

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
Leiter: Prof. Dr. med. J. Jordan

**Pilotstudie zur Wirkung von L-Arginin bei Patienten
mit koronarer Herzkrankheit nach Angioplastie und
Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA
in Plasma als PFB-Derivat**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Sabine Rothmann
aus Aachen

Hannover 2009

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am: 09.09.2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer: Prof. Dr. med. Jürgen C. Frölich

Referent: Prof. Dr. med. Jens Jordan

Korreferent: PD Dr. med. Frank Schröder

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Michael Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2010

Für meine Eltern

Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. J.C. Frölich, dem emeritierten Institutsleiter der Klinischen Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Bereitstellung des Themas, seine Betreuung und Lehre. Nach seiner Emeritierung im April 2004 wurde das Institut kommissarisch von Herrn Prof. Dr. med. D.O. Stichtenoth geleitet, der sich auf meine Weiterbildung in Klinischer Pharmakologie konzentrierte. Im April 2008 übergab er die Leitung des Instituts an Herrn Prof. Dr. med. J. Jordan, dem ich danke diese Dissertation in seiner Abteilung abschließen zu können.

Für die Überlassung des Themas der Methodenentwicklung und Validierung, und für seine Betreuung und Hilfestellung danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. D. Tsikas.

Zu besonderem Dank bin ich Jessica Y. Lachmuth für die Studiendurchführung und Datenerhebung im Studienzentrum Magdeburg verpflichtet. Ohne ihre Mitarbeit und ohne die Bereitstellung ihrer Daten wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. H. U. Klein und Herrn Prof. Dr. med. G. H. Reil, die eine Studiendurchführung in den Studienzentren Magdeburg und Oldenburg ermöglichten. Ich danke dem Integrierten Herzzentrum des Klinikums Oldenburg, Herrn Dr. med. A. Brucksch, dem Personal der Kardiologischen Ambulanz, des Katheterlabors sowie dem der Stationen E13 und 112. Auch möchte ich an dieser Stelle die Universitätsklinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie und den Einsatz von Herrn PD Dr. med. A. Auricchio, Herrn PD Dr. med. A. Götte, dem Personal des Katheterlabors, der Kardiologischen Ambulanz, der Kardiologischen Funktionsambulanz und der Stationen 1-4 in Magdeburg dankend erwähnen.

Für die Unterstützung bei der Laboranalytik gilt mein Dank Herrn Dipl. Ing. F-M. Gutzki, Frau B. Beckmann, Frau A. Mitschke und Frau J.Y. Lachmuth, die mir während der gesamten Dauer der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Außerdem danke ich allen anderen Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Hecker danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Aufgabenstellung	1
1.2. Atherosklerose	2
1.2.1. Definition	2
1.2.2. Endotheliale Dysfunktion.....	3
1.2.3. Der L-Arginin/NO-Stoffwechsel.....	5
1.2.4. Hemmstoffe der NO-Synthese	9
1.2.5. Oxidativer Stress	12
1.2.6. Marker des oxidativen Stresses	14
1.3. Hintergrund der Arbeit	16
1.4. Ziel der Arbeit	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Studiendesign	21
2.2. Patientenkollektiv	21
2.2.1. Patienten	21
2.2.2. Einschlusskriterien	22
2.2.3. Ausschlusskriterien	22
2.2.4. Patientenzahl	22
2.2.5. Ethische Aspekte	23
2.2.6. Randomisierung	23
2.2.7. Zeitlicher Ablauf der Studie	24
2.2.8. Abbruch der Studie durch einzelne Patienten	24
2.2.9. Abbruch der gesamten Studie	24
2.2.10. Verblindung und Entblindung.....	25
2.3. Studien-Medikation.....	26
2.3.1. Studien-Medikation	26
2.3.2. Qualitätssicherung der Studien-Medikation.....	26
2.3.3. Dosierung der Studien-Medikation	27
2.3.4. Vergabe und Rücknahme der Studien-Medikation	27
2.3.5. Risiken der Studien-Medikation.....	27
2.3.6. Compliance der Studien-Medikation	28
2.3.7. Unerwünschte Ereignisse unter der Studien-Medikation.....	28
2.4. Zielparameter	29
2.4.1. Hauptzielkriterien.....	29
2.4.2. Nebenzielkriterien	29
2.4.2.1. Laborparameter	29
2.4.2.2. Gesundheitszustand einschließlich Lebensqualität	30
2.4.2.3 Angina-pectoris-Beschwerden	31

2.5. Patientendaten und Kontrollparameter	32
2.5.1. Patientendaten	32
2.5.2. Kardiovaskuläre Anamnese.....	32
2.5.3. Kontrollparameter	33
2.6. Analysenmethoden	34
2.6.1. Probengewinnung und Lagerung	34
2.6.2. Laborroutine	34
2.6.3. Laborparameter der Nebenzielkriterien	35
2.6.4. Gaschromatographie-Massenspektrometrie	35
2.6.5. Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie.....	36
2.6.6. Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	36
2.6.7. Bestimmung von L-Arginin, L-NMMA und ADMA in Plasma und Urin	37
2.6.8. Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Plasma und Urin	38
2.6.9. Bestimmung von Dimethylamin in Urin.....	39
2.6.10. Bestimmung von Gesamthomocystein in Plasma	39
2.6.11. Bestimmung von 8-iso-PGF _{2α} in Plasma und Urin	40
2.6.12. Bestimmung von MDA und HNE in Plasma	42
2.6.13. Bestimmung von Kreatinin in Urin.....	43
2.6.14. Bestimmung von L-Arginin in den Brausetabletten	44
2.7. Statistik	45
2.7.1. Studienplanung.....	45
2.7.2. Studiauswertung	45
2.8. Methoden-Entwicklung für die Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat 47	
2.8.1. Herstellung der internen Standards	47
2.8.2. Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma.....	49
2.8.3. Messung von MDA als PFB-Derivat mittels GC/MS.....	49
2.8.4. Messung von MDA als PFB-Derivat mittels GC/MS/MS	50
2.8.5. Methodvalidierung zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat.....	50
2.8.5.1. Bestimmung der Selektivität	50
2.8.5.2. Bestimmung der Präzision, Richtigkeit, Linearität und Empfindlichkeit	51
2.8.5.3. Bestimmungsbereich	52
2.8.6. Vergleich der Messverfahren zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat. 52	
2.8.7. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und als PFBox-Derivat	52
3. ERGEBNISSE	53
3.1. Patientenkollektiv	53
3.1.1. Patientenzahl	53
3.1.2. Demographische Verteilung.....	53
3.1.3. Begleiterkrankungen	54
3.1.4. Intervention	55
3.1.5. Begleitmedikation	55
3.2. Hauptzielkriterien	56
3.2.1. Auswertung der kardiovaskulären Ereignisse	56
3.3. Nebenzielkriterien	60
3.3.1. Laborparameter	60

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1.1. L-Arginin.....	60
3.3.1.2. L-NMMA	62
3.3.1.3. ADMA.....	63
3.3.1.4. Nitrit	65
3.3.1.5. Nitrat.....	68
3.3.1.6. DMA.....	70
3.3.1.7. 8-iso-PGF _{2α}	72
3.3.1.8. MDA.....	74
3.3.1.9. HNE.....	75
3.3.1.10. Gesamthomocystein	76
3.3.1.11. CRP	77
3.3.1.12. LDL und HDL	78
3.3.1.13. Blutdruck.....	80
3.3.1.13.1. Blutdruck und antihypertensive Therapie	83
3.3.1.14. Puls.....	84
3.3.2. Gesundheitszustand einschließlich Lebensqualität	85
3.3.2.1. Fragebogen FS-12	85
3.3.2.2. FFB-Mot-Fragebogen.....	88
3.3.3. Angina-pectoris-Beschwerden	89
3.6. Studien-Medikation.....	90
3.6.1. Qualitätssicherung der Studien-Medikation.....	90
3.6.2. Unerwünschte Ereignisse	90
3.6.3. Compliance.....	92
3.6.4. Dauer der Gabe der Studien-Medikation	92
3.7. Entblindung	93
3.8. Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat.....	94
3.8.1. GC/MS- und GC/MS/MS-Analysen der PFB-Derivate.....	94
3.8.1.1. GC/MS-Massenspektren	94
3.8.1.2. GC/MS/MS-Massenspektren	95
3.8.1.3. Chromatogramme der GC/MS und GC/MS/MS.....	97
3.8.2. Validierung der GC/MS- und GC/MS/MS-Methode zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat.....	98
3.8.2.1. Selektivität.....	98
3.8.2.2. Präzision, Richtigkeit, Linearität und Empfindlichkeit.....	98
3.8.2.3. Nachweisgrenze	100
3.8.2.4. Bestimmungsbereich	100
3.8.3. Vergleich der Messverfahren zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat.....	100
3.8.4. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und als PFBox-Derivat	102
4. DISKUSSION	104
4.1. Pilotstudie.....	104
4.1.1. Einfluss von L-Arginin auf kardiovaskuläre Ereignisse	104
4.1.2. Einfluss von L-Arginin auf den NO-Stoffwechsel.....	111
4.1.3. Einfluss von L-Arginin auf Parameter des oxidativen Stresses	115
4.1.4. Einfluss von L-Arginin auf die Lebensqualität	117
4.1.5. Verträglichkeit der Studien-Medikation.....	118

4.1.6. Schlussfolgerung Studienergebnisse	118
4.2. Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat... 119	
4.2.1. Validierung.....	120
4.2.2 Vergleich der GC/MS- und GC/MS/MS-Messmethoden zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma.....	121
4.2.3. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und PFB-Box-Derivat.....	122
4.2.4. Schlussfolgerung Methodenentwicklung	122
5. ZUSAMMENFASSUNG	124
6. LITERATURVERZEICHNIS	126
7. ANHANG	144
7.1. Interimsanalyse.....	144
7.2. Randomisierungsliste	145
7.3. Chargenzuordnungsliste.....	146
7.4. Therapiezuordnungsliste	147
7.5. Meldebögen für unerwünschte Ereignisse	148
7.5.1. Meldebogen für nicht schwere unerwünschte Ereignisse	148
7.5.2. Meldebogen für schwere unerwünschte Ereignisse	149
7.6. Case Report Forms.....	150
7.6.1. Case Report Form Eingangsuntersuchung	150
7.6.2. Case Report Form Zwischenuntersuchung	154
7.6.3. Case Report Form Enduntersuchung.....	156
7.7. Fragebogen zum Gesundheitszustand FS-12.....	160
7.8. Fragebogen zum motorischen Funktionsstatus (FFB-Mot)	162
7.9. VAS-Tagebuch.....	164
7.10. Patienteninformation	165
7.11. Einwilligungserklärung	168
7.12. Studien-Medikation.....	169
7.13. Studienzentren.....	169
7.14. Normwerte	170
7.15. Chemikalien	171
7.16. Geräte	174

7.17. Materialien	178
7.18. Labordiagnostik	181
7.19. Abweichungen der Kontrollparameter	182
7.20. Methodenvalidierung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat.....	183
7.20.1. Standardkurven zur Methodenvalidierung mittels GC/MS.....	183
7.20.2. Standardkurven zur Methodenvalidierung mittels GC/MS/MS.....	186

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Absorption
ACE	angiotensin converting enzyme
ACVB	ateriokoronarer Venen-Bypass
ADL-Skala	Fragen mit niedrigem Schwierigkeitsgrad des FFB-Mot Fragebogens
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AITV	α -Amino- δ -isothioureidovaleriansäure
ALAT	Alanin-Aminotransferase
amol	Attomol
AP	Angina pectoris
ARAMI	L-Arginine in Acute Myocardial Infarction
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
β -Blocker	β -Rezeptoren-Blocker
BMI	Body-Mass-Index
BSTFA	N,O-bis(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamid
c	Konzentration
Ca-Antagonisten	Calcium-Kanal-Antagonisten
cGMP	cylco-Guanosinmonophosphat
CI	Vertrauensintervall
cm	Zentimeter
CRF	Case Report Form
CRP	c-reaktives Protein
d	Durchmesser / Schichtdicke
d _n	n-fach deuteriert
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
dl	Deziliter
DMA	Dimethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	electron impact
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Isoform der NO-Synthase, auch NOS III genannt
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-Dinukleotid-Adenin
FFB-Mot	Fragebogen zur Erfassung des motorischen Funktionsstatus
FFB-Mot ges	Fragebogen basierend auf der Kurzfassung und der ADL-Skala
FMN	Flavin-Mono-Adenin
fmol	Femtomol
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC/MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
GCP	gute klinische Praxis
GI	gastrointestinal
GLP	Grundsätzen der guten Laborpraxis
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartat-Aminotransferase)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Alanin-Aminotransferase)
h	Stunde
H [•]	Wasserstoffradikal
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Alternativhypothese
HCl	Hydrochlorid
HCO ₃	Hydrogencarbonat
HDL	Lipoprotein mit hoher Dichte
HNE	4-Hydroxynonenal
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IAC	Immunoaffinity column
ID	Innendurchmesser

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

iNOS	induzierbare NO-Synthase, auch NOS II genannt
IS	interner Standard
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kPa	Kilopascal
Krea	Kreatinin
l	Liter
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte
L-NMMA	N^{ω} -Monomethyl-L-Arginin
LOD	Nachweisgrenze
μA	Mikroampere
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
M	molar
MCS	mentaler Gesundheitszustand
MDA	Malondialdehyd
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mM	millimolar
MMA	Monomethylamin
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometer
m/z	Massen-Ladungs-Verhältnis
NADPH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotidphosphat
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
ng	Nanogramm
NICI	negative ion chemical ionisation
nNOS	neuronale NO-Synthase, auch NOS I genannt
NO	Stickstoffmonoxid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NO [•]	Stickstoffmonoxidradikal
NO ₂ [•]	Stickstoffdioxidradikal
NO-PAIN	Nitric Oxide in Peripheral Arterial INSufficiency
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase / NO-Synthase
nü	nüchtern
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{-•}	Superoxidradikal
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OH [•]	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
oxLDL	oxidiertes Lipoprotein mit niedriger Dichte
p	Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses
P	Plasma
Pa	Pascal
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PCS	physischer Gesundheitszustand
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PFAA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
PFB-Br	Pentafluorbenzylbromid
PFB ₅ -OH	Pentafluorbenzylhydroxylamin
PFB ₅ -Cl	Pentafluorbenzoylchlorid
8-iso-PGF _{2α}	8-iso-Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ / Prostazyklin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten
pmol	Picomol
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PTV	temperaturprogrammierte Verdampfung
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

r	Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNS	reaktive Stickstoffspezien
ROS	reaktive Sauerstoffspezien
RR dia	diastolischer Blutdruck gemessen mit Riva-Rocci-Apparat
RR sys	systolischer Blutdruck gemessen mit Riva-Rocci-Apparat
RSD	relative Standardabweichung
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDMA	symmetrisches Dimethyl-L-Arginin
SF-12	Fragebogen mit 12 Fragen zum Gesundheitszustand
SF-36	Fragebogen mit 36 Fragen zum Gesundheitszustand
SI	Internationales Einheitensystem
SIM	selected ion monitoring
S/N	Signal-Rauch-Verhältnis
S _N 2-Reaktion	nucleophile bimolekulare Substitutionsreaktion
SPE	Festphasenextraktion
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
SRM	selected reaction monitoring
STABWN	Standardabweichung der Grundgesamtheit / SD
STKV	Standardkurve
TBAR	Thiobarbitursäure reaktive Substanz
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TMCS	Trimethylchlorsilan
t-PA	Gewebsplasminogenaktivator
U	Urin
U1, U2, U3	Eingangs-, Zwischen- und Enduntersuchung
UV/VIS	Wellenlängen im ultravioletten und sichtbaren Bereich
VAS	visuelle Analogskala
VINTAGE MI	Vascular Interaction with Age in Myocardial Infarction
WHO	Welt Gesundheits-Organisation
x g	Erdbeschleunigung
Z.n.	Zustand nach

1. EINLEITUNG

1.1. Aufgabenstellung

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der Arterien, die in der westlichen Welt zu den häufigsten Todesursachen zählt. Zu den Folgen der Atherosklerose zählen z.B. die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), der Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz und der Apoplex. Als Behandlungsoptionen der Atherosklerose stehen neben der Beeinflussung der Risikofaktoren wie Hypertonie, Hyperlipidproteinämie und Diabetes mellitus, auch die Behandlung der Risikofolgen zur Verfügung. In einem weit fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose der Koronararterien sind eine Bypass-Operation oder eine mechanische Rekanalisation oft die letzte Behandlungsoption. Bei einer mechanischen Rekanalisation kann allerdings das Auftreten einer Restenose den Therapieerfolg einschränken oder sogar aufheben. Sowohl ein operativer Eingriff als auch die Beeinflussung der Risikofaktoren und -folgen können eine bereits bestehende Atherosklerose nicht heilen. Einen Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre hat das Stickstoffmonoxid (NO) dargestellt, da es bei der Entstehung der Atherosklerose eine zentrale Rolle spielt. Die Atherosklerose geht mit einer endothelialen Dysfunktion einher, welche sich durch eine gestörte Freisetzung endothelialer Substanzen auszeichnet, zu denen auch das NO gehört. Da die Aminosäure L-Arginin als Präkursor von NO identifiziert wurde, ist ihr Einsatz sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie der Atherosklerose denkbar. Die vorliegende Dissertation ist als Pilotstudie konzipiert worden, um festzustellen inwieweit eine sechsmonatige Gabe von L-Arginin an Patienten mit koronarer Herzkrankheit den Krankheitsverlauf dieser Patienten beeinflussen kann. Auch sollte erfasst werden wie eine definitive Studie gestaltet werden müsste, um einen in der Pilotstudie angedeuteten Effekt zu beweisen. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Rekanalisation auf Biomarker des oxidativen Stresses untersucht und eine Labormethode zur Erfassung des oxidativen Status entwickelt, validiert und eingesetzt.

1.2. Atherosklerose

1.2.1. Definition

Die Atherosklerose ist eine vaskuläre Erkrankung, deren Name sich aus dem Griechischen ableitet (atheroma = Grützbeutel, skleros = hart). Sie wird auch als Arteriosklerose oder umgangssprachlich als Arterienverkalkung bezeichnet. Die Atherosklerose ist die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien. Sie manifestiert sich in einer Verhärtung und Verdickung der Arterien sowie in einem Elastizitätsverlust und einer Lichtungseinengung. Die atherosklerotischen Veränderungen betreffen die Intima und Media der Arterie und bestehen aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe sowie aus Calcium-Ablagerungen. Die WHO teilt die Atherosklerose in 4 Stadien ein: Eine normale Arterie ist als Stadium 0 klassifiziert, eine frühe Läsion mit Fettstreifen als Stadium I, eine fortgeschrittene Läsion mit fibrösen Plaques als Stadium II und komplizierte Läsionen mit klinisch manifesten Folgekrankheiten als Stadium III (Pschyrembel 2002). Die Atherosklerose ist Ursache für etwa die Hälfte aller Todesfälle in der westlichen Welt. Als allgemeine Risikofaktoren gelten Hyperlipoproteinämie, Dyslipoproteinämie, Hyperhomocysteinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Adipositas sowie familiäre Prädisposition. Diese Risikofaktoren beeinflussen sich gegenseitig additiv (Synergismus) und bestimmen so in ihrer Gesamtheit das individuelle Risiko an Atherosklerose zu erkranken.

Die Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose beschränkt sich zurzeit primär auf die Beeinflussung und Behandlung ihrer Risikofaktoren. Hierfür stehen z.B. Lipidsenker, Antihypertensiva, Thrombozyteninhibitoren und –aggregationshemmer zur Verfügung. Neben der medikamentösen Behandlung der Risikofaktoren, kann ein atherosklerotischer Plaque auch direkt durch eine Bypass-Operation oder eine mechanische Rekanalisation (PTA = perkutane transluminale Angioplastie) behandelt werden. Durch die PTA kann es allerdings zu einer mechanischen Verletzung des Endothels kommen, welche zu einer erneuten Entstehung von Läsionen beitragen kann. Das Auftreten einer Restenose nach durchgeführter PTA stellt bis heute eine bedeutende Limitation dieser Behandlungsmethode dar. Da eine Rückbildung oder Heilung der Atherosklerose zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich ist, konzentriert sich die aktuelle Forschung auf mögliche medikamentöse Therapieoptionen. Zu diesen zählen unter anderem eine Plaque-Stabilisierung mit selektiven

Metalloprotease-Inhibitoren (Rouis M 2005, Johnson JL 2007), die Behandlung der Atherosklerose durch die pleiotropische Wirkung der Statine (Liao und Laufs 2005, Alegret und Silvestre 2006) und die Beeinflussung der endothelialen Dysfunktion mit Stickstoffmonoxid-Donatoren, auf die in dieser Arbeit eingegangen wird.

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien. Auf Grund einer Koronarsklerose kommt es dort zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, das bis hin zur Myokardischämie führen kann und sich als Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörung oder Herzinsuffizienz manifestieren kann. Eine Atherosklerose kann aber auch andere zentrale sowie periphere Gefäße befallen. Eine zerebrale Minderdurchblutung kann einen Hirnschlag, einen so genannten Apoplex, hervorrufen, eine Minderdurchblutung der peripheren Gefäße eine PAVK. Meist sind alle Gefäßgebiete zugleich, jedoch in oft sehr unterschiedlich starker Ausbildung betroffen.

1.2.2. Endotheliale Dysfunktion

Eine mögliche Ursache für die Entstehung der Atherosklerose ist eine Schädigung des Gefäßendothels. Dies formulierte Ross in der „Response to Injury Theory“ (Ross 1986, Ross 1993, Ross 1999). Ross sieht die Atherosklerose als eine entzündliche Erkrankung, deren Anfangsstadium die endotheliale Dysfunktion ist. Die endotheliale Dysfunktion begünstigt die Entstehung eines „fatty streak“, eines Fettstreifens, der sich durch die zusätzliche Ansammlung von Makrophagen und T-Lymphozyten als ein entzündlicher Prozess auszeichnet und zu einem Plaque weiterentwickeln kann (Stary et al. 1994). Plaques sind mit einer Bindegewebskapsel überzogen und dadurch vom Blut abgegrenzt. Durch die Plaques selbst oder deren Ruptur kann es zu Gefäßverschlüssen und thromboembolischen Komplikationen kommen, die sich in Folgeerkrankungen wie der KHK oder PAVK manifestieren. Die Pathogenese der Atherosklerose ist vereinfacht in Abbildung 1 dargestellt.

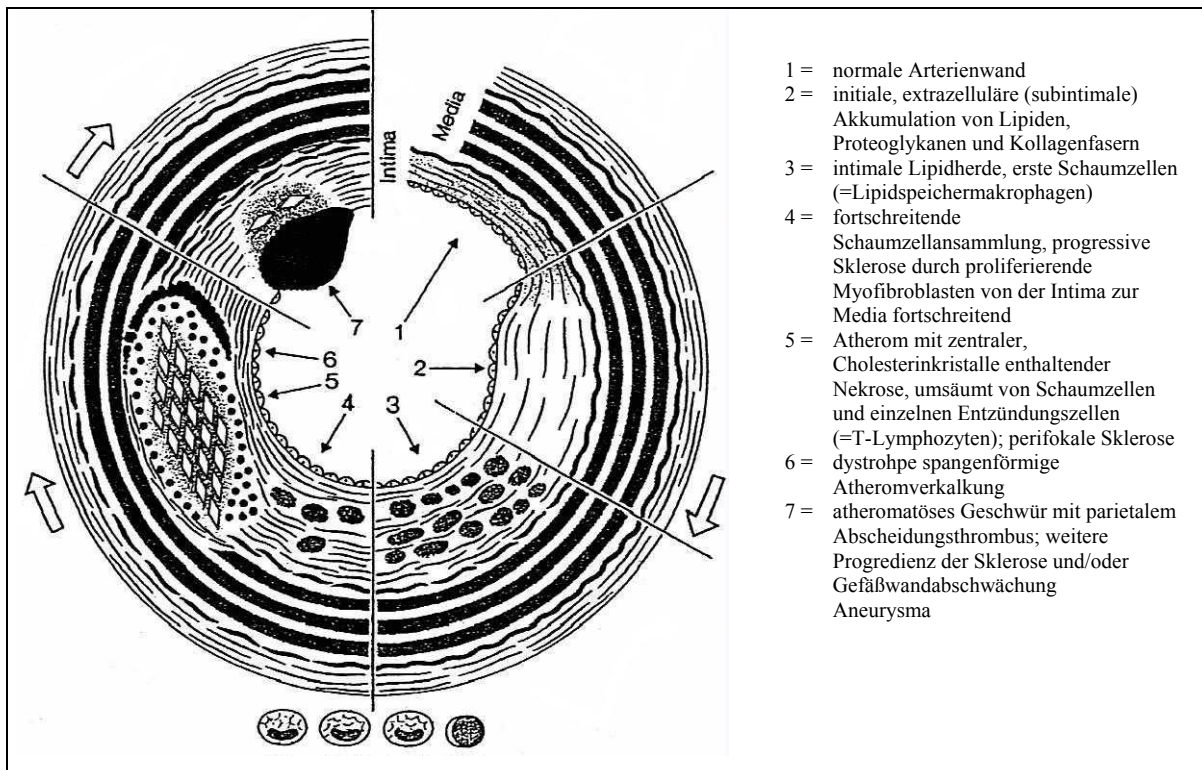


Abbildung 1: Formale Pathogenese der Atherosklerose
(Riede, Schaefer. Allgemeine und spezielle Pathologie)

Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch eine Störung der physiologischen Funktion des Endothels aus. Das Endothel der Gefäße besteht aus einer geschlossenen, einschichtigen Zellschicht und dient unter anderem der Regulierung des Gefäßtonus und Blutdrucks, der Fibrinolyse, der Gerinnung und der Thrombenresistenz. Für eine endotheliale Dysfunktion kommen neben einer mechanischen Verletzung auch pathobiochemische Ursachen in Frage. Diese sind erhöhte LDL- und/oder Homocystein-Konzentrationen, freie Radikale, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotinabusus oder Infektionen durch Mikroorganismen (Ross 1999). Selbst ein morphologisch intaktes Endothel kann funktionelle Mängel aufweisen.

Endothelprodukte, die bei der koronaren Herzkrankheit eine übergewichtige Rolle spielen, sind der endotheliale, relaxierende Faktor (EDRF), das Prostazyklin und der Gewebsplasminogenaktivator (t-PA). Der EDRF wurde schon 1980 von Furchgott und Zawadzki entdeckt, konnte allerdings erst 1987 von Ignarro und Palmer als Stickstoffmonoxid identifiziert werden (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987). NO ist ein wichtiges Signalmolekül, welches unter anderem die Regulierung des physiologischen Blutdrucks übernimmt. Wird NO von den Endothelzellen freigesetzt, so kommt es zu einer Aktivierung der löslichen zytoplasmatischen Guanylatzyklase in den glatten Muskelzellen. Durch eine cylo-Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelte Abnahme der intrazellulären Calcium-

Konzentration kommt es schließlich zu einer Relaxation der Gefäße (Murad 1986, Moncada und Higgs 1993). Somit wirkt sich eine endotheliale Dysfunktion bzw. eine verminderte NO-Produktion in einer eingeschränkten Dilationsfähigkeit der Gefäße aus (Zeiber et al. 1993). Auch hemmt NO eine Adhäsion der Leuko- und Monozyten sowie deren Migration in die Gefäßwand. Weitere Funktionen von NO sind die Hemmung der Thrombozytenfunktion (Radomski et al. 1987, Förstermann et al. 1989), die Regulierung der Produktion von Thromboxan A₂ und vom Plättchenwachstumsfaktor (PDGF). Thromboxan A₂ bewirkt eine Plättchenaggregation und eine Vasokonstriktion (Pill et al. 1990), der PDGF die Muskelzellproliferation zu Schaumzellen (Ross 1993). Neben NO ist auch Prostazyklin (Prostaglandin I₂) als Produkt des Eicosanoid-Stoffwechsels mitverantwortlich für die Vasodilation der Gefäße und für die Hemmung der Thrombozytenfunktion (Moncada et al. 1976, Darius et al. 1995).

Ein weiteres Endothelprodukt, welches bei der endothelialen Dysfunktion vermindert gebildet wird und wodurch es zu einer geringeren Fibrinolyse von Thromben kommt, ist t-PA.

Bei der endothelialen Dysfunktion kommt es somit auf Grund der verminderten NO-, Prostazyklin- und t-PA-Konzentration zu einem Verlust der vasodilatatorischen und antikoagulativen Eigenschaften des Endothels. Dadurch werden die Entstehung und Weiterentwicklung einer Atherosklerose begünstigt.

1.2.3. Der L-Arginin/NO-Stoffwechsel

Als Präkursor-Substanz für NO wurde die basische, semi-essentielle Aminosäure L-Arginin identifiziert. Arginin wird als semi-essentielle Aminosäure eingestuft, da Erwachsene und Kinder, ausgewachsene Säuger und Nager, nicht aber juvenile Nager Arginin selbst synthetisieren können (Rose et al. 1948). Bei einer ausgewogenen mitteleuropäischen Diät beträgt die L-Arginin-Aufnahme 5-6 g pro Tag (Visek 1986). Bei oraler Zufuhr erfolgt die Resorption von L-Arginin aus dem Jejunum (Kim et al. 1991).

NO entsteht durch eine 5-Elektronen-Oxidation eines Stickstoffatoms der Guanidino-Gruppe des L-Arginins (Abbildung 2). Das entstehende Nebenprodukt ist L-Citrullin (Palmer et al. 1988), aus dem in mehreren Schritten L-Arginin in Leber und Niere zurückgewonnen werden kann (Wu und Meininger 1993). Hierbei kommt der Leber die Produktion des L-Arginins für den Eigenbedarf zu (White und Christensen 1982), der Niere dagegen die Produktion, die zum Aufrechterhalten des physiologischen Plasmaspiegels benötigt wird (Borsook und Dubnoff 1941).

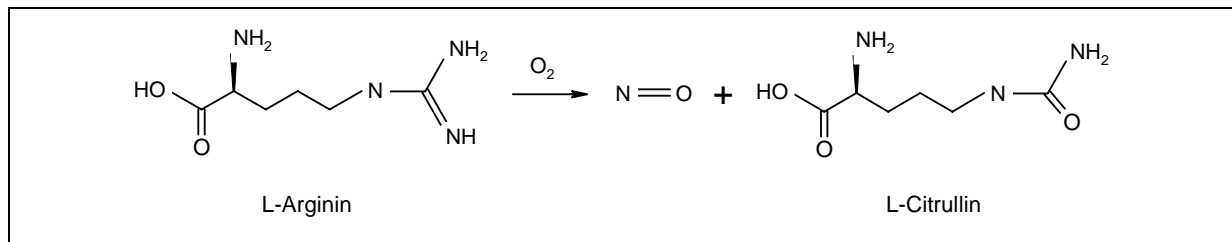


Abbildung 2: Biosynthese von NO aus L-Arginin

L-Arginin kann durch zwei verschiedene Transportsysteme in die Zelle gelangen. 60 % des L-Arginins werden über den Natrium-unabhängigen γ^+ -Transporter für kationische Aminosäuren in die Zelle transportiert, der Rest über ein Natrium-abhängiges System.

Die Oxidation von L-Arginin zu NO wird durch die NO-Synthasen (NOS) katalysiert, von denen drei gewebespezifische Isoformen bekannt sind. Die konstitutiv exprimierte neuronale NOS-Isoform (nNOS) kommt im zentralen und peripheren Nervensystem vor und ist für die nicht-adrenerge und nicht-cholinerge (NANC) Neurotransmission verantwortlich (Mayer et al. 1991). Die induzierbare NOS (iNOS) kommt in mehreren Zytokin-induzierbaren Zellen vor, z.B. in Makrophagen. Sie ist an Abwehrvorgängen beteiligt (Stuehr et al. 1991) und wird über die Transkription reguliert. In der Endothelzelle befindet sich hauptsächlich die Isoform eNOS, die konstitutiv exprimiert wird. Die eNOS und die nNOS benötigen für ihre Aktivierung Calcium-Ionen und Calmodulin in Form einer erhöhten zytoplasmatischen Calcium-Konzentration. Der Anstieg der Calcium-Konzentration in der Zelle ist ein über Guanosinmonophosphat vermittelter Prozess. Für die eNOS scheint noch ein zusätzlicher Mechanismus auf der Ebene der Genexpression zu existieren (Förstermann et al. 1993). Die iNOS hat Calmodulin fest an das Enzymmolekül gebunden und ist somit nicht von der Calcium-Konzentration abhängig. Alle NO-Synthasen benötigen neben Calmodulin zusätzlich reduziertes Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotidphosphat (NADPH), das Flavin-Mono- (FMN) und das Flavin-Dinukleotid-Adenin (FAD) sowie Tetrahydrobiopterin, um NO aus L-Arginin produzieren zu können (Förstermann 2006a).

Die isolierte, aufgereinigte NO-Synthase aus Rinderaorten-Endothelzellen ist durch eine Michaelis-Menten-Konstante (K_m) von $\sim 2.9 \mu\text{mol/l}$ charakterisiert (Pollock et al. 1991). Demnach dürfte bei einer physiologischen L-Arginin-Konzentration in Endothelzellen von 2 mmol/l (Hecker et al. 1990) die NO-Synthase bei Weitem im Bereich der Substratsättigung arbeiten. Durch externe Gabe von L-Arginin ist es allerdings dennoch möglich die NO-Synthese zu steigern. Dieser Gegensatz wird in der Literatur als „L-Arginine paradox“ bezeichnet (Förstermann et al. 1994). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass der

physiologische intrazelluläre K_m -Wert der eNOS nicht dem der in vitro Versuche entspricht. Auch muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass die L-Arginin-Konzentration in unmittelbarer Enzym-Nachbarschaft unbekannt ist. McDonald et al. konnten 1997 zeigen, dass der γ^+ -Transporter und die eNOS in direkter Nachbarschaft zueinander liegen, was eine sehr gute Versorgung der eNOS mit L-Arginin gewährleistet. Somit wäre die freie L-Arginin-Konzentration der limitierende Faktor. In diesem Model käme der intrazellulären L-Arginin-Konzentration eine untergeordnete Rolle zu. Auch wäre eine Kumulation von endogenen Enzyminhibitoren ein möglicher Erklärungsansatz für das „L-Arginine paradox“ (Tsikas et al. 2000a). Eine externe Gabe von L-Arginin würde in diesem Fall zu einer Verdrängung der Inhibitoren führen und somit die NO-Syntheserate steigern. Als ein derartiger Inhibitor wurde z.B. das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) identifiziert. Neben der NO-Synthese ist L-Arginin noch an weiteren Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Im Harnstoffzyklus wird es durch die Arginase zu Ornithin und Harnstoff aufgespalten (Krebs und Henseleit 1932). Des Weiteren hat L-Arginin eine endokrin-sekretagoge Wirkung. Es wirkt stimulierend auf die Freisetzung von Hormonen wie Katecholamine, Wachstumshormone, Kortikosteroide, Somatostatin, Insulin, Glukagon und Prolaktin. Auch ist L-Arginin an der Kreatinin-Synthese und an der Synthese von Orotsäure aus Carbamylphosphat beteiligt (Visek 1992, Reyes et al. 1994).

Zu einer Freisetzung von NO aus der Endothelzelle kommt es durch eine Aktivierung der eNOS. Diese kann durch Rezeptoragonisten wie Thrombin oder Acetylcholin erfolgen (Furchgott und Zawadzki 1980) oder durch die laminare Scherkraft des Blutflusses in den Gefäßen. Eine dauerhafte Stimulation der NO-Synthase hat wiederum eine vermehrte eNOS Genexpression zur Folge (Topper et al. 1996). Die NO-Freisetzung kann allerdings nur an intakten Endothelzellen erfolgen. Das freigesetzte NO wirkt im Gefäßlumen und direkt auf die glatte Gefäßmuskulatur. Diese Reaktion auf die Gefäßmuskulatur wird über die lösliche Guanylatzyklase vermittelt, welche durch NO stark aktiviert wird (Arnold et al. 1977). Für die kardiovaskuläre Wirkung von NO ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase der wichtigste Mechanismus. Der nachfolgend gebildete intrazelluläre Botenstoff cGMP wirkt vasodilatierend über eine Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration und aggregationshemmend.

Freies NO wird innerhalb von wenigen Sekunden inaktiviert (Griffith et al. 1984). Hierfür kommen mehrere Mechanismen in Frage. NO kann z.B. durch Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat reagieren, aber auch Abbauwege über diverse andere

Hämoglobinformen sind möglich (Hsia 1998, McMahon et al. 2002, Kim-Shapiro et al. 2006). Ein weiterer möglicher Inaktivierungsweg des NO ist die Reaktion mit Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$). Hierbei entsteht über das radikalische Zwischenprodukt Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) ebenfalls Nitrat, welches renal eliminiert wird (Blough et al. 1985). Des Weiteren kann NO mit Lipid-Peroxy- oder Lipid-Alkoxyradikalen reagieren wie sie z.B. bei der Lipidperoxidation entstehen. Als Beispiel sei hier die Oxidation von LDL genannt (Maggi et al. 1995). Ebenfalls kann NO zur Bildung von S-Nitroso-Aminosäuren durch die Reaktion mit Thiolgruppen beitragen. Unter physiologischen Bedingungen kann NO unter anderem zu S-Nitroso-Hämoglobin, S-Nitroso-Acetylcystein, S-Nitroso-Cystein, S-Nitroso-Albumin und S-Nitroso-Glutathion reagieren (Mathews et al. 1993). Für diese S-Nitrosoverbindungen konnte eine ähnliche Wirkung wie die von NO in Bezug auf Vasorelaxation und Hemmung der Thrombozytenaggregation aufgezeigt werden (Tsikas et al. 1994, Ramsay et al. 1995). Als weitere Inaktivierungsmechanismen von NO bleiben noch die Reaktionen mit den Enzymen Cyclooxygenase (Salvemini et al. 1995) und Myeloperoxidase (Eiserich et al. 2002) zu nennen.

Nitrit und Nitrat sind Produkte des NO-Stoffwechsels, die zusammen mit dem Urin ausgeschieden werden. Sowohl Nitrit und Nitrat als auch cGMP können als Parameter für die systemische NO-Syntheserate herangezogen werden. Hierbei ist zu beachten, dass die cGMP-Konzentration eher die biologische Aktivität von NO anzeigt, wogegen die Nitrit/Nitrat-Konzentration Aufschluss über die endogene NO-Bildungsrate geben kann (Böger et al. 1996). Voraussetzung für die Berechnung der NO-Syntheserate für klinische Zwecke ist die Minimierung der Nitrit/Nitrat-Aufnahme mit der Nahrung und die Standardisierung auf die Kreatinin-Ausscheidung im Urin bei der Bestimmung aus Spontan-Urin. Auch das cGMP muss bei der Bestimmung aus Spontan-Urin auf die Kreatinin-Ausscheidung standardisiert werden.

Pathophysiologische Faktoren, die bei der Entstehung der Atherosklerose eine Rolle spielen, sind verminderte NO-Produktion und NO-Bioverfügbarkeit, gestörte Freisetzung vasoaktiver Mediatoren, vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen bei Entzündungsprozessen, gestörte Bildung der thrombenresistenten Gefäßinnenauskleidung, Oxidation von Lipoproteinen, unphysiologische Sekretion von Gerinnungsfaktoren oder Faktoren der Fibrinolyse und veränderte Metabolisierung der Regulatoren Angiotensin I, Adenosin und Adenosintriphosphat (ATP).

Verminderte NO-Bioverfügbarkeit kann in mehreren Mechanismen begründet sein. Diese können sowohl in einer verminderten NO-Synthese als auch in einem vermehrten

NO-Metabolismus resultieren. Eine mögliche Ursache für eine verminderte NO-Produktion wäre eine verminderte Aufnahme von L-Arginin in die Endothelzelle. Grund hierfür könnte eine veränderte Aktivität der Transporter für L-Arginin sein. Als Inhibitoren für die L-Arginin Transporter wurden das symmetrische Dimethyl-L-Arginin (SDMA) und die α -Amino- δ -isothioureidovaleriansäure (AITV) experimentell identifiziert (Closs et al. 1997). Diese würden in unphysiologisch hoher Konzentration letztlich eine verminderte NO-Produktion zur Folge haben. Aber auch eine Hemmung der NOS durch endogene Inhibitoren muss als möglicher Mechanismus in Betracht gezogen werden. Inhibitoren wie das ADMA und das N^G -monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) (Rees et al. 1990) werden im Abschnitt 1.2.4. *Hemmstoffe der NO-Synthese* besprochen. Des Weiteren kann eine verminderte NO-Produktion auch auf Grund genetischer Anomalien auftreten (Liao et al. 1995). Zu diesen zählen ein Tetrahydrobiopterin-Mangel sowie eine verminderte Expression der eNOS. Eine verminderte eNOS-Expression erscheint bei Patienten mit Atherosklerose allerdings unwahrscheinlich, da viele Studien zeigen konnten, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren eher mit einer vermehrten als mit einer verminderten Expression der eNOS in Verbindung gebracht werden können (Hink et al. 2001, Mollnau et al. 2002).

Zu einem gesteigerten NO Metabolismus kann es auch durch einen vermehrten oxidativen Abbau von NO durch Sauerstoff selbst oder Superoxidanionen kommen. Auf diese Zusammenhänge wird zusätzlich im Kapitel 1.2.5. *Oxidativer Stress* eingegangen.

1.2.4. Hemmstoffe der NO-Synthese

Zu den endogenen Hemmstoffen der eNOS zählen das N^G, N^G -dimethyl-L-Arginin (asymmetrisches Dimethylarginin, ADMA), das N^G -monomethyl-L-Arginin (Monomethylarginin, L-NMMA) (Vallance et al. 1992) und das schwächer hemmende $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-Arginin (symmetrisches Dimethylarginin, SDMA) (Tsikas et al. 2000b). Diese methylierten Arginin-Analoga (Abbildung 3) kommen in freier Form im Urin (Kakimoto und Akazawa 1970), im Plasma (Vallance et al. 1992), im Gewebe und in Zellen vor (Bothmer et al. 2002). Sie entstehen durch die Methylierung von Arginin-Seitenkettengruppen in Polypeptiden und Proteinen durch spezifische Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) (Rawal et al. 1995, Gary und Clarke 1998). Durch anschließende Proteolyse werden die Methylarginine freigesetzt.

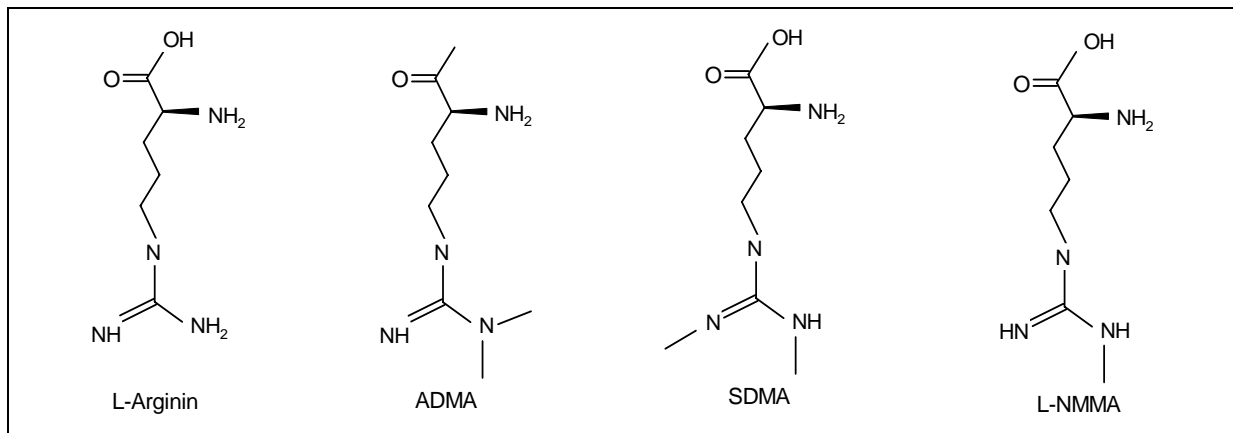


Abbildung 3: Chemische Struktur von L-Arginin und den methylierten L-Arginin-Analoga

ADMA wird als endogener Hemmstoff der eNOS in vielen Zelltypen einschließlich der endothelialen Zellen durch PRMT synthetisiert. Eliminiert wird ADMA durch die Metabolisierung zu L-Citrullin und Dimethylamin (DMA) oder durch die Ausscheidung mit dem Urin. Die Metabolisierung zu L-Citrullin erfolgt über das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) (Ogawa et al. 1989, MacAllister et al. 1996). Es existieren zwei Isoformen der DDAH. Die DDAH I liegt hauptsächlich im Gehirn und in der Niere vor, während die DDAH II im Herzen, der Plazenta und in der Niere exprimiert wird (Leiper et al. 1999). Auch das L-NMMA wird über die DDAH abgebaut und zwar zu Citrullin und Monomethylamin (MMA). Da sowohl die Synthese als auch die Metabolisierung von ADMA stark regulierte Prozesse sind, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die DDAH das Potential besitzt, den NO-Stoffwechsel über den ADMA-Spiegel zu regulieren (Leiper und Vallance 2006). Die Bestimmung der DMA-Ausscheidungsrate im Urin gibt Aufschluss über die ADMA-Metabolisierung. Allerdings ist dabei die exogene Zufuhr von DMA durch Nahrungsbestandteile wie Lecithin, Cholin und Trimethylamin sowie dessen N-Oxide zu berücksichtigen (Asatoor und Simenhoff 1965). Die individuelle DMA-Ausscheidungsrate im Urin ist somit von der Ernährung, der endogenen Produktion sowie von Metabolismus und Ausscheidung abhängig. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erhöhte ADMA-Konzentration zu einer verminderten NO-Synthese und einem erhöhten Gefäßwiderstand führen kann. In klinischen Studien konnten erhöhte ADMA-Werte bei Patienten mit PAVK (Böger et al. 1997), chronischer Niereninsuffizienz (Vallance et al. 1992), Hypertonie (Surdacki et al. 1999) und Hypercholesterinämie (Böger et al. 1998) festgestellt werden. Miyazaki et al. (1999) konnten eine Korrelation zwischen den Risikofaktoren Alter, Blutdruck, Glucosetoleranz, Intima-/Mediadicke der Carotis und der ADMA-Konzentration im Plasma aufzeigen. Sie assoziierten daraufhin eine erhöhte ADMA-Konzentration im Plasma mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko. Achan et al.

(2003) konnten in einer doppelblinden, placebokontrollierten, randomisierten Studie mit gesunden Probanden, denen ADMA intravenös injiziert wurde, eine negative Auswirkung auf die Herzleistung aufzeigen. Durch die niedrig dosierte ADMA-Injektion wurden eine sofortige Senkung der Herzfrequenz sowie eine Senkung des Herzminutenvolumens und eine Erhöhung des Blutdrucks und des vaskulären Widerstandes beobachtet. Auch in Studien zur Erfassung des Effektes einer ADMA-Infusion auf die zerebrale (Kielstein et al. 2006) und pulmonale (Kielstein et al. 2005) Durchblutung, konnten vergleichbare negative Auswirkungen beobachtet werden. Ähnliche vasokonstriktorische Effekte konnten auch für L-NMMA nachgewiesen werden (Haynes et al. 1993). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Akkumulation von ADMA eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose zukommt. 2001 wurde ADMA von Valkonen et al. als potentieller Marker für die endotheliale Dysfunktion und als Risikofaktor für die Atherosklerose definiert.

Ein weiterer Risikofaktor der Atherosklerose, der in den NO-Stoffwechsel eingreifen könnte, ist das Homocystein. Homocystein entsteht durch den Abbau von Methionin. Es liegt nur zu einem sehr geringen Prozentsatz frei im Plasma vor. 70 - 85 % des Homocysteins sind proteingebunden, vorzugsweise an Albumin (Kang et al. 1992). Das so genannte Gesamthomocystein setzt sich aus Homocystein, Homocystin, Cystin-Homocystein und anderen Disulfiden zusammen. Der individuelle Homocystein-Spiegel wird sowohl von genetischen als auch von ernährungstechnischen Faktoren beeinflusst. Für den Abbau von Homocystein stehen verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung. Über das Enzym Methioninsynthase wird Homocystein durch Methylierung zu Methionin zurückverwandelt. Wichtige Co-Faktoren für diesen Prozess sind Methylcobalamin (Vitamin B₁₂) und Folsäure. Ein weiterer Metabolisierungsweg für Homocystein ist der Cystein-Stoffwechsel. Die Cystathionin-β-Synthase baut Homocystein in Gegenwart der Aminosäure Serin zu Cystathionin ab. Für diesen Schritt wird Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆) benötigt (Loscalzo 1996). Somit kommen den B-Vitaminen und der Folsäure elementare Schlüsselfunktionen im Homocystein-Metabolismus zu. Erste Berichte über einen möglichen Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und Atherosklerose wurden von Gibson et al. (1964) und McCully (1969) publiziert. Untersuchungen konnten zeigen, dass vermutlich mehrere Mechanismen für die Schädigung des Endothels durch Homocystein verantwortlich sind. Zu ihnen zählt die Oxidation von Homocystein zu Homocystin, zu gemischten Disulfiden und Homocysteinthiolacton, welche von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) begleitet ist. Zu den so gebildeten ROS zählen das Superoxidanion und das

Wasserstoffperoxid. Eine weitere mögliche pathologische Rolle spielt Homocystein in Bezug auf erhöhten oxidativen Stress durch die Hemmung der Glutathionperoxidase. Die Glutathionperoxidase ist als endogenes Antioxidans für die Inaktivierung von Wasserstoffperoxid mitverantwortlich. Durch Hemmung der Glutathionperoxidase kommt es somit zu einem Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration. Ein Anstieg der gebildeten ROS würde sich wiederum negativ auf die Endothelfunktion, den NO- und den Lipidstoffwechsel auswirken. Es könnten sowohl eine direkte Endothelschädigung als auch eine erhöhte Lipidperoxidation die Folge sein. Auf den NO-Stoffwechsel könnte sich die erhöhte ROS-Konzentration durch eine erhöhte Reaktionsrate mit freiem NO auswirken. Durch diese Faktoren wäre die Entstehung und Weiterentwicklung der endothelialen Dysfunktion begünstigt (Upchurch et al. 1997). Durch die verschiedenen Eingriffe des Homocysteins in die endotheliale Funktion scheint die Einstufung von Homocystein als Risikofaktor für die Atherosklerose gerechtfertigt zu sein. Studien konnten zeigen, dass eine Nahrungsergänzung mit den Vitaminen B₆, B₁₂ und Folsäure den Homocystein-Spiegel um 30 % senken kann. Der Folsäure wird dabei das größte Potential zugeschrieben (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998). Neuere Studien deuten allerdings auf eine mögliche negative Wirkung der Folsäure- und B-Vitamin-Therapie in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse hin (Lange et al. 2004, Bonna et al. 2006, Lonn et al. 2006). Somit bleibt die therapeutische Signifikanz der Senkung des Homocystein-Spiegels durch Folsäure (und B-Vitamine) unbelegt.

1.2.5. Oxidativer Stress

Unter erhöhtem oxidativem Stress versteht man ein Missverhältnis zwischen reaktiven Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS) und Antioxidantien. Unter den ROS werden das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und weitere zusammengefasst. Zu den RNS zählen das Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\cdot}), das Stickstoffdioxidradikal (NO_2^{\cdot}) und das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$). Radikale wie z.B. das Superoxidradikal oder das Hydroxylradikal spielen beim oxidativen Stress eine elementare Rolle. Radikale zeichnen sich allgemein durch ein ungepaartes Elektronenpaar auf dem obersten besetzten Orbital aus. Sie sind im Allgemeinen sehr reaktiv und haben eine Halbwertszeit von wenigen Millionstel-Sekunden (Olson et al. 1981). Molekülstrukturen wie Alkohol- und Aldehydgruppen, Schwefelwasserstoffgruppen, Aminogruppen und Lipide sind

die Angriffspunkte der ROS/RNS. Auch können ROS/RNS die Initiierung einer radikalischen Kettenreaktion hervorrufen wie z.B. bei der Lipidperoxidation.

ROS können aus molekularem Sauerstoff entstehen. Durch eine 1 e⁻-Reduktion von molekularem Sauerstoff kommt es zur Bildung von O₂^{•-}, OH[•] und H₂O₂. Durch eine weitere Reduktion des Sauerstoffs entsteht Wasser (Fridovich 1997). Im Körper können ROS/RNS auch mit Hilfe der Enzyme NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase, Lipooxygenase, Myeloperoxidase oder Cyclooxygenase gebildet werden (Landmesser und Harrison 2001b, Channon und Guzik 2002, Taniyama und Griendling 2003). Des Weiteren produziert die NOS, die L-Arginin zu NO und L-Citrullin verstoffwechselt, genau genommen auch RNS, da es sich bei NO um ein Radikal handelt, das NO[•]. Das so entstandene NO[•] kann dann wiederum mit Sauerstoff oder O₂^{•-} zu NO₂[•] bzw. ONOO⁻ weiterreagieren. Auch die eNOS selbst kann bei Entkopplung ROS produzieren, z.B. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (Xia 2007). Als mögliche Gründe für eine Entkopplung der eNOS werden Substrat- und Cofaktormangel (Vasquez-Vivar et al. 1998, Milstien und Katusic 1999, Landmesser et al. 2003, Förstermann U 2006b) sowie ROS und ADMA diskutiert. In Bezug auf ADMA ist auffällig, dass sowohl die PRMT als auch die DDAH redoxsensitiv sind, so dass oxidativer Stress sowohl zu einer vermehrten ADMA-Produktion als auch zu einem verminderten ADMA-Abbau führen könnte (Cooke 2000, Stühlinger et al. 2001, Sydow und Münzel 2003, Förstermann 2006b). In vivo Studien zu diesem Thema liegen allerdings noch nicht vor.

Die ROS spielen neben der Signalübertragung in den Gefäßzellen auch bei der Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sowie bei der Inflammation und Apoptose eine wichtige Rolle (Griendling et al. 2000, Torres 2003). Durch die Hochregulierung des körpereigenen, antioxidativen Abwehrsystems können Zellen einem gewissen Grad an oxidativem Stress entgegenwirken. Können die ROS/RNS jedoch nicht abgefangen werden, so sind Zellschäden die Folge. Oxidativer Stress schädigt alle Biomoleküle und kann selten klar definiert werden. Je nach Zelltyp ist die Auswirkung des oxidativen Stresses auf die Zelle unterschiedlich. So kann es zum Beispiel durch den oxidativen Stress zu einer gestörten interzellulären Kommunikation und Signaltransduktion bzw. zu einer gestörten Zellteilung oder Zellreparatur kommen. Auch ist eine vermehrte Zellproliferation und ein Zelltod durch Nekrose oder Apoptose möglich (Deshpande et al. 2002, Li et al. 2003). Oxidativer Stress ist an der Pathophysiologie zahlreicher Krankheiten in nicht exakt definierter Weise beteiligt (Florence 1995). Im Gefäßsystem werden ROS/RNS in Verbindung gebracht mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose, Ischämie und

Reperfusionen-Verletzungen sowie mit kongestiver Herzinsuffizienz (Landmesser und Harrison 2001a, Landmesser und Harrison 2001b, Zalba et al. 2001). Neben den Gefäßen sind auch das Herz, die Niere, das endokrine System und das zentrale Nervensystem Angriffspunkte des oxidativen Stresses (Wilcox 2002, Zanzinger 2002, Cantor et al. 2003).

Den ROS und RNS stehen die Antioxidantien gegenüber. Antioxidantien inaktivieren Radikale und unterbrechen radikal-induzierte Prozesse. Zu den Antioxidantien zählen sowohl Vitamine, z.B. Tocopherole (Vitamin E), Carotine (Provitamin A) und Ascorbinsäure (Vitamin C), als auch Enzyme, z.B. Glutathionperoxidase, Katalase und Superoxiddismutase. Beim Abbau über diese Enzyme entstehen die Endprodukte Wasser oder Sauerstoff. Im gesunden Organismus liegt ein Gleichgewicht zwischen den ROS/RNS und den Antioxidantien vor (Halliwell 1999).

1.2.6. Marker des oxidativen Stresses

Neben Radikalen entstehen durch die Lipidperoxidation verschiedene Produkte, zu denen Hydroperoxide, Cycloperoxide und Endoperoxide zählen. Diese können weiter zu Ketonen bzw. Aldehyden reagieren. Als Marker für oxidativen Stress haben sich u.a. Malondialdehyd (MDA), 4-Hydroxynonenal (HNE) und die Isoprostane etabliert.

MDA entsteht hauptsächlich durch radikalische Reaktion aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) Arachidonsäure, Docosahexaensäure und Linolensäure. Aber auch ein enzymatischer Eicosanoid-Metabolismus führt zur Bildung von MDA. Die Struktur von freiem MDA in wässriger Lösung ist pH-abhängig (Esterbauer et al. 1991). Unter physiologischen Bedingungen reagiert MDA bevorzugt mit Proteinen, es ist aber auch eine Reaktion mit freien Aminosäuren und der DNA möglich. MDA liegt sowohl in freier als auch in kovalent gebundener Form vor. Das gebundene MDA kann zur Bestimmung durch saure oder basische Hydrolyse freigesetzt werden. Als Biomarker für den oxidativen Stress und somit auch als Maß für die Lipidperoxidation kann MDA im Plasma sowohl als freies MDA als auch als gebundenes MDA bestimmt werden. Bei der Bestimmung im Urin ist allerdings zu beachten, dass MDA primär als Metabolite und nur in sehr geringen Mengen in freier Form mit dem Urin ausgeschieden wird.

Ein weiteres Produkt der Lipidperoxidation ist HNE (Pryor und Porter 1990). HNE gilt als zytotoxisch und weist zusätzlich noch pro-proliferative Eigenschaften auf (Benedetti et al. 1980, Esterbauer et al. 1991). HNE kann aus den Fettsäuren Arachidonsäure und

Linolensäure entstehen. Hier sei als Beispiel die Oxidation von Phospholipiden genannt. HNE reagiert wie auch MDA mit diversen Proteinen und kann den Verlust der entsprechenden Proteinfunktionen, zum Beispiel der Enzymaktivität, herbeiführen (Esterbauer et al. 1991). HNE formt Michael-Additionsprodukte mit den Seitenketten von Histidin und Cystein in Proteinen sowie Pyrrolprodukte mit Lysin (Okada et al. 1999). Als Marker für den oxidativen Stress kann HNE im Plasma bestimmt werden. Bei der Bestimmung im Urin ist wie bei MDA zu beachten, dass auch HNE nur in sehr geringen Mengen in freier Form mit dem Urin ausgeschieden wird.

Isoprostane sind prostaglandin-ähnliche Substanzen und weitere Produkte der Lipidperoxidation. Insbesondere die F₂-Isoprostane haben sich als hilfreiche Marker zur Bestimmung des oxidativen Status etabliert. Das am häufigsten bestimmte F₂-Isoprostane ist das 8-iso-Prostaglandin-F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}). Es kann unabhängig von enzymatischer Beteiligung (Morrow et al. 1990) oder durch die Cyclooxygenase gebildet werden (Schweer et al. 1997, Tsikas et al. 2003b, Sugimoto et al. 2006). 8-iso-PGF_{2α} weist vasokonstriktorische Eigenschaften auf, die auf einer Thromboxan-A-Rezeptoraktivierung beruhen. Eine erhöhte 8-iso-PGF_{2α}-Bildung konnte bei Rauchern (Morrow et al. 1995, Helmersson et al. 2005), Diabetikern (Davi et al. 1999), bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (Wang et al. 2006), Hypertonie (Minuz et al. 2002) und Hypercholesterinämie (Reilly et al. 1998) aufgezeigt werden. Als unabhängiger Risikomarker für den oxidativen Stress kann 8-iso-PGF_{2α} im Plasma und Urin bestimmt werden (Schwedhelm et al. 2004, Dalle-Donne et al. 2006).

