Erkrankungen beeinflussen. Psychopharmaka beeinflussen den Verlauf dieser Erkrankungen durch Rezeptorblockade, Hemmung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern oder Hemmung der Monoaminoxidasen (MAO) (Prast and Philippu, 2001; Leiper and Nandi, 2011).

Über die genannten Substanzen hinaus könnten in Zukunft möglicherweise noch zusätzliche DDAH-Induktoren entwickelt werden. Es sind noch weitere Studien notwendig, bevor DDAH-Aktivatoren gezielt zur Therapie von Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt werden können. Jedoch könnten diese in Zukunft wichtige therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung therapieresistenter Patient/-innen darstellen.

6. Zusammenfassung

- 1) In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode mit einer zeitsparenden Probenvorbereitung zur quantitativen Erfassung von ADMA in humanem Serum entwickelt. Die Festphasenextraktion wird an dem starken Kationenaustauschpolymer Oasis® MCX (Waters) unter Verwendung eines Elutionsmittels bestehend aus 0,4g Kaliumchlorid, 5,96ml Wasser, 0,04ml 5M Kaliumhydroxid-Lösung und 4ml Methanol durchgeführt. Dazu werden die SPE-Säulen zunächst mit dem Elutionsmittel präkonditioniert und anschließend mit Wasser equilibriert. Eine zu analysierende Serumprobe wird mit dem internen Standard MEA und Wasser versetzt, bevor die SPE-Säulen damit beladen werden. Nachdem die Säulen mit 0,1M Salzsäure und Methanol gewaschen wurden, erfolgt die Elution mit dem entwickelten Elutionsmittel. Anschließend wird mit OPA und MPA derivatisiert. Für die HPLC-Analytik wird die Säule Kinetex® EVO C18 2,6µm 150x4,6 100A (Phenomenex) geschützt durch die Vorsäule SecurityGuard® Ultra cartridge for EVO-C18 (Phenomenex) verwendet. Als Fließmittel wird ein Kaliumphosphatpuffer 25mM pH6,5, welcher 9,7% Acetonitril (V/V) enthält, eingesetzt. Es werden 5µl der derivatisierten Probe injiziert und bei einem Flow von 1ml/min und einer Säulenoftemperatur von 40°C 13min isokratisch getrennt. Die Detektion erfolgt fluorimetrisch. Vor der nächsten Injektion wird die Säule gewaschen und equilibriert. Die externen Standards werden in gleicher Weise aufbereitet und analysiert wie die Serumproben. Bei der Zusammensetzung des Elutionsmittels für die SPE wurde Ammoniak durch Kaliumhydroxid-Lösung und Kaliumchlorid ersetzt. Da das Elutionsmittel somit keine Bestandteile enthält, welche die Derivatisierung und HPLC-Analytik stören, ist ein Abdampfen nach dem SPE-Verfahren nicht notwendig, sodass Zeit, Energie und Kosten eingespart werden können.
- 2) Es wurden Extraktionsausbeuten von 93,4% für ADMA und 92,8% für MEA und damit eine relative Extraktionsausbeute von 101% ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden zur Ermittlung der Linearität im Bereich von 25ng/ml (LOQ) bis 800ng/ml beträgt $R^2 = 0,9999$. Der Bias beträgt 12,0% am LOQ und 5,61% bei einer Konzentration von 50ng/ml. Bei allen höheren Konzentrationen liegt er unter 3,0%. Die Ermittlung der Präzision ergab $CV_{\text{intra-assay}} = 2,1\%$ und $CV_{\text{inter-assay}} = 3,1\%$ für niedrige ADMA-Konzentration und $CV_{\text{intra-assay}} = 1,9\%$ und $CV_{\text{inter-assay}} = 2,8\%$ für hohe ADMA-Konzentrationen. Der Matrixeffekt ist mit einem Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden von $R^2_{\text{Matrix}} = 0,9978$ vernachlässigbar. Die Methode erfüllt alle gestellten Anforderungen an Extraktionsausbeute, Linearität, Richtigkeit, Präzision und Matrixeffekt. Durch ihre Anwendung lässt sich zuverlässig die ADMA-Konzentration im Serum ermitteln. Somit ist die entwickelte Methode valide.

- 3) Unter Verwendung dieser Methode wurde im Serum gesunder Personen eine mittlere ADMA-Konzentration von $84.8 \pm 11.9 \text{ ng/ml} = 0.419 \pm 0.059 \text{ }\mu\text{M}$ ($n=16$) gemessen. Obwohl sich die bisher publizierten ADMA-Konzentrationen bei Gesunden teilweise stark unterscheiden, kamen einige frühere Studien zu einem dieser Arbeit sehr ähnlichen Ergebnis. Da verschiedene analytische Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, sollten Vergleiche der ADMA-Konzentrationen immer mit derselben Methode durchgeführt werden.
- 4) Die mit der entwickelten Methode gemessenen Serumkonzentrationen von ADMA sind bei Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöht. ADMA ist somit vermutlich an der Pathophysiologie psychiatrischer Erkrankungen beteiligt.
- 5) Sowohl bei den Gesunden als auch bei den psychisch Erkrankten existiert keine Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und dem Personenalter. Die Serumkonzentration von ADMA nimmt mit höherem Probandenalter nicht zu.
- 6) Bei der Kontrollgruppe sowie bei Patient/-innen mit psychiatrischen Erkrankungen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen und Männern in den ADMA-Konzentrationen feststellbar. ADMA ist vermutlich gleichermaßen bei Frauen und Männern an der Pathophysiologie dieser Erkrankungen beteiligt
- 7) Die ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen mit verschiedenen Schweregraden einer psychiatrischen Erkrankung unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Somit ist die Quantifizierung von ADMA vermutlich nicht für das Therapie-Monitoring psychiatrischer Erkrankungen geeignet.
- 8) Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Patient/-innen, die sich während der Therapie verbesserten, und Patient/-innen, die sich während der Therapie nicht verbesserten, feststellbar. Auch aus diesem Grund eignet sich ADMA vermutlich nicht, um den Therapieverlauf einer psychischen Erkrankung zu überwachen.
- 9) Die ADMA-Konzentrationen verschiedener Gruppen unterteilt nach Wirkstoff, dessen Serumkonzentration mindestens 50% der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Somit ist kein Einfluss der Medikation auf die ADMA-Werte erkennbar.
- 10) Die ADMA-Konzentrationen sind jeweils bei Patient/-innen mit Schizophrenie, Depression, Bipolarer Störung und Schizoaffectiver Störung im Vergleich zu

gesunden Personen signifikant erhöht. Aus dieser Tatsache können sich neue Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie der genannten psychiatrischen Erkrankungen ergeben. Die ADMA-Konzentrationen dieser Patientengruppen unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander.

