

**Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ein  
neuer Marker zur Abschätzung der  
kardiovaskulären Gesundheit**

Dissertationsschrift zur Erlangung des Akademischen Grades

Doktor der Medizinischen Wissenschaft

Eingereicht an der Medizinischen Universität Graz

im Juli 2009 von

Mag. Andreas Meinitzer

Durchgeführt am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik

des Universitätsklinikums Graz

in der Zeit von Jänner 2006 bis Dezember 2008

Herzlichen Dank

Univ. Prof. Dr. Wínfried März, unserem Institutsvorstand. Er hat mich an dieses Thema herangeführt. Sein Wissen und seine Kompetenz haben Vorbildwirkung.

Den VITAGE Studien Teams in Graz (A), Reus (E) und Clermont-Ferrand (F) sowie dem LURIC Team in Freiburg (D) für die Probanden bzw. Patientenbetreuung und die Proben- und Datenadministration. Dem Laborpersonal der Krankenhäuser Graz, Ludwigshafen (D), Freiburg (D) und Ulm (D) sowie allen Probanden und Patienten für die Teilnahme an den Studien.

Univ. Prof. Brigitte Winklhofer-Roob, Univ. Prof. Peter Rehak, Priv. Doz. Hubert Scharnagl und Univ. Prof. Martie Truschnig für ihre wissenschaftlichen Beiträge und Anregungen, die zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Fr. Gabriele Gartner und Fr. Andrea Prattes, die mich tatkräftig im Labor unterstützten.

Der Leiterin des Laborbereichs 1 Dr. Mariana Stettin, den Kollegen Dipl. Ing. Markus Puchinger, Dr. Gerhard Höbarth und Dr. Stefan Pilz, die wertvolle Diskussionspartner waren.

Meiner Familie

Ganz speziell danke ich meiner Frau Ursula und meinen Kindern Sophie und Valerie für ihre Liebe und die Motivation in schwierigen Phasen. Ohne ihre Mithilfe und ihr Verständnis hätte ich meine Ziele nicht erreicht. Meiner Schwiegermutter Elisabeth für die Unterstützung und den anregenden Gedankenaustausch. Meinen Schwestern Anna und Elisabeth, die großes Interesse an meinem Studienfortgang zeigten.

Gewidmet meinen Eltern die sicher sehr stolz auf mich gewesen wären.

## Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist eine endogen produzierte Aminosäure, die das Enzym Stickoxid-Synthase inhibiert. Eine Erhöhung von ADMA in den Endothelzellen schränkt die Freisetzung des relaxierenden Signalmoleküls Stickstoffmonoxid ein und könnte damit die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen begünstigen. Als gut abgesichert gilt, dass ADMA in verschiedenen Krankheitsstadien von chronischer Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit (KHK) im Plasma kumuliert. ADMA ist sehr schwierig zu bestimmen, da es in sehr niedriger Konzentration und neben strukturell sehr ähnlichen Substanzen vorkommt. Für die Bestimmung von ADMA im Plasma wurde aus der Literatur eine chromatographische Methode übernommen und weiterentwickelt. Nach Evaluierung und Validierung nach internationalen Vorschriften wurde die Methode an eine gesunde Studienpopulation (VITAGE Studie mit 300 Probanden) und an eine Studienkohorte mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung (LURIC Studie mit 3300 Patienten) angewandt. Damit konnten erstmals altersabhängige Referenzwerte für ADMA erstellt werden und ADMA als Prognosefaktor für die kardiovaskuläre Mortalität und die Gesamtmortalität vorgestellt werden. Aus dieser Doktorarbeit sind drei wissenschaftliche Arbeiten entstanden bei denen der Doktorand Erstautor ist.<sup>1-3</sup> Weitere Artikel sind in Arbeit. Die wichtigsten Elemente der Publikationen wurden in dieser Dissertationsschrift neu zusammengefasst und mit einigen neuen Interpretationen dargestellt.

*(1) Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, März W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). Clin Chem. 2007 Feb;53(2):273-83*

*(2) Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. Clin Chim Acta. 2007 Sep;384(1-2):141-8.*

*(3) Meinitzer A und März W. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA): ein neuer Marker zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA): a new marker for evaluating cardiovascular risk J Lab Med 2007;31(3):125–134*

## Abstract

Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) is an endogenous amino acid that inhibits the enzyme nitric oxide synthase. High concentrations of ADMA in endothelial cells interfere with release of the vasodilator signalling molecule nitric oxide and may therefore facilitate the development of atherosclerotic lesions. It has been shown that ADMA accumulates in plasma in parallel with the progression of chronic renal failure, diabetes mellitus, hypertension and coronary artery disease. Determination of ADMA hence remains an analytical challenge because the concentration of ADMA in plasma is low, while a number of structurally similar compounds occur at much higher concentrations. For the measurement of ADMA in plasma a published chromatographic method was established and refined. After evaluation and validation in accordance to international guidelines the method was applied to a healthy study population (VITAGE Study with 300 subjects) and a study cohort with 3300 patients (LURIC Study) who had undergone coronary angiography. For the first time age dependent reference values were calculated and ADMA was identified as prognostic factor of cardiovascular mortality and total mortality. From this dissertation resulted three scientific articles<sup>1-3</sup> with the doctoral candidate as the first author. Scientific writing is ongoing. In this doctoral thesis the main parts of the published articles were summarized and presented with new interpretations.

(1) Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, März W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem*. 2007 Feb;53(2):273-83

(2) Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):141-8.

(3) Meinitzer A und März W. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA): ein neuer Marker zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA): a new marker for evaluating cardiovascular risk *J Lab Med* 2007;31(3):125–134

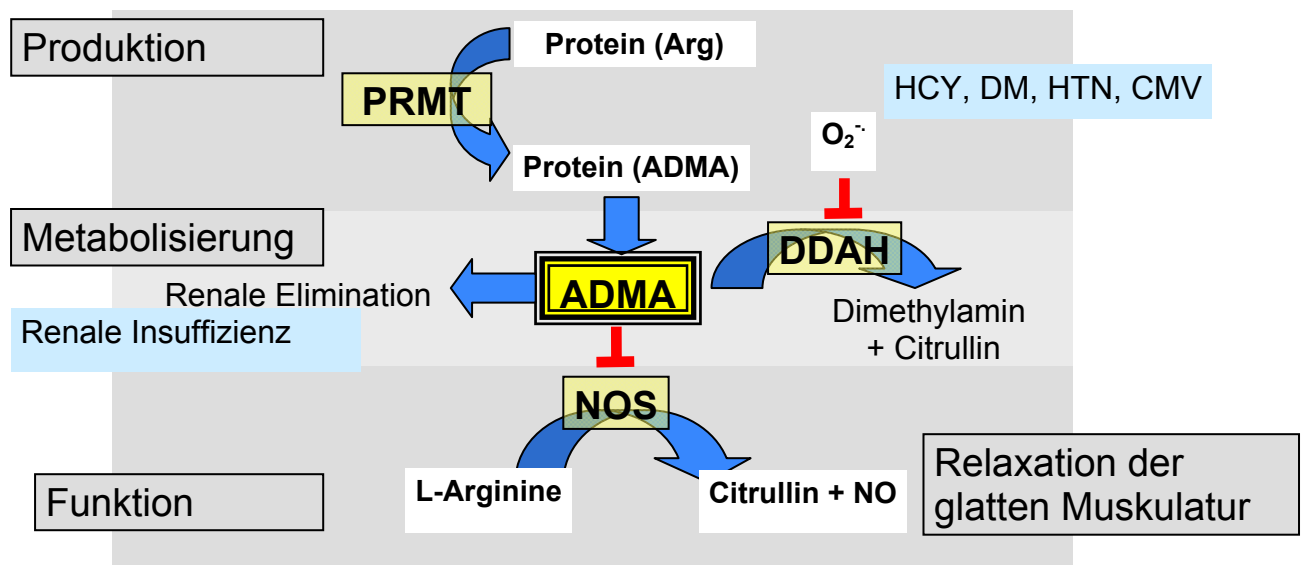
## Inhaltsangabe

1. Einführung .....	6
1.1. Funktion von Stickstoffmonoxid und ADMA .....	6
1.2. ADMA - ein Indikator für endotheliale Dysfunktion.....	8
2. Konzentrationsbestimmung von ADMA im Plasma .....	9
3. ADMA und die VITAGE Studie (Vitamin Status and Metabolism during Ageing Studie).....	12
3.1. ADMA und VITAGE - Methoden .....	12
3.2. ADMA und VITAGE - Resultate .....	13
4. ADMA und die LURIC Studie (Ludwigshafener Risiko- und kardiovaskuläre Gesundheitsstudie) .....	17
4.1. ADMA und LURIC - Methoden.....	17
4.2. ADMA und LURIC - Resultate.....	18
5. Beurteilungen von einzelnen ADMA Konzentrationen .....	23
6. Literatur .....	26
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	29
8. Anhang (original Arbeiten) .....	30

# 1. Einführung

## 1.1. Funktion von Stickstoffmonoxid und ADMA

Stickstoffmonoxid (NO) agiert bei der inter- und intrazellulären Kommunikation als Botenstoff und reguliert die Funktion von nahezu allen glattmuskulären Systemen wie Blutgefäße, Magen und Darm. Die Bildung des NO erfolgt durch die NO-Synthase (NOS) welche Arginin und Sauerstoff zu NO und Citrullin umsetzt (2). Für die Vasodilatation entscheidend ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Weitere NOS Isoformen finden sich in den Makrophagen (induzierbare NOS; iNOS) zur Zellabwehr und im peripheren und zentralen Nervensystem (neuronal NOS; nNOS) zur Signalübertragung. Im Jahr 1992 wurde von Patrick Vallance erstmals beschrieben, dass endogene Methylmodifikationen von Arginin die NO-Synthase hemmen. Als besonders effektive Inhibitoren für alle drei Isoformen haben sich NG-monomethyl- L-Arginin (NMMA) und NG1, NG1-Dimethylarginin (ADMA) herausgestellt. Das Strukturisomer NG1, NG2-Dimethylarginin (SDMA) ist wirkungslos (3). Alle drei Argininsubtypen (NMMA, ADMA, SDMA) sind endogen als Hydrolyseprodukte des Proteinumsatzes in verschiedenen Flüssigkeitskompartimenten in unterschiedlicher Konzentration vorhanden (Abb.1). ADMA ist im Plasma zehnfach höher konzentriert als NMMA. Deshalb wird angenommen, dass es ein höheres „Regulationspotential“ hat. Alle drei Methylarginine können im Urin nachgewiesen werden (4). Während für SDMA die renale Elimination den einzigen Abbauweg darstellt, spaltet das Enzym NG, NG-Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) ADMA und NMMA in Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin (5) (Abb. 1). Dieses Enzym wird in hoher Konzentration in der Leber, in der Niere, im Gehirn und in der Aorta gefunden. Die Inhibition der eNOS durch Methylarginine führt zu einer Störung der Vasodilatation, zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes und damit des Blutdrucks. Die endotheliale Dysfunktion infolge von NO-Mangel wird als frühes Stadium der Atherosklerose angesehen (6). Erhöhte Werte von ADMA in Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren sind bekannt bei Bluthochdruck (7), eingeschränkter Nierenfunktion (3, 8, 9), Diabetes (10), Insulinresistenz (11), Hypercholesterinämie (12), Hypertriglyceridämie (13), und Hyperhomocysteinämie (5).



**Abb. 1: Bildung, Metabolisierung und Funktion von ADMA im Organismus.**

Die Methylierung der proteingebundenen Argininreste wird von Proteinarginin N-Methyltransferasen (PRMT) katalysiert. Proteasen und Peptidasen setzen die methylierten Arginine ins Cytosol frei. Die Kinetik der Freisetzung ist vom Zelltyp und dessen Lebensdauer abhängig. Das Enzym NG, NG-Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) spaltet ADMA in Citrullin und Dimethylamin. Bei eingeschränkter DDAH Funktion steigt der ADMA Spiegel in der Zelle an und hemmt die Funktion der NO-Synthase bei der Umsetzung von Arginine in Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). Die Verminderung der NO Produktion verhindert die Relaxation der glatten Muskulatur. Eine Sulfhydrylgruppe an der aktiven Stelle des DDAH Enzyms ist verantwortlich für die Sensibilität auf Sauerstoffradikale. Dieser endotheliale oxidative Stress ist dokumentiert bei Hyperhomocysteinämie (HCY), Hypertonie (HTN), Diabetes Mellitus (DM) und viralen Infektionen (CMV). Intrazellulär nicht abgebautes ADMA gelangt über den kationischen Aminosäuretransporter aus der Zelle in das zirkulierende Blut und wird auch zu anderen Organen transportiert. Die DDAH der Leber baut etwa 30% des durchströmenden ADMA ab. Etwa 80% der täglich produzierten ADMA-Menge werden dadurch zu Citrullin umgebaut, der Rest wird über den Urin eliminiert. Bei eingeschränkter Nierenfunktion steigt der ADMA Spiegel im Blut.

## 1.2. ADMA - ein Indikator für endotheliale Dysfunktion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Pathophysiologische Untersuchungen zeigen, dass fehlendes Stickstoffmonoxid eine der Folgen der endothelialen Dysfunktion ist. Der Zusammenhang zwischen ADMA, Atherosklerose und kardiovaskulärem Risiko wurde in mehreren Studien untersucht. Als Bolus intravenös appliziertes ADMA (3 mg/kg) erhöhte in einer Studie bei gesunden Erwachsenen den systemischen Gefäßwiderstand (24%) und den arteriellen Blutdruck (6%) (3). Die Intima Media Dicke (IMT) der Arteria carotis als bedeutender prädiktiver Parameter zur Abschätzung des Herzinfarkt- und Schlaganfallrisikos zeigte in einer Studie an 116 gesunden Probanden, die ohne Symptome einer koronaren oder peripheren Gefäßerkrankung waren, einen starken Zusammenhang mit der ADMA-Konzentration (14). Die Indikatorfunktion von ADMA wird auch durch eine finnische prospektive Kohortenstudie an 150 Männern getragen, bei der Patienten mit ADMA-Konzentrationen in der höchsten Quartile ( $> 0,62 \mu\text{M}$ ) ein vierfach höheres Risiko für koronare Ereignisse hatten als Patienten in den niedrigeren Quartilen (15). In einer Studie an 1908 deutschen Patienten mit angiografisch gesicherter koronarer Herzerkrankung konnte ein 2,5-fach erhöhtes Risiko für koronare Ereignisse festgestellt werden, wenn die ADMA-Konzentration über  $0,70 \mu\text{M}$  betrug (16)

## 2. Konzentrationsbestimmung von ADMA im Plasma

ADMA liegt im Plasma in niedriger Konzentration und neben sehr viel höher konzentrierten, strukturell ähnlichen Substanzen vor. Die Bestimmung ist deshalb eine analytische Herausforderung. Die deutlichen Unterschiede zwischen den in der Literatur berichteten Mittelwerten für ADMA bei ähnlichen Patientenpopulationen weisen auf methodische Probleme bei der Analyse hin (17, 18, 19).

**Tab. 1:** ADMA Messungen bei gesunden Probanden. Die Messwerte differieren um mehr als eine Größenordnung.

<b>Autor/Jahr der Veröffentlichung</b>	<b>Methode</b>	<b>Gesunde Probanden (Anzahl n; Alter)</b>	<b>ADMA Mittelwert ± SD µmol/L</b>
Petterson 1997 (20)	OPA	n = 10; 40 ± 2 Jahre	0,58 ± 0,02
Boeger 2001 (21)	„	n = 10	1,39 ± 0,20
Paiva 2002 (22)	„	n= 47; 35 ± 4 Jahre	0,43 ± 0,12
Teerlink 2002 (23)	„	n= 42	0,43 ± 0,06
Kielstein 2003 (24)	„	n = 24; 25 ± 1 Jahre	1,30 ± 0,07
Kielstein 2003 (24)	„	n = 24; 69 ± 1Jahre	2,77 ± 0,12
Bae 2005 (25)	„	n = 48; 55 ± 7 Jahre	1,57 ± 0,85
Teerlink 2005 (26)	„	n = 726, 15- 75 Jahre	0,50 ± 0,06
Vishwanathan 2000 (27)	LC-Tandem MS	n = 20	0,12 ± 0,04
Tsikakos 2003 (28)	GC-Tandem MS	n = 12	0,39 ± 0,06
Albsmeier 2004 (29)	„	n = 10; 29,7±5,8 Jahre	0,60 ± 0,08
Martens-Lobenhoffer 2004 (30)	LC-Tandem MS	n = 15	0,45 ± 0,13
Schulze 2005 (31)	ELISA	n = 500;19-75 Jahre	0,69 ± 0,20 95 % 0,36-1,17
Martens-Lobenhoffer 2006 (17)	LC-Tandem MS	n = 47; 20-56 Jahre	0,355 ± 0,066
Meinitzer 2007 (32)	OPA	n = 295, 20-75 Jahre	0,60 ± 0,08

Die unterschiedlichen Messungen bei gesunden Probanden sind in Tabelle 1 angeführt. Aus diesem Grund wurde dem Aufbau der Analytik besonderer Raum gewidmet. Die chromatographische Methode nach Teerlink (23) wurde modifiziert und hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit nach internationalen Richtlinien (33), evaluiert und validiert.

**Tab. 2:** Leistungskenndaten der ADMA Methode

Arbeitsbereich [ $\mu\text{M}$ ]	0,1 – 1,25	
Kalibrationskurve		
Steigung	26,9	
Abschnitt	0,007	
Korrelationskoeffizient $r^2$	0,999	
SD über die Regressionslinie	0,02	
Präzision in der Serie n = 6	C1	C2
Mittelwert $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	0,77 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01
Variationskoeffizient	1,4	2,1
Präzision von Tag zu Tag n = 20		
Mittelwert $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	0,77 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,02
Variationskoeffizient	3,1	3,1
Stabilität in der Matrix	2 Tage	
Richtigkeit		
Vergleich zweier Kontrollproben (n = 5) bestimmt mit zwei unabhängigen Kalibrationen	C1	C2
Mittelwert 1 [ $\mu\text{M}$ ]	0,77	0,58
Mittelwert 2 [ $\mu\text{M}$ ]	0,79	0,61
t-Test, Signifikanz Level 0,05	n.s.	n.s.
Recovery (mittlere Extraktionseffizienz) [%]	99,8	
Interner Standard 97,4%		
Bestimmungsgrenze (LOQ) $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	0,1 $\pm$ 0,004	
Variationskoeffizient [%]	3,3	
Detektionslimit (LOD) [ $\mu\text{M}$ ] grob abgeschätzt mit der 3fachen Standardabweichung des Basislinienrauschens	0,05	

Besonderes Augenmerk wurde auf die Richtigkeit, die Präzision, die Spezifität und Robustheit der Methode gelegt. Die erforderliche analytische Qualität wurde vor allem durch eine automatisierte Probenvorbereitung und die Wahl des richtigen internen Standards erreicht. Die Leistungsdaten der Methode sind in Tabelle 2 ersichtlich.

### Prinzip der Methode

ADMA wird gemeinsam mit anderen Arginin Metaboliten aus dem EDTA Plasma mittels Festphasenextraktion (Kationenaustauscher) extrahiert und mit o-Phtalaldehyd zu fluoreszierenden Verbindungen umgesetzt. Die chromatographische Auftrennung erfolgt isokratisch auf einer Reversed Phase Säule; die Detektion fluorometrisch. Die Leistungsdaten der Evaluierung sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Methodik wurde an einer gesunden Probandenkohorte im Alter von 20 bis 75 Jahren zur Ermittlung von Referenzwerten angewandt.

### **3. ADMA und die VITAGE Studie (Vitamin Status and Metabolism during Ageing Studie)**

Das übergeordnete Ziel des Vitage Projektes (34) war die Beantwortung der Frage, ob ältere Menschen einen im Vergleich mit jüngeren Personen veränderten Bedarf an den fettlöslichen Vitaminen A, E und Carotenoiden haben. Die damit verbundenen Fragen, ob der Prozess des Alterns den Versorgungszustand, den Stoffwechsel und die Funktionen dieser fettlöslichen Vitamine beeinflusst, sollten durch die Untersuchung von 300 gesunden Männern im Alter von 20 bis 75 Jahren aus drei europäischen Ländern beantwortet werden. Die freiwilligen Probanden wurden nach strengen Ausschlusskriterien in drei rekrutierenden europäischen Zentren, Centre Recherche Humaine Nutrition (CRHN), Institute Nationale de la Recherche Agronomique (INRA-Theix), Clermont-Ferrand (France), Lipid Research Unit, University of Reus (Spain) und im Institut für Molekulare Biologie, Biochemie und Mikrobiologie (IMBM), Karl-Franzens Universität Graz sowohl hinsichtlich ihrer Ernährung, dem klinischen Status und einer umfangreichen Kombination verschiedener biochemischer Parameter untersucht. Als Probanden waren gesunde, männliche, "nicht institutionalisierte" (Spital, Heime) Nichtraucher im Alter von 20 bis 75 Jahren, mit folgender Altersverteilung vorgesehen. 20 - 30 Jahre: 19 Probanden; 30 - 40 Jahre: 18 Probanden; 40 - 50 Jahre: 18 Probanden; 50 - 60 Jahre: 18 Probanden; 60 - 70 Jahre: 18 Probanden; 70 - 75 Jahre: 9 Probanden.

#### **3.1. ADMA und VITAGE - Methoden**

Die Studienpopulation der VITAGE Kohorte war für die Findung von ADMA Basiswerten sehr gut geeignet. ADMA zeigt eine hohe biologische Variation, (35) sodass die Auswahl der Probanden und die strenge Anwendung der Ein und Ausschlusskriterien der VITAGE Probanden wesentliche Voraussetzungen für valide Referenzwerte darstellten. Die Probanden durften während der letzten 6 Monate keiner Diät (vegetarisch, fettreduziert, Schlankheitskur etc.) unterliegen und keine Vitaminpräparate eingenommen haben. Volontäre mit chronischen Erkrankungen der

Lunge, Leber, Niere, Schilddrüse wurden ausgeschlossen. Weiters Probanden mit Herzinsuffizienz, Schlaganfall, Krebs, Diabetes, familiärer Cholesterinämie, instabiler Hypertonie, neurologischen Erkrankungen, Demenz, akuten und chronischen Infektionen, akuten und chronischen Entzündungen. Ebenso ausgeschlossen waren Personen, die unter Therapie mit folgenden Medikamenten standen: Cholesterinsenkende Medikamente, nichtsteroidale Antirheumatika, Diuretika, Beta Blocker, Antiepileptika, Kortikosteroide und Analgetika. Teilnahme an Wettkämpfen und Impfungen innerhalb der letzten 2 Monate waren Ausschlussgründe und auch Alkoholismus, Drogenabhängigkeit, Infektionen (HIV, Hepatitis C, Grippe) und entzündliche Erkrankungen. Eine positive anthropologische Bewertung gab es bei einem Body Mass Index (BMI) zwischen  $19 \text{ kg/m}^2$  und  $30 \text{ kg/m}^2$  für Probanden zwischen 20 und 65 Jahren, für Probanden zwischen 65 und 75 Jahren war ein BMI zwischen  $21$  und  $30 \text{ kg/m}^2$  erlaubt. Die klinische Prüfung und biochemische Evaluierung umfasste eine Reihe von klinisch-chemischen Variablen, die innerhalb eines definierten Bereichs liegen mussten. Innerhalb des Normalbereichs: Albumin, C-reaktives Protein; innerhalb einer 10 %igen Toleranz des Normalbereichs: Glukose, WBC, RBC, Thrombozythen, TSH oder innerhalb einer 50%igen Toleranz des Normalbereichs für ALAT, ASAT, GGT, Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure. Die strengen Auswahlkriterien wurden vom SENIEUR (36) Protokoll übernommen, das Effekte des nicht pathologischen Alterns berücksichtigt. Das Studienprotokoll wurde bei allen Ethikkomitees der drei involvierten Zentren genehmigt.