1.3. Hintergrund der Arbeit

Die durch Atherosklerose entstandenen Koronarstenosen werden heutzutage bevorzugt durch die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) behoben. Hierfür steht die Ballondilatation mit oder ohne Stent-Implantation zur Verfügung. Die anfängliche Erfolgsrate ist größer als 90 %, allerdings treten bei 20 – 40 % der Patienten Restenosen auf, die diese Therapiemethode limitieren (Popma et al. 1992, Topol et al. 1993, Bauridel et al. 2002). Ein möglicher Grund für die hohe Restenoserate könnte eine Endothelverletzung bei der Dilatation selbst sein. Bosmans et al. (1996) haben am Kaninchen gezeigt, dass sich zwar das Endothel nach einer Verletzung durch eine Angioplastie relativ schnell regeneriert, seine Funktion aber längerfristig vermindert bleibt. Die durch die Aufdehnung entstandene endotheliale Dysfunktion könnte somit die Entstehung eines neuen Plaques in dem dilatierten Bereich hervorrufen. Auf Grund der hohen Restenoserate werden andere, mögliche Angriffspunkte für die Atherosklerosetherapie diskutiert. Am naheliegendsten erscheint die Wiederherstellung der endothelialen Funktion. Eine zentrale Rolle bei der endothelialen Funktion spielt das NO, wie die Forschungsarbeiten der letzten Jahre verdeutlichen. 1992 wurde NO vom Wissenschaftsmagazin „Science“ zum Molekül des Jahres gewählt, und 1998 erhielten Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott und Ferid Murad für ihre Forschungstätigkeit um das Signalmolekül NO den Nobelpreis für Physiologie bzw. Medizin. Als Substrat der NO-Synthase wurde das L-Arginin zu einem der Forschungsschwerpunkte des NO-Stoffwechsels. Eine erste konkrete Therapieidee zur Senkung der Restenoserate nach Ballonangioplastie lieferte Tarry und Makhoul (1994). Sie konnten im Tierversuch zeigen, dass L-Arginin zu einer Reduktion der Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie führt. Bode-Böger et al. konnten 1996 zeigen, dass sich bei Patienten mit PAVK die Durchblutung durch intravenöse Gabe von L-Arginin steigern lässt. Eine positive Wirkung von oralem L-Arginin bei Patienten mit Hypercholesterinämie und Herzversagen wurde noch im selben Jahr beschrieben. Auch hier konnte eine Dilatation der Gefäße durch L-Arginin erzielt werden (Clarkson et al. 1996, Rector et al. 1996). Rector et al. (1996) konnten neben der gesteigerten Durchblutung auch einen Anstieg der Lebensqualität verzeichnen. Wenige Jahre später konnten bei Patienten mit stabiler Angina pectoris erste Erfolge mit L-Arginin beobachtet werden. Blum et al. setzten 1999 orales L-Arginin ein und erzielten eine deutliche Verbesserung der Angina-pectoris-Symptomatik. Cermuzynski et al. (1997) erreichten durch eine dreitägige orale Gabe von L-Arginin eine Verringerung der ST-Streckensenkung unter Belastung bei Patienten mit Angina pectoris. Lerman et al. konnten 1998 eine Verbesserung

der endothelialen Funktion durch Langzeitgabe von L-Arginin zeigen und schlugen L-Arginin als eine mögliche Therapiemaßnahme vor. Ihre Ergebnisse wurden 2000 von Maxwell et al. bestätigt. In dieser Studie konnte eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch orale Gabe von L-Arginin in Kombination mit Antioxidantien erzielt werden. 2002 wurde dann erstmals von Suzuki et al. L-Arginin gezielt zur Restenoseprävention im Stentbereich eingesetzt. Diese Forschungsgruppe konnte zeigen, dass im Vergleich zur Therapie mit Kochsalzlösung die intramurale Applikation von L-Arginin zu einer reduzierten neointimalen Hyperplasie im Stentbereich führt. Sie proklamierten ihre Ergebnisse als möglichen neuen Therapieansatz zur Prävention von Stentrestenosen. Dieser positive Effekt auf die Restenoserate konnte von Dudek et al. (2002) allerdings nicht bestätigt werden.

Dennoch lassen die anderen oben genannten Studien den Schluss zu, dass L-Arginin oral als unterstützende Therapie bei Atherosklerose und Angina pectoris geeignet zu sein scheint. Diese Annahme basiert auf seiner Funktion als NO-Lieferant, die mit einer positiven Auswirkung auf die Thrombozytenaggregation, Monozytenadhäsion und Proliferation der Muskelzellen zu Schaumzellen gekoppelt ist. Somit wäre es möglich, dass L-Arginin einer erneuten Stenose nach Angioplastie entgegenwirken könnte.

Zur Bestimmung des oxidativen Status stehen heute eine Vielzahl analytischer Methoden zur Verfügung. Die Bestimmung von MDA hat ihre Anfänge in der Bestimmung der so genannten Thiobarbitursäure-reaktiven-Substanzen (TBARs). Bei dieser Methode entstehen durch die Reaktion mit Thiobarbitursäure farbige Verbindungen, die mittels Spektrometrie oder Fluorimetrie bestimmt werden können (Sinnhuber et al. 1958, Yagi 1976). Da die Thiobarbitursäure eine hoch reaktive Substanz ist, mangelt es bei der Bestimmung der TBARs an Selektivität. In den frühen Thiobarbitursäure-Assays wurden daher neben MDA auch andere Substanzen mit Keto- oder Aldehydfunktionen (Zucker, Aminosäuren, HNE, Harnstoff, Biliverdin) bestimmt. Zusätzlich entstanden auf Grund der Reaktionsbedingungen während der Bestimmung artifizielle TBARs aus Vorläufern (Esterbauer et al. 1991). Somit waren die erzielten Messergebnisse eher ein Index für die Lipidperoxidation als eine genaue Bestimmung der MDA-Konzentration. Um eine höhere Selektivität zu erreichen, wurden die Thiobarbitursäure-Assays mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) weiterentwickelt (Bird et al. 1983, Wade et al. 1985, Yu et al. 1986). Diese Entwicklung machte eine Abtrennung der MDA-Thiobarbitursäureprodukte von anderen Reaktionsprodukten möglich. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind neben den fortgeschrittenen TBARs-Methoden diverse andere HPLC- und Gaschromatographie-Massenspektrometrie

(GC/MS)-Methoden zur Bestimmung des oxidativen Stresses entwickelt worden. Die für HPLC-Methoden benutzten Derivatisierungsreagenzien sind z.B. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) (Esterbauer et al. 1982), Diaminonaphthalen (Steghens et al. 2001) und 9-Fluorenylmethoxycarbonylhydrazin (Mao et al. 2006). Die Derivatisierung bei GC/MS-Methoden wird hauptsächlich mit Methylhydrazin (Fujioka und Shibamoto 2005), Phenylhydrazin (Cighetti et al. 1999), DNPH (Maboudou et al. 2002), 2-Hydrazinobenzthiazol (Beljean-Leymarie und Bruna 1988) und Pentafluorophenylhydrazin (Yeo et al. 1994) durchgeführt. Die weiterentwickelten Methoden sind um ein Vielfaches spezifischer als die ursprüngliche Thiobarbitursäure-Methode. Des Weiteren können sie sowohl für die Bestimmung des freien MDAs als auch für die Bestimmung des gesamten MDAs herangezogen werden (Cighetti et al. 1999, Steghens et al. 2001). Als interne Standards wurden zur Bestimmung von MDA in den letzten Jahren die verschiedensten Verbindungen eingesetzt (Luo et al. 1995, Rauli et al. 1998). In Bezug auf die Reproduzierbarkeit wird allerdings der Einsatz von deuteriertem MDA als Optimum angesehen. Schon 1968 bzw. 1985 wurden Methoden zur Herstellung von dideuteriertem MDA (3-Hydroxy[1,3-²H₂]-2-propenal) vorgestellt (Hamberg et al. 1968, Basu und Marnett 1985). Allevi et al. optimierten 1994 die Methode von Basu und Marnett (1985). Heutzutage wird 1,3-d₂-1,1,3,3-Tetraethoxypropan zur Herstellung von zweifach deuteriertem MDA von mehreren Arbeitsgruppen zur GC/MS-Analytik eingesetzt (Cighetti et al. 1999, Fenaille et al. 2001, Cighetti et al. 2002).

Die zurzeit genaueste Analyse von Stoffgemischen ist mit der GC/MS bzw. der Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (GC/MS/MS) zu erreichen. Unter GC/MS versteht man die physikalisch-chemische Auftrennung von Komponenten eines Probengemisches, die unzersetzt verflüchtigt werden können, mit einer sich anschließenden Strukturidentifizierung und Quantifizierung durch die Massenspektrometrie. Die GC/MS ermöglicht heutzutage den sicheren Nachweis von Verbindungen im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻¹² g. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf dem Zerfall der zu bestimmenden Moleküle in strukturspezifische Fragment-Ionen, die entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses aufgetrennt werden. Durch die Kopplung von zwei Massenspektrometern in Serie entsteht die GC/MS/MS. Durch die Kopplung wird ein weiterer Zerfall der Ionen-Fragmente in so genannte Tochter-Ionen auslöst. Durch die Analyse der Eltern- und Tochter-Spektren ist mit der GC/MS/MS eine detailliertere Strukturanalyse als mit der eindimensionalen GC/MS möglich. Zusätzlich erhöht sich durch die Fragmentierung in Tochter-Ionen bei der GC/MS/MS noch zusätzlich die Selektivität. Beide Methoden sind

unempfindlich gegenüber interferierenden Substanzen. Als Nachteile der GC/MS- und GC/MS/MS-Analytik sind die oft aufwändige Probenvorbereitung mit kombinierten chromatographischen Trennverfahren und die Entwicklung geeigneter Derivatisierungstechniken für die gaschromatographische Analyse zu erwähnen.

In der von uns durchgeführten klinischen Studie wurde die Konzentration von MDA im Plasma nach einem im Jahre 1995 von Luo et al. publiziertem Verfahren mittels GC/MS/MS als Pentafluorobenzylhydroxylamin-Derivat bestimmt. Vor dem Einsatz dieser Methode in unserer Studie wurde dieses adaptierte Verfahren modifiziert, intern validiert und seine Eignung für die Messung von MDA in den Studien-Proben festgestellt. Zusätzlich sollte die analytische Verlässlichkeit dieser Methode durch eine weitere, unabhängige GC/MS/MS-Methode überprüft werden. Da solch eine Methode weder in der Literatur noch im hiesigen Institut bis Beginn der Studie verfügbar war, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neue GC/MS/MS-Methode für die Bestimmung von MDA im Humanplasma entwickelt und validiert werden. Alle derzeit erhältlichen Methoden zur Analyse von MDA basieren auf der Derivatisierung der Aldehyd-Funktion von MDA. Der neuen Methode sollte ein unterschiedliches Prinzip zu Grunde liegen. Da MDA eine C-H-azide Verbindung ist ($pK_s = 5,0$) (Organikum 1976) und im Plasma nahezu vollständig dissoziiert als Carbanion vorliegt, sollte überprüft werden, ob die Alkylierung von MDA, z.B. mit Pentafluorbenzylbromid (PFB-Br) analog zur Messung von Nitrit als PFB-Derivat mittels GC/MS (Tsikas 2000), solch ein neuartiges Prinzip darstellen kann.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es eine prospektive, placebokontrollierte Pilotstudie zur Bestimmung des Effekts einer sechsmonatigen L-Arginin-Therapie auf die Restenoserate bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und erfolgter Angioplastie durchzuführen. Des Weiteren sollte untersucht werden wie sich die orale L-Arginin-Therapie auf kardiovaskuläre Ereignisse, Angina-pectoris-Beschwerden, Laborparameter und die Lebensqualität im Vergleich zu einer Placebo-Therapie auswirkt. Bei einem positiven Effekt der L-Arginin-Therapie war geplant, diese Studie als Basis für weiterführende Untersuchungen heranzuziehen, insbesondere sollte sie für diese Nachfolgestudien eine Fallzahlabeschätzung ermöglichen.

Des Weiteren sollte eine Methode zur Bestimmung von MDA im Plasma mittels GC/MS/MS entwickelt und validiert werden. Die entwickelte Methode sollte dann zusätzlich mit der in der Studie verwendeten GC/MS/MS-Literaturmethode verglichen und validiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Studiendesign

Es handelt sich bei dieser Studie um eine Pilotstudie. Sie wurde prospektiv, randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert und multizentrisch durchgeführt. Der Titel der Studie lautet: Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie.

2.2. Patientenkollektiv

2.2.1. Patienten

Die Patienten wurden in den folgenden zwei kardiologischen Kliniken in Deutschland rekrutiert: Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Klein und Klinik für Kardiologie, Integriertes Herzzentrum Oldenburg, Klinikum Oldenburg gGmbH, unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. H. Reil (siehe 7.13. Studienzentren). Es wurden Patienten rekrutiert, bei denen auf Grund verengter Koronargefäße eine Ballondilation durchgeführt werden sollte. Solche Patienten, bei denen zunächst eine Angiographie geplant war, in deren Verlauf die Entscheidung für eine Ballondilation fallen könnte, wurden ebenfalls in die Studie eingeschlossen. Eine erfolgte Dilation führte bei diesen Patienten zur Teilnahme an der Studie, bei einer Angiographie ohne eine Dilation beendete der Patient seine Teilnahme durch den Wegfall des Einschlusskriteriums. Patienten, bei denen zunächst nur eine Angiographie geplant war, die dann aber eine Ballondilation erhielten, wurden nachträglich in die Studie eingeschlossen, sofern die Einwilligung und Einnahme der Studien-Medikation innerhalb von 12 Stunden nach dem Eingriff erfolgte.

2.2.2. Einschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden Patienten, bei denen eine Angioplastie durchgeführt wurde. Es wurden sowohl Patienten, bei denen eine einfache Ballondilatation durchgeführt wurde, als auch Patienten, bei denen gleichzeitig ein Stent implantiert wurde, in die Studie eingeschlossen. Das Studienprotokoll schrieb ein Alterskollektiv von 40 bis 85 Jahren vor. Beiderlei Geschlecht wurde vom Studienprotokoll akzeptiert. Des Weiteren mussten die Teilnehmer Kaukasier sein.

2.2.3. Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien galten: 1) akute auftretende Arrhythmie bei der Eingangsuntersuchung; 2) Teilnahme an einer anderen Studie; 3) bekannte Überempfindlichkeit gegen das Medikament oder einen Hilfsstoff; 4) Hyperkaliämie; 5) Myokardinfarkt innerhalb der letzten 24 Stunden; 6) Angioplastie eines Gefäßes, das ein Bypass ist; 7) Herzinsuffizienz NYHA Klasse III und IV; 8) Leberfunktionsstörungen, mit verminderter Albuminproduktion; 9) eine verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren; 10) erhöhte ALAT- und/oder ASAT-Spiegel im Plasma (dreifache Konzentration im Vergleich zum Lebergesunden); 11) Nierenfunktionsstörungen mit einem Minimalwert der Kreatinin-Clearance von 20 ml/min nach Cockcroft und Gault; 12) Hämodialyse; 13) Zustand nach Transplantation; 14) eine Erkrankung, die eine Lebenserwartung von weniger als einem Jahr hat; 15) nicht-kaukasische Abstammung; 16) Nichterfüllen aller Einschlusskriterien.

2.2.4. Patientenzahl

Das Studienprotokoll schrieb eine sequentielle Rekrutierung in maximal zwei Phasen vor. In der ersten Phase sollten 56 Patienten randomisiert rekrutiert werden, von denen 28 Patienten auf die L-Arginogruppe und 28 Patienten auf die Placebogruppe entfallen sollten. Nach Auswertung der Ergebnisse sollte entschieden werden, ob die Studie mit weiteren 56 Patienten fortgeführt oder beendet werden sollte.

2.2.5. Ethische Aspekte

Die Patienten wurden über das Studienvorhaben sowohl schriftlich (siehe 7.10. Patienteninformation) als auch mündlich aufgeklärt. Sie mussten bei Teilnahme an der Studie ihr schriftliches Einverständnis (siehe 7.11. Einwilligungserklärung) abgeben, in dem sie bestätigten, dass sie ausführlich informiert wurden und keine Fragen unbeantwortet geblieben waren. Den Patienten war bekannt, dass ein Studienabbruch ohne Begründung und ohne Nachteile für ihre Behandlung jederzeit möglich war. Sie wurden darüber informiert, dass nach Zufall ein Teil der Teilnehmer ein Placebopräparat erhielt.

Die Studie wurde gemäß GCP-Richtlinien durchgeführt, die Deklaration von Helsinki sowie das Datenschutzgesetz fanden Anwendung. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Medizinischen Hochschule Hannover und der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt.

Eine Probandenversicherung für die Teilnehmer der Studie wurde gemäß § 40, Abs. 3 des Arzneimittelgesetzes abgeschlossen.

Bei der Studiauswertung wurde von einer Interimsanalyse Gebrauch gemacht. Die sequentielle Auswertung der Studie in maximal zwei Phasen ermöglichte einen frühzeitigen Einblick in die Ergebnisse. Das vorzeitige Erreichen eines signifikanten Ergebnisses (positiv wie auch negativ) hätte laut Protokoll den Abbruch der weiteren Rekrutierung zur Folge gehabt. Bei einem nicht signifikanten Ergebnis der Interimsanalyse sollte eine Abschätzung erfolgen wie groß die Studiengruppe sein müsste, um ein signifikant positives Ergebnis zu erzielen. Im Falle eines negativen Trends würde die Studie abgebrochen.

2.2.6. Randomisierung

Die Zuordnung der Patienten zur Verumgruppe oder Placebogruppe erfolgte randomisiert im Block-Design mit jeweils 8 Patienten pro Block. Eine Tabelle mit Patientenummer und Gruppen- bzw. Chargennummer wurde erstellt (siehe 7.2. Randomisierungsliste, 7.3. Chargenzuordnungsliste). Anhand dieser Tabellen wurde die Studien-Medikation an die Patienten verteilt. Nach der Entblindung dienten diese Tabellen zur Erstellung einer Therapiezuordnungstabelle (siehe 7.4. Therapiezuordnungsliste).

2.2.7. Zeitlicher Ablauf der Studie

Die Rekrutierungsphase wurde auf 4 Monate festgelegt, die Beobachtungsdauer auf 6 Monate, so dass sich die Studie auf insgesamt 10 Monate belaufen sollte. Im Studienprotokoll wurde festgelegt, dass die Rekrutierungsphase um bis zu 2 Monate verlängert werden könnte, sollte die Rekrutierung nicht in gewünschter Geschwindigkeit vorangehen. Da dieser Fall eintrat, und auch nach Verlängerung um 2 Monate noch nicht die angestrebte Patientenzahl eingeschlossen worden war, wurde nach Rücksprache mit den zuständigen Ethikkommissionen die Rekrutierungsphase im Studienzentrum Oldenburg um einen weiteren Monat, im Studienzentrum Magdeburg um 2 weitere Monate verlängert. Die Studiendauer für das Studienzentrum Oldenburg betrug somit insgesamt 13 Monate, die für das Studienzentrum Magdeburg 14 Monate.

Die Untersuchungsphase betrug pro Patient 6 Monate mit einer Eingangsuntersuchung (U1) zu Beginn der Studie, einer Zwischenuntersuchung (U2) nach 3 Monaten, und einer Enduntersuchung (U3) nach insgesamt 6 Monaten.

2.2.8. Abbruch der Studie durch einzelne Patienten

Ein Abbruch der Studie konnte auf Wunsch eines einzelnen Patienten erfolgen, ohne dass ihm dadurch Nachteile entstanden. Außerdem konnte der betreuende Arzt einen Studienabbruch für einen einzelnen Patienten beschließen. Grund für einen Studienabbruch durch den Studienarzt waren das Auftreten von Ausschlusskriterien oder ein Nichtbefolgen der Anweisungen des Prüfarztes durch den Patienten.

Durch nicht vorhandene Compliance oder durch Abbruch des Kontaktes mit dem Studienzentrum beendete ein Patient ebenfalls seine Teilnahme an der Studie.

2.2.9. Abbruch der gesamten Studie

Gründe für einen Abbruch der gesamten Studie waren das Auftreten schwerer Nebenwirkungen, gehäuftes Auftreten therapiebedingter Todesfälle oder neue Erkenntnisse

aus anderen Studien oder Publikationen. Im Falle eines negativen Trends zum Zeitpunkt der Interimsanalyse würde die Studie ebenfalls abgebrochen.

2.2.10. Verblindung und Entblindung

Die Pilotstudie wurde doppelblind durchgeführt. Die Zuordnung der Therapie zur Patientenummer erfolgte verblindet nach dem Zufallsprinzip. Mit Hilfe der Randomisierungsliste (siehe 7.2. Randomisierungsliste) wurde jeder Patientenummer eine Therapienummer zugeteilt. Die anschließende Zuordnung der Chargennummer zu der Therapienummer erfolgte von einer nicht in der Studie involvierten, nicht verblindeten Person nach dem Zufallsprinzip. Diese Zuordnung wurde in einer Chargenzuordnungsliste (siehe 7.3. Chargenzuordnungsliste) festgehalten. Die Zuordnung der Verum- bzw. Placebomedikation zur entsprechenden Chargennummer wurde verschlossen in der Pilotstudien-Masterfile aufbewahrt.

Für einen eventuellen Notfall in den Studienzentren wurden Briefumschläge zur Entblindung angefertigt. Die Umschläge waren mit der Patientenummer gekennzeichnet und enthielten Hinweise zur Therapie (Placebo oder L-Arginin). Nach Vergabe der Patientenummer an einen Patienten, wurde der Name des Patienten auf dem Umschlag vermerkt.

Die Entblindung der Studie erfolgte erst nach der kompletten Auswertung (Datenerhebung, Laboranalyse, Statistik) der Studie. Es wurde eine Therapiezuordnungsliste (siehe 7.4. Therapiezuordnungsliste) erstellt.

2.3. Studien-Medikation

2.3.1. Studien-Medikation

Die Studien-Medikation wurde von der Firma C. Hedenkamp GmbH hergestellt (siehe 7.12. Studien-Medikation). Die Verumcharge enthielt laut Herstellungsprotokoll 2g L-Arginin-Hydrochlorid pro Brausetablette, die Placebocharge kein L-Arginin-Hydrochlorid. Die Brausetabletten wurden in Röhrchen, die von der Firma Dr. Jaeniche GmbH & Co. KG hergestellt und bedruckt wurden, zu 20 Stück gepackt (siehe 7.12. Studien-Medikation). Zusätzlich wurden sie am Boden mit Chargennummer und Haltbarkeitsdatum versehen. Eine Unterscheidung der beiden Chargen war nur an Hand der Chargennummer möglich. Eine Zuordnung der Chargennummern zu den Verumtabletten bzw. den Placebotabletten wurde verschlossen in der Pilotstudien-Masterfile aufbewahrt.

Die verwendete Studien-Medikation war bis November 2005 haltbar, und die Studie wurde am 01.05.2004 abgeschlossen.

2.3.2. Qualitätssicherung der Studien-Medikation

Nach Erhalt der Studien-Medikation hatte der Studienleiter Einsicht in die Herstellungsprotokolle und die Qualitätskontrollprotokolle der Firma Hedenkamp. An Hand dieser Protokolle wurde die Zusammensetzung beider Chargen überprüft.

Zusätzlich wurde im Institut für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover eine stichprobenartige Kontrolle jeder Charge durchgeführt. Dazu wurden 10 Brausetabletten jeder Charge verblindet auf ihren L-Arginin-Gehalt und die Gleichförmigkeit des Gehaltes nach dem Europäischen Arzneibuch 2005 untersucht (siehe 2.6.14. Bestimmung von L-Arginin in den Brausetabletten).

2.3.3. Dosierung der Studien-Medikation

Die Patienten erhielten über den Studienzeitraum von 6 Monaten täglich 12 g L-Arginin-Hydrochlorid (10 g L-Arginin) oder Placebo. Nach einem Dosierungsschema wurden morgens, mittags und abends je 2 Brausetabletten in 200 ml Wasser aufgelöst und eingenommen. Dies entsprach einer Menge von 3 x 4 g L-Arginin-Hydrochlorid bzw. Placebo. Die erste Einnahme der Studien-Medikation erfolgte am Abend vor der Angioplastie in Form von 2 Verum- oder Placebo-Brausetabletten. Bei Patienten, die als Notfall eingeliefert wurden oder erst nach erfolgter Angioplastie in die Studienteilnahme einwilligten, erfolgte die erste Einnahme der Studien-Medikation spätestens 12 Stunden nach der Angioplastie.

2.3.4. Vergabe und Rücknahme der Studien-Medikation

Die Vergabe der Studien-Medikation erfolgte nach der Chargenzuordnungsliste (siehe 7.3. Chargenzuordnungsliste). Die Vergabe wurde vom Studienbetreuer des entsprechenden Studienzentrums durchgeführt und erfolgte am Entlassungstag nach der Angioplastie und bei der Zwischenuntersuchung (U2). Die abgegebene Menge entsprach dem Bedarf bis zur nächsten Untersuchung im Studienzentrum.

Die Rücknahme der Studien-Medikation erfolgt bei den Untersuchungen im Studienzentrum durch den Studienbetreuer. Die nicht verbrauchte Studien-Medikation wurde gezählt und so der Verbrauch des Patienten ermittelt.

2.3.5. Risiken der Studien-Medikation

Mögliche Risiken der Studien-Medikation waren die der vermehrten Chloridionenzufuhr, die zu einer Acidose hätte führen können. Weitere bekannte und unerwünschte Arzneimittelwirkungen waren weicher Stuhl oder Diarrhöe, Sodbrennen und Magenbeschwerden wie Übelkeit und Druckgefühl.

2.3.6. Compliance der Studien-Medikation

Unter dem Begriff Compliance versteht man die Bereitschaft eines Patienten, die Anweisungen des Arztes zu befolgen, d.h. im Fall dieser Pilotstudie, die Studien-Medikation regelmäßig einzunehmen.

Die Compliance der Studienteilnehmer wurde individuell mit Hilfe der Anzahl der verbrauchten Brausetabletten ermittelt. Die Zeiträume von U1 bis U2 und von U2 bis U3 wurden separat auf Compliance geprüft und bewertet. Des Weiteren wurden die Patienten gezielt nach Einnahmepausen befragt. Für die Patienten, die mit dem Erreichen eines Endpunktes die Studie vorzeitig beendeten, wurde die Compliance getrennt ausgewertet.

Als compliant galten Studienteilnehmer, die 80 % oder mehr der vorgesehenen Studien-Medikation eingenommen hatten. Patienten mit einer Einnahmepause von einer Woche oder mehr sowie Patienten mit einer Compliance unter 80 % wurden als non-compliant eingestuft.

2.3.7. Unerwünschte Ereignisse unter der Studien-Medikation

Eine regelmäßige Befragung erfolgte in Bezug auf aufgetretene unerwünschte Ereignisse unter der Studien-Medikation. Alle gemeldeten Ereignisse wurden vom Studienbetreuer auf dafür vorgesehenen Meldebögen für unerwünschte Ereignisse (siehe 7.5.1. Meldebogen für nicht schwere unerwünschte Ereignisse) oder auf Meldebögen für schwere unerwünschte Ereignisse (siehe 7.5.2. Meldebogen für schwere unerwünschte Ereignisse) vermerkt. Schwere unerwünschte Ereignisse wurden sofort an den Sicherheitsbeauftragten der Studie weitergeleitet. Schwere unerwünschte Ereignisse, die unter die Hauptzielkriterien der Studie fielen (siehe 2.4.1. Hauptzielkriterien), wurden nur zur Auswertung der Hauptzielkriterien herangezogen und nicht bei der Ermittlung der Verträglichkeit der Studien-Medikation berücksichtigt.

2.4. Zielparameter

2.4.1. Hauptzielkriterien

Als Hauptzielkriterien wurde für diese Pilotstudie ein kombinierter kardiovaskulärer Endpunkt, bestehend aus den neuen Ereignissen Restenose, Herzinfarkt, Schlaganfall, Tod, Krankenhausaufnahme wegen zunehmender Angina-pectoris-Beschwerden, arteriokoronärer Venen-Bypass (ACVB), sowie arterielle Verschlusskrankheit (AVK), gewählt.

Die Patienten wurden regelmäßig hinsichtlich aufgetretener kardiovaskulärer Ereignisse befragt und es wurde Einsicht in die entsprechenden Befunde genommen. Die kardiovaskulären Ereignisse und die Mortalität wurde mit Hilfe der Meldebögen für schwere unerwünschte Ereignisse (siehe 7.5.2. Meldebogen für schwere unerwünschte Ereignisse) erfasst. Regelmäßige apparative Untersuchungen zur Erfassung der kardiovaskulären Endpunkte, wie z.B. EKGs, wurden im Rahmen der Pilotstudie nicht durchgeführt.

2.4.2. Nebenzielkriterien

Zusätzlich zu den Hauptzielkriterien wurden verschiedene Laborparameter, der Gesundheitszustand inklusive Lebensqualität sowie die Stärke der Angina-pectoris-Beschwerden ausgewertet.

Die Nebenzielkriterien wurden auf Case Report Forms (CRFs) erfasst (siehe 7.6. Case Report Forms).

2.4.2.1. Laborparameter

Folgende Laborparameter wurden in der Studiauswertung berücksichtigt:

L-Arginin, L-NMMA, ADMA, Nitrit, Nitrat, DMA, 8-iso-PGF_{2α}, MDA, HNE, Gesamthomocystein, c-reaktives Protein (CRP), LDL und das Lipoprotein mit hoher Dichte (HDL).

Des Weiteren wurden die Parameter Blutdruck und Puls erfasst.

2.4.2.2. Gesundheitszustand einschließlich Lebensqualität

Der Gesundheitszustand der Patienten wurde mit Hilfe von zwei Fragebögen beurteilt.

Zur Erfassung des Gesundheitszustandes unter Berücksichtigung der mentalen und physischen Aspekte wurde der Fragebogen SF-12 gewählt (siehe 7.7. Fragebogen zum Gesundheitszustand FS-12). Der SF-12 ist die Kurzversion des SF-36 der Firma Qualitometric. Der Fragebogen eignet sich zur Bestimmung des Gesundheitszustandes aus der Sicht des Patienten. Er umfasst Aspekte wie den allgemeinen und mentalen Gesundheitszustand, Vitalität, Schmerz, sowie den sozialen und emotionalen Status. Die Auswertung des SF-12 erfolgte in zwei Kategorien, von denen die eine den physischen Gesundheitszustand (PCS) und die andere den mentalen Gesundheitszustand (MCS) beschreibt. Es handelt sich um ein validiertes Verfahren.

Für die Pilotstudie erfolgte die Berechnung der Punktzahl für die zwei Kategorien über komplexe Algorithmen standardisiert nach Anleitung von Qualitometric. Für die Auswertung gilt: je höher die Punktzahl, desto besser der Gesundheitszustand. Für jede Kategorie können Punktzahlen im Bereich von 0 - 100 erreicht werden. Laut Qualitometric spiegelt ein Mittelwert von 50 mit einer Standardabweichung von 10 den Gesundheitszustand der Bevölkerung der USA wieder. Eine Punktzahl oberhalb von 50 deutet somit auf einen Gesundheitszustand über dem der USA-Bevölkerung hin.

Zur Erfassung des motorischen Funktionsstatus wurde der FFB-Mot-Fragebogen (siehe 7.8. Fragebogen zum motorischen Funktionsstatus (FFB-Mot)) des Instituts für Sport und Sportwissenschaft der Universität Karlsruhe verwendet. Dieser Fragebogen erfasst die Dimensionen Kraft, Ausdauer, Beweglichkeit und Koordination mittels Selbsteinschätzung. Die Standardfassung des Fragebogens umfasst 20 Fragen, die Kurzfassung 12 Fragen. Es ist möglich den Fragebogen um 4 Fragen mit hohem Schwierigkeitsgrad oder 4 Fragen mit niedrigem Schwierigkeitsgrad (ADL-Skala) zu erweitern. Die Fragen mit hohem Schwierigkeitsgrad wurden für Sportler entwickelt, die mit niedrigem Schwierigkeitsgrad für schwächere und gesundheitlich eingeschränkte Personen (Bös et al. 2002).

Für die Pilotstudie wurden die Kurzfassung und die 4 Fragen der ADL-Skala ausgewählt.

Der Fragebogen wurde wie folgt ausgewertet:

Für jedes angekreuzte Kästen wurde die in Klammern stehende Punktzahl gutgeschrieben. Die Addition der Punkte der Fragen 1 - 12 ergab die Punktzahl für die Kurzform und die

Addition der Punkte der Fragen 13 - 16 die Punktzahl für die ADL-Skala. Die für die Kurzform zu erhaltende Punktzahl betrug minimal 12 und maximal 60 Punkte, die bei der ADL-Skala zu erreichende Punktzahl minimal 4 und maximal 20 Punkte. Zur zusammengefassten Auswertung wurden die Punkte der Kurzform und der ADL-Skala addiert und so die Gesamtpunktzahl eines jeden Patienten ermittelt. Für den FFB-Mot gilt, je höher die Punktzahl desto besser der motorische Funktionsstatus. Die Bad Schönborner Gesundheitsstudie mit 458 Befragten der Normalbevölkerung ergab für Männer im Alter von 33 - 60 Jahren Durchschnittswerte von 48,8 Punkten für die Kurzform und Durchschnittswerte von 19,4 Punkten für die ADL-Skala. Für Frauen im Alter von 33 - 60 Jahren ergaben sich für die Kurzform Durchschnittswerte von 44,1 Punkten und für die ADL-Skala Durchschnittswerte von 18,9 Punkten (Bös et al. 2002). Daraus ergibt sich für die zusammengefasste Fragebogenauswertung ein durchschnittlicher Referenzwert von 68,2 Punkten für Männer und von 63,0 Punkten für Frauen.

2.4.2.3 Angina-pectoris-Beschwerden

Zur Bestimmung der Angina-pectoris-Beschwerden während der Studiendauer wurde ein Tagebuch mit visueller Analogskala (VAS) entworfen (siehe 7.9. VAS-Tagebuch). Dieses Tagebuch wurde einmal pro Woche unter Angabe der Woche, des Datums, einer Beschreibung der Stärke der Beschwerden sowie der Anzahl der Anfälle pro Tag und Woche und der benutzten Anfallsmedikation ausgefüllt. Die Auswertung der Tagebücher erfolgte nach Abschluss der Studie wie folgt:

1. Nicht eindeutig oder korrekt ausgefüllte Beschwerdekategorien, Beschwerdestärken, oder Angaben zu Anfällen wurden als ungültig angesehen.
2. Der Abstand zwischen dem Kästchen mit dem traurigen Gesicht und der Mitte des Kreuzes wurde mit Hilfe eines Lineals ausgemessen. Die gemessenen Zentimeter wurden in Punkte umgerechnet; für diese Umrechnung wurden 10 cm als 100 Punkte festgelegt. Wurde das lachende Gesicht direkt als Beschwerdestärke gewählt, so wurde dies mit 100 Punkten bewertet, ein trauriges Gesicht folglich mit 0 Punkten.
3. Die ermittelte Punktzahl wurde anschließend zur Kategoriepunktzahl addiert. Das Ankreuzen der Beschwerdekategorie 1 wurde generell mit 300 Punkten bewertet. Für das Ankreuzen der Beschwerdekategorie 4 ergab sich eine Kategoriepunktzahl von 200 Punkten, so dass maximal 300 Punkte in dieser Beschwerdekategorie erreicht

werden konnten. Für die Beschwerdekategorie 3 galt eine Kategoriepunktzahl von 100 Punkten, für die Beschwerdekategorie 2 eine von 0 Punkte. Die maximal zu erreichende Punktzahl in Beschwerdekategorie 3 ergab sich demnach als 200 Punkte, die der Beschwerdekategorie 2 als 100 Punkte.

Es erfolgte eine wochenweise Auswertung unter Berücksichtigung der Stärke der Angina-pectoris-Beschwerden sowie der durchschnittlichen Anzahl der Angina-pectoris-Anfälle pro Tag und Woche.

2.5. Patientendaten und Kontrollparameter

2.5.1. Patientendaten

Zu allen drei Untersuchungen erfolgte die Aufnahme von anonymisierten Patientendaten mittels einer CRF (siehe 7.6. Case Report Forms). Bei der Eingangs-, Zwischen- und Enduntersuchung (U1, U2, U3) wurden die Patientenummer, die Initialen, das Geburtsdatum, das Alter, die Größe, das Gewicht und das Geschlecht des Patienten dokumentiert. Der komplette Name, Anschrift, Telefonnummer, Name des Hausarztes und Krankenkasse wurden aus Gründen des Datenschutzes bei der U1 getrennt erfasst. Eine Zuordnung zwischen Patientenummer und Name des Patienten erfolgte anhand einer vertraulichen Patienten-Identifikationsliste.

2.5.2. Kardiovaskuläre Anamnese

Des Weiteren wurden in den CRFs die kardiovaskuläre Anamnese der Patienten inklusive der aktuellen Diagnose mit Angiographiebefund, die Beschreibung der Angina-pectoris-Beschwerden mit Anfallsmedikation, die kardiovaskulären Risikofaktoren (Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese), die Ergebnisse erfolgter Belastungs-Elektrokardiogramme (EKGs), sowie die aktuelle Begleitmedikation dokumentiert. Unter dem Punkt ‚Beleiterkrankungen‘ wurden sowohl bereits erfolgte vaskuläre Eingriffe als auch andere Krankheiten erfasst. Die Risikofaktoren wurden wie folgt definiert:

Als Nikotinabusus wurde ein aktueller Zigaretten-, Zigarren- oder Pfeifenkonsum definiert sowie ein zurückliegender Konsum. Eine positive Familienanamnese wurde vermerkt, sofern bei blutsverwandten Familienmitgliedern ersten oder zweiten Grades eine kardiovaskuläre Erkrankung oder eine PAVK diagnostiziert worden war. Als adipös wurden Patienten klassifiziert, die einen Body-Mass-Index (BMI) größer 25 kg/m^2 aufwiesen. Die Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als solche erfasst, sofern eine entsprechende Diagnose bei der Eingangsuntersuchung vorlag.

2.5.3. Kontrollparameter

Zu Beginn der Studie (U1) und zur Enduntersuchung (U3) wurden die Laborparameter Natrium, Kalium und Chlorid sowie die Alanin-Aminotransferase (ALAT) und die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) im Plasma bestimmt. Im Serum erfolgte die Messung von Kreatinin (Krea). Im Kapillarblut wurden Blutzucker und pH-Wert sowie der Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und die Hydrogencarbonat-Konzentration (HCO_3) bestimmt. Mit Hilfe der Kreatininwerts, des Alters und des Gewichts des Patienten wurde die Kreatinin-Clearance nach Cockcroft und Gault abgeschätzt. Die Blutgase (pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3) wurden kontrolliert, um eine eventuelle Azidose rechtzeitig zu erkennen.

Zur U1 wurden die Kontrollparameter zur Überprüfung der Ein- bzw. Ausschlusskriterien herangezogen. Bei der Zwischenuntersuchung (U2) erfolgten eine ALAT- und ASAT-Bestimmung im Plasma und eine Kreatinin-Bestimmung im Serum. Die Kreatinin-Clearance nach Cockcroft und Gault wurde berechnet.

Traten im Studienverlauf Veränderungen der Kontrollparameter außerhalb der Normbereiche auf, so wurden diese als unerwünschte Ereignisse gemeldet. Eine Liste der Normbereiche befindet sich in der Anlage (siehe 7.14. Normwerte).

2.6. Analysenmethoden

Listen der verwendeten Chemikalien, Geräte, Materialien und der ausführenden Labore befinden sich in der Anlage (siehe 7.15. Chemikalien, 7.16. Geräte, 7.17. Materialien, 7.18. Labordiagnostik).

2.6.1. Probengewinnung und Lagerung

Die Blutentnahme erfolgte in S-Monovetten oder BD-Vacutainern zur Plasmagewinnung und in S-Monovetten zur Serumgewinnung. Die Proben für die Laborroutine wurden sofort in das Labor des entsprechenden Studienzentrums zur Analyse gebracht. Die Proben zur Bestimmung der Parameter im Institut für Klinische Pharmakologie in Hannover wurden bei 2000 x g für 5 min im jeweiligen Studienzentrum zentrifugiert. Das gewonnene Plasma und Serum wurde in Polypropylen-Röhrchen mit Griffstopfen und rundem Boden (4 ml) überführt. Die verwendeten Röhrchen waren patienten- und probenspezifisch gekennzeichnet. Die Plasma- und Serumproben wurden sowohl im Studienzentrum als auch später im Institut für Klinische Pharmakologie in Hannover bei -20 °C gelagert.

Die aus Spontan-Urin gewonnenen Urinproben wurden in gekennzeichnete, sterile Cellstar Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss und konischem Boden (50 ml) überführt und bei -20 °C im Studienzentrum und später auch im Institut für Klinische Pharmakologie in Hannover gelagert.

Der Transport der Proben vom den Studienzentren ins Institut für Klinische Pharmakologie erfolgte auf Trockeneis in isolierten Transportkisten.

2.6.2. Laborroutine

Die Laborroutine der Proben aus Magdeburg wurde im Zentrallabor der Klinischen Chemie des Städtischen Klinikums Magdeburg durchgeführt. Die Laborroutine der Proben aus Oldenburg wurde im Institut für Laboratoriumsdiagnostik und Mikrobiologie des Klinikums Oldenburg durchgeführt (siehe 7.18. Labordiagnostik).

Als Laborroutine wurden die Laborparameter Natrium, Kalium, Chlorid, Serumkreatinin, Blutzucker, Blutgase (pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3) und die Leberenzyme ALAT/GPT und ASAT/GOT bestimmt.

Die Angabe der Parameter erfolgte in den Laboren in den konventionellen oder SI-Einheiten. Die Umrechnung der konventionellen Einheiten in SI-Einheiten erfolgte später mit Hilfe der amtlichen Umrechnungsfaktoren (Jakob 2000).

2.6.3. Laborparameter der Nebenzielkriterien

Die Bestimmung der Nebenzielkriterien CRP, LDL und HDL erfolgte zusammen mit der Laborroutine in den Studienzentren und in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Bernd Schottdorf Labor Hannover (siehe 7.18. Labordiagnostik). Parameter, die in konventionellen Einheiten angegeben wurden, wurden später in SI-Einheiten umgerechnet. Im Institut der Klinischen Pharmakologie wurden die Parameter L-Arginin, L-NMMA, ADMA, Nitrit, Nitrat, DMA, 8-iso-PGF_{2 α} , MDA, HNE und Gesamthomocystein bestimmt. Bei der Bestimmung der Parameter aus Urin erfolgte die Angabe als Urinausscheidungsrate bezogen auf Kreatinin (Krea). Zur Qualitätssicherung wurden im Institut für Klinische Pharmakologie Hannover bei allen zu bestimmenden Parametern für jede Messreihe eine Qualitätskontrollprobe aus Qualitätskontrollplasma bzw. -urin hergestellt und vermessen. Eine maximale Abweichung von 10 % vom zuvor in mehreren Analysen festgelegten Kontrollwert wurde als zulässig angesehen.

2.6.4. Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die Bestimmung der Parameter L-Arginin, Nitrit, Nitrat, DMA und Gesamthomocystein mittels GC/MS wurde ein HP 5890 series II Gaschromatograph gekoppelt mit einem 5989A Massenspektrometer von Hewlett Packard verwendet. Für die gaschromatographische Trennung wurden für alle Parameter Säulen vom Typ Optima 17 (15 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke) von der Firma Macherey-Nagel verwendet. Der Trägergasstrom (Helium) für alle Trennungen betrug 35 kPa. Die massenspektrometrische Bestimmung von L-Arginin, Nitrit, Nitrat und Gesamthomocystein erfolgte im negative ion chemical ionisation (NICI) Modus. Dabei wurde für alle Parameter eine Ionenquellentemperatur von 180 °C, eine Quadrupoltemperatur von 120 °C, eine Interfacetemperatur von 260 °C, ein Methandruck von

200 Pa, eine Elektronenenergie von 230 eV, ein Elektronenstrom von 300 μ A und eine Scanzeit von 50 ms/Ion gewählt. DMA wurde im electron impact (EI) Modus bestimmt. Hier betrug die Ionenquellentemperatur 150 °C, die Quadrupoltemperatur 120 °C, die Interfacetemperatur 260 °C, die Elektronenenergie 70 eV, der Elektronenstrom 100 μ A und die Scanzeit 50 ms/Ion. Alle Bestimmungen erfolgten im selected ion monitoring (SIM) Modus.

2.6.5. Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

Die GC/MS/MS zur Bestimmung der Parameter L-NMMA, ADMA, 8-iso-PGF_{2 α} , MDA und HNE wurde mit Hilfe eines ThermoQuest Trace GC 2000 series Gaschromatographen von CE Instruments gekoppelt mit einem TSQ 7000 Massenspektrometer von Finnigan MAT durchgeführt. Für die gaschromatographische Trennung wurden für die Bestimmungen von L-NMMA, ADMA, und 8-iso-PGF_{2 α} Säulen vom Typ Optima 17 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke) von Macherey-Nagel verwendet, für die Bestimmung von MDA und HNE Säulen vom Typ FactorFour VF-17ms (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke) mit integrierter Vorsäule EZ-Guard von Varian. Die massenspektrometrische Bestimmung aller Parameter erfolgte im NICI Modus. Dabei wurden eine Ionenquellentemperatur von 180 °C, eine Manifoldtemperatur von 70 °C, ein Trägergasstrom (Helium) von 1 ml/min, ein Ionenquellendruck (Methan) von 530 Pa, ein Stoßkammerdruck (Argon) von 0,27 Pa, eine Elektronenenergie von 200 eV, ein Elektronenstrom von 300 μ A und eine Scanzeit von 100 ms/Ion gewählt.

2.6.6. Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

Die HPLC erfolgte je nach Parameter auf zwei verschiedenen Geräten. Bei der HPLC-Anlage 1 handelte es sich um einen Waters 717 Plus Autosampler mit einer Pharmacia LKB Gradient Pump 2249 und einem Spectroflow 78 UV-Detektor. Sie wurde zur Bestimmung von Kreatinin eingesetzt und die verwendete Säule war eine Phenomenex Synergi 4 μ Polar-RP 80 Å 250 x 4,6 mm. Die HPLC-Anlage 2 war eine Gynkotek Gina mit einem Gynkotek RF 1002 Fluoreszenz-Detektor und einer Nucleosil 100-5 C₆H₅ Säule (250 x 40 mm) von Macherey-Nagel. Mit ihr wurde der L-Arginin-Gehalt der Brausetabletten bestimmt.

2.6.7. Bestimmung von L-Arginin, L-NMMA und ADMA in Plasma und Urin

Die Bestimmung von L-Arginin, L-NMMA und ADMA in Plasma und Urin erfolgte nach der Methode von Tsikas et al. (2003a).

Die Parameter L-Arginin und ADMA wurden sowohl in Plasma als auch in Urin bestimmt, die Analyse von L-NMMA erfolgte nur mit Plasma.

Für die Bestimmung wurde ein Phosphatpuffer (pH 7,4) bestehend aus 54 mM Di-natriumhydrogenphosphat und 13 mM Kaliumdihydrogenphosphat sowie ein 0,4 M Boratpuffer (pH 8,5) verwendet.

Zur Herstellung der internen Standards für die Bestimmung in Plasma wurde ein Mischstandard aus 100 μ M L-Arginin, 1 μ M L-NMMA und 1 μ M ADMA in Wasser verwendet. Die Mischung zur Herstellung des internen Standards für die Bestimmung im Urin setzte sich aus 100 μ M L-Arginin und 20 μ M ADMA in Wasser zusammen.

Für die Bestimmung in Plasma wurden 500 μ l aufgetautes Plasma in Vivaspin 2-Kartuschen pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 min bei 8000 x g zentrifugiert. Für die Bestimmung in Urin wurden je 100 μ l aufgetauter Urin 1:10 (V/V) mit Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Anschließend wurden 100 μ l des Plasma-Ultrafiltrats bzw. des verdünnten Urins unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Durch Zugabe von 100 μ l 2 M Salzsäure in Methanol wurden die Proben für 1 h bei 80 °C verestert. Analog zu den Plasma- und Urinproben wurde eine entsprechende Anzahl interner Standards hergestellt. Dazu wurden je 100 μ l der Standardmischung für die Plasmaproben unter Stickstoff eingeengt und die trockenen Proben anschließend mit 2 M Salzsäure in deuteriertem Methanol verestert. Gleiches gilt für die internen Standards zur Bestimmung in Urin, nur mit dem Unterschied, dass 100 μ l Standardmischung zunächst 1:10 (V/V) mit Phosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt wurden. Nach Veresterung und Abkühlung der Proben wurden die entsprechenden internen Standards mit den Plasmaproben, bzw. den Urinproben vereinigt. Darauf erfolgte ein erneutes Eindampfen zur Trockene. Nach Zugabe von 100 μ l Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFAA) in Ethylacetat (1:4 V/V) wurden die Proben bei 65 °C für 30 min derivatisiert und anschließend bis zur Trockne eingedampft.

Die Rückstände wurden in 200 μ l Boratpuffer (0,4 M, pH 8,5) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Toluol zu den Urinproben und 200 μ l Toluol zu den Plasmaproben wurden die Proben 1 min ausgeschüttelt und anschließend bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Zur

Messung wurden die Toluolphasen in Autosamplergläschen überführt. Zur Bestimmung von L-Arginin in Plasma wurden zusätzlich 10 µl der Toluolphase mit Toluol auf 500 µl verdünnt. Das Injektionsvolumen bei der GC/MS/MS-Bestimmung von ADMA und L-NMMA betrug 1 µl und die Injektionsgeschwindigkeit 50 µl/s. Der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 90 °C für eine Dauer von 2 min. Die Aufheizung erfolgte mit einer Heizrate von 25 °C/min auf eine finale Temperatur von 340 °C, die für 1 min gehalten wurde. Die Injektionstemperatur betrug 280 °C, die Temperatur des Interfaces wurde auf 280 °C eingestellt. Zur Bestimmung von ADMA wurde der Übergang des Ions mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) 634 zum Ion mit m/z 378, bzw. des deuterierten Ions mit m/z 637 zum Ion mit m/z 378 gewählt. Zur Bestimmung von L-NMMA wurde der Übergang des Ions mit m/z 474 zum Ion mit m/z 218, bzw. des deuterierten Ions mit m/z 477 zum Ion mit m/z 218 gemessen. Die Kollisionsenergie betrug 15 eV.

Bei der GC/MS-Bestimmung von L-Arginin wurde 1 µl Probe im Splitlos-Modus injiziert. Der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 90 °C, die für 1 min beibehalten wurde. Die anschließende Aufheizung auf 340 °C erfolgte mit einer Heizrate von 25 °C/min. Zur Bestimmung von L-Arginin wurden die Ionen mit m/z von 586 und 589 gewählt. Dem deuterierten Ion ist hierbei das m/z 589 zuzuordnen.

2.6.8. Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Plasma und Urin

Die Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Plasma und Urin erfolgte nach der Methode von Tsikas (2000).

Die für die Bestimmung verwendete Mischung aus internen Standards wurde für die Plasmaproben-Bestimmung aus 400 µM ¹⁵N-Nitrat und 40 µM ¹⁵N-Nitrit in Wasser hergestellt und für die Urinproben-Bestimmung aus 8 mM ¹⁵N-Nitrat und 80 µM ¹⁵N-Nitrit.

Die Plasma- und Urinproben wurden aufgetaut, gerüttelt und bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Zu 100 µl der Proben wurden 10 µl der entsprechenden ¹⁵N-Standardmischung hinzugegeben und die Proben kurz gerüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 400 µl Aceton und 10 µl PFB-Br versehen. Die Proben wurden erneut gerüttelt und dann für 1 h bei 50 °C inkubiert. Nach der Derivatisierung wurden die Proben unter Stickstoff bis zur Trübung für etwa 3 - 4 min eingeengt. Der Rückstand der Proben (etwa 100 µl) wurde mit 1 ml Toluol versetzt, für 1 - 2 min gerüttelt und anschließend 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. 500 - 800 µl der Toluolphasen wurden in Autosamplergläschen überführt und verschlossen.

Bei der GC/MS-Bestimmung von Nitrit und Nitrat wurde 1 µl Probe splitlos injiziert, und die initiale Temperatur des GC-Ofens wurde bei 70 °C festgelegt, die für 1 min beibehalten wurde. Die anschließende Aufheizung erfolgte in Schritten von 30 °C/min auf eine Endtemperatur von 280 °C. Die Injektortemperatur betrug 200 °C. Zur Bestimmung von Nitrit wurde das Ionen mit m/z von 46 gewählt, für Nitrat das Ionen mit m/z von 62. Für die deuterierten Ionen wurden die m/z 47 und 63 gewählt.

2.6.9. Bestimmung von Dimethylamin in Urin

Die Bestimmung von DMA in Urin erfolgte nach der Methode von Tsikas et al. (2007).

Der für die Bestimmung verwendete interne Standard bestand aus 8,759 g/l d₆-Dimethylaminhydrochlorid in Wasser und entsprach einer 100 mM Lösung.

Die Urinproben wurden aufgetaut, gerüttelt und bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Je 1 ml der Proben wurde in ein Reaktionsglas überführt und 5 µl des d₆-Dimethylamin-Standards hinzugegeben. Die Proben wurden gerüttelt und für 10 min gekühlt konditioniert. 100 µl der Proben wurden mit 1 ml Toluol, 10 µl einer 20 mM Natriumcarbonat-Lösung und 10 µl einer 10 % Pentafluorbenzoylchlorid-Lösung in wasserfreiem Acetonitril (PFBoyl-Chlorid) versetzt. Die Proben wurden für 1 min gerüttelt und anschließend bei 4 °C für 5 min und 2000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in Autosamplergläschen überführt.

Das Injektionsvolumen bei der GC/MS-Bestimmung von DMA betrug 1 µl (splitlos), und der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 70 °C, die für 1 min beibehalten wurde. Die anschließende Aufheizung erfolgte in 2 Schritten. Die Zwischentemperatur von 280 °C wurde durch eine Heizrate von 30 °C/min erreicht, die Endtemperatur von 300 °C durch eine Rate von 10 °C/min. Die Injektortemperatur betrug 200 °C. Zur Bestimmung des nicht-deuterierten DMAs wurde das Ion mit den m/z 239 analysiert, zur Bestimmung der deuterierten Form das Ion mit der m/z 245.

2.6.10. Bestimmung von Gesamthomocystein in Plasma

Die Bestimmung von Gesamthomocystein in Plasma erfolgte nach einer validierten, jedoch noch nicht veröffentlichten Methode des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Diese Methode wurde an das Verfahren zur Bestimmung von L-Arginin, L-NMMA und ADMA von Tsikas et al. (2003a) angelehnt.

Für die Bestimmung wurde eine 1 mM wässrige Lösung d₈-Homocystin als interner Standard verwendet. Des Weiteren wurde ein 0,4 M Borsäurepuffer (pH 8,5) hergestellt.

Die Plasmaproben wurden aufgetaut, gerüttelt und bei 2000 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. 500 µl Plasma wurden mit 5 µl des 1 mM d₈-Homocystin-Standards versetzt und gerüttelt. Zur Reduktion von Homocystin zu Homocystein wurden je 5 µl 2-Mercaptoethanol zu den Proben gegeben. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Vivaspin 2-Kartuschen überführt und für 30 min bei 10 °C und 8000 x g ultrazentrifugiert. 100 µl des Ultrafiltrats wurden zur Trockene eingedampft und dann mit 100 µl 2 M Salzsäure in Methanol für 1 h bei 80 °C inkubiert. Die Proben wurden erneut zur Trockene eingedampft. Nach Zugabe von 100 µl PFAA in Ethylacetat (1:4 V/V) wurden die Proben bei 65 °C für 30 min derivatisiert und anschließend bis zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in 200 µl Boratpuffer (0,4 M, pH 8,5) aufgenommen und mit 100 µl Toluol ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren bei 2000 x g für 5 min getrennt und die Toluolphasen wurden in Autosamplergläschen überführt.

Bei der GC/MS-Bestimmung vom Gesamthomocystein wurde 1 µl Probe splitlos injiziert. Die initiale GC-Ofentemperatur wies 90 °C auf, die für 1 min beibehalten wurde. Die Aufheizung auf 340 °C erfolgte in Heizraten von 25 °C/min. Zur Bestimmung von Gesamthomocystein wurden die Ionen mit m/z von 293 und 297 ausgewählt. Dem deuterierten Ion ist hierbei das m/z 297 zuzuordnen.

2.6.11. Bestimmung von 8-iso-PGF_{2α} in Plasma und Urin

Die Bestimmung von 8-iso-PGF_{2α} in Plasma und Urin erfolgte nach der Methode von Tsikas et al. (2003b).

Die Bestimmung wurde für Plasma mit einem 0,01 ng/µl d₄-8-iso-PGF_{2α}-Standard in Ethanol durchgeführt. Für die Bestimmung in Urin wurde ein 0,1 ng/µl d₄-8-iso-PGF_{2α}-Standard in Ethanol verwendet. Für die Aufreinigung der Proben wurden 4 ml 8-Isoprostane Immunoaffinity Columns (IAC) verwendet. Die Plasmaproben wurden zusätzlich noch mit 15 ml Cromabond Solid Phase Extraction C18 endcapped 500 mg Säulen (SPE-Säule) aufbereitet.

Für die Aufreinigung mittels IAC wurde ein Eluent bestehend aus 95 % Ethanol abs. und 5 % Wasser hergestellt. Zur Regeneration und Lagerung der IAC diente ein 0,1 M Phosphatpuffer

(pH 7,4). Vor der erstmaligen Benutzung der IAC wurden diese mit 1 ml Qualitätskontroll-Urin konditioniert. Der Qualitätskontroll-Urin wurde mit dem IAC-Eluenten von der IAC gespült und die IAC mit 5 ml Wasser und anschließend mit 5 ml Säulenpuffer regeneriert. Für die Bestimmung von 8-iso-PGF_{2α} in Plasma wurden die IAC bis zu 4 mal regeneriert und verwendet, für die Bestimmung in Urin bis zu 6 mal. Die Lagerung der IAC erfolgte gefüllt mit 2 ml Säulenpuffer im Kühlschrank.

Auch die SPE-Säulen wurden vor der Benutzung konditioniert. Dazu wurden die SPE-Säulen unter einem angelegten Vakuum mit 10 ml Methanol und anschließend mit 5 ml 0,05 M Ameisensäure gespült. Beim Spülvorgang wurde ein Trockenlaufen der Säulen vermieden. Die konditionierten SPE-Säulen wurden nur einmal verwendet.

Die Plasma- und Urinproben wurden aufgetaut, gerüttelt und bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert. Zu 1 ml Plasma bzw. 1 ml Urin wurden 10 µl des entsprechenden d₄-8-iso-PGF_{2α}-Standards hinzugegeben. Die im Folgenden beschriebene Aufreinigung mit den SPE-Säulen wurde nur mit den Plasmaproben durchgeführt. Dazu wurden die Plasmaproben mit 400 µl Kalilauge 25 % versetzt, gerüttelt und bei 40 °C für 45 min inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Wasser wurde eine pH-Einstellung auf pH 3 mit 5 M Ameisensäure durchgeführt. Nach erfolgter Einstellung wurden die Plasmaproben 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und die Überstände auf die konditionierten SPE-Säulen gegeben. Mittels Vakuum wurde eine Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s eingestellt. Anschließend wurden die SPE-Säulen mit 0,05 M Ameisensäure gespült. Die Elution wurde mit 4 ml Ethylacetat und einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/s durchgeführt. Die gesammelten Ethylacetatphasen wurden von den Restwasserphasen abpipettiert und unter Stickstoff eingedampft. Die Rückstände wurden in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer aufgenommen und gerüttelt.

Zur Extraktion von 8-iso-PGF_{2α} aus den Plasma- und Urinproben wurden als nächstes die IAC verwendet. Dazu wurden die Urinproben sowie die von der SPE-Säule aufbereiteten Plasmaproben getrennt auf die IAC gegeben. Es wurde eine Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s gewählt. Anschließend wurden die IAC zuerst mit 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer und dann mit 2 ml Wasser gespült. Die Proben wurden mit 2 ml Elutionslösung eluiert und die Eluate unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden mit 100 µl Acetonitril, 10 µl Methanol, 10 µl *N*-Ethyl-diisopropylamin (Hünigbase) und 10 µl PFB-Br (33 %ig in Acetonitril) versetzt. Anschließend wurde bei 30 °C für 1 h inkubiert und unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden mit 200 µl Wasser und 500 µl Diethylether versehen und 1 min gerüttelt. Durch Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min

wurden die Etherphasen von den Wasserphasen getrennt und die Etherphasen anschließend in Autosamplergläser mit Deckel überführt. Die Rückstände der Proben wurden erneut mit 500 µl Diethylether ausgeschüttelt, zentrifugiert und die korrespondierenden Etherphasen vereinigt. Die Etherphasen wurden dann unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und die Rückstände mit 50 µl *N,O*-bis(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) 1 h bei 60 °C derivatisiert. Vor Abgabe zur Messung wurde abermals zentrifugiert.