- 11) Die Serumkonzentrationen von ADMA sind bei Personen mit rezidivierender depressiver Störung im Vergleich zu Personen mit einer depressiven Episode signifikant erhöht, was vermutlich durch stärkere pathologische Veränderungen im ADMA-NOS-System bei längerem Krankheitsverlauf bedingt ist.
- 12) Es existieren keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von ADMA zwischen Patient/-innen, die sich in einer manischen, einer depressiven oder einer gemischten Episode einer schizoaffektiven oder bipolaren Störung befinden. Somit ist ADMA vermutlich in ähnlicher Weise an der Pathophysiologie aller dieser Zustände beteiligt.
- 13) Die ADMA-Konzentrationen psychisch Erkrankter unterscheiden sich nicht signifikant von den ADMA-Konzentrationen psychisch und gleichzeitig kardiovaskulär Erkrankter. Die Erhöhung der ADMA-Konzentration kann die gemeinsame Ursache beider Erkrankungen sein.

7. Anhang

7.1 Befunde

Im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit wurden verschiedene klinisch-pharmakologische Befunde angefertigt. Dabei wurden im TDM-Labor quantifizierte Wirkstoffkonzentrationen aufgrund der Angaben auf den Anforderungsscheinen beurteilt und Empfehlungen für den weiteren Verlauf der Pharmakotherapie gegeben. Im Folgenden sind einige Beispiele für diese Befunde aufgeführt.

Laborbefund - ClozapinProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcode Nr.: XXXXXXXXXX

Auftragsnr.:

Kunde:

Telefon:

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Gesamtwert: 268 ng/ml Clozapin: 268 ng/ml Metaboliten: 0 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 250 mg: 119-336 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 350-600 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig		
	passend	X	
	zu hoch		

☒ Verdacht auf langsamen Metabolisierer☒ Verdacht auf Leberinsuffizienz**Stoffwechselwege der Medikation des Patienten**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT 1A4	Pgp	pNAT
Clozapin		X	X		X H	X H	X	X H		X H			
Alkohol		X	X	X				X	X I	X I			
Amisulprid	X												
Aripiprazol								X		X			
Koffein		X H			X	X		X	X	X			X

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 250 mg Clozapin würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 119 und 336 ng/ml erwarten. Clozapin hat mit Alkohol, Aripiprazol und Koffein gemeinsame Stoffwechselwege (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5/6), die durch Koffein gehemmt werden, andererseits jedoch durch Alkohol induziert werden. Aripiprazol ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet. Der resultierende Summeneffekt kann im Einzelfall natürlich sehr stark variieren, im vorliegenden Fall sind die Effekte derzeit (gerade noch) ausgeglichen.

Unklar ist, warum die Clozapinkonzentration jetzt erstmals im dosisbezogenen Referenzbereich liegt. Erstmals wurde uns Alkoholkonsum angegeben, ich kann mir aber nicht vorstellen, dass der Patient jetzt plötzlich Alkohol in Therapie-relevanten Mengen konsumiert? Oder hat der Patient jetzt eine Clozapineinnahme ausgelassen? In den Vorbefunden fanden sich aber nie Hinweise auf Complianceprobleme.

Seit wann sind die Leberenzyme angestiegen? In der Vergangenheit sind alle gemessenen Wirkstoffkonzentrationen (Clozapin, Olanzapin, Risperidon, Aripiprazol, Escitalopram) oberhalb des dosisbezogenen Referenzbereiches gelegen - dies kann seine Ursache in einem langsamen Metabolisiererstatus haben, aber auch in einer reduzierten Leberfunktion.

Als UAW kann eine Leberfunktionsstörung in erster Linie durch Clozapin verursacht werden, aber auch durch Aripiprazol; Amisulprid sollte dieses Problem tatsächlich umgehen, da es fast ausschließlich über die Niere eliminiert wird - es gibt aber auch Leberenzymanstiege unter Amisulprid Monotherapie.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapie-relevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - VenlafaxinProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcode Nr.: XXXXXXXXXXAuftragsnr.: XXXXXXXXXXKunde: XXXXXXXXXXTelefon: XXXXXXXXXX

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Gesamtwert: 232 ng/ml Venlafaxin: 51 ng/ml Metaboliten: 181 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 75 mg: 118-235 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 100-400 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig		
	passend	X	
	zu hoch		

☒ Verdacht auf Arzneimittelinteraktion**Stoffwechselwege der Medikation der Patientin**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5/6	UGT 1A4	Pgp	pNAT
Venlafaxin				X H	X	X	X	X H		X H			
Acetylcystein	X												
Olanzapin		X H			X	X H	X H	X H		X H			
Quetiapin								X		X H			

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 75 mg Venlafaxin würden wir eine Konzentration der Muttersubstanz Venlafaxin zwischen 34 und 70 ng/ml und des aktiven Metaboliten O-Desmethylvenlafaxin zwischen 84 und 165 ng/ml, in Summe also zwischen 118 und 235 ng/ml erwarten. Venlafaxin hat mit Olanzapin und Quetiapin gemeinsame Stoffwechselwege (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5/6), die durch Olanzapin und Quetiapin gehemmt werden. Das Verhältnis von Muttersubstanz (Venlafaxin) zu aktivem Metabolit (O-Desmethylvenlafaxin) von fast 0,3 (normal ca. 0,4) zeigt keine Hemmung der Umwandlung der Muttersubstanz in den aktiven Metaboliten an, sondern spricht für eine eventuelle Ausscheidungshemmung des Metaboliten, die aber zur Zeit klinisch nicht relevant ist.

Da die Konzentration im therapeutischen Referenzbereiches liegt, die Patientin deutlich krank ist und keine UAW zeigt, besteht aus labormedizinischer Sicht im Prinzip die Möglichkeit, die Dosierung noch etwas zu steigern.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - CitalopramProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcodenr.: XXXXXXXXXXAuftragsnr.: XXXXXXXXXXKunde: XXXXXXXXXXTelefon: XXXXXXXXXX

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Wert: 16 ng/ml**Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 30 mg: 31-45 ng/ml****Therapeutischer Referenzbereich: 50-110 ng/ml**

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig	X	
	passend		
	zu hoch		

☒ Verdacht auf niedrige Konzentration durch Rauchen**Stoffwechselwege der Medikation der Patientin**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5	UGT	Pgp	NAT
Citalopram		X H		X H			X H	X H		X		X	
Rauchen		X I								I			

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 30 mg Citalopram würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 31 und 45 ng/ml erwarten. Citalopram hat mit Tabak gemeinsame Stoffwechselwege (CYP1A2), die durch Tabak induziert werden.