Die Blutentnahme bei den rund 300 Probanden erfolgte morgens nach einer 12 stündigen Nahrungskarenz in EDTA präparierten Monvetten. Nach Zentrifugation wurde das Plasma abgehoben und portioniert bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Analyse gelagert

### **3.2. ADMA und VITAGE - Resultate**

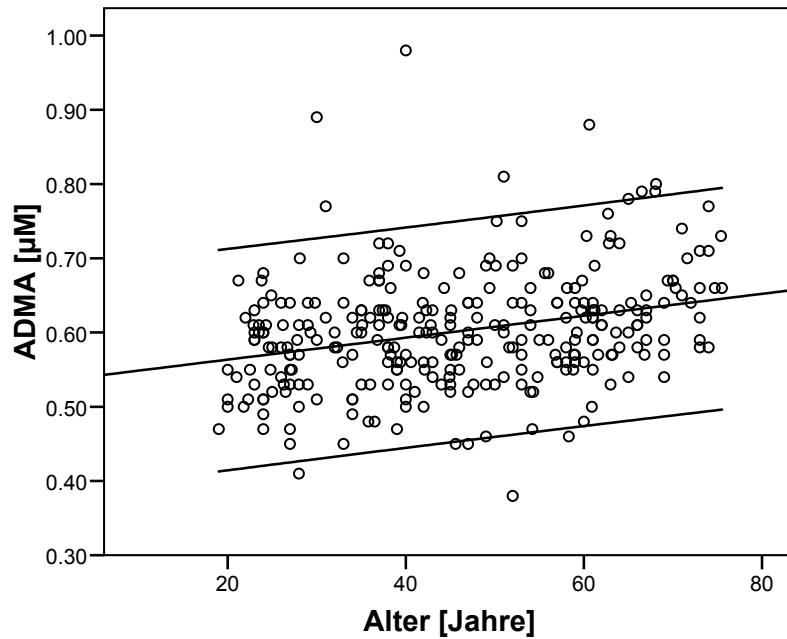
Die Ermittlung der Referenzwerte erfolgte in Übereinstimmung mit der NCCLS Guideline C28-A2 (37) zur Findung von Referenzwertintervallen in der klinischen Chemie und in Anlehnung an die Empfehlungen von Solberg und Royston (38). Die Daten wurden mit den Statistikprogrammen SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und NCCS (Kaysville, Utah; USA) ausgewertet. Die Überprüfung der Normalwertverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov–Smirnov Test. Die Probanden

wurde in 4 Altersgruppen eingeteilt: Gruppe 1: unter 35 Jahre; Gruppe 2: Alter zwischen 35–49 Jahre; Gruppe 3: Alter zwischen 50–64 Jahre; Gruppe 4: über 65 Jahre. Da keine Normalverteilung vorlag, wurden die Berechnungen der Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallistest durchgeführt. Dieser zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Als Referenzwert gilt jener Bereich in dem 95% aller Gesunden zu finden sind. Der untere und obere Bereich ist mit den 2,5% bzw. 97,5% Perzentile definiert. Das heißt 2,5% aller Gesunden können einen zu hohen und 2,5% aller Gesunden einen zu niedrigen Wert aufweisen. In Tabelle 1 sind die Unterschiede der Altersgruppen im Detail und die Grenz - Perzentilen dargestellt.

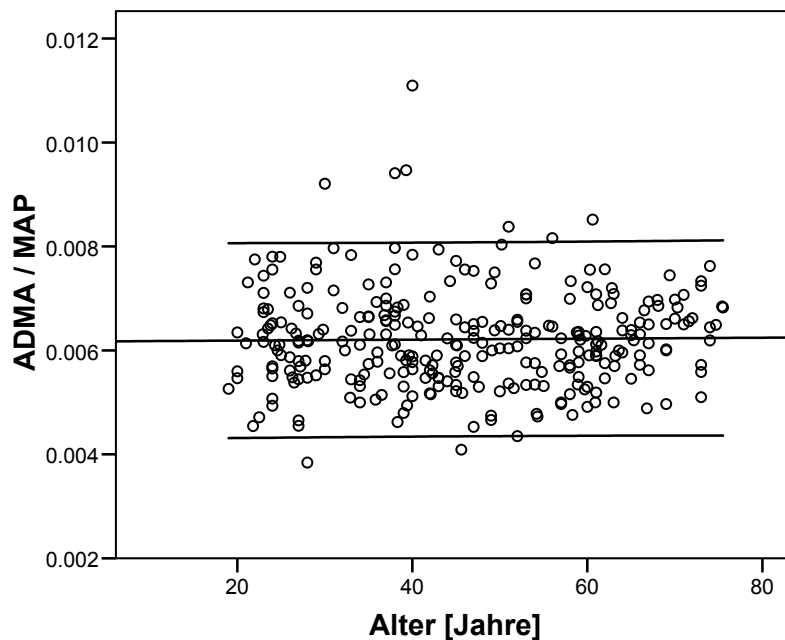
**Tab. 3:** Referenzbereiche von ADMA. \*signifikanter Unterschied der Mediane im Vergleich zur Gruppe 1 und 2

Gruppe		1	2	3	4
Alter [a], MW ± SD		26.7 ± 4.0	41.6 ± 4.0	57.5 ± 4.2	69.6 ± 3.3
Anzahl n,		78	93	82	39
Alter [a]	Percentile	<35.0	35.1-50.0	50.1-65.0	>65.1
ADMA	<b>2.5</b>	<b>0.43</b>	<b>0.45</b>	<b>0.46</b>	<b>0.54</b>
[µM]	50.0	0.58	0.59	0.61*	0.64*
	<b>97.5</b>	<b>0.69</b>	<b>0.73</b>	<b>0.78</b>	<b>0.79</b>

Die Darstellung im Streudiagramm (Abb. 2) ermöglicht den Verlauf der Steigerung bei zunehmendem Alter zu erkennen. Die Korrelation des Blutdrucks mit ADMA ist in mehreren Studien gezeigt worden, insbesondere bei Personengruppen bei denen keine kardiovaskulären Auffälligkeiten nachzuweisen waren. (7, 14, 22, 39, 40) Diese Abhängigkeit ist auch in der vorliegenden Studie zu erkennen. Bei Berechnung der Ratio zwischen ADMA und dem mittleren arteriellen Blutdruck ( $MAP = DIA + (SYS - DIA) / 3$ ) und anschließender Korrelation mit dem Alter wird ersichtlich, dass zwischen ADMA und Alter keine Abhängigkeit mehr zu erkennen ist (Abb. 3).



**Abb 2:** Streudiagramm zur Darstellung des altersabhängigen Verlaufs von ADMA inklusive des 95%igen Konfidenzintervalls.  $y$  (ADMA) =  $0.538 + (0.00148 * \text{age})$ ,  
 $r = 0.28$ ,  $p < 0.001$



**Abb 3:** Streudiagramm zur Darstellung des altersabhängigen Verlaufs von ADMA unter Berücksichtigung des Blutdrucks inklusive des 95%igen Konfidenzintervalls. Es ist keine Signifikanz erkennbar. (ADMA / MAP ist das Verhältnis von ADMA zum mittleren arteriellen Blutdruck)

Das Ausschlußkriterium des Blutdrucks für die VITAGE Probanden wurde definiert als die 90% Perzentile der Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II) Studie (41). Das bedeutete für die Altersgruppen von 35 bis 44 einen Grenzwert von 146,3 mm Hg, für die Altersgruppe von 45 bis 54 einen Grenzwert von 157,4 mm Hg, für 55 bis 64 jährige 157,4 mm Hg und für 65 bis 74 jährige 177 mm Hg, um nicht mehr in die Studie aufgenommen zu werden. Diese Werte sind deutlich über den Wert der WHO Definition der Hypertonie (einer oder beide Werte des systolischen bzw. diastolischen Blutdrucks  $>140$  bzw.  $> 90$ ) die keinen Altersverlauf beschreibt. Dies erlaubte die Aufnahme von Patienten in die Studie, die frei von Krankheiten waren, aber einen altersentsprechenden Blutdruck aufwiesen. So konnten Referenzwerte für eine generelle Anwendbarkeit an eine gesunde Population gewonnen werden. Wurden die Blutdruckwerte in die Berechnung der Referenzwerte berücksichtigt, konnten keine altersabhängigen Unterschiede mehr erkannt werden.

## **4. ADMA und die Ludwigshafener Risiko- und kardiovaskuläre Gesundheitsstudie (LURIC)**

Die Hinweise auf einen Zusammenhang von ADMA mit koronaren Ereignissen waren Auslöser für die Bestimmung von ADMA in der LURIC Studie. Ziel der LURIC Studie ist es, bislang unbekannte klinische, biochemische und genetische Faktoren zu identifizieren, die das individuelle Risiko für Herz- und Gefäßerkrankungen bestimmen, und damit sowohl die Grundlage für eine wirksame Prävention zu legen als auch die medizinische Behandlung der verschiedenen Krankheitsbilder zu verbessern.

### **4.1. ADMA und LURIC - Methoden**

Im Zeitraum von 1997 bis 2002 am Herzzentrum des Klinikums der Stadt Ludwigshafen wurden 3.808 Patienten (2.660 Männer und 1.148 Frauen) für die Teilnahme an der LURIC-Studie ausgewählt. Die Studienteilnehmer waren Patienten, bei denen eine Koronarangiographie bereits vorlag oder die Notwendigkeit dieser Untersuchung bestand. Um genetische Heterogenität zu vermeiden, mussten sie deutscher Abstammung sein. Weitere Einschlusskriterien waren: klinische Stabilität, d.h. es durften außer einem „akuten Koronarsyndrom“ keine anderen akuten oder chronischen Krankheiten vorliegen und schriftliche Einwilligung in die Teilnahme der Studie. Unmittelbar nach Einschluss in die Studie wurden eine Erhebung der Krankengeschichte mittels standardisiertem Fragebogen, eine körperliche Untersuchung, ein Glukosetoleranztest bei bisher nicht bekanntem Diabetes mellitus und die Entnahme einer Blutprobe vorgenommen. Die Blutproben wurden nach Entnahme portioniert und bei -80°C eingefroren. Seit dieser Zeit werden aus diesen Proben biochemische Parameter analysiert, bei denen ein möglicher Zusammenhang mit der kardiovaskulären Gesundheit vermutet wird.

Die Beobachtung der weiteren gesundheitlichen Entwicklung der Studienteilnehmer erfolgte über die Nachsorge die seit 2004 in Gange ist. Mit Hilfe der örtlichen Meldeämter wurde der Vitalstatus der Studienteilnehmer erhoben, d. h. welche

Studienteilnehmer leben noch und wo sind sie gemeldet. Auf Grund der Meldeamtsrecherche konnten die Todesbescheinigungen und die Todesursachen der bereits verstorbenen Studienteilnehmer ermittelt werden. Diese Erhebungen brachten die Voraussetzung für die statistische Auswertung von ADMA in Verbindung mit der Mortalität.

In 3238 von insgesamt 3808 Patientenproben der LURIC Studie wurde ADMA im EDTA Plasma analysiert. Die erhaltenen ADMA Ergebnisse wurden mit der Mortalität nach Todesursachen, den anthropologischen Merkmalen Geschlecht, Alter, Bodymass Index und Rauchen, den biochemischen Parametern LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, C-reaktives Protein, Fibrinogen, glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Homocystein und den klinischen Diagnosen Diabetes, Bluthochdruck (>140/>90) und koronarer Herzkrankheit (KHK) statistisch verknüpft. Als KHK positiv wurde gewertet, wenn in einem von 15 Arterienabschnitten eine mindestens 20%ige Verengung festgestellt wurde.

Zur sinnvollen statistischen Auswertung wurden die kontinuierlichen Variablen in Quartilen umgewandelt. Um Referenzbereichsüberschreitungen zu berücksichtigen wurden als Quartilabgrenzungen die Daten der Patienten ohne KHK herangezogen. Triglycerid - und CRP Werte wurden logarithmisch transformiert. Mittels Varianzanalyse unter Berücksichtigung der angegebenen Kovariablen (Analysis of Covariance - ANCOVA) untersuchten wir den Effekt von ADMA auf Geschlecht, Alter, KHK, kardiovaskuläre Risikofaktoren und Medikamente. Zur Ermittlung des Zusammenhangs von ADMA und Mortalität verwendeten wir das proportionale Hazardmodell nach Cox. Der Einfluss von Geschlecht, Alter, KHK, kardiovaskulären Risikofaktoren und Medikamenten wurde in mehreren Modellen berücksichtigt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Kaplan Meier Graph. Alle statistischen Tests waren 2-seitig; Signifikanz war gegeben bei  $p < 0,05$ . Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ausgewertet.

#### **4.2. ADMA und LURIC - Resultate**

Von den 3238 Patienten hatten 695 nur sehr geringfügig ausgeprägte Koronarstenosen (KHK negativ). Die restlichen 2543 Patienten mit mindestens einer Stenose über 20% wurden nach dem Friesinger Score eingeteilt. Wir konnten keine Beziehung zwischen ADMA und der Ausprägung der Koronarmorphologie finden.

Damit sind hohe ADMA-Konzentrationen eher für die Ausbildung akuter atherothrombotischer Ereignisse als für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen verantwortlich. ADMA war signifikant mit folgenden Variablen assoziiert (geordnet in der Reihenfolge abnehmender Assoziation): glomeruläre Filtrationsrate (GFR) > Homocystein > Alter > C-reaktives Protein > Geschlecht > Triglyzeride > Rauchen > Diabetes mellitus. Kein Zusammenhang konnte zwischen koronarer Erkrankung, arterieller Hypertonie und LDL-Cholesterin und Body-Mass-Index (BMI) festgestellt werden.

Wesentliche Erkenntnisse der LURIC-Studie bezüglich ADMA und Mortalität sind in Tabelle 4 (Hazard Ratio (HR) bezogen auf die Gesamtmortalität) und in Tabelle 5 (Hazard Ratio (HR) bezogen auf die kardiovaskuläre Mortalität) zusammengefasst. Gegenüber den Patienten in der ersten Quartile, die als Referenz dienen, haben Patienten in der zweiten Quartile ein um 12% bzw. 13%, in der dritten ein um 35 % bzw. 42 % und in der vierten Quartile ein um 87% bzw. 81% höheres Mortalitätsrisiko, allerdings wird der Effekt erst in der vierten Quartile statistisch signifikant. Die mittlere Erhöhung des Risikos ist 25% bzw. 23% pro Quartile und statistisch signifikant. Alle Risiko-Ratios in den Tabellen 4 und 5 sind bereits statistisch adjustiert für Alter, Geschlecht, KHK (ja/nein), BMI, Type 2 Diabetes, Hypertonie, Raucherstatus, LDL-C, HDL-C, Triglyzeride, CRP, Fibrinogen, GFR, Homocystein, Einnahme von ACE Inhibitoren, Antikoagulantien, Cholesterinsenker, und Diuretika.

**Tab. 4:** Hazard Ratio (HR) bezogen auf die Gesamtmortalität in Abhängigkeit von ADMA (LURIC-Studie). Die Daten wurden hinsichtlich der Kovariablen Alter, Geschlecht, KHK (ja/nein), BMI, Type 2 Diabetes, Hypertonie, Raucherstatus, LDL-C, HDL-C, Triglyzeride, CRP, Fibrinogen, GFR, Homocystein, Einnahme von ACE Inhibitoren, Antikoagulantien, Cholesterinsenker, und Diuretika statistisch adjustiert

ADMA (µM)	HR (95% CI)	P
Alle Patienten (n=3238)		
1. Quartile (<0,720)	1,0 Referenz	
2. Quartile (0,721–0,800)	1,12 (0,83–1,52)	0,460
3. Quartile (0,801–0,890)	1,35 (1,01–1,81)	0,042
4. Quartile (≥0,891)	1,87 (1,43–2,44)	<0,001
per Quartile	1,25 (1,15–1,36)	<0,001

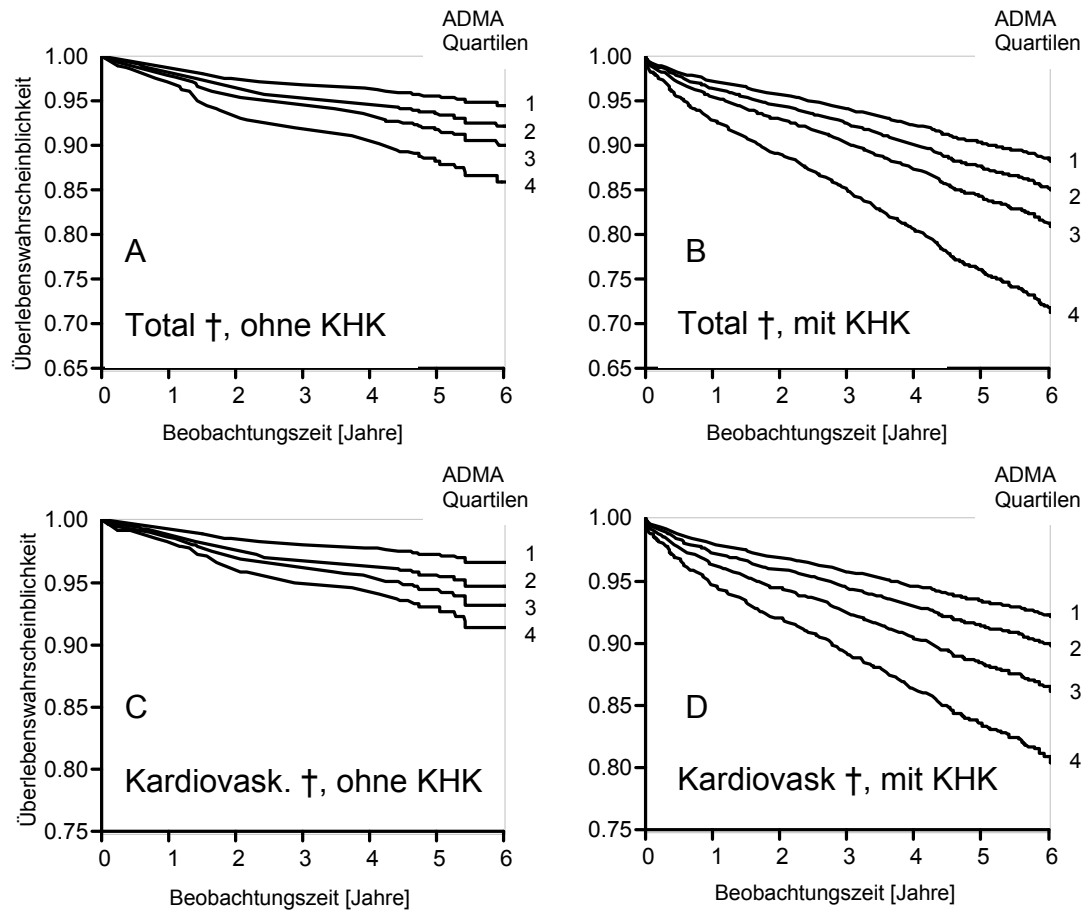
**Tab. 5:** Hazard Ratio (HR) bezogen auf die kardiovaskuläre Mortalität in Abhängigkeit von ADMA (LURIC-Studie). Die Daten wurden hinsichtlich der Kovariablen Alter, Geschlecht, KHK (ja/nein), BMI, Type 2 Diabetes, Hypertonie, Raucherstatus, LDL-C, HDL-C, Triglyceride, CRP, Fibrinogen, GFR, Homocystein, Einnahme von ACE Inhibitoren, Antikoagulantien, Cholesterinsenker, und Diuretika statistisch adjustiert

ADMA ( $\mu\text{M}$ )	HR (95% CI)	P
Alle Patienten (n=3238)		
1. Quartile (<0,720)	1,0 Referenz	
2. Quartile (0,721–0,800)	1,13 (0,78–1,63)	0,460
3. Quartile (0,801–0,890)	1,42 (1,00–2,02)	0,048
4. Quartile ( $\geq$ 0,891)	1,81 (1,31–2,51)	<0,001
per Quartile	1,23 (1,11–1,36)	<0,001

Die relativen Risikosteigerungen, die in der LURIC-Studie mit zunehmender ADMA-Konzentration beobachtet wurden, entsprechen etwa denjenigen, die bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gesehen werden (42, 43). Allerdings sind die absoluten Risiken, gemessen zum Beispiel an der Gesamtmortalität in der LURIC-Studie deutlich geringer. Die gewonnen Daten ergänzen und erweitern damit die Daten, die bei Dialysepatienten gewonnen wurden.

Durch die Art der Auswahl der Patienten war die Gesamt Sterblichkeit unserer Kohorte vor allem von kardiovaskulären Ursachen geprägt. Wir konnten allerdings eine starke Assoziation von ADMA mit nichtvaskulärer Sterblichkeit feststellen. Die Zahl der Fälle ohne kardiovaskulären Zusammenhang war sehr niedrig, sodass keine definitiven Aussagen getroffen werden konnten. Obwohl der Zusammenhang zwischen Mortalität und ADMA sehr klar erkennbar ist, ist ein kausaler Zusammenhang davon nicht abzuleiten. Wir fanden einige biochemische Marker, die mit ADMA korrelieren und die selbst die gefundenen Ergebnisse erklären könnten. Von den beeinflussenden Faktoren ist der Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate - GFR) besonderer Beachtung zu schenken, weil eine beeinträchtigte Nierenfunktion selbst einen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt und hohes ADMA lediglich eine Nierenfunktionsstörung anzeigen könnte. Das ADMA trotzdem eine hohe Aussagekraft besitzt, zeigte sich in den multivariablen Modellen, in denen wir die GFR, Medikamente und andere Einflußfaktoren als Kovariablen miteinbezogen.

## Kaplan Meier Kurven: Kumuliertes Überleben



**Abb. 4:** Überlebenskurven von Patienten mit (B und D) und ohne (A und C) angiographisch festgestellter KHK in Abhängigkeit von der ADMA Konzentration eingeteilt in Quartilen. Diagramme A und B beschreiben die Gesamtmortalität, C und D die kardiovaskuläre Mortalität. Hazard Ratios mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen sind in den Tabellen 4 und 5 ersichtlic.

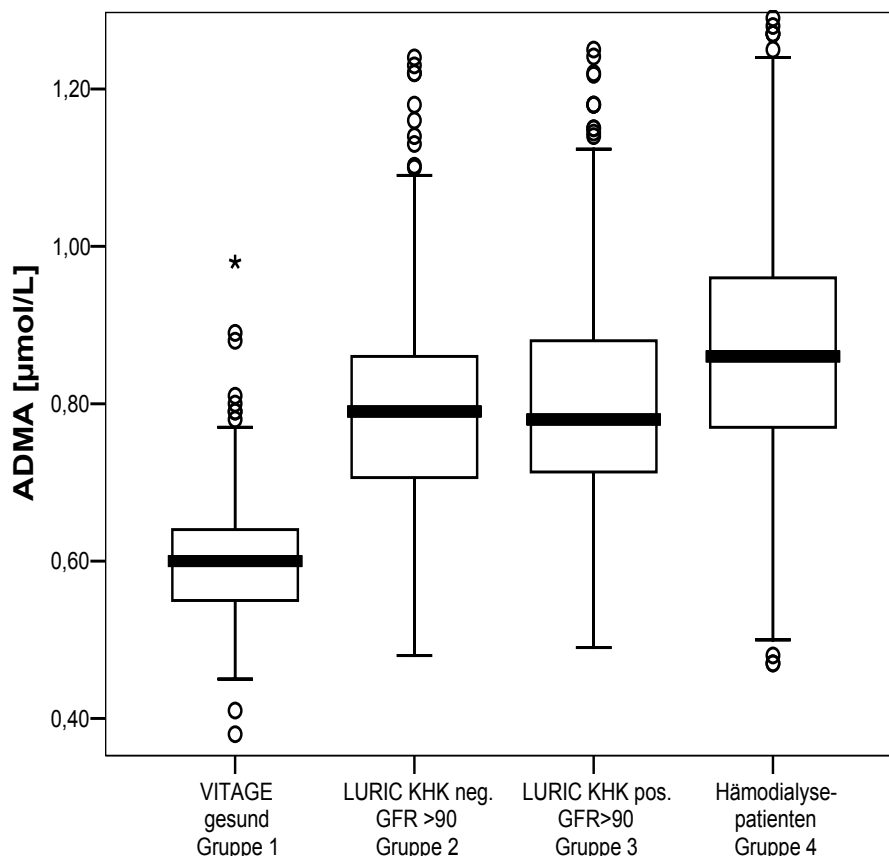
Unsere Studienbevölkerung setzte sich aus Personen kaukasischer Abstammung mittleren Alters und älter zusammen, sodass die Ergebnisse nicht auf Personen jüngeren Alters und anderen Ethnologien übertragen werden können. Die große Stärke der LURIC Studie ist die Definition des koronaren Status der durch die Feststellung mittels Angiographie als „Gold Standard“ bezeichnet werden kann. Dadurch wurde eine falsche Zuteilung zur Kontrollgruppe von asymptomatischen koronaren Arteriosklerosen, deren Prävalenz ab 50 Jahren sehr hoch ist, verhindert. Überraschend war, dass die 695 Patienten der Kontrollgruppe die ohne KHK klassifiziert waren ähnliche kardiovaskuläre Risikofaktoren hatten als vergleichsweise

die Gesamtpopulation. Beispielsweise ist die Prävalenz des Bluthochdrucks in dieser Gruppe sehr ähnlich mit der der Gesamtbevölkerung (44). Basierend auf den Studien der National Health and Nutrition Examination surveys 1999–2000 (45) war die Prävalenz von Diabetes mellitus 9.2% bzw. 19.3% bei Erwachsenen zwischen 40–59 bzw. mehr als 60 Jahren. Unter Berücksichtigung der dort angewandten Definition des Diabetes haben 12.1 % der Kontrollgruppe Diabetes. Dieser Anteil musste allerdings korrigiert werden. Nach genauerer Ermittlung des Krankheitsstatus mittels oralen Glukosebelastungstests stieg der Anteil auf 18% an.