Zur Bestimmung von 8-iso-PGF_{2α} mittels GC/MS/MS wurde 1 µl Probe mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 20 µl/s injiziert. Die Injektion erfolgte als Druckstoßinjektion mit 124 kPa im temperaturprogrammierten Verdampfungs-Modus (PTV). Die Starttemperatur betrug 70 °C, die anschließende Aufheizung erfolgte in Schritten von 10 °C/s auf 300 °C. Der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 80 °C für eine Dauer von 1,5 min. Die Aufheizung erfolgte mit einer Heizrate von 8 °C/min auf eine Temperatur von 340 °C, die für 2 min gehalten wurde. Die Temperatur des Interfaces wurde auf 280 °C eingestellt. Gemessen wurde im selected reaction monitoring (SRM) Modus. Zur Bestimmung von nicht deuteriertem 8-iso-PGF_{2α} wurde der Übergang des Ions mit m/z von 569 zu dem Ion mit m/z von 299 gewählt. Die deuterierte Form wurde durch den Übergang des Ions m/z 573 auf das Ion m/z 303 bestimmt. Die Kollisionsenergie betrug 25 eV.

Zur Kontrolle der Derivatisierung und zur Abschätzung der Ausbeute wurde eine Derivatisierungskontrollprobe nur aus internem Standard hergestellt.

2.6.12. Bestimmung von MDA und HNE in Plasma

Die Bestimmung von MDA und HNE in Plasma erfolgte modifiziert nach der Methode von Luo et al (1995).

Für die Bestimmung wurden ein 2 µM d₂-MDA-Standard in 0,1 M Salzsäure (siehe 2.8.1. Herstellung der internen Standards) (Kwon und Watts 1963, Allevi et al. 1994, Filipe et al. 2002) und ein 500 nM d₃-HNE-Standard in Ethanol hergestellt.

Die Plasmaproben wurden aufgetaut und gerüttelt. Nach dem Zentrifugieren bei 2000 x g für 5 min wurden 100 µl Plasma zur Analyse entnommen. Die Proben wurden mit 10 µl des d₂-MDA-Standards mit 10 µl des d₃-HNE-Standards sowie mit 200 µl einer 0,1 M PFBox-Lösung versetzt, gerüttelt und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 500 µl Methanol, 1 ml Isooctan und 6 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Proben wurden 1 min gerüttelt und für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die oberen Phasen

wurden abpipettiert und über einer Spatelspitze wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach der Trocknung wurde erneut zentrifugiert und die Überstände bis zur Trockene unter Stickstoff eingedampft. Die Rückstände wurden mit 50 μl BSTFA versetzt, welches 1 % Trimethylchlorsilan (TMCS) enthielt, und bei 80 °C für 1 h inkubiert.

Bei der GC/MS/MS-Bestimmung von MDA und HNE betrug das Injektionsvolumen 1 μl und die Injektionsgeschwindigkeit 50 $\mu\text{l/s}$. Die Injektion erfolgte als Druckstoßinjektion mit 124 kPa im PTV-Modus. Die Starttemperatur betrug 70 °C, die anschließende Aufheizung erfolgte in Schritten von 10 °C/s auf 340 °C. Der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 80 °C, die nachfolgende Aufheizung erfolgte mit einer Heizrate von 10 °C/min auf eine Temperatur von 320 °C, die für 1 min gehalten wurde. Die Temperatur des Interfaces wurde auf 300 °C eingestellt. Zur Bestimmung von MDA wurden die Übergänge der Ionen mit m/z von 415 und 416 auf die Ionen mit m/z von 234 und 235 ausgewählt. Dem deuterierten Ion ist hierbei der Übergang des Ions m/z 416 auf m/z 235 zuzuordnen. HNE wurde durch den Übergang des Ions mit m/z von 403 auf das Ionen mit m/z von 283 bestimmt. Für das deuterierte Derivat wurde der Übergang des Ions mit m/z 406 auf das Ion mit m/z 286 gewählt. Die verwendete Kollisionsenergie betrug 15 eV.

2.6.13. Bestimmung von Kreatinin in Urin

Die Bestimmung von Kreatinin in Urin erfolgte in Anlehnung an die Methode von Tsikas et al. (2004).

Die Bestimmung wurde mit einem Standard durchgeführt, der 10 mM Kreatinin in Wasser enthielt. Zur Herstellung des HPLC-Fließmittels wurden 11,8926 g Ammoniumsulfat und 1900 ml Wasser mit Methanol auf 2000 ml aufgefüllt.

Die Urinproben wurden aufgetaut und gerüttelt. Nach dem Zentrifugieren bei 2000 x g für 5 min wurden 10 μl Urin mit 1000 μl Fließmittel vereinigt. Die Probe wurde gerüttelt und mittels HPLC Anlage 1 analysiert. Zur Auswertung wurde ebenfalls eine Standardprobe mit 10 μl Standard und 1000 μl Fließmittel hergestellt und vermessen. Das Injektionsvolumen für die HPLC betrug 50 μl , die Temperatur der Säule 22 °C, und die Flussrate 1 ml/min. Die gewählte Wellenlänge betrug 236 nm.

2.6.14. Bestimmung von L-Arginin in den Brausetabletten

Die Bestimmung von L-Arginin in den in der Pilotstudie verwendeten Brausetabletten erfolgte modifiziert nach der Methode von Böger et al. (1998).

Der zur Bestimmung verwendete 1 mM Homoarginin-Standard wurde aus 224,7 mg L-Homoarginin-HCl in 1000 ml Wasser hergestellt. Für die HPLC-Bestimmung wurden zwei Eluenten und ein Derivatisierungsreagenz benötigt. Für Eluent A wurden 11,52 g Zitronensäure in 1000 ml Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt. Nach der Einstellung erfolgte die Auffüllung mit Wasser auf 1200 ml und eine Zugabe von 600 ml Methanol. Der Eluent B bestand aus einer Mischung von 900 ml Methanol und 100 ml Wasser. Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes wurden 540 mg *o*-Phthaldialdehyd in 10 ml Methanol und 400 µl 2-Mercaptoethanol gelöst und mit 0,4 M Boratpuffer auf 100 ml aufgefüllt. Der Boratpuffer bestand aus 6,183 g Borsäure in 250 ml Wasser, eingestellt mit 2 M Natronlauge auf pH 8,5.

Für die Bestimmung von L-Arginin in den Brausetabletten wurden die Brausetabletten verblindet in 50 ml Wasser gelöst. Es folgte eine 1:20 (V/V) Verdünnung und eine weitere 1:100 (V/V) Verdünnung mit Wasser. 100 µl der zweifach verdünnten Probenlösungen wurden mit 10 µl des Homoarginin-Standards versetzt, mit Wasser zu 1 ml aufgefüllt und analysiert. Die Messung wurde auf der HPLC-Anlage 2 durchgeführt. Die Derivatisierung erfolgte in der HPLC-Anlage durch Inkubation von 20 µl Probe mit 100 µl Derivatisierungsreagenz für 20 Sekunden. Das Injektionsvolumen wurde auf 5 µl, die Temperatur der Säule auf 25 °C und die Flussrate auf 1 ml/min eingestellt. Beim Fluoreszenz-Detektor wurde für die Extinktion eine Wellenlänge von 236 nm und für die Emission eine Wellenlänge von 453 nm gewählt.

2.7. Statistik

2.7.1. Studienplanung

Zur Berechnung der Effektgröße wurde die Studie von Suzuki et al. (2002) herangezogen. Auf diesen Studienergebnissen basierend wurde für unsere Pilotstudie ein Sequentialplan mit einer Gesamtpatientenzahl von 112 entwickelt. Diesem zweiphasigen Sequentialplan lagen ein Effektmaß von 0,57, eine Power von 80 %, ein zweiseitiges globales Niveau von $\alpha = 0,05$ und ein Shape-Parameter von 0,3 zugrunde. Nach der ersten Stufe sollte frühzeitig sowohl zugunsten als auch gegen die Nullhypothese (H_0) entschieden werden können. Als H_0 wurde die positive Wirksamkeit von L-Arginin in Bezug auf die Hauptzielkriterien (siehe 2.4.1. Hauptzielkriterien) zugrunde gelegt. Unter einer positiven Wirksamkeit ist eine Verbesserung der kombinierten kardiovaskulären Endpunkte im Vergleich zur Placebothherapie zu verstehen. Es wurde zweiseitig getestet und die kritischen Werte für die Ablehnung der H_0 lagen in der ersten Stufe bei 2,299 und zur Ablehnung der Alternativhypothese (H_1) bei 0,969. In der zweiten Stufe betrug der kritische Wert bezogen auf die H_1 2.00. Die entsprechenden nominellen p-Werte waren 0,022 und 0,333 in der ersten Stufe und 0,045 in der zweiten Stufe. Eine graphische Darstellung der kritischen Werte ist unter 7.1. *Interimsanalyse* wiedergegeben. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für alle anderen Studienkriterien für $p < 0,05$ festgelegt.

2.7.2. Studiauswertung

Die benutzten Programme zur Datenerhebung und Auswertung waren Microsoft Office Excel 2001 und XP sowie SPSS (Statistical Product and Service Solutions) Version 13, 14 und 16. Zur graphischen Darstellung von Strukturformeln wurde das Programm Isis Draw 2.5 von MDL Information System verwendet (siehe 7.17. Materialien). Angaben zum Patientenkollektiv wurden in absoluten Zahlen gemacht. Relative Häufigkeiten (%) wurden in Klammern angegeben. Zur statistischen Auswertung wurden der Medianwert und der 95 % Vertrauensintervall (CI) vom Mittelwert berechnet. In den graphischen Darstellungen wurde der Median als Querbalken und der Interquartilbereich als Kasten dargestellt. Als Interquartilbereich wurde die Differenz zwischen dem 75 %- und dem 25 %-Perzentil definiert. Ausreißer wurden als vertikale Linien in die Darstellungen aufgenommen und

Extremwerte als separate Datenpunkte. Als Ausreißer wurden Werte klassifiziert, deren Abstand vom 25 %-Perzentil nach unten bzw. vom 75 %-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Kastenhöhe lagen. Als Extremwerte wurden solche angesehen, deren Abstand vom dem 25 %- oder dem 75 %-Perzentil mehr als das 3fache der Kastenhöhe betrug.

Des Weiteren wurden diverse statistische Tests durchgeführt. Alle Daten wurden vor der statistischen Auswertung auf Normalverteilung geprüft. Die Varianzhomogenität wurde mit Hilfe des F-Tests ermittelt. Die Signifikanztests wurden je nach Gruppen und Verteilung als gepaarter oder ungepaarter t-Test, als Wilcoxon-Test oder Mann Whitney U-Test durchgeführt. p-Werte $< 0,001$ wurden als 0,000 angegeben. Der Vergleich der relativen Häufigkeiten erfolgte mit Hilfe von Kreuztabellen und dem χ^2 -Test bzw. Test von Fisher. Die Korrelation zwischen zwei Parametern wurde nach Pearson oder Spearman berechnet.

2.8. Methoden-Entwicklung für die Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

Zur Bestimmung von MDA in nativem Plasma wurde eine zusätzliche und neue Methode entwickelt, die auf der Azidität von MDA ($pK_s = 5,0$) beruht. Als interne Standards wurden d_0 -MDA und d_2 -MDA eingesetzt, die aus Tetraethoxypropan und deuteriertem Tetraethoxypropan durch Hydrolyse gewonnen wurden. Als Messmethoden wurden die GC/MS und die GC/MS/MS eingesetzt. Die benutzten Programme zur Datenauswertung waren Microsoft Excel und SPSS, das Programm zur Darstellung von Strukturformeln Isis Draw (siehe 7.17. Materialien).

2.8.1. Herstellung der internen Standards

Die Herstellung der Standardlösungen von d_0 -MDA und d_2 -MDA erfolgte aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropan und 1,3,- d_2 -1,1,3,3-Tetraethoxypropan. Zur Herstellung wurden jeweils 12,5 mg in 50 ml 0,1 M Salzsäure gelöst und bei 40 °C für 1 h inkubiert (Kwon und Watts 1963, Allevi et al. 1994, Filipe et al. 2002). Zur Standardisierung der hergestellten Stammlösungen wurden diese mit Hilfe der UV/VIS-Spektralphotometrie auf ihren Gehalt an d_0 -MDA bzw. d_2 -MDA überprüft. Hierfür wurde je eine Messlösung durch eine 1:12-Verdünnung (V:V) mit 0,1 M Salzsäure hergestellt. Die Messlösungen wurden nacheinander Mittels UV/VIS-Spektralphotometrie in einer Halbmikro-Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil® mit einem Specord 50 der Firma Analytik Jena vermessen (siehe 7.16. Geräte, 7.17. Materialien). Zur Identifikation der Absorptionsmaxima wurde zuerst für jede Messlösung ein Spektrum über einen Wellenlängenbereich von 200 - 500 nm aufgezeichnet. Die Absorptionsmaxima zeigten sich bei einer Wellenlänge von 246 nm (Abbildung 4). Zur Kontrolle wurde auch ein Spektrum für 0,1 M HCl aufgezeichnet. Die Absorption der 0,1 M HCl betrug bei der Wellenlänge von 246 nm ca. 0,1 (Abbildung 4) und wurde somit bei der Berechnung der Konzentrationen der internen Standards vernachlässigt.

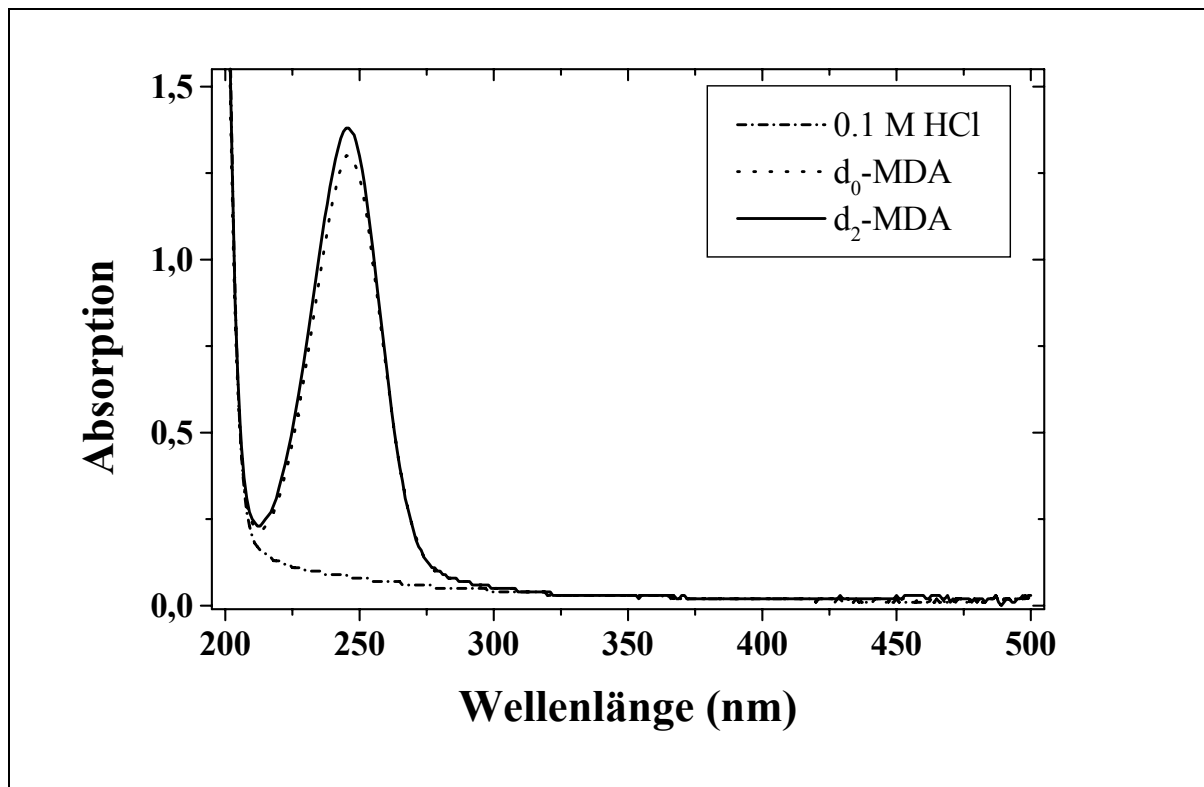


Abbildung 4: UV/VIS Spektrum von d_0 -MDA, d_2 -MDA und 0,1M HCl

Anschließend wurde die Absorption beider Messlösungen bei einer Wellenlänge von 246 nm bestimmt. Es ergaben sich Absorptionen von 1,30 für die d_0 -MDA-Messlösung und 1,38 für die d_2 -MDA-Messlösung. Die Konzentrationen der beiden Stammlösungen wurden unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) und des Verdünnungsfaktors mit Hilfe des Lambert'schen Gesetzes ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$) berechnet. In dieser Formel steht A für die Absorption, ϵ für den molaren Extinktionskoeffizienten, c für die Konzentration der Lösung und d für die Schichtdicke der verwendeten Küvette. Der ϵ -Wert von MDA beträgt $13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 245 nm (Filipe et al. 2002). Die Konzentration der d_0 -MDA-Stammlösung errechnete sich als 1,14 mM und die der d_2 -MDA-Stammlösung als 1,21 mM.

Im Anschluss erfolgte die Analyse der Stammlösungen von d_0 -MDA und d_2 -MDA mittels GC/MS und GC/MS/MS zur Ermittlung der isotopischen Reinheit. Die GC/MS- und GC/MS/MS-Analyse der Standardlösungen ergab für beide Messmethoden einen Anteil von etwa 0,37 % d_2 -MDA im d_0 -MDA-Standard. Der d_2 -MDA-Standard wies einen d_0 -MDA-Anteil von etwa 0,23 % für beide Messmethoden auf.

Aus den Stammlösungen wurden anschließend Standardlösungen mit einer Konzentration von je $10 \mu\text{M}$ hergestellt. Sowohl die Methodenentwicklung als auch die Validierung wurden mit diesen Lösungen durchgeführt.

2.8.2. Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma

Die Bestimmung von MDA in Plasma erfolgt in Anlehnung an die Methode zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat nach Tsikas (2000).

Die Plasmaproben wurden aufgetaut, gerüttelt und 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. 100 µl Plasma wurden entnommen und mit 10 µl des 10 µM d₂-MDA-Standards versetzt. Nach kurzem Rütteln der Proben wurden 400 µl Aceton und 10 µl PFB-Br hinzugegeben, die Proben erneut gerüttelt, und 1 h bei 50 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurde 25 min lang unter Stickstoff eingeeengt und die Rückstände mit 1 ml Toluol versetzt. Die Extraktion erfolgte durch Rütteln für 1 min und anschließendes Zentrifugieren für 5 min bei 2000 x g. Die Überstände wurden in Autosamplergläschen überführt und mittels GC/MS/MS und GC/MS analysiert.

Die Methodenentwicklung erfolgt mit Hilfe eines Qualitätskontrollplasmas, das sowohl für Einzelbestimmungen als auch für das Erstellen von Standardkurven verwendet wurde.

2.8.3. Messung von MDA als PFB-Derivat mittels GC/MS

Zur Bestimmung von MDA mittels GC/MS wurde eine Optima 17 (15 m x 0,25 mm ID) Säule von Macherey-Nagel verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte im NICI-Modus. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, und als Injektionsmodus wurde der Splitlos-Modus gewählt. Die initiale Temperatur des GC-Ofens betrug 70 °C, die für 1 min beibehalten wurde, und anschließend mit einer Heizrate von 20 °C/min auf eine Endtemperatur von 280 °C erhöht wurde. Die Injektortemperatur betrug 200 °C, der Trägergasdruck (Helium) 35 kPa, der Methandruck 200 Pa und die Temperatur vom Interface 260 °C. Gemessen wurde im SIM-Modus. Für die Ionenquellentemperatur wurden 180 °C und für die Quadrupoltemperatur 120 °C gewählt. Die Elektronenenergie betrug 230 eV und der Elektronenstrom 300 µA. Zur GC-MS-Bestimmung von MDA wurden die Ionen mit m/z von 251 und m/z 253 und eine Scanzeit von 50 ms/Ion gewählt.

2.8.4. Messung von MDA als PFB-Derivat mittels GC/MS/MS

Die verwendete Säule für die Bestimmung von MDA mittels GC/MS/MS war eine Optima 5-MS (30 m x 0,25 mm ID) von Macherey-Nagel. Als Messmodus wurde NICI gewählt. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl und die Injektionsgeschwindigkeit 10 µl/s. Die Injektion erfolgte als Druckstoßinjektion mit 124 kPa im PTV-Modus, und die Starttemperatur betrug 70 °C. Die anschließende Aufheizung erfolgte mit einer Heizrate von 10 °C/s auf 320 °C. Der GC-Ofen hatte eine initiale Temperatur von 80 °C, die für 2 min gehalten wurde. Anschließend erfolgte eine Aufheizung in Heizraten von 20 °C/min auf eine Endtemperatur von 340 °C, die für 1 min beibehalten wurde. Der Trägergasstrom (Helium) wurde auf 1 ml/min und das Interface auf eine Temperatur von 280 °C eingestellt. Gemessen wurde im SRM-Modus mit einer Elektronenenergie von 200 eV und einem Elektronenstrom von 300 µA. Der Ionenquellendruck (Methan) betrug 530 Pa und die Ionenquellentemperatur 180 °C. Für den Stoßkammerdruck (Argon) wurden 0,27 Pa gewählt. Zur Bestimmung von MDA wurden die Übergänge der Ionen mit m/z von 251 bzw. 253 auf die Ionen mit m/z von 175 bzw. 177 ausgewählt. Die Kollisionsenergie betrug 15 eV, und die Scanzeit für die einzelnen Ionen wurde auf 100 ms festgelegt.

2.8.5. Methodvalidierung zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat

Die Methodvalidierung wurde separat für die GC/MS-Methode und für die GC/MS/MS-Methode durchgeführt. Es erfolgte die Bestimmung der Selektivität, Präzision, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Empfindlichkeit und die des Bestimmungsbereiches für jede Methode.

2.8.5.1. Bestimmung der Selektivität

Die Beurteilung der Selektivität der Methode erfolgte mit Hilfe des internen Standards. Es wurden separate Aufarbeitungen des internen Standards in Pufferlösung und im Plasma durchgeführt sowie eine separate Aufarbeitung des Plasmas ohne Zugabe des internen Standards. Die Chromatogramme aus den Analysen wurden hinsichtlich der relevanten Ionen und Retentionszeiten verglichen.

2.8.5.2. Bestimmung der Präzision, Richtigkeit, Linearität und Empfindlichkeit

Für die Validierung wurden Standardkurven mit 11 Konzentrationspunkten in Doppelbestimmungen an 5 verschiedenen Tagen erstellt. Die Werte aller Konzentrationspunkte der 5 Standardkurven wurden für die Bestimmungen herangezogen. Die Konzentrationsbereiche der Standardkurven wurden von 0 - 2 μM gewählt. Die Abstände zwischen den einzelnen Punkten betragen 0,2 μM . Als Matrix wurde Humanplasma verwendet, das in Glas bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Die Derivatisierung erfolgte wie unter 2.8.2. *Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma* beschrieben.

Die Berechnung der mittleren Präzision (precision) als relative Standardabweichung (RSD) eines Tages sowie der mittleren Präzision von Tag zu Tag erfolgte mit Hilfe der erstellten Standardkurven.

Die Richtigkeit wurde als Wiederfindungsrate (recovery) angegeben und ebenfalls mit Hilfe der Standardkurven ermittelt. Die Wiederfindungsrate wurde wie folgt berechnet: Von der gemessenen MDA-Konzentration wurde der MDA-Basalwert subtrahiert, die Differenz ins Verhältnis zur zugesetzten MDA-Konzentrationen gesetzt und der Quotient mit 100 multipliziert.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) wurden 100 μl Aliquots der 1 μM d_2 -MDA-Standardlösung in Phosphatpuffer derivatisiert und nach Vorschrift aufgearbeitet. 1 μl der Toluolphase wurden in die GC/MS und in die GC/MS/MS injiziert. Im SIM-Modus wurde die Detektion der Ionen mit m/z von 253 und 177 durchgeführt. Unter der Annahme, dass die Ausbeute quantitativ war, entsprach das injizierte Volumen von 1 μl einer Konzentration von 100 fmol d_2 -MDA. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden von der Toluolphase Verdünnungen (1:100, 1:1000 als V:V) hergestellt und injiziert. Das minimale akzeptable Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) wurde per Definition zu 3:1 festgelegt.

Die Ermittlung der Linearität und der Empfindlichkeit wurde mit Hilfe der Regressionsgeraden, Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße (R^2) der Standardkurven bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß gibt Aufschluss über die Linearität, wobei ein Wert von 1,000 einen perfekten linearen Zusammenhang widerspiegelt. Die Empfindlichkeit beschreibt wie stark ein Messergebnis auf Konzentrationsänderungen reagiert und ergibt sich aus der Änderung der gemessenen Konzentration bei Änderung der zugesetzten Konzentration. Bei direkter Proportionalität entspricht die Empfindlichkeit der Steigung der Regressionsgeraden.

2.8.5.3. Bestimmungsbereich

Als Bestimmungsbereich wurde der Konzentrationsbereich definiert in dem die Standardkurven einen linearen Verlauf aufwiesen.

2.8.6. Vergleich der Messverfahren zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

Zum Vergleich der Messverfahren GC/MS und GC/MS/MS wurde die Auswertungsmethode von Bland und Altman (1986) sowie die Berechnung der Korrelation nach Pearson angewendet.

Die Analyse nach Bland und Altman erfolgte graphisch. Hierzu wurden die Differenzen der MDA-Plasmakonzentrationen beider Methoden gegen die jeweiligen Mittelwerte der entsprechenden MDA-Plasmakonzentrationen beider Methoden aufgetragen. Zusätzlich wurden die Grenzen von ± 2 SD definiert. In dieser Darstellung lassen sich Unterschiede der Methoden durch die Abweichung vom Mittelwert festlegen. Bei dieser Auswertung ist die klinische Relevanz der jeweiligen Abweichungen unbedingt zu berücksichtigen.

2.8.7. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und als PFBox-Derivat

Als einen weiteren Aspekt der Arbeit wurde die entwickelte Methode zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat mit der in der Pilotstudie verwendeten Literaturmethode von Luo et al. (1995) als PFBox-Derivat verglichen. Hierfür wurden die Studienplasmaproben zusätzlich zur Derivatisierung mit PFBox (siehe 2.6.12. Bestimmung von MDA und HNE in Plasma) auch gemäß Methodenbeschreibung mit PFB-Br derivatisiert (siehe 2.8.2. Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma) und mittels GC/MS/MS bestimmt (siehe 2.8.4. Messung von MDA als PFB-Derivat mittels GC/MS/MS). Die Messergebnisse beider Methoden wurden nach Bland und Altman (1986) und durch Berechnung der Korrelation nach Spearman analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientenkollektiv

3.1.1. Patientenzahl

Für die Studie wurden in den beiden Studienzentren insgesamt 364 Patienten gesichtet. Von den gesichteten Patienten wurden 310 aufgeklärt und 134 nach Einwilligung in die Studie eingeschlossen. 83 fielen dabei auf das Studienzentrum Oldenburg und 51 auf das Zentrum in Magdeburg. Insgesamt brachen von den 134 eingeschlossenen Patienten 74 Patienten die Studie ab. Davon fielen 47 Patienten auf Grund von Nichterfüllen der Einschlusskriterien sofort nach Studieneinschluss wieder aus dem Patientenkollektiv heraus. Bei 25 Patienten von ihnen wurde keine Angioplastie sondern lediglich eine Angiographie durchgeführt, und bei 19 Patienten wurde ein Befund zur Bypass-Operation gestellt. Weitere 3 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien nicht auf Grund eines erhöhten Kreatinin-Wertes, einer erfolglosen PTCA und der PTCA eines Bypass-Gefäßes. Die Studie wurde von 13 Patienten vorzeitig auf Grund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen abgebrochen, und von einem Patienten auf Grund einer längeren Einnahmepause der Studien-Medikation. 4 Patienten beendeten die Studie vorzeitig aus persönlichen Gründen und 9 Patienten aus nicht angegebenen Gründen. Die Pilotstudie protokollkonform beendet haben insgesamt 60 Patienten, von denen 31 Patienten auf die Verumgruppe und 29 Patienten auf die Placebogruppe entfielen. Diese Patienten werden im Folgenden als Studienteilnehmer bzw. Patientenkollektiv bezeichnet und wurden zur Berechnung der relativen Häufigkeiten berücksichtigt.

3.1.2. Demographische Verteilung

Eingeschlossen wurden Patienten beiderlei Geschlechts im Alter von 43 bis 76 Jahren. Die Angaben zur demographischen Verteilung der Studienteilnehmer sind in Tabelle 1 gruppenweise wiedergegeben. Beide Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die demographische Verteilung auf.

Tabelle 1: Demographische Verteilung des Patientenkollektivs

Demographische Verteilung	Total	Placebo	Verum	p
Alter [Jahre]	62	62	62	0,905
Body Mass Index (BMI)	27	27	27	0,938
Geschlecht				0,605
männlich	48 (80)	24 (83)	24 (77)	
weiblich	12 (20)	5 (17)	7 (23)	
Größe [cm]	172	172	172	0,826
Körpergewicht [kg]	80	80	79	0,803

Die Angaben zum Patientenkollektiv sind in absoluten Zahlen, relative Häufigkeiten (%) sind in Klammern angegeben. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 angenommen.

3.1.3. Begleiterkrankungen

Die Begleiterkrankungen des Patientenkollektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Begleiterkrankungen konnten zwischen den beiden Gruppen nicht ermittelt werden.

Tabelle 2: Begleiterkrankungen des Patientenkollektivs

Begleiterkrankungen	Total	Placebo	Verum	p
Adipositas (BMI > 25)	48 (80)	23 (79)	25 (81)	0,897
Apoplex / TIA	2 (3)	0 (0)	2 (7)	0,492
Diabetes mellitus	18 (30)	9 (31)	9 (29)	0,866
Familiäre kardiovaskuläre Vorgeschichte	42 (70)	20 (69)	22 (71)	0,866
Hypercholesterinämie	46 (77)	20 (69)	26 (84)	0,173
Hypertonie	43 (72)	19(66)	24 (77)	0,307
KHK mit Z.n. ACVB	4 (7)	1 (3)	3 (10)	0,613
KHK mit Z.n. MI	16 (27)	10 (35)	6 (19)	0,185
KHK mit Z.n. PTCA / Stent	16 (27)	10 (35)	6 (19)	0,185
Nikotinabusus	44 (73)	21 (72)	23 (74)	0,876
PAVK	7 (12)	3 (10)	4 (13)	1,000
Patienten mit Hochrisikofaktoren (Apoplex / TIA, KHK mit Z.n. ACVB, MI oder PTCA / Stent)	29 (48)	15 (52)	14 (45)	0,611

3.1.4. Intervention

Beim Patientenkollektiv wurden zum Studieneinschluss 7 PTCA's und 53 PTCA's mit Stent durchgeführt. Davon entfielen auf die Verumgruppe 5 PTCA's (71 %) und auf die Placebogruppe 2 PTCA's (29 %). Von den betroffenen Gefäßen wurden bereits 5 zu einem früheren Zeitpunkt aufgedehnt. Von diesen 5 Rekanalisationen entfielen 1 auf die Verumgruppe und 4 auf die Placebogruppe. Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Verteilung der PTCA's ($p = 0,426$) und auf die Verteilung der Rekanalisationen ($p = 0,188$) pro Gruppe konnte nicht aufgezeigt werden.

3.1.5. Begleitmedikation

Die Tabelle 3 zeigt die Begleitmedikation, die von den Studienteilnehmern der beiden Gruppen während der Pilotstudie eingenommen wurde. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Begleitmedikation konnten zwischen den beiden Gruppen nicht ermittelt werden.

Tabelle 3: Begleitmedikation des Patientenkollektivs

Begleitmedikation	Total	Placebo	Verum	p
α_2 -Blocker	2 (3)	1 (3)	1 (3)	1,000
ACE-Hemmer	25 (42)	11 (38)	14 (45)	0,570
Aggregationshemmer	60 (100)	29 (100)	31 (100)	*
AT ₁ -Blocker	13 (22)	5 (17)	8 (26)	0,421
β -Blocker	47 (78)	24 (83)	23 (74)	0,421
Calcium-Kanal-Blocker	10 (17)	6 (21)	4 (13)	0,500
Diuretika	20 (33)	10 (35)	10 (32)	0,855
Herzglykoside	2 (3)	1 (3)	1 (3)	1,000
Insulin	3 (5)	2 (7)	1 (3)	0,606
Lipidsenker	42 (70)	18 (62)	24 (77)	0,195
Nitrate	25 (42)	12 (41)	13 (42)	0,965
Orale Antidiabetika	9 (15)	6 (21)	3 (10)	0,292

*: auf Grund der 100 %igen relativen Häufigkeiten in beiden Gruppen wurde keine statistische Auswertung mittels Fischer-Test durchgeführt.

Von den 18 Patienten mit Diabetes mellitus, die gleichmäßig auf beide Gruppen verteilt waren, wurden in der Placebogruppe 7 Patienten medikamentös therapiert (5x orale Antidiabetika, 1x Insulin, 1x beides), in der Verumgruppe lediglich 4 Patienten (3x orale Antidiabetika, 1x Insulin). Dieser Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant ($p = 0,327$).

3.2. Hauptzielkriterien

3.2.1. Auswertung der kardiovaskulären Ereignisse

Kardiovaskuläre Ereignisse traten bei insgesamt 9 Patienten auf. Bei 7 dieser Patienten traten Restenosen der dilatierten Gefäße auf, die zusätzlich noch von 2 neuen Stenosen und einem subakuten Vorderwandinfarkt begleitet wurden. Ein achter Patient wurde auf Grund von zunehmenden Angina-pectoris-Beschwerden stationär aufgenommen, bei einem neunten Patienten wurde eine neue Stenose diagnostiziert.

2 der kardiovaskulären Ereignisse traten in der Placebogruppe auf, alle anderen ereigneten sich in der Verumgruppe. Die Restenosen wurden in beiden Gruppen in einem Zeitraum von 3 Wochen bis 5 Monaten diagnostiziert, die neue Stenose erst nach 6 Monaten bei der Enduntersuchung. Kein Patient verstarb im Zeitraum der Studie.

Die statistische Auswertung der ersten Stufe der Interimsanalyse mittels Fischer-Test deutete auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen hin. Der p-Wert betrug 0,148, das durch die Interimsanalyse vorgegebene Signifikanzniveau 0,022. Mittels Fischer Test, ergab die retrospektive Berechnung der Power einen Wert von 25 %. Für ein signifikantes Ergebnis zu Gunsten der Placebo-Therapie und einer Power von 80 % hätten insgesamt 88 Patienten pro Gruppe rekrutiert werden müssen. Tabelle 4 zeigt die kardiovaskulären Ereignisse, die in den beiden Gruppen während der Pilotstudie auftraten. Zusätzlich ist die Dauer der Studienteilnahme in Tagen vermerkt, die gleichzusetzen ist mit der Studienmedikations-Exposition dieser Patienten.

Tabelle 4: Hauptzielkriterien, die im Studienverlauf von Patienten der beiden Gruppen erreicht wurden

Gruppe	Patient	Hauptzielkriterium	Dauer der Studienteilnahme [Tagen]
Placebo	005	Stenose	180
	118	Restenose	96
Verum	009	Restenose u. Stenose	21
	105	AP-Beschwerden Krankenhausaufenthalt	116
	111	Restenose	56
	115	Restenose	124
	116	Restenose u. Vorderwandinfarkt	43
	122	Restenose	153
	129	Restenose u. Stenose	85

In einer weiterführenden Analyse wurden die Einschlussdaten der 9 Patienten mit erfüllten Hauptzielkriterien mit denen des restlichen Patientenkollektivs ($n = 51$) verglichen. Die Gruppe mit den erfüllten Hauptzielkriterien zeigte im Vergleich zum restlichen Pobandenkollektiv unter anderem einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der kardiovaskulären Vorgeschichte auf ($p = 0,020$). In der Gruppe mit erfüllten Hauptzielkriterien wiesen insgesamt 2 Patienten (22 %) einen Zustand nach Apoplex auf, in dem restlichen Patientenkollektiv keiner. Ein weiterer signifikanter Unterschied bestand zwischen den CRP-Konzentrationen im Plasma ($p = 0,035$). Bei der Gruppe mit erfüllten Hauptzielkriterien wurde zu Studienbeginn eine mediane CRP-Konzentration von 2,77 mg/l gemessen, im Restpatientenkollektiv eine mediane Konzentration von nur 1,50 mg/l. Abbildung 5 zeigt die CRP-Konzentration der Patienten mit erfüllten Hauptzielkriterien im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv.

Ein signifikanter, nicht aber relevanter Unterschied bestand in der mittleren Körpergröße ($p = 0,021$). Die Gruppe mit erfüllten Hauptzielkriterien wies eine mittlere Körpergröße von 167 cm auf, das restliche Patientenkollektiv eine von 173 cm.

Bei der Analyse des Patientenkollektivs mit kardiovaskulären Ereignissen war weiterhin auffällig, dass sich 7 der 9 Ereignisse bei Patienten aus dem Studienzentrum Magdeburg ereigneten ($p = 0,023$). Auf Grund dieses signifikanten Unterschiedes wurde das gesamte Patientenkollektiv zusätzlich noch nach Studienzentrum unterteilt und hinsichtlich der Einschlussparameter analysiert. Dabei entfielen auf das Studienzentrum Magdeburg 24 Patienten und auf das Studienzentrum Oldenburg 36 Patienten.

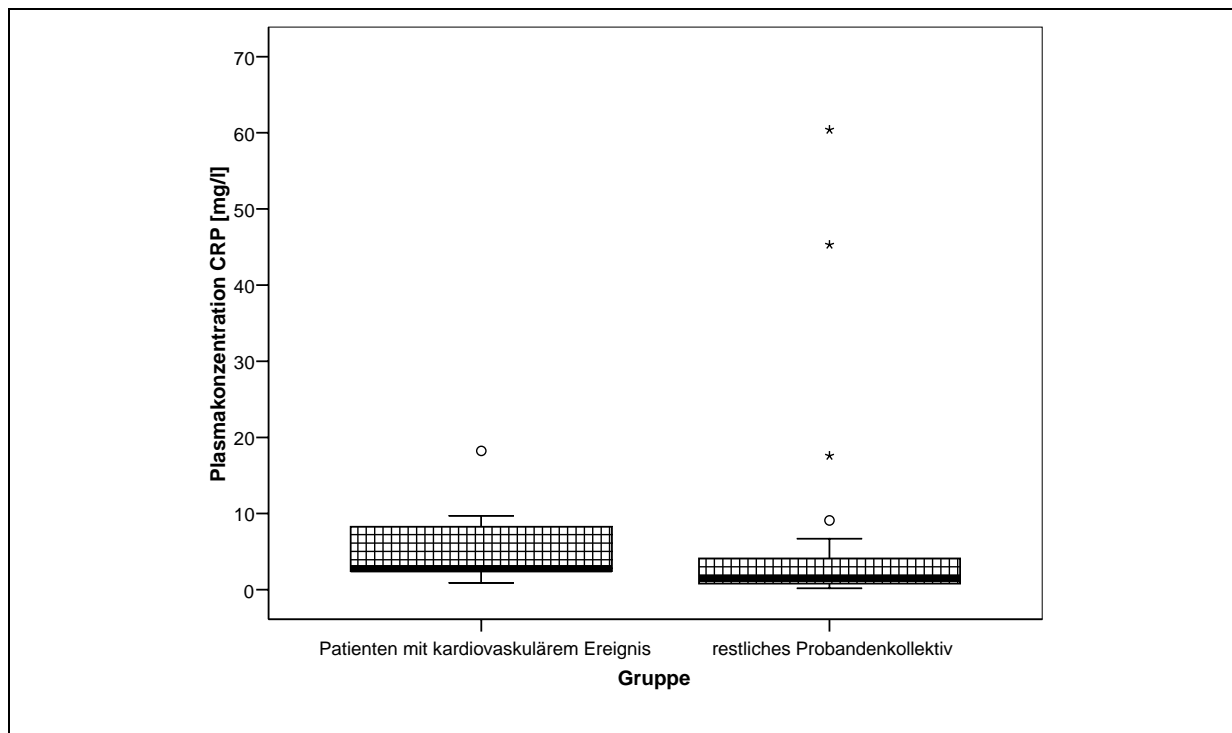


Abbildung 5: CRP-Konzentration zur U1 der Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis im Vergleich zum restlichen Probandenkollektiv

Der Median ist als Querbalken dargestellt, der Interquartilbereich zwischen dem 25 %-Perzentil und dem 75 %-Perzentil als Kasten. Ausreißer sind als vertikale Linien dargestellt, Extremwerte als separate Datenpunkte.

Signifikante Unterschiede zeigten sich z.B. hinsichtlich der kardiovaskulären Vorgeschichte. Hypertonie ($p = 0,026$) und Hypercholesterinämie ($p = 0,025$) waren in der Magdeburger Gruppe signifikant häufiger vertreten. In Bezug auf die Nebenzielparameter wiesen die Patienten in Magdeburg neben einer signifikant niedrigeren 8-iso-PGF_{2α}-, L-NNMA-, HNE- und DMA-Konzentration, auch eine signifikant höhere HDL-, Nitrit- und CRP-Konzentration auf. Die mediane CRP-Konzentration war im Studienzentrum Magdeburg doppelt so hoch wie im Studienzentrum Oldenburg. Die signifikanten Unterschiede der Nebenzielkriterien zur Eingangsuntersuchung zwischen den Studienzentren Magdeburg und Oldenburg sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Signifikante Unterschiede der Nebenzielkriterien zur Eingangsuntersuchung zwischen den Patienten aus Magdeburg und Oldenburg

Parameter	Studienzentrum Magdeburg		Studienzentrum Oldenburg		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
HDL [mg/dl]	1,29	1,14 – 1,37	1,05	0,98 – 1,18	0,025
8-iso-PGF _{2α} [nmol/l]	1,71	1,48 – 1,99	2,59	2,35 – 3,26	0,001
L-NMMA [μmol/l]	0,13	0,11 – 0,14	0,18	0,17 – 0,22	0,000
DMA [μmol/mmol Krea]	32,9	31,8 – 41,6	36,0	37,8 – 49,7	0,036
Nitrit Plasma [μmol/l]	1,73	1,59 – 2,16	1,40	1,19 – 1,52	0,002
Nitrit Urin [μmol/mmol Krea]	0,11	0,01 – 0,84	0,25	0,25 – 0,39	0,001
CRP [mg/l]	2,77	1,52 – 12,5	1,30	0,74 – 5,95	0,039
HNE [nmol/l]	372	345 – 475	612	623 – 812	0,000

3.3. Nebenzielkriterien

Die Auswertung der Nebenzielkriterien wurde ohne Korrektur des α -Fehlers durchgeführt, es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 angenommen.

Eine Tabelle mit Normwerten, sofern für die verwendete Labormethode bekannt, befindet sich in der Anlage unter 7.14. *Normwerte*.

3.3.1. Laborparameter

3.3.1.1. L-Arginin

Zu Studienbeginn konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der L-Arginin-Konzentration im Plasma der Verum- und Placebogruppe ermittelt werden. Zur Enduntersuchung nach sechs Monaten zeigte sich dagegen ein hoch signifikanter Unterschied. Die Verumgruppe wies eine deutlich höhere L-Arginin-Konzentration im Plasma auf als die Placebogruppe ($p < 0,001$) (Tabelle 6, Abbildung 6).

Auch für die L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin konnte in der Verumgruppe ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden. Der Anstieg der L-Arginin-Ausscheidungsrate war von der U1 zur U2 mit $p < 0,001$ hoch signifikant. Von der U2 zur U3 wurde allerdings ein leichter Abfall der Ausscheidungsrate beobachtet. Dieser Abfall zur U3 hin war nicht signifikant. Im direkten Vergleich der Ausscheidungsraten zur U1 und zur U3 zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) mit einer höheren L-Arginin-Ausscheidungsrate zur U3. Im Gruppenvergleich konnte sowohl zur U2 als auch zur U3 ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Verumgruppe verzeichnet werden (Tabelle 7, Abbildung 7).

Tabelle 6: L-Arginin-Konzentration im Plasma

L-Arginin [$\mu\text{mol/l}$]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	58,9	52,1 – 64,4	67,7	58,5 – 73,5	0,108
Plasma U3	60,6	52,9 – 66,4	94,7	87,4 – 112	0,000
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	58,9	52,1 – 64,4	60,6	52,9 – 66,4	0,674
Plasma Verum	67,7	58,5 – 73,5	94,7	87,4 – 112	0,000

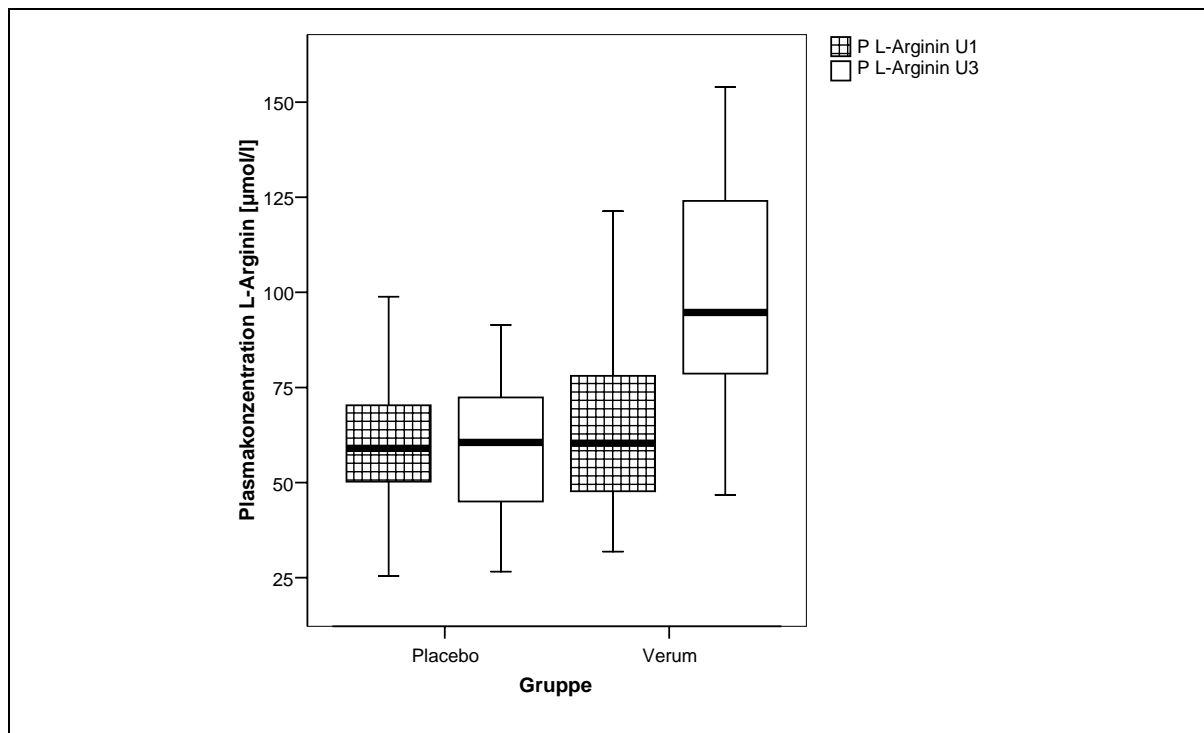


Abbildung 6: L-Arginin-Konzentration im Plasma

Tabelle 7: L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin

L-Arginin [µmol/mmol Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	2,38	2,23 – 3,07	2,76	2,39 – 3,33	0,518
Urin U2	2,59	2,45 – 3,71	5,10	4,47 – 6,69	0,000
Urin U3	2,71	2,40 – 3,51	3,55	3,67 – 6,05	0,004
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	2,38	2,23 – 3,07	2,59	2,45 – 3,71	0,142
Urin Verum	2,76	2,39 – 3,33	5,10	4,47 – 6,69	0,000
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	2,59	2,45 – 3,71	2,71	2,40 – 3,51	0,539
Urin Verum	5,10	4,47 – 6,69	3,55	3,67 – 6,05	0,607
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	2,38	2,23 – 3,07	2,71	2,40 – 3,51	0,122
Urin Verum	2,76	2,39 – 3,33	3,55	3,67 – 6,05	0,003

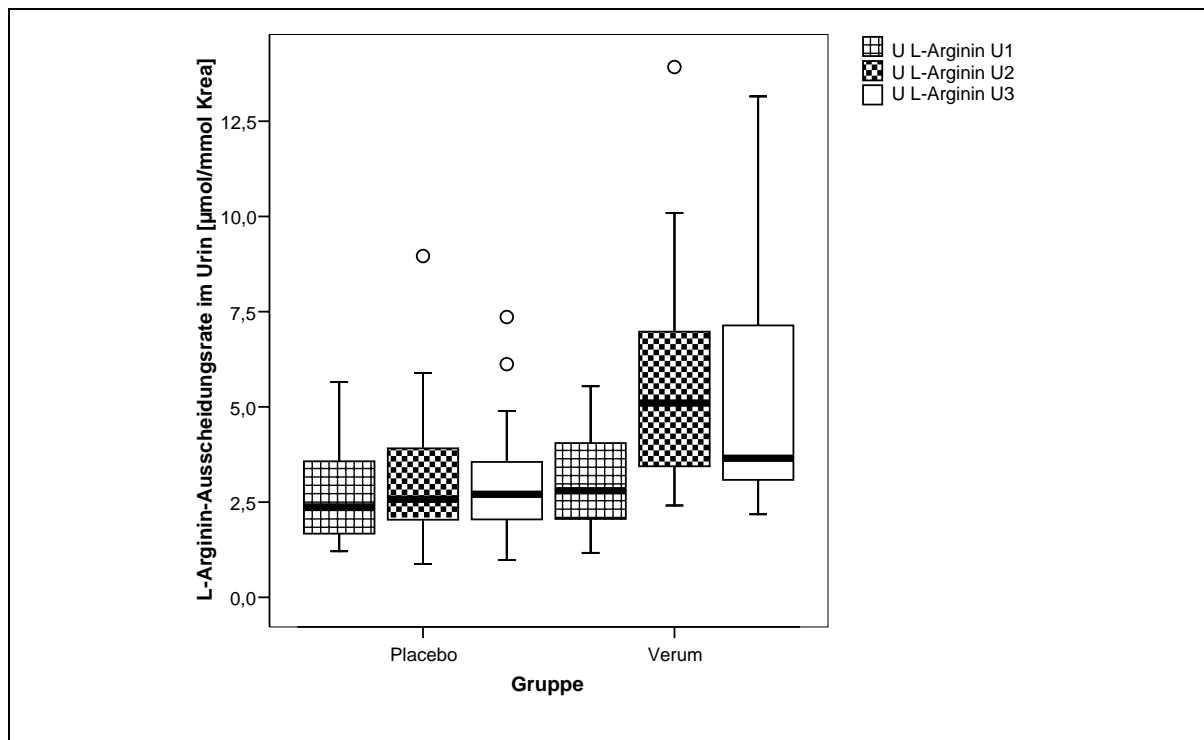


Abbildung 7: L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin

3.3.1.2. L-NMMA

Auch beim Studienparameter L-NMMA im Plasma konnte nach sechs Monaten zur U3 ein hoch signifikanter Anstieg in der Verumgruppe verzeichnet werden ($p < 0,001$). Der Gruppenvergleich zeigte eine deutlich höhere L-NMMA-Konzentration im Plasma der Verumgruppe auf ($p = 0,002$) (Tabelle 8, Abbildung 8).

Tabelle 8: L-NMMA-Konzentration im Plasma

L-NMMA [µmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	0,15	0,15 – 0,21	0,15	0,14 – 0,18	0,477
Plasma U3	0,15	0,13 – 0,18	0,24	0,20 – 0,28	0,002
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	0,15	0,15 – 0,21	0,15	0,13 – 0,18	0,188
Plasma Verum	0,15	0,14 – 0,18	0,24	0,20 – 0,28	0,000

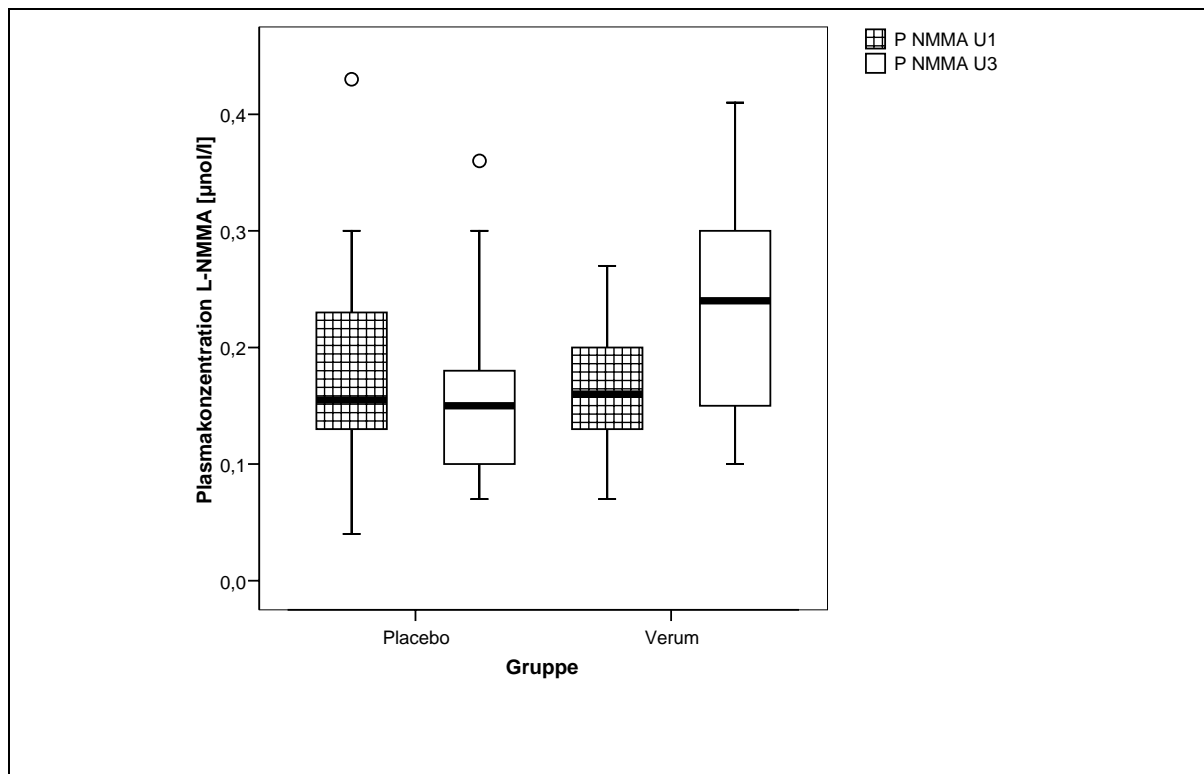


Abbildung 8: L-NMMA-Konzentration im Plasma

3.3.1.3. ADMA

Die ADMA-Konzentration im Plasma zeigte im Studienverlauf keine signifikanten Änderungen innerhalb der Gruppen oder zwischen den Gruppen (Tabelle 9, Abbildung 9). In der Verumgruppe konnte allerdings bezüglich der ADMA-Ausscheidungsrate im Urin ein signifikanter Anstieg von der U1 zur U2 verzeichnet werden ($p = 0,012$). Zusätzlich wies die Verumgruppe zum Zeitpunkt der U2 auch eine signifikant höhere ADMA-Ausscheidungsrate im Urin auf als die Placebogruppe ($p = 0,040$) (Tabelle 10, Abbildung 10).

Tabelle 9: ADMA-Konzentration im Plasma

ADMA [µmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	0,46	0,45 – 0,50	0,50	0,47 – 0,52	0,374
Plasma U3	0,47	0,44 – 0,62	0,50	0,46 – 0,53	0,544
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	0,46	0,45 – 0,50	0,47	0,44 – 0,62	0,962
Plasma Verum	0,50	0,47 – 0,52	0,50	0,46 – 0,53	0,782

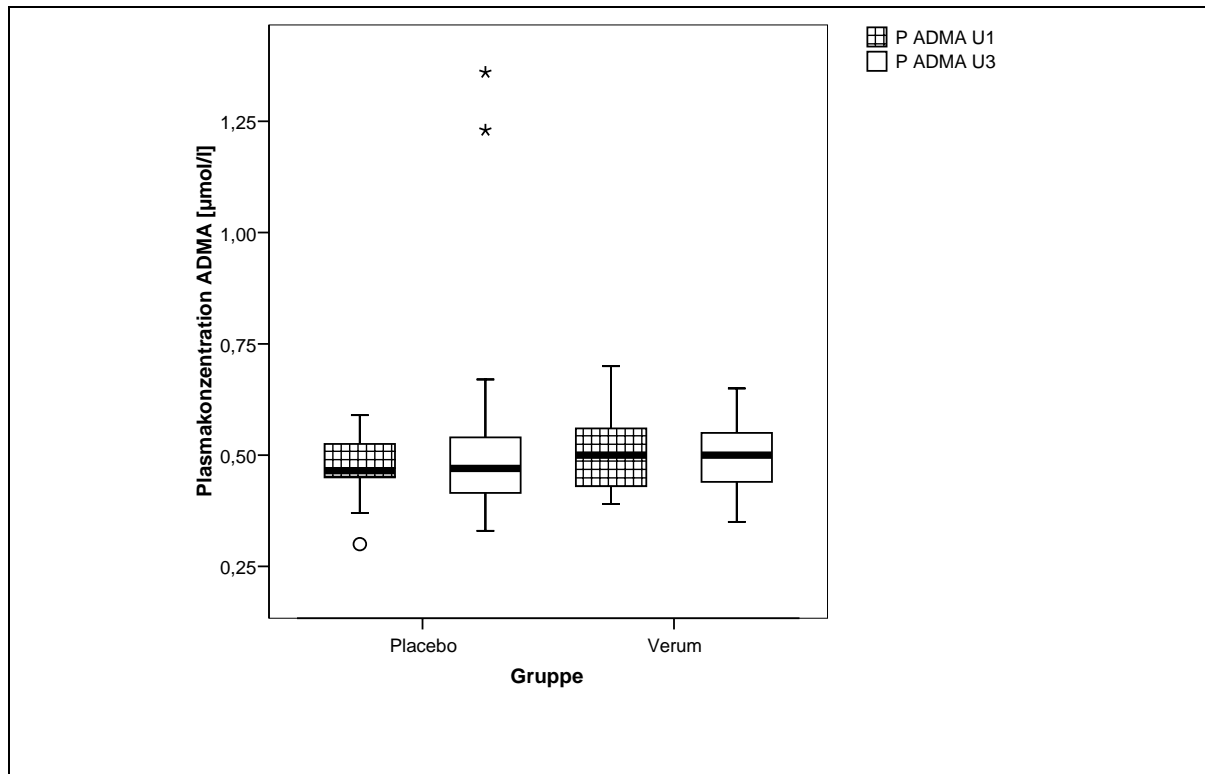


Abbildung 9: ADMA-Konzentration im Plasma

Tabelle 10: ADMA-Ausscheidungsrate im Urin

ADMA [µmol/mmol Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	3,58	3,52 – 4,53	4,10	3,73 – 4,85	0,299
Urin U2	3,77	3,48 – 4,26	4,29	4,07 – 5,10	0,040
Urin U3	3,67	3,31 – 4,30	4,24	3,81 – 5,04	0,123
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	3,58	3,52 – 4,53	3,77	3,48 – 4,26	0,345
Urin Verum	4,10	3,73 – 4,85	4,29	4,07 – 5,10	0,012
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	3,77	3,48 – 4,26	3,67	3,31 – 4,30	0,927
Urin Verum	4,29	4,07 – 5,10	4,24	3,81 – 5,04	0,939
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	3,58	3,52 – 4,53	3,67	3,31 – 4,30	0,239
Urin Verum	4,10	3,73 – 4,85	4,24	3,81 – 5,04	0,493

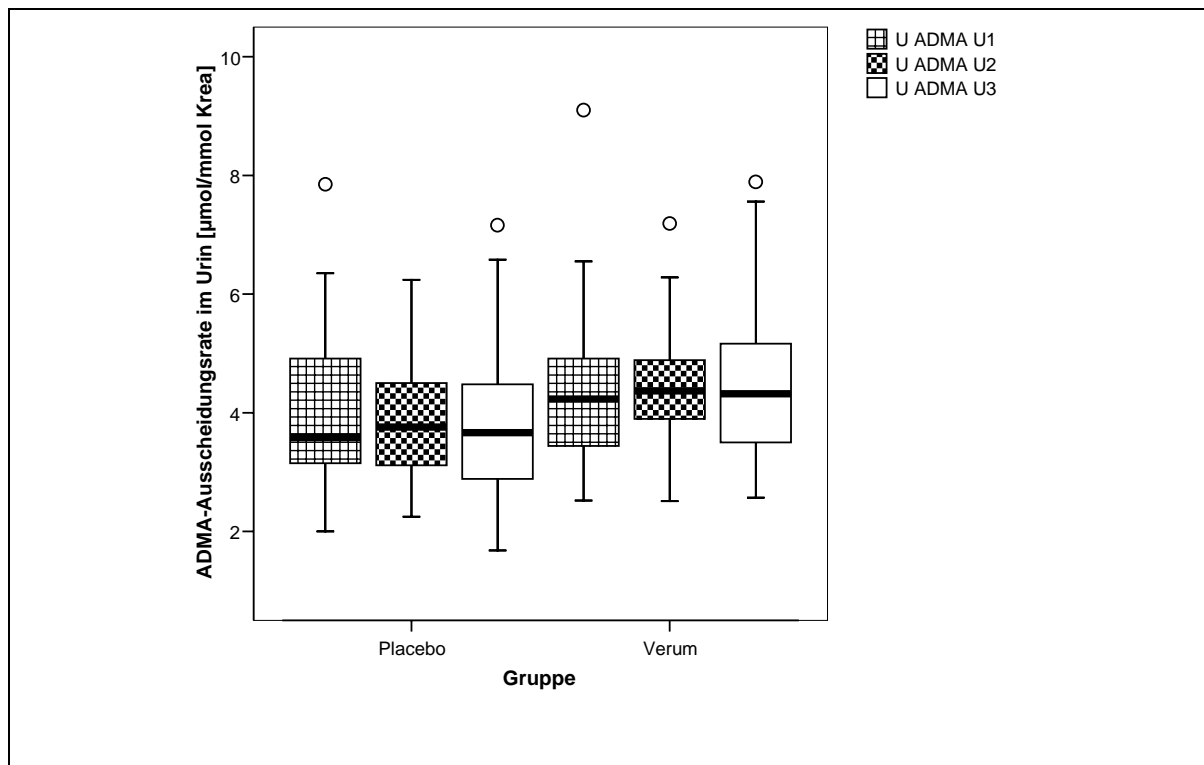


Abbildung 10: ADMA-Ausscheidungsrate im Urin

Das L-Arginin:ADMA-Molarverhältnis der Plasmakonzentrationen änderte sich im Studienverlauf von 135:1 auf 195:1 für die Verumgruppe und blieb für die Placebogruppe mit 122:1 zur U1 und 121:1 zur U3 konstant.