Da die Konzentration noch unterhalb des therapeutischen Bereichs liegt, die Patientin deutlich krank ist, ihr Zustand unter der angegebenen Medikation gleich blieb und die Patientin keine UAW zeigt, besteht aus labormedizinischer Sicht im Prinzip die Möglichkeit, die Dosierung noch etwas zu steigern. Beachten Sie bitte bei eventuellen Dosisänderungen, dass die Patientin unter dem angegebenen Genussmittel eine flachere Dosis-/Konzentrationsbeziehung zeigt, der Anstieg der Wirkstoffkonzentration wird also schwächer ausfallen. Beachten Sie bitte auch, dass jede Änderung des Rauchverhaltens deutliche Änderungen der Wirkstoffkonzentration zur Folge haben kann.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - QuetiapinProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcode Nr.: XXXXXXXXXXAuftragsnr.: XXXXXXXXXXKunde: XXXXXXXXXXTelefon: XXXXXXXXXX

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Wert: 34 ng/ml**Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 400 mg: 115-242 ng/ml****Therapeutischer Referenzbereich: 100-500 ng/ml**

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig	X	
	passend		
	zu hoch		

☒ Verdacht auf Complianceprobleme**Stoffwechselwege der Medikation der Patientin**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5	UGT	Pgp	NAT
Quetiapin								X		X H	H		
Acetylsalicylsäure	X				X	X	I				X		X
Kaliumiodid													
Koffein		X H	X		X	X		X	X	X			X
Levothyroxin										I		X I	
Olanzapin		X	X		X			X		X H	X	X	
Venlafaxin				X H	X	X	X	X H		X H		X	

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 400 mg Quetiapin würden wir eine im Tagesverlauf mittlere Wirkstoffkonzentration zwischen 115 und 242 ng/ml erwarten. Quetiapin hat mit Koffein, Olanzapin und Venlafaxin gemeinsame Stoffwechselwege (CYP2D6, CYP3A4/5), die durch Olanzapin und Venlafaxin gehemmt werden, andererseits jedoch durch Levothyroxin induziert werden. Koffein ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet.

Der Induktionseffekt durch Levothyroxin auf das Cytochrom-P450-Isoenzym 3A4 ist zwar literaturbelegt, ich sehe beim Befunden aber nie dramatische Effekte, die ich wirklich auf diesen Induktionseffekt zurückführen könnte.

Die Wirkstoffkonzentration müsste wegen der hemmenden Effekte sogar eigentlich für die verordnete Dosis zu hoch sein. Daher vermute ich, dass die verordnete Dosis nicht vollständig bzw. nicht regelmäßig eingenommen wird (Ausschlussdiagnose).

Alternativ dazu kann es sich auch um einen schnellen Metabolisierer handeln.

Sollte wirklich ein Complianceproblem vorliegen, sind Empfehlungen zur Anpassung der Dosis sehr problematisch.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - ClozapinProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcode Nr.: XXXXXXXXXX

Auftragsnr.:

Kunde:

Telefon:

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Gesamtwert: 501 ng/ml Clozapin: 501 ng/ml Metaboliten: 0 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 275 mg: 234-419 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 350-600 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig		
	passend		
	zu hoch	X	

☒ Verdacht auf Arzneimittelinteraktion**Stoffwechselwege der Medikation der Patientin**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5	UGT	Pgp	NAT
Clozapin		X	X		X H	X H	X	X H		X H		X	
Chlorprothixen		X	X	X	X	X	X	X H	X	X	X		
Kaliumiodid													
Koffein		X H	X		X	X		X	X	X			X
Levothyroxin										I		X I	
Lorazepam											X H		
Rauchen		X I								I			
Valsartan					X H	X H							

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 275 mg Clozapin würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 234 und 419 ng/ml erwarten. Clozapin hat mit Chlorprothixen, Koffein, Levothyroxin, Tabak und Valsartan gemeinsame Stoffwechselwege (Pgp, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5), die durch Chlorprothixen, Koffein und Valsartan gehemmt werden, andererseits jedoch durch Levothyroxin und Tabak induziert werden.

Der resultierende Summeneffekt kann im Einzelfall natürlich sehr stark variieren. Wir führen die in Bezug zur applizierten Dosis zu hohe Wirkstoffkonzentration im vorliegenden Fall auf ein Überwiegen der Enzymhemmung zurück.

Meines Erachtens ist die Patientin compliant.

Anzeichen für einen ungewöhnlichen Metabolisierungsstatus sehe ich derzeit nicht.

Da die Konzentration im therapeutischen Bereich liegt, die Patientin schwer krank ist, ihr Zustand unter der angegebenen Medikation etwas besser wurde und die Patientin keine UAW zeigt, sehe ich keinen labormedizinischen Grund, derzeit an der Medikation etwas zu ändern.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - OlanzapinProbe Nr.: XXXXXXXXXX

Name:

Ihre Fall-/Barcode Nr.: XXXXXXXXXXAuftragsnr.: XXXXXXXXXXKunde: XXXXXXXXXXTelefon: XXXXXXXXXX

Abnahme

Eingang

Bestimmung

Befundung

Ausgang

Gesamtwert: 27 ng/ml Olanzapin: 27 ng/ml Metaboliten: 0 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 10 mg: 9-24 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich: 20-80 ng/ml

Dosisbezogener Referenzbereich	Therapeutischer Referenzbereich		
	zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig		
	passend		
	zu hoch	X	

☒ Verdacht auf Arzneimittelinteraktion**Stoffwechselwege der Medikation des Patienten**

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5	UGT	Pgp	NAT
Venlafaxin				X H	X	X	X	X H		X H		X	
Amisulprid	X												
Apixaban	X	X			X	X	X H			X	X	X	
Koffein		X H	X		X	X		X	X	X			X
Lactulose													
Lorazepam											X H		
Olanzapin		X	X		X			X		X H	X	X	

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 10 mg Olanzapin würden wir eine Wirkstoffkonzentration zwischen 9 und 24 ng/ml erwarten. Olanzapin hat mit Apixaban, Koffein, Lorazepam und Venlafaxin gemeinsame Stoffwechselwege (UGT, Pgp, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4/5), die durch Koffein, Lorazepam und Venlafaxin gehemmt werden. Apixaban ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet.