ADMA zeigte in dieser Studie, der größten die bis jetzt durchgeführt wurde, seine Stärke als robuster Biomarker für die Vorhersage der Gesamtmortalität und der kardiovaskulären Mortalität. Die Hazard Ratios bei Personen ohne KHK ergaben zwar ähnliche Werte, sie erreichten aber durch die geringere Fallzahl keine statistische Signifikanz.

## 5. Beurteilungen von einzelnen ADMA Konzentrationen

Die großen Differenzen in der Literatur in Bezug auf die absoluten ADMA Konzentrationen (siehe Tab. 1) und die hohe Variabilität auch innerhalb homogener Gruppen (Abb. 2) lassen Rückschlüsse auf organspezifische Fehlfunktionen oder pathologische Zustände für einen einzelnen ADMA Wert nur schwer zu. Von der Höhe der Werte kann nach kritischer Betrachtung aller methodischen Details zusammenfassend gesagt werden, dass nur Ergebnisse berücksichtigt werden sollten, deren Methoden ADMA-Konzentrationen unter  $1 \mu\text{M}$  liefern. Unterschiede zwischen Patientengruppen ohne Nieren und Leberfunktionsstörungen sind meist sehr klein und können nur mit hochpräzisen Methoden ( $\text{VK} < 5\%$ ) oder großer Fallzahl erkannt werden. Eindeutige Unterschiede wurden bei Patienten gefunden die unterschiedliche glomeruläre Filtrationsrate aufwiesen. Gute Aussagen sind dann zu treffen wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, mit identem Analytiksystem verschiedene Studienpopulationen gemessen wurden. Werden die beiden Studien und weitere Messungen von definierten Patientenkohorten miteinander verglichen so können auffallend große Differenzen vor allem zwischen gesunden Probanden (die nicht aus institutionalisierten Systemen rekrutiert wurden), und Klinikpatienten festgestellt werden. Werden Patienten von der LURIC Studie, die laut Angiographie frei von KHK waren und deren GFR  $> 90 \text{ ml/min}$  lagen (Gruppe 2) mit den gesunden VITAGE Probanden (Gruppe 1) verglichen, so ist der Unterschied hochsignifikant ( $p < 0.001$ ). Diese Gruppe der LURIC Patienten hatte zwar keine angiographisch nachweisbare KHK, aber Symptome z.B. Brustschmerzen oder andere nichtinvasive Untersuchungsergebnisse die auf kardiovaskuläre Erkrankungen hindeuteten. Dies könnte den Eindruck erwecken dass ADMA ein möglicher Biomarker für unklare metabolische Prozesse ist, die kardiovaskuläre Ereignisse zur Folge haben. Die Patienten mit ausgeprägter KHK (Gruppe 3) zeigen ADMA Werte, die dieselbe Höhe aufweisen wie die Gruppe 2 in welcher keine KHK feststellbar war. Auch hier wurden nur Patienten ausgewählt mit guter Nierenfunktion um den Einfluss der GFR möglichst auszuschalten. Nur bei Dialysepatienten (Gruppe 4) steigen die ADMA Werte signifikant weiter an, bleiben aber dennoch bis auf eine relativ geringe Anzahl unter  $1 \mu\text{M}$ .

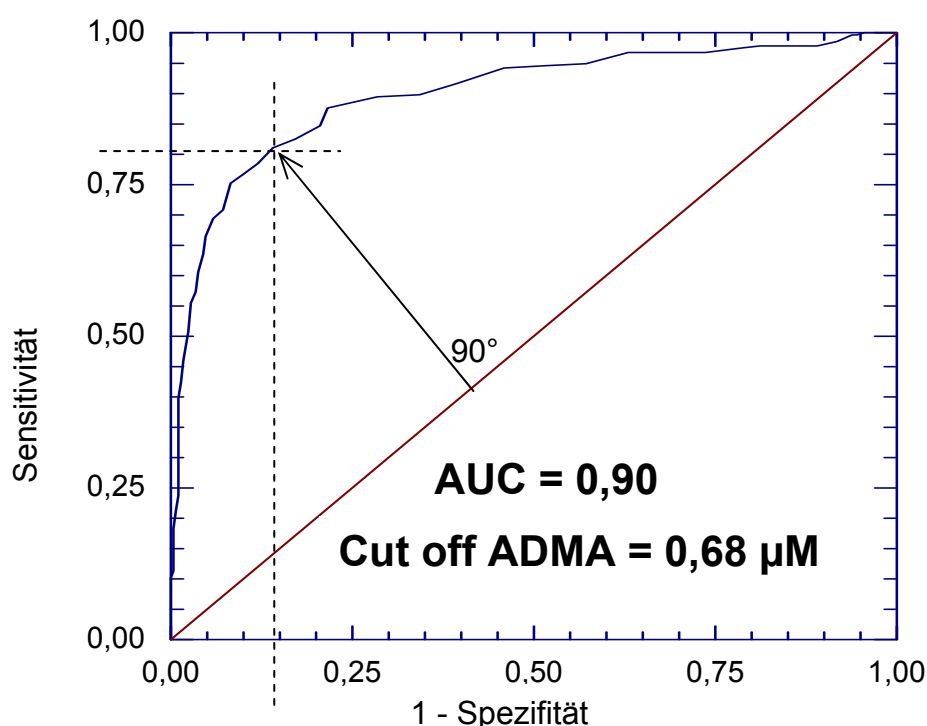


**Abb. 5:** Probanden und Patienten aus verschiedenen Studien. Anzahl  $n$ , Alter  $\pm$  SD Jahre; ADMA MW  $\pm$  SD  $\mu\text{mol/L}$ , Gruppe 1, Vitage Kohorte (gesund),  $n=295$ ;  $46 \pm 15$ ,  $0,60 \pm 0,08$ ; LURIC Studie, ausgewählte Patienten ohne KHK und GFR > 90 ml/min,  $n= 274$ ,  $54 \pm 12$ ,  $0,80 \pm 0,15$ ; Gruppe 3 Patienten mit KHK und GFR > 90 ml/min,  $n= 858$ ,  $59 \pm 9$ ;  $0,80 \pm 0,13$ ; Gruppe 4 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz  $n= 1204$ ,  $65,7$ , Bereich 30-83 Jahre,  $0,87 \pm 0,16$ .

Um das Vermögen von ADMA als diagnostischen Test zu beurteilen wurde zwischen der gesunden VITAGE Studienkohorte (Gruppe 1) und der ausgewählten LURIC Population (Gruppe 2) eine "Receiver Operating Characteristic"-Kurve (ROC – Kurve) berechnet \*. (Abb. 6). Die "Area under the curve" (AUC) von 0,90 (95 CI, 0,87-0,92) der empirischen Bestimmung weist auf die Möglichkeit einer sehr guten diagnostische Diskriminierung hin. Bei einem Cut off von 0,65  $\mu\text{M}$  liegen die Sensitivität bei 87,6 % und die Spezifität bei 78,4%. Bei einem Cut off von 0,70  $\mu\text{M}$  sinkt die Sensitivität auf 76,6% während die Spezifität auf 90,1% ansteigt. Die Likelihood Ratio die angibt um wie viel mal häufiger ein positiver ADMA Wert bei Personen mit klinischen KHK Symptomen auftritt im Vergleich zu Gesunden liegt bei

\*. Die Berechnungen wurden mit der Statistik Software NCSS (Kaysville, Utah, USA) durchgeführt.

einem Cutoff von  $0,60 \mu\text{M}$  bei 1,8, während sie bei einem Cutoff von  $0,70 \mu\text{M}$  auf 7,7 ansteigt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen dass Personen ohne Erkrankung auch einen hohen ADMA Wert aufweisen können. Nahrungsaufnahme vor der Blutabnahme z.B. kann zu einem falsch hohen ADMA Wert führen. Wird der Youden-Index (Sensitivität + Spezifität -1) als die zusammenfassende Maßzahl für die Güte des diagnostischen Tests herangezogen so ergibt sich der optimale Cut off Wert mit  $0,68 \mu\text{M}$  (Sensitivität 81,0%, Spezifität 86,0%). Er lässt sich graphisch als derjenige Punkt bestimmen bei dem der Abstand der ROC Kurve zur Winkelhalbierenden am größten ist.



**Abb. 6:** Receiver Operating Characteristic (ROC) für die ADMA Werte von KHK Symptompatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Der Wert der Area under the Curve (AUC) von 0,90 weist auf eine hohe diagnostische Diskriminierung hin. Der Cut off zwischen gesunden Probanden und Symtompatienten ergibt sich mit  $0,68 \mu\text{M}$  ADMA bei einem kombinierten Maximum an Sensitivität und Spezifität..

Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass große physiologische Veränderungen nur kleine Konzentrationsänderungen von ADMA im Plasma nach sich ziehen. Dies könnte als Folge von großen intrazellulären Konzentrationsänderungen in kleineren spezialisierten Zellpopulationen interpretiert werden. In diesen Zellen die

Konzentration von ADMA messen zu können, ist eine methodische Herausforderung. Unter Berücksichtigung der technischen Möglichkeiten bleibt das vorerst eine Vision.

## 6. Literatur

1. Kramer JK, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan ME. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1137S-45S.
2. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
3. 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;339:572-5.
4. Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977;26:531-7.
5. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205-9.
6. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-9.
7. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652-8.
8. Anderstam B, Katzarski K, Bergstrom J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1437-42.
9. Zoccali C, Bode-Boeger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.
10. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201-3.
11. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama* 2002;287:1420-6.
12. Boger RH, Bode-Boeger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
13. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111-6.
14. 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;99:1141-6.
15. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-8.
16. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53-9.
17. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boeger SM. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:61-8.
18. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006.
19. Schwedhelm E. Quantification of ADMA: analytical approaches. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S89-95.
20. Pettersson A, Ugglä L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692:257-62.

21. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:161-7.
22. Paiva H, Laakso J, Laine H, Laaksonen R, Knuuti J, Raitakari OT. Plasma asymmetric dimethylarginine and hyperemic myocardial blood flow in young subjects with borderline hypertension or familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1241-7.
23. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131-7.
24. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003;107:1891-5.
25. Bae SW, Stuhlinger MC, Yoo HS, Yu KH, Park HK, Choi BY, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005;95:729-33.
26. Teerlink T. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1130-8.
27. Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:157-66.
28. Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frolich 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 Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;798:87-99.
29. Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Boger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809:59-65.
30. Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Boger SM. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J Mass Spectrom* 2004;39:1287-94.
31. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005;35:622-6.
32. Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, et al. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin Chim Acta* 2007;384:141-8.
33. Guidance, for, industry. *Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), May 2001. (Accessed).
34. Rock E, Winklhofer-Roob BM, Ribalta J, Scotter M, Vasson MP, Brtko J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:70-3.
35. Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar D. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. *Eur J Clin Invest* 2007;37:364-71.
36. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1984;28:47-55.
37. NCCLS G, C28-A2. *How to Define and Determine Reference Intervals in Clinical Laboratory; Approved Guideline -Second Edition*. (Accessed).
38. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. *Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values*. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337-42.
39. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:518-23.

40. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens* 2005;19:629-33.
41. Kumanyika SK, Landis JR, Matthews-Cook YL, Almy SL, Boehmer SJ. Systolic blood pressure trends in US adults between 1960 and 1980: influence of antihypertensive drug therapy. *Am J Epidemiol* 1998;148:528-38.
42. Paiva H, Laakso J, Lehtimaki T, Isomustajarvi M, Ruukonen I, Laaksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:219-22.
43. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C. Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int* 2005;67:2330-7.
44. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 2003;289:2363-9.
45. Hauner H, Koster I, von Ferber L. [Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003;128:2632-7.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADMA	NG1, NG1-Dimethylarginin
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANCOVA	Analysis of Covariance
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body Mass Index
CRP	C - Reaktives Protein
DDAH	NG, NG-Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DIA	diastolischer Blutdruck
DM	Diabetes Mellitus
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HCY	Hyperhomocysteinämie
HDL	High Density Lipoproteins
HIV	Human Immundeficiency Virus
HTN	Hypertonie
IMT	Intima Media Dicke
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoproteins
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of quantification
LURIC	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
NMMA	NG-monomethyl- L-Arginin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
RBC	Red Blood Cells, Erythrocyten
SD	Standarddeviation
SDMA	NG1, NG2-Dimethylarginin
SYS	systolischer Blutdruck
TSH	Thyroid Stimulating Hormon
VITAGE	Vitamin Status and Metabolism during Ageing
WBC	White Blood Cells, Leukocyten
WHO	World Health Organization

## **8. Anhang** (original Arbeiten)

# Asymmetrical Dimethylarginine Independently Predicts Total and Cardiovascular Mortality in Individuals with Angiographic Coronary Artery Disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study)

ANDREAS MEINITZER,<sup>1</sup> URSULA SEELHORST,<sup>2</sup> BRITTA WELLNITZ,<sup>2</sup>  
GABRIELE HALWACHS-BAUMANN,<sup>1</sup> BERNHARD O. BOEHM,<sup>3</sup> BERNHARD R. WINKELMANN,<sup>4</sup> and  
WINFRIED MÄRZ<sup>5\*</sup>

**Background:** Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is increased in conditions associated with increased risk of atherosclerosis. We investigated the use of ADMA to predict total and cardiovascular mortality in patients scheduled for coronary angiography.

**Methods:** In 2543 persons with and 695 without coronary artery disease (CAD) identified by angiography we measured ADMA and recorded total and cardiovascular mortality during a median follow-up of 5.45 years.

**Results:** ADMA was correlated positively to age, female sex, diabetes mellitus, former and current smoking, and C-reactive protein and inversely to HDL cholesterol and triglycerides. ADMA was not associated with body mass index, hypertension, LDL cholesterol, or the presence or absence of angiographic CAD. Glomerular filtration rate and homocysteine were the strongest predictors of ADMA. At the 2nd, 3rd and 4th quartile of ADMA, hazard ratios for all-cause mortality adjusted for age, sex, and cardiovascular risk factors were 1.12 [95% confidence interval (CI) 0.83–1.52], 1.35 (95% CI 1.01–

1.81), and 1.87 (95% CI 1.43–2.44), respectively, compared with the 1st quartile. Hazard ratios for cardiovascular death were 1.13 (95% CI 0.78–1.63), 1.42 (95% CI 1.00–2.02), and 1.81 (95% CI 1.31–2.51). ADMA in the highest quartile remained predictive of mortality after accounting for medication at baseline. The predictive value of ADMA was similar to that in the entire cohort in persons with CAD, stable or unstable, but was not statistically significant in persons without angiographic CAD.

**Conclusions:** ADMA concentration predicts all-cause and cardiovascular mortality in individuals with CAD independently of established and emerging cardiovascular risk factors.

© 2007 American Association for Clinical Chemistry

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA),<sup>6</sup> an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, is increased in conditions associated with increased risk of atherosclerosis, such as impaired renal function (1–4), hypercholesterolemia (5), hypertriglyceridemia (6), insulin resistance (7), diabetes mellitus (8), hyperhomocysteinemia (9), and hypertension (10). ADMA may contribute to endothelial dysfunction (1, 11).

<sup>1</sup> Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Graz, Austria.

<sup>2</sup> LURIC Database nonprofit LLC, Freiburg, Germany.

<sup>3</sup> Division of Endocrinology, Department of Medicine, University Hospital, Ulm, Germany.

<sup>4</sup> Cardiology Group, Frankfurt-Sachsenhausen, Germany.

<sup>5</sup> Synlab Center of Laboratory Diagnostics Heidelberg, Heidelberg, Germany.

\* Address correspondence to this author at: Synlab Center of Laboratory Diagnostics Heidelberg, PO Box 10 47 80, D-69037 Heidelberg, Germany. Fax 0049-6221-793-111; e-mail maerz@synlab.de.

Received July 20, 2006; accepted November 27, 2006.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2006.076711

<sup>6</sup> Nonstandard abbreviations: ADMA, asymmetrical dimethylarginine; ESRD, end-stage renal disease; CAD, coronary artery disease; LURIC, Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study; CRP, C-reactive protein; NSTEMI, non-ST-elevation myocardial infarction; MI, myocardial infarction; STEMI, ST-elevation MI; GFR, glomerular filtration rate; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; BMI, body mass index; HR, hazard ratio; DDAH, dimethyl-arginine dimethylaminohydrolase.

A few small studies have addressed the ability of ADMA to predict mortality and have found that high ADMA was related to mortality in critically ill patients (12, 13) and to unfavorable pulmonary hemodynamics and mortality (14). ADMA was predictive of cardiovascular events and total mortality in kidney disease (15), end-stage renal disease (ESRD) (3), and coronary artery disease (CAD) (16–18). We investigated the value of ADMA to predict total mortality in patients scheduled for coronary angiography.

## Materials and Methods

### STUDY DESIGN AND PARTICIPANTS

We studied participants of the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study (19). Inclusion criteria were: German ancestry, clinical stability except for acute coronary syndromes, and the availability of a coronary angiogram. The indications for angiography in individuals in clinically stable condition were chest pain and/or noninvasive test results consistent with myocardial ischemia. Individuals suffering from acute illness other than acute coronary syndromes, chronic noncardiac diseases, or malignancy within the 5 past years, and those unable to understand the purpose of the study were excluded. The study was approved by the ethics committee at the "Ärztekammer Rheinland-Pfalz". Informed written consent was obtained from all participants.

CAD was assessed by angiography with maximum luminal narrowing estimated by visual analysis. Clinically relevant CAD was defined as the occurrence of  $\geq 1$  stenosis of  $\geq 20\%$  in  $\geq 1$  of 15 coronary segments. Individuals with stenoses  $< 20\%$  were considered as not having CAD. The severity of CAD was quantified with the Friesinger score.

Diabetes mellitus was diagnosed if plasma glucose was  $> 1.25$  g/L in the fasting state, or  $> 2.00$  g/L 2 h after an oral glucose load (20), or if individuals were receiving antidiabetic treatment. Hypertension was diagnosed if the systolic and/or diastolic blood pressure exceeded 140 and/or 90 mmHg or if there was a history of hypertension, evident through the use of antihypertensive drugs. Women were categorized into pre-, peri- or postmenopausal according to menstrual bleeding history and the concentrations of follicle-stimulating hormone (19).

Measurements of ADMA, lipoproteins, C-reactive protein (CRP), fibrinogen, creatinine, and homocysteine were complete in 3238 of 3279 individuals with coronary angiograms. Study participants included 928 patients who presented within 7 days after onset of unstable angina, non-ST-elevation myocardial infarction (MI) (NSTEMI, troponin T  $> 0.1$   $\mu\text{g/L}$ ), or ST-elevation MI (STEMI, troponin T  $> 0.1$   $\mu\text{g/L}$ ) because the mean (SD) ADMA concentrations in these patients [827 (145) nmol/L] were close to those in the stable CAD patients [829 (150) nmol/L].

Information on vital status was obtained from local registries. No patients were lost to follow-up. Of the 3238

persons studied, 497 deaths (15.3%) occurred during a median follow-up of 5.45 years. Death certificates were missing for 15 decedents (3%) who were included in the total mortality analysis but excluded from the cardiovascular mortality analysis. Cardiovascular death included the following: sudden death, fatal MI, death because of congestive heart failure, death immediately following intervention to treat CAD, fatal stroke, and other causes of death due to CAD.

### LABORATORY PROCEDURES

To perform ADMA and all other analyses we collected fasting blood samples before angiography to rule out ADMA alterations attributable to food intake (21). The standard laboratory methods have been described (19). Glomerular filtration rate (GFR) was calculated as  $\text{GFR} [\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}] = 186 \cdot \text{creatinine}^{-1.154} \cdot \text{age}^{-0.203}$  and  $\text{GFR} [\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}] = 138 \cdot \text{creatinine}^{-1.154} \cdot \text{age}^{-0.203}$  in males and in females, respectively (22).

ADMA was measured in frozen serum ( $-80$  °C) with reversed-phase HPLC (23). Within-day and between-day CVs were 3.1% (620 nmol/L) and 1.0% (2000 nmol/L), and 9% (620 nmol/L) and 1.5% (2000 nmol/L), respectively. CRP was measured with high sensitivity immunonephelometry (Dade Behring), and fibrinogen with the Clauss method (Dade Behring).

### STATISTICAL ANALYSIS

Triglycerides and CRP were transformed logarithmically. We established quartiles of continuous variables according to the values in individuals without CAD. Characteristics of individuals with and without CAD are presented as percentages for categorical variables and as mean (SD) or median and 25th and 75th percentiles for continuous variables. Associations of categorical and continuous variables were analyzed by logistic regression and univariate ANOVA, respectively, with covariables as indicated (Table 1). Using ANOVA models in which we included those factors not under examination as covariables, we studied the effects on ADMA of sex, age, CAD, and cardiovascular risk factors (Table 2) and of drugs. We used the Cox proportional hazards model to examine the relationship between ADMA and mortality (Tables 3 and 4). As indicated by log-minus-log diagnostic plots, the proportional hazards assumption was met.

Multivariable adjustment was carried out for sex, age, CAD, cardiovascular risk factors, and drugs (Tables 3 and 4). All statistical tests were 2-sided;  $P < 0.05$  was considered significant. The SPSS 11.0 statistical package (SPSS Inc.) was used.

## Results

### STUDY PARTICIPANTS

Compared with the group without CAD, CAD patients were significantly older, more likely to be current or past smokers, and had higher prevalence of diabetes mellitus,

**Table 1. Clinical and biochemical characteristics of study participants at baseline.**

	No CAD (n = 695)	CAD (n = 2543)	P <sup>a</sup>
Age, years	58 (12)	64 (10)	<0.001
Male sex, %	52	75	<0.001 <sup>b</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27 (4)	28 (4)	0.376
Diabetes mellitus, %	18	36	<0.001
Systemic hypertension, %	63	75	0.001
Smoking			
Never, %	52	32	
Past, %	30	48	
Current, %	18	20	<0.001
Previous MI, %	–	53	–
Peripheral vascular disease, %	2	12	<0.001
Cerebrovascular disease, %	5	9	<0.019
Systolic blood pressure, mmHg	136 (22)	143 (24)	<0.009 <sup>c</sup>
Diastolic blood pressure, mmHg	80 (11)	81 (11)	0.433 <sup>c</sup>
Fasting blood glucose, g/L	1.05 (0.28)	1.16 (0.37)	<0.001
LDL-C, g/L	1.20 (0.31)	1.16 (0.35)	<0.001 <sup>d</sup>
HDL-C, g/L	0.43 (0.12)	0.38 (0.10)	<0.001 <sup>d</sup>
Triglycerides, g/L median (25th and 75th percentile)	1.33 (0.97–1.94)	1.50 (1.13–2.02)	<0.001 <sup>d,e</sup>
Fibrinogen, g/L	3.55 (0.83)	4.08 (1.10)	<0.001
CRP, mg/L median (25th and 75th percentile)	2.2 (1.0–6.0)	3.8 (1.5–9.2)	<0.001 <sup>d,e</sup>
GFR, mL/min	83 (18)	81 (19)	0.829
Homocysteine, μmol/L	12 (5)	14 (6)	0.006 <sup>d</sup>

Values are mean (SD) unless otherwise noted.

<sup>a</sup> Analysis of variance or logistic regression, respectively, adjusted for age and gender.

<sup>b</sup> Logistic regression, adjusted for age only.

<sup>c</sup> Adjusted for use of beta blockers, ACE inhibitors, AT1 receptor antagonists, calcium channel blockers, diuretics, and lipid-lowering agents.

<sup>d</sup> Adjusted for use of lipid-lowering agents.

<sup>e</sup> ANOVA of logarithmically transformed values.

hypertension, and cerebrovascular and peripheral artery disease. A history of MI occurred in 53% of the CAD patients. The CAD patients had higher systolic blood pressure, fasting glucose, fibrinogen, homocysteine, and triglycerides and lower HDL cholesterol (HDL-C). Unadjusted LDL cholesterol (LDL-C) was lower in individuals with CAD than those without CAD ( $P = 0.002$ ). 57% of the CAD patients received lipid-lowering drugs compared with 18% of those without CAD. In accounting for this we found that LDL-C was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in CAD patients (adjusted mean: 1.20 g/L) than individuals without CAD (adjusted mean: 1.16 g/L). CRP and fibrinogen were higher in CAD patients, a finding related to the presence of patients with acute coronary syndromes in the CAD group. Body mass index (BMI), diastolic blood pressure, and GFR were similar in both groups (Table 1).

#### ASSOCIATION OF ADMA WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTORS, CAD STATUS, AND MEDICATION

For study participants as a whole, ADMA was significantly higher in women than in men ( $P < 0.001$ ). ADMA in pre- or perimenopausal women was similar to that in men, whereas ADMA was significantly higher in postmenopausal women (Table 2). ADMA was positively related to age, diabetes mellitus, former and current smoking, CRP, and homocysteine. ADMA was increased

at the lowest quartile of HDL-C and was decreased at the highest quartile of triglycerides. The GFR was inversely related to ADMA. We found no statistically significant relationships between ADMA and hypertension, LDL-C, or BMI.

Unadjusted ADMA concentrations were higher in patients with CAD than in persons without CAD (828 vs 814 nmol/L,  $P = 0.022$ ), but this difference was not seen on multivariate analysis. When we stratified our cohort based on the severity of angiographic changes (the strata of the Friesinger scores were 0–1, 1.01–4, 4.01–8, and 8.01–15), unadjusted ADMA was higher in the 2nd, 3rd, and 4th strata ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.031$ ,  $P = 0.003$ , respectively) compared with the lowest stratum, but these differences were also insignificant on multivariate analysis ( $P = 0.075$ ,  $P = 0.219$ ,  $P = 0.450$ , respectively). By multiple linear regression with forward selection, significant predictors of ADMA were selected in the order of GFR > homocysteine > age > CRP > HDL-C > sex > triglycerides > smoking status > diabetes mellitus. The overall  $R^2$  was 0.095, suggesting that <10% of the variation of ADMA was explained by the selected covariates.

ADMA may be increased in morbid obesity (24), but we observed no significant difference when we compared ADMA between study participants with a BMI <25 kg/m<sup>2</sup> (n = 903) and those with a BMI >35 kg/m<sup>2</sup> (n =

**Table 2. Association of cardiovascular risk factors and angiographic status with ADMA.**

		ADMA, nmol/L <sup>a</sup>	Difference, % <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
Gender and menopausal status				
Men	(n = 2258)	817 (811–823)		
Women, pre- or perimenopausal	(n = 98)	806 (777–836)	–1.3	NS
Women, postmenopausal	(n = 882)	848 (837–858)	+3.7	0.01
Age, years				
<60	(n = 1196)	807 (799–816)		
60–70	(n = 1171)	828 (820–836)	+2.6	0.001
>70	(n = 871)	845 (835–856)	+4.7	<0.001
CAD				
No	(n = 695)	830 (819–841)		
Yes	(n = 2543)	824 (818–829)	–0.7	NS
BMI, kg/m <sup>2</sup>				
≤26 or 27 <sup>d</sup>	(n = 1518)	827 (820–835)		
≥26 or 27 <sup>d</sup>	(n = 1720)	823 (816–830)	–0.5	NS
Diabetes mellitus				
No	(n = 2204)	821 (815–827)		
Yes	(n = 1034)	833 (824–842)	+1.5	0.032
Hypertension				
No	(n = 882)	826 (816–836)		
Yes	(n = 2356)	825 (819–830)	–0.1	NS
Smoking				
Never	(n = 1165)	815 (806–823)		
Former	(n = 1441)	827 (819–834)	+1.5	0.046
Current	(n = 632)	840 (828–852)	+3.1	0.001
LDL-C, g/L				
1st quartile (<1.00)	(n = 1044)	832 (823–840)		
2nd quartile (1.00–1.19)	(n = 774)	828 (818–838)	–0.5	
3rd quartile (1.20–1.40)	(n = 693)	818 (807–828)	–1.7	
4th quartile (≥1.41)	(n = 727)	819 (809–830)	–1.6	NS
HDL-C, g/L				
4th quartile (≥0.50)	(n = 479)	802 (788–815)		
3rd quartile (0.42–0.49)	(n = 644)	820 (808–831)	+2.2	0.200
2nd quartile (0.34–0.41)	(n = 880)	827 (818–837)	+3.1	0.033
1st quartile (<0.34)	(n = 1235)	835 (827–844)	+4.1	0.001
Triglycerides, g/L				
1st quartile (<0.97)	(n = 571)	829 (817–842)		
2nd quartile (0.97–1.32)	(n = 764)	832 (822–842)	0.4	0.718
3rd quartile (1.33–1.94)	(n = 1018)	828 (820–837)	–0.1	0.872
4th quartile (≥1.95)	(n = 885)	812 (803–822)	–2.1	0.038
CRP, mg/L				
<3	(n = 1511)	815 (807–823)		
3–10	(n = 1068)	832 (823–840)	+2.1	0.007
≥10	(n = 659)	836 (823–850)	+2.6	0.019
Fibrinogen, g/L				
1st quartile (<2.98)	(n = 503)	814 (800–828)		
2nd quartile (2.98–3.44)	(n = 674)	824 (813–835)	+1.2	
3rd quartile (3.45–3.99)	(n = 750)	818 (808–828)	+0.5	
4th quartile (≥400)	(n = 1311)	834 (825–843)	+2.5	NS
GFR, mL/min				
≥90	(n = 1098)	816 (807–825)		
60–89	(n = 1785)	819 (813–826)	+0.4	0.529
30–59	(n = 332)	872 (856–888)	+6.9	<0.001
<30	(n = 23)	1030 (971–1089)	+26.2	<0.001
Homocysteine, μmol/L				
1st quartile (<9.2)	(n = 606)	801 (790–813)		
2nd quartile (9.2–11.1)	(n = 648)	810 (799–821)	+1.1	0.285
3rd quartile (11.2–14.1)	(n = 879)	826 (816–835)	+3.1	0.001
4th quartile (≥14.2)	(n = 1105)	847 (838–822)	+5.7	<0.001

<sup>a</sup> Estimated marginal means and 95% confidence intervals obtained in a general linear model (ANOVA) adjusted for each of the other factors, whereby age, BMI, GFR, fibrinogen, C-reactive protein, LDL-C, HDL-C, triglycerides, and homocysteine were included as continuous rather than categorical covariables. NS, not significant.

<sup>b</sup> Compared to the first category of each variable.

<sup>c</sup> Post hoc pairwise comparisons with the first category of each variable, reported if the overall *P* < 0.05.

<sup>d</sup> Thresholds of 26 and 27 kg/m<sup>2</sup> apply to males and females, respectively.

**Table 3. HR for death from all causes according to ADMA.**

ADMA, nmol/L	Model 1 HR (95% CI)	P	Model 2 HR (95% CI)	P	Model 3 HR (95% CI)	P
All individuals (n = 3238)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.09 (0.81–1.48)	0.572	1.12 (0.83–1.52)	0.460	1.107 (0.79–1.45)	0.660
3rd quartile (801–889)	1.40 (1.05–1.87)	0.022	1.35 (1.01–1.81)	0.042	1.26 (0.94–1.69)	0.115
4th quartile (≥890)	2.04 (1.57–2.66)	<0.001	1.87 (1.43–2.44)	<0.001	1.60 (1.22–2.09)	0.001
per quartile <sup>a</sup>	1.30 (1.19–1.41)	<0.001	1.25 (1.15–1.36)	<0.001	1.18 (1.09–1.29)	<0.001
Angiographic CAD (n = 2543)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.18 (0.85–1.63)	0.326	1.21 (0.88–1.68) <sup>b</sup>	0.240	1.16 (0.84–1.61) <sup>b</sup>	0.359
3rd quartile (801–889)	1.46 (1.07–2.01)	0.018	1.40 (1.02–1.92) <sup>b</sup>	0.038	1.30 (0.95–1.79) <sup>b</sup>	0.103
4th quartile (≥890)	2.15 (1.62–2.87)	<0.001	2.00 (1.50–2.67) <sup>b</sup>	<0.001	1.71 (1.28–2.29) <sup>b</sup>	<0.001
per quartile <sup>a</sup>	1.31 (1.20–1.43)	<0.001	1.27 (1.16–1.38) <sup>b</sup>	<0.001	1.20 (1.10–1.31) <sup>b</sup>	<0.001
Stable CAD (n = 1518)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.10 (0.74–1.64)	0.647	1.15 (0.77–1.72) <sup>b</sup>	0.240	1.06 (0.71–1.58) <sup>b</sup>	0.788
3rd quartile (801–889)	1.34 (0.90–1.99)	0.147	1.30 (0.87–1.95) <sup>b</sup>	0.194	1.25 (0.84–1.87) <sup>b</sup>	0.268
4th quartile (≥890)	2.10 (1.48–2.98)	<0.001	1.78 (1.25–2.53) <sup>b</sup>	0.001	1.55 (1.08–2.22) <sup>b</sup>	0.017
per quartile <sup>a</sup>	1.31 (1.17–1.46)	<0.001	1.22 (1.09–1.36) <sup>b</sup>	<0.001	1.17 (1.05–1.31) <sup>b</sup>	0.005
Unstable CAD (n = 928)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.65 (0.91–3.01)	0.100	1.67 (0.91–3.05) <sup>b</sup>	0.097	1.70 (0.93–3.11) <sup>b</sup>	0.086
3rd quartile (801–889)	1.99 (1.11–3.56)	0.020	1.88 (1.04–4.00) <sup>b</sup>	0.036	1.65 (1.91–2.98) <sup>b</sup>	0.036
4th quartile (≥890)	2.49 (1.42–4.34)	<0.001	2.40 (1.36–4.23) <sup>b</sup>	0.003	2.10 (1.19–3.70) <sup>b</sup>	0.011
per quartile <sup>a</sup>	1.31 (1.12–1.52)	0.001	1.28 (1.10–1.51) <sup>b</sup>	0.002	1.22 (1.04–1.43) <sup>b</sup>	0.016

Model 1: adjusted for age and gender.

Model 2: in addition adjusted for presence or absence of CAD on angiography, BMI, type 2 diabetes, hypertension, smoking status, LDL-C, HDL-C, triglycerides, CRP, fibrinogen, GFR, and homocysteine. All continuous variables were treated as such in the modeling.

Model 3: in addition adjusted for ACE inhibitors, antiplatelet agents, lipid-lowering drugs, and diuretics.

<sup>a</sup> The HRs are the ratios associated with an increase of one quartile in ADMA.

<sup>b</sup> Presence or absence of CAD on angiography not included as a covariable.

137) or 40 kg/m<sup>2</sup> (n = 30), respectively. Systolic blood pressure has also been reported to be related to ADMA (25), but we found no evidence of such a relationship whether or not we adjusted for confounding variables (age, sex, risk factors, and use of antihypertensive drugs).

We investigated whether common medications were associated with ADMA. In users of ACE inhibitors (+1.5%, *P* = 0.015) and diuretics (+3.6%, *P* < 0.001), ADMA was significantly higher than in nonusers, whereas it was lower in users of lipid-lowering (97% statins, -2.1%, *P* < 0.001) and antiplatelet drugs (-2.2%, *P* = 0.001). Administration of  $\beta$ -blockers, AT1 receptor antagonists, calcium channel blockers, and insulin or oral anti-diabetics was not related to ADMA.

#### ADMA AND MORTALITY FROM ALL CAUSES

Among the 3238 persons studied, 497 deaths (15.3%) occurred. Compared with patients in the lowest ADMA quartile, the age and sex-adjusted hazard ratios (HR) for death in the 2nd, 3rd and 4th quartiles were 1.09, 1.40, and 2.04, respectively (Table 3, Fig. 1). Inclusion of cardiovascular risk factors as covariables changed these estimates to 1.12, 1.35, and 1.87, respectively (Table 3). Although HRs decreased, ADMA retained prognostic importance after

additional adjustment for the use of drugs significantly associated with ADMA (Table 3). Per quartile of ADMA, the HRs of death were 1.29, 1.23, and 1.16, respectively, in the 3 models incrementally adjusted for age and sex, risk factors, and the use of drugs (Table 3).

Among the 2543 patients with CAD, 440 died (17.3%). In this subgroup, HRs for death were slightly higher than those in the entire cohort (Table 3).

Only 57 deaths (8.2%) occurred among the 695 study participants without CAD. Although there was a tendency toward an increased risk of death at high ADMA concentrations in this group (unadjusted HR of 1.88 for the 4th compared with the 1st quartile), the association did not reach statistical significance.

Among the patients with CAD, 1518 were studied at least 14 days past the onset of symptoms of an acute coronary event and were considered as having stable CAD. Nine hundred twenty eight patients underwent angiography within 7 days after the onset of symptoms of acute coronary syndromes (unstable angina, NSTEMI, or STEMI) and were classified as having unstable CAD. In this subgroup of patients, 277 (18.2%) and 150 deaths (16.1%), respectively, occurred in the stable and unstable CAD patients. In both groups, we found consistent and

**Table 4. HR for death from cardiovascular causes according to ADMA.**

ADMA (nmol/L)	Model 1 HR (95% CI)	P	Model 2 HR (95% CI)	P	Model 3 HR (95% CI)	P
All individuals (n = 3223)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.10 (0.76–1.58)	0.622	1.13 (0.78–1.63)	0.460	1.07 (0.74–1.55)	0.707
3rd quartile (801–889)	1.50 (1.06–2.13)	0.022	1.42 (1.00–2.02)	0.048	1.32 (0.93–1.87)	0.123
4th quartile (≥890)	2.00 (1.45–2.77)	<0.001	1.81 (1.31–2.51)	<0.001	1.52 (1.01–2.12)	0.012
per quartile <sup>a</sup>	1.29 (1.16–1.42)	<0.001	1.23 (1.11–1.36)	<0.001	1.16 (1.05–1.29)	0.004
Angiographic CAD (n = 2528)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.20 (0.81–1.78)	0.326	1.24 (0.84–1.84) <sup>b</sup>	0.280	1.19 (0.80–1.77) <sup>b</sup>	0.391
3rd quartile (801–889)	1.60 (1.09–2.34)	0.015	1.50 (1.03–2.20) <sup>b</sup>	0.036	1.34 (0.95–2.03) <sup>b</sup>	0.092
4th quartile (≥890)	2.16 (1.52–3.07)	<0.001	1.99 (1.34–2.84) <sup>b</sup>	<0.001	1.68 (1.18–2.41) <sup>b</sup>	0.004
per quartile <sup>a</sup>	1.31 (1.18–1.46)	<0.001	1.26 (1.13–1.40) <sup>b</sup>	<0.001	1.19 (1.07–1.33) <sup>b</sup>	0.002
Stable CAD (n = 1510)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	1.13 (0.70–1.80)	0.624	1.16 (0.73–1.86) <sup>b</sup>	0.529	1.07 (0.67–1.72) <sup>b</sup>	0.769
3rd quartile (801–889)	1.36 (0.86–2.17)	0.194	1.30 (0.81–2.08) <sup>b</sup>	0.278	1.24 (0.77–1.98) <sup>b</sup>	0.373
4th quartile (≥890)	2.05 (1.36–3.10)	<0.001	1.72 (1.14–2.62) <sup>b</sup>	0.011	1.52 (0.99–2.32) <sup>b</sup>	0.053
per quartile <sup>a</sup>	1.29 (1.14–1.47)	<0.001	1.20 (1.06–1.37) <sup>b</sup>	0.005	1.16 (1.02–1.32) <sup>b</sup>	0.028
Unstable CAD (n = 922)						
1st quartile (<720)	1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>		1.0 <sup>reference</sup>	
2nd quartile (720–800)	2.03 (0.90–4.62)	0.090	2.06 (0.90–4.71) <sup>b</sup>	0.087	2.12 (0.92–4.84) <sup>b</sup>	0.076
3rd quartile (801–889)	2.79 (1.27–6.14)	0.011	2.61 (1.17–5.78) <sup>b</sup>	0.019	2.21 (0.99–4.92) <sup>b</sup>	0.053
4th quartile (≥890)	3.21 (1.49–6.92)	<0.003	3.06 (1.40–6.69) <sup>b</sup>	0.005	2.62 (1.20–5.74) <sup>b</sup>	0.016
per quartile <sup>a</sup>	1.38 (1.13–1.68)	0.001	1.35 (1.10–1.66) <sup>b</sup>	0.004	1.27 (1.03–1.56) <sup>b</sup>	0.024

Model 1: adjusted for age and gender.

Model 2: in addition adjusted for presence or absence of CAD on angiography, BMI, type 2 diabetes, hypertension, smoking status, LDL-C, HDL-C, triglycerides, CRP, fibrinogen, GFR, and homocysteine. All continuous variables were treated as such in the modeling.

Model 3: in addition adjusted for the use of ACE inhibitors, antiplatelet agents, lipid-lowering drugs, and diuretics.

<sup>a</sup> The HRs are the ratios associated with an increase of one quartile in ADMA.

<sup>b</sup> Presence or absence of CAD on angiography not included as a covariable.

robust associations of ADMA with mortality from all causes, with slightly higher HRs in patients with unstable CAD (Table 3).

#### ADMA AND MORTALITY FROM CARDIOVASCULAR CAUSES

Death certificates were not available from 15 deceased persons, therefore the analysis for cardiovascular mortality included a total of 3223 individuals. Among these, 334 (10.4%) died from cardiovascular causes, 31 (1%) died from fatal infection, 55 (1.7%) died from fatal cancer, and 62 (1.9%) died from miscellaneous causes. HRs for death from cardiovascular causes according to ADMA were similar to those obtained for mortality from all causes in all models and across all subgroups examined, whereby the HRs for mortality from cardiovascular causes were slightly higher than the HRs for all-cause mortality in patients presenting with unstable CAD (Table 4, Fig. 1). Compared with the lowest quartile, there were also increased HRs for death from noncardiovascular causes in the highest quartile of ADMA (HR 2.18, adjusted for age and sex).

#### Discussion

We demonstrated that ADMA is associated with all-cause and cardiovascular mortality in stable and unstable CAD, regardless of established and emerging cardiovascular risk factors. We noticed a tendency toward an increased risk of death at high ADMA concentrations in individuals without CAD as well, but this did not reach statistical significance.

To identify confounding variables, we examined the relationship between ADMA and conditions involved in the development of endothelial dysfunction or CAD. Multiple linear regression analysis revealed GFR as the strongest predictor of ADMA, which supports previous findings of increased ADMA in ESRD (1–3). Two mechanisms may account for the relationship between ADMA and renal function. First, ADMA itself is eliminated by renal excretion. Second, the enzyme dimethyl-arginine dimethylaminohydrolase (DDAH), which converts ADMA to citrulline and dimethylamine, is highly expressed in the kidney, so that a deterioration of renal function may go along with a decrease in DDAH (26). We emphasize, however, that the association of ADMA with

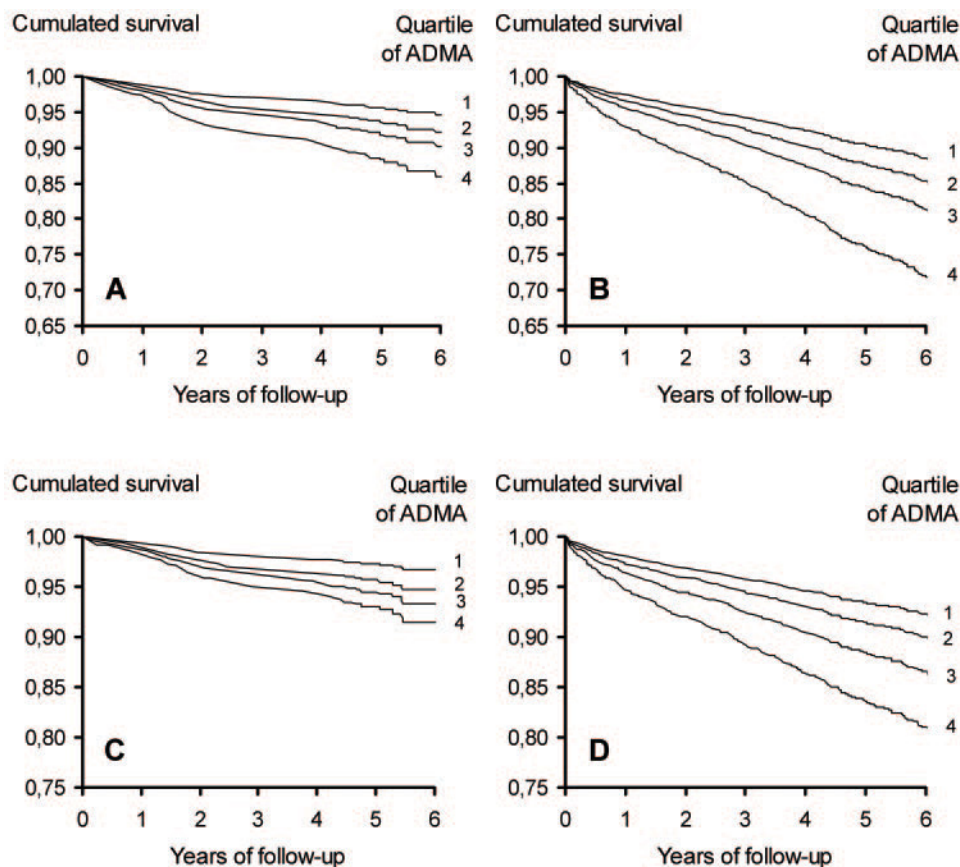


Fig. 1. Cumulated survival functions according to quartiles of ADMA in individuals with (panels B and D) or without (panels A and C) angiographic CAD.

Panels A and B: total mortality. Panels C and D: cardiovascular mortality. For HRs and CIs cf. Tables 3 and 4.

mortality from all causes (HR per quartile 1.27, 95% CI 1.17–1.39) and cardiovascular causes (HR per quartile 1.23, 95% CI 1.10–1.37) also occurred among individuals with GFRs  $>60$  mL/min and was thus independent of renal function.

The 2nd most important predictor of ADMA was plasma homocysteine. ADMA has been suggested to link hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction (9). Although not shown consistently (27, 28), experimental hyperhomocysteinemia may raise ADMA (29, 30). Three mechanisms may underlie the correlation between homocysteine and ADMA. First, because the formation of homocysteine and ADMA requires L-methionine as a methyl group donor, expansion of the L-methionine pool may fuel both pathways at an increased rate (31). Second, homocysteine may inhibit the degradation of ADMA (31). Third, as homocysteine is eliminated by the kidney, both ADMA and homocysteine may concurrently accumulate once the GFR declines. Partial correlation analysis suggests that the latter mechanism might indeed be operative: When we controlled for the GFR, the correlation coefficient between homocysteine and ADMA decreased from 0.212 ( $n = 3238$ ,  $P < 0.001$ ) to 0.140 ( $n = 3238$ ,  $P < 0.001$ ), which also reflects the strong and well-known (32) association between homocysteine and GFR ( $r = -0.390$ ,  $n = 3238$ ,  $P < 0.001$ ).

In women ADMA was higher than in men. This difference obviously originates from the fact that ADMA increases after menopause (33), and that the vast majority of the women participating in the LURIC study were postmenopausal.

The finding that ADMA was higher in smokers than in nonsmokers is in line with recent findings (34), but contrasts with a study in 563 elderly men in which smokers had lower ADMA than nonsmokers (35). However, the difference was no longer significant after adjustment for multiple confounding factors.

The relationship between LDL-C and ADMA has remained elusive. In their study of 49 hypercholesterolemic adults, Boger et al. (5) found an association between ADMA and LDL-C. This observation has not been confirmed by others (7, 21, 36) or by the current study.

Intravenous administration of ADMA increased systemic vessel resistance and arterial blood pressure (37), and systolic blood pressure has been found to be related to ADMA (25, 38). These findings, however, have not been confirmed by all studies. Interestingly, acute infusion of ADMA in healthy men, which led to an increase in mean (SD) plasma ADMA from 950 (270) to 22 950 (4910) nmol/L, increased mean arterial pressure from 83.9 (1.1) mmHg to only 88.3 (1.2) mmHg, (39), and mice with low ADMA as a consequence of DDAH overexpression ex-

hibit a modest decrease in blood pressure (40). In the current study, we did not detect increased ADMA in hypertensive patients nor were we able to prove a relationship between ADMA and blood pressure. Taken together, the effect of ADMA on blood pressure may thus be minor.

Increased ADMA has been shown to coincide with other features of the metabolic syndrome (6, 8, 10). Krzyzanowska and colleagues (24) found ADMA to be significantly increased in women with morbid obesity [ $n = 34$ , mean (SD) BMI 49 (1) kg/m<sup>2</sup>]. We did not detect any such association, however, and therefore suggest that variations in BMI across the commonly observed range would not appreciably affect ADMA.

ADMA has been found to be increased in persons with normotensive insulin-resistance (7) and diabetes mellitus (8). Consistently, ADMA was higher in diabetic than in nondiabetic individuals and inversely related to HDL-C. Finally, our results showed a significant correlation of ADMA with CRP and a tendency toward high ADMA at high fibrinogen. These findings are in line with reports that ADMA is increased in low-grade systemic inflammation (24).

Our attempt to identify confounding nonrandomized medications revealed higher ADMA in users of ACE inhibitors, a result that contrasts with a report suggesting that ACE inhibitors lower ADMA (41). Patients receiving diuretics had higher ADMA than those not on diuretics. Confirming some (42) but not all (36, 43–46) pertinent earlier work, individuals treated with lipid-lowering drugs (97% statins) had lower ADMA than those untreated. The use of antiplatelet drugs was associated with lower ADMA. Insulin and oral antidiabetics were not related to ADMA, as would have been expected from earlier research (7, 13, 47). We stress, however, that these associations are cross-sectional in nature and do not prove any pharmacological effect of the drugs on ADMA.

So far, few small prospective studies have addressed the predictive value of ADMA for total mortality and cardiovascular mortality. In patients with mild to advanced chronic kidney disease, ADMA was a strong and independent risk marker for progression to ESRD and death (15). Zoccali et al. (3) examined 225 hemodialysis patients with a mean ADMA of 2520 nmol/L (interquartile range 1580–3850 nmol/L). Compared with the 1st and 2nd quartile, HRs for death at ADMA concentrations in the 3rd and 4th quartile were 1.72 and 3.11, respectively. An even higher mean ADMA concentration (3060 nmol/L) and corresponding associations with all-cause mortality and cardiovascular mortality were seen in a subsequent study of the same group (48). The overall risk of death and cardiovascular events is excessive in ESRD. In the 2 ESRD studies (3, 48), the annual mortality rate was nearly 5-fold that in the current study. The high cardiovascular mortality of dialyzed patients is not solely explained by classical risk factors. Uremia-specific risk factors may be important. Findings in ESRD, including

interpretation of ADMA concentrations, are therefore difficult to extrapolate to other situations. Although we found relative increments of risk by quartiles of ADMA similar to those in ESRD (3, 48), our median and 75th percentile values of ADMA were one fourth to one fifth of the values in ESRD (3, 48). Thus, our work extends the information on ADMA and all-cause mortality in ESRD to a lower range of ADMA.

In a small nested case-control study of middle-aged nonsmoking men from Eastern Finland with ( $n = 70$ ) or with no ( $n = 80$ ) CAD, Valkonen et al. (16) observed a 3.9-fold increase in the risk of cardiovascular events in the highest quartile of ADMA compared with the remaining quartiles. The association of ADMA and acute coronary events was not significant in men with no history of CAD, nor was it significant in smokers. The relationship of ADMA and all-cause mortality was not reported. To compare our results with those by Valkonen et al. (16), we separately considered men and women, individuals who did not have a history of STEMI, and current or previous smokers. ADMA attained virtually identical prognostic importance in women and men. Furthermore, the predictive value of ADMA in former or current smokers was equivalent to that in the entire sample. ADMA also stayed predictive of total mortality in individuals with no previous STEMI (data not shown). Thus, by demonstrating that ADMA predicts all-cause and cardiovascular death in persons at intermediate risk regardless of sex, smoking status, or previous MI, our results add to those of Valkonen et al. (16).

Lu et al. (17) studied ADMA in 153 Chinese stable CAD patients undergoing percutaneous coronary intervention. Consistent with the current study, Lu et al. found ADMA to be associated with future death or nonfatal MI (17), but our study extends their observations by showing an association of high ADMA with adverse outcomes in patients with acute coronary syndromes. Schnabel et al. (18) reported that ADMA was predictive of death from cardiovascular causes or nonfatal MI in patients with CAD. Although their findings are basically consistent with ours, Schnabel et al. did not report on total mortality, nor did they differentiate between individuals presenting in a stable clinical condition or with acute coronary syndromes.

In our cohort total mortality was evidently driven by mortality from cardiovascular causes, and we also observed an association of ADMA with noncardiovascular mortality. Because the number of deaths from noncardiovascular causes was low and because this study was not designed to study diseases other than cardiovascular, this finding should not be considered definite.

The pooled analysis of patients with stable and unstable CAD is a possible limitation of our study. Another study of 48 patients with acute coronary syndromes and 48 healthy volunteers indicated that acute coronary syndromes might increase ADMA (49). Because that study did not include patients with stable CAD, it does not

refute our finding of similar ADMA in stable and unstable CAD. Therefore a combined analysis of these groups appears justified and is supported by the fact that the separate analyses of stable and unstable patients in our study yielded very similar HRs.

The observation that ADMA predicts total and cardiovascular mortality in patients with CAD does not prove causality. We identified several biochemical markers of cardiovascular risk correlated with ADMA that may by themselves explain the current findings. Among the confounding factors, GFR may deserve particular attention because impaired renal function represents a cardiovascular risk factor by itself and high ADMA may merely indicate renal dysfunction. Nevertheless, after we controlled for confounding variables in multivariable models and for the use of drugs, ADMA retained predictive power. Other confounders that may be related to ADMA may have been disregarded in this study, however.

Our study population consisted of selectively enrolled middle-aged to elderly Caucasians; therefore the results cannot be generalized to younger persons or other races or ethnicities. That coronary angiography was indicated in each study participant may have produced referral bias. The definition of the coronary artery status, however, may be a strength of the study. The prevalence of clinically asymptomatic coronary atherosclerosis has been reported to be high at  $\geq 50$  years of age. Hence, angiography-based recruitment prevents inadvertent allocation of individuals with significant, clinically unapparent CAD to the control group. Surprisingly, among the study participants classified as having no CAD the major cardiovascular risk factors occurred at a frequency similar to that of the general population. For example, the prevalence of hypertension is close to that found in the German population (50). Diabetes mellitus in our group first appeared to be 2 to 3 times more frequent than in the German population, but this is likely due to the fact that we measured fasting glucose and performed an oral glucose challenge in individuals not known to have diabetes. Based on clinical history or fasting glucose measurements, the National Health and Nutrition Examination surveys 1999–2000 reports prevalences of diabetes mellitus of 9.2% and 19.3% in adults 40–59 or  $>60$  years of age, respectively (51). In the current study, 12.1% of the persons without CAD had diabetes mellitus according to this criterion, and another 5.6% were detected by increased postchallenge glucose.

In this study, the largest to examine ADMA as a predictor of mortality, ADMA was a surprisingly robust predictor of mortality from all causes and from cardiovascular causes. The predictive value of ADMA was similar in patients with stable CAD or acute coronary syndromes and in those with or without history of STEMI. Because the association of ADMA with mortality did not reach statistical significance in persons with no CAD, investigation in asymptomatic persons is warranted.

The authors extend appreciation to the participants of the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study without their collaboration this article would not have been written. We thank Mrs. Gabriele Gartner, Graz, for excellent technical assistance and the LURIC study team either temporarily or permanently involved in patient recruitment, sample and data handling, and the laboratory staff at the Ludwigshafen General Hospital and the Universities of Freiburg and Ulm, Germany.

## References

- 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;339:572–5.
- Anderstam B, Katzarski K, Bergstrom J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1437–42.
- Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113–7.
- Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age. *Am J Kidney Dis* 2005;46:186–202.
- Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842–7.
- Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111–6.
- Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002;287:1420–6.
- Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201–3.
- Stuhlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab* 2005;6:3–14.
- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652–8.
- Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813–8.
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003;22:23–30.
- Siroen MP, van Leeuwen PA, Nijveldt RJ, Teerlink T, Wouters PJ, Van den Berghe G. Modulation of asymmetric dimethylarginine in critically ill patients receiving intensive insulin treatment: a possible explanation of reduced morbidity and mortality? *Crit Care Med* 2005;33:504–10.
- Kielstein JT, Bode-Boger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, et al. Asymmetrical dimethylarginine in idio-

- pathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1414–8.
15. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2449–55.
  16. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127–8.
  17. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003;24:1912–9.
  18. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53–9.
  19. Winkelmann BR, März W, Boehm BO, Zotz R, Hager J, Hellstern P, et al. Rationale and design of the LURIC study—a resource for functional genomics, pharmacogenomics and long-term prognosis of cardiovascular disease. *Pharmacogenomics* 2001;2:S1–73.
  20. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29(Suppl 1):S43–8.
  21. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039–44.
  22. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
  23. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131–7.
  24. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Kopp HP, Wolzt M, Scherthaner G. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6277–81.
  25. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens* 2005;19:629–33.
  26. Zoccali C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:314–20.
  27. Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:347–53.
  28. Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, et al. Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism* 2005;54:351–60.
  29. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:161–7.
  30. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upton BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933–8.
  31. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569–75.
  32. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E, et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:170–6.
  33. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005;35:622–6.
  34. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006;48:278–85.
  35. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004;53:1574–9.
  36. Paiva H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Laaksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:219–22.
  37. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455–9.
  38. 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;99:1141–6.
  39. Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172–7.
  40. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042–7.
  41. Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X. *Am J Cardiol* 2002;90:974–82.
  42. Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004;94:157–61.
  43. Sasaki S, Kuwahara N, Kunitomo K, Harada S, Yamada T, Azuma A, et al. Effects of atorvastatin on oxidized low-density lipoprotein, low-density lipoprotein subfraction distribution, and remnant lipoprotein in patients with mixed hyperlipoproteinemia. *Am J Cardiol* 2002;89:386–9.
  44. Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I. Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis* 2003;166:279–84.
  45. Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med* 2003;8:185–9.
  46. Maas R, Quitzau K, Schwedhelm E, Spieker L, Rafflenbeul W, Steenpass A, et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary endothelial function in patients with coronary artery disease and mild hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006 Jul 6; [Epub ahead of print].

47. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002;51:843–6.
48. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C. Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int* 2005;67:2330–7.
49. Bae SW, Stuhlinger MC, Yoo HS, Yu KH, Park HK, Choi BY, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005;95:729–33.
50. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 2003;289:2363–9.
51. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults—United States, 1999–2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52:833–7.

## Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method

Andreas Meinitzer<sup>a,c,\*</sup>, Markus Puchinger<sup>b</sup>, Brigitte M. Winklhofer-Roob<sup>c</sup>,  
Edmond Rock<sup>d</sup>, Josep Ribalta<sup>e</sup>, Johannes M. Roob<sup>f</sup>, Isabella Sundl<sup>c</sup>,  
Gabriele Halwachs-Baumann<sup>a</sup>, Winfried März<sup>a,g</sup>

<sup>a</sup> Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Austria

<sup>b</sup> University Surgical Clinic, Medical University of Graz, Austria

<sup>c</sup> Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center, Institute of Molecular Biosciences, Karl Franzens University of Graz, Austria

<sup>d</sup> Institut National de la Recherche Agricole, UMMM. CRNH, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, France

<sup>e</sup> Unitat de Recerca de Lipids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Universitat Reus, Spain

<sup>f</sup> Division of Clinical Nephrology and Hemodialysis, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Austria

<sup>g</sup> Synlab Center of Laboratory Diagnostics, Heidelberg, Germany

Received 21 April 2007; received in revised form 3 July 2007; accepted 3 July 2007

Available online 13 July 2007

### Abstract

**Background:** Owing to the growing number of reports in the literature on ADMA as a possibly useful marker of endothelial health, its use in the clinical laboratory is of increasing interest. Age dependency and the small, but statistically significant differences between healthy subjects and disease groups are difficult to interpret. Additionally, levels of ADMA in comparable patient groups of different studies vary widely, even when similar methods have been used.

**Methods:** After analytical evaluation of a chromatographic method according to international guidelines, we analysed asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethyl arginine (SDMA), homo-arginine and arginine in EDTA plasma of 292 healthy males aged 20 to 75 years (y) who had passed strict inclusion/exclusion criteria. For statistical analysis, 4 age groups were formed. Group differences were identified with the non-parametric Kruskal–Wallis test.

**Results:** Calibration curves were linear throughout the selected ranges; the standard deviation for the regression line, recovery, imprecision, and accuracy results were all highly satisfactory. The reference ranges of ADMA for the 4 age groups are presented as age (mean±SD of age group, y); number of subjects; median, 2.5th–97.5th percentile: group <35 y: 26.7±4.0 y; n=78; 0.58, 0.43–0.69 µmol/L; group 35–49 y: 41.6±4.0 y; n=93; 0.59, 0.45–0.73 µmol/L; group 50–65 y: 57.5±4.2 y; n=82; 0.61, 0.46–0.78 µmol/L; and group >65 y: 69.6±3.3 y; n=39; 0.64, 0.54–0.79 µmol/L.

**Conclusions:** Only highly precise methods are able to detect small differences between groups. The application of an evaluated method to a well defined group of healthy subjects should provide a basis for comparison of ADMA concentrations in different patient populations of future studies.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ADMA; Methylated arginines; Plasma; Reference values

**Abbreviations:** ADMA, Symmetrical dimethylarginine; BMI, Body mass index; CI, Confidence interval; DBP, Diastolic blood pressure; EDTA, Ethylene-diamine-tetraacetic acid; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; GC, Gas chromatography; HDL, High density lipoprotein; LC, Liquid chromatography; LDL, Low density lipoprotein; LOD, Limit of detection; LOQ, Limit of quantification; MS, Mass spectrometry; NO, Nitric oxide; SD, Standard deviation; SDMA, Symmetrical dimethylarginine; SFE, Solid phase extraction; SBP, Systolic blood pressure.

\* Corresponding author. Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Auenbruggerplatz 19, 8036 Graz, Austria. Tel.: +43 316 385 83988; fax: +43 316 385 3419.

E-mail address: [andreas.meinitzer@klinikum-graz.at](mailto:andreas.meinitzer@klinikum-graz.at) (A. Meinitzer).

## 1. Introduction

Nitric oxide (NO) plays an important role in physiological functions by inhibiting key processes in vascular diseases [1]. Endothelial dysfunction as an early stage of atherosclerosis is a direct result of NO deficiency [2]. The endothelium-derived enzyme NO synthase converts the amino acid L-arginine into L-citrulline and nitric oxide. This process is inhibited by the endogenous molecule asymmetric dimethylarginine (ADMA) [3]. This parameter reflects a summary effect of various risk factors on endothelial health. High levels of ADMA seem to associate with the risk of acute vascular events [4]. It predicts total mortality in individuals with angiographically confirmed coronary artery disease [5]. ADMA and its inactive stereoisomer symmetric dimethylarginine (SDMA) are hydrolysis products of proteins with methylated arginine residues [6]. They are generated through the transfer of methyl groups from S-adenosyl-methionine [7].

Levels of dimethylarginines in patients and healthy subjects in different studies vary widely, even when similar methods are being used. The published values listed in Table 1 [8–20] demonstrate that differences are more than tenfold. How can these findings as well as large differences when compared with gold standard methods be explained?

Analytical-grade ADMA is readily available for standardization of methods. Slight differences may be explained by inaccuracies in initial weight of standards and higher deviation in sample sources. The differences might be due to the nature of the molecule, but they cannot yet be explained sufficiently.

In this study, we performed and documented our validation process as precisely as possible. We evaluated the method of Teerlink et al. [11] according to the guidelines of the US Department of Health and Human Services [21] and measured ADMA, arginine and arginine metabolites in plasma of 292 healthy male 20–75-year-old non-smoking volunteers after an overnight fast. The aim of this study was to establish reference values in a healthy population to provide a basis for comparison of the results for this marker in future studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Asymmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine hydrochloride, L-homo-arginine hydrochloride, phthalaldehyde, and the internal standard N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine acetate salt were provided by Sigma, St. Louis, Missouri, USA. 3-Mercaptopropionic acid was obtained from Aldrich, Steinheim, Germany, and symmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine dihydrochloride was obtained from Calbiochem, Darmstadt, Germany. Oasis MCX cation-exchange SPE columns (30 mg, 1 mL) were supplied by Waters (Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA). HPLC grade acetonitrile, HPLC grade methanol and all other chemicals were of analytical grade and were obtained from Merck, Darmstadt, Germany.

### 2.2. Equipment

A RapidTrace<sup>®</sup> automated solid phase extraction (SPE) system and the TurboVap LV Evaporator (Zymark Ruesselsheim, Germany) were used for the SPE procedure. The chromatographic equipment was a Chemstation system series 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, U.S.A.) comprising a programmable autosampler, a binary pump, a programmable switching valve and a programmable

Table 1  
Overview of ADMA results obtained by different methods

Author, year of publication (reference number)	Method	Group investigated healthy volunteers <i>n</i> , age range (y)	ADMA mean ± SD μmol/L
Petterson et al., 1997 [8]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 10 40 ± 2 y	0.58 ± 0.02
Boeger et al., 2001 [9]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 10	1.39 ± 0.20
Paiva et al., 2002 [10]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 47 35 ± 4 y	0.43 ± 0.12
Teerlink et al., 2002 [11]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 42	0.43 ± 0.06
Kielstein et al., 2003 [12]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 24 25 ± 1 y	1.30 ± 0.07
Kielstein et al., 2003 [12]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 24 69 ± 1 y	2.77 ± 0.12
Bae et al., 2005 [13]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 48 55 ± 7 y	1.57 ± 0.85
Teerlink, 2005 [14]	OPA pre-column fluorescence derivatization	<i>n</i> = 726 50–75 y	0.50 ± 0.06
Vishwanathan et al., 2000 [15].	LC-Tandem MS	<i>n</i> = 20	0.12 ± 0.04
Tsikas et al., 2003 [16]	GC-Tandem MS as methyl ester tri( <i>N</i> -penta-fluoro-propionyl) derivative	<i>n</i> = 12	0.39 ± 0.06
Albsmeier et al., 2004 [17]	GC-Tandem MS as methyl ester tri( <i>N</i> -penta-fluoro-propionyl) derivative	<i>n</i> = 10 29.7 ± 5.8 y	0.60 ± 0.08
Martens-Lobenhoffer et al., 2004 [18]	LC-Tandem MS with the isotope dilution technique	<i>n</i> = 15	0.45 ± 0.13
Schulze et al., 2005 [19]	ELISA	<i>n</i> = 500 19–75 y	0.69 ± 0.20 95% CI 0.36–1.17
Martens-Lobenhoffer et al., 2006 [20]	LC-Tandem MS with the isotope dilution technique	<i>n</i> = 47 20–56 y	0.355 ± 0.066

fluorescence detector (Merck-Hitachi, LaChrom L7480, Darmstadt, Germany). The column was a reversed phase type 4.6×250 mm (Agilent Zorbax SB C18, 5 µm).

### 2.3. Subjects

A total of 292 healthy male non-smoking (0 cigarette/day for more than 6 months) 20–75-year-old volunteers participating in the European Commission-funded VITAGE project (Vitamin A, Vitamin E and Carotenoid Status and Metabolism during Ageing: Functional and Nutritional Consequences) [22] were enrolled in Austria, Spain and France according to strict inclusion/exclusion criteria for being classified as healthy. All subjects were Caucasians. In every country the volunteers were distributed equally among 6 age groups. There were 18 to 20 volunteers for each of the following age groups: 20–29 years, 30–39 years, 40–49 years, 50–59 years, 60–69 years and 9 volunteers between 70–75 years, from whom EDTA plasma samples were obtained. Exclusion criteria were chronic diseases of the liver, lung, kidney, thyroid, inflammatory diseases, neurological diseases, dementia, heart disease (myocardial infarction in the last six months), stroke in the last six months, cancer, diabetes, familial hypercholesterolemia, alcoholism, infectious diseases (HIV, hepatitis C, influenza) and hypertension. The cut-off for exclusion of study subjects was defined as systolic blood pressure >90th percentile of NHANES II for the age groups 35–44 (>146.3 mm Hg), 45–54 (>158.4 mm Hg), 55–64 (>168.3 mm Hg), and 65–74 (>177.0 mm Hg) [23].

Further exclusion criteria were the intake of non-steroid anti-inflammatory drugs, diuretics, beta blockers, antiepileptics, hypolipidemic drugs, corticosteroids, analgesics and vitamins, as well as a body mass index higher than 30 or lower than 19. C-reactive protein over 6 mg/mL, more than 10% deviation from the normal values for blood counts, serum albumin lower than 35 g/L, fasting blood glucose >7 mmol/L, and values more than 10% above the normal range for gamma glutamyltransferase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinine and thyroid stimulating hormone were not acceptable. Mean laboratory and anthropometric parameters are shown in Table 2.

### 2.4. Standardization and quality control

Stock solutions of 1 mmol/L homo-arginine, ADMA and SDMA were prepared in 10 mM HCl and diluted to a combined working solution of 25 µmol/L homo-arginine and 5 µmol/L ADMA and SDMA with an extensively dialysed

serum pool from over 50 patients. Dialysis was performed against phosphate buffered saline. This pool was checked in a double volume that was free of analytes. Standard series were prepared in concentrations of 0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.25; and 1.5 µmol/L for ADMA and SDMA and 0; 1.25; 2.5; 3.75; 5; 6.25; and 7.5 µmol/L for homo-arginine, and frozen in aliquots. For quality control, we produced two pooled EDTA plasma samples: one from patients attending the gynaecological clinic, because we knew that the levels in these patients are always low (pooled control plasma in the low range), and another one from patients of the Department for Angiology, which we knew that they are always high (pooled control plasma in the high range). Aliquots of these controls were analyzed in each run after every five specimens. Before the series were performed, the controls were analyzed 10 times and the mean value was taken as the reference value.

### 2.5. Analytical methods

Routine biochemical parameters were measured by the clinical core laboratory of the University Hospital. ADMA concentrations in plasma were determined by an HPLC method with pre-column derivatization and fluorescence detection. The method published by Teerlink [11] was used with slight modifications. The main differences to the original method were (i) that washing and elution steps were performed by an automated solid phase extraction system, (ii) the SPE columns were preconditioned before use, (iii) the derivatisation process was done immediately before injection, and (iv) the calibration solutions were prepared with dialysed serum. The exact procedure was as follows: In a vial suitable for the automated system, 100 µL calibrator, sample or control serum were diluted with 900 µL phosphate buffered saline pH=7.2 and 20 µL internal standard (62.5 µM monomethylarginine in 20% methanol v/v) were added. After mixing, the vials were inserted and the Rapid Trace followed its automatic routine. The cartridges were first washed with 5 mL solution of (10/40/50; ammonium hydroxide (25% w/v)/bidistilled water/methanol; v/v/v) and 3 mL methanol followed by 2 mL phosphate buffered saline before loading with the diluted sample. Rinsing with 1 mL water was followed by 1 mL hydrochloric acid and 1 mL methanol. ADMA was eluted with 1 mL solution of (10/40/50; ammonium hydroxide (25% w/v)/bidistilled water/methanol; v/v/v). The loading and collecting speeds were 2 mL/min; all other steps were done with 20 mL/min. The eluate was blown dry with air and the residue dissolved with 100 µL water. The sample was derivatized with an automated autosampler. 50 µL of the dissolved residue were mixed with 50 µL o-phenyldiamine (o-PD) working solution. After a two-minute incubation, 10 µL of the resulting solution were injected. The stock solution for derivatization was prepared as follows: 10 mg o-PD was dissolved in 200 µL methanol; 1.8 mL borate buffer, 0.2 M pH=9.5, and 10 µL mercaptopropionic acid were added. This stock solution is stable for more than one week. A fresh five-fold dilution for the working solution with borate buffer was prepared daily. The SPE cartridges were used up to 10 times. Regeneration was performed using 5 mL solution of (10/40/50; ammonium hydroxide (25% w/v)/bidistilled water/methanol; v/v/v) before we apply the samples.

Data were acquired on the Chemstation version 08.04 (Agilent). The separation was done on a Waters Agilent Zorbax SB C18 5 µm 4.6×250; the flow rate was 1.5 mL/min at room temperature. The mobile phase consisted of 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6.5 and 9% (v/v) acetonitrile. After 25 min, the column was rinsed for 5 min with a mixture of 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6.5 and 50% (v/v) acetonitrile. After 5 min equilibration, the column was ready for the next injection. Compounds were detected with a fluorescence detector at excitation 340 nm and emission 455 nm.

### 2.6. Method validation

Validation was performed according to the procedures of the US Department of Health and Human Services [21].

#### 2.6.1. Linearity

Calibration curves were generated covering the working concentration ranges (see details in Table 3) using plasma which had been extensively dialysed against phosphate buffered saline, pH=7.2, as the matrix. For each curve, 5 different calibration points were used: For ADMA and SDMA: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 µmol/L; for homo-arginine: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 µmol/L, and for

Table 2  
Laboratory and anthropometric data (mean±standard deviation) of the study subjects according to age groups

Variable	Age groups	<35	35–50	50–65	>65
N		78	93	82	39
Age	y	26.7±4.0	41.6±4.2	57.5±4.2	69.6±3.3
BMI	kg m <sup>-2</sup>	23.6±2.61	25.3±2.73	25.4±2.44	26.1±2.07
SBP	mm Hg	126.7±11.3	126.0±11.3	132.7±13.1	141.8±14.5
DBP	mm Hg	77.4±9.5	82.0±9.7	84.1±7.2	81.8±7.9
Triglyceride	mmol/L	0.97±0.49	1.08±0.52	1.15±0.62	1.07±0.421
Cholesterol	mmol/L	4.45±0.73	4.97±0.82	5.51±1.06	5.58±1.03
HDL Chol	mmol/L	1.30±0.27	1.26±0.30	1.39±0.35	1.39±0.30
LDL Chol	mmol/L	2.27±0.56	2.63±0.55	2.99±0.75	3.08±0.72
ALT	U/L	18.4±12.80	20.6±9.71	19.5±8.38	18.5±8.68
AST	U/L	17.5±8.73	18.1±8.97	18.7±7.3	18.6±9.15
GGT	U/L	16.3±10.2	22.4±13.61	22.8±13.06	21.0±10.72
Creatinine	µmol/L	84.8±11.5	86.6±13.3	88.4±13.3	88.4±14.1
Uric acid	µmol/L	328±54	328±89	325±71	342±67
TSH	µU/ml	1.94±0.84	1.82±0.94	1.45±0.69	1.5±0.79
Glucose	mmol/L	4.87±0.50	5.05±0.54	5.31±0.67	5.46±0.71

Abbreviations: ALT=Alanine aminotransferase; AST=Aspartate aminotransferase; BMI=body mass index; DBP=diastolic blood pressure; GGT=Gamma-glutamyltransferase; HDL=high density lipoprotein; LDL=low density lipoprotein; SBP=systolic blood pressure; TSH=Thyroid stimulating hormone, y=years.

Table 3  
Characteristics of the analytical method

	Arginine		Homo-arginine		ADMA		SDMA	
Working range [ $\mu\text{M}$ ]	25–125		0.25–12.5		0.1–1.25		0.1–1.25	
<i>Calibration curve</i>								
Slope	156.3		21.1		26.9		25.9	
Intercept	–1.215		–0.100		0.007		0.011	
Correlation $r^2$	0.990		0.993		0.999		0.998	
SD of the regression line	4.20		0.35		0.02		0.02	
Intra-day precision $n=6$	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Mean [ $\mu\text{M}$ ]	82.9	75.6	1.21	3.53	0.77	0.58	1.00	0.60
SD [ $\mu\text{M}$ ]	3.13	5.5	0.06	0.08	0.01	0.01	0.02	0.03
Coefficient of variation [%]	3.8	7.3	4.7	2.2	1.4	2.1	1.9	4.6
<i>Inter-day precision <math>n=20</math></i>								
Mean [ $\mu\text{M}$ ]	85.0		77.78		1.25		3.66	
SD [ $\mu\text{M}$ ]	4.92		4.92		0.09		0.25	
Inter day variability [%]	5.8		6.3		7.9		6.8	
<i>Inter-person variability of standardization</i>								
Results of control samples ( $n=5$ ) with two independent calibrations	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Mean value 1 [ $\mu\text{M}$ ]	82.92	75.57	1.21	3.53	0.77	0.58	1.00	0.59
Mean value 2 [ $\mu\text{M}$ ]	87.18	79.91	1.28	3.40	0.79	0.61	1.03	0.63
$t$ -test	0.163	0.221	0.112	0.102	0.061	0.056	0.301	0.130
Significance level 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Recovery (mean extraction efficiency) [%]</i>								
Internal standard 97.4%	97.0		77.1		99.8		99.8	
Limit of quantification (LOQ) [ $\mu\text{M}$ ]	10		1.0		0.10		0.10	
SD [ $\mu\text{M}$ ]	0.984		0.069		0.004		0.007	
Coefficient of variation [%]	8.7		7.4		3.3		6.1	
<i>Limit of detection</i>								
(LOD) [ $\mu\text{M}$ ] 3-fold SD of the Baseline noise	0.11		0.17		0.05		0.05	
Stability in the matrix tested	Two days		Two days		Two days		Two days	

Abbreviations: C1 control low, C2 control high.

arginine 0, 25, 50, 75, 100, 125  $\mu\text{mol/L}$ . Linear calibration curves were constructed by plotting the ratios of peak heights of the analyte divided by the corresponding internal standard against the concentration of each compound. The data from the standard curves were analyzed using regression analysis to obtain the slopes, the intercepts and correlation coefficients.

#### 2.6.2. Imprecision and recovery

The within- and between-day imprecision were assessed by performing at least 6 replicate analyses of quality control samples from the 2 different patient pools in a low and high range. The recoveries of ADMA, SDMA and homo-arginine were determined twice at 3 concentrations by calculating the percentage difference between the peak heights of extracted analytes and those of the same amount of authentic pure substance added to the different patient pools.

#### 2.6.3. Limit of detection

The limit of the detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined by decreasing concentrations of the compounds added to the blank matrices. The LOD was defined as the lowest concentration that produced a response three times the background noise. The LOQ was defined as the lowest concentration that was possible to quantify at an imprecision of <10%, and was established as the lowest calibration point of the calibration graph.

#### 2.6.4. Accuracy

Commercial human plasma control samples or certified reference standards in the matrix were not available. Therefore, determination of the closeness of an agreement between the measured value of the analyte and its “true” value was not possible.

However, measurement of recovery is an effective means of obtaining accuracy information because it tests whether the method can measure the analyte in the presence of all the other compounds that are contained in the matrices of authentic samples.

In addition, to ensure that standardization was well done, the interperson variability was tested. A second person independently spiked matrix samples with pure substances for a second calibration curve. The quality control samples in the low and high ranges were analysed at least 5 times with both calibration curves and results were calculated with the mean value  $t$ -test for significant differences. When there was a deviation, the standardisation procedure was checked and repeated. The reason for this time-consuming process was the unexplained large differences in normal levels in the literature. Standardization was a very critical point and it took a long time until the deviation was in the acceptable range but we feel it was necessary for comparability.

#### 2.6.5. Stability of samples

As specimens are usually handled and transported to the laboratory at room temperature, we also investigated stability at room temperature. If there is a stability problem, it is easier to see at room temperature, which is the worst condition for the specimens. We thus tested three patient samples stored at room temperature with daylight exposure. They were analyzed after time intervals of 1, 3, 4 and 8 days. An analyte was considered stable when the measured concentration was in the range of the inter-day standard deviation of the method.

#### 2.7. Statistics

In accordance with the NCCLS Guideline [21] on how to define and determine reference intervals in clinical chemistry and the recommendations of

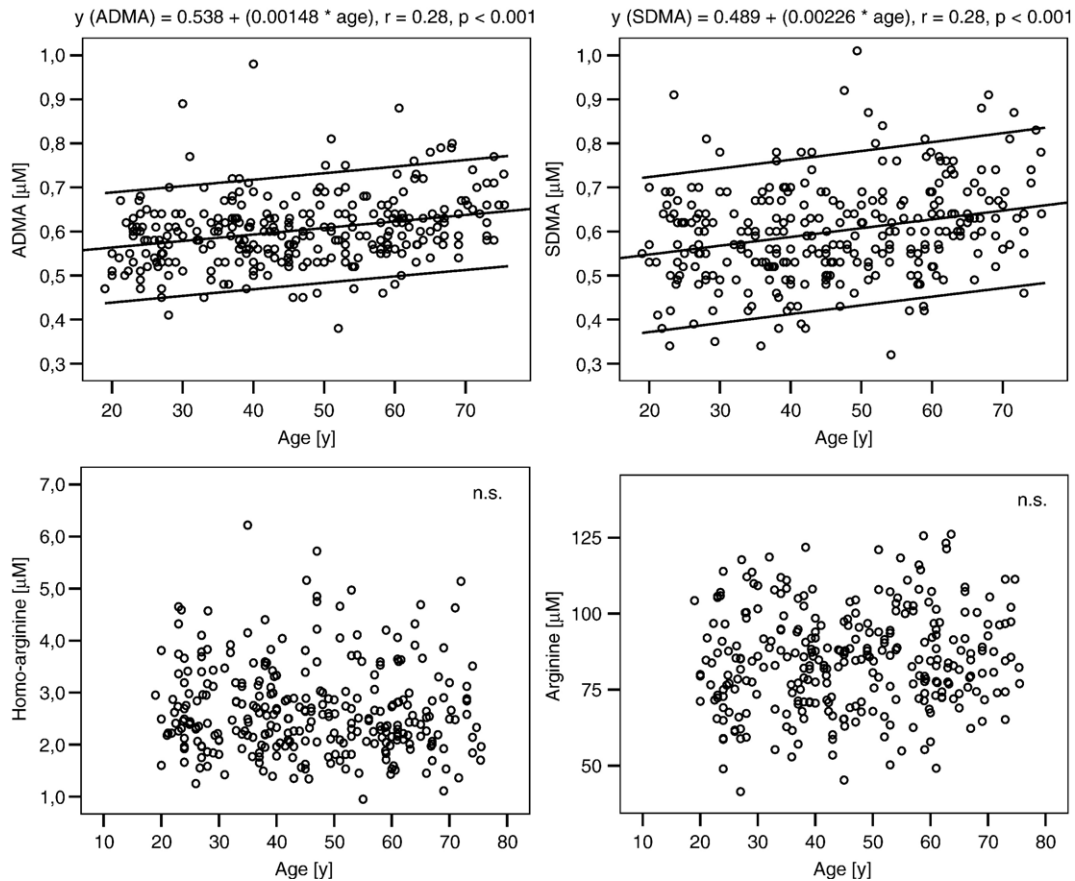


Fig. 1. Scatter plot showing the age-dependent evolution of ADMA, SDMA, homo-arginine and arginine including the 95% confidence intervals.

Solberg and Royston [24], we analysed the data with the SPSS 11.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and NCCS power analysis software (Kaysville, Utah; USA). Gaussian distribution was performed with the Kolmogorov–Smirnov test. Age-group differences were identified with the non-parametric Kruskal–Wallis test (for independent samples). The post hoc test between medians of the groups was calculated with the NCCS® statistical software version 2004. All statistical tests were two-sided.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**3. Results**

*3.1. Method*

In Table 3 the characteristics of the analytical method as a result of the method evaluation are presented. Calibration curves were linear throughout the selected ranges and the coefficient of determination ( $r^2$ ) always exceeded 0.990. The recovery and imprecision results were highly satisfactory. The limit of detection and the limit of quantification are far below the lowest measured values. The validation data show that the method works for creating comparable reference values. There was no significant difference between plasma and serum in ADMA, SDMA, and homo-arginine, but for arginine serum concentrations were significantly higher than plasma concentrations (approximately by a factor of 2). For the determination of the reference values, we used exclusively EDTA plasma samples.

All study subjects were enrolled prospectively and had to meet the inclusion/exclusion criteria that were preset in the study protocol. The 6-month post-infarction or post-stroke period was the minimum period to qualify them as eligible, but in fact none of subjects had myocardial infarction or stroke at any time.

Table 4  
Reference range of four groups according to age

Group	1	2	3	4	
<i>n</i>	78	93	82	39	
Age [y], mean±SD	26.7±4.0	41.6±4.0	57.5±4.2	69.6±3.3	
Age [y]	<35	35–50	50–65	>65	
	Percentile				
ADMA [µM]	2.5	0.43	0.45	0.46	0.54
	50.0	0.58	0.59	0.61*	0.64*
	97.5	0.69	0.73	0.78	0.79
SDMA [µM]	2.5	0.25	0.27	0.30	0.33
	Median	0.57	0.56	0.60*	0.64*
	97.5	0.81	0.88	0.84	0.88
h-Arginine [µM]	2.5	1.42	1.38	1.43	1.11
	Median	2.48	2.58	2.37	2.49
	97.5	4.62	5.29	4.69	4.68
Arginine [µM]	2.5	45.8	53.4	50.8	62.3
	Median	84.6	84.1	84.7	85.7
	97.5	115.5	113.4	125.4	118.3

\*Medians significantly different in the Bonferroni test in comparison to groups 1 and 2.

### 3.2. Reference values

The age-dependent evolution of ADMA, SDMA, homo-arginine and arginine concentrations of 292 male non-smoking study subjects, including the 95% confidence intervals, is presented in Fig. 1. There was a significant increase with age in ADMA and SDMA, while this was not the case for arginine and homo-arginine.

To analyse differences between age groups, the study participants were divided according to age into four groups (group 1: age below 35 years; group 2: 35–49 years; group 3: 50–64 years; group 4: above 65 years). Since the data were not normally distributed, we used the non-parametric Kruskal–Wallis test, which showed significant differences between the age groups. The post hoc test of ADMA and SDMA concentrations showed no significant differences between the groups 1 and 2. ADMA concentrations in group 3 were significantly higher than in group 1, and ADMA concentrations in group 4 were significantly higher than in all the other age groups. The SDMA results showed a similar trend. Comparison of the arginine and homo-arginine values between the groups showed no significant differences. The reference values of each group contain the 95% fraction of the distribution of the measurement values in the study population and extend from the 2.5th to the 97.5th percentile (shown in Table 4).

## 4. Discussion

Owing to the increasing number of reports in the literature, clinical laboratories attempted to apply ADMA as a possibly useful marker into routine analysis. The interpretation is difficult as long as reference values are not available. We adapted a published method after a rigorous evaluation process in our laboratory and investigated a healthy population. Even though there is no difference in ADMA, SDMA, and homo-arginine results between plasma and serum, in contrast to arginine, we used EDTA plasma samples throughout. The parameters are all highly stable and variations of the results when samples were stored at room temperature for up to 8 days were in the range of the inter-day variability. However, we do not recommend to store human plasma samples at room temperature for several days. Consequently, to be on the safe side, stability data of the samples was provided only for two days. For saving costs, we used the SPE cartridges up to 10 times. The SPE cartridges could be used even longer, but we prefer to exchange it after use of a maximum of 10 times, because we have observed that back pressure might start to increase after 10 times use. This is also the reason why automatic sample preparation is not possible.

Our focus was mainly on ADMA, but to increase the applicability of the method, we also determined arginine, homo-arginine and SDMA. Arginine concentrations are useful for identifying arginine supplemented patients and for comparing concentrations of SDMA with ADMA for further metabolic studies.

The concentrations of the endogenously present *N*-methyl-L-arginine, which was also used as internal standard, were in the range of 0.16 and 0.27  $\mu\text{M}$  (data not shown). The difference of

0.11  $\mu\text{M}$  that could have influenced the concentrations of *N*-methyl-L-arginine as the internal standard (final concentration 12.5  $\mu\text{M}$ ) would thus have been smaller than 1%. The use of homo-arginine, which is endogenously present at a concentration of 0.90 to 6.2  $\mu\text{M}$ , in other publications [25] clearly would introduce higher deviations.

Differences between the age groups are very small. A remarkable increase in concentrations of ADMA is only seen in the oldest group. Our findings regarding ADMA concentrations are in agreement with those of Albsmeier et al. [17] who, with gas chromatography-tandem mass spectrometry, found  $0.60 \pm 0.076 \mu\text{mol/L}$  of ADMA as methyl ester tri(*N*-pentafluoropropionyl) derivative in 10 healthy volunteers (age:  $29.7 \pm 5.8$ ). Our results are higher than those of Teerlink et al. [11], whose method we used with slight modifications. This group reported  $0.43 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$  in 42 healthy volunteers.

The inactive stereoisomer SDMA shows the same progression with increasing age. ADMA and SDMA have quite similar synthesis steps but different degradation routes. Both may be eliminated renally. ADMA has an additional metabolic pathway via dimethylarginine dimethylaminohydrolase [26,27]. Considering that over 90% of ADMA is metabolized this way [28,29], it is interesting that concentrations of SDMA and ADMA are approximately equal in healthy subjects. In patients with chronic renal failure, SDMA concentrations increase tenfold, while ADMA concentrations double [30–32]. SDMA shows a better correlation to creatinine than ADMA [30].

Homo-arginine has another source and for that reason it is not comparable with ADMA and SDMA. It may be formed from lysine through a homologous urea cycle in which arginine is replaced by lysine [33]. Homo-arginine, together with arginine, did not show an age dependency in the present study.

There is a high variability of ADMA values in healthy subjects. Experimental studies loaded healthy subjects with homocysteine. One study reported a selective increase in ADMA concentrations in experimental hyperhomocysteinemia [9]. A second study by Stuhlinger [34] verified these findings in young healthy individuals. After oral methionine loading, ADMA levels increased significantly from  $1.0 \pm 0.20 \mu\text{mol/L}$  to  $1.6 \pm 0.20 \mu\text{mol/L}$ . Another group [35] found only slight elevations, i.e. an increase from baseline levels of  $0.70 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$  to  $0.76 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$ . In both studies SDMA levels remained unchanged. A recent study by Doshi [36] showed in a similar experiment conducted in a carefully selected group of healthy subjects with baseline ADMA levels of  $0.55 \pm 0.037 \mu\text{mol/L}$  no significant increase after methionine loading. The increase in ADMA levels seems to be dependent on baseline levels. We cannot explain these differences in findings of high baselines in healthy subjects, particularly when the same analytical methodology is used.

Associations between increased ADMA levels and different cardiovascular risk factors such as hypertension [37], diabetes [38], insulin resistance [39], hypercholesterolemia [25], hypertriglyceridemia [40] and hyperhomocysteinemia [41] have been documented in the literature. Elevated circulating ADMA concentrations may contribute to an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality [5].

A limitation of this study is the fact that only healthy male subjects have been investigated and therefore the reference ranges can reliably be used for males only. Reference values for female subjects should be established as well, taking into account additional determinants such as hormonal influences, given that a recent publication showed a significant difference in ADMA concentration in females aged below or above age 50 years, the average age of menopause [19]. We applied the NHANES II percentile values for blood pressure using the 90th percentile as the cut-off for exclusion [23]. However, this allows that subjects have been included in the present study who were free of disease but had blood pressure values that are regarded as hypertensive. On the other hand, it would also allow for use of these reference values in the general population.

The differences in reference values reported previously could be explained by analytical differences. It is essential that the analytical steps be done with highest precision. The differences between patient groups are often very small and only with large numbers of cases can significant differences be detected. For the future, we recommend that an international proficiency scheme be introduced.

### Acknowledgements

We thank Mrs. Gabriele Gartner, Graz (Austria), for excellent technical assistance and the VITAGE Study Teams in Graz (Austria), Reus (Spain), and Clermont-Ferrand (France), for patient recruitment, and sample and data handling.

This study was carried out with financial support of the Commission of the European Communities, specific RTD programme “Quality of Life and Management of Living Resources”, QLK1-CT-1999-00830, VITAGE. It does not necessarily reflect its views and in no way anticipates the Commission’s future policy in this area. Additional financial support from Roche Vitamins Europe (now: DSM Nutritional Products), Basel, Switzerland, and the Austrian Government (bm:bwk) is gratefully acknowledged.

### References

- [1] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
- [2] Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546–9.
- [3] 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;339:572–5.
- [4] Valkonen VP, Laaksonen R. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin Chim Acta* 2004;348:9–17.
- [5] Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *Clin Chem* 2007;53:273–83.
- [6] Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:542–8.
- [7] Ghosh SK, Paik WK, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem* 1988;263:19024–33.
- [8] Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692:257–62.
- [9] Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:161–7.
- [10] Paiva H, Laakso J, Laine H, Laaksonen R, Knuuti J, Raitakari OT. Plasma asymmetric dimethylarginine and hyperemic myocardial blood flow in young subjects with borderline hypertension or familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1241–7.
- [11] Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131–7.
- [12] Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003;107:1891–5.
- [13] Bae SW, Stuhlinger MC, Yoo HS, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005;95:729–33.
- [14] Teerlink T. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1130–8.
- [15] Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:157–66.
- [16] Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frolich 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 Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;798:87–99.
- [17] Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Boger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2004;809:59–65.
- [18] Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Boger SM. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J Mass Spectrom* 2004;39:1287–94.
- [19] Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005;35:622–6.
- [20] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:61–8.
- [21] Guidance, for, industry. Bioanalytical method validation, us department of health and human services, food and drug administration, center for drug evaluation and research (CDER), center for biologics evaluation and research (CBER); May 2001.
- [22] Rock E, Winklhofer-Roob BM, Ribalta J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:70–3.
- [23] Kumanyika SK, Landis JR, Matthews-Cook YL, Almy SL, Boehmer SJ. Systolic blood pressure trends in US adults between 1960 and 1980: influence of antihypertensive drug therapy. *Am J Epidemiol* 1998;148:528–38.
- [24] Solberg HE. International federation of clinical chemistry (IFCC), scientific committee, clinical section, expert panel on theory of reference values, and international committee for standardization in haematology (ICSH), standing committee on reference values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337–42.
- [25] Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842–7.

- [26] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:671–7.
- [27] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205–9.
- [28] Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4:33–40.
- [29] Leiper JM. The DDAH-ADMA-NOS pathway. *Ther Drug Monit* 2005;27:744–6.
- [30] Marescau B, Nagels G, Possemiers I, et al. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism* 1997;46:1024–31.
- [31] Anderstam B, Katzarski K, Bergstrom J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1437–42.
- [32] Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003;336:1–12.
- [33] Ryan WL, Wells IC. Homocitrulline and homoarginine synthesis from lysine. *Science* 1964;144:1122–7.
- [34] Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933–8.
- [35] Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:347–53.
- [36] Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, et al. Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism* 2005;54:351–60.
- [37] Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652–8.
- [38] Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201–3.
- [39] Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama* 2002;287:1420–6.
- [40] Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111–6.
- [41] Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001;158:425–30.

## Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA): ein neuer Marker zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos

Asymmetric dimethyl arginine (ADMA): a new marker for evaluating cardiovascular risk

Andreas Meinitzer<sup>1,\*</sup> und Winfried März<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Auenbruggerplatz 29, 8036 Graz, Austria

<sup>2</sup> Synlab Zentrum für Laboratoriumsdiagnostik Heidelberg, PO Box 10 47 80, D-69037 Heidelberg, Germany

### Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist eine endogen produzierte Aminosäure, die alle drei Isoformen der Stickoxid-Synthase inhibiert. Eine Erhöhung von ADMA in den Endothelzellen schränkt die Freisetzung des relaxierenden Signalmoleküls Stickstoffmonoxid ein und könnte damit die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen begünstigen. Als gut abgesichert gilt, dass ADMA in verschiedenen Krankheitsstadien von chronischer Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit (KHK) im Plasma kumuliert. ADMA liegt im Plasma in niedriger Konzentration und neben sehr viel höher konzentrierten, strukturell ähnlichen Substanzen vor. Die Bestimmung ist deshalb eine analytische Herausforderung. Die Beurteilung einer pathologischen Konzentration sollte immer im Vergleich mit einer adäquaten Kontrollgruppe erfolgen, die mit identischer Methodik analysiert wurde. Der vorliegende Artikel fasst den aktuellen Wissensstand über die biologische Wirkung, die Entstehung, den Metabolismus und die Elimination von ADMA zusammen. Anhand eigener Befunde wird weiterhin auf die Bedeutung von ADMA als Prognosefaktor für kardiovaskuläre Mortalität und Gesamtmortalität eingegangen.

**Schlüsselwörter:** Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA); Atherosklerose; Biomarker; endotheliale Dysfunktion; kardiovaskuläres Risiko; Stickstoffmonoxid.

\*Korrespondenz: Mag. Andreas Meinitzer, Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Auenbruggerplatz 29, 8036 Graz, Österreich  
Tel.: +43 316 385 3988  
Fax: +43 316 385 3419  
E-mail: andreas.meinitzer@klinikum-graz.at

### Abstract

Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) is an endogenous amino acid that inhibits all three isoforms of nitric oxide synthase. High concentrations of ADMA in endothelial cells interfere with release of the vasodilator signalling molecule nitric oxide and may therefore facilitate the development of atherosclerotic lesions. It has been shown that ADMA accumulates in plasma in parallel with the progression of chronic renal failure, diabetes mellitus, hypertension and coronary artery disease. The concentration of ADMA in plasma is low, while a number of structurally similar compounds occur at much higher concentrations. Determination of ADMA hence remains an analytical challenge. Pathological concentrations should always be considered by comparison with a suitable control group in which ADMA has been determined using identical methodology. This article summarizes the current state of knowledge on the biological effects, production, metabolism and elimination of ADMA. Exemplified by original results, the importance of ADMA as a prognostic factor for cardiovascular and total mortality is discussed.

**Keywords:** atherosclerosis; asymmetric dimethyl arginine (ADMA); biomarker; cardiovascular risk; coronary artery disease; endothelial dysfunction; nitric oxide.

### NO-Freisetzung

Die fundamentale Erkenntnis, dass gasförmiges Stickstoffmonoxid (NO) die Relaxation der glatten Muskulatur beeinflusst, war ein Meilenstein in der kardiovaskulären Medizin und wurde mit der Verleihung des Nobelpreises an Furchgott, Ignarro und Murad gewürdigt [1, 2]. Die Bildung des NO erfolgt durch die NO-Synthase (NOS) welche Arginin und Sauerstoff zu NO und Citrullin umsetzt [3, 4]. Als Co-Faktoren werden Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat (NADP), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin benötigt [5]. Drei Isoformen konnten identifiziert werden.

- a. Die neuronale (nNOS oder Typ I NOS) befindet sich im zentralen und peripheren Nervensystem und wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin reguliert.
- b. Die induzierbare Form (iNOS oder Typ II NOS) kann durch Lipopolysaccharide und Zytokine in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen aktiviert werden und produziert große Mengen NO, die zytostatische Effekte auf parasitäre Mikroorganismen und Tumorzellen ausüben.
- c. Die Isoform III der NO-Synthase (eNOS) kommt in Endothelzellen vor und wird durch Agonisten wie Bradykinin, Acetylcholin oder Östrogene aktiviert. In Arterienabschnitten, in denen es zu Verwirbelungen des Blutstroms kommt, wird diese Isoform verstärkt exprimiert. NO aus Endothelzellen stellt Blutgefäße weit und verhindert die Thrombozytenaggregation [6, 7].

### Beeinflussung der NO-Synthase

Die Freisetzung von NO wird durch endogen gebildete methylierte Arginine beeinflusst. Als besonders effektive Inhibitoren für alle drei Isoformen haben sich  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (NMMA) und  $\text{N}^{\text{G}^1}$ ,  $\text{N}^{\text{G}^1}$ -Dimethylarginin (ADMA) herausgestellt. Das Strukturisomer  $\text{N}^{\text{G}^1}$ ,  $\text{N}^{\text{G}^2}$ -Dimethylarginin (SDMA) ist wirkungslos [1].

### Generierung von methylierten Argininen

Die Methylierung von proteingebundenen Argininen ist ein seit langem bekannter Prozess, dessen Bedeutung noch nicht ausreichend verstanden ist [8]. Funktionell relevant ist sie vor allem für Zellkernprozesse wie RNA-Prozessierung, transkriptionelle Regulation und Reparatur von DNA-Schäden [9, 10]. Die höchsten Konzentrationen an ADMA werden mit 2,8 nmol/g Protein in der grauen Substanz der menschlichen Hirnrinde gefunden, während in den restlichen Hirnregionen nur 0,5 nmol/g Protein vorhanden sind [11]. In Hydrolysaten von Herz- und Nierengewebe werden etwa 1,1 bzw. 1,4 nmol/g Protein gefunden. Das inaktive Strukturisomer SDMA kommt in vergleichsweise niedriger Konzentration von 1 nmol/g im Gehirn, 0,2 nmol/g im Herz und 0,3 nmol/g in der Niere vor.

Die Methylierung der Arginine wird von Proteinarginin N-Methyltransferasen (PRMT), die S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator benötigen, katalysiert. Alle PRMT Isotypen methylieren Arginin zu NMMA, während nur PRMT I die Dimethylierung zu ADMA und PRMT II die Reaktion zu SDMA katalysiert [10, 12]. Proteasen und Peptidasen setzen die methylierten Arginine ins Cytosol frei. Die Kinetik der Freisetzung ist vom Zelltyp und dessen Lebensdauer abhängig. Weiterhin spielt die funktionelle Beanspruchung vermutlich eine Rolle. An Verzweigungen von Arterien stimulieren Turbulenzen einen höheren Umsatz von Endothelzellen und eine gesteigerte Freisetzung von ADMA [13, 14].

### In-vitro-Effekte von ADMA

Die aktiven methylierten Arginine kompetieren um die Bindungsstelle der NO-Synthase für Arginin, wie Versuche an kultivierten Zellen zeigen. Die inhibierende Wirkung von ADMA (0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ ) auf die NO-Bildung in Endothelzellen wird durch Zugabe von hohen Konzentrationen an Arginin (1000  $\mu\text{M}$ ) wieder aufgehoben. Die Adhäsion mononukleärer Leukozyten an der Endothelzellmembran, die mit steigender ADMA-Konzentration zunimmt, kann ebenfalls durch Arginin wieder rückgängig gemacht werden [15]. ADMA hemmt signifikant das Zellwachstum von kultivierten menschlichen Endothelzellen und beschleunigt den „Prozess des Alterns“, wie anhand von Aktivitätsmessungen der alterungsabhängigen  $\beta$ -Galactosidase demonstriert wurde [16]. Sowohl der Hemmeffekt als auch der Alterungseffekt ist durch Arginin beeinflussbar. Auch in anderen Zelltypen ist ADMA aktiv. In Konzentrationen zwischen 5 bis 500  $\mu\text{mol/L}$  inhibiert es die Osteoblastendifferenzierung durch Verminderung der Freisetzung von NO [17]. In mikrovaskulären dermalen Endothelzellen menschlichen Ursprungs wurde die NOS-Aktivität bei 2,5  $\mu\text{M}$  ADMA im Zellüberstand signifikant unterdrückt, während bei 1  $\mu\text{M}$  noch keine Beeinträchtigung feststellbar war [18]. Neuere Untersuchungen mit kultivierten Endothelzellen zeigten auch einen möglichen indirekten Einfluss von SDMA auf die NO-Synthese. SDMA-Konzentrationen von 2, 5, 10, 100  $\mu\text{M}$  sollen einen Mangel an Arginin für die NO-Synthase auslösen [19].

### In-vivo-Effekte von ADMA

Alle drei Argininsubtypen (NMMA, ADMA, SDMA) sind endogen als Hydrolyseprodukte des Proteinumsatzes in verschiedenen Flüssigkeitskompartimenten in unterschiedlicher Konzentration vorhanden. ADMA ist im Plasma zehnfach höher konzentriert als NMMA. Deshalb wird angenommen, dass es ein höheres „Regulationspotential“ hat. Als Bolus intravenös appliziertes ADMA (3 mg/kg) erhöhte in einer Studie bei gesunden Erwachsenen den systemischen Gefäßwiderstand (24%) und den arteriellen Blutdruck (6%). Der Puls und das Herzminutenvolumen sanken ab. Diese Effekte traten bei einer pathologischen Konzentration von 2,6  $\mu\text{M}$  ADMA im Plasma auf [20]. Der Einfluss auf den arteriellen Blutdruck wurde in Experimenten an gesunden nicht rauchenden Männern mit konstanten Infusionen von 12,5  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  bis 250  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ADMA bestätigt [21]. Die Erhöhung des arteriellen Drucks betrug etwa 5%, obwohl die Plasmakonzentration bis 23  $\mu\text{M}$  erreichte, was etwa der zehnfachen Konzentration entspricht [20]. Der systemische Gefäßwiderstand stieg um 15%. Der renale Plasmafluss verringerte sich um 15%, während die glomeruläre Filtrationsrate unverändert blieb. In-vivo-Versuche an gesunden Probanden wurden bereits 1992 durchgeführt. Bei lokaler Infusion

von etwa  $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  in die Oberarmarterie wurde ein Abfall des Oberarmblutflusses um 8% nachgewiesen. Die Blutdruckwerte wurden in der Arbeit nicht gezeigt [22]. Neuere Untersuchungen zeigten bei konstanter Infusion von  $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ADMA eine verminderte Dehnbarkeit der Arterien und eine signifikante Abnahme der zerebralen Durchblutung [23]. Im Tierexperiment werden ähnliche, in Relation jedoch ausgeprägtere Effekte, gemessen. Fortwährende ADMA-Infusionen in den Herzmuskel induzieren mikrovaskuläre Läsionen sowohl bei Wildtyp- als auch bei NOs-knockout-Mäusen [24]. Eine Zusammenfassung aller In-vivo-Versuche der letzten 15 Jahre wurde unlängst publiziert [25].

### Elimination der methylierten Arginine

Alle drei Methylarginine können im Urin nachgewiesen werden [26]. Während für SDMA die renale Elimination den einzigen Abbauweg darstellt, spaltet das Enzym  $\text{N}^G$ ,  $\text{N}^G$ -Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) ADMA und NMMA in Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin [27]. Dieses Enzym wird in hoher Konzentration in der Leber, in der Niere, im Gehirn und in der Aorta gefunden. Interessanterweise sind DDAH und NOS gemeinsam in den verschiedenen Zelltypen lokalisiert. Dies könnte auf eine aktive zelluläre Regulation hindeuten [28, 29].

Im Vergleich zu anderen Enzymen fällt der hohe Km-Wert von ca.  $180 \mu\text{mol/L}$  der DDAH auf. Es wurde an Gewebehomogenaten der Niere gezeigt, dass die DDAH-Aktivität mit der ADMA-Konzentration korreliert [30]. Hohe ADMA-Konzentrationen werden sehr rasch abgebaut, niedrige ADMA-Konzentrationen bleiben bestehen. Bei Hemmung der DDAH steigen als Folge der raschen Proteolyse von Proteinen mit methylierten Argininen die ADMA-Konzentrationen sehr stark an. Intrazellulär nicht abgebautes ADMA gelangt über den kationischen Aminosäuretransporter aus der Zelle in das zirkulierende Blut und wird auch zu anderen Organen transportiert. Die DDAH der Leber baut etwa 30% des durchströmenden ADMA ab, wie Messungen an der Pfortader und der hepatischen Vene ergaben, die Niere zeigt prozentual eine noch etwas höhere Abbauleistung [31].

### ADMA und chronische Niereninsuffizienz

Etwa 80% der täglich produzierten ADMA-Menge von ca.  $300 \mu\text{mol}$  werden durch die DDAH zu Citrullin umgebaut, nur ein kleiner Teil wird über den Urin eliminiert [20]. Trotzdem wurden Erhöhungen der Methylarginine im Plasma erstmals bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gesehen [22]. Vallance et al. bestimmten die Summe von ADMA und SDMA bei männlichen Hämodialysepatienten mit  $8,7 (\pm 0,7) \mu\text{M}$ . Davon ist allerdings der überwiegende Teil SDMA, wie später festgestellt wurde. Eine andere Arbeit berichtete von Dialysepatienten, die Mittelwerte von ADMA  $0,70 (\pm 0,3)$  und von SDMA  $2,85$

$(\pm 0,77) \mu\text{M}$  aufwiesen [32]. Weitere Ergebnisse in Studien bei ähnlichen Patienten waren ADMA- und SDMA-Konzentrationen von  $1,05 (\pm 0,04) \mu\text{M}$  und  $2,68 (\pm 0,13) \mu\text{M}$  [33, 34]; eine andere Arbeit fand bei Patienten mit Niereninsuffizienz Werte um  $0,86 \mu\text{M}$  ADMA und  $2,17 \mu\text{M}$  SDMA [35]. Auffallend hoch waren die ermittelten ADMA-Konzentrationen von Hämodialysepatienten, die eine mittlere ADMA-Konzentration von  $2,52 \mu\text{M}$  aufwiesen [36], während das SDMA mit  $3,01 \mu\text{M}$  durchaus vergleichbar mit anderen Arbeiten war. In einer Arbeit ist ein sehr eindrucksvoller Zusammenhang von ADMA mit Norepinephrin bei 220 Hämodialysepatienten beschrieben; auch hier finden sich relativ hohe Konzentrationen an ADMA [36, 37]. Bei Lebererkrankungen im Endstadium wurden mit  $5,3 \mu\text{M}$  die höchsten Konzentrationen von ADMA bei niedrigen SDMA-Werten ( $0,53 \mu\text{M}$ ) gefunden [38]. In einer Studie fand man an Intensivpatienten mit hepatischer Dysfunktion ADMA-Konzentrationen von  $1,05$  bis  $1,83 \mu\text{M}$  und SDMA-Werte von  $1,55$  bis  $3,15 \mu\text{M}$  [35].

### ADMA – ein Indikator für endotheliale Dysfunktion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Pathophysiologische Untersuchungen zeigen, dass fehlendes Stickstoffmonoxid eine der Folgen der endothelialen Dysfunktion ist. Der Zusammenhang zwischen ADMA, Atherosklerose und kardiovaskulärem Risiko wurde in mehreren Studien untersucht. Die Intima Media Dicke (IMT) der A. carotis als bedeutender prädiktiver Parameter zur Abschätzung des Herzinfarkt- und Schlaganfallrisikos zeigte in einer Studie an 116 gesunden Probanden, die ohne Symptome einer koronaren oder peripheren Gefäßerkrankung waren, einen starken Zusammenhang mit der ADMA-Konzentration [39]. Die Indikatorfunktion von ADMA wird auch durch eine finnische prospektive Kohortenstudie an 150 Männern getragen, bei der Patienten mit ADMA-Konzentrationen in der höchsten Quartile ( $> 0,62 \mu\text{M}$ ) ein vierfach höheres Risiko für koronare Ereignisse hatten als Patienten in den niedrigeren Quartilen [40]. In einer Studie an 1908 deutschen Patienten mit angiografisch gesicherter koronarer Herzerkrankung konnte ein 2,5-fach erhöhtes Risiko für koronare Ereignisse festgestellt werden, wenn die ADMA-Konzentration über  $0,70 \mu\text{M}$  betrug [41]. In einer Studie an 225 Hämodialysepatienten, die über einen mittleren Zeitraum von 2,8 Jahren beobachtet wurden, stand ADMA nach Diabetes mellitus und Fibrinogen an dritter Stelle als Vorhersagefaktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Im proportionalen Cox-Hazardmodell stieg die Hazard Ratio für kardiovaskuläre Ereignisse um 1,17 pro  $1 \mu\text{M}$  ADMA (Konfidenzintervall  $1,04$ – $1,33$ ,  $p=0,008$ ) [36, 42]. Ein konträres Ergebnis ergab eine Studie an 200 Patienten mit chronischem Nierenversagen, die nach 24 Monaten eine um 7% geringere Inzidenzrate kardiovaskulärer Ereignisse in der höchsten Quartile der ADMA-Konzen-

trationen ( $>1,17 \mu\text{M}$ ) fand, verglichen mit der niedrigsten Quartile ( $<0,73 \mu\text{M}$ ) [43].

### ADMA und Mortalität

In einer prospektiven Kohortenstudie an 225 Hämodialysepatienten wurde der Zusammenhang zwischen ADMA und Mortalität untersucht [36]. Die Hazard Ratios, berechnet nach einer Beobachtungszeit von 2,8 Jahren, in der dritten und vierten Quartile der ADMA-Konzentration, betragen 1,72 und 3,11, verglichen mit der ersten und zweiten Quartile. Eine weitere Publikation dieser Arbeitsgruppe, mit einem ähnlichen Patientenkollektiv, ergab übereinstimmende Ergebnisse bei Auswertungen zur Gesamt- und kardiovaskulären Mortalität [44].

Aus derselben Arbeitsgruppe stammt eine Arbeit mit einer ausgewählten älteren Patientengruppe ( $n=131$ ;  $71 \pm 11$  Jahre) mit unterschiedlichen chronischen Nephropathien. Nach einer Beobachtungszeit von 2,3 Jahren betrug die Hazard Ratio pro Steigerung von ADMA um  $0,1 \mu\text{M}$  ADMA 1,20 (95% Konfidenzintervall 1,07–1,35) [45]. In letzterer Studie wurden insgesamt niedrigere ADMA-Konzentrationen ( $<1 \mu\text{M}$ ) erhoben als in den beiden vorherigen Studien, bei denen als Grenzwerte der niedrigsten und höchsten Tertile  $<2,2 \mu\text{M}$  und  $>3,8 \mu\text{M}$  angegeben wurden.

Die kardiovaskulären Todesfälle und Ereignisse treten bei Dialysepatienten extrem häufig auf. Die hohe kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit terminalem Nierenversagen kann nur durch urämiespezifische Risikofaktoren erklärt werden. Die Übertragung der Ergebnisse auf andere Patientengruppen ist schwierig. Daher ist die Frage von erheblichem Interesse, ob es auch bei Personen mit niedrigerem globalem kardiovaskulären Risiko einen Zusammenhang zwischen ADMA und der kardiovaskulären Prognose gibt. Um diese Frage zu beantworten, wurden 3238 Teilnehmer der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC) untersucht. Bei allen Studienteilnehmern wurde eine Koronarangiografie durchgeführt, bei 2543 Personen bestand eine koronare Herzkrankheit (wenigstens eine Stenose mit einer Lumeneinengung von mindestens 20%) [46].

Wesentliche Ergebnisse der LURIC-Studie sind in Tabelle 1 (Gesamtmortalität) und in Tabelle 2 (kardiovaskuläre Mortalität) zusammengefasst. Gegenüber den Patienten in der ersten Quartile, die als Referenz dienen, haben Patienten in der zweiten Quartile ein um 12% bzw. 13%, in der dritten ein um 35% bzw. 42% und in der vierten Quartile ein um 87% bzw. 81% höheres Mortalitätsrisiko, allerdings wird der Effekt erst in der vierten Quartile statistisch signifikant. Die mittlere Erhöhung des Risikos ist 25% bzw. 23% pro Quartile und statistisch signifikant. Alle Risiko-Ratios in Tabelle 1 sind bereits statistisch adjustiert für koronare Herzerkrankung, Body-Mass-Index (BMI), Hypertonie, Rauchen, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, CRP, Fibrinogen, glomeruläre Filtrationsrate und Homocystein.

**Tabelle 1** Gesamtmortalität in Abhängigkeit von ADMA (LURIC-Studie).

ADMA, $\mu\text{M}$	HR (95% CI)	p
Alle Patienten ( $n=3238$ )		
1. Quartile ( $<0,72$ )	1,0 Referenz	
2. Quartile ( $0,72-0,80$ )	1,12 (0,83–1,52)	0,460
3. Quartile ( $0,80-0,89$ )	1,35 (1,01–1,81)	0,042
4. Quartile ( $\geq 0,89$ )	1,87 (1,43–2,44)	$<0,001$
per Quartile	1,25 (1,15–1,36)	$<0,001$

**Tabelle 2** Kardiovaskuläre Mortalität in Abhängigkeit von ADMA (LURIC-Studie).

ADMA, $\mu\text{M}$	HR (95% CI)	p
Alle Patienten ( $n=3238$ )		
1. Quartile ( $<0,72$ )	1,0 Referenz	
2. Quartile ( $0,72-0,80$ )	1,13 (0,78–1,63)	0,460
3. Quartile ( $0,80-0,89$ )	1,42 (1,00–2,02)	0,048
4. Quartile ( $\geq 0,89$ )	1,81 (1,31–2,51)	$<0,001$
per Quartile	1,23 (1,11–1,36)	$<0,001$

Von den 3238 angiografisch untersuchten Patienten hatten 695 keine oder nur sehr geringfügig ausgeprägte Koronarstenosen. Die restlichen 2543 Patienten mit mindestens einer Stenose über 20% wurden nach dem Friesinger Score eingeteilt. Interessanterweise ergab sich dabei keine wesentliche Beziehung zwischen ADMA und der Koronarmorphologie. Damit sind hohe ADMA-Konzentrationen eher für die Ausbildung akuter atherothrombotischer Ereignisse als für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen verantwortlich. ADMA war signifikant mit folgenden Variablen assoziiert (geordnet in der Reihenfolge abnehmender Assoziation): glomeruläre Filtrationsrate (GFR)  $>$  Homocystein  $>$  Alter  $>$  C-reaktives Protein  $>$  Geschlecht  $>$  Triglyzeride  $>$  Rauchen  $>$  Diabetes mellitus. Kein Zusammenhang konnte zwischen koronarer Erkrankung, arterielle Hypertonie und LDL-Cholesterin und Body-Mass-Index (BMI) festgestellt werden. Die relativen Risikosteigerungen, die in der LURIC-Studie mit zunehmender ADMA-Konzentration beobachtet wurden, entsprechen etwa denjenigen, die bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gesehen werden [36, 44]. Allerdings sind die absoluten Risiken, gemessen zum Beispiel an der Gesamtmortalität in der LURIC-Studie, deutlich geringer. Die gewonnenen Daten ergänzen und erweitern damit die Erkenntnisse, die bei Dialysepatienten gewonnen wurden.

### Beziehung zwischen ADMA und traditionellen Risikofaktoren

Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind bei Patienten zu finden, deren Erkrankung oder Lebensweise mit der Einschränkung der NO-Freisetzung und endothelialer Dysfunktion einhergehen, wie zum Beispiel Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus,

Hyperhomocysteinämie, Hypertriglyzeridämie und Rauchen [Übersicht bei 29]. Nicht alle Assoziationen können aber anhand der Literaturdaten konsistent nachvollzogen werden.

### ADMA, Cholesterin und Triglyzeride

Im Jahr 1998 wurde über eine hohe und statistisch signifikante Korrelation zwischen ADMA und LDL-Cholesterin ( $r=0,42$ ,  $p<0,01$ ) berichtet [47]. Bei einem Gesamtcholesterin von 142 mg/dL (3,67 mmol/L) lag ADMA bei 1,03  $\mu\text{M}$ , bei 238 mg/dL (6,15 mmol/L) doppelt so hoch (2,17  $\mu\text{M}$ ). Eine weitere Korrelation zwischen ADMA und Cholesterin wurde gefunden ( $r=0,41$ ,  $p<0,001$ ) [48]. Diese Befunde wurden in anderen Studien aber nicht bestätigt [46, 49–51].

Fünfzehn gesunde Männer mit hohen Triglyzeridwerten (Alter 34,0 $\pm$ 5,0 Jahre, Triglyzeride 353 $\pm$ 247 mg/dL [4 $\pm$ 2,8 mmol/L]) verglichen mit einer altersgleichen Vergleichsgruppe (Alter 34,3 $\pm$ 4,5 Jahre, Triglyzeride 102 $\pm$ 23 mg/dL [1,2 $\pm$ 0,3 mmol/L]) zeigten 1,23-fach höhere ADMA-Konzentrationen (1,13 $\pm$ 0,37  $\mu\text{M}$  versus 0,92 $\pm$ 0,28  $\mu\text{M}$ ,  $p<0,05$ ) [52]. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Martens-Lobenhoffer et al., die absolut zwar halb so hohe ADMA-Konzentrationen, aber ebenfalls einen Faktor von 1,31 zwischen Personen mit niedrigen und hohen Triglyzeriden fanden (ADMA-Konzentrationen 0,47 $\pm$ 0,08  $\mu\text{M}$  versus 0,36 $\pm$ 0,07  $\mu\text{M}$ ) [53].