3.3.1.4. Nitrit

In Bezug auf die Nitrit-Konzentration im Plasma konnte kein signifikanter Unterschied über den Studienverlauf innerhalb einer Gruppe oder zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Tabelle 11, Abbildung 11).

Die Nitrit-Ausscheidungsrate im Urin der Placebogruppen wies dagegen einen statistisch signifikanten Anstieg von der U1 zur U2 auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Nitrit-Ausscheidungsrate im Urin bestand allerdings nicht zur U2 (Tabelle 12, Abbildung 12).

Tabelle 11: Nitrit-Konzentration im Plasma

Nitrit [µmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	1,60	1,36 – 1,93	1,55	1,32– 1,65	0,615
Plasma U3	1,43	1,26 – 1,55	1,51	1,27 – 1,84	0,669
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	1,60	1,36 – 1,93	1,43	1,26 – 1,55	0,207
Plasma Verum	1,55	1,32– 1,65	1,51	1,27 – 1,84	0,419

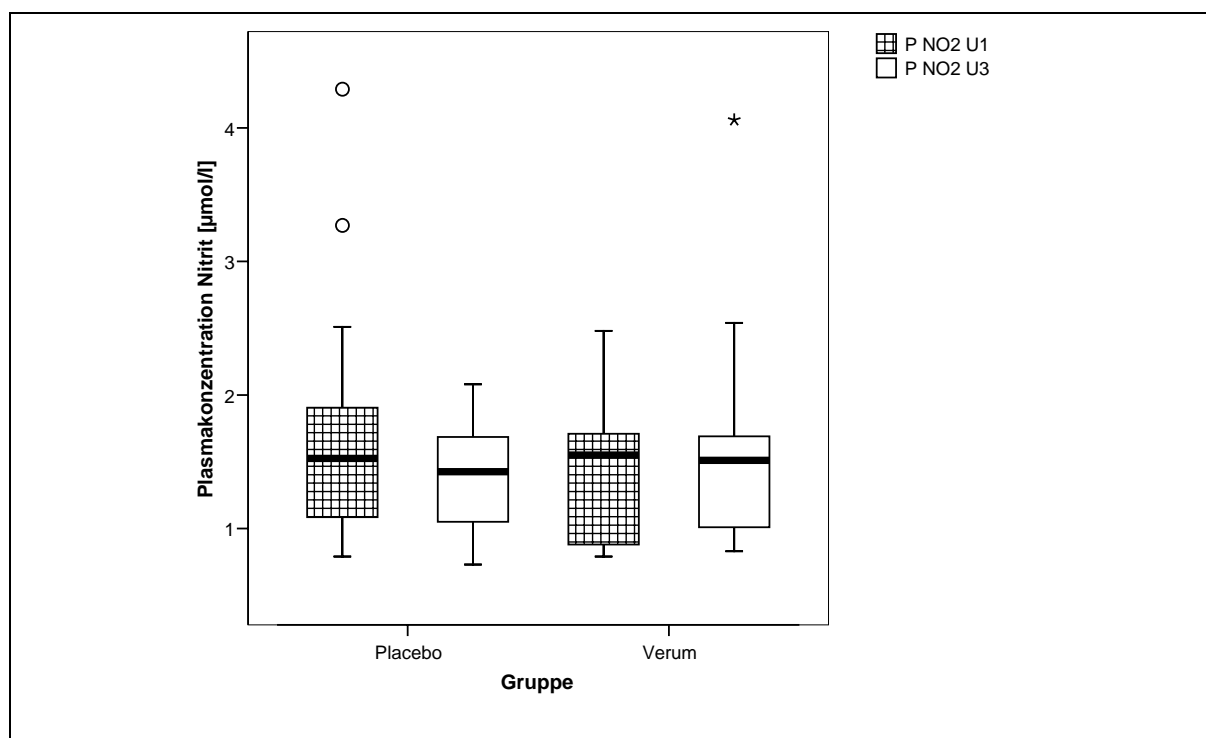


Abbildung 11: Nitrit-Konzentration im Plasma

Tabelle 12: Nitrit-Ausscheidungsrate im Urin

Nitrit [µmol/mmol Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	0,19	0,13 – 0,58	0,20	0,16 – 0,57	0,883
Urin U2	0,26	0,28 – 0,61	0,27	0,22 – 0,40	0,549
Urin U3	0,25	0,21 – 0,37	0,21	0,19 – 0,51	0,618
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	0,19	0,13 – 0,58	0,26	0,28 – 0,61	0,047
Urin Verum	0,20	0,16 – 0,57	0,27	0,22 – 0,40	0,929
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	0,26	0,28 – 0,61	0,25	0,21 – 0,37	0,060
Urin Verum	0,27	0,22 – 0,40	0,21	0,19 – 0,51	0,764
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	0,19	0,13 – 0,58	0,25	0,21 – 0,37	0,684
Urin Verum	0,20	0,16 – 0,57	0,21	0,19 – 0,51	0,819

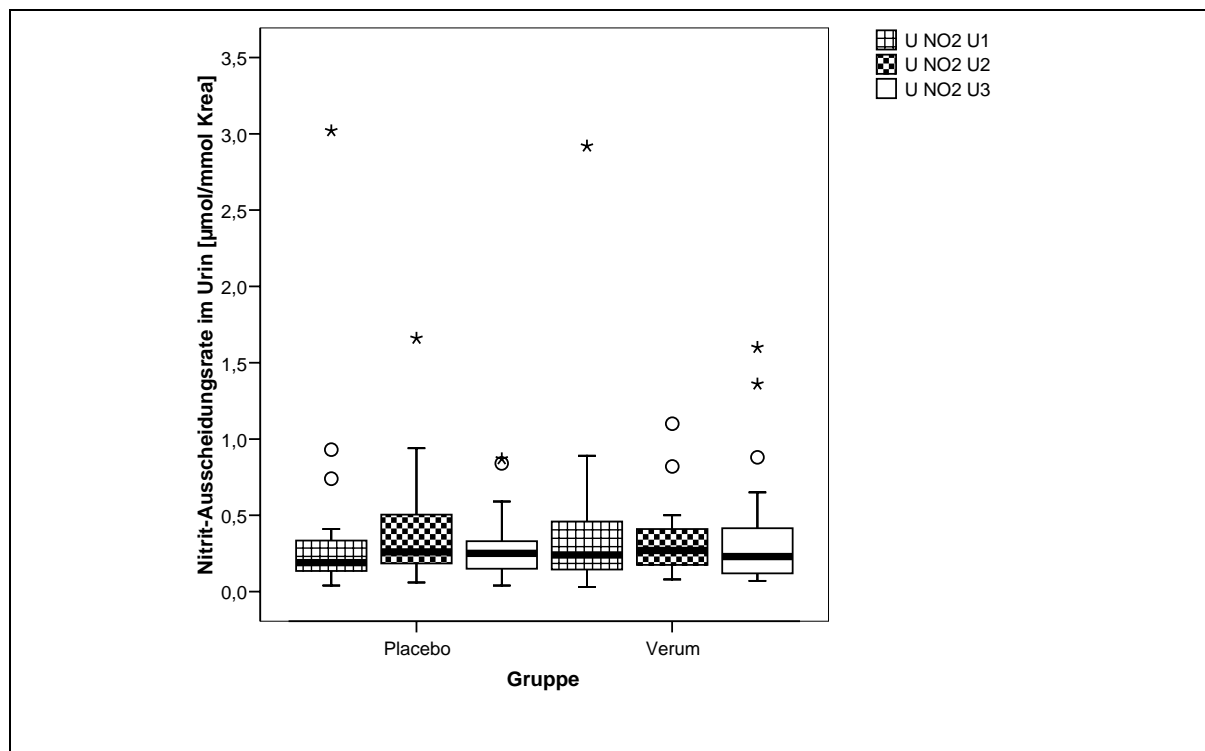


Abbildung 12: Nitrit-Ausscheidungsrate im Urin

3.3.1.5. Nitrat

Im Gegensatz zu der unveränderten Nitrit-Konzentration im Plasma konnte über den Studienzeitraum ein signifikanter Abfall der Nitrat-Konzentration im Plasma für die Placebogruppe verzeichnet werden ($p = 0,004$) (Tabelle 13, Abbildung 13). Dieser Abfall in der Placebogruppe bewirkte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, da auch in der Verumgruppe ein leichter Abfall zu verzeichnen war, der allerdings nicht statistisch signifikant war.

Tabelle 13: Nitrat-Konzentration im Plasma

Nitrat [$\mu\text{mol/l}$]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	42,8	35,4 – 74,8	41,0	38,5 – 52,3	0,717
Plasma U3	35,6	35,4 – 47,5	35,6	34,5 – 45,3	0,979
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	42,8	35,4 – 74,8	35,6	35,4 – 47,5	0,004
Plasma Verum	41,0	38,5 – 52,3	35,6	34,5 – 45,3	0,339

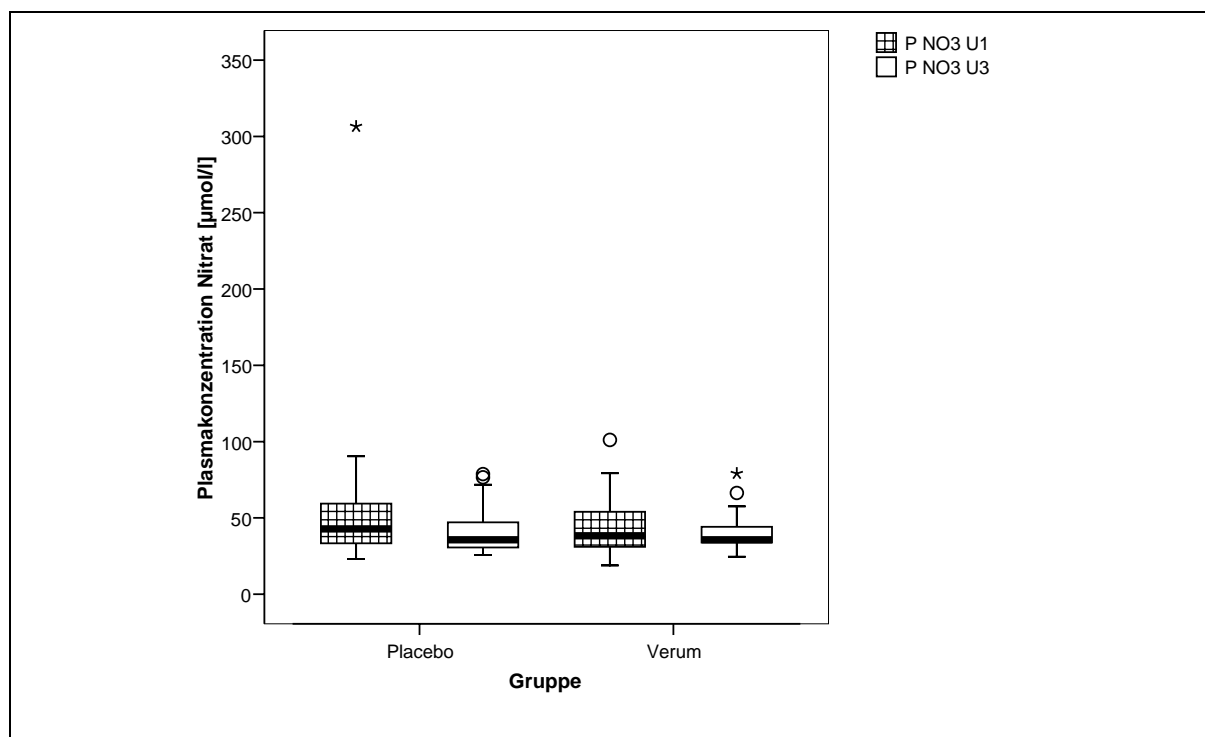


Abbildung 13: Nitrat-Konzentration im Plasma

Die Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin stieg in der Verumgruppe zur U2 leicht an, fiel dann aber zur U3 signifikant ab ($p = 0,012$). In der Placebogruppe zeigte sich der signifikante Abfall schon zur U2 ($p = 0,037$) und setzte sich zur U3 weiter fort ($p = 0,016$). Beim Vergleich beider Gruppen wies die Verumgruppe eine signifikant erhöhte Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin zur U2 ($p = 0,025$) und zur U3 ($p = 0,036$) auf (Tabelle 14, Abbildung 14).

Tabelle 14: Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin

Nitrat [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	87,0	79,6 – 125	78,0	71,7 – 117	0,544
Urin U2	69,0	64,7 – 89,9	92,0	83,5 – 126	0,025
Urin U3	61,0	50,7 – 71,0	73,0	64,3 – 88,2	0,036
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	87,0	79,6 – 125	69,0	64,7 – 89,9	0,037
Urin Verum	78,0	71,7 – 117	92,0	83,5 – 126	0,258
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	69,0	64,7 – 89,9	61,0	50,7 – 71,0	0,016
Urin Verum	92,0	83,5 – 126	73,0	64,3 – 88,2	0,012
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	87,0	79,6 – 125	61,0	50,7 – 71,0	0,001
Urin Verum	78,0	71,7 – 117	73,0	64,3 – 88,2	0,021

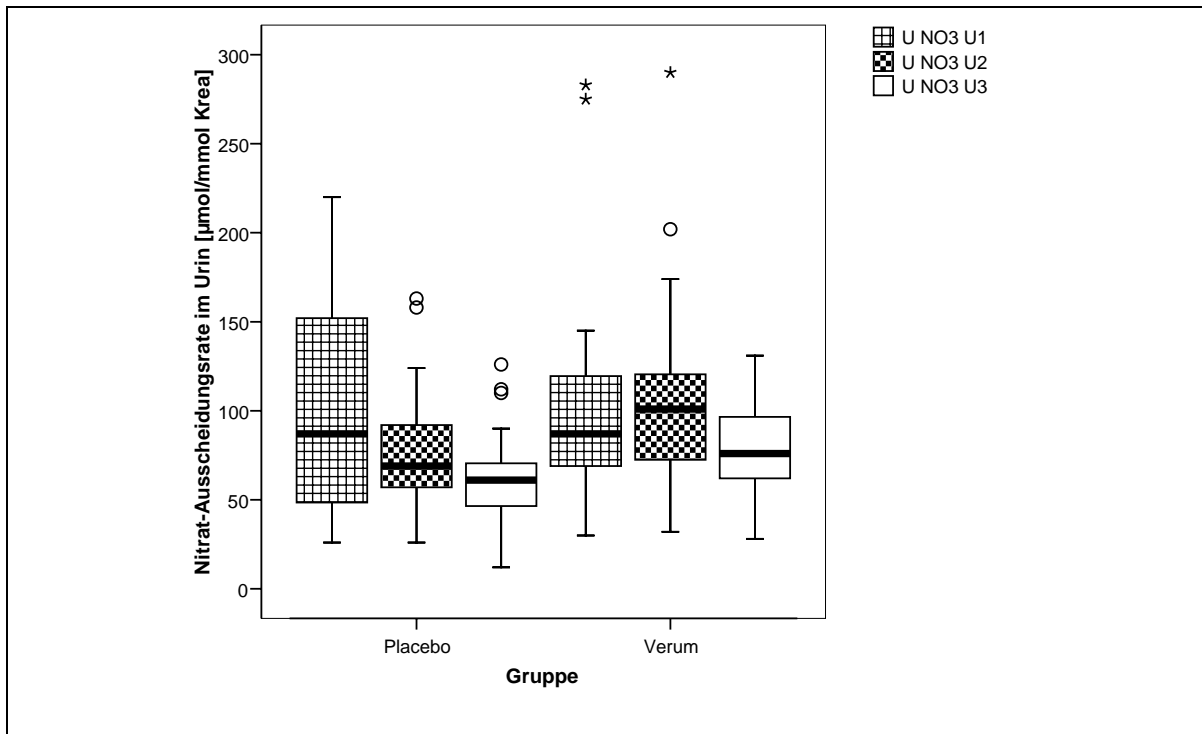


Abbildung 14: Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin

3.3.1.6. DMA

Für die DMA-Ausscheidungsrate im Urin konnte keine signifikante Veränderung innerhalb der Gruppen und auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden (Tabelle 15, Abbildung 15). Das ADMA:DMA-Molarverhältnis der Urinausscheidungsrate blieb im Studienverlauf sowohl für die Placebogruppe als auch für die Verumgruppe mit ca. 1:11 konstant.

Tabelle 15: DMA-Ausscheidungsrate im Urin

DMA [µmol/mmol Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	35,7	35,0 – 42,6	35,7	36,0 – 51,0	0,798
Urin U2	34,4	31,6 – 39,6	37,0	33,8 – 47,9	0,198
Urin U3	35,4	33,1 – 46,7	36,9	28,4 – 59,2	0,972
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	35,7	35,0 – 42,6	34,4	31,6 – 39,6	0,059
Urin Verum	35,7	36,0 – 51,0	37,0	33,8 – 47,9	0,200
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	34,4	31,6 – 39,6	35,4	33,1 – 46,7	0,179
Urin Verum	37,0	33,8 – 47,9	36,9	28,4 – 59,2	0,797
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	35,7	35,0 – 42,6	35,4	33,1 – 46,7	0,964
Urin Verum	35,7	36,0 – 51,0	36,9	28,4 – 59,2	0,376

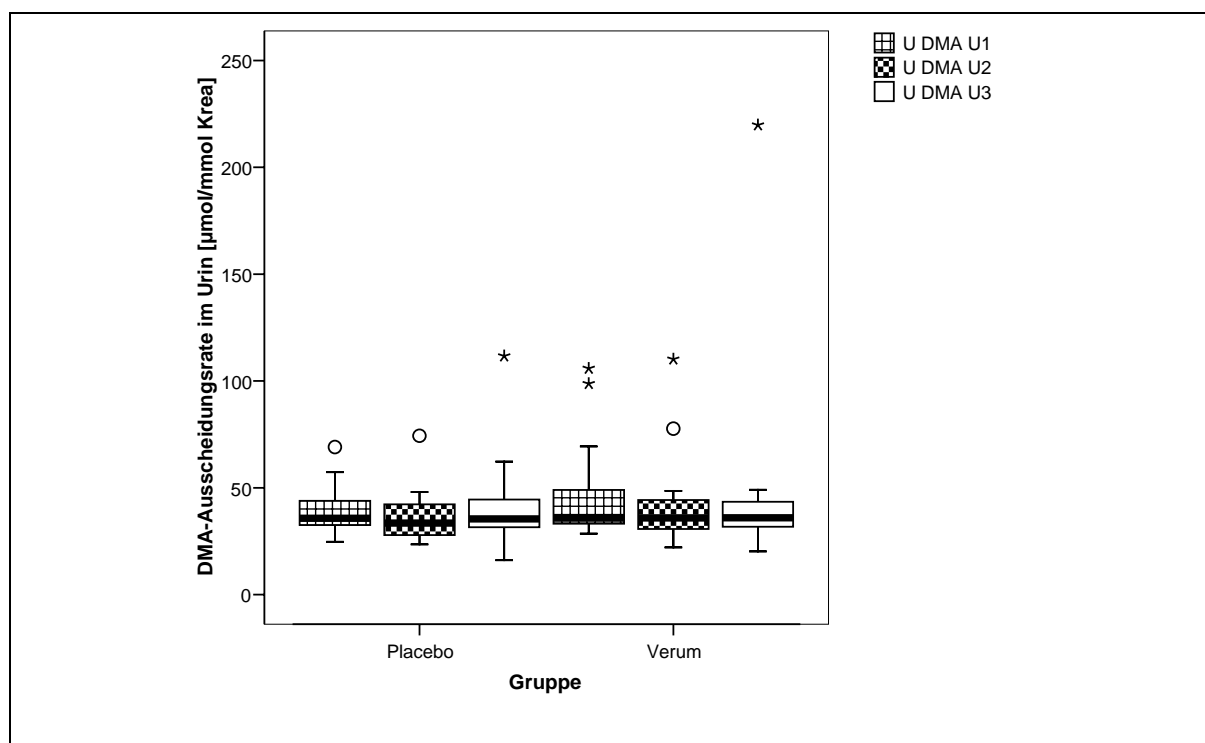


Abbildung 15: DMA-Ausscheidungsrate im Urin

3.3.1.7. 8-iso-PGF_{2α}

Sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe konnte ein signifikanter Abfall der 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration im Plasma zwischen der U1 und der U3 verzeichnet werden (Tabelle 16, Abbildung 16). Zwischen den beiden Gruppen bestand allerdings kein signifikanter Unterschied. Weiterhin ist auffällig, dass die 8-iso-PGF_{2α}-Plasmakonzentrationen beider Gruppen über ein Vielfaches der oberen Grenze des Normbereiches erhöht sind (siehe 7.14. Normwerte).

Die 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin zeigte für beide Gruppen keine signifikanten Veränderungen über den Verlauf der Pilotstudie. Zwischen den beiden Gruppen konnte aber zum Zeitpunkt der U2 eine signifikant niedrigere 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin in der Verumgruppe verzeichnet werden (p = 0,025). Zur U3 wies dann die Placebogruppe eine signifikant niedrigere 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin auf (p = 0,036) (Tabelle 17, Abbildung 17).

Tabelle 16: 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration im Plasma

8-iso-PGF _{2α} [nmol/l]	Placebo		Verum		P
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	2,32	1,98 – 3,06	2,13	1,87 – 2,62	0,386
Plasma U3	1,10	1,02 – 1,64	1,35	1,03 – 1,52	0,785
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	2,32	1,98 – 3,06	1,10	1,02 – 1,64	0,000
Plasma Verum	2,13	1,87 – 2,62	1,35	1,03 – 1,52	0,000

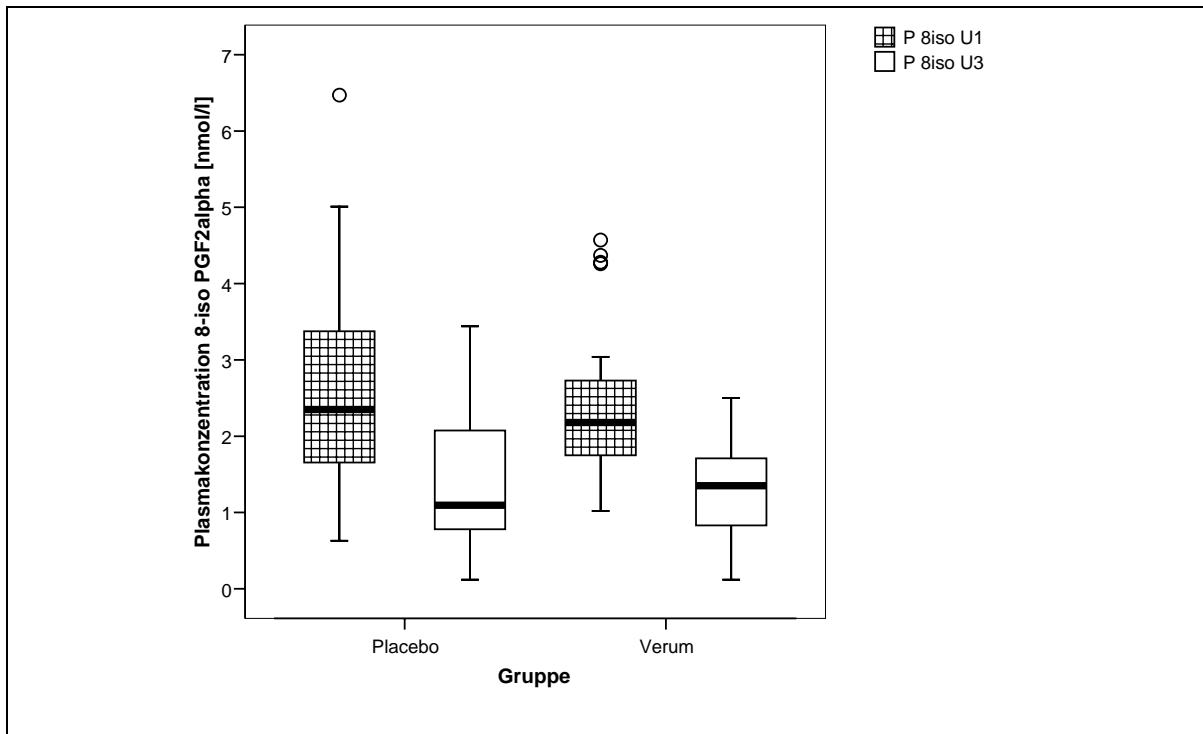


Abbildung 16: 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration im Plasma

Tabelle 17: 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin

8-iso-PGF _{2α} [pmol/mmol Krea]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin U1	39,8	38,5 – 55,0	49,4	43,6 – 68,1	0,544
Urin U2	43,9	39,9 – 58,2	41,0	38,6 – 53,5	0,025
Urin U3	35,2	32,0 – 67,2	44,8	41,9 – 60,4	0,036
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	39,8	38,5 – 55,0	43,9	39,9 – 58,2	0,785
Urin Verum	49,4	43,6 – 68,1	41,0	38,6 – 53,5	0,269
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	43,9	39,9 – 58,2	35,2	32,0 – 67,2	0,305
Urin Verum	41,0	38,6 – 53,5	44,8	41,9 – 60,4	0,253
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Urin Placebo	39,8	38,5 – 55,0	35,2	32,0 – 67,2	0,452
Urin Verum	49,4	43,6 – 68,1	44,8	41,9 – 60,4	0,819

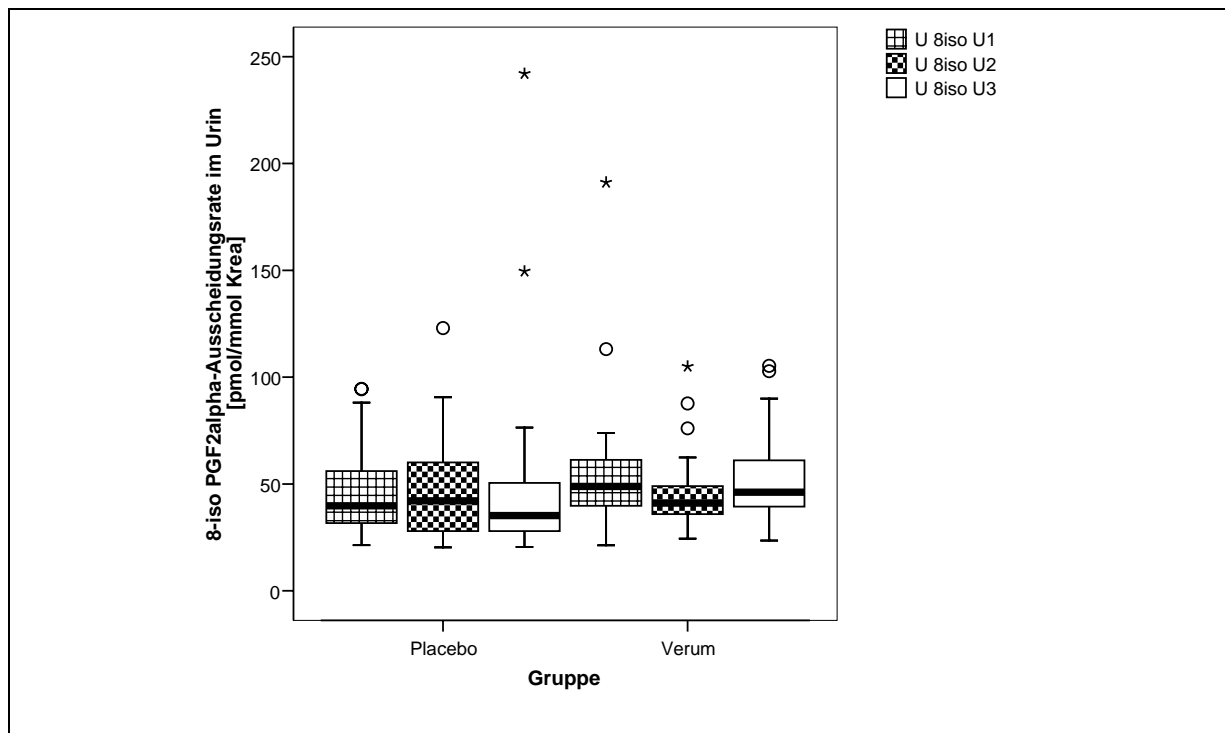


Abbildung 17: 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin

3.3.1.8. MDA

Für beide Studiengruppen konnte ein signifikanter Abfall der MDA-Konzentration im Plasma von der U1 zur U3 beobachtet werden (Tabelle 18, Abbildung 18). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand allerdings nicht.

Tabelle 18: MDA-Konzentration im Plasma

MDA [nmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	1316	1240 – 1620	1284	1192 – 1515	0,530
Plasma U3	1092	987,1 – 1427	1114	990,2 – 1261	0,531
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	1316	1240 – 1620	1092	987,1 – 1427	0,005
Plasma Verum	1284	1192 – 1515	1114	990,2 – 1261	0,001

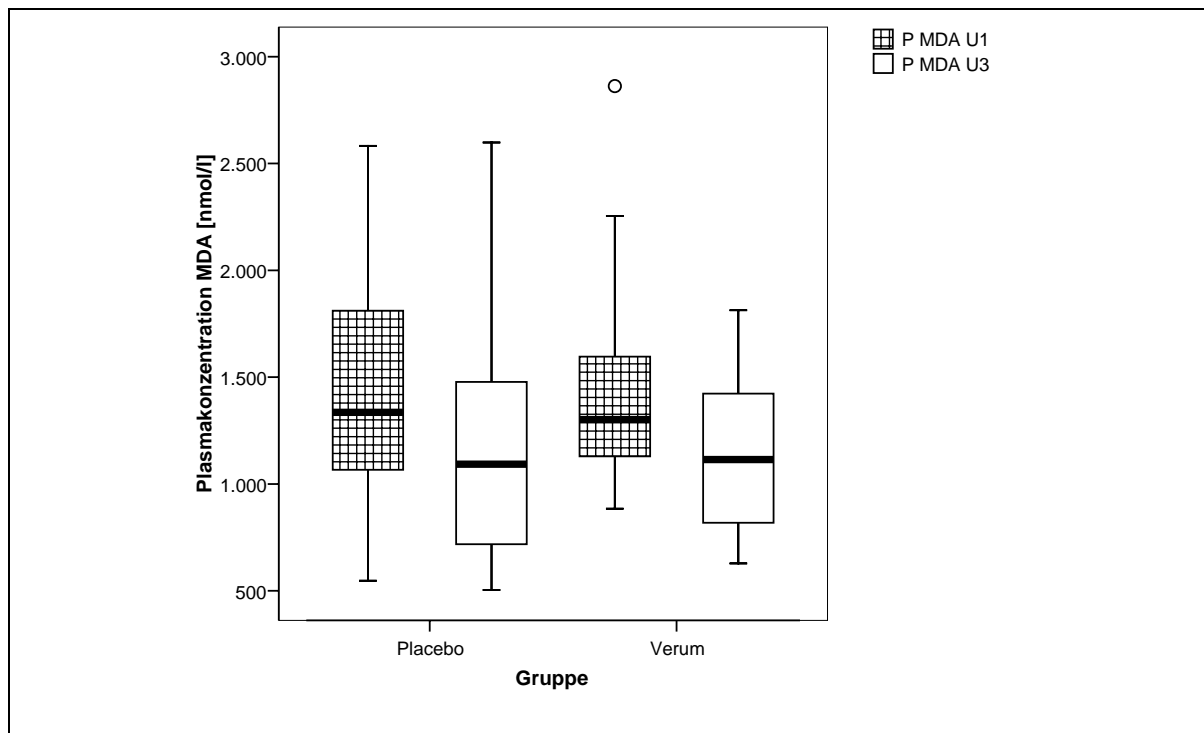


Abbildung 18: MDA-Konzentration im Plasma

3.3.1.9. HNE

Auch die HNE-Konzentration im Plasma zeigte einen signifikanten Abfall der Werte in beiden Gruppen, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden (Tabelle 19, Abbildung 19).

Tabelle 19: HNE-Konzentration im Plasma

HNE [nmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	572	506 – 760	530	478 – 639	0,305
Plasma U3	446	392 – 605	462	380 – 544	0,588
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	572	506 – 760	446	392 – 605	0,006
Plasma Verum	530	478 – 639	462	380 – 544	0,001

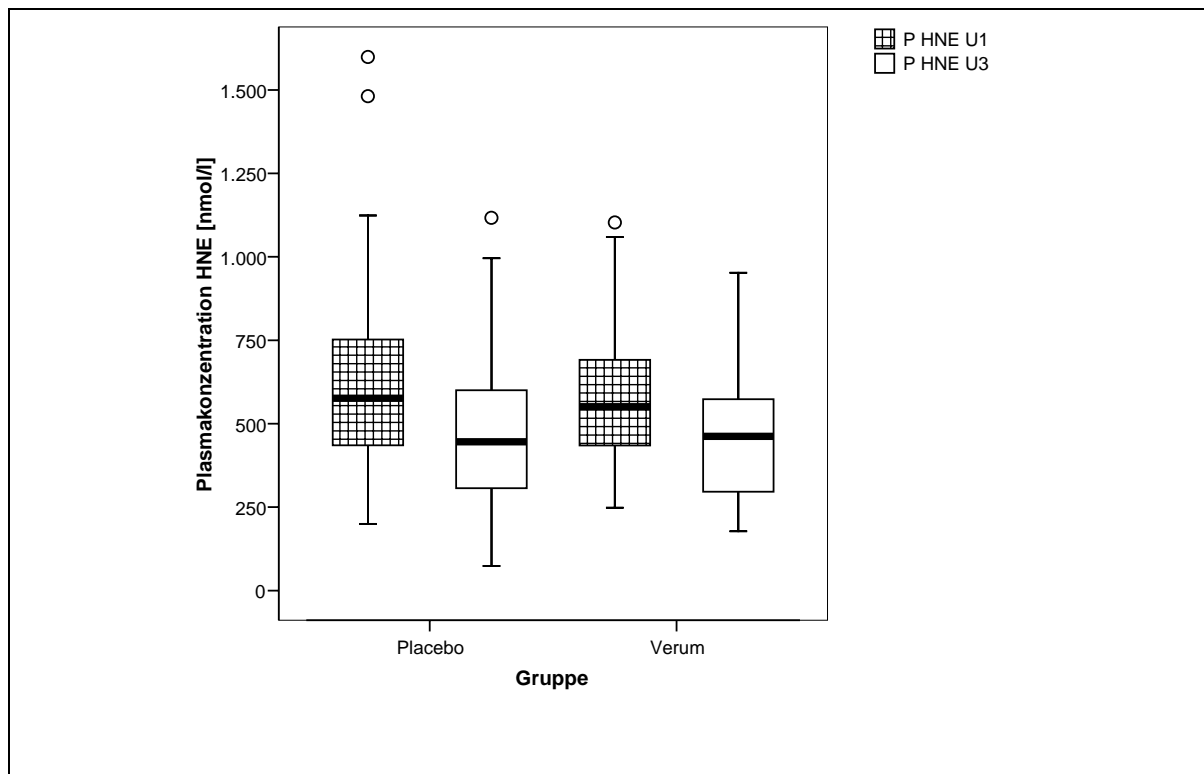


Abbildung 19: HNE-Konzentration im Plasma

3.3.1.10. Gesamthomocystein

Für die Gesamthomocystein-Konzentration im Plasma konnte keine signifikante Veränderung innerhalb der Gruppen und auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden (Tabelle 20, Abbildung 20).

Tabelle 20: Gesamthomocystein-Konzentration im Plasma

Homocystein [µmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	8,47	8,05 – 9,56	9,20	8,60 – 11,0	0,336
Plasma U3	8,66	6,93 – 13,5	9,76	8,54 – 11,3	0,250
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	8,47	8,05 – 9,56	8,66	6,93 – 13,5	0,682
Plasma Verum	9,20	8,60 – 11,0	9,76	8,54 – 11,3	0,503

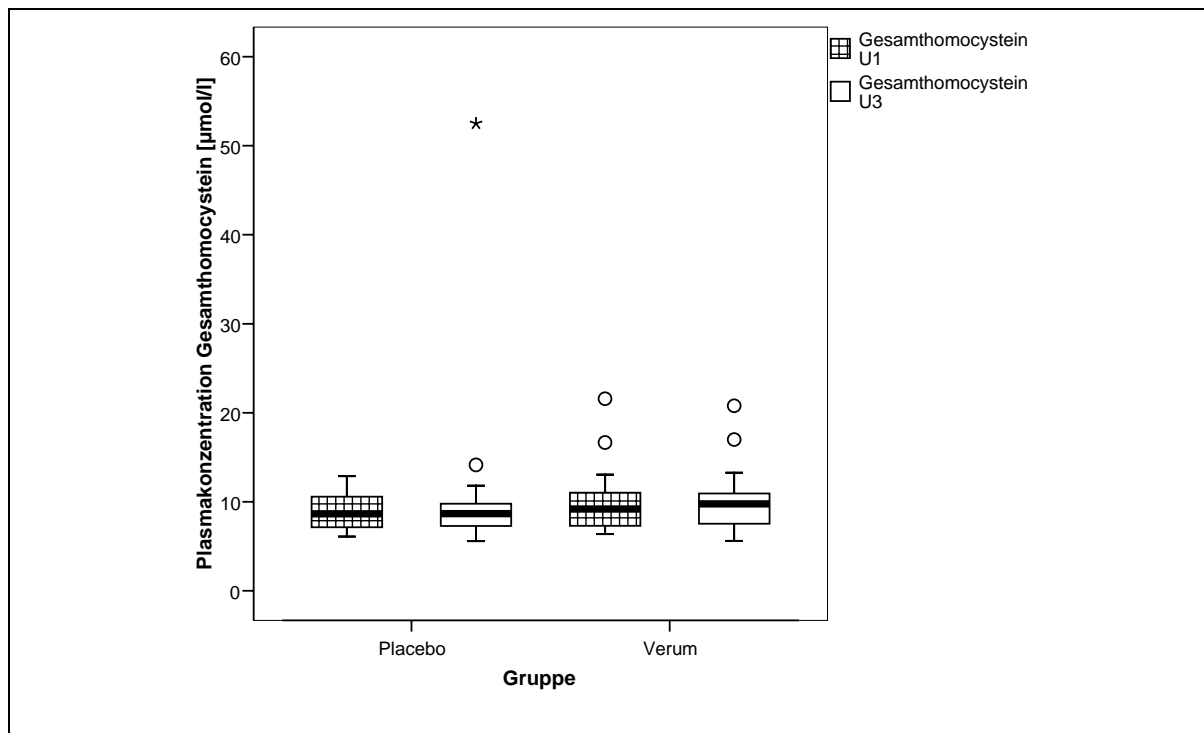


Abbildung 20: Gesamthomocystein-Konzentration im Plasma

3.3.1.11. CRP

Die CRP-Konzentration im Plasma wies keine signifikante Veränderung innerhalb einer Gruppe oder einen Unterschied zwischen den Gruppen über den Studienverlauf auf (Tabelle 21, Abbildung 21).

Tabelle 21: CRP-Konzentration im Plasma

CRP [mg/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	1,76	0,86 – 11,3	1,60	1,82 – 5,31	0,489
Plasma U3	1,60	1,36 – 3,02	1,50	1,63 – 6,05	0,581
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	1,76	0,86 – 11,3	1,60	1,36 – 3,02	0,322
Plasma Verum	1,60	1,82 – 5,31	1,50	1,63 – 6,05	0,310

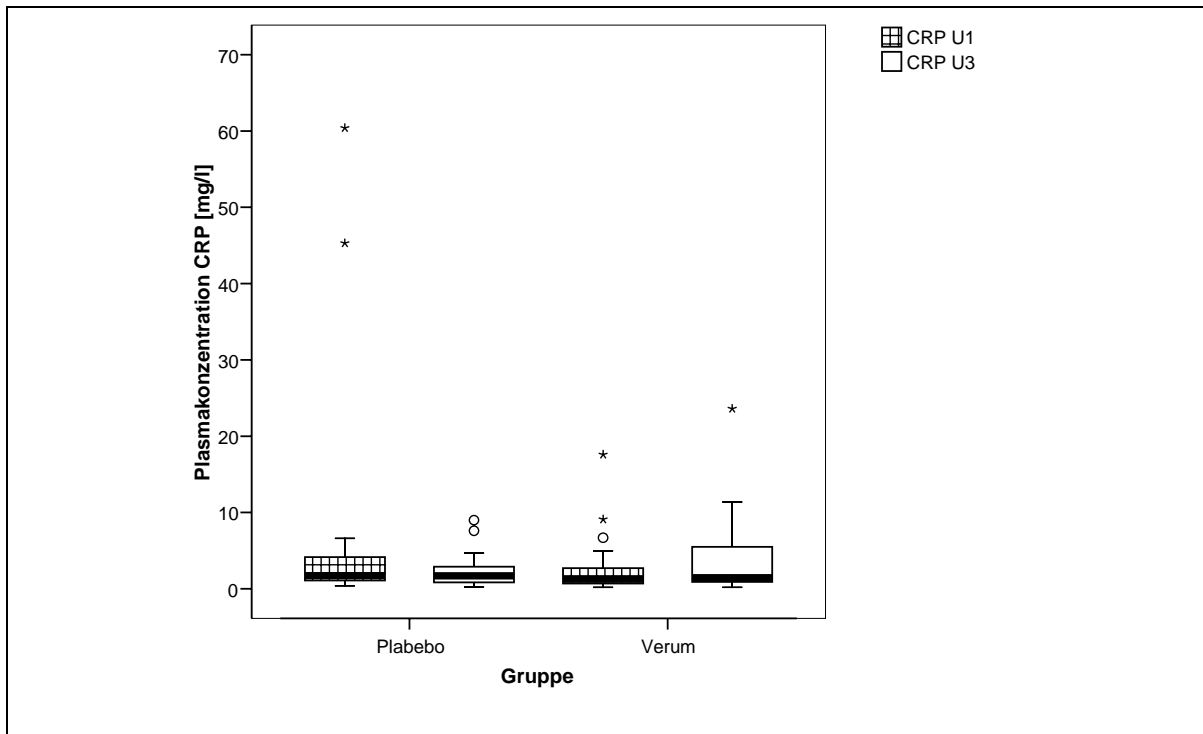


Abbildung 21: CRP-Konzentration im Plasma

3.3.1.12. LDL und HDL

Für die LDL-Konzentration im Plasma konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, weder zwischen den Gruppen noch innerhalb einer Gruppe (Tabelle 22, Abbildung 22).

Die HDL-Konzentration im Plasma stieg dagegen im Studienverlauf signifikant in der Verumgruppe an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der HDL-Plasmakonzentration bestand allerdings nicht (Tabelle 23, Abbildung 23).

Tabelle 22: LDL-Konzentration im Plasma

LDL [mmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	2,77	2,53 – 3,27	2,95	2,74 – 3,47	0,413
Plasma U3	2,57	2,30 – 2,92	2,43	2,32 – 3,03	0,767
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	2,77	2,53 – 3,27	2,57	2,30 – 2,92	0,067
Plasma Verum	2,95	2,74 – 3,47	2,43	2,32 – 3,03	0,175

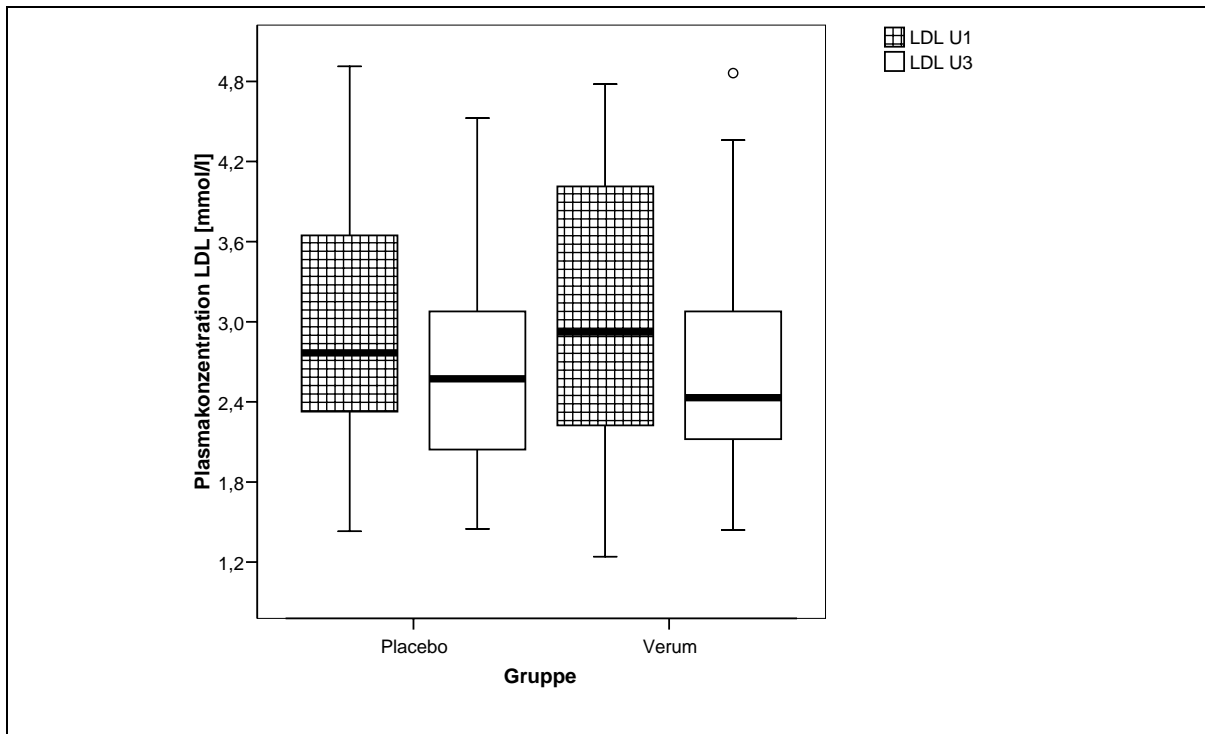


Abbildung 22: LDL-Konzentration im Plasma

Tabelle 23: HDL-Konzentration im Plasma

HDL [mmol/l]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma U1	1,06	1,02 – 1,28	1,20	1,05 – 1,24	0,933
Plasma U3	1,12	1,07 – 1,34	1,28	1,13 – 1,34	0,727
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Plasma Placebo	1,06	1,02 – 1,28	1,12	1,07 – 1,34	0,069
Plasma Verum	1,20	1,05 – 1,24	1,28	1,13 – 1,34	0,006

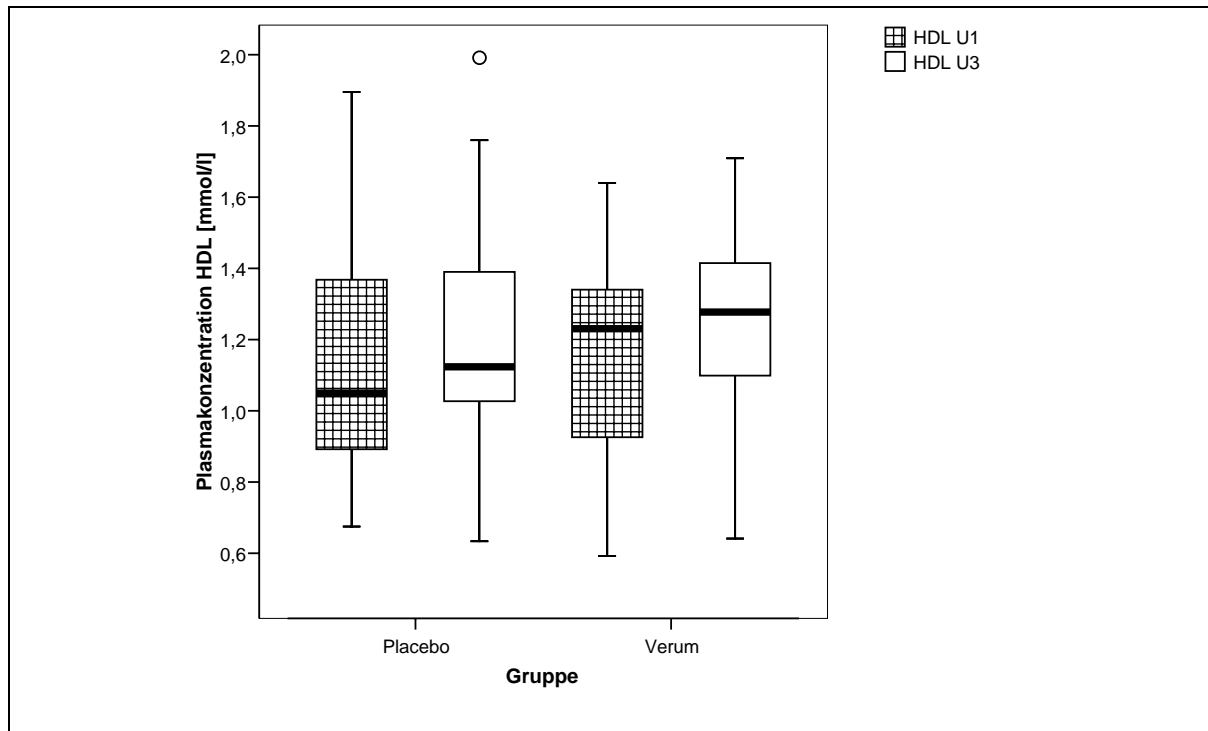


Abbildung 23: HDL-Konzentration im Plasma

3.3.1.13. Blutdruck

Beim diastolischen Blutdruck (RR dia) konnte für den Studienintervall von der U1 zur U2 ein signifikanter Abfall innerhalb der Norm in der Verumgruppe beobachtet werden ($p = 0,049$) (Tabelle 24, Abbildung 24, 7.14. Normwerte). Im Studienintervall von der U2 zur U3 setzte sich die Signifikanz in der Verumgruppe allerdings nicht fort. Für die Placebogruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

In Bezug auf den systolischen Blutdruck (RR sys) konnten keine signifikanten Veränderungen über den Studienzeitraum festgestellt werden (Tabelle 25, Abbildung 25).

Auch beim direkten Vergleich beider Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des diastolischen oder systolischen Blutdrucks aufgezeigt werden.

Tabelle 24: Diastolischer Blutdruck

RR dia [mmHg]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	80	77 – 86	80	80 – 87	0,405
U2	80	76 – 85	80	75 – 82	0,550
U3	80	78 – 89	80	74 – 82	0,090
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	80	77 – 86	80	76 – 85	0,399
Verum	80	80 – 87	80	75 – 82	0,049
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	80	76 – 85	80	78 – 89	0,101
Verum	80	75 – 82	80	74 – 82	0,981
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	80	77 – 86	80	78 – 89	0,547
Verum	80	80 – 87	80	74 – 82	0,067

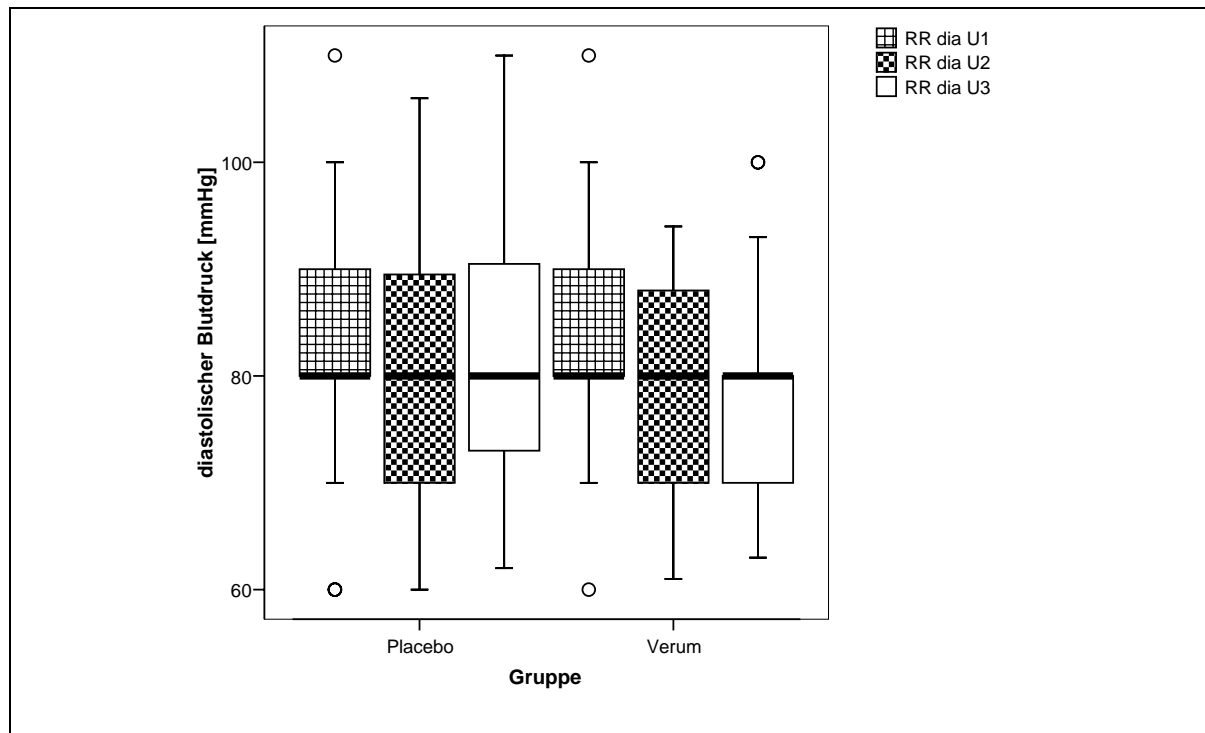


Abbildung 24: Diastolischer Blutdruck

Tabelle 25: Systolischer Blutdruck

RR sys [mmHg]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	140	129 – 143	140	129 – 141	0,877
U2	134	127 – 142	128	121 – 137	0,300
U3	140	131 – 148	130	121 – 144	0,354
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	140	129 – 143	134	127 – 142	0,757
Verum	140	129 – 141	128	121 – 137	0,277
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	134	127 – 142	140	131 – 148	0,223
Verum	128	121 – 137	130	121 – 144	0,412
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	140	129 – 143	140	131 – 148	0,943
Verum	140	129 – 141	130	121 – 144	0,784

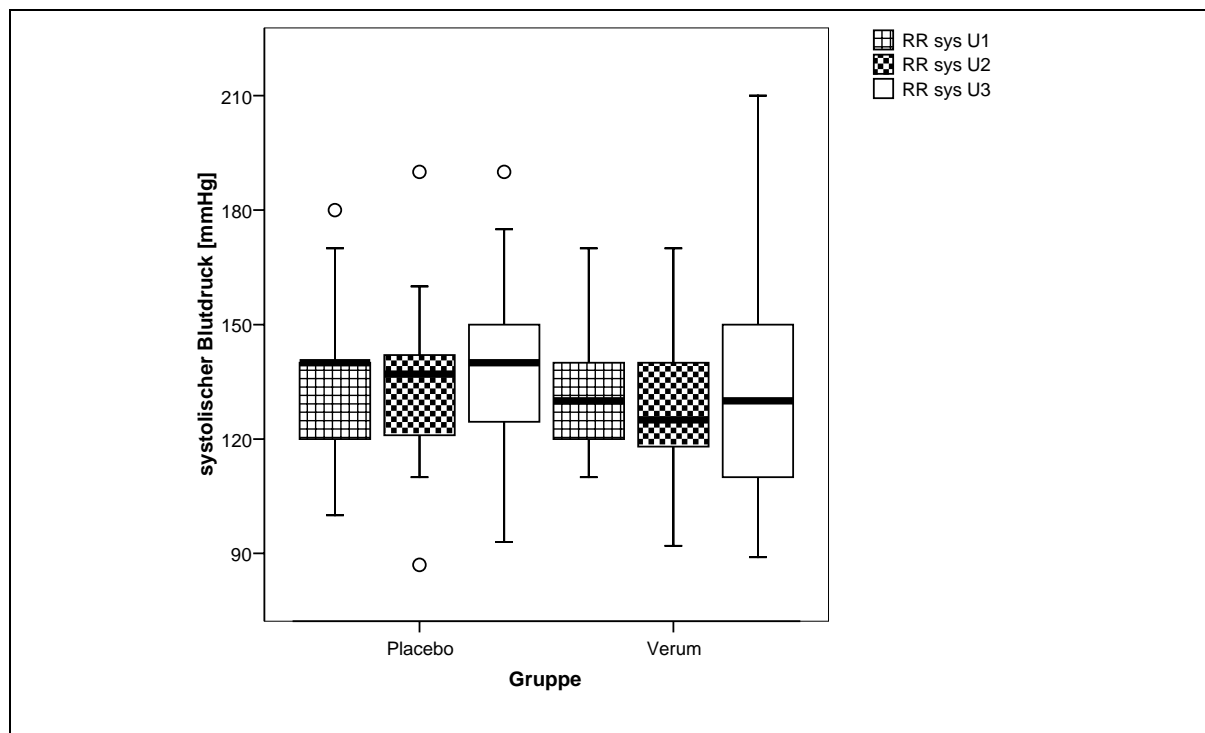


Abbildung 25: Systolischer Blutdruck

3.3.1.13.1. Blutdruck und antihypertensive Therapie

In der Verumgruppe konnte ein signifikanter Abfall des diastolischen Blutdrucks von der U1 zur U2 beobachtet werden ($p = 0,049$). Eine zusätzliche, explorative Subgruppenanalyse unter Berücksichtigung der antihypertensiven Medikation zeigte einen vergleichbaren Trend in der Subgruppe der Nitrats (ISDN, ISMN, Molsidomin). Von den 31 Patienten in der Verumgruppe erhielten 10 Patienten Nitrats als Begleitmedikation. Innerhalb dieser Gruppe zeigte sich lediglich für den Studienabschnitt von der U1 zur U2 beim diastolischen Blutdruck ein signifikanter Abfall ($p=0,010$). Des Weiteren waren die Unterschiede im diastolischen Blutdruck in der Verumgruppe zwischen den Patienten mit Nitrats-Therapie und ohne zur U2 ($p =0,004$) und zur U3 ($p = 0,049$) signifikant (Tabelle 26). Andere gebildete Subgruppen (ACE-Hemmer, AT₁-Blocker, β -Blocker, Diuretika) wiesen keine signifikanten Unterschiede im Verlauf auf.

Tabelle 26: Diastolischer Blutdruck bei Patienten mit und ohne Nitrats-Therapie in der Verumgruppe

RR dia [mmHg]	Verum mit Nitraten		Verum ohne Nitrats		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	80	72,51 – 88,49	85	80,74 – 89,26	0,249
U2	70	66,29 – 77,05	81	77,84 – 86,05	0,004
U3	70	67,93 – 77,19	80	75,01 – 86,87	0,049
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Verum mit Nitraten	80	72,51 – 88,49	70	66,29 – 77,05	0,010
Verum ohne Nitrats	85	80,74 – 89,26	81	77,84 – 86,05	0,336
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Verum mit Nitraten	70	66,29 – 77,05	70	67,93 – 77,19	0,790
Verum ohne Nitrats	81	77,84 – 86,05	80	75,01 – 86,87	0,786
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Verum mit Nitraten	80	72,51 – 88,49	70	67,93 – 77,19	0,113
Verum ohne Nitrats	85	80,74 – 89,26	80	75,01 – 86,87	0,253

3.3.1.14. Puls

Ein signifikanter Anstieg des Pulses innerhalb der Norm konnte für die Verumgruppe im Studienverlauf von der U1 zur U2 beobachtet werden ($p = 0,007$) (Tabelle 27, Abbildung 26, 7.14. Normwerte). Beim Vergleich beider Gruppen miteinander konnte allerdings kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

Tabelle 27: Puls

Puls [Schläge/min]	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	66	63 – 70	65	63 – 69	0,731
U2	70	65 – 74	72	68 – 75	0,604
U3	69	65 – 75	66	65 – 73	0,673
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	66	63 – 70	70	65 – 74	0,186
Verum	65	63 – 69	72	68 – 75	0,007
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	70	65 – 74	69	65 – 75	0,929
Verum	72	68 – 75	66	65 – 73	0,272
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	66	63 – 70	69	65 – 75	0,225
Verum	65	63 – 69	66	65 – 73	0,072

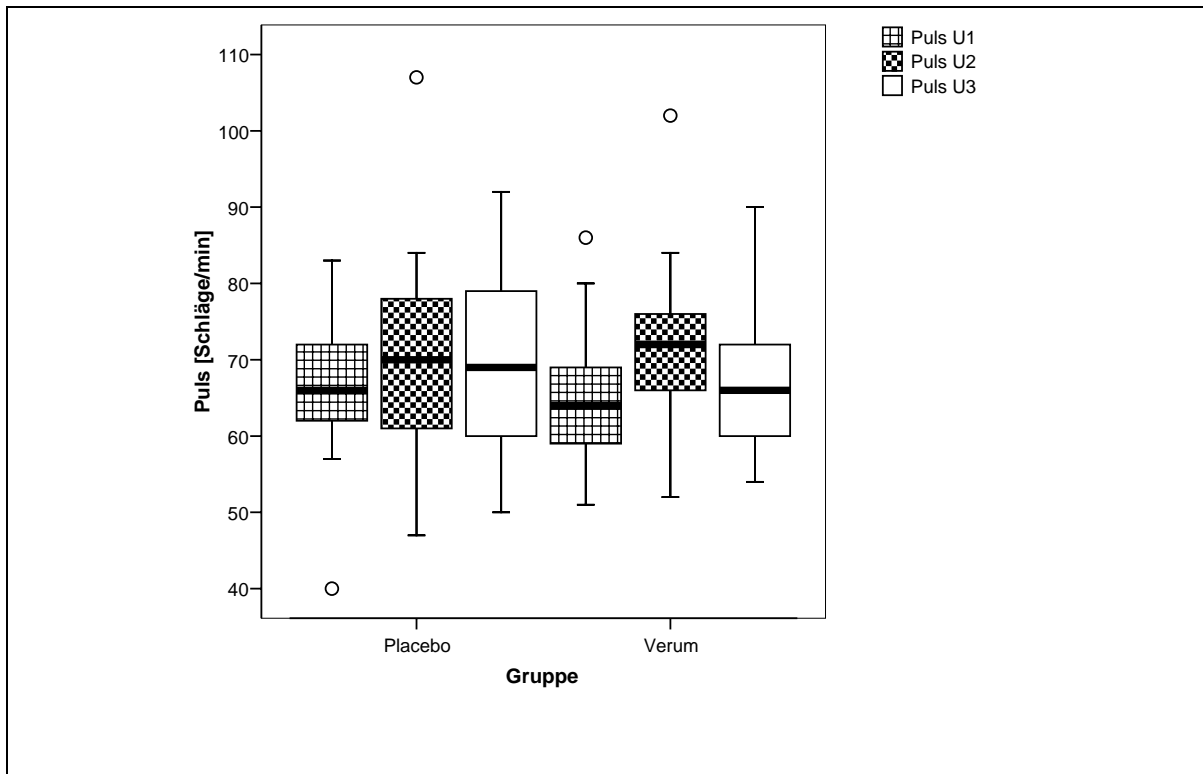


Abbildung 26: Puls

3.3.2. Gesundheitszustand einschließlich Lebensqualität

3.3.2.1. Fragebogen FS-12

Die Auswertung der Fragebögen erfolgte auf der Basis des physischen (PCS) und des mentalen (MCS) Gesundheitszustandes. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand weder zu Studienbeginn noch im Studienverlauf. Innerhalb der Gruppen konnte aber sowohl für die Placebo- als auch für die Verumgruppe ein signifikanter Anstieg des PCS von U1 zur U2 verzeichnet werden (Tabelle 28, Abbildung 27). Dieser Anstieg setzte sich zur U3 weniger stark fort, blieb aber über den Verlauf von der U1 zur U3 signifikant. Der MCS änderte sich über den Studienverlauf dagegen nicht signifikant (Tabelle 29, Abbildung 28).

Tabelle 28: Physischer Gesundheitszustand (PCS)

PCS	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	35,7	34,4 – 42,5	35,3	33,7 – 40,6	0,620
U2	48,3	39,9 – 47,8	46,3	40,6 – 47,1	0,997
U3	46,3	41,1 – 48,2	44,3	38,4 – 46,8	0,444
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	35,7	34,4 – 42,5	48,3	39,9 – 47,8	0,001
Verum	35,3	33,7 – 40,6	46,3	40,6 – 47,1	0,000
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	48,3	39,9 – 47,8	46,3	41,1 – 48,2	0,987
Verum	46,3	40,6 – 47,1	44,3	38,4 – 46,8	0,509
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	35,7	34,4 – 42,5	46,3	41,1 – 48,2	0,001
Verum	35,3	33,7 – 40,6	44,3	38,4 – 46,8	0,003

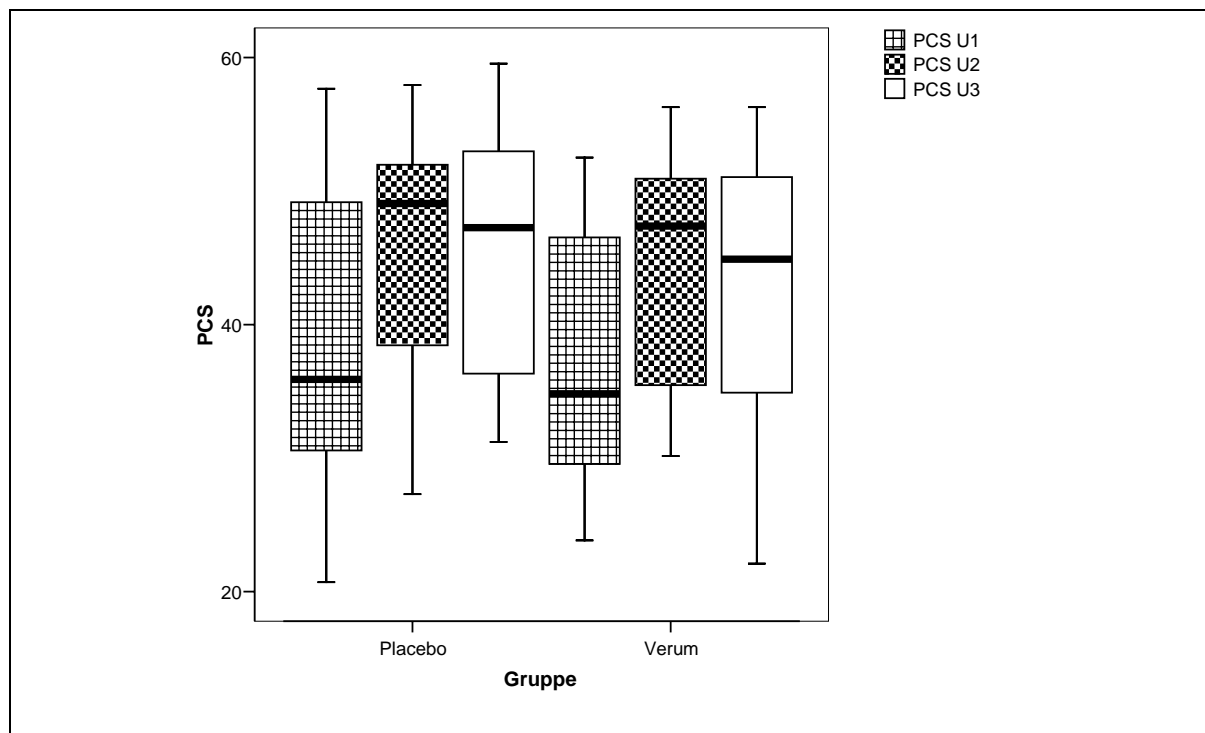


Abbildung 27: Physischer Gesundheitszustand (PCS)

Tabelle 29: Mentaler Gesundheitszustand (MCS)

MCS	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	49,8	43,1 – 52,1	48,4	43,8 – 51,9	0,932
U2	54,6	47,3 – 55,1	50,0	43,1 – 51,7	0,182
U3	52,8	45,9 – 54,1	57,0	46,7 – 56,0	0,652
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	49,8	43,1 – 52,1	54,6	47,3 – 55,1	0,203
Verum	48,4	43,8 – 51,9	50,0	43,1 – 51,7	0,732
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	54,6	47,3 – 55,1	52,8	45,9 – 54,1	0,732
Verum	50,0	43,2 – 51,7	57,0	46,7 – 56,0	0,051
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	49,8	43,1 – 52,1	52,8	45,9 – 54,1	0,195
Verum	48,4	43,8 – 51,9	57,0	46,7 – 56,0	0,147

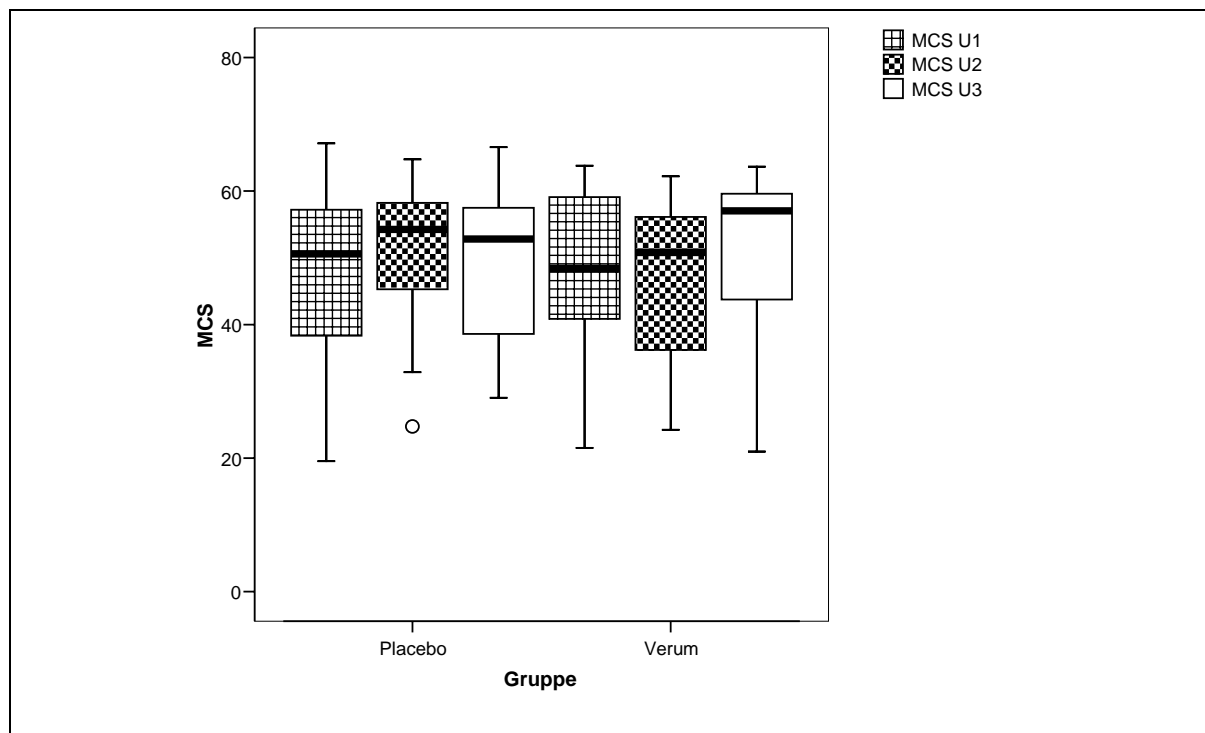


Abbildung 28: Mentaler Gesundheitszustand (MCS)

3.3.2.2. FFB-Mot-Fragebogen

Die Auswertung des Fragebogens zur Erfassung des motorischen Funktionsstatus (FFB-Mot) erfolgte auf der Basis der Kurzfassung inklusive der 4 Fragen der ADL-Skala mit niedrigem Schwierigkeitsgrad (FFB Mot ges). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen oder innerhalb einer Gruppe über den Studienverlauf hinweg aufgezeigt werden (Tabelle 30, Abbildung 29). Auch die separate statistische Auswertung der Kurzform und der ADL-Skala zeigte keine statistischen Unterschiede auf.

Tabelle 30: Motorischer Funktionsstatus basierend auf der Kurzfassung und ADL-Skala (FFB Mot ges)

FFB Mot ges	Placebo		Verum		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
U1	44	41 – 53	51	45 – 55	0,434
U2	46	43 – 56	51	45 – 55	0,854
U3	52	43 – 58	50	46 – 57	0,798
	U1		U2		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	44	41 – 53	46	43 – 56	0,158
Verum	51	45 – 55	51	45 – 55	0,989
	U2		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	46	43 – 56	52	43 – 58	0,445
Verum	51	45 – 55	50	46 – 57	0,925
	U1		U3		p
	Median	95 % CI	Median	95 % CI	
Placebo	44	41 – 53	52	43 – 58	0,133
Verum	51	45 – 55	50	46 – 57	0,428

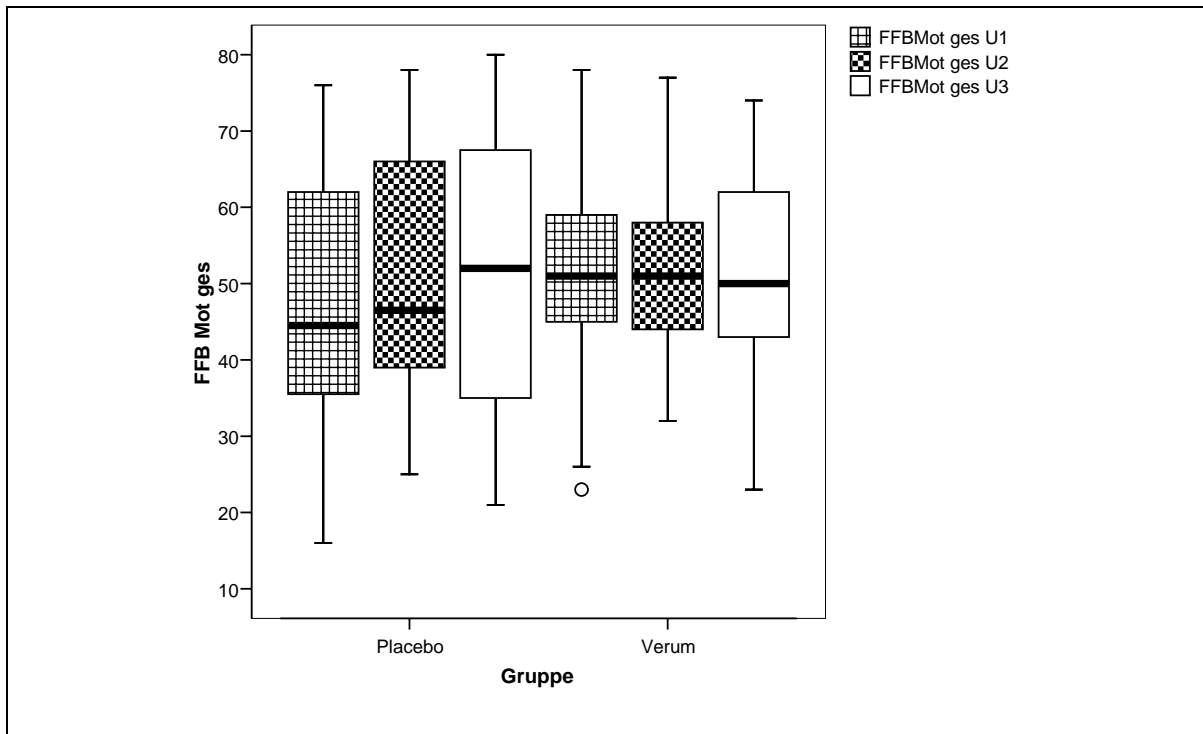


Abbildung 29: Motorischer Funktionsstatus basierend auf der Kurzfassung und ADL-Skala (FFB Mot ges)

3.3.3. Angina-pectoris-Beschwerden

Von den 60 Studienpatienten gaben 4 ihr Tagebuch auch nach mehrfacher Aufforderung nicht zurück. Zusätzlich füllten 27 der 60 Studienteilnehmer ihre Tagebücher falsch aus. Der häufigste Fehler war das Ankreuzen mehrerer Beschwerdekategorien und VAS pro Woche.

Auf Grund der großen Anzahl fehlender und falsch ausgefüllter Tagebücher (52 %) wurde von einer weiteren Auswertung abgesehen.

3.6. Studien-Medikation

3.6.1. Qualitätssicherung der Studien-Medikation

Die Durchsicht der Herstellungs- und Qualitätskontrollprotokolle der Firma Hedenkamp ergab, dass in den Verum-Brausetabletten L-Arginin in der geforderten Menge, und in den Placebo-Brausetabletten kein L-Arginin enthalten war.

Die verblindete, hausinterne Analytik der Brausetabletten ergab für alle 10 Stichproben der einen Charge einen L-Arginin-Gehalt von $< 0,01$ g pro Tablette mit einer Standardabweichung von $\pm 0,0057$ g. Diese Charge wurde nach der Entblindung als L2289/2 identifiziert. Für alle 10 Stichproben der anderen Charge ergab sich ein durchschnittlicher Gehalt von $2,0$ g L-Arginin-HCl pro Tablette mit einer Standardabweichung von $\pm 0,1318$ g. Diese Charge wurde nach der Entblindung als L2289/1 identifiziert.

Laut Europäischem Arzneibuch 2005 entsprechen Tabletten der Gleichförmigkeit des Gehaltes, wenn deren Gehalt zwischen 85 % und 115 % des Durchschnittsgehaltes liegt. Die geprüften Verum-Brausetabletten wiesen jeweils einen Gehalt zwischen 92,5 % und 110 % des Durchschnittsgehaltes auf, und entsprechen somit der Gleichförmigkeit des Gehalts nach dem Europäischen Arzneibuch 2005.

3.6.2. Unerwünschte Ereignisse

Im Studienzeitraum wurden insgesamt 64 unerwünschte Ereignisse gemeldet, die auf 38 Patienten entfielen. 8 dieser unerwünschten Ereignisse wurden als schwer eingestuft.

Zur Berechnung der Häufigkeiten der gemeldeten unerwünschten Ereignisse wurden sowohl die 60 Studienpatienten als auch die 74 Dropout-Patienten berücksichtigt. Von den insgesamt 134 Patienten entfielen 62 auf die Placebogruppe und 72 auf die Verumgruppe.

Alle gemeldeten schweren unerwünschten Ereignisse fielen unter die als Hauptzielkriterien definierten Ereignisse. Die Häufigkeiten und die statistische Auswertung sind unter 3.2. *Hauptzielkriterien* aufgeführt.

Des Weiteren wurden 56 nicht schwere unerwünschte Ereignisse gemeldet, die unter anderem Abweichungen der Kontrollparameter von der Norm beinhalten. Davon entfielen 32 auf die Verumgruppe und 24 auf die Placebogruppe (Tabelle 31).

Tabelle 31: Unerwünschte nicht schwere Ereignisse

Unerwünschte Ereignis	Total	Placebo	Verum	p
Angina-pectoris-Beschwerden	3 (2,2)	1 (1,6)	2 (2,8)	1,000
Blähungen	2 (1,5)	1 (1,6)	1 (1,4)	1,000
Blasenentzündung	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Blaue Flecken	2 (1,5)	0 (0,0)	2 (2,8)	0,499
Blauverfärbung des Händewaschwassers	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Blutdruckanstieg	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Blutzuckeranstieg	5 (3,7)	4 (6,5)	1 (1,4)	0,182
Depressionen	1 (0,8)	1 (1,61)	0 (0)	0,463
Durchfall	7 (5,2)	2 (3,2)	5 (6,9)	0,450
Einschlafstörung	2 (1,5)	2 (3,2)	0 (0,0)	0,212
Gewichtsabnahme	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Gewichtszunahme	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Harndrang	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Juckreiz	2 (1,5)	1 (1,6)	1 (1,4)	1,000
Kreatininanstieg	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Kopfschmerzen	2 (1,5)	0 (0,0)	2 (2,8)	0,499
Kurzatmigkeit	2 (1,5)	0 (0,0)	2 (2,8)	0,499
Leberenzymanstieg	2 (1,5)	1 (1,6)	1 (1,4)	1,000
Luftnot	2 (1,5)	0 (0,0)	2 (2,8)	0,499
Magenschmerzen	5 (3,7)	1 (1,6)	4 (5,6)	0,373
Pickel	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Reizhusten	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Schwitzen	3 (2,2)	2 (3,2)	1 (1,4)	0,596
Sodbrennen	3 (2,2)	0 (0,0)	3 (4,2)	0,249
Übelkeit	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Vorhofflimmern	1 (0,8)	1 (1,6)	0 (0,0)	0,463
Wunde Stellen	2 (1,5)	2 (3,2)	0 (0,0)	0,212
GI-Beschwerden (Blähungen, Durchfall, Magen- schmerzen, Sodbrennen und Übelkeit)	18 (13)	4 (6,5)	14 (19)	0,028

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der gemeldeten Häufigkeiten bestand nicht. Eine zusammengefasste Auswertung der gastrointestinalen Beschwerden (Blähungen, Durchfall, Magenschmerzen, Sodbrennen und Übelkeit) ergab allerdings einen signifikanten Unterschied mit einem vermehrten Auftreten in der Verumgruppe ($p = 0,028$). Eine Korrektur des α -Fehlers wurde für diese Berechnungen nicht durchgeführt.

In Bezug auf die Kontrollparameter gab es Abweichungen von der Norm für die Parameter ALAT und ASAT, Serumkreatinin sowie Glucose (siehe 7.19. Abweichungen der Kontrollparameter). Diese Abweichungen wurden als nicht schwerwiegend eingestuft.

3.6.3. Compliance

Insgesamt waren von den 60 eingeschlossenen Patienten 45 Patienten compliant und 12 Patienten non-compliant; die Compliance von 3 Patienten war nicht auswertbar. Es ergab sich eine durchschnittliche Compliance von 83 % für die Placebogruppe und von 68 % für die Verumgruppe. Die gruppenübergreifende Compliance lag somit bei 75 %. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Compliance zwischen den beiden Gruppen war nicht ermittelbar ($p = 0,530$). Eine Korrektur des α -Fehlers wurde für diese Berechnungen nicht durchgeführt, und Patienten mit unauswertbarer Compliance wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Alle 3 Patienten mit fehlender Compliance gehörten der Verumgruppe an und zeichneten sich durch das Erreichen von Hauptzielkriterien und einen vorzeitigen Studienabbruch aus. Für diese Patienten war die Compliance unauswertbar (43 %), da Angaben zur Anzahl der eingenommenen Brausetabletten bis zum Zeitpunkt des Ereignisses fehlten. Somit konnte nur für 4 Patienten mit erfüllten Hauptzielkriterien der Verumgruppe eine bestehende Compliance aufgezeigt werden (57 %). Die Compliance der Patienten mit erfüllten Hauptzielkriterien unter Placebothherapie war dagegen auswertbar, und beide Patienten wurden als compliant eingestuft.

3.6.4. Dauer der Gabe der Studien-Medikation

Zur Berechnung der Dauer der Gabe der Studien-Medikation wurden nur diejenigen Patienten berücksichtigt, die die Studie ohne vorzeitiges Erreichen eines Endpunktes beendeten. Unter diesen Patienten lag die durchschnittliche Dauer der Einnahme der Studien-Medikation bei 185 Tagen. Die kürzeste Einnahmezeit lag bei 174 Tagen, die längste bei 236 Tagen. Bei

dieser Berechnung wurden die individuelle Compliance der Patienten und eventuelle Einnahmepausen nicht berücksichtigt. Die Therapiedauer der Patienten mit erfüllten Hauptzielkriterien ist Abschnitt 3.2.1. *Auswertung der kardiovaskulären Ereignisse* und Tabelle 4 zu entnehmen.

3.7. Entblindung

Die Entblindung ergab folgende Zuordnung: bei Gruppe 1 handelt es sich um die Placebogruppe, die Charge L2289/2 erhielt, bei Gruppe 2 um die Verumgruppe, die Charge L2289/1 einnahm. Die Zuordnung der jeweiligen Therapie zu den einzelnen Patienten ist in der Therapiezuordnungsliste zusammengefasst (siehe 7.4. Therapiezuordnungsliste).

3.8. Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

3.8.1. GC/MS- und GC/MS/MS-Analysen der PFB-Derivate

3.8.1.1. GC/MS-Massenspektren

Die Analyse des PFB-Derivats in Plasma mittels GC/MS im NICI-Modus zeigte ein intensives Ion mit einem m/z von 251 (Abbildung 30). Die mutmaßliche Struktur des Ions 1,1-Diformyl-2-(2,3,4,5,6-pentafluorphenyl)ethan-1-ol ist im Spektrum wiedergegeben. Die Retentionszeit des Derivats bei der Gaschromatographie betrug 7,6 min.

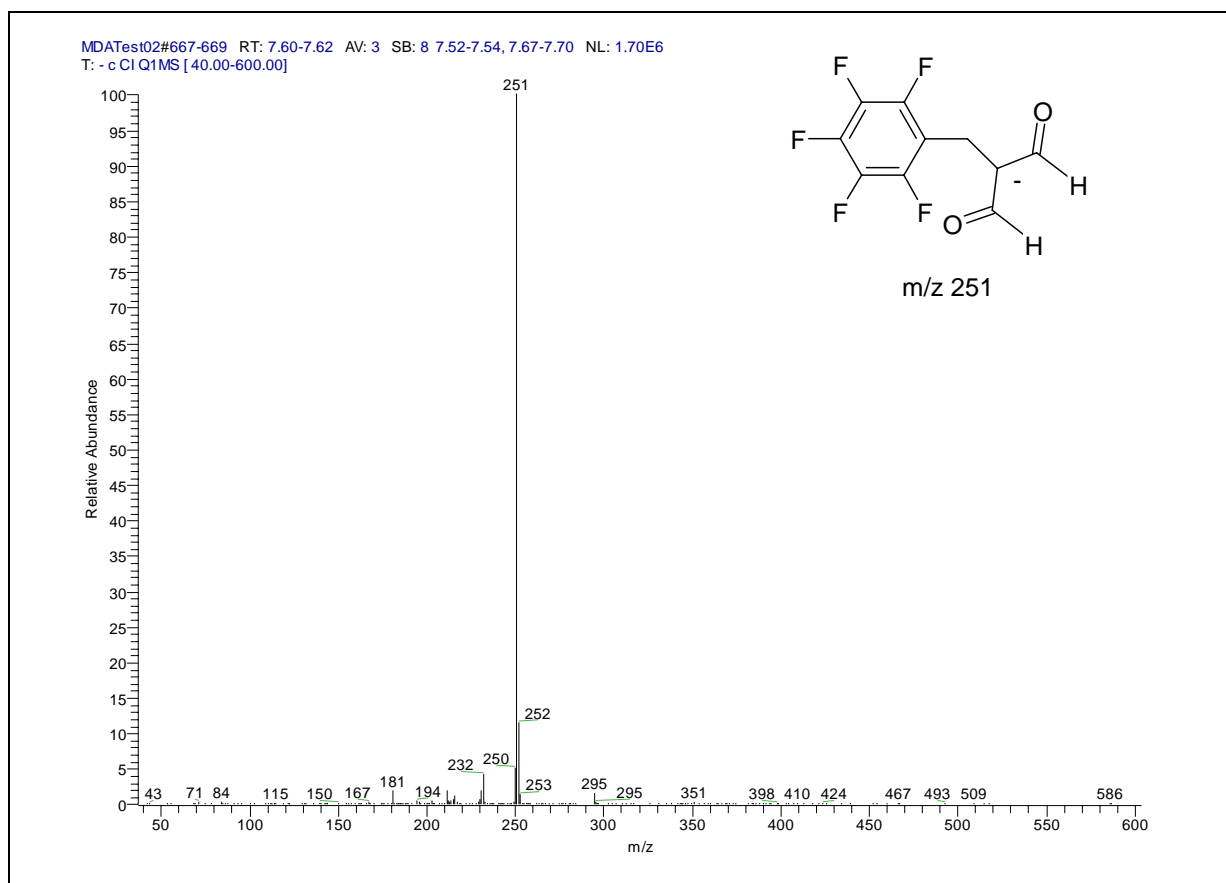


Abbildung 30: GC/MS-Spektrum des PFB-Derivats

Die Analyse des deuterierten PFB-Derivats zeigte das entsprechende deuterierte Ion bei einem m/z von 253 (Abbildung 31). Der Massenunterschied von 2 ergibt sich aus dem Vorhandensein von zwei Deuterium-Atomen im Derivat. Die Retentionszeit bei der Gaschromatographie betrug 7,6 min.

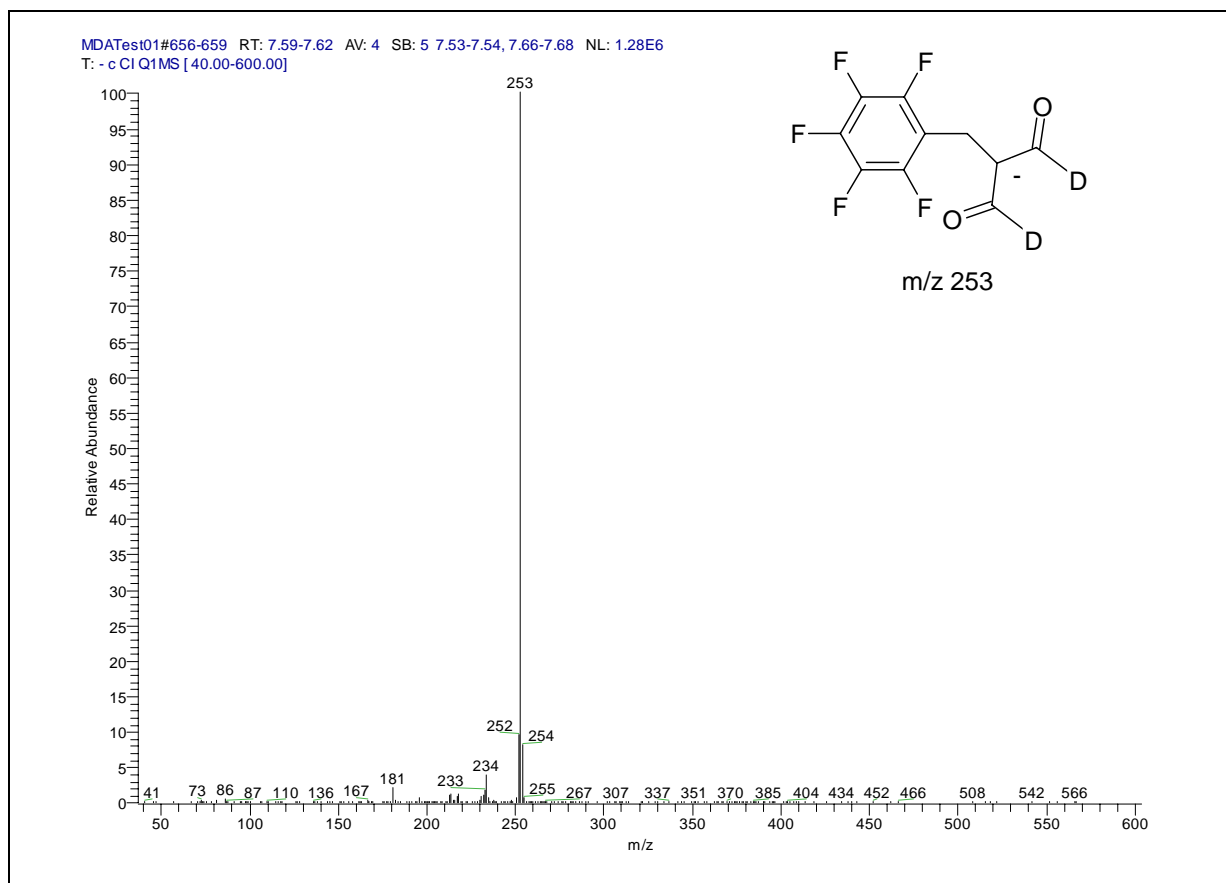


Abbildung 31: GC/MS-Spektrum des deuterierten PFB-Derivats

Das Derivatisierungsprodukt wurden als MDA-PFB₂-Derivat [2,2-Bis(2,3,4,5,6-pentafluorphenylbenzyl)-malonaldehyd] identifiziert. Abbildung 32 zeigt die vorgeschlagene Derivatisierungsreaktion der neu entwickelten Methode.

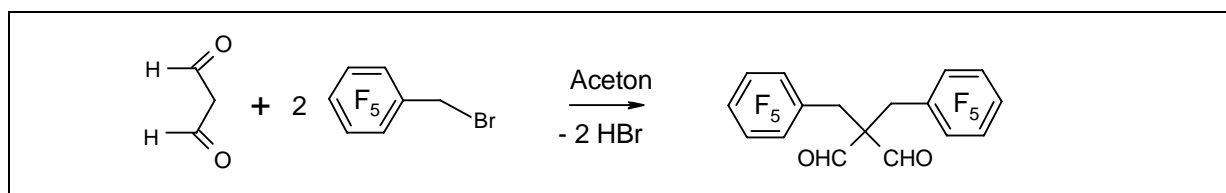


Abbildung 32: Reaktionsgleichung der Derivatisierung von MDA mit PFB-Br

3.8.1.2. GC/MS/MS-Massenspektren

Die Analyse mittels GC/MS/MS im NICI-Modus zeigte nach Fragmentierung des Ions m/z 251 ein Tochter-Ion mit dem m/z 175. Die mutmaßliche Struktur des Ions 3,4,5,6-Tetrafluor-1,2-dihydrocyclobutabenzol-1-id ist im Spektrum wiedergegeben (Abbildung 33). Die Fragmentierung des Ions m/z 253 zeigte ein Tochter-Ion mit dem m/z 177 (Abbildung 34). Neben den Ionen mit m/z 175 bzw. 177 waren in den GC/MS/MS-Spektren des

MDA-PFB₂-Derivats bzw. des d₂-MDA-PFB₂-Derivats die Ionen mit den m/z 183/184, 187/189, 203/205, 211/212, 231/233, 149/150, 202/203 155/156 sowie 167 vorhanden.

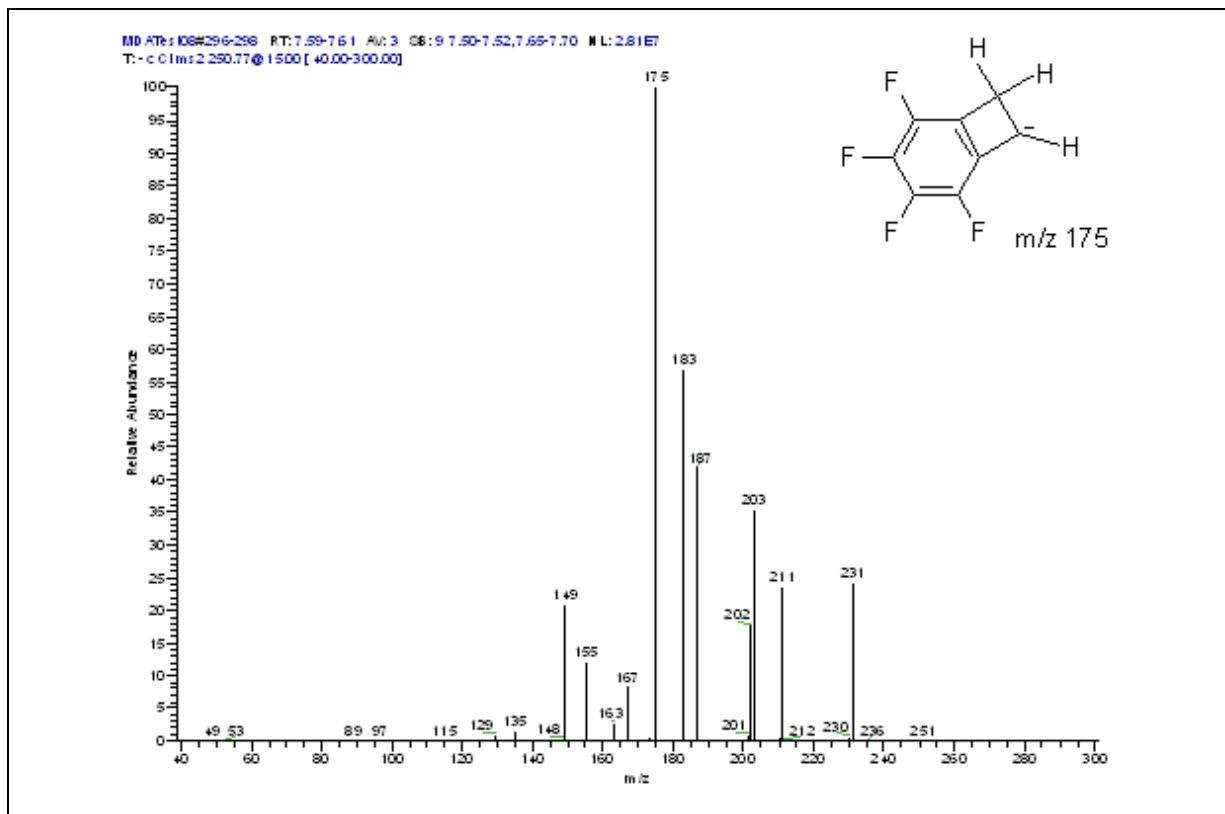


Abbildung 33: GC/MS/MS-Spektrum des MDA-PFB₂-Derivats, gewonnen durch die Fragmentierung des Ions m/z 251

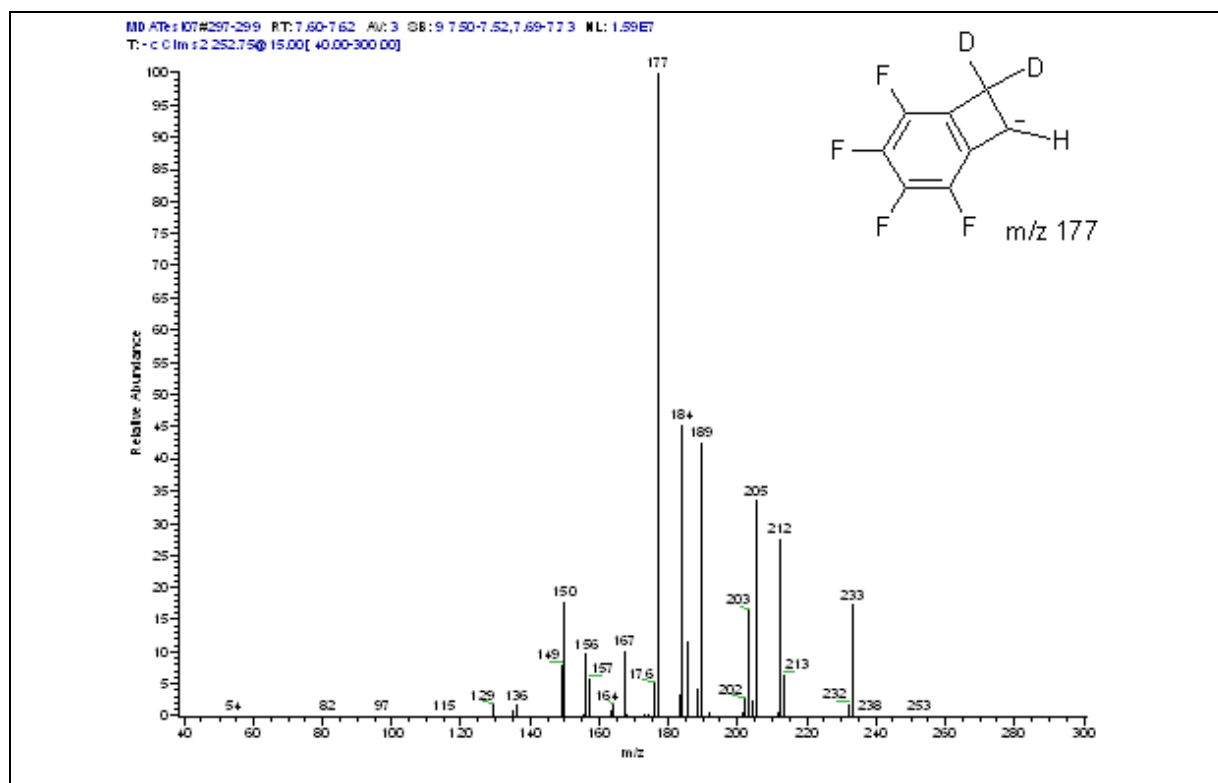


Abbildung 34: GC/MS/MS-Spektrum des d₂-MDA-PFB₂-Derivats, gewonnen durch die Fragmentierung des Ions m/z 253

3.8.1.3. Chromatogramme der GC/MS und GC/MS/MS

Zur Bestimmung der einzelnen Ionen wurden Chromatogramme mittels GC/MS und GC/MS/MS sowohl für das MDA-PFB₂-Derivat als auch für das d₂-MDA-PFB₂-Derivat aufgezeichnet. Es zeigten sich Peaks mit einer Retentionszeit von 10,57 min bzw. 10,58 min für die GC/MS und GC/MS/MS (Abbildung 35).

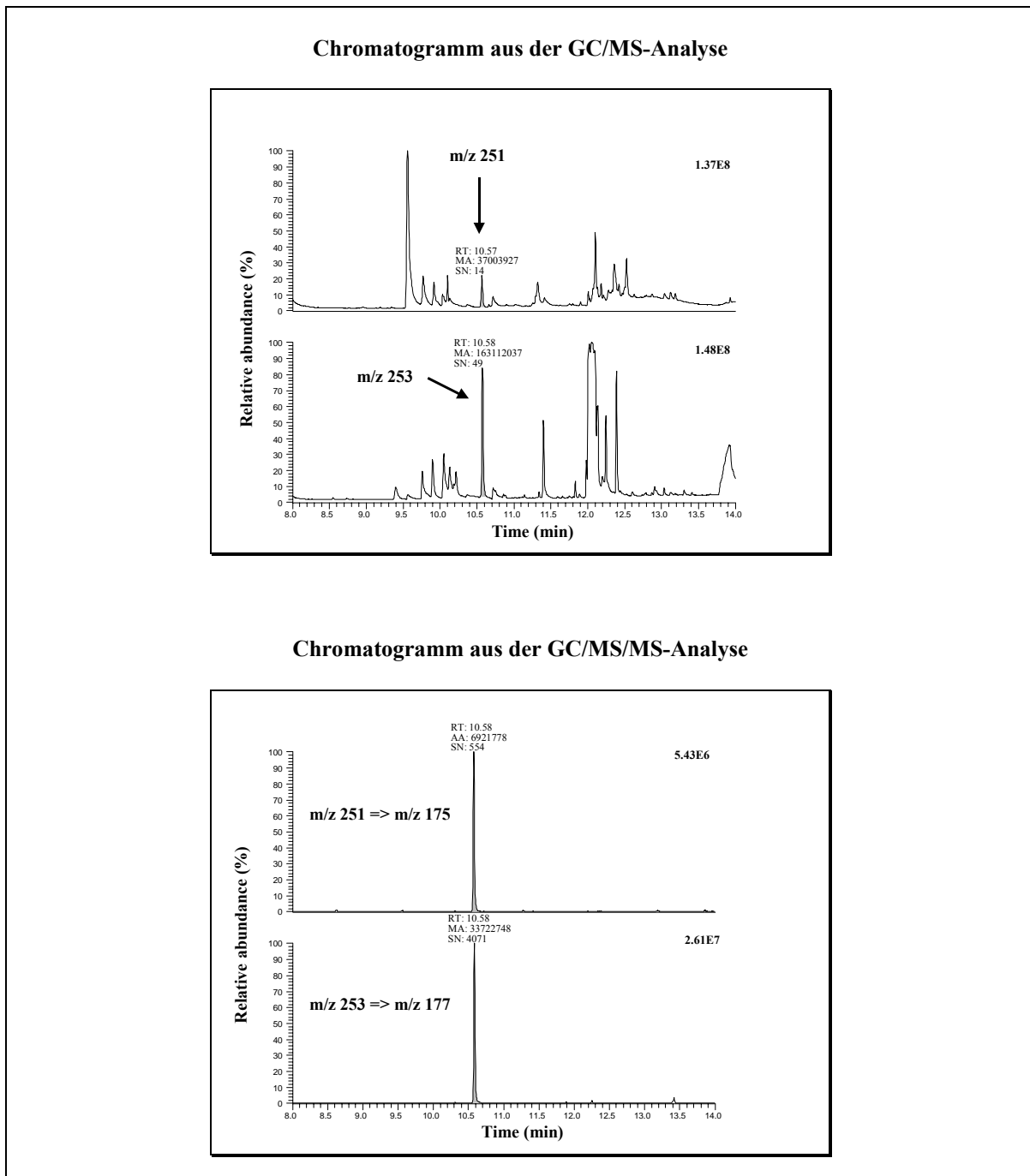


Abbildung 35: GC/MS- und GC/MS/MS-Chromatogramme des physiologischen MDA-PFB₂-Derivats im Plasma und des d₂-MDA-PFB₂-Derivats aus Standard, Endkonzentration 1µM

3.8.2. Validierung der GC/MS- und GC/MS/MS-Methode zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat

3.8.2.1. Selektivität

Die Aufarbeitung des internen Standards in Pufferlösung und Plasma sowie die Aufarbeitung des Plasmas ohne internen Standard zeigte identische Fragmentierungs-Ionen und Retentionszeiten für die GC/MS- und GC/MS/MS-Analysen.

3.8.2.2. Präzision, Richtigkeit, Linearität und Empfindlichkeit

Die Präzision, Richtigkeit, Linearität und Empfindlichkeit beider Messmethoden wurde mit Hilfe von Standardkurven in Plasma ausgewertet. Für detaillierte Angaben siehe 7.20.1. *Standardkurven zur Methodvalidierung mittels GC/MS* und 7.20.2. *Standardkurven zur Methodvalidierung mittels GC/MS/MS*.

Die Präzision innerhalb eines Tages der GC/MS-Methode lag zwischen 0,08 % und 17,9 %. Die mittlere Präzision wurde zu 3,8 % berechnet. Die GC/MS/MS-Methode wies eine Präzision innerhalb eines Tages zwischen 0,02 % und 28,4 % auf. Die mittlere Präzision wurde berechnet zu 3,8 %. Die Präzision von Tag zu Tag der GC/MS-Methode lag zwischen 3,5 % und 23,8 %, die der GC/MS/MS-Methode zwischen 1,4 % und 18,4 %. Die mittlere Präzision von Tag zu Tag der GC/MS-Methode betrug 9,8 %, die der GC/MS/MS-Methode 7,3 %.

Die Wiederfindungsrate der GC/MS-Methode lag zwischen 67 % und 112 %, die der GC/MS/MS-Methode zwischen 78 % und 114 %. Die berechneten mittleren Wiederfindungsraten betragen 91 % für die GC/MS und 97 % für die GC/MS/MS.

Die Auswertung einzelner Standardkurven ergab Bestimmtheitsmaße (R^2) zwischen 0,9792 und 0,9977 für die GC/MS-Methode und zwischen 0,9931 und 0,9985 für die GC/MS/MS-Methode. Die Steigungen der Geraden lagen zwischen 1,06 und 1,22 für die GC/MS-Methode und zwischen 1,10 und 1,25 für die GC/MS/MS-Methode. Neben der Auswertung der 5 einzelnen Standardkurven erfolgte auch eine zusammengefasste Auswertung über die Mittelwerte der 5 Standardkurven. Die Auswertung ergab eine lineare Regressionsgrade mit einer mittleren Steigung von 1,12 für die GC/MS-Methode und von 1,19 für die GC/MS/MS-

Methode. Das mittlere Bestimmtheitsmaß betrug bei der GC/MS-Methode 0,9977 und bei der GC/MS/MS-Methode 0,9992 (Abbildung 36, Abbildung 37).

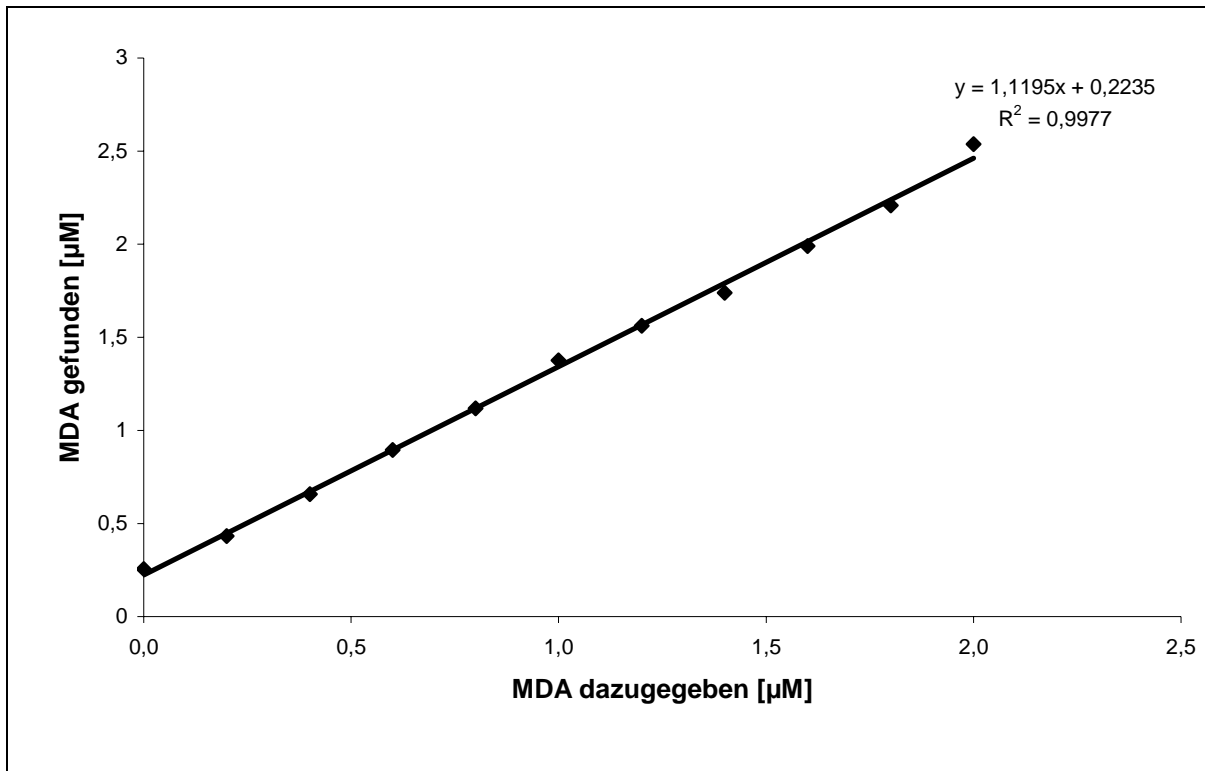


Abbildung 36: Zusammengefasste Auswertung über die Mittelwerte der 5 Standardkurven zur Validierung der GC/MS-Methode

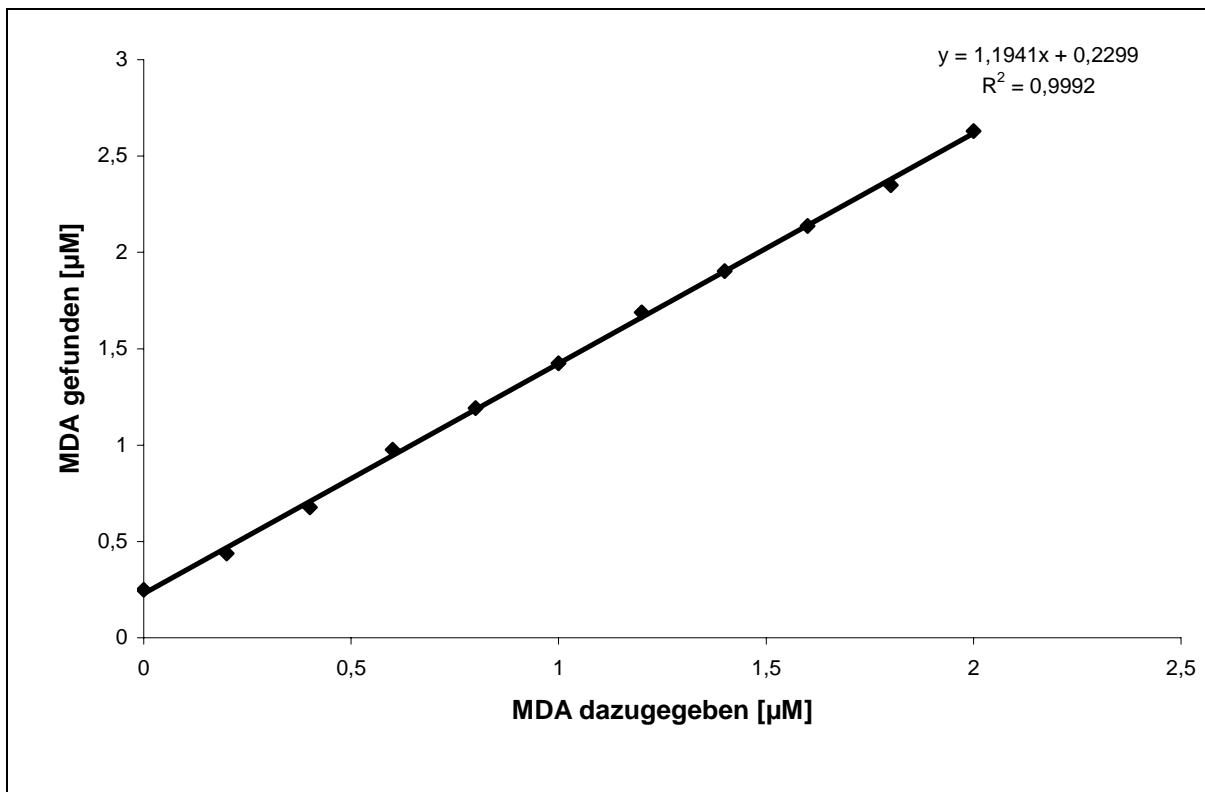


Abbildung 37: Zusammengefasste Auswertung über die Mittelwerte der 5 Standardkurven zur Validierung der GC/MS/MS-Methode

3.8.2.3. Nachweisgrenze

Mit der GC/MS-Messmethode konnte eine Menge von 100 fmol mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 144:1 in Phosphatpuffer bestimmt werden. Die GC/MS/MS-Messmethode erfasste eine Menge von 100 amol mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 183:1. Die Nachweisgrenze wurde als 2 fmol/ μl für die GC/MS und 1,6 amol/ μl für die GC/MS/MS berechnet.

3.8.2.4. Bestimmungsbereich

Im untersuchten Konzentrationsbereich bestand für die zugesetzten MDA-Konzentrationen (0,2 μM bis 2 μM) im Plasma sowohl für die GC/MS-Methode als auch die GC/MS/MS-Methode Linearität. Höhere und/oder niedrigere Konzentrationsbereiche wurden nicht auf Linearität überprüft.

3.8.3. Vergleich der Messverfahren zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

Die Auswertung nach Bland und Altman wurde mit Hilfe der Standardkurven (STKV) durchgeführt und ergab eine durchschnittliche Differenz von $-0,0809 \mu\text{M}$ mit einer Standardabweichung (SD) von $0,0919 \mu\text{M}$ zwischen den beiden Methoden. Des Weiteren zeigte die graphische Darstellung, dass lediglich 2 Datenpunkt nicht innerhalb der Grenzen von $\pm 2 \text{ SD}$ lagen (Abbildung 38).

Die Datenanalyse nach Pearson ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,990. Diese Korrelation war signifikant auf dem Signifikanzniveau von 0,001 mit einem p-Wert $< 0,001$. Die graphische Darstellung der einzelnen Messwerte der GC/MS-Methode gegen die entsprechenden Messwerte der GC/MS/MS-Methode ist wiedergegeben in Abbildung 39.