Da die Konzentration im therapeutischen Bereich liegt, der Patient deutlich krank ist, sein Zustand unter der angegebenen Medikation etwas besser wurde und der Patient keine UAW zeigt, kann aus labormedizinischer Sicht die Dosis noch etwas gesteigert werden, muss aber nicht. Beachten Sie bitte bei eventuellen Dosisänderungen, dass der Patient unter der angegebenen Komedikation eine steilere Dosis-/Konzentrationsbeziehung zeigt, der Anstieg der Wirkstoffkonzentration wird also stärker ausfallen.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

Laborbefund - Quetiapin**Probe Nr.:** [REDACTED]**Name:****Ihre Fall-/Barcode Nr.:** [REDACTED]**Auftragsnr.:** [REDACTED]**Kunde:** [REDACTED]**Telefon:** [REDACTED]**Abnahme****Eingang****Bestimmung****Befundung****Ausgang****Wert:** 385 ng/ml**Dosisbezogener Referenzbereich für eine Tagesdosis von 900 mg:** 258-546 ng/ml**Therapeutischer Referenzbereich:** 100-500 ng/ml

Therapeutischer Referenzbereich

Dosisbezogener Referenzbereich		zu niedrig	passend	zu hoch
	zu niedrig			
	passend		X	
	zu hoch			

Stoffwechselwege der Medikation des Patienten

Wirkstoff	Niere	CYP 1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4/5	UGT	Pgp	NAT
Quetiapin								X		X H	H		
Koffein		X H	X		X	X		X	X	X			X
Lorazepam											X H		
Olanzapin		X	X		X			X		X H	X	X	
Rauchen		X I								I			

X: Substrat, H: Hemmung, I: Induktion

Klinisch-Pharmakologischer Befund

Bei einer Tagesdosis von 900 mg Quetiapin würden wir eine im Tagesverlauf mittlere Wirkstoffkonzentration zwischen 258 und 546 ng/ml erwarten. Quetiapin hat mit Koffein und Olanzapin gemeinsame Stoffwechselwege (CYP2D6, CYP3A4/5), die durch Olanzapin gehemmt werden, andererseits jedoch durch Tabak induziert werden. Koffein ist lediglich als Substrat der Stoffwechselwege verzeichnet.

Der resultierende Summeneffekt kann im Einzelfall natürlich sehr stark variieren, im vorliegenden Fall sind die Effekte derzeit ausgeglichen.

Da die Konzentration im therapeutischen Bereich liegt, der Patient schwer krank ist, sein Zustand unter der angegebenen Medikation etwas besser wurde und der Patient keine UAW zeigt, sehe ich keinen labormedizinischen Grund, derzeit an der Medikation etwas zu ändern.

Befundung durch Daniel Braun, Nähere Infos: Tel.: 0941/943-4766 oder Fax.: 0941/943-5832. Die Informationen und Empfehlungen dieses Befundes setzen Vollständigkeit und Richtigkeit der vom Einsender gemachten Angaben voraus. Die dem Befund zu Grunde liegenden pharmakologischen Datenbanken wurden nach bestem Wissen aus der Fachliteratur zusammengestellt, sie werden regelmäßig überprüft, aktualisiert und elektronisch verarbeitet. Dennoch können Irrtümer nicht völlig ausgeschlossen werden. Besonders vor therapierelevanten Entscheidungen sollte der Benutzer stets selbst noch einmal überdenken, ob die Informationen dem aktuellen Erkenntnisstand entsprechen und die Empfehlungen zum klinischen Bild des Patienten passen.

7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

4-HNE	4-Hydroxynonenal
5-HT	Serotonin
5-SSA	5-Sulfosalicylsäure
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGATE	Arbeitsgemeinschaft Arzneimitteltherapie bei Psychiatrischen Erkrankungen
ARG	L-Arginin
c(ADMA)	Konzentration von ADMA
Citr	Citrullin
CV	Coefficient of variation (Variationskoeffizient)
DA	Dopamin
DDAH	Dimethylarginindimethylaminohydrolase
DMA	Dimethylamin
EA	Extraktionsausbeute
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (immunologisches Nachweisverfahren)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FM	Fließmittel
GC – MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LC – MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
L-NMMA	Monomethylarginin
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Quantifizierungsgrenze)
M	Mittelwert

ME	2-Mercaptoethanol
MEA	Monoethylarginin
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Fallzahl
NA	Noradrenalin
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase)
NRI	Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer
OPA	o-Phthaldialdehyd
p	Signifikanzniveau
PRMT	Proteinargininmethyltransferase
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TNF α	Tumornekrosefaktor α

7.3 ICD-10-Codes der in dieser Arbeit analysierten Diagnosen

F2X	Schizophrenie oder Schizoaffective Störung
------------	---

F20	Schizophrenie
-----	---------------

F25	Schizoaffective Störung
-----	-------------------------

F3X	Affektive Störungen
------------	----------------------------

F31	Bipolare affektive Störung
-----	----------------------------

F32	Depressive Episode
-----	--------------------

F33	Rezidivierende depressive Störung
-----	-----------------------------------

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chemische Strukturen von L-Arginin und dessen methylierter Derivate	9
Abb. 2: Biosynthese der methylierten Arginin-Derivate	10
Abb. 3: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage	24
Abb. 4: Reaktion der Derivatisierung von ADMA mit dem OPA-Reagenz	33
Abb. 5: Chromatogramme von Serum-Proben, die durch Proteinfällung mit 5-Sulfosalicylsäure aufbereitet wurden	50
Abb. 6: Chromatogramme von Serum-Proben, die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion aufbereitet wurden	51
Abb. 7: Vergleich von Probenaufbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und Probenaufbereitung durch Proteinfällung	52
Abb. 8: Chromatogramm von Poolserum, aufgereinigt durch SPE, Einengen und Wiederaufnehmen des SPE-Eluats	53
Abb. 9: Repräsentatives Chromatogramm einer Serum-Probe, aufgereinigt durch SPE unter Einsatz des entwickelten Elutionsmittels	55
Abb. 10: Repräsentatives Chromatogramm einer wässrigen Lösung, die zur Kalibration verwendet wurde	56
Abb. 11: Regressionsgerade zur Ermittlung der Linearität	59
Abb. 12: Regressionsgerade des Matrixeffektes	62
Abb. 13: gemessene ADMA-Konzentrationen im Serum bei der Kontrollgruppe, bei Patient/-innen mit Schizophrenie oder Schizoaffektiver Störung und bei Patient/-innen mit affektiven Störungen	65
Abb. 14: Chromatogramm der Serum-Probe, die eine ungewöhnlich hohe ADMA-Konzentration von 2892 ng/ml enthält (oben), verglichen mit dem Chromatogramm einer Serumprobe einer Schizophrenie-Patientin mit einer ADMA-Konzentration von 157 ng/ml (unten)	66
Abb. 15: Alter, Geschlecht und gemessene ADMA-Konzentration	67-68
Abb. 16: ADMA-Konzentrationen nach Geschlecht der Probanden	70
Abb. 17: Schweregrad der Erkrankung und ADMA-Konzentration	72

Abb. 18: ADMA-Konzentrationen von gesunden Personen, von Personen, die sich unter Therapie verbesserten, und Personen, die sich unter Therapie nicht verbesserten	74
Abb. 19: ADMA-Konzentrationen von Patient/-innen, unterteilt nach Wirkstoffen, deren Serumkonzentration mindestens die Hälfte der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug	76
Abb. 20: Serumkonzentrationen von ADMA bei Probanden mit verschiedenen Diagnosen	78
Abb. 21: Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit einer depressiven Episode und Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung	80
Abb. 22: ADMA-Konzentrationen von schizoaffektiven oder bipolaren Patient/-innen in Subgruppen unterteilt nach gegenwärtigem Zustand	81
Abb. 23: ADMA-Konzentrationen der Kontrollgruppe, der Personen mit einer psychiatrischen Erkrankung und der Personen, bei denen außer einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen	83
Abb. 24: Einflussnahme von ADMA und Psychopharmaka auf die Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA)	94
Abb. 25: Einflussnahme von ADMA, Psychopharmaka sowie Aktivatoren und Inhibitoren der DDAH auf die Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA)	101

7.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bisher publizierte Arbeiten über ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Schizophrenie	14
Tab. 2: Bisher publizierte Arbeiten über ADMA-Konzentrationen bei Patient/-innen mit Depression	15
Tab. 3: Bisher publizierte Serum- oder Plasmakonzentrationen von ADMA bei gesunden Personen	18-19
Tab. 4: Verwendete Reagenzien und Chemikalien	26
Tab. 5: Verwendete Säulen und Zubehör für SPE und HPLC	26
Tab. 6: Verwendete Laborgeräte	27
Tab. 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tab. 8: Komponenten des chromatographischen Trennsystems	28
Tab. 9: Verwendete Software	29
Tab. 10: Verwendete Fließmittel	30
Tab. 11: Ergebnisse der Ermittlung der Extraktionsausbeuten von ADMA und MEA	57
Tab. 12: Daten zur Ermittlung der Linearität	58
Tab. 13: Ermittlung der Richtigkeit	60
Tab. 14: Ermittlung der Präzision: Gemessene ADMA-Konzentration in einer Serumprobe mit hoher und einer mit niedriger ADMA-Konzentration an sechs verschiedenen Tagen	61
Tab. 15: Ermittlung der Präzision: Berechnete Variationskoeffizienten für die intra-assay-Präzision und die inter-assay-Präzision	61
Tab. 16: Ermittlung des Matrixeffektes	62
Tab. 17: Eigenschaften des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe	63
Tab. 18: Serumkonzentrationen von ADMA in allen Gruppen	64
Tab. 19: Korrelationskoeffizienten r und Signifikanzniveaus p für die Analyse der Spearman-Rho-Korrelation zwischen der ADMA-Konzentration und dem Probandenalter in allen drei Gruppen	69

Tab. 20: Geschlecht der Probanden und ADMA-Konzentrationen	69
Tab. 21: Angewandter statistischer Test und Ergebnis für den Vergleich der ADMA-Konzentrationen von Frauen und Männern in allen drei Gruppen	70
Tab. 22: ADMA-Konzentration und Zustand der Erkrankten	71
Tab. 23: ADMA-Konzentration und klinische Veränderung der Patient/-innen unter Therapie	73
Tab. 24: Gemessene Serumkonzentrationen von ADMA in Gruppen nach Arzneistoff, dessen Serumkonzentration mindestens 50% der unteren Grenze des Therapeutischen Referenzbereiches betrug	75
Tab. 25: Gemessene Serumkonzentrationen von ADMA in Gruppen nach Diagnose	77
Tab. 26: Testergebnisse aller paarweisen Vergleiche der Patientengruppen unterteilt nach Diagnose	79
Tab. 27: Gemessene ADMA-Werte von Patient/-innen mit einer depressiven Episode und von Patient/-innen mit rezidivierender depressiver Störung	79
Tab. 28: Serumkonzentrationen von ADMA bei Patient/-innen mit Schizoaffectiver oder Bipolarer Störung unterteilt nach gegenwärtigem Zustand	81
Tab. 29: ADMA-Konzentrationen der Kontrollgruppe, der Personen mit einer psychiatrischen Erkrankung und der Personen, bei denen zusätzlich zu einer psychiatrischen Erkrankung noch kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegen, welche die ADMA-Konzentration erhöhen können	82
Tab. 30: Isoelektrischer Punkt ausgewählter Aminosäuren	85

7.6 Posterpräsentationen

Während der Entstehung dieser Dissertation fanden folgende Posterbeiträge auf Kongressen statt:

- Braun D., Stegmann B., Haen E. (2016): TDM of psychotropic drugs in body fluids; XII. Symposium der AGNP, Therapeutisches Drug Monitoring in der Psychiatrie, Bremen, 01.-03.06.2016
- Braun D., Schlossmann J., Haen E. (2017): Asymmetrisches Dimethylarginin bei psychiatrischen Erkrankungen; WPA XVII world congress of psychiatry, Berlin, 08.-12.10.2017
- Braun D., Schlossmann J., Haen E. (2018): Asymmetric dimethylarginine in psychiatric disorders; XIII. AGNP-TDM Symposium, Therapeutisches Drug Monitoring von Neuropsychopharmaka in der ärztlichen Praxis, Alpbach, Österreich, 13.-15.06.2018
- Braun D., Schlossmann J., Haen E. (2018): Quantifizierung von Asymmetrischem Dimethylarginin im Serum bei psychiatrischen Erkrankungen; DGPPN Kongress, Berlin, 28.11.-01.12.2018

7.7 Publikationen

Im Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

- Braun D., Stegmann B., Haen E. (2016): TDM of psychotropic drugs in body fluids; Pharmacopsychiatry 49(03); DOI: 10.1055/s-0036-1582045; Abstract zu einer Posterpräsentation (Braun et al., 2016)
- Braun D., Schlossmann J., Haen E. (2018): Asymmetric dimethylarginine in psychiatric disorders; Pharmacopsychiatry 51(03): 109; DOI: 10.1055/s-0038-1649527; Abstract zu einer Posterpräsentation (Braun et al., 2018)
- Klein H., Haen E. (2018): Pharmakogenetik und Therapeutisches Drug Monitoring; De Gruyter; Braun D., Haen E.: Kapitel 1.7.4 Wirkstoffkonzentrationsbestimmungen in Körperflüssigkeiten (Klein and Haen, 2018)
- Braun D., Schlossmann J., Haen E., 2020. An innovative, time- and cost-saving method for the quantification of asymmetric dimethylarginine in serum by high-performance liquid chromatography without evaporation. Separation science plus 17 (3), 571–577. 10.1002/sscp.202000082. (Braun et al., 2020)
- Braun D., Schlossmann J., Haen E., 2021. Asymmetric dimethylarginine in psychiatric disorders; Psychiatry research 229 (11), 113901. 10.1016/j.psychres.2021.113901. (Braun et al., 2021)