Die Auswertung der LURIC-Kohorte ergab keinen Zusammenhang zwischen ADMA und LDL-Cholesterin und nur eine geringe Korrelation von ADMA mit den Triglyzeriden. In der höchsten Quartile der Triglyzeride (Triglyzeride > 195 mg/dL [2,22 mmol/L],  $n=885$ , ADMA 0,81  $\mu\text{M}$ ) war ADMA im Vergleich zur niedrigsten Quartile (Triglyzeride < 97 mg/dL [1,11 mmol/L],  $n=571$ , ADMA 0,83  $\mu\text{M}$ ) signifikant niedriger ( $p=0,038$ ). Damit wäre die Beziehung sogar umgekehrt im Vergleich zu den beiden vorhin genannten Studien [52, 53].

### ADMA und Homocystein

Homocystein, das ab einer Konzentration von etwa 10  $\mu\text{mol/L}$  eine enge Korrelation zu kardiovaskulären Ereignissen aufweist, ist mit ADMA korreliert. ADMA wird als mögliche Brücke zwischen Hyperhomocysteinämie und endothelialer Dysfunktion gesehen [54]. Der erste von drei Mechanismen, der ADMA und Homocystein verbindet, könnte eine Erhöhung des Methylgruppendonors Methionin einschließen. Die Steigerung der Homocysteinkonzentration bei einem oralen Methioninbelastungstest sollte folglich mit einer Erhöhung der ADMA-Konzentration einhergehen. Entsprechende Experimente zeigen jedoch uneinheitliche Resultate. Die Ergebnisse scheinen auch abhängig vom ADMA-Ausgangswert zu sein. Bei Ausgangskonzentrationen von 0,56 $\pm$ 0,03  $\mu\text{M}$  [55] bzw. 0,70 $\pm$ 0,10  $\mu\text{M}$  [56] sind nur geringfügige Steigerungen auf 0,59 $\pm$ 0,06 bzw. 0,76 $\pm$ 0,22 zu erkennen, während bei Ausgangswerten von 1,39 $\pm$ 0,20  $\mu\text{M}$  [57]

bzw. 1,00 $\pm$ 0,20  $\mu\text{M}$  [58] deutliche Steigerungen auf 2,03 $\pm$ 0,18 bzw. 1,6 $\pm$ 0,20  $\mu\text{M}$  beobachtet wurden. Der zweite Mechanismus besteht darin, dass Homocystein in kultivierten Endothelzellen die Aktivität der DDAH reduziert [54]. Der dritte Mechanismus könnte in der gemeinsamen Abhängigkeit von ADMA und Homocystein von der Nierenfunktion liegen. Unter statistischer Berücksichtigung der glomerulären Filtrationsrate sinkt der Korrelationskoeffizient zwischen ADMA und Homocystein bei der Auswertung der LURIC-Daten von 0,212 ( $n=3238$ ,  $p<0,001$ ) auf 0,140 ( $n=3238$ ,  $p<0,001$ ).

### ADMA und Blutdruck

Die deutliche Assoziation von ADMA mit dem arteriellen Blutdruck, die in verschiedenen Studien festgestellt wurden, konnte in der LURIC-Studie nicht gefunden werden [39, 46, 59–62]. Die Korrelation des Blutdrucks mit ADMA trat bei ausgesuchten Patientengruppen auf, bei denen keine kardiovaskulären Auffälligkeiten nachzuweisen waren. Es wurde bei normotensiven Personen (Blutdruck 126/82 mm Hg) eine ADMA-Konzentrationen von 1,1  $\mu\text{M}$  und bei Hypertonie (Blutdruck 149/97 mm Hg) im Mittel von 2,4  $\mu\text{M}$  gefunden. Es wird über einen Anstieg des ADMA von 2,84 über 3,21 bis 4,24  $\mu\text{M}$  in drei Personengruppen (gesamt  $n=102$ ), eingeteilt nach Blutdruckwerten von 127/80 mm Hg, 130/79 mm Hg und 159/94 mm Hg ( $p$  zwischen den Gruppen  $<0,001$ ), berichtet [62]. Auch bei niedrigen ADMA-Konzentrationen (0,51  $\mu\text{M}$ ) ergab sich bei den ansonsten Gesunden eine signifikante Korrelation mit dem mittleren arteriellen Blutdruck ( $r=0,46$ ,  $p<0,001$ ) [39]. Übereinstimmend damit sind die Befunde, die bei Normotensiven ( $n=8$ , Blutdruck 124/69) eine ADMA-Konzentration von 0,40  $\mu\text{M}$  und bei 36 Patienten mit essentieller Hypertonie (Blutdruck 156/93) eine ADMA-Konzentration von 0,59  $\mu\text{M}$  feststellten ( $p<0,001$ ) [60]; weiterhin die Befunde, die bei Personen mit leicht erhöhtem Blutdruck ( $n=16$ , Blutdruck 137/82) 0,59  $\mu\text{M}$  ADMA und in einer normotensiven Vergleichsgruppe ( $n=47$ , Blutdruck 114/63) 0,43  $\mu\text{M}$  ADMA ergaben ( $p<0,05$ ) [61]. Auch in einer kleinen Gruppe ( $n=8$ ) von jungen Patienten mit pulmonarer Hypertonie wurden gegenüber einer Vergleichsgruppe erhöhte Konzentrationen (Median 0,55  $\mu\text{M}$ ) zu einer Vergleichsgruppe ( $n=5$ ; Median 0,21  $\mu\text{M}$ ) gefunden [63].

ACE-Hemmer senken mit dem Blutdruck auch die ADMA-Konzentration signifikant. Bei 78 hypertensiven Patienten mit einem mittleren Blutdruck von 165/97 mm Hg sank der Blutdruck nach zwölf Wochen Behandlung mit Zofenopril auf 134/70 mm Hg. ADMA sank von 0,59  $\mu\text{M}$  auf 0,45  $\mu\text{M}$  ( $p<0,01$ ). Die Behandlung mit Enalapril senkte den Blutdruck auf 131/68 mm Hg und ADMA auf 0,51  $\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ ) [64]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch ein Versuch an Ratten mit Captopril [65]. Interessanterweise konnte bei einer Studie mit Enalapril und Eprosartan nach einer Woche Therapie zwar kein statistisch messbarer blutdrucksenkender Effekt (145/93 mm

Hg versus 144/93 mm Hg) jedoch eine signifikante Senkung des ADMA von 1,69  $\mu\text{M}$  auf 1,41  $\mu\text{M}$  erreicht werden [66]. Ein ähnlicher Effekt wurde für Perindopril beschrieben [67].

In der LURIC-Studie bestand kein Zusammenhang zwischen ADMA und Blutdruck [46]. Die Daten von 882 Normotensiven waren identisch mit denen von 2356 Hypertonikern (0,82  $\mu\text{M}$  versus 0,82  $\mu\text{M}$ ).

### ADMA und Diabetes mellitus

Ein kleines Kollektiv von 16 Typ-2-Diabetikern (Glukosekonzentration 242 mg/dL [13,5 mmol/L]) hatte eine ADMA-Konzentration von 1,59  $\mu\text{M}$  gegenüber einer gesunden Vergleichsgruppe (Glukosekonzentration 93,3 mg/dL [5,2 mmol/L]) von 0,69  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) [68].

Der Zusammenhang zwischen ADMA und Insulinresistenz wurde bei 48 gesunden Probanden ohne kardiale Erkrankungen mit pathologischem Insulinsuppressions-test untersucht. Stuhlinger et al. konnten eine eindrucksvolle Korrelation von ADMA mit der SSPG-(Steady State Plasma Glucose)-Konzentration ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,001$ , ADMA-Konzentration von 0,5 bis 1,5  $\mu\text{M}$ ) demonstrieren [49]. Bemerkenswert ist, dass nach Behandlung mit Rosiglitazon die ADMA-Konzentration parallel zum SSPG-Wert wieder absank.

Nach einer fettreichen Mahlzeit stiegen die ADMA-Konzentrationen bei 50 Typ-2-Diabetikern von 1,04  $\mu\text{M}$  auf 2,51  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0005$ ), während sie sich bei einem fettreduzierten Menü nur geringfügig veränderten [50]. In dieser Studie war leider keine gesunde Vergleichsgruppe involviert, um den Einfluss lipämischer Proben auf die Bestimmungsmethode abzuschätzen.

Sowohl Metformin als auch Sulfonylharnstoffe senken die ADMA-Konzentration bei Typ-2-Diabetikern ( $n = 31$ , Glukose 11,9 mmol/L bzw. 212 mg/dL) nach zehnwöchiger Behandlung von 1,65  $\mu\text{M}$  auf 1,18  $\mu\text{M}$  bzw. von 1,75  $\mu\text{M}$  auf 1,19  $\mu\text{M}$  ADMA [69].

Im Tierversuch hatten Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes ADMA-Konzentrationen von 1,33  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 0,48  $\mu\text{M}$  bei gesunden Tieren ( $p < 0,05$ ). Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität, aber nicht die Expression des ADMA abbauenden Enzyms DDAH, reduziert war [70].

Völlig konträr zu den bisherigen Daten sind die Werte von 88 Typ-2-Diabetikern, die mit 0,29  $\mu\text{M}$  ADMA niedrigere ADMA aufwiesen, als eine gesunde Vergleichsgruppe ( $n = 65$ ) mit 0,34  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) [71]. Bei der Bestimmung von ADMA kam hier Homo-Arginin als interner Standard zum Einsatz. Diese Substanz ist endogen in unterschiedlicher Konzentration vorhanden und kann die Bestimmung beeinflussen [72].

In einer Studie an 600 Typ-1-Diabetikern konnte ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,001$ ) zwischen Patienten mit normaler Albuminausscheidung ( $n = 192$ , Urinalbumin Mittelwert 8 mg/24 h, ADMA 0,40  $\pm$  0,06  $\mu\text{M}$ ) und diabetischer Nephropathie ( $n = 408$ , Urinalbumin 606 mg/24 h; ADMA-Konzentration 0,46  $\pm$  0,08  $\mu\text{M}$ ) festge-

stellt werden [73]. Die Odds Ratio für die Ausprägung der Nephropathie stieg dabei pro 0,1  $\mu\text{M}$  ADMA um den Faktor 2,77 (95% CI 1,89-4,05). Es gibt eine Reihe weiterer konsistenter Studien mit kleinen Patientenzahlen [74]. Eine neue Arbeit berichtet von fünfmal höheren Werten bei Typ-1-Diabetikern (2,6  $\mu\text{M}$  ADMA), mit einer durchschnittlichen Dosis von 0,8 U Insulin/kg/Tag gegenüber einer vergleichbaren gesunden Kontrollgruppe mit 1,7  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) [75].

Die Diabetiker der LURIC-Studie ( $n = 1034$ , ADMA 0,83  $\mu\text{M}$ ) hatten im Vergleich zu den Patienten ohne Diabetes mellitus ( $n = 2204$ , ADMA 0,82  $\mu\text{M}$ ) um 1,5% höhere Konzentrationen ( $p = 0,032$ ).

### ADMA und Rauchen

Eine Steigerung um das 1,6- bis 1,9-fache der intrazellulären ADMA-Konzentration nach einer siebenwöchigen Nikotinbelastung bei Kaninchen wurde berichtet [76]. Es wurden bei 10 Nichtrauchern im Mittel ADMA-Konzentrationen von 0,61  $\pm$  0,13  $\mu\text{M}$  gegenüber 1,10  $\pm$  0,54  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,01$ ) bei 12 Rauchern gefunden [77]. In einer klinischen Studie mit großer Fallzahl ( $n = 1874$ ) zeigten sich nur geringe aber signifikante ( $p = 0,002$ ) Unterschiede (Raucher Median = 0,64  $\mu\text{M}$  versus Nichtraucher Median = 0,61  $\mu\text{M}$ ) [41]. Ebenfalls wurde nur ein geringfügiger Zusammenhang ( $p = 0,03$ ) in einer 147 Personen umfassenden Kohortenstudie (Raucher 0,47  $\pm$  0,08  $\mu\text{M}$  versus Nichtraucher 0,43  $\pm$  0,07  $\mu\text{M}$ ) gefunden [78]. Im Gegensatz dazu, steht eine Querschnittsstudie, die bei 563 älteren Rauchern (70  $\pm$  11 y) sogar eine niedrigere ADMA-Konzentration beobachtete (Raucher 1,32  $\mu\text{M}$  versus Nichtraucher 1,42  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,037$ ) [79]. Dieser Unterschied war nach Berücksichtigung der Kovariablen Insulin, Blutdruck, BMI und Kreatinin aber nicht mehr signifikant ( $p = 0,14$ ). Die Auswertungen von LURIC nach post hoc Einteilung der Patienten in Nichtraucher ( $n = 1165$ , ADMA 0,81  $\mu\text{M}$ ), frühere Raucher ( $n = 1441$ , ADMA 0,83  $\mu\text{M}$ ) und aktuelle Raucher ( $n = 632$ , ADMA 0,84  $\mu\text{M}$ ) zeigten eine signifikante Erhöhung bei Ex-Rauchern und Rauchern (frühere Raucher bzw. aktuelle Raucher im Vergleich zur Nichtrauchergruppe  $p = 0,016$  bzw.  $p = 0,001$ ).

### Referenzbereiche für ADMA

Beim Vergleich der ADMA-Konzentrationen gesunder Personen fallen erhebliche Unterschiede zwischen den publizierten Daten auf (Tabelle 3). Nach eigenen Messungen mit einer modifizierten HPLC-Methode [80] sind die ADMA-Konzentrationen altersabhängig und liegen im Durchschnitt bei Gesunden  $< 0,6 \mu\text{mol/L}$  (Meinitzer, März, submitted). Das stimmt mit vielen anderen Autoren überein. Die Altersabhängigkeit ist ebenfalls klar aus der Auswertung der LURIC-Daten ersichtlich. Die älteste Gruppe der Studienteilnehmer (über 70 Jahre,  $n = 871$ , ADMA 0,85  $\mu\text{M}$ ) und die Altersgruppe der 60- bis 70-

**Tabelle 3** ADMA-Referenzwerte bei Gesunden.

Methode	Fallzahl (Alter, Jahre)	ADMA MW $\pm$ SD, $\mu$ M	Referenz
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 10 (40 $\pm$ 2)	0,58 $\pm$ 0,02	[83]
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 10	1,39 $\pm$ 0,20	[57]
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 47 (35 $\pm$ 4)	0,43 $\pm$ 0,12	[61]
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 42	0,43 $\pm$ 0,06	[80]
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 24 (25 $\pm$ 1)	1,30 $\pm$ 0,07	[84]
HPLC OPA Vorsäulenderivatisierung	n = 48 (55 $\pm$ 7)	1,57 $\pm$ 0,85	[85]
LC-Tandem MS	n = 20	0,12 $\pm$ 0,04	[86]
GC- Tandem MS als Methylester	n = 12	0,39 $\pm$ 0,06	[87]
GC- Tandem MS als Methylester	n = 10 (29,7 $\pm$ 5,8)	0,60 $\pm$ 0,08	[88]
LC-Tandem MS	n = 15	0,45 $\pm$ 0,13	[89]
ELISA	n = 500 (19–75)	0,69 $\pm$ 0,20	[90]
		95% 0,36–1,17	
LC-Tandem MS	n = 47 (20–56)	0,36 $\pm$ 0,07	[53]

Jährigen (n = 1171, ADMA 0,83  $\mu$ M) haben im Vergleich zu den jüngeren Personen (unter 60 Jahre, n = 1196, ADMA 0,81  $\mu$ M) höhere Konzentrationen ( $p < 0,001$ ). Bei der Betrachtung der absoluten Werte sollte jedoch das erhöhte kardiovaskuläre Risiko dieses Patientenkollektivs beachtet werden. Ebenso lassen sich geschlechtsspezifische Unterschiede erkennen. Postmenopausale Frauen (n = 882, ADMA 0,85  $\mu$ M) haben eine um 3,7% höhere ADMA-Konzentration ( $p = 0,01$ ) als Männer (n = 2258, ADMA 0,82  $\mu$ M).

### Quantitative Bestimmung von ADMA

Die deutlichen Unterschiede zwischen den in der Literatur berichteten Mittelwerten für ADMA bei ähnlichen Patientenpopulationen weisen auf methodische Probleme bei der Analyse hin [72, 81, 82]. Bei der Beurteilung einer einzelnen ADMA-Konzentration muss deshalb auch die Validität der Methode beachtet werden. In einer Studie wurde nach der Standard-Additionsmethode 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M zu einer Blutprobe hinzugegeben und für 8 verwendete Methoden in verschiedenen Zentren die Wiederfindung der Reinsubstanz in der Matrix untersucht [82]. Die neun verschickten Proben setzten sich wie folgt zusammen: Drei identische Basalproben mit endogener ADMA-Konzentration, drei identische Proben bei denen zur Basalprobe 1  $\mu$ M ADMA zugefügt wurde und drei identische Proben mit 5  $\mu$ M ADMA-Zusatz. Die Ergebnisse dieses wichtigen Experiments sind leider nur als Grafik publiziert, an deren Skalen die genauen Analyseergebnisse in  $\mu$ mol/L grob abgeschätzt, aber nicht abgelesen werden können. Wichtig für den Vergleich der Methoden wären die ADMA-Ergebnisse der Basalwerte und der aufgestockten Proben in Tabellenform. In jedem

Fall lässt diese Arbeit erkennen, dass die wahren „basalen“ Werte von ADMA in jedem Fall unter 1  $\mu$ M (zwischen 0,36 und 0,60  $\mu$ M, ohne Beachtung der unteren und oberen Extremwerte) liegen [82]. Werden die als Goldstandard geltenden LC-MS-MS-Methoden isoliert betrachtet, so fallen trotzdem bemerkenswerte Unterschiede zwischen den gemessenen Werten (0,12 bis 0,55  $\mu$ M) auf.

Die Richtigkeit einer Methode wird wesentlich durch ihre Interferenzfreiheit und die Vorgehensweise bei der Standardisierung bestimmt. Werden Kalibratoren durch Aufstocken einer analytfreien Matrix zur Standardisierung verwendet, so können matrixspezifische Effekte berücksichtigt werden. Werden wässrige Standards ohne Matrix verwendet, sollte sichergestellt sein, dass die Wiederfindung (Recovery) der Analysesubstanz in der Matrix nahe 100% ist. Dies sollte ohne Verwendung eines internen Standards zuvor überprüft werden. Standardlösungen sollten zumindest von einer zweiten unabhängigen Person geprüft werden.

Wenn nur die Ergebnisse berücksichtigt werden, deren Methoden ADMA-Konzentrationen unter 1  $\mu$ M liefern, so sind gesunde Personen unter 0,5  $\mu$ M zu finden, zwischen 0,5  $\mu$ M und 0,7  $\mu$ M ist ein „Graubereich“ und über 0,7  $\mu$ M werden die Werte pathologisch. So liegen die Konzentrationen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und Patienten mit KHK sehr nahe bei 0,8  $\mu$ M. Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen sind sehr klein und können nur mit hochpräzisen Methoden (VK < 5%) oder großer Fallzahl erkannt werden. Gemeinsamer Nenner bisher veröffentlichter Daten ist, dass große physiologische Veränderungen nur kleine Konzentrationsänderungen von ADMA im Plasma nach sich ziehen. Dies könnte als Folge von großen intrazellulären Konzentrationsänderungen in kleineren spezialisierten Zellpopulationen interpretiert werden. In diesen Zellen die

Konzentration von ADMA messen zu können, ist eine methodische Herausforderung. Unter Berücksichtigung der technischen Möglichkeiten bleibt das vorerst eine Vision.

## Literatur

- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664–6.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365–72.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002–12.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915–8.
- Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280: H2484–8.
- Forstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl I:10–5.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121–31.
- Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;29:14–20.
- Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 2005; 280:32890–6.
- McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5–8.
- Kakimoto Y, Matsuoka Y, Miyake M, Konishi H. Methylated amino acid residues of proteins of brain and other organs. *J Neurochem* 1975;24:893–902.
- Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 2002;56:427–38.
- Garlick PJ, Waterlow JC, Swick RW. Measurement of protein turnover in rat liver. Analysis of the complex curve for decay of label in a mixture of proteins. *Biochem J* 1976; 156:657–63.
- Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4:33–40.
- Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2287–95.
- Scalera F, Martens-Lobenhoffer J, Tager M, Bukowska A, Lendeckel U, Bode-Boger SM. Effect of L-arginine on asymmetric dimethylarginine (ADMA) or homocysteine-accelerated endothelial cell aging. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1075–82.
- Xiao ZS, Quarles LD, Chen QQ, et al. Effect of asymmetric dimethylarginine on osteoblastic differentiation. *Kidney Int* 2001;60:1699–704.
- Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C. Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2001;59:1466–72.
- Bode-Boger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1128–34.
- Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455–9.
- Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172–7.
- 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;339:572–5.
- Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S, Menne J, Kielstein A, Martens-Lobenhoffer J, et al. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke* 2006;37:2024–9.
- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Uenos S, Nakata S, et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1682–8.
- Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D. Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:39–44.
- Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977;26: 531–7.
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205–9.
- MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119:1533–40.
- Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813–8.
- Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005;10:S73–81.
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003;22:17–22.
- Anderstam B, Katarzski K, Bergstrom J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997;8: 1437–42.
- Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S14–8.
- Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003;336:1–12.
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Knik DJ, Rauwerda JA, et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003;22:23–30.

36. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113–7.
37. Mallamaci F, Tripepi G, Maas R, Malatino L, Boger R, Zoccali C. Analysis of the relationship between norepinephrine and asymmetric dimethyl arginine levels among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:435–41.
38. Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frolich JC. Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF<sub>2</sub>alpha in end-stage liver disease. *Hepatology* 2003;38:1063–4.
39. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141–6.
40. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127–8.
41. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53–9.
42. Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular and renal risk factor on the move. *J Hypertens* 2006;24:611–9.
43. Busch M, Fleck C, Wolf G, Stein G. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease—possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids* 2006;30:225–32.
44. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C. Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int* 2005;67:2330–7.
45. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2449–55.
46. Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007;53:273–83.
47. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842–7.
48. Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I. Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis* 2003;166:279–84.
49. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *J Am Med Assoc* 2002;287:1420–6.
50. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039–44.
51. Paiva H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Laaksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:219–22.
52. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111–6.
53. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Measurement of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:61–8.
54. Stuhlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab* 2005;6:3–14.
55. Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, et al. Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism* 2005;54:351–60.
56. Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:347–53.
57. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:161–7.
58. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933–8.
59. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas d, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652–8.
60. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:518–23.
61. Paiva H, Laakso J, Laine H, Laaksonen R, Knuuti J, Raitakari OT. Plasma asymmetric dimethylarginine and hyperemic myocardial blood flow in young subjects with borderline hypertension or familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1241–7.
62. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens* 2005;19:629–33.
63. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;37:489–92.
64. Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignalosa D, Condorelli M, Ignarro LJ, et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J* 2004;148:e5.
65. Fu YF, Xiong Y, Guo Z. A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril

- on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. *Eur J Pharmacol* 2005;508:167–75.
66. Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15:590–3.
67. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J* 2002;66:811–5.
68. Abbasi F, Asagami T, Cooke JP, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201–3.
69. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002;51:843–6.
70. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987–92.
71. Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruokonen I, Rantalaiho V, Wirta O, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism* 2003;52:303–7.
72. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:61–8.
73. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Parving HH. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:765–9.
74. Yasuda S, Miyazaki S, Kanda M, Goto Y, Suzuki M, Harano Y, et al. Intensive treatment of risk factors in patients with type-2 diabetes mellitus is associated with improvement of endothelial function coupled with a reduction in the levels of plasma asymmetric dimethylarginine and endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Eur Heart J* 2006;27:1159–65.
75. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Feb 20; Epub ahead of print.
76. Hamasaki H, Sato J, Masuda H, Tamaoki S, Isotani E, Obayashi S, et al. Effect of nicotine on the intimal hyperplasia after endothelial removal of the rabbit carotid artery. *Gen Pharmacol* 1997;28:653–9.
77. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006;48:278–85.
78. Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis* 2006;184:383–8.
79. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004;53:1574–9.
80. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131–7.
81. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006 Aug.
82. Schwedhelm E. Quantification of ADMA: analytical approaches. *Vasc Med* 2005;10:S89–95.
83. Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692:257–62.
84. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003;107:1891–5.
85. Bae SW, Stuhlinger MC, Yoo HS, Yu KH, Park HK, Choi BY, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005;95:729–33.
86. Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:157–66.
87. Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frolich 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 Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;798:87–99.
88. Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Boger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809:59–65.
89. Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Boger SM. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J Mass Spectrom* 2004;39:1287–94.
90. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005;35:622–6.