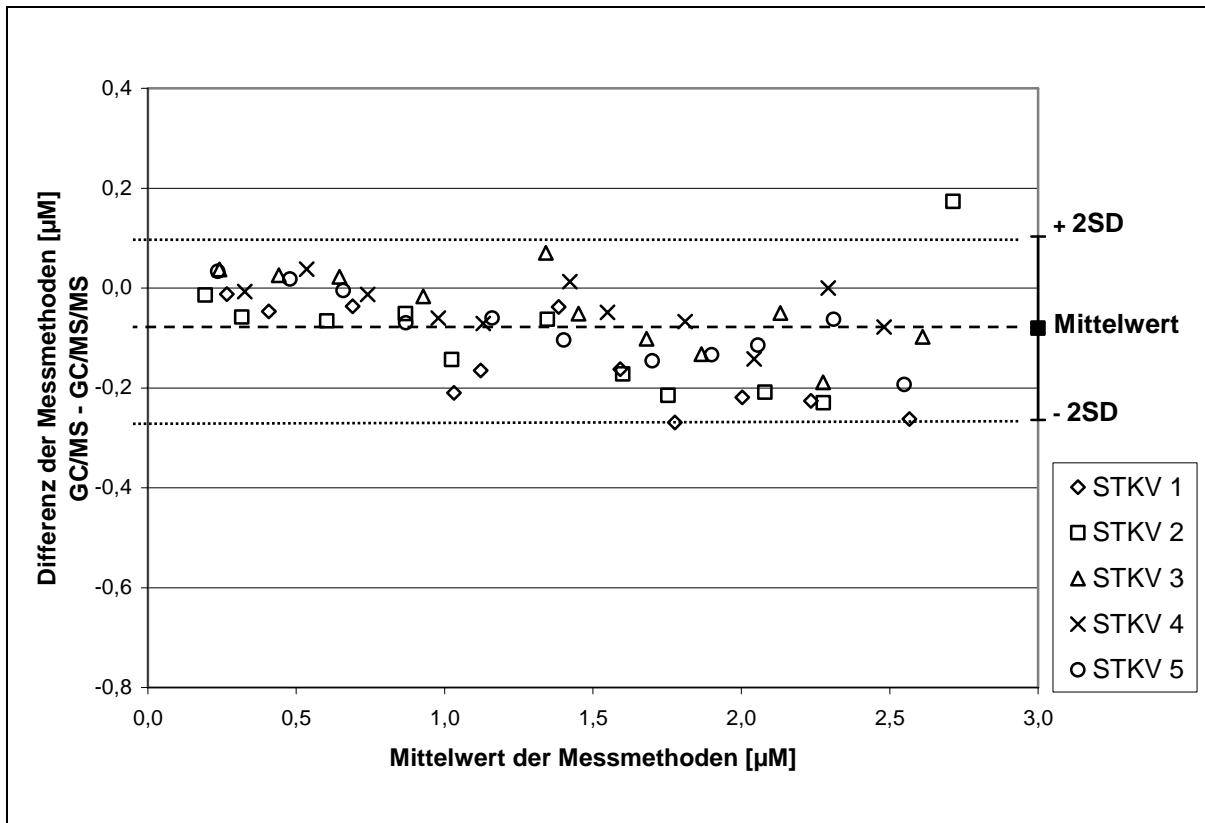


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse nach Bland und Altman

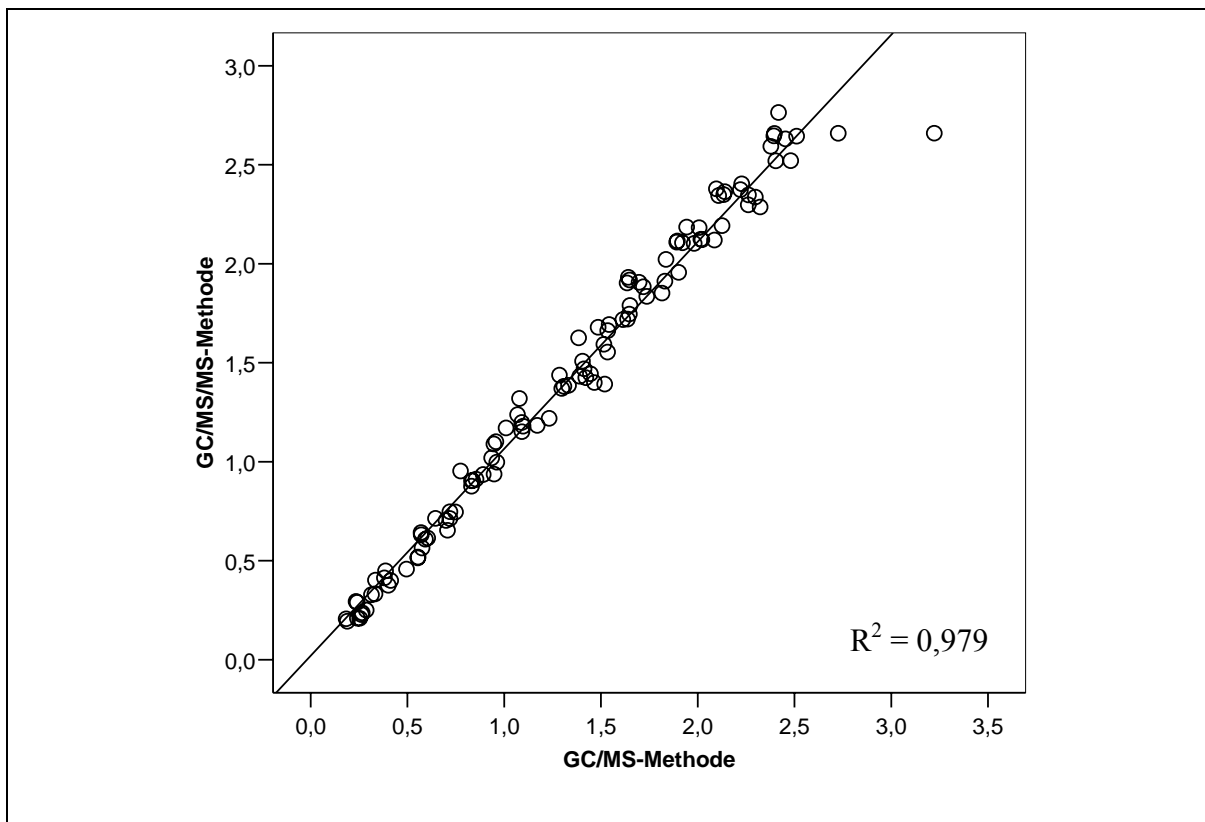


Abbildung 39: Darstellung zur Korrelation nach Pearson

3.8.4. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und als PFBox-Derivat

Zum Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA als PFB- bzw. PFBox-Derivat nach Bland und Altman wurden die Plasmaproben des Patientenkollektivs mit beiden Methoden bestimmt. Die höchsten Übereinstimmungen zwischen den beiden Methoden zeigten sich im Konzentrationsbereich bis etwa 1500 nM. In diesem Bereich wurde deutlich, dass die gemessenen MDA-Plasmakonzentrationen als PFB-Derivat unter denen des PFBox-Derivats lagen. Ab einer Konzentration von ca. 3000 nM wurde der Unterschied zwischen den beiden Methoden besonders auffällig, wobei in diesem Konzentrationsbereich die Werte der PFB-Methode weit über denen der BFBox-Methode lagen. Des Weiteren ergab die Auswertung eine durchschnittliche Differenz von 63 nM mit einer Standardabweichung von 1270 nM zwischen den beiden Methoden. Insgesamt lagen 4 Datenpunkte außerhalb der Grenze von ± 2 SD (Abbildung 40).

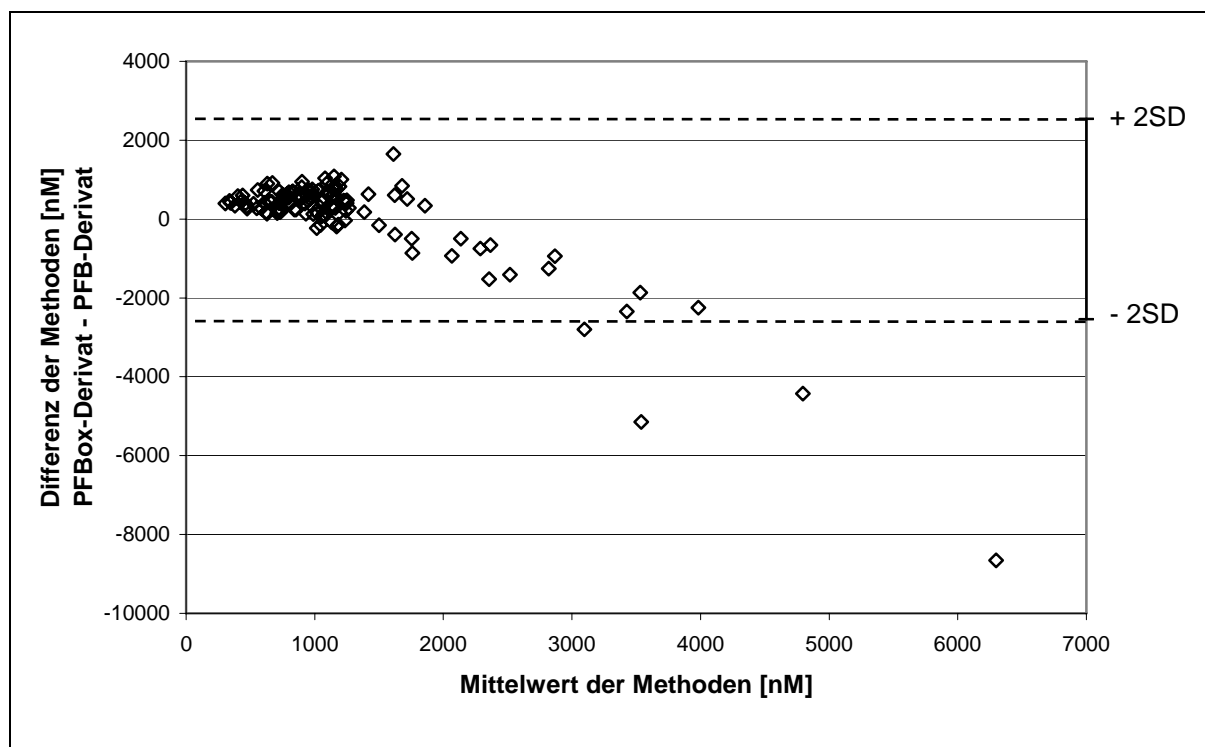


Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse nach Bland und Altman

Die Datenanalyse nach Spearman ergab einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,721. Diese Korrelation war signifikant auf dem Signifikanzniveau von 0,01 mit einem p -Wert $< 0,001$. Die graphische Darstellung der MDA-Plasmakonzentration als PFBox-Derivat gegen die MDA-Plasmakonzentration als PFB-Derivat ist wiedergegeben in Abbildung 41.

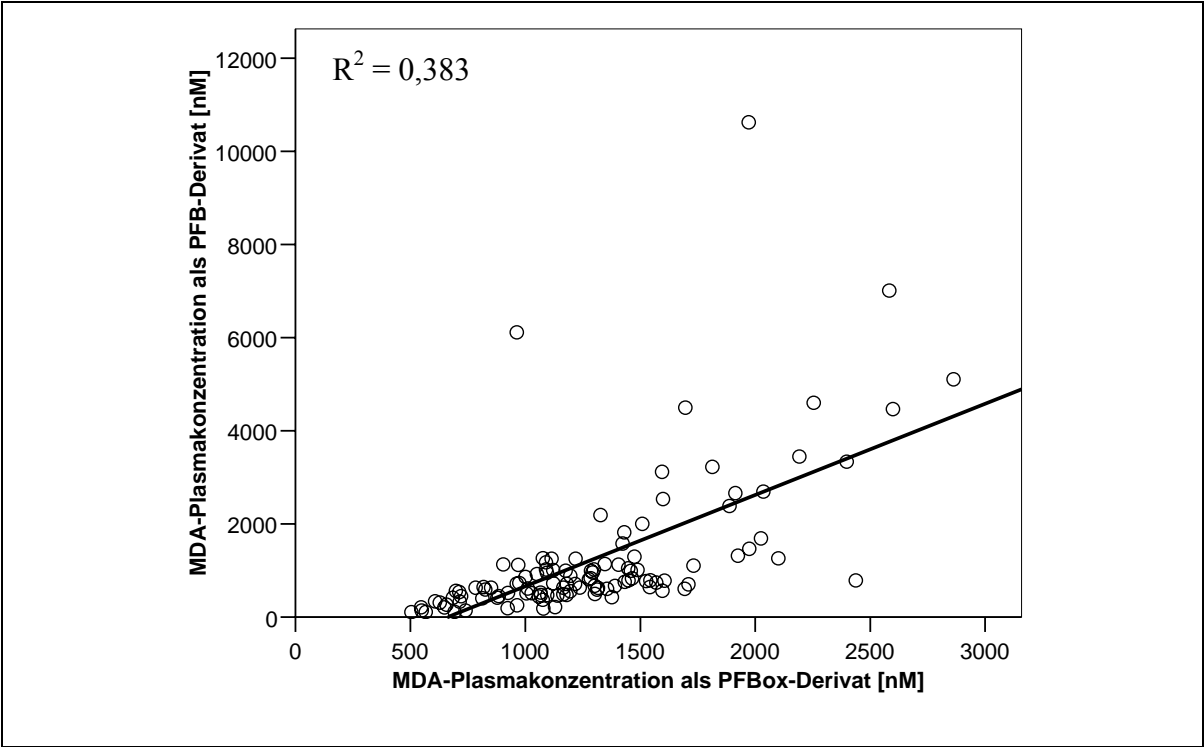


Abbildung 41: Darstellung zur Korrelation nach Spearman

4. DISKUSSION

4.1. Pilotstudie

4.1.1. Einfluss von L-Arginin auf kardiovaskuläre Ereignisse

Die demographische Auswertung ergab für beide Gruppen eine vergleichbare Patientenzahl und keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilungsparameter Alter, Body Mass Index, Geschlecht, Größe und Gewicht. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 62 Jahre und die geschlechtliche Verteilung wies ein Männer:Frauen-Verhältnis von durchschnittlich 4:1 auf. Auch bezüglich der Begleiterkrankungen, der Begleitmedikation und der durchgeführten Interventionen unterschieden sich die beiden Gruppen nicht.

Die statistische Auswertung der ersten Stufe des Sequentialplans bestätigte in Bezug auf die Hauptzielkriterien nicht den auf der Basis veröffentlichter Literatur erwarteten positiven Effekt einer L-Arginin-Therapie. Der durchgeführte Fischer-Test ergab mit einem p-Wert von 0,148 keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das für die Interimsanalyse vorgesehene Signifikanzniveau betrug für die erste Stufe 0,022 bzw. 0,333. Somit hätte laut Sequentialplan die Studie fortgeführt werden müssen, bis insgesamt 112 Patienten, 56 je Gruppe, rekrutiert worden wären. Auf Grund der Verteilung der kardiovaskulären Ereignisse auf die beiden Gruppen wurde jedoch von einer Fortführung der Studie abgesehen. Insgesamt entfielen 7 kardiovaskuläre Ereignisse auf die Verumgruppe und 2 kardiovaskuläre Ereignisse auf die Placebogruppe. Der festgelegte kritische Wert für die Ablehnung der Nullhypothese lag bei $-2,299$, der erreichte kritische Wert bei $-1,466$ (Abbildung 42). Die retrospektive Berechnung der Power ergab lediglich einen Wert von 25 %. Für ein signifikantes Ergebnis mit einer Power von 80 % hätten 88 Patienten pro Gruppe rekrutiert werden müssen. Da der Sequentialplan allerdings nur 56 Patienten pro Gruppe vorschrieb, hätte auch eine Fortführung der Studie zu keinem signifikanten Ergebnis geführt.

Eine mögliche negative Auswirkung der L-Arginin-Therapie wurde auf Grund der bereits veröffentlichten Studien zu diesem Thema nicht erwartet. Die Mehrzahl der bis Studienbeginn (2003) publizierten Studien am Menschen deutete auf einen protektiv-kardiovaskulären Effekt von L-Arginin hin (Creager et al. 1992, Drexler et al. 1994, Clarkson et al. 1996, Egashira et

55 Patienten in der L-Arginin- und 59 Patienten in der Placebogruppe die Studie beendet. Bei insgesamt 12 Patienten der L-Arginierungsgruppe traten klinische Ereignisse wie Tod, Myokardinfarkt und Krankenhausaufenthalt wegen Herzversagens auf. In der Placebogruppe litten lediglich 7 Patienten unter klinischen Ereignissen. In der L-Arginierungsgruppe starben insgesamt 6 Patienten, in der Placebogruppe keiner ($p = 0,01$). Die Autoren schlussfolgerten, dass L-Arginin die Sterblichkeit älterer Patienten nach Myokardinfarkt im Vergleich zu Placebo erhöhen könnte. Allerdings lag die beobachtete Sterblichkeit in der VINTAGE MI-Studie innerhalb der Grenzen der erwarteten Sterblichkeit 6 Monate nach Myokardinfarkt, die ca. 5 – 15 % beträgt. Auch ist die Studie besonders unter dem Aspekt eines fehlenden Anstiegs der L-Arginin-Konzentration im Plasma unter der durchgeführten L-Arginin-Therapie mit 9 g pro Tag unglaublich. Deshalb erscheint ein Kausalzusammenhang zwischen den klinischen Ergebnissen und der L-Arginin Therapie sehr fraglich. Im Gegensatz zur VINTAGE MI-Studie konnten unsere Pilotstudie und die Studien von Clarkson et al. (1996), Rector et al. (1996), Blum et al. (2000), Maxwell et al. (2000), Walker et al. (2001) und Dudek et al. (2002) einen signifikanten Anstieg der L-Arginin-Konzentration im Plasma nach oraler Gabe von L-Arginin in Dosierungen zwischen 5 g und 21 g pro Tag nachweisen. Der fehlende Anstieg der L-Arginin-Konzentration im Plasma in der VINTAGE MI-Studie deutet auf ein Compliance-Problem hin, und somit sind die Ergebnisse der Studie in Frage zu stellen. Die Autoren der VINTAGE MI-Studie diskutierten, dass der fehlende L-Arginin-Anstieg durch eine Hemmung der Arginase in diesen Patienten hervorgerufen worden sein könnte. Das Enzym Arginase baut L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff ab, so dass diese Patienten erhöhte Blutharnstoff-Werte hätten aufweisen müssen. Der Blutharnstoff wurde jedoch nicht bestimmt, so dass dieser Theorie nicht weiter nachgegangen werden kann. Auch stehen die Ergebnisse der VINTAGE MI-Studie im Gegensatz zu einer 2005 veröffentlichten prospektiven, multizentrischen, randomisierten, doppelblinden und placebokontrollierten Pilotstudie aus Polen (Bednarz et al. 2005). In dieser Studie, die unter dem Namen ARAMI publiziert wurde, konnte für eine dreißigtägige Gabe von 9 g L-Arginin pro Tag in Patienten mit akutem Myokardinfarkt ein verbesserter klinischer Verlauf verzeichnet werden als unter Placebo ($p = 0,06$). In der Subgruppe der Patienten mit Hyperlipidproteinämie war der Unterschied zur Placebogruppe sogar statistisch signifikant ($p < 0,05$). Diese Studie zeichnet sich im Vergleich zur VINTAGE MI-Studie durch ein wesentlich größeres Patientenkollektiv (792 Patienten) aus, hat aber mit 30 Tagen Therapiedauer auch einen deutlich geringeren Beobachtungszeitraum. Mit der ARAMI-Studie

ist somit eine weitere Studie publiziert wurden, die einen positiven Effekt von L-Arginin auf Patienten mit KHK aufzeigt.

Wilson et al. (2007) veröffentlichten dagegen Studienergebnisse, die auf einen möglichen negativen Effekt einer L-Arginin-Therapie hindeuten könnten. In einer prospektiven, monozentrischen, randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie namens NO-PAIN untersuchte die Forschungsgruppe den Effekt einer sechsmonatigen L-Arginin-Therapie (3g/Tag) an 133 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Im Gegensatz zur VINTAGE-MI Studie stieg auch in dieser Studie die L-Arginin-Plasmakonzentration in der Verumgruppe an. Des Weiteren konnte ein Abfall der strömungsvermittelten Vasodilation unter L-Arginin beobachtet werden, wogegen unter Placebo ein Anstieg der strömungsvermittelten Vasodilation eintrat. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. In Bezug auf die Gehstrecke konnte bei beiden Gruppen eine Verbesserung festgestellt werden. In der Verumgruppe war diese Verbesserung allerdings signifikant geringer als in der Placebogruppe. Die Gruppe schlussfolgerte, dass L-Arginin nicht zu einer Verbesserung der Gehstrecke bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit beiträgt. Des Weiteren wurde die Hypothese aufgestellt, dass L-Arginin eventuell sogar die Gefäßleistung einschränken könnte. Als Erklärungsansatz für ihre Ergebnisse führten Wilson et al. (2007) das Prinzip der L-Arginin-Toleranz an, das einer gesteigerten endogenen Bildung von NO entgegenwirken könnte. Mögliche mechanistische Ansätze hierfür wären eine Induzierung der Arginase, sowie eine Hemmung der NOS durch NO selbst oder eine Hemmung des L-Arginin-Transporters.

Als Diskussionsansatz für die negative Ausrichtung der Ergebnisse unserer Pilotstudie kann die separate Analyse des Patientenkollektivs mit erfüllten Hauptzielkriterien herangezogen werden. Diese ergab hinsichtlich diverser Risikofaktoren zu Studienbeginn ein signifikant häufigeres Auftreten eines Zustandes nach Apoplex sowie eine signifikant höhere CRP-Konzentration im Plasma in der Gruppe mit erreichten Hauptzielkriterien. Als Apoplex bezeichnet man eine Minderdurchblutung im, oder Einblutung ins Gehirn. Am häufigsten sind dabei Minderdurchblutungen, so genannte transitorische ischämische Attacken (TIAs), deren primäre jährliche Inzidenz in Deutschland bei 132 Ereignissen/100.000 Einwohner liegt (Kolominsky-Rabas et al. 2001). Als Ursachen für eine TIA kommen Atherosklerosen großer Arterien, Kardioembolien sowie Verschlüsse kleinerer Arterien in Frage. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Intima-Media-Dicke der Carotis ein guter Indikator für das Bestehen und den Grad einer Atherosklerose ist. Zusätzlich lässt sie sich zur Vorhersage vaskulärer Ereignisse (Myokardinfarkt, Angina pectoris, koronare Intervention, TIA) inklusive Tod

heranziehen (Hodis et al. 1998, Ebrahim et al. 1999, Staub et al. 2006, Lorenz et al. 2007). Ob bei unseren Studienpatienten mit Apoplex auch eine Veränderung der Carotis vorlag, ist nicht bekannt. Da die beiden Patienten mit Zustand nach TIA aber auch unter einer KHK litten, und die Risikofaktoren für eine TIA denen einer KHK gleichen, sind atherosklerotische Veränderungen der Carotis als Auslöser für die TIAs nahe liegend. Da Veränderungen der Carotis zur Vorhersage vaskulärer Ereignisse genutzt werden können, könnte das Auftreten der kardiovaskulären Ereignisse in den beiden Patienten mit Zustand nach Apoplex durch diesen zusätzlichen Risikofaktor erklärt werden. Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen dem Kollektiv mit kardiovaskulären Ereignissen und dem restlichen Patientenkollektiv bestand in der höheren CRP-Konzentration der Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis. CRP ist ein Entzündungsmarker, der in Zusammenhang mit der KHK gebracht wird, da der Entzündungsprozess eine elementare Rolle bei der Entstehung und Weiterentwicklung der Atherosklerose spielt (Ross 1999). Lokale Entzündungen können die Zytokinproduktion stimulieren, die wiederum die endotheliale Adhäsion induziert und die Monozytenmigration steuert. Weiterhin wird eine Plaqueruptur und Thrombusformation mit dem Entzündungsprozess in Verbindung gebracht (van der Wal et al. 1994, Casscells et al. 1996). Zusätzlich konnte im Zellversuch gezeigt werden, dass sich eine erhöhte CRP-Konzentration negativ auf die NO-Produktion und Angiogenese auswirkt (Verma et al. 2002). Erhöhte CRP-Konzentrationen wurden bei Patienten mit positiver Myokardinfarkt-Familienanamnese, einer manifesten KHK und mit KHK-Risikofaktoren (Nikotinkonsum, Alter, BMI, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus) festgestellt (Mendall et al. 1996, Koenig et al. 1999, Rifai et al. 1999, Margaglione et al. 2000, Rosen et al. 2007). Zusätzlich kann die CRP-Konzentration zur Vorhersage des KHK-Risikos herangezogen werden, da das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses proportional mit der CRP-Konzentration ansteigt (Koenig et al. 1999, Tommasi et al. 1999, Gram et al. 2000, Ridker et al. 2000, Strandberg und Tilvis 2000). Dieser prognostische Ansatz zeigte sich auch in unserer Pilotstudie. Die Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis wiesen zu Studienbeginn eine signifikant höhere CRP-Konzentration auf als das restliche Patientenkollektiv. Dies könnte das vermehrte Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in dieser Gruppe erklären. Allerdings ist anzumerken, dass nicht bei allen Patienten mit deutlich erhöhten CRP-Spiegeln kardiovaskuläre Ereignisse eintraten, und bei einigen Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis befand sich die CRP-Konzentration dagegen im Normbereich. Somit scheint die CRP-Konzentration zum individuellen Risikoprofil beizutragen, nicht aber uneingeschränkt ausschlaggebend zu sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der sich bei der Analyse des Patientenkollektivs mit kardiovaskulären Ereignissen ergab, war das signifikant höhere Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen im Studienzentrum Magdeburg im Vergleich zum Studienzentrum Oldenburg ($p = 0,023$). Die auf diesem Unterschied basierende Gruppenanalyse ergab zu Studienbeginn eine signifikant höhere Anzahl Patienten mit Hypertonie und Hypercholesterinämie im Studienzentrum Magdeburg sowie einige signifikante Unterschiede bei den Nebenzielparametern. Besonders auffällig war die durchschnittliche CRP-Konzentration, die in Magdeburg im Vergleich zu Oldenburg zweifach erhöht war. Die höhere Anzahl Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie sowie einer deutlich höheren CRP-Konzentration in Magdeburg sprechen für einen schlechteren kardiovaskulären Gesundheitszustand und ein höheres Risikoprofil in dem Patientenkollektiv dieses Studienzentrums. Studien, die kardiovaskuläre Mortalität, Risikofaktoren und Medikation zwischen den alten und neuen Bundesländern Deutschlands verglichen haben, fanden auch noch 10 Jahre nach der Wiedervereinigung eine bis zu 50 % erhöhte Mortalitätsrate in Bezug auf eine KHK, Variationen im Verschreibungsprofil kardiovaskulärer Medikation sowie ein ungünstigeres Risikoprofil in den neuen Bundesländern (Marti et al. 1990, Nolte et al. 2000a, Nolte et al. 2000b, Müller-Nordhorn et al. 2004, Müller-Nordhorn et al. 2005). Das vermehrte Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse im Studienzentrum Magdeburg ist unter diesen epidemiologischen Gesichtspunkten nicht verwunderlich.

Auch ist zu berücksichtigen, dass die Hauptzielkriterien für diese Pilotstudie aus einem kombinierten kardiovaskulären Endpunkt bestanden, für dessen Bestimmung das Studienprotokoll keine definierten Untersuchungen vorgab, sondern lediglich eine Befragung der Patienten auf neu diagnostizierte Ereignisse durchgeführt wurde. Bei einem neu diagnostizierten Ereignis wurde Einsicht in die Befunde genommen, aber keine weiteren Untersuchungen zur Bestätigung durchgeführt. Somit sind auch bis zur Enduntersuchung nicht diagnostizierte Ereignisse in dieser Auswertung nicht berücksichtigt. Dies schließt sowohl Restenosen als auch stumme Myokardinfarkte etc. ein. Spezifischere Hauptzielkriterien wären z.B. eine Vermessung der Restenose durch erneute Angiographie nach 3 und 6 Monaten gewesen, allerdings wurde davon aus ethischen als auch kostentechnischen Gründen für diese Pilotstudie abgesehen.

Da sich unsere Pilotstudie in Bezug auf einen möglichen positiven Effekt von anderen am Menschen durchgeführten L-Arginin-Studien abhebt, wurde eine Analyse mit anschließendem Vergleich zwischen unserer Pilotstudie und anderen Studien durchgeführt. Folgende Faktoren

stachen hervor: In den Studien von Creager et al. (1992), Drexler et al. (1994), Egashira et al. (1996), Lerman et al. (1998), Tousoulis (2001) und Suzuki et al. (2002) wurde das L-Arginin intravenös oder intrakoronar appliziert. Zusätzlich zeichnen sich viele Studien, auch die bei denen eine vergleichbare orale L-Arginin-Therapie durchgeführt worden ist, durch strikere Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien als in unserer Pilotstudie aus. Zu den Ausschlusskriterien der Studien von Creager et al. (1992), Drexler et al. (1994), Chin-Dusting et al. (1996), Clarkson et al. (1996), Egashira et al. (1996), Rector et al. (1996), Ceremuzynski et al. (1997), Lerman et al. (1998), Maxwell et al. (2000), Tousoulis et al. (2001) und Dudek et al. (2002) zählten mitunter Zustand nach Myokardinfarkt, ST-Streckenveränderungen, KHK, PAVK, Hypertonie, Hypercholesterinämie, zerebrovaskuläre Ischämie, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum. Die Patienten unserer Pilotstudie wiesen dagegen diese Kriterien als Begleiterkrankungen bzw. Einschlusskriterien auf. Das Kollektiv unserer Pilotstudie war somit sehr praxisnah. Zusätzlich wiesen alle Patienten mehr als einen bekannten Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse auf. Somit ist unsere Pilotstudie, neben den Studien von Bednarz et al. (2005) und Schulman et al. (2006), eine der ersten Studien, die L-Arginin an einem breiten Patientenquerschnitt angewendet hat. Die bestehenden Begleiterkrankungen und Risikofaktoren unseres Kollektivs könnten einen möglichen Erklärungsansatz für die nicht reproduzierbaren positiven Ergebnisse der strikter klassifizierten Studien geben. Als wesentliches Auswahlkriterium für zukünftige Studien könnte sich auch der ADMA-Plasmaspiegel erweisen. Es wurde wiederholt beobachtet, dass Patienten mit erhöhten ADMA-Werten in besonders positiver Weise auf L-Arginin reagieren. Dies ist besonders auf der Basis des kompetitiven Antagonismus von ADMA und L-Arginin an der NO-Synthese gut verständlich (Böger und Ron 2005). Da die ADMA-Plasmaspiegel unserer Patienten im Normbereich lagen, findet sich hier ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für das Ausbleiben eines positiven L-Arginin-Effektes in unserer Pilotstudie.

Weiterhin unterscheidet sich unsere Pilotstudie im Vergleich zu Studien mit positivem Effekt auch hinsichtlich der oral eingenommenen L-Arginin-Tagesdosis (10 g/Tag) und der Therapiedauer (6 Monate). Dabei ist zu berücksichtigen, dass zwar 75 % des Gesamtstudienkollektivs compliant waren, und auch zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte, dennoch aber im Patientenkollektiv mit erreichten Hauptzielkriterien nur bei 6 der 9 Patienten die Compliance auswertbar war und bestand (66 %). Die Therapiedauer der Patienten mit erreichten Hauptzielkriterien in der Verumgruppe schwankte stark zwischen 21 und 153 Tagen. Die durchschnittliche L-Arginin-

Therapiedauer lag in dieser Subgruppe bei lediglich 85 Tagen, die von 4 der 7 Patienten nicht überschritten wurde. Zu den Studien mit einer geringeren L-Arginin-Tagesdosis und Therapiedauer zählen die von Rector et al. (1996) [$\leq 12,6$ g/Tag über 4 Wochen], Ceremuzynski et al. (1997) [6 g/Tag über 3 Tage], Blum et al. (1999) [9 g/Tag über 3 Monate], Maxwell et al. (2000) [6,6 g/Tag über 1 Woche] und Bednarz et al. (2005) [9 g/Tag über 30 Tage]. Eine L-Arginin-Therapie, die hinsichtlich der Therapiedauer mit unserer Pilotstudie vergleichbar wäre, wurde lediglich von Schulman et al. (2006) in der VINTAGE MI-Studie durchgeführt. In der Studie von Wilson et al. (2007) wurde den Patienten über einen Zeitraum von 6 Monaten 3 g L-Arginin pro Tag verabreicht. Hinsichtlich der Therapiedauer ist auch diese Studie mit unserer Pilotstudie vergleichbar, die L-Arginin-Tagesdosis ist allerdings um 75 % geringer. Somit scheint neben der Charakterisierung des Patientenkollektivs auch die L-Arginin-Dosierung und -Therapiedauer einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der Studie zu haben. Der Hypothese einer möglichen L-Arginin-Toleranz von Wilson et al. (2007) sollte daher in Zukunft nachgegangen werden.

Hinsichtlich der erreichten Endpunkte unterscheiden sich die Ergebnisse unserer Studie ebenfalls von den Literaturdaten aus Studien mit einer vergleichbaren Therapiedauer. In der Studie von Schulman et al. (2006) erreichten 12 Patienten in der L-Arginin-Gruppe einen kardiovaskulären Endpunkt (einschließlich Tod), der vergleichbar mit dem kombinierten Endpunkt unserer Studie ist, in der Studie von Wilson et al. (2007) waren es 5 Patienten. Berechnet auf die Gesamtpatientenzahl der jeweiligen Therapiegruppe sind das 16,7 % und 7,6 %. Unsere Pilotstudie liegt mit 22,6 % für die L-Arginin-Gruppe deutlich darüber. In der Publikation von Lerman et al. (1998), die ebenfalls eine L-Arginin-Studie über 6 Monate durchführten, wird keine Aussage über unerwünschte Ereignisse gemacht, so dass ein Vergleich mit unserer Pilotstudie nicht möglich ist.

Auch wenn publizierte Studien mit oral verabreichtem L-Arginin eine positive Wirkung auf das Gefäßsystem für klar definierten Patientengruppen und Dosierungen aufzeigen konnten, bleibt der Nutzen von L-Arginin in einem praxisnahen Patientenkollektiv in der von uns gewählten Dosierung und Anwendungsdauer ungewiss.

4.1.2. Einfluss von L-Arginin auf den NO-Stoffwechsel

Im Studienverlauf konnte wie erwartet ein deutlicher Anstieg der L-Arginin-Konzentration im Plasma und der L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin der Verumgruppe verzeichnet werden.

Die zu Studienbeginn gemessene mittlere L-Arginin-Konzentration im Plasma lag mit 62 μM für das gesamte Patientenkollektiv nur knapp unter der anderer Studien von durchschnittlich 85 μM (Creager et al. 1992, Rector et al. 1996, Bode-Böger et al. 1999, Blum et al. 2000, Lücke et al. 2006, Martens-Lobenhoffer und Bode-Böger 2007). Allerdings ist bei der L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin ein leichter, aber nicht signifikanter Abfall der Werte von der U2 zur U3 zu beobachten. Dieser Abfall deutet auf eine geringere Compliance in der zweiten Studienhälfte hin.

Die ADMA-Spiegel im Plasma blieben dagegen im Studienverlauf im Vergleich zu den L-Arginin-Spiegeln konstant. Durch die konstanten ADMA-Spiegel und den beobachteten L-Arginin-Anstieg kam es in unserer Studie zu einer Verschiebung des L-Arginin/ADMA-Plasmakonzentrationsverhältnisses zu Gunsten von L-Arginin. Zu Studienbeginn wies die Verumgruppe ein L-Arginin/ADMA-Plasmakonzentrationsverhältnis von 135:1 auf, welches sich im Studienverlauf auf 195:1 erhöhte. Die ADMA-Konzentrationen im Plasma lagen in unserer Studie mit durchschnittlich 0,5 μM an der oberen Normgrenze. Für Gesunde wurden mit vergleichbaren Labormethoden ADMA-Konzentrationen zwischen 0,4 μM und 0,5 μM im Plasma gemessen (Tsikas et al. 2003, Thum et al. 2005, Horowitz und Heresztyn 2007, Martens-Lobenhoffer und Bode-Böger 2007, Teerlink 2007). In Bezug auf Patienten mit KHK sind uns vergleichbare ADMA-Spiegel von Thum et al. (2005) bekannt. Die ADMA-Spiegel in der Studie von Thum et al. (2005) wurden mit einer vergleichbaren Labormethode ermittelt und lagen je nach Grad der KHK (Eingefäßerkrankung, Zweigefäßerkrankung oder Dreigefäßerkrankung) zwischen 0,45 μM und 0,58 μM . Frühere Studien zeigen dagegen deutlich höhere ADMA-Spiegel (2,17 – 3,49 μM) bei Patienten mit PAVK (Böger et al. 1997), Hypertonie (Surdacki et al. 1999) und Hypercholesterinämie (Böger et al. 1998). Diese deutlich erhöhten Messergebnisse liegen in der wenig spezifischeren Labormethode (HPLC mit Derivatisierungsreagenz *o*-Phthaldialdehyd) zur Bestimmung von ADMA begründet. Für die ADMA-Ausscheidungsrate im Urin konnte für die Verumgruppe im Verlauf von der U1 zur U2 ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden, der im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt der U2 signifikant war. Dieser Anstieg könnte in der L-Arginin-Gabe begründet liegen, die eine vermehrt Methylierung der Arginin-Seitenkettengruppen zu methylierten Analoga herbeigeführt haben könnte. Diese Theorie wird durch den signifikanten Anstieg der L-NMMA-Konzentration im Plasma in der Verumgruppe unterstützt. Warum ein vergleichbarer Anstieg der ADMA-Konzentration im Plasma ausblieb bleibt ungewiss. Unter diesem Gesichtspunkt bleibt zu erwähnen, dass die meisten Studien keinen Anstieg der

ADMA-Konzentration unter einer L-Arginin-Therapie beobachten konnten (Walker et al. 2001, Bode-Böger et al. 2003). Nur eine kürzlich veröffentlichte Pilotstudie an Patienten mit PAVK konnte einen vergleichbaren Trend beobachten (Lachmuth 2008). Auch eine Studie von Schwedhelm et al. (2007) deutet auf einen Anstieg der ADMA-Konzentration unter L-Arginin hin, adressiert diesen aber nicht direkt. In dieser Veröffentlichung wurden nur die L-Arginin/ADMA-Plasmakonzentrationsverhältnisse vor und nach L-Arginin-Therapie angegeben. Unter Berücksichtigung der ADMA-Konzentration zu Studienbeginn und der L-Arginin-Konzentration zu Studienende lässt sich allerdings ein Anstieg der ADMA-Konzentration berechnen.

Für DMA, ein Abbauprodukt von ADMA, wurden über den gesamten Studienverlauf konstante Spiegel gemessen. Die mittlere DMA-Ausscheidungsrate im Urin lag bei 40 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin. Diese Ausscheidungsrate lässt sich auf Grund von stark variierenden DMA-Normwerten nur schwer in Relation setzen. Die veröffentlichten DMA-Urinausscheidungen für Gesunde liegen je nach Labormethode bei 100 - 500 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$ (Zhang et al. 1993, Achan et al. 2003, Tsikas et al. 2006). Mit einer geschätzten Kreatinin-Ausscheidung von 10 mmol/Tag würde die mittlere DMA-Urinausscheidung unserer Studie bei 400 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$ liegen. In einer Studie von Tsikas et al. (2006), in der die gleiche Labormethode wie in unserer Pilotstudie verwendet wurde, betrug die mittlere DMA-Ausscheidungsrate im Urin von Gesunden 10 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin, die von 49 KHK-Patienten 53 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin. Die DMA-Ausscheidungsrate unserer Pilotstudie liegt mit 40 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin somit knapp unter der von Tsikas et al. (2006). Das DMA/ADMA-Urinausscheidungsratenverhältnis lag in der Untersuchung von Tsikas et al. (2006) für Gesunde bei 10:1 und für Patienten mit KHK mit 14:1 etwas darüber. Unsere Pilotstudie wies ein DMA/ADMA-Urinausscheidungsratenverhältnis von 10:1 auf, welches mit den geringeren DMA-Spiegeln bei vergleichbaren ADMA-Konzentrationen zu begründen ist.

Die Diskussion der Nitrit- und Nitrat-Ergebnisse in Bezug auf den L-Arginin-Stoffwechsel gestaltet sich für unsere Pilotstudie schwierig. Obwohl bereits publizierte eigene und andere Untersuchungen einen Anstieg der Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen unter einer L-Arginin-Therapie aufzeigen konnten (Hibbs et al. 1987, Marletta et al. 1988, Palmer et al. 1988, Bode-Böger et al. 1996, Böger et al. 1996, Bode-Böger et al. 1999), zeigte unsere Studie in beiden Gruppen stark schwankende und inkonsistente Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen, die allerdings im Normbereich lagen. Besonders auffällig war hierbei ein signifikanter Abfall der Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin in der Placebogruppe über den gesamten Studienverlauf

hinweg. In der Verumgruppe wurde dagegen von der U1 zur U2 ein leichter, nicht aber signifikanter Anstieg in der Nitrat-Ausscheidungsrate im Urin verzeichnet. Im weiteren Verlauf fiel die Ausscheidungsrate dann signifikant ab und zwar bis weit unter den zur Eingangsuntersuchung gemessenen Wert. Dieser Verlauf deckt sich mit dem der L-Arginin-Ausscheidungsrate im Urin und könnte in einer mangelnden Compliance zum Studienende begründet liegen. Studien, in denen ebenfalls kein Anstieg der Nitrit- und/oder Nitrat-Konzentrationen unter L-Arginin verzeichnet werden konnte, wurden unter anderem von Blum et al. (2000), Bennett-Richards et al. (2002), Schwedhelm et al. (2007) und Wilson et al. (2007) publiziert. Als mögliche Ursachen für einen fehlenden Nitrit- und Nitratanstieg im Plasma unter L-Arginin kommen in unserer Studie unter anderem präanalytische Probleme in Frage. In der klinischen Phase unserer Studie war es nicht möglich, das EDTA-haltige Vollblut und den Spontan-Urin innerhalb von Sekunden einzufrieren oder auf Eis zu lagern. Somit ist eine artifizielle Umwandlung von Nitrit zu Nitrat *in vitro* denkbar. Auch kann ein so empfindlicher Parameter wie Nitrit von Variationen in der Abnahmezeit und auch –menge beeinflusst werden. Innerhalb und zwischen beiden Studienzentren war es nicht möglich die Abnahmezeit oder –menge zu standardisieren. Zu erwähnen bleibt auch, dass Monovetten von verschiedenen Herstellern benutzt wurden, die herstellungsbedingt verschiedene Konzentrationen an Nitrit- und Nitratverunreinigungen enthalten könnten. Des Weiteren wurde bei dieser Studie auch auf eine Kontrolle oder Standardisierung der Nitrit- und Nitrataufnahme mit der Nahrung oder Medikation verzichtet. Daher lassen sich unsere Ergebnisse nur bedingt zur Erläuterung der Nitrit- und Nitrat-Stoffwechselforgänge heranziehen.

Die statistische Auswertung der Studiendaten ergab des Weiteren einen signifikanten Anstieg von HDL unter L-Arginin. Ein gruppenspezifischer Unterschied konnte allerdings im Vergleich zur Placebogruppe nicht nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten lediglich in einer weiteren publizierten Studie identifiziert werden (Siani et al. 2000). HDL, das im Gegensatz zum LDL umgangssprachlich als „gute Cholesterin“ bezeichnet wird, vermag freies Cholesterin aus den Zellen aufzunehmen und es in Cholesterinester umzuwandeln. Zusätzlich wirkt es über eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit positiv auf den Gefäßstatus (Spieker et al. 2002, Bisoendial et al. 2003). Dies geschieht unter anderem über eine Beeinträchtigung der Plättchenfunktion (Chen und Mehta 1994). Somit kann dem HDL eine Schlüsselfunktion im NO- bzw. L-Arginin-Stoffwechsel zugesprochen werden. Auf welchem Wege aber ein Anstieg von HDL durch eine L-Arginin-Gabe hervorgerufen werden kann, bleibt bis heute ungeklärt. Basierend auf dieser Schlüsselfunktion und unseren

Studienergebnissen ist der Einsatz von L-Arginin in weiteren, kontrollierten, klinischen Studien auf dem Gebiet der Hyperlipidproteinämie-Therapie und zur Risikofaktorreduktion bei Patienten mit KHK in Zukunft denkbar.

Ein weiterer positiver Effekt von L-Arginin auf den NO-Stoffwechsel konnte in Bezug auf den diastolischen Blutdruck beobachtet werden. Dieser fiel bei gleichbleibendem Median signifikant von der Eingangs- zur Zwischenuntersuchung in der Verumgruppe ab. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Blutdrucks (diastolisch, systolisch und/oder mittlerer) konnten Studien von Bode-Böger et al. (1998), Higashi et al. (1999) und Huynh und Tayek (2002) verzeichnen. Dass sich dieser Verlauf nicht von der U2 zur U3 fortsetzte, liegt höchst wahrscheinlich in der geringeren L-Arginin-Compliance zum Studienende begründet. Eine explorative Subgruppenanalyse mit Patienten, die zusätzlich noch Nitrate als antihypertensive Therapie erhielten, zeigte ebenfalls einen Abfall des diastolischen Blutdrucks in der Subgruppe, die neben der L-Arginin-Therapie noch Nitrate erhielten. Dieser Effekt ist mit der erhöhten NO-Zufuhr aus L-Arginin und Nitraten in diesen Patienten zu begründen. Schlussfolgernd stellt die Blutdruck-Veränderung unter L-Arginin eine weitere Therapieoption zur kardiovaskuläre Risikoreduktion dar.

4.1.3. Einfluss von L-Arginin auf Parameter des oxidativen Stresses

Im Studienverlauf konnte für die Plasmakonzentrationen aller Parameter des oxidativen Stresses (8-iso-PGF_{2α}, MDA, HNE) ein Abfall in beiden Gruppen beobachtet werden. Die 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration im Plasma war darüber hinaus zu Studienbeginn zehnfach und zu Studienende fünffach gegenüber dem oberen Normwert erhöht. Die 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin blieb dagegen über den gesamten Studienverlauf innerhalb beider Gruppen konstant im Normbereich. Bei der Zwischenuntersuchung konnte allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, da die Verumgruppe zu diesem Zeitpunkt eine signifikant niedrigere 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin aufwies als die Placebogruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass L-Arginin den oxidativen Stress reduziert, wie es auch andere am Menschen und Tier durchgeführte Studien belegen (Sydow et al. 2003, Böger et al. 1995). Der Abfall der Plasmakonzentration aller Parameter des oxidativen Stresses über den Studienlauf deutet auf eine Verringerung des oxidativen Stresses durch die durchgeführte Gefäßaufdehnung hin. Die konstante Urinausscheidungsrate spricht allerdings gegen einen solchen gruppenübergreifenden positiven Effekt, da eine Verbesserung der oxidativen Stresssituation sich auch auf die 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsrate im Urin hätte

auswirken müssen. Somit scheinen methodologische Probleme für den Abfall der oxidativen Stressparameter im Plasma verantwortlich zu sein. Alle Studienparameter, die im Labor der Klinischen Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover bestimmt worden sind, wurden zeitverzögert aufgearbeitet und vermessen. Die Plasma- und Urinproben wurden kurz nach der Abnahme bei -20 °C eingefroren und dort bis zur weiteren Auswertung gelagert. Die Auswertung der Parameter 8-iso-PGF_{2α}, MDA und HNE erfolgte aus personaltechnischen Gründen erst lange nach Studienabschluss. Die 8-iso-PGF_{2α}-Urin- und Plasmaproben wurden ca. 4 Monate nach Studienende ausgewertet, die MDA- und HNE-Plasmaproben erst weitere 12 Monate später. Auf Grund des Studiendesings liegt noch zusätzlich ein Zeitintervall von 13 Monaten zwischen dem Studienabschluss durch den ersten und den letzten Patienten. Da Plasmaproben Lipide enthalten, ist es denkbar, dass sich trotz der Lagerung bei -20 °C 8-iso-PGF_{2α}, MDA und HNE artifiziell aus den bluteigenen Lipiden gebildet haben könnten. Da zwischen der Eingangs- und Enduntersuchung 6 Monate liegen, könnte der Plasmakonzentrationsunterschied zur Eingangs- und zur Enduntersuchung auf dieses Zeitfenster zurückgeführt werden. In diesem Modell würde sich die Plasmakonzentration der oxidativen Stressparameter proportional zur Lagerzeit verhalten und sich so auch die fünf- bis sechsfach gegenüber der Norm erhöhten 8-iso-PGF_{2α}-Plasmaspiegel erklären. Da im Urin in der Regel keine Lipide enthalten sind, ist in Urinproben eine artifizielle Bildung nicht möglich. Dieser Diskussionsansatz wird in unserer Studie durch die konstanten 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidungsraten im Urin, die innerhalb des Normbereiches lagen, bestätigt.

Für zukünftige Studien, die Parameter des oxidativen Stresses erfassen, sollte daher ein Verfahren gewählt werden, das ein zeitnahes Auswerten der Plasmaproben ermöglicht. Eine Analyse der Proben gleich nach Probenentnahme wäre anzustreben. Eine Alternative könnte auch die Suche nach Substanzen sein, die die artifizielle Bildung von oxidativen Lipidabbauprodukten unterbinden. Durch die Zugabe dieser Substanzen zu den Plasmaproben könnte ein oxidativer Angriff auf die bluteigenen Lipide verhindert werden. Als Antioxidantien werden heutzutage Meclofenaminsäure zur Lagerung (Dillon et al. 2002) und 2,6-di-tert-Butyl-p-cresol bei der Aufarbeitung und Analyse (Yeo et al. 1994, Siems et al. 1997, Suttner et al. 2001) eingesetzt. Des Weiteren sollte die Auswirkung der Lagerung der Plasmaproben bei verschiedenen Temperaturen (-20 °C , -40 °C , -80 °C) bestimmt werden.

4.1.4. Einfluss von L-Arginin auf die Lebensqualität

Die Auswertung der Fragebögen zur Lebensqualität lieferte unterschiedliche Ergebnisse, die keine einheitlichen Schlussfolgerungen zulassen. Beim FS-12 Fragebogen zeigte sich für den physischen Gesundheitszustand eine signifikante Verbesserung über den Studienverlauf hinweg, die allerdings zum Studienende etwas abflachte. Die höchsten Werte, die die höchste Lebensqualität widerspiegeln, ergaben sich für beide Gruppen zum Zeitpunkt der Zwischenuntersuchung. Signifikante Unterschiede zwischen der Verum- und Placebogruppe bestanden nicht. Somit scheint der bessere physische Gesundheitszustand primär in der koronaren Gefäßaufdehnung begründet zu sein. Beim mentalen Gesundheitszustand war dagegen kein signifikanter Unterschied über den Zeitraum der Studie oder zwischen den beiden Gruppen zu beobachten. Laut Qualitometric spiegelt ein Mittelwert von 50 Punkten je Kategorie den Gesundheitszustand der Bevölkerung der USA wieder. Die von unseren Patienten erreichten Medianwerte lagen für beide Gruppen bei Studienbeginn mit 35 Punkten in der physischen Kategorie deutlich unter dem angegebenen Durchschnittswert der USA-Bevölkerung. Im Studienverlauf stiegen die Werte unsere Patienten dann allerdings auf ca. 45 Punkte im Median an. Für den mentalen Gesundheitszustand wurden von beiden Gruppen über den Verlauf der Studie dagegen konstante Durchschnittswerte von um die 50 Punkte erreicht.

Der FFB-Mot-Fragebogen, der den motorischen Funktionsstatus erfasst, zeigte im Gegensatz zum SF-12 keine signifikante Verbesserung des Funktionsstatus der Patienten. Ein positiver Verlauf deutet sich bei diesem Fragebogen nur in der Placebogruppe an, die bei Studienbeginn allerdings auch etwas niedrigere Werte als die Verumgruppe aufwies. Die Patienten in der Verumgruppe erzielten über die gesamte Studiendauer sehr konstante Medianwerte. Wie nicht anders zu erwarten, lagen die Werte beider Gruppen deutlich unter denen der Deutschen Bevölkerung im Alter von 33-60 Jahren.

Eine Auswertung der Angina-pectoris-Beschwerden mit Hilfe der Patiententagebücher war auf Grund der großen Anzahl falsch ausgefüllter Tagebücher nicht möglich. Des Weiteren sollte das Konzept der Tagebücher überdacht werden, da sie lediglich einen Wochendurchschnitt der Beschwerden erfassen, Angina-pectoris-Beschwerden allerdings von Tag zu Tag stark variieren können, was vom Patienten dokumentiert werden möchte und sollte.

4.1.5. Verträglichkeit der Studien-Medikation

Die Verträglichkeit der Studien-Medikation wurde mit Hilfe der Meldebögen für (schwere) unerwünschte Ereignisse ausgewertet. Alle gemeldeten schweren unerwünschten Ereignisse waren Ereignisse, die unter die Hauptzielkriterien der Pilotstudie fielen. Zur Auswertung der Verträglichkeit der Studien-Medikation wurden somit nur die nicht schweren unerwünschten Ereignisse berücksichtigt. Von den insgesamt 56 gemeldeten nicht schweren unerwünschten Ereignissen entfielen 32 auf die Verumgruppe und 24 auf die Placebogruppe. Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die einzelnen Ereignisse konnte zwischen den beiden Behandlungsgruppen nicht aufgezeigt werden. Die am häufigsten gemeldeten Ereignisse in der Verumgruppe waren Durchfall, Magenschmerzen und Sodbrennen. Weitere gemeldete gastrointestinale Beschwerden waren Blähungen und Übelkeit. Eine zusammengefasste Auswertung der gastrointestinalen (GI) Beschwerden (Blähungen, Durchfall, Magenschmerzen, Sodbrennen, Übelkeit) ergab einen signifikanten Unterschied mit einem vermehrten Auftreten in der Verumgruppe ($p = 0,028$). GI-Beschwerden wie weicher Stuhl oder Durchfall sind bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkungen von L-Arginin. Somit können die signifikant häufiger gemeldeten GI Ereignisse durchaus auf das L-Arginin in den Verum-Brausetabletten zurückgeführt werden.

4.1.6. Schlussfolgerung Studienergebnisse

Diese Pilotstudie wurde zur Erfassung des Einflusses einer sechsmonatigen L-Arginin-Therapie auf die Restenoserate nach Angioplastie durchgeführt. Sie sollte die Basis für weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet bilden. Auch wenn in unserer Pilotstudie bis zur Interimsanalyse vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse unter L-Arginin auftraten, so bleibt zu berücksichtigen, dass dieser Unterschied nicht signifikant war. Erst ein Studienabschluss von weiteren 52 Patienten hätte eventuell statistisch verlässliche Ergebnisse gebracht. Von einer weiteren Rekrutierung wurde in unserer Pilotstudie auf Grund eines fehlenden positiven Effektes allerdings abgesehen. Auch wenn bereits veröffentlichte Studien mit L-Arginin auf einen kardiovaskulären protektiven Effekt hindeuten, so scheint sich dieser nicht auf jedes Patientenkollektiv übertragen zu lassen. Umfangreiche Studien, die diverse Begleiterkrankungen, Risikofaktoren und Krankheitsstadien berücksichtigen, sind erforderlich, um zu erfassen für welche Patienten eine L-Arginin-Therapie von Nutzen sein

kann. Hierbei sind besonders Patienten mit erhöhten ADMA-Werten von Interesse. Auch sollte untersucht werden, ob ein möglicher Gefäßschutz von L-Arginin von der Therapiedosis bzw. -dauer abhängig ist, wobei besonders auf eine überwachte Compliance in Bezug auf die Studien-Medikation Wert zulegen ist. Da sich unter L-Arginin in unserer Pilotstudie positive Verläufe für die Parameter HDL, diastolischer Blutdruck und 8-iso-PGF_{2α} im Urin abgezeichnet haben, sollten kontrollierte Studien auf diesen Gebieten durchgeführt werden, um den protektiven Effekt von L-Arginin weiter zu definieren und den therapeutischen Nutzen zu ermitteln.

4.2. Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

Die in dieser Dissertation entwickelte Methode beruht auf der Azidität des Malonaldehyds. Eine nucleophile bimolekulare Substitution (S_N2-Reaktion) wird von uns als Derivatisierungsmechanismus angenommen, bei der ein MDA mit zwei Pentafluorbenzylbromid-Molekülen zu einem Dipentafluorbenzyl-Derivat und zwei Bromwasserstoffmolekülen reagiert.

Die GC/MS-Analyse des d₀-MDA-PFB-Derivats zeigte ein deutlich vermehrtes Auftreten des Ions mit dem m/z 251. Die Analytik des deuterierten Derivatisierungsproduktes zeigte das entsprechende deuterierte Ion mit dem m/z 253. Die GC/MS/MS-Analytik zeigte die weitere Aufspaltung in die Produktionen m/z 175 bzw. m/z 177. Die Fragmente der GC/MS- und GC/MS/MS-Analyse ließen Rückschlüsse auf das mutmaßliche Derivatisierungsprodukt als 2,2-Bis(2,3,4,5,6-pentafluorphenylbenzyl)malonaldehyd zu.

Die von uns gewählte Derivatisierungsreaktion läuft im Vergleich zu den TBA-Methoden ohne Säure- oder Basezugabe und ohne hohe Temperaturen ab. Dies minimiert die artifizielle Bildung von Artefakten und garantiert somit eine höhere Selektivität. Darüber hinaus erlauben die Reaktionsbedingungen die differenzierte Bestimmung von freiem MDA, da gebundenes MDA ohne Zugabe von Säure oder Lauge nicht aus seinen Verbindungen freigesetzt werden kann. Der Einsatz eines deuterierten Analogons als interner Standard kann als weiterer Vorteil angesehen werden.

Des Weiteren ist die von uns entwickelte Methode schnell und einfach in der Durchführung und somit auch zum Einsatz in der täglichen Laborroutine geeignet.

4.2.1. Validierung

Die Validierung einer analytischen Messmethode dient der Qualitätskontrolle. Allgemeine Anforderungen an sachgerechtes Arbeiten in der Analytik sind in den „Grundsätzen der guten Laborpraxis“ (GLP) der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) formuliert. Folgende Qualitätsmerkmale werden zur Validierung von Analysenverfahren herangezogen: Präzision, Richtigkeit, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Selektivität, Spezifität, Linearität, Empfindlichkeit, Bestimmungsbereich sowie die Robustheit (Rücker et al. 1992). Bei der Methodvalidierung in dieser Arbeit wurden alle oben genannten Qualitätsmerkmale, außer der Robustheit der Methode gegenüber unterschiedlichen Störeinflüssen, bestimmt.

Die Methodvalidierung bestätigte die hohe Selektivität der von uns entwickelten Methoden. Die Vermessung der humanen Plasmaproben ergab Signale mit den gleichen Masse-Ladungsverhältnissen und den gleichen Retentionszeiten wie die Vermessung der Standardsubstanz in Puffer oder Plasma. Die Präzision, Richtigkeit und Linearität der Methoden konnte anhand von Standardkurven aufgezeigt werden. Die mittlere Präzision innerhalb eines Tages lag sowohl bei der GC/MS-Methode als auch bei der GC/MS/MS-Methode bei 3,8 %. Die mittlere Präzision von Tag zu Tag lag mit 9,8 % für die GC/MS-Methode und 7,3 % für die GC/MS/MS-Methode knapp darunter. Die mit unserer Methode erzielten Präzisionen sind mit denen anderer Methoden vergleichbar (Beljean-Leymarie und Bruna 1988, De Zwart et al. 1997, Rauli et al. 1998, Maboudou et al. 2002, Mao et al. 2006). Dabei ist die höhere Präzision von Tag zu Tag der GC/MS/MS-Methode im Vergleich zu GC/MS-Methode hervorzuheben. Die mittleren Bestimmtheitsmaße der GC/MS-Methode von 0,9977 und der GC/MS/MS-Methode von 0,9992 verdeutlichen die vorhandenen Linearitäten der Methoden. Aufgrund der vorhandenen Linearität konnte die Empfindlichkeit der Methoden aus den Geradensteigungen der Standardkurven ermittelt werden. Je empfindlicher ein Verfahren, desto steiler die Geradengleichung. Mit einer mittleren Steigung von 1,1195 für die GC/MS und 1,1941 für die GC/MS/MS ist die GC/MS/MS-Methode der GC/MS-Methode in Bezug auf die Empfindlichkeit knapp überlegen. Die Richtigkeit der Methoden spiegelt sich in einer Wiederfindungsraten von 91 % für die GC/MS und 97 % für die GC/MS/MS wieder. Auch hier ist eine Überlegenheit der GC/MS/MS-Methode hervorzuheben. Die von uns erzielten hohen Wiederfindungsraten sind mit denen einiger anderer Methoden vergleichbar (Beljean-Leymarie und Bruna 1988, Luo et al. 1995, Cighetti et al. 1999, Mao et al. 2006). Bei der

Erfassung der Nachweisgrenze wurden Substanzmengen von 100 fmol bei der GC/MS-Messmethode und 100 amol bei der GC/MS/MS-Messmethode mit Signal/Rausch-Verhältnissen von 144:1 bzw. 183:1 erfasst. Die daraus berechnete Nachweisgrenze der GC/MS-Methode liegt somit bei 2 fmol/μl, die der GC/MS/MS-Methode bei 1,6 amol/μl. Die Nachweisgrenze der GC/MS/MS-Methode liegt weit unter der anderer Methoden und ist somit anderen Methoden gegenüber deutlich überlegen. Die Nachweisgrenze der GC/MS-Methode liegt im Bereich der bereits veröffentlichten Methoden (Beljean-Leymarie und Bruna 1988, Yeo et al. 1994, Luo et al. 1995, De Zwart et al. 1997, Rauli et al. 1998, Maboudou et al. 2002, Mao et al. 2006).

4.2.2 Vergleich der GC/MS- und GC/MS/MS-Messmethoden zur Bestimmung von MDA als PFB-Derivat in Plasma

Die vorangegangene Methodvalidierung bescheinigt sowohl der GC/MS- als auch der GC/MS/MS-Analytik eine hohe Selektivität, Präzision, Linearität, Richtigkeit, Empfindlichkeit, Wiederfindungsrate und Nachweisgrenze. Der Validierungsprozess zeigte allerdings eine leichte Überlegenheit der GC/MS/MS-Methode im Vergleich zur GC/MS-Methode. Aus diesem Grund wurde ein direkter statistischer Vergleich beider Methoden durchgeführt. Beim Vergleich der GC/MS-Methode mit der GC/MS/MS-Methode zeigte sich eine Korrelation nach Pearson mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,990, die auf dem Niveau von 0,001 mit einem p-Wert von < 0,001 signifikant war. Die Auswertung nach Bland und Altman (1986) bestätigte im graphischen Vergleich nicht nur die Linearität sondern auch die Vergleichbarkeit beider Methoden. Die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Methoden betrug lediglich -0,0809 μM.