8. Referenzen

- Abbasi, F., Asagmi, T., Cooke, J.P., Lamendola, C., McLaughlin, T., Reaven, G.M., Stuehlinger, M., Tsao, P.S., 2001. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology* 88 (10), 1201–1203. 10.1016/s0002-9149(01)02063-x.
- Albsmeier, J., Schwedhelm, E., Schulze, F., Kastner, M., Böger, R.H., 2004. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 809 (1), 59–65. 10.1016/j.jchromb.2004.06.008.
- Ali-Sisto, T., Tolmunen, T., Viinamäki, H., Mäntyselkä, P., Valkonen-Korhonen, M., Koivumaa-Honkanen, H., Honkalampi, K., Ruusunen, A., Nandania, J., Velagapudi, V., Lehto, S.M., 2018. Global arginine bioavailability ratio is decreased in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders* 229, 145–151. 10.1016/j.jad.2017.12.030.
- Anderstam, B., Katzarski, K., Bergström, J., 1997. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 8 (9), 1437–1442.
- Bae, S.W., Stühlinger, 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., 2005. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *The American journal of cardiology* 95 (6), 729–733. 10.1016/j.amjcard.2004.11.023.
- Baranyi, A., Amouzadeh-Ghadikolai, O., Rothenhäusler, H.-B., Theokas, S., Robier, C., Baranyi, M., Koppitz, M., Reicht, G., Hlade, P., Meinitzer, A., 2015. Nitric Oxide-Related Biological Pathways in Patients with Major Depression. *PloS one* 10 (11), e0143397. 10.1371/journal.pone.0143397.
- Blackwell, S., O'Reilly, D.S.J., Talwar, D.K., 2009. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 401 (1-2), 14–19. 10.1016/j.cca.2008.10.032.
- Boger, R.H., Bode-Boger, S.M., Szuba, A., Tsao, P.S., Chan, J.R., Tangphao, O., Blaschke, T.F., Cooke, J.P., 1998. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction : Its Role in Hypercholesterolemia. *Circulation* 98 (18), 1842–1847. 10.1161/01.CIR.98.18.1842.
- Böger, R.H., 2005. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: Insights from prospective clinical trials. *Vascular medicine (London, England)* 10 Suppl 1, S19-25. 10.1177/1358836X0501000104.
- Böger, R.H., Lentz, S.R., Bode-Böger, S.M., Knapp, H.R., Haynes, W.G., 2001. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clinical science (London, England : 1979)* 100 (2), 161–167.
- Braun, D., Schlossmann, J., Haen, E., 2018. Asymmetric dimethylarginine in psychiatric disorders, in: XIIIth Symposium of the Task Force Therapeutic Drug Monitoring of the AGNP. XIIIth Symposium of the Task Force Therapeutic Drug Monitoring of the AGNP, Alpbach, Austria. 13.06.2018 - 15.06.2018. Georg Thieme Verlag KG.

- Braun, D., Schlossmann, J., Haen, E., 2020. An innovative, time- and cost-saving method for the quantification of asymmetric dimethylarginine in serum by high-performance liquid chromatography without evaporation. *Sep Sci plus* 17 (3), 571–577. 10.1002/sscp.202000082.
- Braun, D., Schlossmann, J., Haen, E., 2021. Asymmetric dimethylarginine in psychiatric disorders. *Psychiatry research* 229 (11), 113901. 10.1016/j.psychres.2021.113901.
- Braun, D., Stegmann, B., Haen, E., 2016. TDM of psychotropic drugs in body fluids. *Pharmacopsychiatry* 49 (03). 10.1055/s-0036-1582045.
- Cakir, E., Ozcan, O., Yaman, H., Akgul, E.O., Bilgi, C., Erbil, M.K., Yesilova, Z., 2005. Elevated plasma concentration of asymmetric dimethylarginine that is reduced by single dose testosterone administration in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (3), 1651–1654. 10.1210/jc.2004-2045.
- Celik, C., Cayci, T., Ozdemir, B., Akgul, E.O., Zincir, S., Balikci, A., Uzun, O., Yaman, H., 2011. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations in patients with first and multiple episode schizophrenia. *Psychiatry research* 190 (2-3), 177–180. 10.1016/j.psychres.2011.06.003.
- Chen, B.-M., Xia, L.-W., Zhao, R.-Q., 1997. Determination of NG,NG-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692 (2), 467–471. 10.1016/S0378-4347(96)00531-2.
- Das, I., Khan, N.S., Puri, B.K., Hirsch, S.R., 1996. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neuroscience Letters* 215 (3), 209–211. 10.1016/0304-3940(96)12972-4.
- Dominik, A., Steinhilber, D., 2002. *Instrumentelle Analytik: Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten ; mit 62 Tabellen*, 2nd ed. Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart.
- Dong, J.-Y., Qin, L.-Q., Zhang, Z., Zhao, Y., Wang, J., Arigoni, F., Zhang, W., 2011. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *American heart journal* 162 (6), 959–965. 10.1016/j.ahj.2011.09.012.
- Dooley, A., Gao, B., Bradley, N., Abraham, D.J., Black, C.M., Jacobs, M., Bruckdorfer, K.R., 2006. Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. *Rheumatology (Oxford, England)* 45 (6), 676–684. 10.1093/rheumatology/kei276.
- Elesber, A.A., Solomon, H., Lennon, R.J., Mathew, V., Prasad, A., Pumper, G., Nelson, R.E., McConnell, J.P., Lerman, L.O., Lerman, A., 2006. Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis. *European heart journal* 27 (7), 824–831. 10.1093/eurheartj/ehi749.
- Faraci, F.M., Brian, J.E., Heistad, D.D., 1995. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *The American journal of physiology* 269 (5 Pt 2), H1522–7. 10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1522.
- Fernandes, B.S., Berk, M., Turck, C.W., Steiner, J., Gonçalves, C.-A., 2014. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. *Molecular psychiatry* 19 (7), 750–751. 10.1038/mp.2013.172.
- Fleck, C., Janz, A., Schweitzer, F., Karge, E., Schwertfeger, M., Stein, G., 2001. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney international. Supplement* 78, S14–8. 10.1046/j.1523-1755.2001.59780014.x.

- Heresztyn, T., Worthley, M.I., Horowitz, J.D., 2004. Determination of L-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 805 (2), 325–329. 10.1016/j.jchromb.2004.03.020.
- Hori, T., Matsubara, T., Ishibashi, T., Ozaki, K., Tsuchida, K., Mezaki, T., Tanaka, T., Nasuno, A., Kubota, K., Nakamura, Y., Yamazoe, M., Aizawa, Y., Nishio, M., 2003. Significance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations during coronary circulation in patients with vasospastic angina. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 67 (4), 305–311. 10.1253/circj.67.305.
- Horowitz, J.D., Heresztyn, T., 2007. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 851 (1-2), 42–50. 10.1016/j.jchromb.2006.09.023.
- Hov, G.G., Sagen, E., Bigonah, A., Asberg, A., 2007. Health-associated reference values for arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) measured with high-performance liquid chromatography. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 67 (8), 868–876. 10.1080/00365510701429836.
- Huang, L.-F., Guo, F.-Q., Liang, Y.-Z., Li, B.-Y., Cheng, B.-M., 2004. Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 380 (4), 643–649. 10.1007/s00216-004-2759-y.
- Hulin, J.-A., Gubareva, E.A., Jarzebska, N., Rodionov, R.N., Mangoni, A.A., Tommasi, S., 2019. Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) Enzymes as an Emerging Therapeutic Strategy to Target Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer. *Frontiers in oncology* 9, 1455. 10.3389/fonc.2019.01455.
- Jorgensen, A., Knorr, U., Soendergaard, M.G., Lykkesfeldt, J., Fink-Jensen, A., Poulsen, H.E., Jorgensen, M.B., Olsen, N.V., Staalsø, J.M., 2015. Asymmetric dimethylarginine in somatically healthy schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics: A case-control study. *BMC psychiatry* 15, 67. 10.1186/s12888-015-0455-4.
- Jud, P., Hafner, F., Verheyen, N., Gary, T., Meinitzer, A., Brodmann, M., Seinost, G., Hackl, G., 2018. Age-dependent effects of homocysteine and dimethylarginines on cardiovascular mortality in claudicant patients with lower extremity arterial disease. *Heart and vessels* 33 (12), 1453–1462. 10.1007/s00380-018-1210-9.
- Kielstein, J.T., Bode-Böger, S.M., Klein, G., Graf, S., Haller, H., Fliser, D., 2003. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *European journal of clinical investigation* 33 (5), 370–375. 10.1046/j.1365-2362.2003.01149.x.
- Kielstein, J.T., Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Schäffer, J., Barbey, M., Koch, K.M., Frölich, J.C., 1999. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 (3), 594–600.
- Kirchherr, H., Kühn-Velten, W.N., 2005. HPLC-tandem mass spectrometric method for rapid quantification of dimethylarginines in human plasma. *Clinical chemistry* 51 (1), 249–252. 10.1373/clinchem.2004.042663.
- Klein, H.-G., Haen, E. (Eds.), 2018. *Pharmakogenetik und Therapeutisches Drug Monitoring: Diagnostische Bausteine für die individualisierte Therapie*. de Gruyter, Berlin, Boston.

- Kölch, M., Rassenhofer, M., Fegert, J.M., 2020. Klinikmanual Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie, 3rd ed.
- Krempl, T.K., Maas, R., Sydow, K., Meinertz, T., Böger, R.H., Kähler, J., 2005. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *European heart journal* 26 (18), 1846–1851. 10.1093/eurheartj/ehi287.
- Leiper, J., Nandi, M., 2011. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nature reviews. Drug discovery* 10 (4), 277–291. 10.1038/nrd3358.
- Liu, H.X., Zhang, R.S., Yao, X.J., Liu, M.C., Hu, Z.D., Fan, B.T., 2004. Prediction of the isoelectric point of an amino acid based on GA-PLS and SVMs. *Journal of chemical information and computer sciences* 44 (1), 161–167. 10.1021/ci034173u.
- Marra, M., Bonfigli, A.R., Testa, R., Testa, I., Gambini, A., Coppa, G., 2003. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Analytical biochemistry* 318 (1), 13–17. 10.1016/S0003-2697(03)00157-X.
- Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2006. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry* 52 (3), 488–493. 10.1373/clinchem.2005.060152.
- Martens-Lobenhoffer, J., Krug, O., Bode-Böger, S.M., 2004. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J. Mass Spectrom.* 39 (11), 1287–1294. 10.1002/jms.684.
- Martens-Lobenhoffer, J., Westphal, S., Awiszus, F., Bode-Böger, S.M., Luley, C., 2005. Determination of asymmetric dimethylarginine: liquid chromatography-mass spectrometry or ELISA? *Clinical chemistry* 51 (11), 2188–2189. 10.1373/clinchem.2005.056788.
- Meinitzer, A., Puchinger, M., Winklhofer-Roob, B.M., Rock, E., Ribalta, J., Roob, J.M., Sundl, I., Halwachs-Baumann, G., März, W., 2007. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 384 (1-2), 141–148. 10.1016/j.cca.2007.07.006.
- Miyazaki, H., Matsuoka, H., Cooke, J.P., Usui, M., Ueda, S., Okuda, S., Imaizumi, T., 1999. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99 (9), 1141–1146. 10.1161/01.cir.99.9.1141.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* 43 (2), 109–142.
- Munkholm, K., Braüner, J.V., Kessing, L.V., Vinberg, M., 2013. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *Journal of psychiatric research* 47 (9), 1119–1133. 10.1016/j.jpsychires.2013.05.018.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (Eds.), 2008. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Ozden, A., Angelos, H., Feyza, A., Elizabeth, W., John, P., 2020. Altered plasma levels of arginine metabolites in depression. *Journal of psychiatric research* 120, 21–28. 10.1016/j.jpsychires.2019.10.004.

