



## Arbeitsanleitung

# ADMA / Arginin ELISA

Enzymimmunoassay  
für die quantitative Bestimmung von  
endogenem asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA)  
und Arginin (ARG)  
in Serum und Plasma

REF EA207/192

 2 x 96

 2 – 8 °C

 DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH  
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 040-555 87 10 • Fax 040-555 87 111  
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: [contact@dld-diagnostika.de](mailto:contact@dld-diagnostika.de)

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Testprinzip	Seite	3
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	5
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5.	Probengewinnung	Seite	7
6.	Vorbereitung der Reagenzien	Seite	8
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	9
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	12
9.	Testcharakteristika	Seite	14
10.	Literatur	Seite	16
	Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	18
	Pipettierschema ADMA ELISA	Seite	19
	Pipettierschema Arginin ELISA	Seite	20

## Verwendete Symbole

 <b>CONT</b>	Inhalt		Verwendbar bis
 <b>LOT</b>	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 <b>REF</b>	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

## Gefahrensymbole



Gefahr



Achtung



Gefahr

## 1. Einleitung und Testprinzip

Die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA sind Derivate der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin ist die Vorstufe zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper. NO wiederum ist ein wichtiger physiologischer Mediator im Herz-Kreislaufsystem und in anderen Organsystemen, der an der Regulation von Blutdruck und Gefäßwiderstand, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, Adhäsion von Leukozyten und Monozyten und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt ist. NO spielt auch eine wichtige physiologische Rolle bei der Erektion. Bei Herz-Kreislaufkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz, bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, bei Präeklampsie, bei erektiler Dysfunktion und anderen Erkrankungen kommt es zur Abschwächung der biologischen Wirkungen von NO, wodurch das Fortschreiten dieser Erkrankungen und der begleitenden Gefäßläsionen beschleunigt wird. Durch die Gabe von L-Arginin kann diesem Geschehen entgegengewirkt werden.

In mehreren klinischen und experimentellen Untersuchungen (s. Literaturübersicht) konnte gezeigt werden, dass es bei den genannten Erkrankungen zu einem Ansteigen der Konzentration des endogenen L-Arginin-Analogons ADMA im Plasma oder Serum kommen kann. Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind somit ein für das zukünftige Fortschreiten o.a. Erkrankungen prognostisch relevanter Faktor.

Die verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von ADMA und SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten basierten allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

Der ADMA/Arginin ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin) und Arginin in Serum oder EDTA-Plasma. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird ADMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-ADMA und Arginin quantitativ in N-Acyl-Arginin umgewandelt.

Der von der DLD Diagnostika GmbH neu entwickelte ADMA/ARG Elisa ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen, konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

## **2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

### 3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6. geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

### 4. Inhalt des Testbestecks

4.1	<b>MT-Streifen</b> Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, blau markiert, beschichtet mit ADMA	<b>STRIPS-ADMA</b>	12 Stück
4.2	<b>MT-Streifen</b> Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, gelb markiert, beschichtet mit Arginin	<b>STRIPS-ARG</b>	12 Stück
4.3	<b>Standards 1-6</b> Je 4 ml, gebrauchsfertig	<b>CAL 1 – 6</b>	6 Fläschchen
4.4	<b>Kontrolle 1 &amp; 2</b> Je 4 ml, gebrauchsfertig Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit	<b>CON 1 &amp; 2</b>	2 Fläschchen
4.5	<b>Acylierungspuffer</b> 3,5 ml, gebrauchsfertig Blau eingefärbt	<b>ACYL-BUFF</b>	1 Fläschchen