Daraus ist ersichtlich, dass beide Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma geeignet sind. Auf Grund der höheren Präzision, Linearität, Empfindlichkeit, Wiederfindungsrate und Nachweisgrenze ist die GC/MS/MS-Messmethode eindeutig als Goldstandard vorzuziehen. Für Labore ohne GC/MS/MS-Ausstattung stellt allerdings auch die GC/MS-Methode eine interessante Alternative zu den bereits veröffentlichten Methoden dar.

4.2.3. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat und PFBox-Derivat

Beim Vergleich der entwickelten Methode zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat mit der Methode zur Bestimmung als PFBox-Derivat zeigte sich eine Korrelation nach Spearman mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,721, die auf dem Niveau von 0,01 mit einem p-Wert von $< 0,001$ signifikant war. Die graphische Auswertung nach Bland und Altman (1986) zeigte die höchsten Übereinstimmungen im Konzentrationsbereich bis etwas 1500 nM. In diesem Konzentrationsbereich lagen die MDA-Konzentrationen der meisten Studien-Proben. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die gemessenen MDA-Plasmakonzentrationen als PFB-Derivat leicht unter denen als PFBox-Derivat lagen. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Derivatisierungsmethoden zurückzuführen. Es ist beispielsweise durchaus möglich, dass die PFBox-Methode zusätzlich gebundene MDA-Formen erfasst, da diese Derivatisierungsmethode drastischere Reaktionsbedingungen erfordert, wogegen die PFB-Br-Methode fast ausschließlich das freie MDA erfasst. Dennoch kann für die Mehrzahl der Studienproben davon ausgegangen werden, dass die GC/MS-Messung von MDA als PFBox-Derivat nach Luo et al. (1995) zuverlässige Ergebnisse lieferte. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass bei Betrachtung des kompletten Konzentrationsbereiches die Differenzen der beiden Methoden in einem Bereich von -8652 nM und 1651 nM lagen, und dass bei höheren Konzentrationen die PFB-Methode mehr erfasste als die PFBox-Methode.

4.2.4. Schlussfolgerung Methodenentwicklung

Die Untersuchungen mit PFB-Br ergaben, dass dieses Derivatisierungsgagens sehr gut geeignet ist für die quantitative GC/MS/MS-Analyse von MDA in Humanplasma bei unverändertem pH-Wert. Auf Grund der C-H-Azidität beider H-Atome der Methylen-Gruppe von MDA liefert die Derivatisierung von MDA mit PFB-Br ein Dipentafluorobenzyl-Derivat, wobei beide Aldehydgruppen unversehrt bleiben. Dieses Derivat ist sehr lipophil, thermisch stabil, sehr stark elektronenanziehend, ionisiert sehr leicht und fragmentiert sehr charakteristisch beim Beschuss mit Argon unter GC/MS/MS-Bedingungen. Dank dieser vorteilhaften Eigenschaften ist die GC/MS/MS-Analyse von MDA als PFB-Derivat sehr selektiv,

spezifisch, sensitiv und akkurat. Zusätzlich ist die Methode durch ihre einfache und schnelle Handhabung bestens für die tägliche Laborroutine geeignet. Für Einrichtungen die über keine GC/MS/MS verfügen ist die vorgestellte Methode auch zur Bestimmung mittels GC/MS geeignet. Im Vergleich mit der Bestimmung als PFBox-Derivat (Luo et al. 1995) zeigte sich eine recht gute Übereinstimmung beider Methoden im Konzentrationsbereich bis 1500 nM. Bei höheren Konzentrationen wurden allerdings gravierende Abweichungen zwischen den Methoden evident. Diese könnten in einer unterschiedlichen Selektivität der Methoden begründet liegen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Atherosklerose ist die wichtigste und häufigste Erkrankung der Arterien, die sich durch einen entzündlichen Prozess mit einer gestörten Funktion des Endothels auszeichnet. Eine zentrale Rolle bei der endothelialen Funktion spielt das NO. Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre konzentrierten sich auf die Bedeutung von NO und dessen Präkursor-Substanz L-Arginin in der Entwicklung der Atherosklerose und auf die Stimulation der NO-Synthese als Prävention. Wir entschieden uns daher diese prospektive, randomisierte, multizentrische, placebo-kontrollierte, doppelblinde Pilotstudie zur Bestimmung des Effektes einer sechsmonatigen L-Arginin-Therapie (10 g/Tag oral) an Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach Angioplastie durchzuführen. Als Hauptzielkriterien wurden kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität untersucht, als Nebenzielkriterien der Gesundheitszustand der Patienten sowie Parameter des NO-Stoffwechsels und des oxidativen Stresses. Neben der Erfassung der Marker des oxidativen Stresses zu Studienzwecken wurde im Rahmen dieser Dissertation auch eine neue Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Methode zur Bestimmung von Malondialdehyd, einem Marker des oxidativen Stresses, entwickelt und validiert.

Die Interimsanalyse der Pilotstudie, die mit 60 Patienten durchgeführt wurde, ergab für die Auswertung der Hauptzielkriterien keine statistisch signifikante, positive Wirkung von L-Arginin. Kardiovaskuläre Ereignisse traten bei insgesamt 9 der 60 Patienten auf, wovon sich 2 der kardiovaskulären Ereignisse in der Placebogruppe und alle anderen in der Verumgruppe ereigneten.

Somit heben sich unsere Studienergebnisse von zahlreichen anderen am Menschen durchgeführten Studien ab, in denen ein positiver Effekt von L-Arginin auf die endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden konnte. Diesen Studien lagen geringerer L-Arginin-Tagesdosen und Therapiedauern, sowie striktere Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien im Vergleich zu unserer Pilotstudie zu Grunde. Unser Patientenkollektiv wies viele Ausschlusskriterien anderer Studien (z.B. Myokardinfarkt, KHK, Diabetes mellitus) als Begleiterkrankungen bzw. Einschlusskriterien auf, was dieses zu einem sehr krankheitsbelasteten und dadurch praxisnahen Kollektiv macht. Diese offensichtlichen Unterschiede können als Erklärungsansatz herangezogen werden, warum die in der Literatur beschriebenen positiven Ergebnisse in unserer Pilotstudie nicht aufgezeigt werden konnten, und somit bleibt die L-Arginin Wirkung in einem breiten Patientenkollektiv mit

fortgeschrittener Atherosklerose und in der von uns gewählten Dosierung und Therapiedauer ungewiss.

In Bezug auf den L-Arginin-Stoffwechsel konnten in unserer Pilotstudie zuvor publizierte Ergebnisse für die Parameter L-Arginin, ADMA und DMA reproduziert werden. Allerdings bleibt zu erwähnen, dass sich für die L-Arginin-Ausscheidungsraten im Urin der Verumgruppe ein leichter, aber nicht signifikanter Abfall der Werte von der U2 zur U3 ergab. Dieser Abfall könnte auf eine geringere Compliance in der zweiten Studienhälfte hindeuten. Als positive Effekte der L-Arginin-Therapie zeigten sich ein signifikanter Abfall des diastolischen Blutdrucks in der Verumgruppe, sowie ein signifikanter Anstieg der HDL-Konzentration im Plasma unter L-Arginin. In Bezug auf die 8-iso-PGF_{2 α} -Ausscheidungsrate im Urin konnte zur Zwischenuntersuchung für die Verumgruppe eine signifikant niedrigere Rate aufgezeigt werden als für die Placebogruppe, was auf einen weiteren positiven Effekt der L-Arginin-Therapie hindeutet.

Die Entwicklung einer hoch selektiven, präzisen und sensitiven Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Methode, in der ein deuterierter, interner Standard Anwendung finden sollte, war der zweite Teilaspekt dieser Doktorarbeit. Die von uns entwickelte Methode wurde für die GC/MS und GC/MS/MS validiert, um so eine breite Anwendbarkeit zu gewährleisten. Die gewählte Methode basiert auf der Azidität des Malonaldehyds, die einen nucleophilen Angriff zweier Pentafluorbenzylbromid-Moleküle ermöglicht. Die Derivatisierungsreaktion läuft ohne Säure- oder Basezugabe und ohne hohe Temperaturen ab, wodurch die artifizielle Bildung von MDA minimiert wird. Somit ist eine höhere Selektivität und Akkuratheit zur Bestimmung von freiem MDA gegeben. Als weitere Vorteile der Methode sind der Einsatz eines deuterierten Analogons als interner Standard und die einfache und schnell Aufarbeitung zu nennen.

Die Methodenvalidierung bestätigte die erwartete hohe analytische Zuverlässigkeit. Durch die Verwendung der GC/MS/MS konnte eine Nachweisgrenze weit unter der anderer veröffentlichter Methoden erzielt werden. Der Validierungsprozess zeigte zusätzlich eine Überlegenheit der GC/MS/MS-Methode im Vergleich zur GC/MS-Methode, so dass der Ersteren in der Praxis der Vorrang als Goldstandard einzuräumen ist. Zusammenfassend kann die entwickelte Methode als eine Verbesserung der bereits veröffentlichten Methoden angesehen werden, da sie durch den Einsatz eines deuterierten Analogons als internen Standard, ihre sehr charakteristische Derivatisierungsmethode, und die Verwendung der hoch selektiven und sensitiven GC/MS/MS-Technik eine hochakkurate und -präzise Bestimmung von MDA in Humanplasma ermöglicht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley GSJ, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-1459.

Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28:627-656

Allevi P, Anastasia M, Ciuffreda P. A new simple synthesis of 1,3-dideuterated manondialdehyde (3-hydroxy[1,3-²H₂]-2-propenal). *J Labelled Comp Radiopharm* 1994;34:557-563

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3203-3207

Asatoor A, Simenhoff ML. The origin of urinary dimethylamine. *Biochem Biophys Acta* 1965;111:384-392

Basu AK, Marnett LJ. Synthesis of malondialdehyde-1-²H and malondialdehyde-1,3-²H₂. *J Labelled Comp Radiopharm* 1985;22:1175

Bauriedel G, Skowasch D, Jabs A, Dinkelbach S, Andrié R, Schiele TM, Lüderitz B. Insights into vascular pathology after intracoronary brachytherapy. *Z Kardiol* 2002;91 Suppl 3:1-9

Bednarz B, Jaxa-Chamiec T, Maciejewski P, Szpajer M, Janik K, Gniot J, Kawka-Urbaneck T, Drozdowska D, Gessek J, Laskowski H. Efficacy and safety of oral L-arginine in acute myocardial infarction. Results of the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled ARAMI pilot trial. *Kardiol Pol* 2005;62:421-427

Beljean-Leymarie M, Bruna E. Subpicogram determination of malondialdehyde by gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detector. I. Standardization. *Anal Biochem* 1988;173:174-184

Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochem Biophys Acta* 1980;620:281-296

Bennett-Richards KJ, Kattenhorn M, Donald AE, Oakley GR, Varghese Z, Bruckdorfer KR, Deanfield JE, Rees L. Oral L-arginine does not improve endothelial dysfunction in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2002;62:1372-1378

Bird RP, Hung SS, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983;128:240-244

Bisoendial RJ, Hovingh GK, Levels JHM, Lerch RG, Andresen I, Hayden MR, Kastelein JJP, Stroes ESG. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation* 2003;107:2944-2948

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310

Blough NV, Zafiriou OC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 1985;24:3502-3504

Blum A, Porat R, Rosenschein U, Keren G, Roth A, Laniado S, Miller H. Clinical and inflammatory effects of dietary L-arginine in patients with intractable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1999;83:1488-1490

Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon III RO. Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* 2000;101:2160-2164

Bode-Böger SM, Böger RH, Afke H, Heinzl D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1996;93:85-90

Bode-Böger SM, Böger RH, Löffler M, Tsikas D, Brabant G, Frölich JC. L-arginine stimulates NO-dependent vasodilation in healthy humans - effect of somatostatin pretreatment. *J Investig Med* 1999;47:43-50

Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Tsikas D, Frölich JC. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:489-497

Bode-Böger SM, Muke J, Surdacki A, Brabant G, Böger RH, Frölich JC. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individual older than 70 years. *Vasc Med* 2003;8:77-81

Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Gutzki FM, Tsikas D, Frölich JC. Urinary NO₃-excretion as an indicator of nitric oxide formation in vivo during oral administration of L-arginine or L-NAME in rats. *Clin Exp Pharm Physiol* 1996;23:11-15

Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995;117:273-284

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

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95:2068-2074

- Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming the deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005;10:14-23
- Bös K, Abel T, Woll A, Niemann S, Tittlbach S, Schott N. Der Fragebogen zur Erfassung des motorischen Funktionsstatus (FFB-Mot). *Diagnostica* 2002;48:101-111
- Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1578-1588
- Borsook H, Dubnoff JW. The conversion of citrulline to arginine in the kidney. *J Biol Chem* 1941;140:717-738
- Bosmans JM, Bult H, Vrints CJ, Kockx MM, Herman AG. Balloon angioplasty and induction of non-endothelial nitric oxide synthase in rabbit carotid arteries. *Eur J Pharmacol* 1996;310:163-174
- Bothmer C, Edebo A, Lonroth H, Olbe L, Pettersson A, Fandriks L. Helicobacter pylori infection inhibits antral mucosal nitric oxide production in humans. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:404-408
- Cantor EJ, Mancini EV, Seth R, Yao XH, Netticadan T. Oxidative stress and heart disease: cardiac dysfunction, nutrition and gene therapy. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:215-220
- Casscells W, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, Bearman G, Willerson JT. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet* 1996;347:1447-1451
- Ceremuzynski L, Chamiec T, Herbaczynska-Cedro K. Effects of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997;80:331-333
- Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:5515-524
- Chen LY, Mehta JL. Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sci* 1994;55:1815-1821
- Chin-Dusting JPF, Kaye GM, Lefkovits J, Wong J, Bergin P, Jennings GL. Dietary supplementation with L-arginine fails to restore endothelial function in forearm resistance arteries in patients with severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1207-1213
- Cighetti G, Debiassi S, Paroni R, Allevi P. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. *Anal Biochem* 1999;266:222-229
- Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, Cappellini MD. Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest* 2002;32:55-60

Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy SN, Keech A, Celermaier DS, Deanfield JE. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996;97:1989-1994

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

Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-2037

Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992;90:1248-1253

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623

Darius H, Binz C, Veit K, Fisch A, Meyer J. Platelet receptor desensitization induced by elevated prostacycline levels caused platelet-endothelial cell adhesion. *J Am Coll Cardiol* 1995;29:800-806

Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-229

Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:845-854

De Zwart LL, Venhorst J, Groot M, Commandeur JNM, Hermanns RCA, Meerman JHM, Van Baar BLM, Vermeulen NPE. Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr B* 1997;694:277-287

Dillon SA, Lowe GM, Billington D, Rahman K. Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr* 2002;132:168-171

Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, Chezbraun A, Botas J, Cooke JP, Alderman EL. Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. Relation to vessel wall morphology. *Circulation* 1994;89:1615-1623

Dudek D, Heba G, Bartus S, Partyka L, Dembinska-Kiec A, Huk J, Legutko J, Dubiel JS. Effects of L-arginine supplementation on endothelial function after stent implantation. *Kardiol Pol* 2002;57:389-397

Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, Walker M, Nicolaidis AN, Shanji S, Griffin M, Belcaro G, Rumley A, Lowe GDO. Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women. *Stroke* 1999;30:841-850

- Egashira K, Hirooka Y, Kuga T, Mohri M, Takeshita A. Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *Circulation* 1996;94:130-134
- Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Luscis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296:2391-2394
- Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982;208:129-140
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128
- Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2005, 5. Auflage, Amtliche Deutsche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn
- Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J Chromatogr A* 2001;921:237-245
- Filipe P, Haigle J, Freitas J, Fernandes A, Mazière JC, Mazière C, Santus R, Morlière P. Anti- and pro-oxidant effects of urate in copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Biochem* 2002;269:5474-5483
- Florence TM. The role of free radicals in disease. *Aust NZ J Ophthalmol* 1995;23:3-7
- Förstermann U. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006a;113:1708-1714
- Förstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2006b;62 Suppl 1:5-12
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-1131
- Förstermann U, Kuk JE, Nakane M, Pollock JS. The expression of endothelial nitric oxide synthase is down-regulated by tumor necrosis factor (TNF- α). *N S Arch Pharmacol* 1993;347(Suppl.):R61
- Förstermann U, Mügge A, Alheid S, Bode SM, Frölich JC. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): a defense mechanism against platelet aggregation and vasospasm in human coronary arteries. *Eur Heart J* 1989;10:36-43
- Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997;272:18515-18517

- Fujioka K, Shibamoto T. Improved malonaldehyde assay using headspace solid-phase microextraction and its application to the measurement of the antioxidant activity of phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2005;53:4708-4713
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature* 1980;288:373-376
- Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;61:65-131
- Gibson JB, Carson NAJ, Neill DW. Pathological findings in homocystinuria. *J Clin Pathol* 1964;17:427-437
- Gram J, Bladbjerg EM, Moller L, Sjol A, Jespersen J. Tissue-type plasminogen activator and c-reactive protein in acute coronary heart disease. A nested case-control study. *J Intern Med* 2000;247:205-212
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-2183
- Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984;308:645-647
- Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-272
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications, Oxford University Press New York 1999, 3rd edition
- Hamberg M, Niehaus Jr WG, Samuelsson B. Preparation, isolation, and characterization of a derivative of malonaldehyde. *Anal Biochem* 1968;22:145-153
- Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ. L-NMMA increases blood pressure in man. *Lancet* 1993;342:931-932
- Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR. Endothelial cells metabolize N^G-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167:1037-1043
- Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis* 2005;181:201-207
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987;235:473-476
- Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G. Effect of L-arginine infusion on systemic and renal hemodynamics in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1999;12:8-15

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U, Münzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:14-22

Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998;128:262-269

Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BJM* 1998;316:894-898

Horowitz JD, Heresztyn T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: methodological considerations. *J Chromatogr B* 2007;851:42-50

Hsia CCW. Respiratory function of hemoglobin. *N Eng J Med* 1998;338:239-247

Huynh NT, Tayek JA. Oral arginine reduces systemic blood pressure in type 2 diabetes: its potential role in nitric oxide generation. *J Am Coll Nutr* 2002;21:422-427

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9269

Jakob M. Normalwerte pocket. Bröm Bruckheimer Verlag 2000, 3. Auflage

Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007;5:265-282

Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N^G,N^G- and N^G,N^G-dimethylarginine, N^G-mono, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970;245:5751-5758

Kang S-S, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992;12:279-298

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoyer MM. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1414-1418

Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S, Menne J, Kielstein A, Martens-Lobenhoffer J, Scalera F, Cooke JP, Fliser D, Bode-Böger SM. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke* 2006;37:2024-2029

Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 1991;352:725-728

Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:697-705

- Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men. *Circulation* 1999;99:237-242
- Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O, Neundoerfer B, Heuschmann PU. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* 2001;32:2735-2740
- Krebs HA, Henseleit H. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1932;210:33-66
- Kwon T-W, Watts BM. Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophotometry. *J Food Sci* 1963;28:627-630
- Lachmuth JY. Die APAV-Pilotstudie: L-Arginin bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Klinische Pharmakologie, 2008
- Landmesser U, Dikalov S, Price R, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003;111:1201-1209
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events. *Circulation* 2001a; 104:2638-2640
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis* 2001b;12:455-461
- Lange H, Suryapranata H, De Luca G, Börner C, Dille J, Kallmayer K, Pasalary MN, Scherer E, Dambrink JHE. Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 2004;350:2673-2681
- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister R, Charles I, Whitley G, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethyl-aminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999;343:209-214
- Leiper JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:33-38
- Lerman A, Burnett JC, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR. Long-term L-arginine supplementation improves small vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998;97:2123-2128
- Li J, Li W, Su J, Liu W, Altura BT, Altura BM. Hydrogen peroxide induces apoptosis in cerebral vascular smooth muscle cells: possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. *Brain Res Bull* 2003;62:101-106
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118

Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-324

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJO, Sheridan P, McQueen MJ, Pogue J, Probstfield J, Fodor G, Held C, Micks M, Genest J Jr. Homocysteine lowering with folic acid and b vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1567-1577

Lorenz MW, Markus HS, Bots M, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459-467

Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyt(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:5-7

Lücke T, Tsikas D, Kanzelmeyer NK, Boerkoel CF, Clewing JM, Vaske B, Ehrich JHH, Das AM. Vaso-occlusion in Schimke-immuno-osseous dysplasia: is the NO pathway involved? *Horm Metab Res* 2006;38:678-682

Luo XP, Yazdanpanah M, Bhooi N, Lehotay DC. Determination of aldehydes and other lipid peroxidation products in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995;228:294-298

Maboudou P, Mathieu D, Bachelet H, Wiart JF, Lhermitte M. Detection of oxidative stress. Interest of GC-MS for malondialdehyde and formaldehyde monitoring. *Biomed Chromatogr* 2002;16:199-202

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

Maggi MF, Cristol JP, Guerin MC, Descomps B, Torreilles J. Protection of oxidation of LDL by nitric oxide: implication in atherosclerosis. *C R Seances Soc Biol Fil* 1995;189:375-387

Mao J, Zhang H, Luo J, Li L, Zhao R, Zhang R, Liu G. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *J Chromatogr B* 2006;832:103-108

Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G. C-reactive protein in offspring is associated with the occurrence of myocardial infarction in first-degree relatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:198-203

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-8711

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J Chromatogr B* 2007;851:30-41

- Marti B, Rickenbach M, Keil U, Stieber J, Greiser E, Herman B, Heinemann L, Assmann A, Schadlich H, Nussel E et al. Variation in coronary risk factor levels of men and women between the german-speaking MONICA centres. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1990; 38: 479-486
- Mathews WR, Kerr SW. Biological activity of S-nitrosothiols: The role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:1529-1537
- Maxwell AJ, Anderson B, Zapien MP, Cooke JP. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is reversed by a nutritional product designed to enhance nitric oxide activity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000;14:309-316
- Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multifunctional oxido-reductase. *FEBS Lett* 1991;288:187-191
- McCully KS. Vascular pathology of homocyst(e)inemia: implications for the development of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128
- McDonald K, Zharikov S, Block E, Kilberg M. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and the endothelial nitric oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997;272:31213-31216
- McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 2002;8:711-717
- Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ* 1996;312:1061-1065
- Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:681-684
- Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Lechi Santonastaso C, Lechi A, Morganti A, Patrono C. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002;106:2800-2805
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-1146
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002;90:58-65

- Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263:663-665
- Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332:1198-1203
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383-9387
- Müller-Nordhorn J, Kulig M, Binting S, Voller H, Krobot KJ, Willich SN. Regional variation in medication following coronary events in Germany. *Int J Cardiol* 2005;102:47-53
- Müller-Nordhorn J, Rossnagel K, Mey W, Willich SN. Regional variation and time trends in mortality from ischaemic heart disease: East and West Germany 10 years after reunification. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:481-485
- Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986;78:1-5
- Nolte E, Shkolnikov V, McKee M. Changing mortality patterns in East and West Germany and Poland. I: Long term trends (1960-1997). *J Epidemiol Community Health* 2000a;54:890-898
- Nolte E, Shkolnikov V, McKee M. Changing mortality patterns in East and West Germany and Poland. II: Short-term trends during transition and in the 1990s. *J Epidemiol Community Health* 2000b;54:899-906
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, N^G-N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205-10209
- Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. *J Biol Chem* 1999;274:23787-23793
- Olson R, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS. Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci* 1981;29:1393-1401
- Oomen CM, Erk van MJ, Feskens EJM, Kok FJ, Kromhout D. Arginine intake and risk of coronary heart disease mortality in elderly men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2134-2139
- Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1976, 15. Auflage

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-666

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10480-10484

Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1992;84:1426-1436

Pryor WA, Porter NA. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 1990;8:541-543

Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter Verlag Berlin 2002, 259. Auflage

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058

Ramsay B, Radomski M, de Belder A, Martin JF, Lopez-Jamarillo P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:101-102

Rauli S, Del Puppo M, Magni F, Galli Kienle M. Validation of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-trans-nonenal measurements in plasma by NICI-GC-MS. *J Biochem* 1998;123:918-923

Rawal N, Rajpurohit R, Lischwe MA, Williams KR, Paik WK, Kim S. Structural specificity of substrate for S-adenosylmethionine: protein arginine N-methyltransferases. *Biochem Biophys Acta* 1995;1248:11-18

Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral l-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 1996;93:2135-2141

Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752

Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:2822-2828

Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol* 1994;267:F331-F346

- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843
- Riede UN, Schäfer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, 4. Auflage (1999)
- Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999;45:1967-1973
- Rosen BD, Cushman M, Nasir K, Bluemke DA, Edvardsen T, Fernandes V, Lai S, Tracy RP, Lima JAC. Relationship between c-reactive protein levels and regional left ventricular function in asymptomatic individuals. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:594-600
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126
- Rouis M. Matrix metalloproteinases: a potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:541-548
- Rücker G, Neugebauer M, Willems GG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992, 2. Auflage
- Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Curie MG, Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an vivo analysis. *Br J Pharmacol* 1995;114:1171-1178
- Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst KV, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, Hare JM, Gerstenblith G. L-Arginine therapy in acute myocardial infarction. *JAMA* 2006;295:58-64
- Schweer H, Watzer B, Seyberth HW, Nusing RM. Improved quantification of 8-epi-prostaglandin F₂ alpha and F₂-isoprostanes by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry: partial cyclooxygenase-dependent formation of 8-epi-prostaglandin F₂ alpha in humans. *J Mass Spectrom* 1997;32:1362-1370
- Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brümmer J, Gutzki F-M, Berger J, Frölich JC, Böger RH. Urinary 8-iso-Prostaglandin F_{2α} as a risk marker in patients with coronary heart disease. *Circulation* 2004;109:843-848
- Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2007;65:51-59
- Siani A, Pagano E, Iacone R, Iacoviello L, Scopacasa F, Strazzullo P. Blood pressure and metabolic changes during dietary L-arginine supplementation in humans. *Am J Hypertens* 2000;13:547-551

- Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonenone is not the main product. *J Lipid Res* 1997;38:612-622
- Sinnhuber RO, Yu TC, Yu TeC. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res* 1958;23:626-633
- Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. High-density lipoproteine restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002;105:1399-1402
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462-2478
- Staub D, Meyerhans A, Bundi B, Schmid HP, Frauchiger B. Prediction of cardiovascular morbidity and mortality: comparison of the internal carotid artery resistive index with the common carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2006;37:800-805
- Steghens J-P, van Kappel AL, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic Biol Med* 2001;31:242-249
- Strandberg TE und Tilvis RS. C-reaktive protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1057-1060
- Stühlinger MC, Tsao PS, Her J-H, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-2575
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterisation of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7773-7778
- Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:1-8
- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Frölich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652-658
- Suttner J, Masova L, Dyr JE. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2001;751:193-197
- Suzuki T, Hayase M, Hibi K, Hosokawa H, Yokoya K, Fitzgerald PJ, Yock PG, Cooke JP, Suzuki T, Yeung AC. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans. *Am J Cardiol* 2002;89:363-367

- Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003;4:41-51
- Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57:244-252
- Taniyana Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-1081
- Tarry WC, Makhoul RG. L-arginine improves endothelium-dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb* 1994;14:938-943
- Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B* 2007;851:21-29
- Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G, Bauersachs J. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1693-1701
- Tommasi S, Carluccio E, Bentivoglio M, Buccolieri M, Mariotti M, Politano M, Corea L. C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;83:1595-1599
- Topol EJ, Leya F, Pinkerton CA, Whitlow PL, Hofling B, Simonton CA, Masden RR, Serruys PW, Leon MB, Williams DO, King ISB, Mark DB, Isner JM, Holmes D, Ellis SG, Lee KL, Keeler GP, Berden LG, Hinohara CL. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1993;329:221-227
- Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10417-10422
- Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathway in redox signaling. *Front Biosci* 2003;8:369-391
- Tousoulis D, Davies GJ, Tentolouris C, Goumas, Stefanadis C, Toutouzas P. Vasomotor effects of L- and D-arginine in stenotic atheromatous coronary plaque. *Heart* 2001;86:196-301
- Tsikis D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2000;72:4064-4072
- Tsikis D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Letters* 2000a;478:1-3

- Tsikakos D, Gutzki FM, Stichtenoth DO. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:51-59
- Tsikakos D, Sandmann J, Savva A, Lueßen P, Böger RH, Gutzki F-M, Mayer B, Frölich JC. Assessment of nitric oxide synthase activity in vitro and in vivo by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2000b;742:143-153
- Tsikakos D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frölich JC. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. *J Chromatogr B* 2003a;798:87-99.
- Tsikakos D, Schwedhelm E, Suchy MT, Niemann J, Gutzki FM, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Surdacki A, Frölich JC. Divergence in urinary 8-iso-PGF_{2α} (iPF_{2α} -III, 15-F(2t)-IsoP) levels from gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF_{2α}. Possible methodological, mechanistic and clinical implications. *J Chromatogr B* 2003b;794:237-55.
- Tsikakos D, Stichtenoth DO, Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. Synthesis of nitric oxide releasing, vasodilating and platelet aggregation inhibiting S-[¹⁵N]-nitroso compounds. *J Labelled Comp Radiopharmac* 1994;34:1055-1062
- Tsikakos D, Thum T, Becker T, Pham VV, Chobanyan K, Mitschke A, Beckmann B, Gutzki FM, Bauersachs J, Stichtenoth DO. Accurate quantification of dimethylamine (DMA) in human urine by gas chromatography-mass spectrometry as pentafluorobenzamide derivative : evaluation of the relationship between DMA and its precursor asymmetric dimethylamine (ADMA) in health and disease. *J Chromatogr B* 2007;851:229-239
- Tsikakos D, Wolf A, Frölich JC. Simplified HPLC method for urinary and circulating creatinine. *Clin Chem* 2004;50:201-203
- Upchurch Jr GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney Jr JF, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-17017
- Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-2128
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-575
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9220-9225

Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PWM, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DAG, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: c-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-919

Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 1986;116:36-46

Visek WJ. Nitrogen-stimulated orotic acid synthesis and nucleotide imbalance. *Cancer Res* 1992;52:2082S-2084S

Wade CR, Jackson PG, Van Rij AM. Quantitation of malondialdehyde (MDA) in plasma, by ion-pairing reverse phase high performance liquid chromatography. *Biochem Med* 1985;33:291-296

Walker HA, McGing E, Fisher I, Böger RH, Bode-Böger SM, Jackson G, Ritter JM, Chowienzyk PJ. Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine / ADMA ratio in men with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:499-505

Wang B, Pan J, Wang L, Zhu H, Yu R, Zou Y. Association of plasma 8-isoprostane levels with the presence and extent of coronary stenosis in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2006;184:425-430

White MF, Christensen HN. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. II. Transport systems barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines. *J Biol Chem* 1982;258:8028-8038

Wilcox CS. Reactive oxygen species: role in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:160-166

Wilson AM, Harada R, Nair N, Balasubramanian N, Cooke JP. L-Arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* 2007;116:188-195

Wu G, Meininger CJ. Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;265:H1965-H1971

Xia Y. Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1773-1778

Yagi K. A simple fluorometric assay for lipidperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976;15:212-216

Yeo HC, Helbock HJ, Chyu DW, Ames BN. Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1994;220:391-396

Yu LW, Latriano L, Duncan S, Hartwick RA, Witz G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans,trans-muconaldehyde. *Anal Biochem* 1986;156:326-333

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension. *Hypertension* 2001;38:1395-1399

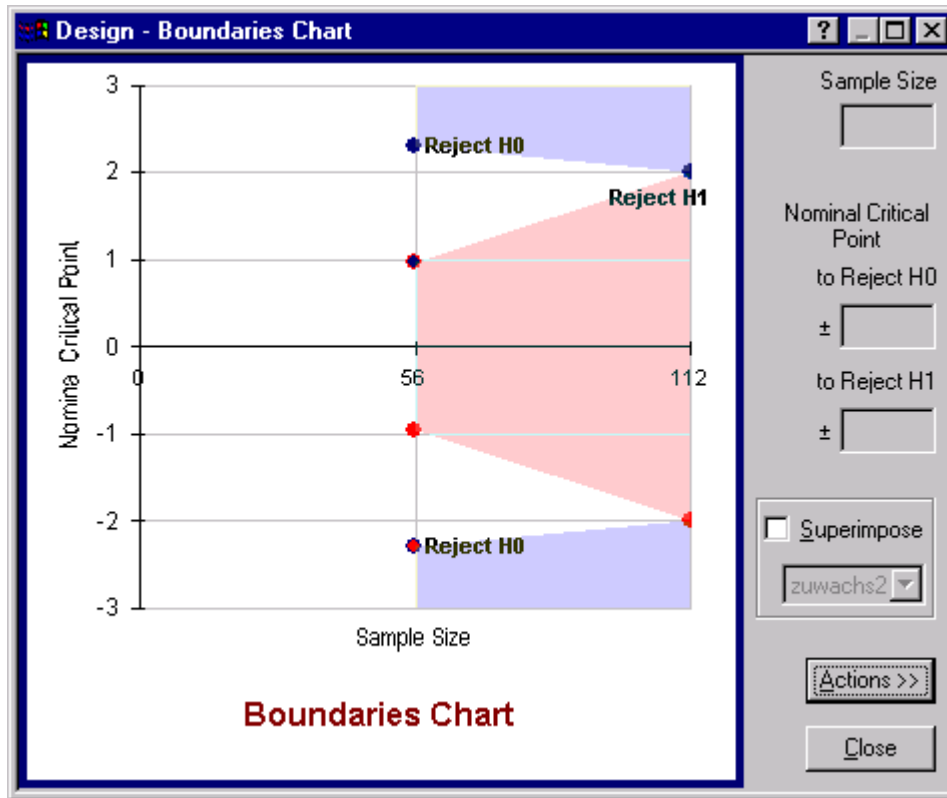
Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 2002;98:24-27

Zeiber AM, Drexler H, Saubier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993;92:652-662

Zhang AQ, Mitchell SC, Ayesh R, Smith RL. Dimethylamine formation in man. *Biochem Pharmacol* 1993;45:2185-2188

7. ANHANG

7.1. Interimsanalyse



7.2. Randomisierungsliste

Patient	Zufallszahl	Nr.	Patient	Zufallszahl	Nr.	Patient	Zufallszahl	Nr.	Patient	Zufallszahl	Nr.	Patient	Zufallszahl	Nr.
1	09621	1	41	04366	2	81	08603	1	121	04042	2	161	09822	2
2	05936	2	42	05904	2	82	07351	1	122	04922	2	162	03679	1
3	09466	2	43	09467	1	83	05399	1	123	05902	2	163	05337	1
4	03454	2	44	01238	2	84	02532	2	124	03275	1	164	07487	1
5	05281	1	45	04900	2	85	06721	1	125	02664	2	165	08353	1
6	01853	1	46	06453	1	86	03384	2	126	03593	1	166	04842	2
7	01416	2	47	07157	1	87	06300	2	127	02119	1	167	08834	2
8	05749	1	48	03577	1	88	02542	2	128	08721	1	168	03242	2
9	06234	2	49	09904	2	89	03351	1	129	01286	2	169	00846	2
10	00810	2	50	02366	2	90	07285	1	130	09938	2	170	02103	1
11	05433	1	51	02281	1	91	09190	2	131	01149	1	171	04878	2
12	03793	1	52	09783	1	92	01208	2	132	08221	1	172	04215	1
13	07842	2	53	02195	1	93	00408	2	133	06509	1	173	00922	2
14	03440	2	54	04722	2	94	08599	1	134	03549	1	174	04529	1
15	02959	1	55	06184	2	95	05576	2	135	00358	2	175	03382	2
16	01807	1	56	07423	1	96	08069	1	136	04198	2	176	04099	1
17	08336	2	57	02992	2	97	03488	2	137	05129	1	177	08634	2
18	01530	2	58	04164	2	98	03470	2	138	00506	2	178	05967	1
19	09402	2	59	02793	1	99	00643	1	139	07404	2	179	04143	1
20	08782	2	60	08220	2	100	01233	1	140	00244	2	180	04223	1
21	02175	1	61	07799	1	101	09161	1	141	03695	1	181	02252	2
22	03751	1	62	02066	2	102	07678	2	142	01925	1	182	07056	2
23	08827	1	63	04011	1	103	09945	1	143	04617	1	183	08517	1
24	01619	1	64	07671	1	104	02296	2	144	01828	2	184	03032	2
25	00248	2	65	08207	1	105	05670	2	145	02741	1	185	04357	1
26	02919	1	66	04099	1	106	01783	1	146	03101	1	186	09613	1
27	07193	1	67	02451	1	107	08619	1	147	09192	2	187	00296	2
28	09151	1	68	04616	2	108	02151	1	148	08563	1	188	06807	1
29	02541	1	69	07626	2	109	04951	1	149	07387	1	189	05355	1
30	01168	2	70	03608	2	110	05506	2	150	00050	2	190	02900	2
31	07884	2	71	04854	2	111	09248	2	151	08894	2	191	04384	2
32	07028	2	72	07819	1	112	08830	2	152	04288	2	192	09084	2
33	02224	2	73	01844	2	113	00051	1	153	03632	2	193	05703	1
34	04482	2	74	09242	2	114	05306	2	154	06123	1	194	01403	1
35	00820	2	75	09012	2	115	01902	2	155	06553	1	195	01872	2
36	08084	2	76	09868	2	116	04288	2	156	09595	1	196	06599	1
37	02937	1	77	00545	1	117	02064	2	157	07799	1	197	01378	2
38	00381	1	78	07019	1	118	05175	1	158	08878	2	198	05953	1
39	07415	1	79	05941	1	119	04625	1	159	07882	2	199	00190	2
40	07203	1	80	03743	1	120	04239	1	160	07840	2	200	09952	2

7.3. Chargenzuordnungsliste

Patient	Charge	Patient	Charge	Patient	Charge	Patient	Charge	Patient	Charge
1	L2289/2	41	L2289/1	81	L2289/2	121	L2289/1	161	L2289/1
2	L2289/1	42	L2289/1	82	L2289/2	122	L2289/1	162	L2289/2
3	L2289/1	43	L2289/2	83	L2289/2	123	L2289/1	163	L2289/2
4	L2289/1	44	L2289/1	84	L2289/1	124	L2289/2	164	L2289/2
5	L2289/2	45	L2289/1	85	L2289/2	125	L2289/1	165	L2289/2
6	L2289/2	46	L2289/2	86	L2289/1	126	L2289/2	166	L2289/1
7	L2289/1	47	L2289/2	87	L2289/1	127	L2289/2	167	L2289/1
8	L2289/2	48	L2289/2	88	L2289/1	128	L2289/2	168	L2289/1
9	L2289/1	49	L2289/1	89	L2289/2	129	L2289/1	169	L2289/1
10	L2289/1	50	L2289/1	90	L2289/2	130	L2289/1	170	L2289/2
11	L2289/2	51	L2289/2	91	L2289/1	131	L2289/2	171	L2289/1
12	L2289/2	52	L2289/2	92	L2289/1	132	L2289/2	172	L2289/2
13	L2289/1	53	L2289/2	93	L2289/1	133	L2289/2	173	L2289/1
14	L2289/1	54	L2289/1	94	L2289/2	134	L2289/2	174	L2289/2
15	L2289/2	55	L2289/1	95	L2289/1	135	L2289/1	175	L2289/1
16	L2289/2	56	L2289/2	96	L2289/2	136	L2289/1	176	L2289/2
17	L2289/1	57	L2289/1	97	L2289/1	137	L2289/2	177	L2289/1
18	L2289/1	58	L2289/1	98	L2289/1	138	L2289/1	178	L2289/2
19	L2289/1	59	L2289/2	99	L2289/2	139	L2289/1	179	L2289/2
20	L2289/1	60	L2289/1	100	L2289/2	140	L2289/1	180	L2289/2
21	L2289/2	61	L2289/2	101	L2289/2	141	L2289/2	181	L2289/1
22	L2289/2	62	L2289/1	102	L2289/1	142	L2289/2	182	L2289/1
23	L2289/2	63	L2289/2	103	L2289/2	143	L2289/2	183	L2289/2
24	L2289/2	64	L2289/2	104	L2289/1	144	L2289/1	184	L2289/1
25	L2289/1	65	L2289/2	105	L2289/1	145	L2289/2	185	L2289/2
26	L2289/2	66	L2289/2	106	L2289/2	146	L2289/2	186	L2289/2
27	L2289/2	67	L2289/2	107	L2289/2	147	L2289/1	187	L2289/1
28	L2289/2	68	L2289/1	108	L2289/2	148	L2289/2	188	L2289/2
29	L2289/2	69	L2289/1	109	L2289/2	149	L2289/2	189	L2289/2
30	L2289/1	70	L2289/1	110	L2289/1	150	L2289/1	190	L2289/1
31	L2289/1	71	L2289/1	111	L2289/1	151	L2289/1	191	L2289/1
32	L2289/1	72	L2289/2	112	L2289/1	152	L2289/1	192	L2289/1
33	L2289/1	73	L2289/1	113	L2289/2	153	L2289/1	193	L2289/2
34	L2289/1	74	L2289/1	114	L2289/1	154	L2289/2	194	L2289/2
35	L2289/1	75	L2289/1	115	L2289/1	155	L2289/2	195	L2289/1
36	L2289/1	76	L2289/1	116	L2289/1	156	L2289/2	196	L2289/2
37	L2289/2	77	L2289/2	117	L2289/1	157	L2289/2	197	L2289/1
38	L2289/2	78	L2289/2	118	L2289/2	158	L2289/1	198	L2289/2
39	L2289/2	79	L2289/2	119	L2289/2	159	L2289/1	199	L2289/1
40	L2289/2	80	L2289/2	120	L2289/2	160	L2289/1	200	L2289/1

7.4. Therapiezuordnungsliste

Patient	Therapie	Patient	Therapie
1	Placebo	35	Verum
2	Verum	36	Verum
3	Verum	37	Placebo
4	Verum	38	Placebo
5	Placebo	40	Placebo
6	Placebo	41	Verum
7	Verum	102	Verum
8	Placebo	103	Placebo
9	Verum	104	Verum
11	Placebo	105	Verum
12	Placebo	106	Placebo
13	Verum	107	Placebo
15	Placebo	109	Placebo
16	Placebo	110	Verum
17	Verum	111	Verum
18	Verum	112	Verum
19	Verum	114	Verum
21	Placebo	115	Verum
22	Placebo	116	Verum
23	Placebo	118	Placebo
24	Placebo	119	Placebo
25	Verum	120	Placebo
26	Placebo	121	Verum
27	Placebo	122	Verum
28	Placebo	123	Verum
29	Placebo	124	Placebo
30	Verum	125	Verum
31	Verum	126	Placebo
32	Verum	127	Placebo
33	Verum	129	Verum

7.5. Meldebögen für unerwünschte Ereignisse

7.5.1. Meldebogen für nicht schwere unerwünschte Ereignisse

Meldebogen für unerwünschte Ereignisse

Patientennummer: _____

Geburtsdatum: ____ . ____ . ____

Initialen: ____

Unerwünschtes Ereignis

Datum: _____

Uhrzeit: ____ : ____ Uhr

Art des unerwünschten Ereignisses:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen des Herzens | <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Leber und Galle |
| <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Gefäße | <input type="checkbox"/> Störungen des Nervensystems |
| <input type="checkbox"/> Störungen des Elektrolythaushaltes | <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Haut und des Unterhautzellgewebes |
| <input type="checkbox"/> Störungen des Blut und Lymphsystems | <input type="checkbox"/> Störungen des endokrinen Systems |
| <input type="checkbox"/> Gastrointestinale Beschwerden | <input type="checkbox"/> Reaktion des Immunsystems |
| <input type="checkbox"/> Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen | <input type="checkbox"/> Sonstige |

Beschreibung des unerwünschten Ereignisses:

Schweregrad des unerwünschten Ereignisses:

- gering/ leicht
- mäßig/ deutlich
- stark/ ausgeprägt

7.5.2. Meldebogen für schwere unerwünschte Ereignisse

Meldebogen für schwere unerwünschte Ereignisse

Patientennummer: _ _ _ _ _

Geburtsdatum: _ _ . _ _ . _ _

Initialen: _ _

Schweres unerwünschtes Ereignis

Datum: _ _ _ _ _

Uhrzeit: _ _ : _ _ Uhr

Art des schweren unerwünschten Ereignisses:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen des Herzens | <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Leber und Galle |
| <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Gefäße | <input type="checkbox"/> Störungen des Nervensystems |
| <input type="checkbox"/> Störungen des Elektrolythaushaltes | <input type="checkbox"/> Funktionsstörungen der Haut und des Unterhautzellgewebes |
| <input type="checkbox"/> Störungen des Blut und Lymphsystems | <input type="checkbox"/> Störungen des endokrinen Systems |
| <input type="checkbox"/> Gastrointestinale Beschwerden | <input type="checkbox"/> Reaktion des Immunsystems |
| <input type="checkbox"/> Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen | <input type="checkbox"/> Sonstige |

Beschreibung des schweren unerwünschten Ereignisses:

Grad des schweren unerwünschten Ereignisses:

- langandauerndes Ereignis
- lebensbedrohliches Ereignis
- Todesfall
- Krankenhausaufenthalt

7.6. Case Report Forms

7.6.1. Case Report Form Eingangsuntersuchung

Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Case Report Form für die Eingangsuntersuchung

Patientennummer:

Patientennummer: _____

Initialen: ____

Geburtsdatum: ____ . ____ . ____

Alter: ____ Jahre

Größe: ____ cm

Gewicht: ____ kg

Geschlecht: ____

Diagnosen: _____, seit _____
 _____, seit _____
 _____, seit _____
 _____, seit _____
 _____, seit _____
 _____, seit _____

Angina-Pectoris-Beschwerden (Schmerzen in der Herzgegend, Luftnot):

- keine Beschwerden
- Beschwerden bei starker körperlicher Belastung (sportlicher Betätigung: Joggen, Wandern in bergigem Gelände u. ä.)
- Beschwerden bei mittelstarker körperlicher Belastung (Treppensteigen, Schwimmen, Fahrradfahren)
- Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung (Spaziergang in flachem Gelände u. ä.)
- Beschwerden in Ruhe

Art der Beschwerden: _____

Frequenz der Beschwerden:

- mehrmals täglich: ____ x täglich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- einmal täglich: Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- mehrmals wöchentlich: ____ x wöchentlich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- einmal wöchentlich: Zeitpunkt: ____:____ Uhr

Maßnahmen:

1. Anfallsprophylaxe: nein ja, seit _____

Art der Medikation: _____

2. Anfallsmedikation: nein ja, seit _____

Art der Medikation: _____

Häufigkeit der Anwendung: _____

Erstmaliges Auftreten der Beschwerden: ____ . ____ . ____

**Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit
L-Arginin nach Angioplastie“**

Case Report Form für die Eingangsuntersuchung

Patientennummer:

Kardiovaskuläre Risikofaktoren

1. Rauchen: nie ja, seit ___ Jahren Zigaretten; Anzahl: ___ / Tag
 ja, seit ___ Jahren Pfeife
 ja; jedoch seit ___ Jahren Nichtraucher

2. Hypercholesterinämie: nein ja, seit _____

3. Hypertonie: nein ja, seit _____
RR_{systolisch}: ___ mm Hg
RR_{diastolisch}: ___ mmHg
Puls: ___ Schläge/min

4. Adipositas: nein ja
BMI: ___ kg/m²

5. Diabetes mellitus: nein ja, seit _____
Medikamente: nein ja, s.u.

6. Familiäre Häufung von kardiovaskulären Problemen:
 nein ja: _____

7. Nierenfunktion: Serumkreatinin: ___ μmol/l
Creatinin-Clearance: ___ (nach Cockroft und Gault)

8. Leberfunktion: ALAT: ___ μmol/sl
ASAT: ___ μmol/sl

Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Case Report Form für die Eingangsuntersuchung

Patientennummer:

9. Weitere Laborparameter:

venöses Plasma:	LDL	_____	mmol/l	
	HDL	_____	mmol/l	
	Homocystein:	_____	µmol/l	
	ADMA:	_____	µmol/l	
	NMMA:	_____	µmol/l	
	L-Arginin:	_____	µmol/l	
	C-reaktives Protein:	_____	mg/dl	
	8-iso-PGF 2α	_____	nmol/l	
	MDA	_____	µmol/l	
	HNE	_____	µmol/l	
	NO ₃ ⁻	_____	µmol/l	
	NO ₂ ⁻ :	_____	µmol/l	
	E-lyte:	Na ⁺ :	_____	mmol/l
		K ⁺ :	_____	mmol/l
Cl ⁻ :		_____	mmol/l	
Kapillarblut:	pO ₂ :	_____	mmHg	
	pCO ₂ :	_____	mmHg	
	pH:	_____		
	HCO ₃ ⁻ :	_____	mmol/l	
	Blutzucker nü.:	_____	mmol/l	
Urin:	NO ₃ ⁻	_____	µmol/ mmol Krea	
	NO ₂ ⁻	_____	µmol/ mmol Krea	
	8-iso-PGF 2α	_____	pmol/mmol Krea	
	ADMA:	_____	µmol/mmol Krea	
	DMA:	_____	µmol/mmol Krea	
	L-Arginin:	_____	µmol/mmol Krea	

10. Angiographiebefund: _____

Stenosen in den Koronargefäßen: ___ %;
 Größe der Läsionen: _____ mm

11. Ergebnis des Belastungs-EKG:

**Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit
L-Arginin nach Angioplastie“**

Case Report Form für die Eingangsuntersuchung

Patientennummer: _____

12. Regelmäßige Einnahme folgender Medikamente:

Lipidsenker: ___ ___ mg _____ seit: _____

Aggregationshemmer: ___ ___ mg _____ seit: _____

β -Blocker: ___ ___ mg _____ seit: _____

ACE-Hemmer: ___ ___ mg _____ seit: _____

Ca-Antagonisten: ___ ___ mg _____ seit: _____

Nitrate: ___ ___ mg _____ seit: _____

andere: 1. ___ ___ mg _____ seit: _____

2. ___ ___ mg _____ seit: _____

3. ___ ___ mg _____ seit: _____

4. ___ ___ mg _____ seit: _____

Begründung:

zu 1. _____

zu 2. _____

zu 3. _____

zu 4. _____

Datum

Unterschrift

7.6.2. Case Report Form Zwischenuntersuchung

Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Case Report Form für die Zwischenuntersuchung

Patientennummer:

Patientennummer: _____

Initialen: _____

Geburtsdatum: ____ . ____ . ____

Alter: ____ Jahre

Größe: _____ cm

Gewicht: _____ kg

Geschlecht: _____

-
1. Nierenfunktion: Serumkreatinin: _____ $\mu\text{mol/L}$
Creatinin-Clearance: _____ (nach Cockcroft und Gault)
2. Leberfunktion: ALAT: _____ $\mu\text{mol/sl}$
ASAT: _____ $\mu\text{mol/sl}$
3. Urin: NO_3^- _____ $\mu\text{mol/mmol Krea}$
 NO_2^- _____ $\mu\text{mol/mmol Krea}$
8-iso-PGF 2α _____ pmol/mmol Krea
ADMA: _____ $\mu\text{mol/mmol Krea}$
DMA: _____ $\mu\text{mol/mmol Krea}$
L-Arginin: _____ $\mu\text{mol/mmol Krea}$

4. Ergebnis des Belastungs-EKG:

5. Regelmäßige Einnahme folgender Medikamente:

- Lipidsenker: _____ mg _____ seit: _____
- Aggregationshemmer: _____ mg _____ seit: _____
- β -Blocker: _____ mg _____ seit: _____
- ACE-Hemmer: _____ mg _____ seit: _____
- Ca-Antagonisten: _____ mg _____ seit: _____
- Nitrate: _____ mg _____ seit: _____

**Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit
L-Arginin nach Angioplastie“**

Case Report Form für die Zwischenuntersuchung

Patientennummer:

- andere:
1. ___ ___ mg _____ seit: _____
2. ___ ___ mg _____ seit: _____
3. ___ ___ mg _____ seit: _____
4. ___ ___ mg _____ seit: _____

Begründung:

zu 1. _____

zu 2. _____

zu 3. _____

zu 4. _____

Datum

Unterschrift

7.6.3. Case Report Form Enduntersuchung

Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Case Report Form für die Enduntersuchung

Patientennummer: _____

Patientennummer: _____

Initialen: _____

Geburtsdatum: _____.____.____

Alter: _____ Jahre

Größe: _____ cm

Gewicht: _____ kg

Geschlecht: _____

Angina-Pectoris-Beschwerden (Schmerzen in der Herzgegend, Luftnot):

- keine Beschwerden
- Beschwerden bei starker körperlicher Belastung (sportlicher Betätigung: Joggen, Wandern in bergigem Gelände u. ä.)
- Beschwerden bei mittelstarker körperlicher Belastung (Treppensteigen, Schwimmen, Fahrradfahren)
- Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung (Spaziergang in flachem Gelände u. ä.)
- Beschwerden in Ruhe

Art der Beschwerden: _____

Frequenz der Beschwerden:

- mehrmals täglich: ____ x täglich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- einmal täglich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- mehrmals wöchentlich: ____ x wöchentlich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr
- einmal wöchentlich; Zeitpunkt: ____:____ Uhr

Maßnahmen:

1. Anfallsprophylaxe: nein ja, seit _____
Art der Medikation: _____
2. Anfallsmedikation: nein ja, seit _____
Art der Medikation: _____
Häufigkeit der Anwendung: _____

Kardiovaskuläre Risikofaktoren

1. Rauchen: nie ja, seit ____ Jahren Zigaretten; Anzahl: ____ / Tag
 ja, seit ____ Jahren Pfeife
 ja; jedoch seit ____ Jahren Nichtraucher
2. Hypercholesterinämie: nein ja, seit _____

Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Case Report Form für die Enduntersuchung

Patientennummer: _____

3. Hypertonie: nein ja, seit _____
 RR_{systolisch}: _____ mm Hg
 RR_{diastolisch}: _____ mmHg
 Puls: _____ Schläge/min
4. Adipositas: nein ja
 BMI: _____ kg/m²
5. Diabetes mellitus: nein ja, seit _____
 Medikamente: nein ja, s.u.
6. Nierenfunktion: Serumkreatinin: _____ µmol/L
 Creatinin-Clearance: _____ (nach Cockroft und Gault)
7. Leberfunktion: ALAT: _____ µmol/sl
 ASAT: _____ µmol/sl
8. Weitere Laborparameter:
- | | | |
|-----------------|---------------------------------|--------------|
| venöses Plasma: | LDL | _____ mmol/l |
| | HDL | _____ mmol/l |
| | Homocystein: | _____ µmol/l |
| | ADMA: | _____ µmol/l |
| | NMMA: | _____ µmol/l |
| | L-Arginin: | _____ µmol/l |
| | C-reaktives Protein: | _____ mg/dl |
| | 8-iso-PGF 2 α | _____ nmol/l |
| | NO ₃ ⁻ | _____ µmol/l |
| | NO ₂ ⁻ : | _____ µmol/l |
| E-lyte: | Na ⁺ : | _____ mmol/l |
| | K ⁺ : | _____ mmol/l |
| | Cl ⁻ : | _____ mmol/l |
| Kapillarblut: | pO ₂ : | _____ mmHg |
| | pCO ₂ : | _____ mmHg |
| | pH: | _____ |
| | HCO ₃ ⁻ : | _____ mmol/l |
| | Blutzucker nü.: | _____ mmol/l |

**Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit
L-Arginin nach Angioplastie“**

Case Report Form für die Enduntersuchung

Patientennummer: _____

Urin:	NO ₃ ⁻	_____ μmol/mmol Krea
	NO ₂ ⁻	_____ μmol/mmol Krea
	8-iso-PGF 2α	_____ pmol/mmol Krea
	ADMA:	_____ μmol/mmol Krea
	DMA:	_____ μmol/mmol Krea
	L-Arginin:	_____ μmol/mmol Krea

9. Angiographiebefund: _____

Stenosen in den Koronargefäßen: _____ %;
 Größe der Läsionen: _____ mm

10. Ergebnis des Belastungs-EKG:

11. Regelmäßige Einnahme folgender Medikamente:

- Lipidsenker: _____ mg _____ seit: _____
- Aggregationshemmer: _____ mg _____ seit: _____
- β-Blocker: _____ mg _____ seit: _____
- ACE-Hemmer: _____ mg _____ seit: _____
- Ca-Antagonisten: _____ mg _____ seit: _____
- Nitrate: _____ mg _____ seit: _____

**Pilotstudie „Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit
L-Arginin nach Angioplastie“**

Case Report Form für die Enduntersuchung

Patientennummer:

- andere:
1. ___ ___ mg _____ seit: _____
2. ___ ___ mg _____ seit: _____
3. ___ ___ mg _____ seit: _____
4. ___ ___ mg _____ seit: _____

Begründung:

zu 1. _____

zu 2. _____

zu 3. _____

zu 4. _____

Datum

Unterschrift

7.7. Fragebogen zum Gesundheitszustand FS-12

MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER

Fragebogen zum Gesundheitszustand (SF-12)

Name: _____

Datum: _____

In diesem Fragebogen geht es darum, wie Sie Ihren Gesundheitszustand beurteilen. Wir möchten uns ein umfassendes Bild machen, wie Sie sich fühlen und wie Sie im Alltag zurechtkommen.

Bitte beantworten Sie jede der folgenden Fragen, indem Sie bei jeder Antwortmöglichkeit das Kästchen bzw. die Zahl ankreuzen, die zur Zeit (d.h. in den letzten 7 Tagen) am besten für Sie zutrifft.

1. Wie würden Sie Ihren **Gesundheitszustand** im allgemeinen beschreiben?

ausgezeichnet	sehr gut	gut	weniger gut	schlecht
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

Im folgenden sind einige Tätigkeiten beschrieben, die Sie vielleicht normalerweise am Tag ausüben. Wie stark sind Sie durch Ihren derzeitigen Gesundheitszustand bei diesen Tätigkeiten eingeschränkt?

	Ja, stark eingeschränkt	Ja, etwas eingeschränkt	Nein, überhaupt nicht eingeschränkt
2. mittelschwere Tätigkeiten (z.B. einen Tisch verschieben, staubsaugen, kegeln)	1	2	3
3. mehrere Stockwerke Treppe steigen	1	2	3

Hatten Sie **in den vergangenen 7 Tagen** aufgrund Ihrer **körperlichen Gesundheit** irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder bei Ihren täglich zu erledigenden Tätigkeiten?

	ja	nein
4. Ich habe weniger geschafft als ich wollte	1	2
5. Ich konnte nur bestimmte Dinge tun	1	2

Hatten Sie **in den vergangenen 7 Tagen** aufgrund **seelischer Probleme** irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder bei Ihren täglich zu erledigenden Tätigkeiten (z.B. weil Sie sich niedergeschlagen oder ängstlich fühlten)?

	ja	nein
6. Ich habe weniger geschafft als ich wollte	1	2
7. Ich konnte nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten	1	2

8. Inwieweit haben Schmerzen Sie **in den vergangenen 7 Tagen** bei der Ausübung Ihrer alltäglichen Tätigkeiten zu Hause und im Beruf behindert?

überhaupt nicht	ein wenig	mäßig	ziemlich	sehr
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

Bei den folgenden Fragen geht es darum, wie Sie sich fühlen und wie es Ihnen **in den vergangenen 7 Tagen** gegangen ist. (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile die Zahl an, die Ihrem Befinden am ehesten entspricht.)

Wie oft waren Sie in den letzten 7 Tagen...

	immer	meistens	ziemlich oft	manchmal	selten	nie
9. ruhig und gelassen?	1	2	3	4	5	6
10. voller Energie?	1	2	3	4	5	6
11. entmutigt und traurig?	1	2	3	4	5	6

12. Wie häufig haben Ihre **körperliche Gesundheit** oder Ihre **seelischen Probleme in den vergangenen 7 Tagen** Ihre normalen Kontakte zu Familienangehörigen, Freunden, Nachbarn oder zu Ihrem Bekanntenkreis beeinträchtigt?

immer	meistens	manchmal	selten	nie
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

7.8. Fragebogen zum motorischen Funktionsstatus (FFB-Mot)

Pilotstudie: “Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Name: _____ Vorname: _____ Datum: _____

Wie gut können Sie die folgenden Tätigkeiten bewältigen?
 Bitte geben Sie zu den folgenden Fragen eine spontane Einschätzung ab.
 Falls Sie die Tätigkeiten schon lange nicht mehr durchgeführt haben, so kreuzen Sie bitte die Antwort an, die Sie sich zutrauen.

Können Sie	nein (1)	mit großen Problemen (2)	mit mäßigen Problemen (3)	mit leichten Problemen (4)	ohne Probleme (5)
1. einen schweren Einkaufskorb (8kg) über mehrere Etagen tragen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. aus der Rückenlage ohne Hilfe der Arme den Oberkörper aufrichten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. schwere Koffer über mehrere Etagen tragen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. zwei Kilometer schnell gehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. einen Kilometer ohne Pause joggen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. 30min. ohne Pause joggen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. auf einem Stuhl sitzend mit den Händen den Boden erreichen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. aus dem Stand (mit gestreckten Knien) mit den Händen den Boden erreichen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
					1 FFB-Mot

Pilotstudie: "Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie"

Können Sie	nein (1)	mit großen Problemen (2)	mit mäßigen Problemen (3)	mit leichten Problemen (4)	ohne Probleme (5)
9. im Stehen mit dem Kopf die gestreckten Knie berühren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. auf einem Bein stehen, ohne sich festzuhalten (15s.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. einen Purzelbaum machen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. mit Abstützen über einen 1m hohen Zaun springen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. auf einem Stuhl sitzend ohne Hilfe der Arme aufstehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. um mehrere Blocks flott gehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. einen engen Pulli und Socken alleine aus- und anziehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. eine Treppe hinab gehen, ohne sich festzuhalten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7.9. VAS-Tagebuch

<p>Woche: _____</p> <p>Datum: _____</p> <p>Beschwerdekategorie:</p> <p>Entscheiden Sie sich für eine Beschwerdekategorie, und kreuzen Sie für diese Kategorie die Beschwerdestärke auf der Skala an.</p> <p><input type="checkbox"/> 1 Keine Beschwerden</p> <p><input type="checkbox"/> 2 Beschwerden bei leichter Belastung (Spazierengehen, Kälte) Beschwerdestärke:</p> <p><input type="checkbox"/> 3 Beschwerden bei mittlerer Betätigung (Radfahren, Treppensteigen, Streß) Beschwerdestärke:</p> <p><input type="checkbox"/> 4 Beschwerden bei sportlicher Betätigung Beschwerdestärke:</p>	<p>Anzahl der Herzschmerzanfälle:</p> <p>Anzahl der Anfälle pro Tag: _____</p> <p>Anzahl der Anfälle pro Woche: _____</p> <p>Anfallsmedikation:</p> <p>Name des Anfall-Medikamentes: _____</p> <p>Dosierung pro Anfall: _____</p>
---	---

7.10. Patienteninformation

Pilotstudie: Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie

1

Patienteninformation

Pilotstudie:

„Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen wurde eine Herzkrankheit festgestellt, die auf einer Verengung der Blutgefäße beruht, die das Herz mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Durch diese Enge ist die Versorgung unzureichend, sie macht sich meist durch Schmerzen in der Herzgegend bemerkbar.

Verengungen treten auf, wenn entweder die Muskeln, die das Gefäß umgeben, dieses Engstellen, oder es zu Verdickungen der Gefäßwand gekommen ist, wodurch sich der Durchmesser des Gefäßes vermindert. Der letztere Fall ist bei Ihnen aufgetreten.

Eine Möglichkeit, den Durchmesser des Gefäßes zu vergrößern, ist eine so genannte Ballondilatation. Diese wird oft im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung durchgeführt. Über die Durchführung dieser Untersuchung sowie die Ballondilatation selbst hat Ihr behandelnder Arzt sie bereits aufgeklärt oder wird sie aufklären. Die Ballondilatation selbst ist nicht Teil der Ihnen hiermit vorgeschlagenen Studie.

Neueren Studien zufolge kommt es zu einer stärkeren Verengung, wenn das Verhältnis zwischen dem körpereigenen Botenstoff ADMA und der Aminosäure L-Arginin, einem Nahrungsbestandteil, von dem wir täglich 4-5g zu uns nehmen, sich ungünstig verhält. Man hat gefunden, daß ADMA die natürlichen Wirkungen von L-Arginin beeinträchtigt; L-Arginin bewirkt eine Weitstellung der Gefäße, Verhinderung der Anheftung von Blutplättchen an der Gefäßwand; es verhindert die Aktivierung von weißen Blutkörperchen. Werden diese Abläufe durch ADMA gehemmt, setzt ein Prozeß ein, der letztendlich zur Atherosklerose und damit zur Verengung der Gefäße führt. Eine Möglichkeit wäre es also, das Verhältnis von ADMA und L-Arginin zugunsten des L-Arginins zu verbessern. Dieses wollen wir durch L-Arginin-Gabe erreichen. Wir möchten untersuchen, ob dadurch das Fortschreiten der Atherosklerose und die erneute Verengung der Koronargefäße verhindert oder wenigsten verzögert werden kann.

Wir möchten Sie bitten an dieser Pilotstudie teilzunehmen. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und ein Rücktritt auch ohne Angabe von Gründen möglich. Der Rücktritt aus der Studie ist jederzeit möglich und wirkt sich nicht nachteilig auf Ihre weitere Behandlung aus.

Sie als Patient nehmen nach einer Ballondilatation täglich 12g L-Arginin-HCl in Form von sechs Brausetabletten (morgens, mittags, abends je zwei Brausetabletten mit insgesamt 4g L-Arginin-Hydrochlorid) ein oder Sie befinden sich in der Kontrollgruppe, die Brausetabletten ohne diesen Wirkstoff erhält. Weder Sie als Patient noch der Sie betreuende Arzt weiß, ob die Tabletten, die Sie erhalten, den Wirkstoff L-Arginin enthalten oder ob es sich um ein Scheinmedikament, ein so genanntes Placebopräparat handelt. Sie nehmen diese Medikation das erste Mal am Vorabend des Eingriffes und danach über sechs Monate regelmäßig zu den Mahlzeiten ein. Sie erhalten die Brausetabletten von Ihrem behandelnden Arzt und geben ihm nicht verbrauchte wieder zurück. Sie werden 3 und 6 Monate nach der Entlassung Ihren Arzt besuchen und ihm von Ihren Erfahrungen mit dem Medikament berichten. Ihr Arzt wird diese Informationen aufnehmen und zur Auswertung an uns weitergeben. Es liegt im Ermessen Ihres behandelnden Arztes nach sechs Monaten eine erneute Herzkatheteruntersuchung durchzuführen, um festzustellen, inwieweit sich erneut Gefäßverengungen ausgebildet haben. Diese Herzkatheteruntersuchung ist ebenfalls nicht Teil dieser Studie. Zur weiteren Auswertung werden noch einige zusätzliche Blutuntersuchungen durchgeführt, die Hinweise auf die atherosklerotischen Veränderungen geben. Anschließend werden die Daten der Patienten, die das L-Arginin erhielten, mit denen verglichen, die die Kontrollgruppe darstellten.

Diese Form der Behandlung bei der koronaren Herzkrankheit ist noch nicht etabliert. Wir möchten mit dieser Pilotstudie untersuchen, ob man die erneute Verengung der Gefäße aufhalten kann. Bei bisherigen Versuchen mit diesem Medikament traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Als mögliches Risiko könnte es zu einer Übersäuerung des Blutes kommen; diese kann sich durch Symptome wie tiefe, später beschleunigte Atmung, Gefäßerweiterung mit warmer geröteter Haut sowie Blutdruckabfall bemerkbar machen.

Alle Daten, die wir von Ihnen erhalten, werden vertraulich behandelt; es besteht die ärztliche Schweigepflicht. Zur Auswertung der Studie werden alle Daten anonymisiert.

Ihnen entstehen durch die Teilnahme an der Pilotstudie keine Kosten; ebensowenig entstehen Ihnen Nachteile, wenn Sie die Teilnahme an der Studie ablehnen. Wir möchten Sie jedoch bitten einzuwilligen, da wir uns aus den Ergebnissen erhoffen, eine Möglichkeit zur verbesserten Behandlung Ihrer Herzkrankheit zu finden.

Für Fragen zur Studie stehen Ihnen jederzeit Ihr behandelnder Arzt und Ihr Studienbetreuer vor Ort zur Verfügung.

Ihr Studienbetreuer: _____

Telefon: _____

7.11. Einwilligungserklärung

Einwilligungserklärung

(zum Verbleib beim Patienten)

Name des Patienten: _____

Datum: _____

Ich habe die schriftliche Information zur Pilotstudie

“Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit L-Arginin nach Angioplastie”

gelesen und wurde des weiteren mündlich unterrichtet. Über Nutzen und Risiken wurde ich im Gespräch mit Dr. _____ informiert. Ich bestätige, daß alle meine Fragen beantwortet worden sind.

Ich wurde darüber aufgeklärt, daß die Daten, die ich meinem behandelnden Arzt im Rahmen von Arztbesuchen anvertraut habe und die im Zusammenhang mit der Therapie stehen, in anonymisierter Form gesammelt und ausgewertet werden. Nur der behandelnde Arzt kann meine Identität nachvollziehen. Im Falle einer Veröffentlichung der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit persönlicher Daten gewahrt. Das Bundesdatenschutzgesetz findet Anwendung.

Notwendige ärztliche Behandlungen werde ich von dem Arzt durchführen lassen, der die Pilotstudie begleitet. Falls ich wegen eines medizinischen Notfalls von einem anderen Arzt behandelt werde, melde ich dies baldmöglichst dem Studienarzt.

Die Durchführung der Studie erfolgt auf der Grundlage der europäischen Richtlinien, die als Qualitätsstandard für Klinische Studien in der europäischen Union gelten.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig; ich kann die Einwilligung jederzeit widerrufen, ohne daß mir daraus Nachteile in Bezug auf klinische Untersuchungen und Behandlung entstehen.

_____, den _____
Ort

Unterschrift des Patienten

_____, den _____
Ort

Unterschrift des aufklärenden Arztes

7.12. Studien-Medikation

C. Hedenkamp GmbH
Ziegler Str. 11
33161 Hövelhof

Dr. Jaeniche GmbH & Co. KG
Bodersweierer Str. 30
77694 Kehl-Leutesheim

7.13. Studienzentren

Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Magdeburg
Prof. Dr. med. H. Klein

Klinik für Kardiologie
Integriertes Herzzentrum Oldenburg
Klinikum Oldenburg gGmbH
Oldenburg
Prof. Dr. med. G. H. Reil

7.14. Normwerte

Parameter	Einheit	Normwert*			
		Literatur**	Magdeburg	Oldenburg	Schottdorf
L-Arginin, Plasma	µmol/l	70 - 100			
L-Arginin, Urin	µmol/mmol	***			
L-NMMA, Plasma	µmol/l	***			
ADMA, Plasma	µmol/l	0,4 - 0,5			
ADMA, Urin	µM/mM	1,3			
Nitrat, Plasma	µmol/l	30 - 50			
Nitrat, Urin	µM/mM	49 - 109			
Nitrit, Plasma	µmol/l	1 - 3			
Nitrit, Urin	µM/mM	0,5			
DMA, Urin	µmol/Tag	100 - 500			
8-isoPGF _{2α} , Plasma	nmol/l	0,2			
8-isoPGF _{2α} , Urin	pM/mM	50			
MDA, Plasma	nmol/l	****			
HNE, Plasma	nmol/l	****			
Homocystein, Plasma	µmol/l	< 10			
CRP, Plasma	mg/l		< 5	< 4	
LDL, Plasma	mmol/l		< 4,0		< 3,5
HDL, Plasma	mmol/l		> 0,9		> 1,0
Blutdruck systolisch	mmHg	< 140			
Blutdruck diastolisch	mmHg	< 90			
Puls	Schläge/min	62 - 86			
Blutzucker, Kapillarblut	mmol/l		3,1 - 6,4	3,9 - 6,1	
Kreatinin, Serum	µmol/l		59 - 104	53 - 106	
ALAT, Plasma	µmol/s.l.		< 0,68	< 0,57	
ASAT, Plasma	µmol/s.l.		< 0,63	< 0,52	
Natrium, Plasma	mmol/l		130 - 150	130 - 150	
Kalium, Plasma	mmol/l		3,5 - 5	3,5 - 5	
Chlorid, Plasma	mmol/l		98 - 106	96 - 110	
pH, Kapillarblut			7,35 - 7,46	7,35 - 7,45	
pO ₂ , Kapillarblut	mmHg		65 - 100	65 - 100	
pCO ₂ , Kapillarblut	mmHg		36 - 42	32 - 46	
HCO ₃ , Kapillarblut	mmol/l		23 - 27	22 - 26	

* die Normwerte sind abhängig vom Labor und/oder der Messmethode, sie sind angegeben als publizierte Mittelwerte oder obere und untere Grenzen der Normbereiche

** Achan et al. 2003, Blum et al. 2000, Bode-Böger et al. 1999, Creager et al. 1992, Horowitz und Heresztyn 2006, Lücke et al. 2006, Martens-Lobenhoffer und Bode-Böger 2007, Pschyrembel 2002, Rector et al. 1996, Teerlink 2007, Thum et al. 2005, Tsikas et al. 2003a, Tsikas et al. 2006, Zhang et al. 1993

*** für die gewählte Messmethode sind noch nicht ausreichend Daten vorhanden

**** die Normwerte sind methodenabhängig

7.15. Chemikalien

Aceton	supra solv	Merck, Darmstadt, Germany
Acetonitril	HPLC grade	Mallinckrodt Baker, Deventer, Netherlands
Ameisensäure, 98-100 %	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Ammoniumsulfat	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Aqua Spüllösung		Delts Select, Pfullingen, Germany
L-Arginin, mind. 98 %		Sigma, Steinheim, Germany
Borsäure	gepulvert reinst	Merck, Darmstadt, Germany
Chlortrimethylsilan	supra solv	Merck, Darmstadt, Germany
Citronensäure, wasserfrei	reinst	Merck, Darmstadt, Germany
Diethylether	uvasol	Merck, Darmstadt, Germany
d ₆ -Dimethylamin-HCl		Aldrich, Steinheim, Germany
L-Homoarginin-HCl		Sigma, Steinheim, Germany
3,3,3',3',4,4,4',4'-d ₈ -DL-Homocystin		Cambridge Isotope Lab, Andover, USA
Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
N ^G ,N ^G -Dimethylarginin-HCl		Sigma, Steinheim, Germany
di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat	pro analysi	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
Ethanol abs.		Mallinckrodt Baker, Deventer, Netherlands
Ethylacetat	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
N-Ethyl-diisopropylamin		Aldrich, Steinheim, Germany
4-Hydroxy-2-nonenal		Cayman, An Arbor, USA
9,9,9-d ₃ -4-Hydroxy-2-nonenal		Cayman, An Arbor, USA

Isooctan	supra solv	Merck, Darmstadt, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Kaliumhydroxid, Plättchen	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Kreatinin, 98 %		Aldrich, Steinheim, Germany
2-Mercaptoethanol, 99 %		Aldrich, Steinheim, Germany
Methanol		Mallinckrodt Baker, Deventer, Netherlands
d ₄ -Methanol		Aldrich, Steinheim, Germany
N ^G -Methyl-L-arginin-acetat, mind. 98 %		Sigma, Steinheim, Germany
Natriumcarbonat, wasserfrei	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid		Mallinckrodt Baker, Deventer, Netherlands
Natriumhydroxid, Plättchen	reinst	Merck, Darmstadt, Germany
¹⁴ N Natriumnitrat	pro analysi	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
¹⁴ N Natriumnitrit	pro analysi	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
¹⁵ N Natriumnitrat	pro analysi	Aldrich, Steinheim, Germany
¹⁵ N Natriumnitrit	pro analysi	Aldrich, Steinheim, Germany
Natriumsulfat, wasserfrei	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
<i>ortho</i> -Phosphorsäure, 85 %	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Pentafluorbenzoylchlorid		Aldrich, Steinheim, Germany
Pentafluorbenzylbromid		Fluka, Steinheim, Germany
<i>O</i> -(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)-hydroxylamin-HCl	pro analysi	Aldrich, Steinheim, Germany
Pentafluorpropionsäure-anhydrid		Pierce, Rockford, USA
<i>o</i> -Phthaldialdehyd, mind. 99 %		Sigma, Steinheim, Germany

3,3,4,4-d ₄ -8-iso-Prostaglandin F _{2α}		Cayman, An Arbor, USA
Salzsäure, 32 %	pro analysi	Merck, Darmstadt, Germany
Schwefelsäure, 95-97 %	pro analysi	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
Tetraethoxypropan		Aldrich, Steinheim, Germany
1,3-d ₂ -Tetraethoxypropan		Cambridge Isotope Lab, Andover, USA
Toluol		Mallinckrodt Baker, Deventer, Netherlands
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid		Pierce, Rockford, USA

7.16. Geräte

Evaporatoren:

Turbo Vap LV Evaporator, Zymark, Hopkinton USA

The Meyer N-EVAP analytical evaporator, Organomation, Thomson Instruments, Clear Brook, USA

Speed vac Concentrator SVC 100 H, Bachofer, Reutlingen, Germany

GC/MS-Anlage:

Autosampler:	HP 7673, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany
Gaschromatograph 1:	HP 5890 series II, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany
Massenspektrometer 2:	MS-Engine 5989A, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany
Software:	ChemStation, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany
Säule:	Optima 17 (15 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke 50 % Phenyl, 50 % Methylpolysiloxanphase), Macherey-Nagel, Düren, Germany

GC/MS/MS-Anlage:

Autosampler:	ThermoQuest AS 2000, CE Instruments, Austin, USA
Gaschromatograph:	ThermoQuest Trace GC 2000 series, CE Instruments, Austin, USA
Tandem-Massenspektrometer:	TSQ 7000, Finnigan MAT, San Jose, USA
Software:	Xcalibur, Finnigan MAT, San Jose, USA
Säulen:	Optima 17 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke 50 % Phenyl, 50 % Methylpolysiloxanphase), Macherey-Nagel, Düren, Germany
	Optima 5-MS (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke 5 % Diphenyl, 95 % Dimethylpolysiloxanphase), Macherey-Nagel, Düren, Germany
	FactorFour VF-17ms (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke vergleichbar mit 50 % Phenyl, 50 % Dimethylpolysiloxanphase) mit 10 m EZ-Guard Vorsäule, Varian, Darmstadt, Germany

Heizblöcke:

Bioblock Scientific, Code 92607, Thermolyne, Barnstead International, Dubuque , USA

Bioblock Scientific, Code 92675, Thermolyne, Barnstead International, Dubuque , USA

neoBlock 1, Code 2-2503, neoLab Migge, Heidelberg, Germany

MBT 250, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Germany

HPLC-Anlage 1:

Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler, Milford, USA
Pumpe:	Pharmacia LKB Gradient Pump 2249, Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany
Säule:	Synergi 4 μ Polar-RP 80 Å 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Heizung:	Column-Thermostat Jetstream 2 Plus, Langenzersdorf, Austria
Detektor:	Spectroflow 783, Kratos Analytical, Ramsey, USA
Integrator:	Shimadzu C-R6A, Kyoto, Japan
Online-Degaser:	Uniflows, Degasys Populaire, Tokyo, Japan

HPLC-Anlage 2:

Autosampler:	Gynkotek Gina 160 Autosampler, Gemering, Germany
Pumpe:	Gynkotek HPLC-Pumpe M 480, Gemering, Germany Gynkotek HPLC-Pumpe 300, Gemering, Germany
Säule:	CC 250/4 Nucleosil 100-5 C ₆ H ₅ , Macherey-Nagel, Düren, Germany
Vorsäule:	CC 8/4 Nucleosil 100-5 C ₆ H ₅ , Macherey-Nagel, Düren, Germany
Detektor:	Gynkotek RF 1002 Fluoreszenz HPLC Monitor, Gemering, Germany
Integrator:	Software Gynkosoft 5.5, Gemering, Germany
Online-Degaser:	Uniflows, Degasys Populaire, Tokyo, Japan

Magnetrührer:

IKAMAG RCT, IKA Labortechnik, Staufen, Germany

pH-Meter:

MP 220, Mettler Toledo, Giessen, Germany

Elektrode Inlab 419, NTC Electrolyte 9823, Mettler Toledo, Giessen, Germany

Pipetten:

Variable Pipetten (Volumenbereiche 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 500 – 5000 µl), Eppendorf, Hamburg, Germany

Multipipetten, Eppendorf, Hamburg, Germany

Rüttler:

2x³, Velp Scientifica, Usmate, Italy

REAX 2000, Heidolph, Schwabach, Germany

Spritzen:

µl-Spritzen (10 µl, 25 µl), Hamilton, Bonaduz, Switzerland

µl-Spritzen (10 µl), SEG, Ringwood, Australia

µl-Spritzen (10 µl), Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany

Ultraschallbad:

Bransonic, Typ 220, Omnilab, Gehrden, Germany

UV/VIS-Spektralphotometer

Spektralphotometer: Specord 50, Analytik Jena, Germany

Lampen: D₂-Lampe und Halogenlampe

Messbereich: 190-1100nm

Software: Aspekt Plus, Analytik Jena, Germany

Vakuumpumpen:

Membranpumpe N 726 FT.18, KNF Neuberger, Freiburg, Germany

Trivac D8A, Leybold-Heraeus, Köln, Germany

Waagen:

Sartorius Typ 1574, Sartorius, Göttingen, Germany

Sartorius Typ 1712, Sartorius, Göttingen, Germany

Zentrifugen:

Jouan CR 412, Jouan, Thermo Electron, Dreieich, Germany

Eppendorf Centrifuge 5415, Hamburg, Germany

Sorvall Instruments RC5C, Du Pont, Thermo Electron, Dreieich, Germany

7.17. Materialien

Computerprogramme:

SPSS, Version 13, 14 und 16

Mircrosoft Office, Excel 2001 und XP

MDL Inforamtion System, Isis Draw 2.5

Einmalpipetten:

Pasteurpipetten aus Glas (150 mm), Brand, Wertheim, Germany

Serum Pipette (170 mm), Copan, Brescia, Italy

Fragebögen:

SF-12, QualityMetric Incorporated, Lincoln, USA

FFB-Mot, Prof. K. Bös, Institut für Sport und Sportwissenschaft, Universität Karlsruhe, Karlsruhe, Germany

Küvetten:

Halbmikropräzisions-Küvette, Quarzglas Suprasil®, 10 mm, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany

Monovetten:

Plastik EDTA KE S-Monovetten (9 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Plastik Serum S-Monovetten (9 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Glas EDTA BD Vacutainer Systems (4 ml, 7 ml, 10 ml), Franklin Lakes, USA

Patiententagebuch:

VAS-Tagebuch, Sabine Rothmann, Institut für Klinische Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Pipettenspitzen:

Volumenspitzen (0,1 – 10 µl), Eppendorf, Hamburg, Germany

Volumenspitzen (200 µl, 1000 µl), Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Combitips plus (5 ml), Eppendorf, Hamburg, Germany

PD-Tips (100 – 5000 µl), Plastibrand, Brand, Wertheim, Germany

Reaktionsgefäße und Messgefäße:

Cellstar Polypropylen-Röhrchen 50 ml, steril, Schraubverschluss, konischem Boden, Geiner, Frickenhausen, Germany

Polypropylen-Röhrchen runder Boden 4 ml, Geiner Bio-One, Frickenhausen, Germany

Polypropylen-Röhrchen runder Boden 5 ml, Geiner Bio-One, Frickenhausen, Germany

Polypropylen-Röhrchen runder Boden 10 ml, Geiner Bio-One, Frickenhausen, Germany

Griffstopfen 11 mm, Geiner Bio-One, Frickenhausen, Germany

Griffstopfen 14 mm, Geiner Bio-One, Frickenhausen, Germany

Safety Cap Reagiergefäße 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Safe-seal Reagiergefäße 2 ml PP, Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Probengläschen N11-1HP 1 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Probengläschen konisch N11-1c 1 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Bördelkappen N11 TB/oA-1.0 Macherey-Nagel, Düren, Germany

Schraubampullen N8-1 1 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Schraubampullen konisch N8-1c 1 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Schraubkappen N8, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Mikroeingsätze Standard 5 x 30 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Säulen:

8-Isoprostane Affinity Columns, Cayman, An Arbor, USA

SPE-Säulen, CV-C18ec, 500mg, 15ml, Macherey-Nagel, Düren, Germany

Ultrazentrifugenkartuschen:

Vivaspin 2 Kartuschen, Vivascience, Hannover, Germany

7.18. Labordiagnostik

Institut für Klinische Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover
Hannover

Prof. Dr. med. J.C. Frölich

PD Dr. med. D.O. Stichtenoth (kommissarisch)

Gemeinschaftspraxis Dr. med. Bernd Schottdorf
Augsburg
Labor Hannover

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Magdeburg

Prof. Dr. med. Dipl. Chem. C. Luley

Institut für Laboratoriumsdiagnostik und Mikrobiologie
Klinikum Oldenburg gGmbH
Oldenburg

Prof. Dr. med. Dr. Klaus P. Kohse

7.19. Abweichungen der Kontrollparameter

Parameter	Einheit	gemeldeter Wert	Normwert*
Blutzucker	mmol/l	8,1	3,1 – 6,4
		9,7	3,9 – 6,1
		9,8	3,9 – 6,1
		10,6	3,9 – 6,1
		13,0	3,1 – 6,4
Kreatinin	µmol/l	106	59 – 104
ALAT	µmol/s.l.	1,29	< 0,57
		2,69	< 0,68
ASAT	µmol/s.l.	1,39	< 0,52
		2,20	< 0,63

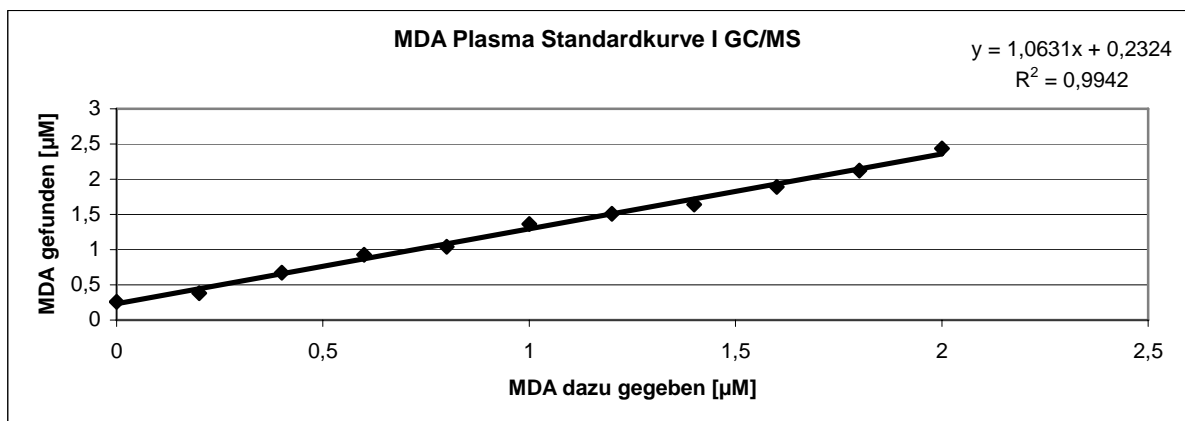
* die Normwerte sind abhängig vom Labor, das die Untersuchung durchgeführt hat, und variieren

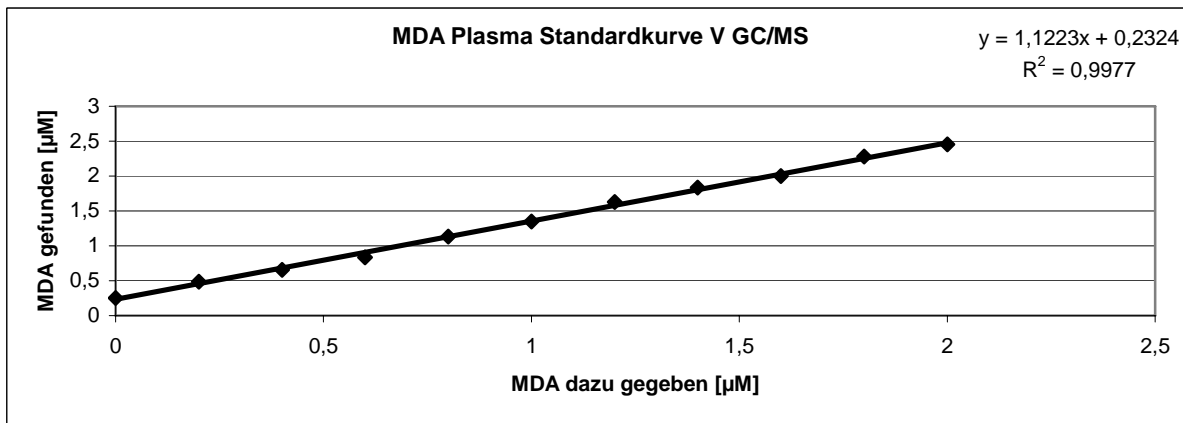
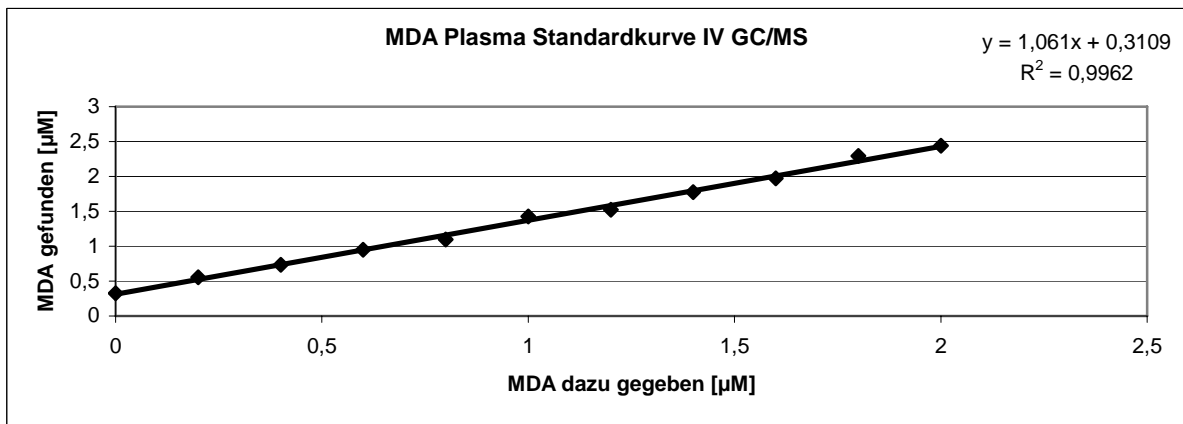
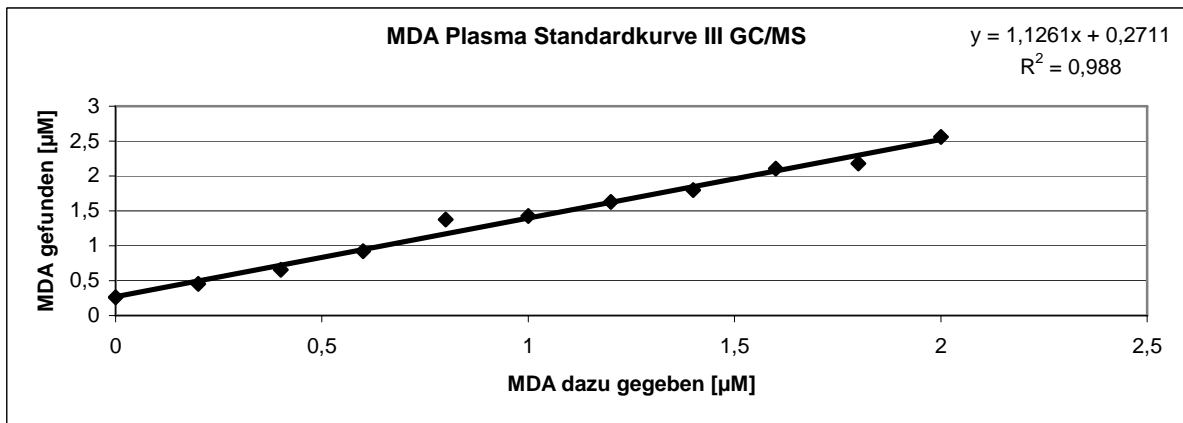
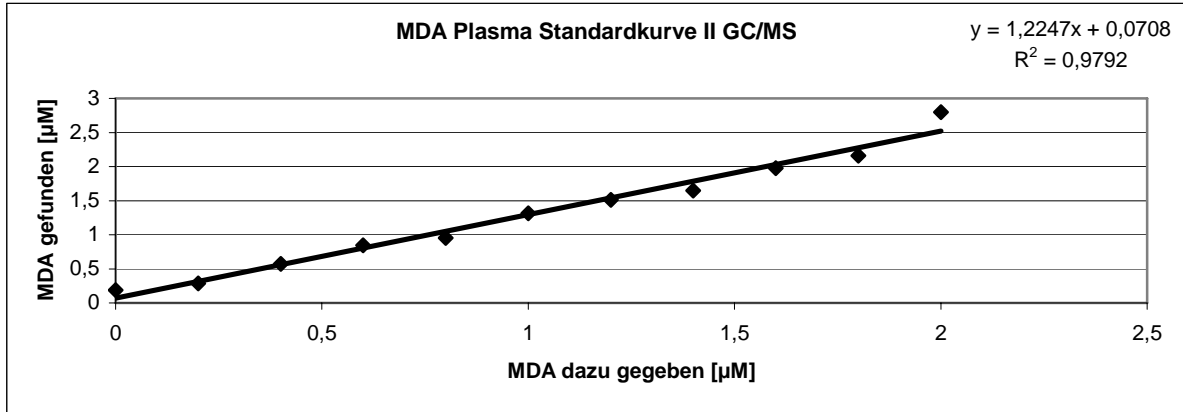
7.20. Methodenvalidierung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-Derivat

7.20.1. Standardkurven zur Methodenvalidierung mittels GC/MS

Standardkurve	hinzugegebene Konzentration IS [µM]	Konzentration MDA-d2 [µM]	Fläche MDA-d2	Fläche MDA-d0	gefundene Konzentration MDA-d0 [µM]	Mittelwert [µM]	STABWN [µM]	Variationskoeffizient [%]	Wiederfindungsrate [%]
1	0,0	1	4599650	1077100	0,2342	0,2604	0,0262	10,07	
	0,0	1	5132480	1471010	0,2866				
	0,2	1	5001830	1935910	0,3870	0,3840	0,0030	0,79	76,52
	0,2	1	4932400	1879120	0,3810				
	0,4	1	4837100	3382540	0,6993	0,6722	0,0271	4,04	90,43
	0,4	1	4905940	3164520	0,6450				
	0,6	1	3172480	3423530	1,0791	0,9269	0,1523	16,43	94,12
	0,6	1	4017130	3111760	0,7746				
	0,8	1	2517120	2690960	1,0691	1,0395	0,0295	2,84	84,78
	0,8	1	4047960	4088370	1,0100				
	1,0	1	2465770	3226750	1,3086	1,3653	0,0567	4,15	93,03
	1,0	1	3402740	4838850	1,4220				
	1,2	1	3243330	5310700	1,6374	1,5111	0,1264	8,36	88,41
	1,2	1	3261740	4516540	1,3847				
	1,4	1	3033240	4996810	1,6474	1,6413	0,0060	0,37	84,15
	1,4	1	2808300	4592460	1,6353				
	1,6	1	2719660	5143730	1,8913	1,8931	0,0018	0,10	86,37
	1,6	1	2945920	5582320	1,8949				
	1,8	1	2534830	5410480	2,1345	2,1213	0,0131	0,62	87,18
	1,8	1	3011280	6348380	2,1082				
2,0	1	2749830	6745980	2,4532	2,4353	0,0179	0,74	91,04	
2,0	1	2916050	7049220	2,4174					
2	0,0	1	5159590	976210	0,1892	0,1865	0,0027	1,44	
	0,0	1	5929520	1089980	0,1838				
	0,2	1	5171940	1732980	0,3351	0,2876	0,0475	16,52	67,21
	0,2	1	4474410	1074210	0,2401				
	0,4	1	4300760	2452830	0,5703	0,5709	0,0006	0,11	85,29
	0,4	1	3929460	2245810	0,5715				
	0,6	1	3816230	3260770	0,8544	0,8429	0,0115	1,37	92,54
	0,6	1	2999120	2493530	0,8314				
	0,8	1	2690740	2546920	0,9466	0,9520	0,0054	0,57	82,62
	0,8	1	2633090	2520820	0,9574				
	1,0	1	2313670	3001930	1,2975	1,3148	0,0174	1,32	94,34
	1,0	1	2561630	3412590	1,3322				
	1,2	1	1970210	3038840	1,5424	1,5139	0,0285	1,88	92,58
	1,2	1	2311650	3433780	1,4854				
	1,4	1	1949380	3216510	1,6500	1,6458	0,0043	0,26	87,70
	1,4	1	2081920	3417480	1,6415				
	1,6	1	1921080	3856130	2,0073	1,9752	0,0320	1,62	93,26
	1,6	1	1898180	3688510	1,9432				
	1,8	1	1976020	4401210	2,2273	2,1617	0,0656	3,04	91,62
	1,8	1	1756550	3681870	2,0961				
2,0	1	1656830	3939680	2,3778	2,8000	0,4222	15,08	107,65	
2,0	1	1039110	3348230	3,2222					
3	0,0	1	418010	111310	0,2663	0,2601	0,0062	2,40	
	0,0	1	592730	150450	0,2538				
	0,2	1	501760	207500	0,4135	0,4544	0,0409	9,00	90,61
	0,2	1	463590	229620	0,4953				
	0,4	1	496290	300230	0,6049	0,6563	0,0513	7,82	88,33
	0,4	1	460170	325610	0,7076				
	0,6	1	463810	413480	0,8915	0,9198	0,0283	3,07	93,43
	0,6	1	413020	391550	0,9480				
	0,8	1	338760	514680	1,5193	1,3759	0,1434	10,42	112,24
	0,8	1	364060	448720	1,2325				
	1,0	1	333600	482280	1,4457	1,4253	0,0204	1,43	97,14
	1,0	1	315400	443120	1,4049				
	1,2	1	330150	532680	1,6134	1,6301	0,0167	1,02	95,40
	1,2	1	318760	524920	1,6468				
	1,4	1	323070	548280	1,6971	1,7994	0,1023	5,69	92,27
	1,4	1	306120	582150	1,9017				
	1,6	1	257970	548420	2,1259	2,1062	0,0197	0,93	96,10
	1,6	1	255940	534030	2,0865				
	1,8	1	287520	638560	2,2209	2,1807	0,0402	1,84	89,63
	1,8	1	269780	577460	2,1405				
2,0	1	349630	953090	2,7260	2,5613	0,1647	6,43	95,77	
2,0	1	263840	632330	2,3966					

Standardkurve	hinzugegebene Konzentration IS [µM]	Konzentration MDA-d2 [µM]	Fläche MDA-d2	Fläche MDA-d0	gefundene Konzentration MDA-d0 [µM]	Mittelwert [µM]	STABWVN [µM]	Variationskoeffizient [%]	Wiederfindungsrate [%]
4	0,0	1	840570	264080	0,3142	0,3234	0,0093	2,86	
	0,0	1	919850	306030	0,3327				
	0,2	1	1030360	571610	0,5548	0,5543	0,0004	0,08	98,13
	0,2	1	1038090	574990	0,5539				
	0,4	1	989630	741080	0,7488	0,7343	0,0145	1,98	91,07
	0,4	1	1103690	794460	0,7198				
	0,6	1	1110460	1038830	0,9355	0,9487	0,0132	1,39	90,54
	0,6	1	1061870	1021370	0,9619				
	0,8	1	995470	1092640	1,0976	1,0946	0,0030	0,27	84,90
	0,8	1	1037820	1132910	1,0916				
	1,0	1	959160	1333800	1,3906	1,4283	0,0377	2,64	93,31
	1,0	1	867820	1272250	1,4660				
	1,2	1	985960	1493920	1,5152	1,5247	0,0095	0,62	86,04
	1,2	1	965110	1480720	1,5342				
	1,4	1	892580	1550410	1,7370	1,7765	0,0395	2,22	88,22
	1,4	1	895830	1626780	1,8159				
	1,6	1	835170	1688600	2,0219	1,9716	0,0502	2,55	87,43
1,6	1	846310	1626080	1,9214					
1,8	1	836220	1891110	2,2615	2,2921	0,0306	1,34	91,81	
1,8	1	678050	1574920	2,3227					
2,0	1	760350	1886030	2,4805	2,4420	0,0384	1,57	89,19	
2,0	1	621750	1494430	2,4036					
5	0,0	1	1237280	324290	0,2621	0,2519	0,0102	4,04	
	0,0	1	1312510	317260	0,2417				
	0,2	1	1312030	755230	0,5756	0,4884	0,0872	17,86	99,00
	0,2	1	1659970	665960	0,4012				
	0,4	1	1517760	1091970	0,7195	0,6561	0,0634	9,66	89,29
	0,4	1	1256690	744830	0,5927				
	0,6	1	1329880	1105210	0,8311	0,8341	0,0031	0,37	85,45
	0,6	1	1268200	1061750	0,8372				
	0,8	1	1304620	1423340	1,0910	1,1310	0,0400	3,53	92,88
	0,8	1	1193050	1397000	1,1709				
	1,0	1	1196960	1538870	1,2856	1,3491	0,0635	4,71	92,46
	1,0	1	1050720	1484280	1,4126				
	1,2	1	1108280	1701440	1,5352	1,6273	0,0921	5,66	95,69
	1,2	1	1008160	1733420	1,7194				
	1,4	1	965440	1772490	1,8359	1,8331	0,0028	0,16	94,39
	1,4	1	1001510	1833010	1,8302				
	1,6	1	934630	1884730	2,0166	1,9991	0,0175	0,87	91,56
1,6	1	919250	1821630	1,9816					
1,8	1	841080	1902760	2,2623	2,2801	0,0178	0,78	94,03	
1,8	1	771010	1771710	2,2979					
2,0	1	790450	1891820	2,3933	2,4522	0,0588	2,40	91,97	
2,0	1	689200	1730570	2,5110					

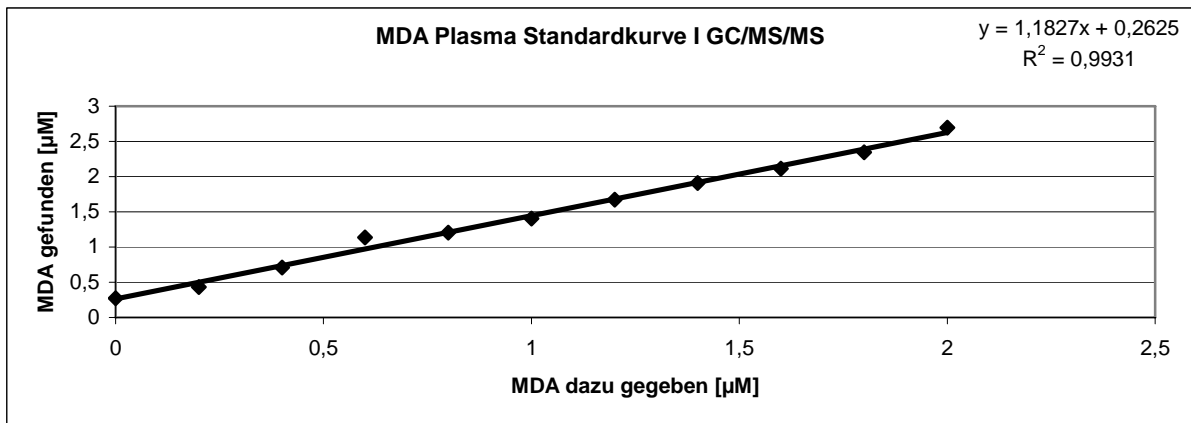


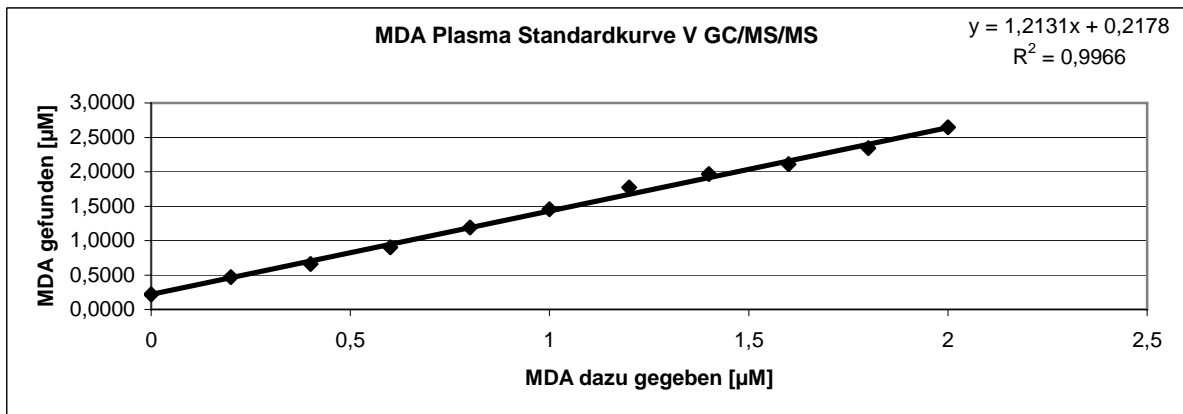
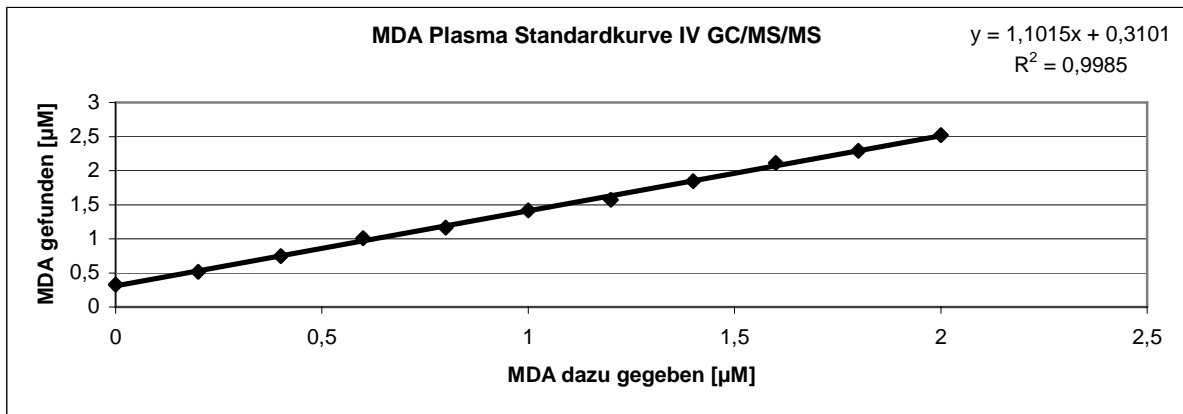
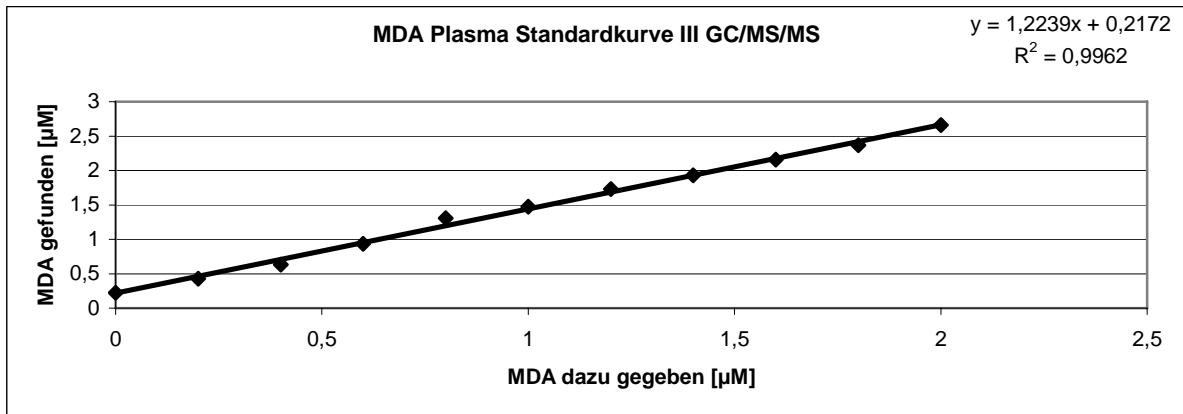
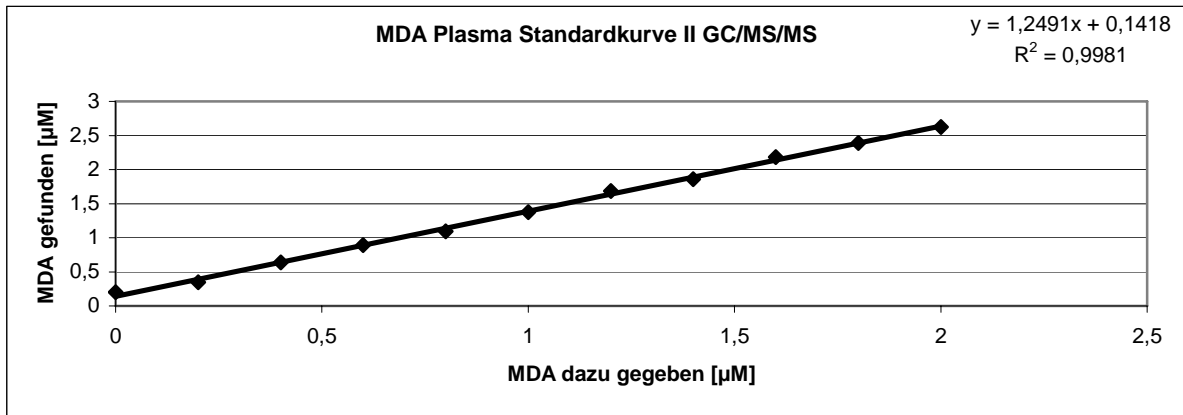


7.20.2. Standardkurven zur Methodenvalidierung mittels GC/MS/MS

Standardkurve	hinzugegebene Konzentration IS [µM]	Konzentration MDA-d2 [µM]	Fläche MDA-d2	Fläche MDA-d0	gefundene Konzentration MDA-d0 [µM]	Mittelwert [µM]	STABWVN [µM]	Variationskoeffizient [%]	Wiederfindungsrate [%]
1	0,0	1	24962292	7346003	0,2943	0,2723	0,0311	11,42	
	0,0	1	24689817	6180478	0,2503				
	0,2	1	21526358	9660428	0,4488	0,4310	0,0251	5,82	83,90
	0,2	1	17939530	7413885	0,4133				
	0,4	1	20765378	14602324	0,7032	0,7085	0,0075	1,06	93,82
	0,4	1	21074957	15044023	0,7138				
	0,6	1	14410862	19017577	1,3197	1,1365	0,2591	22,80	114,03
	0,6	1	19167687	18272313	0,9533				
	0,8	1	13876592	17181298	1,2381	1,2044	0,0478	3,97	97,28
	0,8	1	20252784	23707714	1,1706				
	1,0	1	9376746	12950800	1,3812	1,4030	0,0308	2,20	94,82
	1,0	1	14695302	20937100	1,4247				
	1,2	1	16011810	27549136	1,7206	1,6734	0,0667	3,99	97,24
	1,2	1	14940135	24295400	1,6262				
	1,4	1	15471606	29678326	1,9182	1,9107	0,0106	0,56	97,37
	1,4	1	12973020	24690598	1,9032				
	1,6	1	10767908	22715169	2,1095	2,1123	0,0039	0,18	95,85
	1,6	1	14731497	31157869	2,1151				
	1,8	1	12618351	29651183	2,3498	2,3471	0,0039	0,16	95,98
	1,8	1	14170465	33221225	2,3444				
2,0	1	13905321	36580101	2,6307	2,6975	0,0946	3,51	100,40	
2,0	1	14211363	39285619	2,7644					
2	0,0	1	17527672	3401637	0,1941	0,2003	0,0088	4,40	
	0,0	1	14690635	3034239	0,2065				
	0,2	1	13167239	5291079	0,4018	0,3457	0,0794	22,96	78,26
	0,2	1	13190179	3819384	0,2896				
	0,4	1	13964014	8969148	0,6423	0,6367	0,0079	1,25	93,20
	0,4	1	11967296	7552364	0,6311				
	0,6	1	11019699	10050492	0,9120	0,8942	0,0253	2,82	96,70
	0,6	1	11005384	9644366	0,8763				
	0,8	1	10065325	10969402	1,0898	1,0956	0,0082	0,75	93,96
	0,8	1	9529164	10495873	1,1014				
	1,0	1	10513948	14402473	1,3698	1,3778	0,0112	0,81	97,89
	1,0	1	10566415	14642054	1,3857				
	1,2	1	7389320	12509671	1,6929	1,6862	0,0096	0,57	102,26
	1,2	1	8129599	13652786	1,6794				
	1,4	1	8565159	15327926	1,7896	1,8607	0,1006	5,40	98,43
	1,4	1	9232241	17834620	1,9318				
	1,6	1	8392574	18318874	2,1827	2,1841	0,0019	0,09	102,45
	1,6	1	8634249	18869878	2,1855				
	1,8	1	9005970	21651027	2,4041	2,3914	0,0180	0,75	100,76
	1,8	1	10805400	25702570	2,3787				
2,0	1	9403660	24385730	2,5932	2,6265	0,0470	1,79	100,45	
2,0	1	5752179	15299256	2,6597					
3	0,0	1	27789012	6587710	0,2371	0,2231	0,0197	8,85	
	0,0	1	35300088	7382714	0,2091				
	0,2	1	27005598	10799755	0,3999	0,4286	0,0406	9,46	92,26
	0,2	1	24856276	11365737	0,4573				
	0,4	1	27651966	16997064	0,6147	0,6341	0,0275	4,34	89,82
	0,4	1	24614612	16088515	0,6536				
	0,6	1	26404397	24702357	0,9355	0,9365	0,0013	0,14	98,84
	0,6	1	23948187	22448984	0,9374				
	0,8	1	21800195	30348908	1,3921	1,3055	0,1226	9,39	109,81
	0,8	1	23850953	29069240	1,2188				
	1,0	1	21292440	30755495	1,4444	1,4763	0,0451	3,06	103,21
	1,0	1	20888272	31504189	1,5082				
	1,2	1	23267409	39981871	1,7184	1,7321	0,0194	1,12	103,61
	1,2	1	21215271	37037187	1,7458				
	1,4	1	21149081	40325073	1,9067	1,9316	0,0352	1,82	100,96
	1,4	1	19283240	37726921	1,9565				
	1,6	1	16781776	36795450	2,1926	2,1562	0,0515	2,39	100,07
	1,6	1	17954057	38057539	2,1197				
	1,8	1	20678512	49106746	2,3748	2,3696	0,0073	0,31	98,89
	1,8	1	18621029	44028174	2,3644				
2,0	1	26775896	71205296	2,6593	2,6589	0,0005	0,02	100,81	
2,0	1	13423861	35688458	2,6586					

Standardkurve	hinzugegebene Konzentration IS [µM]	Konzentration MDA-d2 [µM]	Fläche MDA-d2	Fläche MDA-d0	gefundene Konzentration MDA-d0 [µM]	Mittelwert [µM]	STABWV [µM]	Variationskoeffizient [%]	Wiederfindungsrate [%]
4	0,0	1	25884121	8504910	0,3286	0,3305	0,0027	0,82	
	0,0	1	25623513	8517309	0,3324				
	0,2	1	24078364	12478354	0,5182	0,5163	0,0028	0,54	90,26
	0,2	1	23534408	12102971	0,5143				
	0,4	1	22327751	16662580	0,7463	0,7468	0,0008	0,11	91,82
	0,4	1	23075136	17246550	0,7474				
	0,6	1	23166112	23611897	1,0192	1,0086	0,0151	1,50	95,61
	0,6	1	22694060	22646832	0,9979				
	0,8	1	21847102	25777863	1,1799	1,1658	0,0199	1,71	89,93
	0,8	1	22209520	25579216	1,1517				
	1,0	1	19188327	27466929	1,4314	1,4157	0,0223	1,57	92,07
	1,0	1	16893408	23650100	1,4000				
	1,2	1	17242614	27473286	1,5933	1,5736	0,0279	1,77	88,45
	1,2	1	19224723	29873574	1,5539				
	1,4	1	16803774	30838032	1,8352	1,8436	0,0119	0,65	91,24
	1,4	1	18475435	34216884	1,8520				
	1,6	1	16829607	35699886	2,1213	2,1138	0,0106	0,50	93,45
	1,6	1	15339006	32307987	2,1063				
	1,8	1	14973328	34404488	2,2977	2,2923	0,0076	0,33	91,57
	1,8	1	11658125	26661769	2,2870				
2,0	1	14002998	35296737	2,5207	2,5203	0,0005	0,02	91,82	
2,0	1	13378465	33713838	2,5200					
5	0,0	1	17069246	3889458	0,2279	0,2187	0,0130	5,93	
	0,0	1	15159819	3176455	0,2095				
	0,2	1	20716901	11693862	0,5645	0,4702	0,1333	28,35	102,19
	0,2	1	23166706	8709206	0,3759				
	0,4	1	17482830	12470819	0,7133	0,6609	0,0741	11,22	94,20
	0,4	1	15045389	9154452	0,6085				
	0,6	1	16089187	14541536	0,9038	0,9041	0,0005	0,05	95,88
	0,6	1	15115707	13671466	0,9045				
	0,8	1	15916790	19070001	1,1981	1,1909	0,0102	0,85	100,54
	0,8	1	15157889	17942944	1,1837				
	1,0	1	13140921	18894492	1,4378	1,4537	0,0224	1,54	101,94
	1,0	1	13026342	19142657	1,4695				
	1,2	1	16284703	27064633	1,6620	1,7729	0,1569	8,85	106,33
	1,2	1	14883070	28038583	1,8839				
	1,4	1	14959356	30251223	2,0222	1,9672	0,0779	3,96	103,06
	1,4	1	15615796	29858830	1,9121				
	1,6	1	14719567	31270063	2,1244	2,1135	0,0154	0,73	98,29
	1,6	1	14498869	30486119	2,1027				
	1,8	1	13728816	32236087	2,3481	2,3426	0,0078	0,33	97,95
	1,8	1	12630999	29519724	2,3371				
2,0	1	12080151	31965972	2,6462	2,6454	0,0010	0,04	100,47	
2,0	1	12119319	32051651	2,6447					





Lebenslauf

Angaben zur Person

Sabine Rothmann

Geburtsdatum: 31.10.1976

Geburtsort: Aachen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1983 – 1987

Grundschule V IV Burgdorf

1987 – 1989

Orientierungsstufe Burgdorf

1989 – 1990

Gymnasium Burgdorf

1990 – 1991

Doha College, Doha, Qatar

1992 – 1993

Cults Academy, Aberdeen, Schottland

1993 – 1996

Gymnasium Lehrte

Abitur Mai 1996

Studium

1996 – 2001

TU Braunschweig

Studium der Pharmazie

Approbation Juli 2002

Praktische Ausbildung

Juli 2001 – November 2001

University of Otago, Dunedin, Neuseeland

Postgraduate Certificate of Pharmacy

Dezember 2001 – Mai 2002

Apotheke im Gesundheitszentrum, Burgdorf

Beruf

Juni 2002 – Dezember 2005

Medizinische Hochschule Hannover

Wissenschaftliche Angestellte

Beratungstätigkeit ATIS

seit Januar 2006

Solvay Pharmaceuticals, Hannover

Januar 2006 – März 2007 Medical Writer

April 2007 – Juni 2009 Safety Evaluation Manager

seit Juli 2009 Head Medical Writing

Burgdorf, den 09.09.2009

**Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 7 und 8 der Promotionsordnung der MHH
für die Verleihung des Grades Doktor der Humanbiologie**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte
Dissertation mit dem Titel:

**Pilotstudie zur Wirkung von L-Arginin bei Patienten mit koronarer
Herzkrankheit nach Angioplastie und
Methoden-Entwicklung zur Bestimmung von MDA in Plasma als PFB-
Derivat**

im Institut für Klinische Pharmakologie
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J. Jordan
und unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J.C. Frölich
und Herrn PD Dr. rer. nat. D. Tsikas

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die
dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen
Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder
eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden als Abstract in folgendem Publikationsorgan
veröffentlicht:

Rothmann S., Lachmuth JY, Reil GH, Klein HU, Frölich JC. L-Arginine treatment in patients
with coronary artery disease undergoing ballon angioplasty – study protocol. *Eur J Clin
Pharmacol* 2006;62(Suppl 1):171,A38

Burgdorf, den 09.09.2009