- Perticone, F., Sciacqua, A., Maio, R., Perticone, M., Maas, R., Boger, R.H., Tripepi, G., Sesti, G., Zoccali, C., 2005. Asymmetric Dimethylarginine, L-Arginine, and Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 46 (3), 518–523. 10.1016/j.jacc.2005.04.040.
- Pettersson, A., Uggla, L., Backman, V., 1997. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692 (2), 257–262. 10.1016/S0378-4347(96)00525-7.
- Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Shimojo, N., 2000. Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 742 (1), 199–203. 10.1016/S0378-4347(00)00145-6.
- Piletz, J.E., Halaris Angelos, Iqbal Omer, Hoppenstead Debra, Fareed Jawed, Zhu He, Sinacore, J., DeVane, C.L., 2009. Nitric oxide branch of arginine metabolism in depression: effect of venlafaxine. *International Journal of Health Science* 2 (4), 274–281.
- Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology* 64 (1), 51–68. 10.1016/S0301-0082(00)00044-7.
- Pullamsetti, S., Kiss, L., Ghofrani, H.A., Voswinckel, R., Haredza, P., Klepetko, W., Aigner, C., Fink, L., Muiyal, J.P., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., Schermuly, R.T., 2005. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (9), 1175–1177. 10.1096/fj.04-3223fje.
- Rentrop, M., Müller, R., Willner, H., 2020. *Klinikleitfaden Psychiatrie Psychotherapie*, 7th ed.
- Savvidou, M.D., Hingorani, A.D., Tsikas, D., Frölich, J.C., Vallance, P., Nicolaides, K.H., 2003. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet (London, England)* 361 (9368), 1511–1517. 10.1016/S0140-6736(03)13177-7.
- Schulze, F., Maas, R., Freese, R., Schwedhelm, E., Silberhorn, E., Böger, R.H., 2005. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *European journal of clinical investigation* 35 (10), 622–626. 10.1111/j.1365-2362.2005.01561.x.
- Schulze, F., Wesemann, R., Schwedhelm, E., Sydow, K., Albsmeier, J., Cooke, J.P., Böger, R.H., 2004. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 42 (12), 748. 10.1515/CCLM.2004.257.
- Schwedhelm, E., Tan-Andresen, J., Maas, R., Riederer, U., Schulze, F., Böger, R.H., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clinical chemistry* 51 (7), 1268–1271. 10.1373/clinchem.2004.046037.
- Selley, M.L., 2004. Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression. *Journal of Affective Disorders* 80 (2-3), 249–256. 10.1016/S0165-0327(03)00135-6.
- Siroká, R., Trefil, L., Rajdl, D., Racek, J., Rusnáková, H., Cibulka, R., Eiselt, J., Filipovský, J., 2005. Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function—is there a relation? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 43 (10), 1147–1150. 10.1515/CCLM.2005.199.

- Stühlinger, M., 2007. Asymmetrisches Dimethyl Arginin (ADMA): Ein neuer kardiovaskulärer Risikofaktor? *Wiener medizinische Wochenschrift* (1946) 157 (3-4), 57–60. 10.1007/s10354-007-0373-2.
- Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Boeger, R.H., Bode-Boeger, S.M., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., Dubiel, J.S., Froelich, J.C., 1999. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology* 33 (4), 652–658.
- Teerlink, T., 2005. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 43 (10), 1130–1138. 10.1515/CCLM.2005.197.
- Teerlink, T., 2007. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 851 (1-2), 21–29. 10.1016/j.jchromb.2006.07.024.
- Teerlink, T., Nijveldt, R.J., Jong, S. de, van Leeuwen, P.A.M., 2002. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* 303 (2), 131–137. 10.1006/abio.2001.5575.
- Tiryaki, A., Aykut, D., Karaguzel, E., Karahan, S., 2017. Comparison of levels of serum nitric oxide and asymmetric dimethylarginine levels in manic episodes in bipolar affective disorder before and after the treatment. *Anadolu Psikiyatri Derg.* 1. 10.5455/apd.214841.
- Tran, C.T.L., Leiper, J.M., Vallance, P., 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atherosclerosis Supplements* 4 (4), 33–40. 10.1016/S1567-5688(03)00032-1.
- Tsikas, D., Bollenbach, A., Hanff, E., Kayacelebi, A.A., 2018. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): the ADMA, SDMA and hArg paradoxes. *Cardiovascular diabetology* 17 (1), 1. 10.1186/s12933-017-0656-x.
- Tsikas, D., SCHUBERT, B., GUTZKI, F., Sandmann, J., FROLICH, J., 2003. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography–tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 798 (1), 87–99. 10.1016/j.jchromb.2003.09.001.
- Ustundag, M.F., Ozcan, H., Gencer, A.G., Yilmaz, E.D., Uğur, K., Oral, E., Bilici, M., 2020. Nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and L-arginine levels in psychotic exacerbation of schizophrenia and bipolar disorder manic episode. *Saudi medical journal* 41 (1), 38–45. 10.15537/smj.2020.1.24817.
- Usui, M., Matsuoka, H., Miyazaki, H., Ueda, S., Okuda, S., Imaizumi, T., 1998. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life sciences* 62 (26), 2425–2430. 10.1016/s0024-3205(98)00225-2.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet (London, England)* 339 (8793), 572–575. 10.1016/0140-6736(92)90865-z.
- Valtonen, P., Karppi, J., Nyyssönen, K., Valkonen, V.-P., Halonen, T., Punnonen, K., 2005. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 828 (1-2), 97–102. 10.1016/j.jchromb.2005.09.023.

- Vishwanathan, K., Tackett, R.L., Stewart, J.T., Bartlett, M.G., 2000. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 748 (1), 157–166. 10.1016/s0378-4347(00)00399-6.
- Vladimirova-Kitova, L., Deneva, T., Angelova, E., Nikolov, F., Marinov, B., Mateva, N., 2008. Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia. *Clinical physiology and functional imaging* 28 (6), 417–425. 10.1111/j.1475-097X.2008.00825.x.
- Xuan, C., Tian, Q.-W., Li, H., Zhang, B.-B., He, G.-W., Lun, L.-M., 2016. Levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, and risk of coronary artery disease: A meta-analysis based on 4713 participants. *European journal of preventive cardiology* 23 (5), 502–510. 10.1177/2047487315586094.
- Yang, Y.-J., Xiong, J.-W., Zhao, Y., Zhan, J.-Q., Chen, H.-B., Yan, K., Hu, M.-R., Yu, B., Wei, B., 2016. Increased plasma asymmetric dimethylarginine is associated with cognitive deficits in patients with schizophrenia. *Psychiatry research* 246, 480–484. 10.1016/j.psychres.2016.10.015.
- Yu, Z.-M., Zhao, Y., Zhan, J.-Q., Luo, T., Xiong, J.-W., Yu, B., Wei, B., Yang, Y.-J., 2018. Treatment Responses of Cognitive Function and Plasma Asymmetric Dimethylarginine to Atypical Antipsychotic in Patients With Schizophrenia. *Frontiers in psychiatry* 9, 733. 10.3389/fpsy.2018.00733.
- Yuan, N., Chen, Y., Xia, Y., Dai, J., Liu, C., 2019. Inflammation-related biomarkers in major psychiatric disorders: a cross-disorder assessment of reproducibility and specificity in 43 meta-analyses. *Translational psychiatry* 9 (1), 233. 10.1038/s41398-019-0570-y.
- Zhang, W.-z., Kaye, D.M., 2004. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Analytical biochemistry* 326 (1), 87–92. 10.1016/j.ab.2003.11.006.
- Zincir, S., Zincir, S.B., Doruk, A., Erdem, M., Celik, C., Ak, M., Garip, B., Yükselir, C., Karaahmetoğlu, B., 2014. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and treatment response relationship in male patients with first-episode schizophrenia: A controlled study. *Psychiatry research* 220 (1-2), 76–80. 10.1016/j.psychres.2014.07.013.