Achtung

- 4.6 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 3 Fläschchen  
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens  
mit 3 ml Solvent lösen und  
gegebenenfalls vereinigen (s. auch 6.)
- 4.7 **Antiserum ADMA** **AS-ADMA** 1 Fläschchen  
7 ml, gebrauchsfertig  
Blau eingefärbt  
Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA
- 4.8 **Antiserum Arginin** **AS-ARG** 1 Fläschchen  
7 ml, gebrauchsfertig  
Gelb eingefärbt  
Kaninchen-anti-N-Acyl-Arginin
- 4.9 **Enzymkonjugat** **CONJ** 2 Fläschchen  
13 ml, gebrauchsfertig  
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase  Achtung
- 4.10 **Waschpuffer** **WASH** 2 Fläschchen  
20 ml, Konzentrat  
Inhalt mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.  
(s. auch 6.)
- 4.11 **Substrat** **SUB**  2 Fläschchen  
13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig Gefahr
- 4.12 **Stopplösung** **STOP** 2 Fläschchen  
13 ml, gebrauchsfertig  
Enthält 0,3 M Schwefelsäure
- 4.13 **Reaktionsplatte** **ACYL-PLATE** 1 Stück  
für die Acylierung
- 4.14 **Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** 1 Fläschchen  
lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen  
vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden  
(s. auch 6.)

- 4.15 **Solvent** **SOLVENT** 2 Fläschchen  
5 ml, enthält DMSO  
(bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)



Gefahr

- 4.16 **Haftklebefolie** **FOIL** 4 Stück  
Gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler
- Vortex-Mischer
- Rollenmischer
- Multipette
- Destilliertes Wasser

## 5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

### Plasma und Serum

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 18 Monate gelagert werden.

## 6. Vorbereitung der Reagenzien

### **Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

### **Waschpuffer** **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

### **Acylierungs-Reagenz** **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 7. Testdurchführung ELISA

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nur einmal verwenden!  
Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

### 7.1 Probenvorbereitung (Acylierung)

1. **20 µl Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2, Plasma und Serum** in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. **20 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. **200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.  
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.  
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschrhen aufziehen und pipettieren.  
**50 µl gelöstes Acylierungsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 5. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

**Je 25 µl der so vorbereiteten Proben werden in den ADMA-ELISA und je 10 µl der so vorbereiteten Proben werden in den Arginin-ELISA eingesetzt.**

## 7.2 Durchführung ADMA Elisa

### ADMA-ELISA

1. **25 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (blau markiert) pipettieren.
2. **50 µl ADMA Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.  
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
9.  $25 \pm 5$  Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

### 7.3 Durchführung Arginin Elisa

#### Arginin-ELISA

1. **10 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (gelb markiert) pipettieren.
2. **50 µl Arginin Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.  
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
9.  $25 \pm 5$  Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 8. Auswertung und Beurteilung

Standard		1	2	3	4	5	6
<b>ADMA</b>	( $\mu\text{mol/l}$ )	0	0,2	0,45	0,7	1	3
<b>Arginin</b>	( $\mu\text{mol/l}$ )	5	15	35	70	120	300

Umrechnung: ADMA:  $1 \mu\text{mol} / \text{l} = 202 \text{ ng} / \text{ml}$   
 Arginin:  $1 \mu\text{mol} / \text{l} = 174 \text{ ng} / \text{ml}$

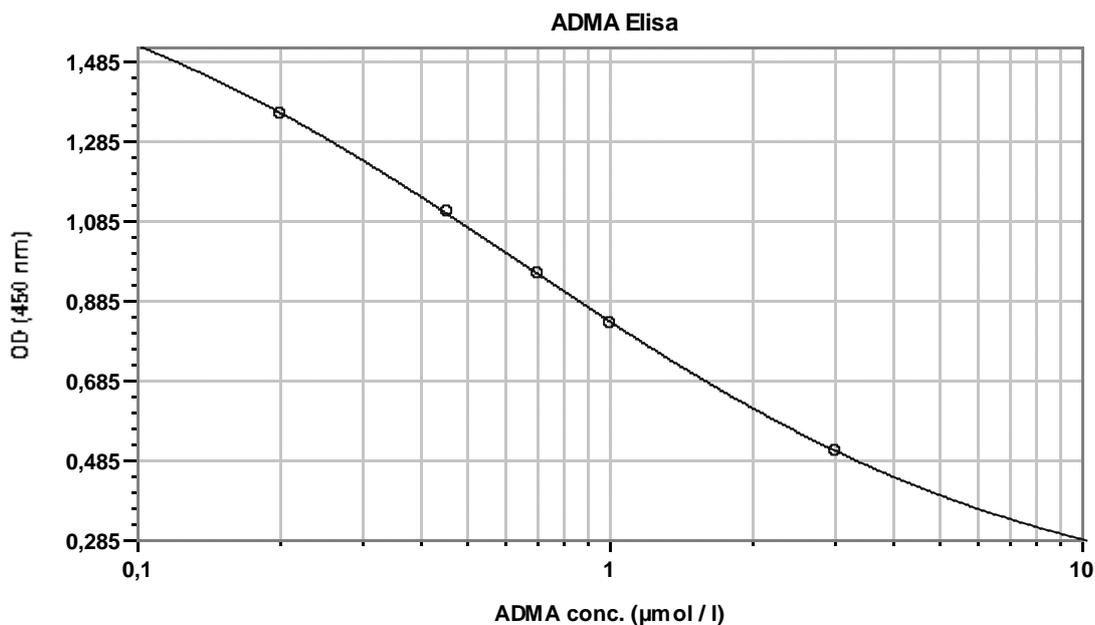
Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können direkt aus der Standardkurve in  $\mu\text{mol} / \text{l}$  abgelesen werden.

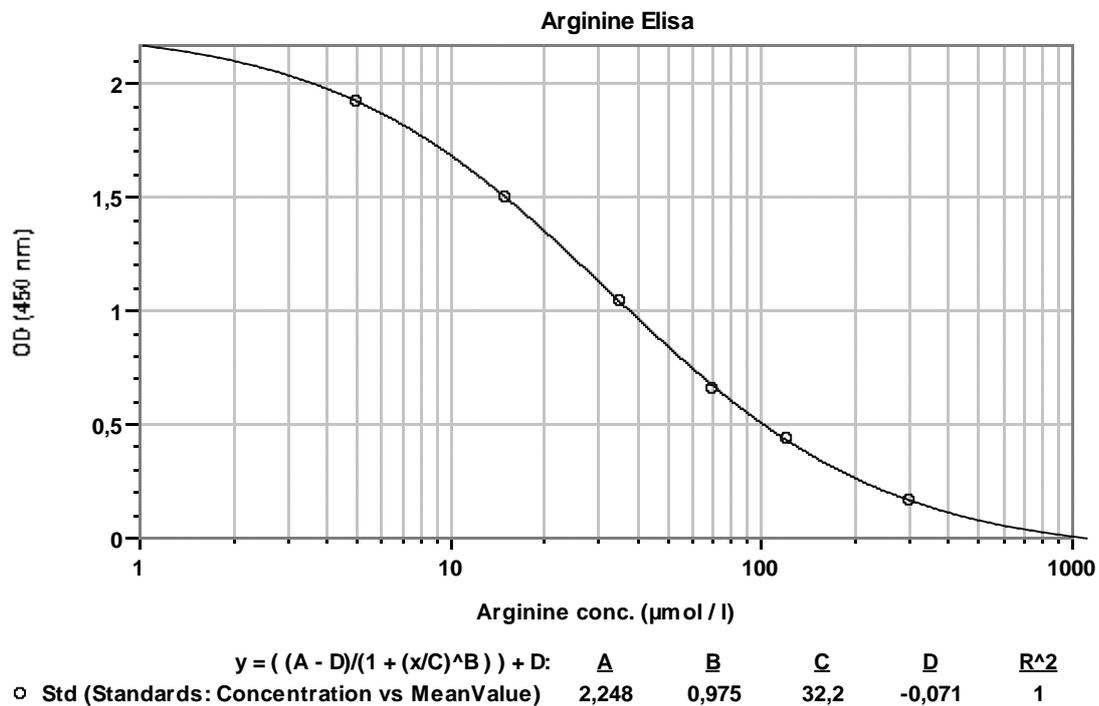
Die Abbildungen zeigen typische Beispiele:

### ADMA Elisa



$y = ( (A - D) / (1 + (x/C)^B ) ) + D$ :    A    B    C    D    R<sup>2</sup>  
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)    1,844    0,791    0,657    0,107    1

## Arginin Elisa



**Qualitätskontrolle:** Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

## 9. Testcharakteristika

### 9.1 Testcharakteristika ADMA

#### 9.1.1 Referenzbereiche

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
EDTA-Plasma, Serum	0,40 – 0,75 µmol / l

#### 9.1.2 Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
0,03 µmol / l	$OD_{Cal1} - 3 \times SD$

#### 9.1.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
ADMA	100
SDMA	0,05
Monomethylarginin (NMMA)	1,93
Homoarginin	< 0,01
Arginin	0,03

#### 9.1.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (µmol / l)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,43 – 1,55	99	90 - 107
Serum	0,54 – 1,72	92	87 - 102

#### 9.1.5 Linearität

Matrix	Bereich (µmol / l)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,23 – 1,53	1 : 6 mit Wasser	99	92 - 105

#### 9.1.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (µmol / l)	Intra-Assay-Vk
EDTA-Plasma	0,58 – 1,04	4,9 – 5,4 %

Matrix	Bereich (µmol / l)	Inter-Assay-Vk
EDTA-Plasma	0,57 – 1,34	4,3 – 9,6 %

#### 9.1.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Serum + Plasma	LC/MS	$Y = 0,99 \times LC/MS + 0,02$ ; $R = 0,983$ ; $N = 32$

## 9.2 Testcharakteristika Arginin

### 9.2.1 Referenzbereiche

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
EDTA-Plasma, Serum	20 – 80 µmol / l

### 9.2.2 Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
6 µmol / l	$OD_{Cal1} - 3 \times SD$

### 9.2.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Arginin	100
ADMA	< 0,37
Homoarginin	2,92
SDMA	0,88

### 9.2.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (µmol / l)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	48 – 163	97	93 - 100
Serum	82 – 211	100	96 - 103

### 9.2.5 Linearität

Matrix	Bereich (µmol / l)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	28 – 193	1 : 6 mit Wasser	102	94 - 106

### 9.2.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (µmol / l)	Intra-Assay-Vk
EDTA-Plasma	56 – 125	3,6 – 2,3 %

Matrix	Bereich (µmol / l)	Inter-Assay-Vk
EDTA-Plasma	53 – 170	3,2 – 6,3 %

### 9.2.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Serum + Plasma	LC/MS	$Y = 0,95 \times LC/MS - 0,68$ ; $R = 0,991$ ; $N = 32$

## 10. Literatur

### Literatur unter Einsatz des ADMA-ELISA der DLD Diagnostika

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH.

**Determination of ADMA using a novel ELISA assay.**

Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42: 1377-1383

Krempf TK, Kähler J, Maas R, Silberhorn L, Meinertz T, Böger RH.

**Elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in patients with unstable angina and recurrent Plasmaiovascular events.**

Eur. Heart J. 2005; 26: 1846-1851

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn L, Böger RH.

**Determination of a reference value for N,N-dimethyl-L-arginine in 500 subjects.**

Eur. J. Clin. Invest. 2005; 35 : 622-626

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T.

**Asymmetric dimethylarginine and the risk of Plasmaiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study.**

Circ. Res. 2005; 97: e53-59

O'Dwyer MJ, Dempsey F, Crowley V, Kelleher D, McManus R, Ryan T.

**Septic shock correlates with ADMA levels which may be influenced by a polymorphism in DDAH II: a prospective observational study.**

Crit. Care 2006; 10: (5): R139

Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K, Vasiliadou C, Tentolouris C, Bouras G, Pitsavos C, Stefanidis C.

**Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines**

Am. J. Clin. Nutr. 2006; 84: 781-788

Wang TZ., Chen WJ., Cheng WC., Lin JW., Chen MF., Lee YT.

**Relation of improvement in endothelium-dependent flowmediated vasodilation after Rosiglitazone to changes in asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, and C-reactive protein in nondiabetic patients with the metabolic syndrome**

Am. J. Plasmaiol. 2006; 9: 1057-1062

Wanby P., Nilsson I., Brudin L., Nyhammar I., Gustafsson I., Carlsson M.

**Increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with carotid stenosis: no evidence for the role of the common FABBP2 A54T gene polymorphism**

Acta Neurol. Scand. 2007; 115: 90-96

Konishi H, Sydow K, Cooke JP.

**Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury**

J. Am. Coll. Plasmaiol. 2007; 49: 1099-1105

Iribarren C, Husson G, Sydow K, Wang BY, Sidney S, Cooke JP.

**Asymmetric dimethyl-arginine and coronary artery calcification in young adults entering middle age: the PLASMAIA Study**

Eur. J. Plasmaiovasc. Prev. Rehabil. 2007; 14:222-229

Melikian N, Wheatcroft SB, Ogah OS, Murphy C, Chowienczyk PJ, Wierzbicki AS, Sanders TA, Jiang B, Duncan ER, Shah AM, Kearney MT.

**Asymmetric dimethylarginine and reduced nitric oxide bioavailability in young Black African men**

Hypertension 2007; 49: 873-877

Horowitz JD, Heresztyn T.

**An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations.**

J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2007; epub ahead of print

Korish AA, Arafah MM.

**Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF)**

Arch. Gerontol. Geriatr. 2007; in press

Charitidou C, Farmakiotis D, Zournatzi V, Pidonia I, Pegiou T, Karamanis N, Hatzistilianou M, Katsikis I, Panidis D.

**The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome**

Atherosclerosis 2007; in press

## **Allgemeine Literatur**

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.

**Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure**

Lancet 1992; 339: 572 - 575

Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS.

**Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor**

J. Am. Med. Assoc. 2002; 287: 1420-1426

Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH.

**Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD)**

Lancet 2001; 358: 2113-2117

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA.

**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

Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaidis KH.

**Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia**

Lancet 2003; 361: 1511-1517

Böger RH.

**The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel Plasmaiovascular risk factor**

Plasmaiovasc. Res. 2003; 59: 824-833

Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC.

**Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse Plasmaiovascular events after percutaneous coronary intervention.**

Eur Heart J. 2003; 24: 1912-1919

## Pipettierschema Probenvorbereitung (ADMA und Arginin)

		Standard	Kontrolle	Plasma	Serum
<b>Standard 1 - 6</b>	µl	20			
<b>Kontrolle 1 &amp; 2</b>	µl		20		
<b>Plasma</b>	µl			20	
<b>Serum</b>	µl				20
<b>Acylierungspuffer</b>	µl	20	20	20	20
<b>Ausgleichsreagenz</b>	µl	200	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

<b>Acylierungsreagenz</b>	µl	50	50	50	50
---------------------------	----	----	----	----	----

**Sofort** 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

ADMA  
Arginin

**25 µl** Überstand für ELISA einsetzen  
**10 µl** Überstand für ELISA einsetzen

## Pipettierschema ADMA ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
<b>Acyl. Standard</b>	μl	25		
<b>Acyl. Kontrolle</b>	μl		25	
<b>Acyl. Probe</b>	μl			25
<b>Antiserum</b>	μl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben.  
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

<b>Enzymkonjugat</b>	μl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

<b>Substrat</b>	μl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

<b>Stopplösung</b>	μl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm

## Pipettierschema Arginin ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
<b>Acyl. Standard</b>	µl	10		
<b>Acyl. Kontrolle</b>	µl		10	
<b>Acyl. Probe</b>	µl			10
<b>Antiserum</b>	µl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben.  
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

<b>Enzymkonjugat</b>	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

<b>Substrat</b>	µl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

<b>Stopplösung</b>	µl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm