

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktion: Prof. Dr. med. Tim Magnus & Prof. Dr. med. Götz Thomalla

Sphingosin-1-Phosphat und Homoarginin als Biomarker bei zerebraler Ischämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Laura Schwieren
aus Neuss

Hamburg 2023

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.07.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jens Gempt

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Chi-un Choe

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Waltraud Pfeilschifter

Inhaltsverzeichnis

1 Publikationen.....	4
2 Darstellung der Publikationen.....	22
2.1 Einleitung.....	22
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Patient:innen.....	25
2.2.2 Studiendesign und klinische Untersuchung.....	26
2.2.3 Messung und Analyse der Biomarker.....	27
2.2.4 Statistische Auswertung.....	28
2.3 Ergebnisse.....	29
2.3.1 Charakteristika der Patient:innen.....	29
2.3.2 Risikofaktoren.....	32
2.3.3 Phänotyp.....	32
2.3.4 Outcome.....	33
2.3.5 Validierungskohorte.....	34
2.4 Diskussion.....	35
2.5 Konklusion.....	40
2.7 Zusammenfassung.....	41
2.7 Summary.....	42
2.8 Abkürzungsverzeichnis.....	43
2.9 Literaturverzeichnis.....	44
3 Erklärung des Eigenanteils.....	48
4 Danksagung.....	49
5 Lebenslauf.....	50
6 Eidesstattliche Erklärung.....	51

ORIGINAL ARTICLE

Serum Sphingosine-1-Phosphate Levels Are Associated With Severity and Outcome in Patients With Cerebral Ischemia

Edzard Schwedhelm¹, PhD*; Laura Schwieren, B.Med*; Steffen Tiedt, MD; Mirjam von Lucadou, MSc; Nils-Ole Gloyer², B.Med; Rainer Böger³, MD; Tim Magnus, MD; Guenter Daum, PhD; Götz Thomalla, MD; Christian Gerloff, MD; Chi-un Choe¹, MD

BACKGROUND AND PURPOSE: The aim of this study was to examine whether sphingosine-1-phosphate (S1P) levels in patients with acute stroke are associated with stroke severity and outcome.

METHODS: In a prospective stroke cohort (MARK-STROKE), 374 patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack were enrolled (mean age: 67.9 ± 13.0 years, sex: 64.7% male), and serum-S1P at admission was analyzed with tandem mass spectrometry. In addition to cross-sectional analyses, 79 adverse events (death, stroke, myocardial infarction, rehospitalization) were recorded in 270 patients during follow-up. Regression analyses were adjusted for age, sex, low-density lipoprotein cholesterol, and vascular risk factors. Results were validated in an independent stroke cohort with 219 patients with acute ischemic stroke (CIRCULAS).

RESULTS: Low serum-S1P was associated with higher National Institutes of Health Stroke Scale score at admission and with anterior circulation nonlacunar infarcts determined by multivariate regression analyses. During a follow-up of 294 ± 170 days, patients with S1P in the lowest tertile ($<1.33 \mu\text{mol/L}$) had more adverse events (Kaplan-Meier analysis, $P=0.048$ for trend). In adjusted Cox regression analysis, the lowest S1P tertile was associated with a worse outcome after stroke (hazard ratio, HR 0.51 [95% confidence interval 0.28–0.92]). Results were confirmed in an independent cohort, ie, low S1P levels were associated with higher National Institutes of Health Stroke Scale, larger infarct volumes and worse outcome after 90 days (β -coefficient: -0.03 , $P=0.026$; β -coefficient: -0.099 , $P=0.009$ and odds ratio 0.52 [0.28–0.96], respectively).

CONCLUSIONS: Our findings imply a detrimental role of low S1P levels in acute stroke and therefore underpin the therapeutic potential of S1P-mimics.

GRAPHIC ABSTRACT: An online [graphic abstract](#) is available for this article.

Key Words: infarct size ■ ischemic attack, transient ■ risk factors ■ sphingosine ■ tandem mass spectrometry

Sphingosine-1-phosphate (S1P) regulates cell survival, lymphocyte migration, and endothelial barrier function—all processes affected in acute ischemic stroke. Therefore, different S1P receptor agonists have been studied in numerous experimental stroke models and have been proven beneficial.^{1–4} Distinct mechanisms have been suggested to be involved in the neuroprotective

effect of S1P, including decreased MMP (matrix metalloproteinase)-9 activity, reduced blood-brain barrier disruption, and improved microvascular circulation.^{5,6} In addition to vascular pathology, S1P also plays a major role in immunologic processes. Most importantly, S1P receptor 1 is critical for the egress of lymphocytes from lymphatic organs and fingolimod targeting S1P receptor 1 is already

Correspondence to: Chi-un Choe, MD, Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany. Email cchoe@uke.de

*E. Schwedhelm and L. Schwieren contributed equally.

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/STROKEAHA.120.033414>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page XXX.

© 2021 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at www.ahajournals.org/journal/str

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

CIRCULAS	circulating biomarkers in acute stroke
CK	creatine kinase
CRP	C-reactive protein
GOT	glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	glutamate-pyruvate transaminase
HDL	high-density lipoprotein
LDL	low-density lipoprotein
MARK-STROKE	biomarkers in stroke
MMP	matrix metalloproteinase
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
OR	odds ratio
S1P	sphingosine-1-phosphate
TIA	transient ischemic attack

clinically used in patients with multiple sclerosis. Recent clinical trials tried to repurpose fingolimod for acute stroke therapy.^{7B} Clinical pilot trials co-administering fingolimod with alteplase suggested that fingolimod might attenuate reperfusion injury and improve clinical outcome in patients with acute ischemic stroke.^{7B} In addition to cerebrovascular disease, low S1P levels were associated with acute coronary syndrome and myocardial infarcts in a nested case-control study.⁹ Furthermore, fingolimod improved diastolic function in mouse models of hypertrophic cardiomyopathy suggesting a causal relationship.¹⁰

Despite these previous studies, the association of S1P levels with clinical and outcome parameters in patients with acute stroke has not been studied yet. Therefore, we aimed to evaluate the potential link of S1P with clinical parameters and outcome after acute ischemic stroke.

METHODS

Data Availability

A subset of the data generated for this study including S1P levels are available at GitHub and can be accessed at https://github.com/MarkersInHamburg/S1P_in_MARK-STROKE_and_CIRCULAS.git. Additional data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. See the [Data Supplement](#) for the STROBE checklist required by the journal.

Study Design, Ethical Approval, and Patient Consent (MARK-STROKE)

The biomarkers in stroke (MARK-STROKE) study is an ongoing prospective observational single-center study at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, which recruited 413 patients from the stroke unit at the Department of Neurology

from November 2017 until August 2019. After exclusion of patients without acute ischemic stroke or transient ischemic attack, 374 patients were enrolled. The inclusion criteria were age >18 years and diagnosis of stroke or transient ischemic attack at discharge. From December 2019 until March 2020, all patients were followed up by phone or mail. For 270 patients, we recorded adverse events (ie, death, myocardial infarction, stroke, and/or rehospitalization). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (PV4715 and PV5979). The investigation was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Clinical Assessment

Neurological deficits were assessed by National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and modified Rankin Scale at admission. Demographic parameters, past medical history, including comorbidities (arterial hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus, atrial fibrillation, prior stroke, prior myocardial infarction), laboratory (creatinine kinase [CK], creatinine, GOT [glutamic oxaloacetic transaminase], GPT [glutamate-pyruvate transaminase], CRP [C-reactive protein], triglycerides, total cholesterol, LDL (low-density lipoprotein) cholesterol, and HDL (high-density lipoprotein) cholesterol) and imaging data (infarct type, internal carotid artery stenosis) were obtained from medical records.



S1P Measurements

S1P measurements were obtained from serum samples collected at admission as previously described.¹¹ Briefly, 20 μ L of serum sample were incubated with 20 μ L of the internal standard (1 μ mol/L [16,17,18-²H₇]-S1P (S1P-d₇, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)). After protein precipitation with 350 μ L acetonitrile/water, 80/20 (vol/vol), and centrifugation, supernatants were subjected to reverse-phase chromatography on a Zorbax SB-C₈ column (2.1 \times 50 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). S1P was eluted with a binary gradient for 6 min (methanol/acetonitrile/0.1% formic acid: 2.5/2.5/95 to 30/30/40, vol/vol/vol) and quantified applying tandem mass spectrometry (Varian L1200 MS/MS, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), by monitoring the m/z 380 to 264 transition of S1P and the m/z 387 to 271 transition of S1P-d₇. Based on the area under the curve ratio of the S1P and S1P-d₇ peaks, calibration curves (4 levels of S1P: 0; 0.1; 0.3; 1; 3 μ mol/L) were generated to calculate the absolute S1P concentration in samples. Two levels of quality controls (QCs) were included on each microtiter plate: for QC-low BSA was spiked with 0.3 μ M S1P and for QC-high with 1.0 μ M S1P, respectively. For both QC levels, coefficients of variation were below 10%, which was considered within the acceptance limits for precision.

Statistical Analysis

Continuous variables are given as arithmetic mean \pm SD if normally distributed, otherwise as median (25th–75th percentile), and categorical variables are given as numbers (percentage) of participants. Relationships between S1P and continuous variables were assessed by Pearson's correlation or linear regression analyses (β -coefficient and 95% CI). Statistical comparisons of 2 groups were made by Student *t* test (2-tailed) for matched groups or by logistic regression analyses with odds ratios (ORs)

and corresponding 95% CI. For regression analysis, we calculated β -coefficients, and ORs for different models: unadjusted (model 1), adjusted for age and sex (model 2), and adjusted for age, sex, LDL, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia (model 3). Univariate associations between S1P and events were assessed with Kaplan-Meier survival analyses and log-rank test. The independent association between S1P and events was determined by multivariable Cox regression analyses with results presented as hazard ratio (HR) with corresponding 95% CI. For Cox regression, we calculated HRs for different models: unadjusted (model 1), adjusted for age and sex (model 2), and adjusted for age, sex, NIHSS at admission, LDL, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia (model 3). A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics (version 27, IBM Corp, Armonk, NY) and GraphPad Prism (version 5 for Windows, La Jolla).

Validation in the Circulating Biomarkers in Acute Stroke (CIRCULAS) Study

Results were validated in an independent cohort of patients with acute stroke from the Ludwig-Maximilian-Universität in Munich. Recruitment and baseline characteristics of the circulating biomarkers in acute stroke (CIRCULAS) study have been described elsewhere.¹² For this study, serum samples from patients with acute stroke were collected upon admission within 24 hours of symptom onset. Serum metabolites were measured by Metabolon as described previously.¹³ For this study, we performed a targeted look-up and exclusively extracted relative concentrations of S1P. Values were standardized by centering to the mean and scaling by SD. In accordance with the first cohort, β -coefficients and ORs were calculated for different models: unadjusted (model 1), adjusted for age and sex (model 2), and adjusted for age, sex, LDL creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia (model 3). All analyses for the validation cohort were performed in R (version 3.5.0, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

S1P Levels and Stroke Phenotype

The 374 patients with stroke of the MARK-STROKE biomarker cohort were 67.9 ± 13.0 years old and 64.7% male (Table 1). Serum-S1P concentrations were positively correlated with total cholesterol, triglycerides, LDL, but not with HDL, creatinine or CRP (Table 2). Inverse correlations for serum-S1P were observed with age and neurological impairment, that is, NIHSS and modified Rankin Scale (Table 2). In multivariate analyses, the association between S1P levels with NIHSS at baseline remained significant in models adjusted for age, sex, LDL, creatinine and vascular risk factors (Table 3). Cross-sectional analysis revealed significantly lower S1P levels in patients with stroke with prior myocardial infarction (Table 4). In line with a negative correlation between serum-S1P and NIHSS scores, lower S1P levels were found in patients with stroke with anterior circulation nonlacunar infarcts compared with those with lacunar infarcts, 1.43 ± 0.28 $\mu\text{mol/L}$,

Table 1. Baseline Characteristics

Characteristics	MARK-STROKE (n=374)	CIRCULAS (n=219)
Demographic parameters		
Age, y	67.9 \pm 13.0	72.0 \pm 13.6
Male	242 (64.7)	115 (52.5)
Smoking	94 (25.1)	112 (51.1)
Hypertension	270 (72.2)	171 (78.1)
Hyperlipidemia	121 (32.4)	93 (42.5)
Diabetes	63 (16.8)	35 (16.0)
Atrial fibrillation	81 (21.7)	52 (23.7)
Prior myocardial infarct	41 (11.0)	23 (10.5)
Prior stroke	62 (16.6)	64 (29.2)
BMI, kg/m ²	26.3 \pm 4.5	26.1 \pm 4.7
Δ T, h	65.2 \pm 57.5	4.2 \pm 4.9
Laboratory parameters		
Hemoglobin, mg/dL	13.6 \pm 1.8	13.9 \pm 1.8
Leucocytes, 10 ⁹ /L	7.7 \pm 2.4	8.6 \pm 3.5
Thrombocytes, 10 ⁹ /L	244 \pm 82	237 \pm 109
Cholesterol, mg/dL	187.1 \pm 46.6	184.4 \pm 46.3
Triglycerides, mg/dL	142 \pm 75	115.3 \pm 58.6
LDL, mg/dL	108.3 \pm 42.4	117.6 \pm 38.9
HDL, mg/dL	51.0 \pm 17.2	50.0 \pm 13.1
GOT, U/L	23.7 \pm 10.9	26.4 \pm 12.5
GPT, U/L	29.2 \pm 34.3	21.8 \pm 16.0
CK, U/L	126 \pm 151	177 \pm 617
Creatinine, mg/dL	1.04 \pm 0.94	1.08 \pm 0.32
CRP, mg/dL	1.31 \pm 2.42	1.08 \pm 2.66
S1P, $\mu\text{mol/L}$	1.50 \pm 0.35	NA
Medication		
Antiplatelet	259 (69.3)	69 (31.5)
Lipid-lowering	270 (72.2)	73 (33.3)
Antihypertensive	268 (71.7)	140 (63.9)
Neurological parameters		
TIA	108 (28.9)	0 (0)
NIHSS, points	2.7 \pm 3.6	6.7 \pm 6.3
mRS, stage	1.5 \pm 1.4	2.8 \pm 1.5
ICA stenosis	90 (24.1)	48 (21.9)

Data are given as mean \pm SD or number (%), as appropriate. Δ T indicates time from symptom onset until blood collection; CIRCULAS, circulating biomarkers in acute stroke; CK, creatine kinase; CRP, C-reactive protein; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamate-pyruvate transaminase; HDL, high-density lipoprotein; ICA, internal carotid artery; LDL, low-density lipoprotein; MARK-STROKE, biomarkers in stroke; mRS, modified Rankin Scale; NA, not available; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; S1P, sphingosine-1-phosphate; and TIA, transient ischemic attack.

and 1.57 ± 0.38 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($P=0.008$). In logistic regression analyses, the associations between serum-S1P and prior myocardial infarction remained significant (OR, 0.19 [95% CI, 0.05–0.70]), whereas we observed only a trend for serum-S1P and anterior circulation nonlacunar infarcts in fully adjusted models (OR, 0.37 [95% CI, 0.13–1.06]; Table 3). We did not observe any association

Table 2. Correlation of S1P With Clinical and Laboratory Parameters in MARK-STROKE

	Correlation coefficient <i>r</i>	<i>P</i> value
Age	−0.145	<0.01†
Hemoglobin	0.240	<0.001‡
Thrombocytes	0.325	<0.001‡
Cholesterol	0.251	<0.001‡
Triglycerides	0.132	0.01*
LDL	0.238	<0.001‡
HDL	−0.028	0.60
Creatinine	0.009	0.87
CRP	0.061	0.48
NIHSS	−0.192	<0.001‡
mRS	−0.175	0.001†
Carotid intima-media thickness	0.002	0.97

Correlation analysis with Pearson coefficients. CRP indicates C-reactive protein; MARK-STROKE, biomarkers in stroke; mRS, modified Rankin Scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; HDL, high-density lipoprotein; and LDL, low-density lipoprotein.

* $P < 0.05$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.001$.

of serum-S1P with parameters of atherosclerosis, that is, carotid intima-media thickness or the presence of internal carotid artery stenosis (Tables 2 and 4).

S1P and Stroke Outcome

During a mean follow-up period of 294 ± 170 days, we registered 79 adverse events among 270 patients with acute stroke. Baseline serum-S1P levels were significantly lower in patients with adverse events compared with those without an adverse event (no event: 1.52 ± 0.35 $\mu\text{mol/L}$, event: 1.43 ± 0.31 $\mu\text{mol/L}$, $n = 273$, $P = 0.03$, Table 4). In logistic regression analyses, this difference was significant after adjustment for age and sex (OR, 0.41 [0.17–0.95]) but revealed only a trend after additional adjustments for NIHSS at admission, LDL, creatinine, and prevalent vascular disease (OR, 0.44 [0.18–1.07]; Table 3). In Kaplan-Meier analyses, low S1P levels were significantly associated with adverse events (Figure [A]; $P = 0.048$, log-rank test, $n = 270$). In adjusted Cox regression analysis, patients in the lowest serum-S1P tertile had a significantly reduced disease-free survival compared with the highest serum-S1P tertile after full adjustment for age, sex, NIHSS at admission, LDL, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia (HR, 0.51 [0.28–0.92]; $n = 265$, Figure [B]).

S1P in the Validation Cohort

Finally, we validated these findings in the CIRCULAS cohort, which consisted of 219 patients with acute stroke (Table 1). In cross-sectional analyses, serum-S1P was inversely associated with NIHSS (β -coefficient: -0.030 , $P = 0.03$, Table 5). In agreement with the association of

Table 3. Regression Analysis of S1P Levels With NIHSS, Territorial Infarct, Prior MI, and Adverse Events in MARK-STROKE

	Model	β coefficient (95% CI)	<i>P</i> value
NIHSS	1	−1.918 (−2.942 to −0.894)	<0.001‡
	2	−1.877 (−2.908 to −0.845)	<0.001‡
	3	−1.698 (−2.759 to −0.637)	0.002†
	Model	Odds ratio (95% CI)	<i>P</i> value
PACI/TACI vs LACI	1	0.276 (0.105 to 0.727)	0.009†
	2	0.263 (0.095 to 0.724)	0.010*
	3	0.370 (0.128 to 1.064)	0.065
Prior MI vs no prior MI	1	0.144 (0.044 to 0.473)	0.001†
	2	0.182 (0.053 to 0.629)	0.007†
	3	0.188 (0.050 to 0.704)	0.010*
Event vs no event	1	0.419 (0.180 to 0.973)	0.043*
	2	0.406 (0.174 to 0.948)	0.037*
	3	0.443 (0.18 to −1.067)	0.052

Linear or logistic regression analysis with beta coefficients (95% CI) (model 1: unadjusted; model 2: adjusted for age and sex; model 3: adjusted for age, sex, LDL-C, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia. LACI indicates lacunar circulation infarct; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MI, myocardial infarction; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; MARK-STROKE, biomarkers in stroke; PACI, lacunar circulation infarct; S1P, sphingosine-1-phosphate; and TACI, total anterior circulation infarct.

* $P < 0.05$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.001$.

low serum-S1P with anterior circulation nonlacunar infarcts found in the MARK-STROKE cohort, a linear and inverse association was also observed for serum-S1P with infarct volume in the CIRCULAS cohort as well (β -coefficient: -0.090 , $P = 0.024$, Table 5). During the 90-day follow-up, low serum-S1P levels were associated with a higher mortality and more severe impairment in survivors (OR, 0.53 [0.28–0.99] and β -coefficient: -0.500 , $P = 0.018$, respectively, Table 5).

DISCUSSION

In our study, low serum-S1P levels in patients with acute stroke were associated with (1) more severe neurological impairment, (2) anterior circulation nonlacunar infarcts, (3) cardiac comorbidities, and (4) worse outcome. Although animal stroke experiments and clinical pilot trials suggest a protective effect of the sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist fingolimod in stroke,^{1,3,8} a direct link between blood borne S1P levels with clinical and outcome parameters has not yet been demonstrated. Here, we show that low serum-S1P concentrations are associated with more severe neurological deficits at admission independent of possible confounders. In animal models, S1P has been shown to enhance collateral growth, to improve microvascular circulation, and to attenuate blood-brain-barrier dysfunction, all of which may contribute to reduce infarct size.^{5,6} In agreement with these observations, S1P levels were lower in patients with stroke with anterior circulation nonlacunar

Table 4. Comparison of S1P Levels With Absence or Presence of Clinical Parameters in MARK-STROKE

	Absent	Present	P value
Smoking	1.48±0.36 μmol/L	1.55±0.33 μmol/L	0.082
Hypertension	1.53±0.41 μmol/L	1.49±0.32 μmol/L	0.319
Hyperlipidemia	1.48±0.35 μmol/L	1.53±0.34 μmol/L	0.190
Diabetes	1.50±0.36 μmol/L	1.49±0.27 μmol/L	0.924
Atrial fibrillation	1.52±0.35 μmol/L	1.43±0.32 μmol/L	0.064
Prior myocardial infarct	1.52±0.35 μmol/L	1.36±0.30 μmol/L	0.006†
Prior stroke	1.49±0.36 μmol/L	1.56±0.28 μmol/L	0.139
ICA	1.50±0.35 μmol/L	1.50±0.31 μmol/L	0.999
Nonlacunar infarct	1.57±0.38 μmol/L	1.43±0.28 μmol/L	0.008†
Adverse event	1.52±0.35 μmol/L	1.43±0.31 μmol/L	0.033*

Data are given as mean±SD. Comparison of 2 independent groups with *t* test. ICA indicates internal carotid artery; MARK-STROKE, biomarkers in stroke; and S1P, sphingosine-1-phosphate.

**P*<0.05, †*P*<0.01.

infarcts compared with lacunar infarcts in the MARK-STROKE cohort and an inverse association between serum-S1P and infarct volume was observed in the CIRCULAS cohort. Notably, both studies were conducted, measured, and analyzed entirely independent of each other and revealed the same major findings.

In 2 clinical pilot trials, patients with acute stroke treated with alteplase plus fingolimod had smaller infarct sizes and a better clinical improvement at 24 hours.⁷⁸ Both trials included patients with anterior circulation

infarct and intracranial large vessel occlusion. In our study, patients with stroke with nonlacunar infarcts had low serum-S1P levels. Therefore, especially low serum S1P levels would be expected in patients with stroke with large vessel occlusion. Although serum S1P was associated with lesion volume and NIHSS in our cohorts of the general stroke population, beneficial effects of S1P agonists are particularly promising in patients with stroke with large infarct sizes and severe impairment. In addition to clinical studies, a recent mechanistic study unequivocally demonstrated that S1P signaling is required to sustain endothelial function in the brain, whereas disruption of this pathway exacerbated brain injury in permanent and transient animal stroke models.¹⁴

A previous study from our center has shown lower serum-S1P in vascular patients when compared with a group of healthy blood donors.¹⁵ In that cohort, associations between atherosclerotic parameters and serum-S1P levels have not been observed possibly due to the prevalence of undetected low grade atherosclerosis in most of these individuals. It is also possible that lower serum-S1P levels in vascular patients are due the early impairment of endothelial functions, rather than the prevalence of established plaques. In line with this assumption, the analysis of 200 human carotid plaques revealed a correlation between plaque instability with all sphingolipids except for S1P.¹⁶ In contrast to arteriosclerotic etiologies, in our study S1P was found inversely associated with cardiac comorbidities, that is,

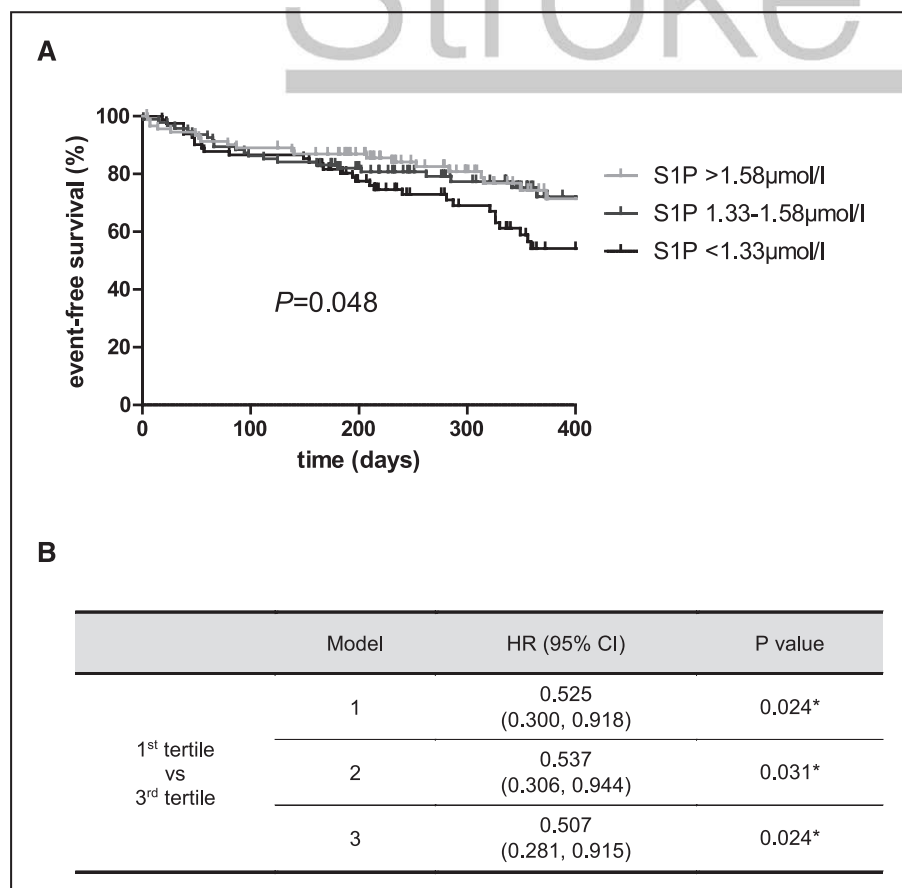


Figure. Kaplan-Meier and Cox regression analysis of patients with acute stroke.

A, Kaplan-Meier curves for adverse events (death, stroke, myocardial infarction, rehospitalization) stratified by sphingosine-1-phosphate (S1P) tertiles during a follow-up time of 365 d after stroke (lowest tertile: <1.33 μmol/L, second tertile: 1.33–1.58 μmol/L, highest tertile >1.58 μmol/L; *P*=0.048, *n*=274). **B**, Cox regression analysis of unadjusted and adjusted models for the lowest vs highest tertile of S1P concentrations (model 1: unadjusted, model 2: adjusted for age and sex, model 3: adjusted for age, sex, low-density lipoprotein cholesterol, National Institutes of Health Stroke Scale at admission, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia; **P*<0.05).

Table 5. Regression Analysis of S1P Levels With NIHSS, Infarct Volume, mRS After 90 Days and Death Within 90 Days in CIRCULAS

	Model	β coefficient	P value
NIHSS	1	-0.034	0.002†
	2	-0.034	0.004†
	3	-0.030	0.030*
Infarct volume	1	-0.104	0.002†
	2	-0.104	0.002†
	3	-0.090	0.024*
mRS 90 d	1	-0.466	0.01*
	2	-0.375	0.042*
	3	-0.500	0.018*
	Model	Odds ratio (95% CI)	P value
Death 90 d	1	0.53 (0.31–0.88)	0.015*
	2	0.60 (0.36–1.01)	0.054
	3	0.53 (0.28–0.99)	0.048*

Linear or logistic regression analysis with beta coefficients or odds ratios (95% CI), respectively (model 1: unadjusted; model 2: adjusted for age and sex; model 3: adjusted for age, sex, LDL-C, creatinine, prevalent arterial hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia) (n=219). CIRCULAS indicates circulating biomarkers in acute stroke; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; mRS, modified Rankin Scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; and S1P, sphingosine-1-phosphate.

* $P < 0.05$, † $P < 0.01$.

previous myocardial infarction and possibly atrial fibrillation. Recent studies in mouse models of cardiac hypertrophy and myocardial ischemia have shown beneficial effects of S1P receptor agonists strongly suggesting a beneficial effect for serum-S1P.^{10,17}

Most importantly, low serum-S1P levels were associated with adverse events after acute ischemic stroke. In the MARK-STROKE cohort, adverse events included death, stroke, myocardial infarction, and rehospitalization and a significant difference between tertiles was observed after 200 days. In the CIRCULAS cohort, a significant association of low serum-S1P levels with mortality and modified Rankin Scale was observed already after 90 days. Higher NIHSS scores in the CIRCULAS study might explain why increased event rates and more severe neurological impairment in association with low serum-S1P levels are observed earlier. In line with our findings, a recent case-control study revealed an association of low plasma-S1P levels with myocardial infarction and acute coronary syndrome.⁹ This and previous studies suggest a protective role of HDL-bound S1P as an integral component of functional (versus dysfunctional) HDL.^{9,18} Whether the beneficial effect of S1P in patients with stroke is linked to HDL-function should be explored in future studies. Low serum-S1P levels are also found in patients with pneumonia and sepsis, which might link to endothelial dysfunction observed in these patients.^{19,20} In our study, the causes for death and rehospitalization have not been documented and therefore we cannot rule out that some adverse events might be attributed to the

association between serum-S1P and infectious causes. Other limitations of our study include the small sample size, the relatively short period for follow-up examinations and the multi-factorial end point in the MARK-STROKE study. Furthermore, S1P levels in the CIRCULAS cohort are based on a metabolome analysis, and therefore, absolute S1P concentration between the 2 studies cannot be compared. Although our findings await verification in larger, randomized multicenter clinical trials, the validation of our major findings in an independent stroke cohort already underlines the robustness of our observations.

CONCLUSIONS

In conclusion, our findings imply a detrimental role of low S1P levels in acute stroke and therefore underpin the therapeutic potential of S1P-mimics.

ARTICLE INFORMATION

Received November 4, 2020; final revision received March 5, 2021; accepted April 5, 2021.

Affiliations

Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany (E.S., L.S., M.v.L., N.-O.G., R.B.). German Center for Cardiovascular Research (DZHK), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Germany (E.S., M.v.L., G.D.). Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany (L.S., T.M., G.T., C.G., C.-u.C.). Institute for Stroke and Dementia Research, University Hospital, LMU Munich, Germany (S.T.). Department of Vascular Medicine, University Heart and Vascular Center Hamburg-Eppendorf, Germany (G.D.).

Acknowledgments

Dr Choe conceived and designed the study. Dr Choe, L. Schwieren, Dr Tiedt, M. von Lucadou, N.-O. Gloyer, and Dr Schwedhelm acquired and analyzed the data. All authors interpreted the data. Dr Choe drafted the article. All other authors revised the article for intellectual content. Drs Choe, Tiedt, and Schwedhelm had access to the clinical data. All authors had access to the data generated in the study including the statistical analysis and decided to submit the article for publication.

Sources of Funding

Dr Choe reports grants from Else Kröner-Fresenius Stiftung during the conduct of the study (grant number: 2018_EKES.04). N.-O. Gloyer was supported by a research scholarship from the German Center for Cardiovascular Research, partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany during the conduct of the study.

Disclosures

Dr Schwedhelm reports grants from German Center for Cardiovascular Research outside the submitted work. M. von Lucadou reports personal fees from German Centre for Cardiovascular Research outside the submitted work. Dr Thomalla reports personal fees from Acandis, grants and personal fees from Bayer, personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Bristol-Myers-Squibb/Pfizer, personal fees from Portola, and personal fees from Stryker outside the submitted work. Dr Gerloff reports personal fees from AMGEN, personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Daiichi Sankyo, personal fees from Abbott, personal fees from Prediction Biosciences, and personal fees from Bayer outside the submitted work. Furthermore, Dr Gerloff received a personal fee from Novartis for his lecture "Digitalization, learning machines ... and a handful of neurologists" as keynote speaker at a general neurology meeting, which was not related to Fingolimod, Siponimod or any other S1P agonist. Dr Choe reports personal fees from Pfizer outside the submitted work. L. Schwieren, Dr Tiedt, N.-O. Gloyer. The other authors report no conflicts.



REFERENCES

- Brait VH, Tarrasón G, Gavalda A, Godessart N, Planas AM. Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 agonist is protective against

- ischemia/reperfusion in mice. *Stroke*. 2016;47:3053–3056. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015371
2. Dang C, Lu Y, Li Q, Wang C, Ma X. Efficacy of the sphingosine-1-phosphate receptor agonist fingolimod in animal models of stroke: an updated meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2021;131:85–94. doi: 10.1080/00207454.2020.1733556
 3. Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, Rolland W, Zhang JH. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke*. 2010;41:368–374. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.568899
 4. Raza Z, Saleem U, Naureen Z. Sphingosine 1-phosphate signaling in ischemia and reperfusion injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2020;149:106436. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106436
 5. Kim GS, Yang L, Zhang G, Zhao H, Selim M, McCullough LD, Kluk MJ, Sanchez T. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nat Commun*. 2015;6:7893. doi: 10.1038/ncomms8893
 6. Li H, Zhou X, Li Y, Ma X, Gonzales RJ, Qiu S, Shi FD, Liu Q. The selective sphingosine 1-phosphate receptor 1 modulator RP101075 improves microvascular circulation after cerebrovascular thrombosis. *FASEB J*. 2019;33:10935–10941. doi: 10.1096/fj.201900282R
 7. Tian DC, Shi K, Zhu Z, Yao J, Yang X, Su L, Zhang S, Zhang M, Gonzales RJ, Liu Q, et al. Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow. *Ann Neurol*. 2018;84:717–728. doi: 10.1002/ana.25352
 8. Zhu Z, Fu Y, Tian D, Sun N, Han W, Chang G, Dong Y, Xu X, Liu Q, Huang D, et al. Combination of the immune modulator fingolimod with alteplase in acute ischemic stroke: a pilot trial. *Circulation*. 2015;132:1104–1112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016371
 9. Soria-Florido MT, Castañer O, Lassale C, Estruch R, Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Corella D, Ros E, Arós F, Elosua R, et al. Dysfunctional high-density lipoproteins are associated with a greater incidence of acute coronary syndrome in a population at high cardiovascular risk: a nested case-control study. *Circulation*. 2020;141:444–453. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041658
 10. Ryba DM, Warren CM, Karam CN, Davis RT 3rd, Chowdhury SAK, Alvarez MG, McCann M, Liew CW, Wieczorek DF, Varga P, et al. Sphingosine-1-Phosphate receptor modulator, FTY720, improves diastolic dysfunction and partially reverses atrial remodeling in a Tm-E180G mouse model linked to hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2019;12:e005835. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005835
 11. Daum G, Winkler M, Moritz E, Müller T, Geffken M, von Lucadou M, Haddad M, Peine S, Böger RH, Larena-Avellaneda A, et al. Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate concentrations in a healthy study group. *TH Open*. 2020;4:e12–e19. doi: 10.1055/s-0040-1701205
 12. Tiedt S, Brandmaier S, Kollmeier H, Duering M, Artati A, Adamski J, Klein M, Liebig T, Holdt LM, Teupser D, et al. Circulating metabolites differentiate acute ischemic stroke from stroke mimics. *Ann Neurol*. 2020;88:736–746. doi: 10.1002/ana.25859
 13. Tiedt S, Prestel M, Malik R, Schieferdecker N, Duering M, Kautzky V, Stoycheva I, Böck J, Northoff BH, Klein M, et al. RNA-Seq identifies circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as potential biomarkers for acute ischemic stroke. *Circ Res*. 2017;121:970–980. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311572
 14. Nitzsche A, Poitvin M, Benarab A, Bonnin P, Faraco G, Uchida H, Favre J, Garcia-Bonilla L, Garcia MCL, Léger PL, et al. Endothelial S1P1 signaling counteracts infarct expansion in ischemic stroke. *Circ Res*. 2021;128:363–382. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316711
 15. Soltau I, Mudersbach E, Geissen M, Schwedhelm E, Winkler MS, Geffken M, Peine S, Schoen G, Debus ES, Larena-Avellaneda A, et al. Serum-Sphingosine-1-Phosphate concentrations are inversely associated with atherosclerotic diseases in humans. *PLoS One*. 2016;11:e0168302. doi: 10.1371/journal.pone.0168302
 16. Edsfeldt A, Dunér P, Ståhlman M, Mollet IG, Ascietto G, Grufman H, Nitulescu M, Persson AF, Fisher RM, Melander O, et al. Sphingolipids contribute to human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:1132–1140. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.305675
 17. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schäfers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Herrmann S, Stypmann J, et al. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation*. 2006;114:1403–1409. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607135
 18. Sattler K, Lehmann I, Gräler M, Bröcker-Preuss M, Erbel R, Heusch G, Levkau B. HDL-bound sphingosine-1-phosphate (S1P) predicts the severity of coronary artery atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:172–184. doi: 10.1159/000362993
 19. Hsu SC, Chang JH, Hsu YP, Bai KJ, Huang SK, Hsu CW. Circulating sphingosine-1-phosphate as a prognostic biomarker for community-acquired pneumonia. *PLoS One*. 2019;14:e0216963. doi: 10.1371/journal.pone.0216963
 20. Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, Mudersbach E, Bauer A, Robbe L, Zahre C, Geffken M, Peine S, Schwedhelm E, et al. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care*. 2015;19:372. doi: 10.1186/s13054-015-1089-0

Article

Homoarginine Associates with Carotid Intima-Media Thickness and Atrial Fibrillation and Predicts Adverse Events after Stroke

Laura Schwieren^{1,2}, Märit Jensen¹, Robert Schulz¹, Susanne Lezius³, Elena Laxy¹, Magalie Milatz¹, Götz Thomalla¹, Rainer Böger² , Christian Gerloff¹, Tim Magnus¹, Edzard Schwedhelm^{2,4,†} 
and Chi-un Choe^{1,*,†}

¹ Department of Neurology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

² Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

³ Institute of Medical Biometry and Epidemiology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

⁴ German Centre for Cardiovascular Research (DZHK e.V.) Partner Site Hamburg/Kiel/Lübeck, 20246 Hamburg, Germany

* Correspondence: c.choe@kh-itzehoe.de

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Homoarginine is associated with cardio- and cerebrovascular morbidity and mortality. However, the underlying pathomechanisms remain elusive. Here, we evaluated the association of homoarginine with adverse events (i.e., death, stroke, and myocardial infarction) and carotid intima-media thickness (cIMT) in stroke patients. In the prospective bioMARKers in STROKE (MARK-STROKE) cohort, patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) were enrolled. Plasma homoarginine concentrations were analyzed and associated with clinical phenotypes in cross-sectional (374 patients) and prospective (273 patients) analyses. Adjustments for possible confounders were evaluated. A two-fold increase in homoarginine was inversely associated with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score at admission, cIMT, and prevalent atrial fibrillation (mean factor -0.68 [95% confidence interval (CI): $-1.30, -0.07$], -0.14 [95% CI: $-0.22, -0.05$]; and odds ratio 0.57 [95% CI: $0.33, 0.96$], respectively). During the follow-up (median 284 [25th, 75th percentile: 198, 431] days), individuals with homoarginine levels in the highest tertile had fewer incident events compared with patients in the lowest homoarginine tertile independent of traditional risk factors (hazard ratio 0.22 [95% CI: $0.08, 0.63$]). A lower prevalence of atrial fibrillation and a reduced cIMT pinpointed potential underlying pathomechanisms.

Keywords: homoarginine; acute stroke; transient ischemic attack; carotid intima-media thickness; atrial fibrillation



Citation: Schwieren, L.; Jensen, M.; Schulz, R.; Lezius, S.; Laxy, E.; Milatz, M.; Thomalla, G.; Böger, R.; Gerloff, C.; Magnus, T.; et al. Homoarginine Associates with Carotid Intima-Media Thickness and Atrial Fibrillation and Predicts Adverse Events after Stroke. *Life* **2023**, *13*, 1590. <https://doi.org/10.3390/life13071590>

Academic Editor: Chad R. Frasier

Received: 6 June 2023

Revised: 13 July 2023

Accepted: 17 July 2023

Published: 20 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Globally, stroke is the second leading cause of death, accounting for 11.6% of all deaths, and the third leading cause of disability and premature death, accounting for 5.7% of all disability-adjusted life years lost, with atherosclerosis being one common underlying pathology [1]. Improved prevention programs and acute therapy interventions cause a decline in age-standardized incidence, prevalence, and mortality rates. However, the absolute burden of disease has steadily increased from 1990 to 2019 due to aging populations, and morbidity and mortality rates are expected to further increase together with enormous healthcare costs [1]. Based on these epidemiological data, the urgent need for improvement both primary preventive strategies and therapeutic options, can be derived.

While pharmacological treatment of risk factors like hypertension and abnormal lipid levels have substantially lowered the mortality risk, there is still a medical need to

improve morbidity and to reduce adverse events; e.g., ischemic stroke and myocardial infarction. Carotid artery intimal-media thickness (cIMT) is one measure of subclinical atherosclerotic burden, with higher values being associated with an adverse cerebrovascular and cardiovascular prognosis [2]. Consequently, cIMT has also been proposed as a surrogate marker for therapeutic interventions directed at lowering atherosclerotic burden [3]. In preliminary work, we and others identified new therapeutic targets to improve the outcome of cerebrovascular and cardiovascular disease; for example, homoarginine [4,5].

Homoarginine is a nonproteinogenic amino acid that differs from arginine by one methylene group [5]. It was first isolated from the seeds of the red pea (*lathyrus cicera*) in 1962 by the English botanist and chemist Ernest Arthur Bell [6]. It is supplied via foods such as red peas, grass peas (*lathyrus sativa*), or lentils (*lens culinaris*) [7]. In the Central European diet, red peas, grass peas, and lentils play a minor role, while these legumes are still used in Southern European (Portugal, Spain, and Italy) cuisine as well as in East Africa (e.g., Ethiopia) and Central and South Asia (India, Bangladesh, Kashmir, and Nepal) [8]. A study that examined the differentiation of exogenous and endogenous protein in the chyme of miniature pigs demonstrated that homoarginine was almost completely absorbed in the jejunum and ileum [9]. The absorption of homoarginine in the human gastrointestinal tract is not well studied yet.

Endogenously, homoarginine is produced in kidneys, liver, and pancreas by the mitochondrial enzyme arginine:glycine amidinotransferase (AGAT). Yet, the alimental intake of homoarginine seems to play a minor role, and it remains to be examined how much homoarginine is derived from food versus enzymatic production [5]. AGAT catalyzes the synthesis of L-homoarginine from L-arginine and L-lysine, while arginase can at least in principle hydrolyze L-homoarginine to L-lysine and urea [10]. However, high L-homoarginine concentrations inhibit arginase, which consecutively leads to increasing arginine and nitric oxide (NO) concentrations, improving vascular homeostasis [11]. Additionally, L-homoarginine serves as a direct substrate for endothelial NO synthase (eNOS) [12]. Furthermore, L-homoarginine is a specific uncompetitive inhibitor of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). TNAP is expressed in many tissues, including vascular endothelial cells. Epidemiological studies have indicated that elevated TNAP concentrations in blood are an independent predictor of overall mortality in patients with stroke and other cardiovascular diseases [13]. The enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase 2 metabolizes L-homoarginine to 6-guanidino-2-oxocaproic acid, whereas some other enzymes of the urea cycle could be involved in the metabolism as well [14]. In addition to enzymatic clearance, homoarginine is also excreted into the urine [5]. However, the extent of hepatic and renal excretion seems to be moderate, and homoarginine can be determined in plasma and serum at median concentrations of 1.77 [25th, 75th percentile: 1.38, 2.26] $\mu\text{mol/L}$ and 2.56 [1.99, 3.32] $\mu\text{mol/L}$, respectively, in women and 2.01 [1.61, 2.56] and 2.72 [2.20, 3.33] $\mu\text{mol/L}$, respectively, in men [15,16]. Of note, during pregnancy mean serum homoarginine concentrations increase up to $5.3 \pm 1.5 \mu\text{mol/L}$ in the third trimester [17].

Previously, we associated homoarginine in the population-based Dallas Heart Study inversely with subclinical atherosclerosis; i.e., aortic wall thickness, and homoarginine was found to predict cardiovascular morbidity and mortality [18]. Similarly, a cohort study postulated a strong relationship between arginine and the NO pathway with aortic atherosclerosis but not with aortic distensibility, suggesting different mechanisms in aortic wall remodeling [19]. In cerebrovascular patients, the ratios of homoarginine over asymmetric dimethylarginine and of homoarginine over symmetric dimethylarginine can discriminate stroke etiologies, predict internal carotid artery stenosis, and estimate the risk of atrial fibrillation [20]. In addition to atherosclerotic phenotypes, cardio-embolic etiologies, especially those due to atrial fibrillation, are a main and independent cause of ischemic stroke. Previous studies demonstrated that homoarginine is also inversely associated with corrected QT interval duration and seems to predict prevalent atrial fibrillation [21] as

well as advanced atrial fibrillation progression phenotypes [22]. In 3331 participants of the Framingham Offspring Study, lower plasma homoarginine concentrations were associated with higher all-cause mortality during a median follow-up of 18 years [23]. Recently, a meta-analysis of 13 studies that included 11,964 participants confirmed the inverse association of homoarginine and all-cause mortality. Of note, low levels of homoarginine were strongly associated with severe strokes and also revealed a trend toward increased risk for stroke [24]. We therefore examined the blood of patients with acute stroke or transient ischemic attack (TIA) and analyzed cross-sectional and prospective associations of plasma homoarginine with medical conditions as a risk factor for stroke (prevalent atrial fibrillation), cIMT as a parameter for the extant prevalent atherosclerosis, and incident events during a follow-up period in an independent stroke cohort.

2. Patients and Methods

2.1. Study Design, Ethical Approval, and Patient Consent

The bioMARKers in STROKE (MARK-STROKE) cohort is a prospective observational single-center study at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf that recruited 413 patients from the stroke unit at the Department of Neurology from November 2017 until August 2019 [25]. Firstly, every stroke unit patient assumed to have had an acute stroke or TIA was eligible for this study and was informed about this study. For strongly affected patients, a legal representative was allowed to give informed written consent. Exclusion criteria were acute or chronic impaired renal function and serious substance abuse. After exclusion of patients without a final diagnosis of an acute ischemic stroke or a TIA, 374 patients were enrolled.

The inclusion criteria were age >18 years, diagnosis of stroke or TIA at discharge, and written informed consent. From December 2019 until March 2020, all patients were followed up by phone, mail, or e-mail. A total of 273 patients or relatives could be reached, and adverse events (i.e., death, nonfatal myocardial infarction and stroke) were recorded. Information on adverse events was either obtained from patient records, reported by the patients themselves, or given by relatives of the deceased.

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (PV4715). Informed written consent was obtained from all subjects involved in the study.

2.2. Clinical Assessment

Neurological deficits were assessed via the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), and the cIMT was calculated using ultrasound measurements at admission. These assessments were conducted by experienced residents from the Department of Neurology. All data, including demographic parameters, past medical history, comorbidities (arterial hypertension, hyperlipidaemia, diabetes mellitus, atrial fibrillation, prior stroke, and prior myocardial infarction), laboratory parameters (glycated hemoglobin A1c (HbA1c), glomerular filtration rate (GFR), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), and triglycerides) and cIMT measured via ultrasound were collected as part of the standard stroke unit routine and obtained from the medical records of each patient, as previously described [20,25]. Medication on admission was evaluated for blood-thinning drugs, including acetylsalicylic acid, adenosine diphosphate receptor antagonists, and anticoagulants. Lipid-lowering drugs comprised statins, fibrates, and ezetimibe. The antihypertensive medication consisted of diuretics, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, beta adrenoceptor blockers, and calcium channel blockers. The GFR was calculated using the abbreviated MDRD equation: $186 \times (\text{creatinine}/88.4) - 1.154 \times (\text{age}) - 0.203 \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.210 \text{ if Black})$. For sonography of the right and left common carotid arteries, a high-resolution B-mode and duplex ultrasound using a GE Logiq7 system with a 7.5 MHz linear-array transducer (GE Healthcare, Solingen, Germany) was applied. In brief, cIMT was measured at the far wall, and the distance from the leading edge of the first echogenic line to the

leading edge of the second echogenic line with 10 mm proximal to the reference point at its thickest point in a region free of plaques was calculated. The greatest cIMT measured in the right and left common carotid artery was used to define the individual cIMT. All carotid ultrasound studies were performed by two investigators, and offline analyses of all frozen ultrasound images were performed by the same experienced reader, who was blinded to clinical data.

2.3. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometric Measurement of Homoarginine

As part of the admission routine, venous blood samples were taken from every patient participating in this study. In addition to the four standard laboratory monovettes (serum-gel, coagulation, EDTA K, and lithium–heparin; Sarstedt, Nümbrecht, Germany), one further monovette (EDTA K, 7.5 mL; Sarstedt) was taken for this study. The monovettes were centrifuged at 4 °C at 1000 rpm for 20 min. About 3 mL of the supernatant plasma from the monovettes was pipetted into two Eppendorf tubes and frozen at –80 °C.

The laboratory measurements were obtained from these blood samples collected at baseline and processed as previously described with minor modifications [26,27]. In brief, 25 µL of EDTA plasma, calibrator, or quality control sample was subjected to protein precipitation with 100 µL of methanol containing $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -L-homoarginine (2.5 µmol/L of $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -homoarginine; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) as the internal standard. Residues were derivatized to their butyl ester derivatives, and reconstituted samples were separated on an AQUITY UPLC BEH C₈ 1.7 µm (2.1 × 75 mm) column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using an elution gradient of the two mobile phases: (A) 0.1% formic acid in water and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile at a flow rate of 0.4 mL/min for 3.2 min. The mean retention time of homoarginine was 1.055 ± 0.014 min (n = 10). Quantification was performed with a Xevo Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) with positive electrospray ionization in multiple-reaction mode (MRM). The MRM transitions monitored were for homoarginine m/z 245.16 > 211.13 @ 16 eV and m/z 256.20 > 220.17 @ 16 eV for the internal standard $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -homoarginine. Peak area ratios of the analyte and internal standard were calculated for calibration (four levels; i.e., 0, 2, 5, and 10 µmol/L), quality control (QC-low and -high), and study samples and used for quantification. Quality control samples were accepted below a 15% relative standard deviation (RSD).

2.4. Statistical Analyses

Continuous variables are given as the mean ± standard deviation (SD) if normally distributed; otherwise they are given as the median [25th, 75th percentile], and categorical variables are given as numbers (percentage) of participants. Relationships between homoarginine and continuous variables were assessed via Spearman correlation or linear regression analyses on log-transformed variables (exponentiated beta coefficient (=mean factor) and 95% confidence interval (CI) are reported). Statistical comparisons of tertiles were made using one-way ANOVA, Kruskal–Wallis, or Chi² tests as appropriate. For associations with NIHSS and cIMT, we calculated beta coefficients. For statistical comparisons of AF groups, we used logistic regression analyses with odds ratios (ORs), and the corresponding 95% CIs were reported. Univariate associations between homoarginine and events were illustrated via Kaplan–Meier plots and compared with a Mantel–Cox log-rank test. The independent associations between homoarginine tertiles and the time to events were determined via multivariable Cox regression analyses, with results presented as the hazard ratio (HR) and corresponding 95% CI. We adjusted the beta coefficients, ORs, and HRs by applying different models: unadjusted (model 1); adjusted for age and sex (model 2); and additionally adjusted for hypertension, diabetes, smoking, hypercholesterolemia, and GFR (model 3).

A p -value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics (version 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism (version 5 for Windows, La Jolla, CA, USA).

Deidentified patient data and related documents such as the study protocol and statistical analysis plan will be shared upon request from any qualified investigator for 3 years after the date of publication.

3. Results

3.1. Homoarginine Levels and Stroke Risk Factors

The 374 patients in the MARK-STROKE cohort were 67.9 ± 13.0 years old, and 64.7% were male. The mean age of patients decreased from 72.9 ± 11.6 years to 63.3 ± 12.6 years from the lowest to the highest tertile of homoarginine, with homoarginine plasma concentrations below $1 \mu\text{mol/L}$ and above $1.5 \mu\text{mol/L}$, respectively (Table 1). The frequency of male patients was higher in the third and second tertile as compared with the first tertile of homoarginine; i.e., 74.4%, 73.4%, and 46.4%, respectively (Table 1). Across increasing homoarginine tertiles, we observed more smokers and a higher GFR but less atrial fibrillation, lower NIHSS scores, and a decreased cIMT (Table 1). Similarly, homoarginine concentrations were positively correlated with higher triglyceride levels and GFR but inversely correlated with age, NIHSS score at admission, and cIMT (Table 2). In multivariable analyses, only the association between homoarginine concentrations and NIHSS, cIMT, and atrial fibrillation remained significant in adjusted regression models (NIHSS: mean factor -0.68 [95% CI: $-1.30, -0.07$]; cIMT: -0.14 [95% CI: $-0.22, -0.05$]; atrial fibrillation: OR 0.57 [95% CI: $0.33, 0.96$], model 3 (Table 3).

Table 1. Baseline characteristics MARK-STROKE.

Characteristics	1st Tertile (n = 125) <1.0 $\mu\text{mol/L}$	2nd Tertile (n = 124) 1–1.5 $\mu\text{mol/L}$	3rd Tertile (n = 125) >1.5 $\mu\text{mol/L}$	p-Value
Demographic parameters				
Age, years	72.9 (11.6)	67.4 (13.1)	63.3 (12.6)	<0.001 ***
Male sex, %	58 (46.4)	91 (73.4)	93 (74.4)	<0.001 ***
Smoking, %	20 (16.0)	42 (33.9)	32 (25.6)	0.004 **
Hypertension, %	91 (72.8)	92 (74.2)	87 (69.6)	0.815
Hyperlipidaemia, %	34 (27.2)	44 (35.5)	43 (34.4)	0.315
Diabetes, %	19 (15.2)	27 (21.8)	17 (13.6)	0.259
Atrial fibrillation, %	37 (29.6)	29 (23.4)	15 (12.0)	0.003 **
Prior myocardial infarct, %	15 (12.0)	11 (8.9)	15 (12.0)	0.660
Prior stroke, %	15 (12.0)	28 (22.6)	19 (15.2)	0.071
BMI, kg/m^2	26.7 (4.2)	25.8 (4.3)	26.5 (4.9)	0.278
Laboratory parameters				
HbA _{1c} , %	5.7 [5.4, 6.0]	5.7 [5.4, 6.2]	5.6 [5.4, 6.0]	0.841
GFR, mL/min	72 [55, 89]	77 [62, 92]	84 [67, 97]	0.001 **
Triglycerides, mg/dL	112 [87, 160]	124 [93, 171]	128 [97, 199]	0.014 *
HDL, mg/dL	49 [40, 60]	49 [40, 61]	46 [38, 56]	0.319
LDL, mg/dL	105 [81, 134]	108 [75, 137]	101 [75, 132]	0.710
Homoarginine, $\mu\text{mol/L}$	0.77 [0.59, 0.87]	1.22 [1.11, 1.34]	1.94 [1.66, 2.21]	<0.001 ***
Medication				

Table 1. Cont.

Characteristics	1st Tertile (n = 125) <1.0 µmol/L	2nd Tertile (n = 124) 1–1.5 µmol/L	3rd Tertile (n = 125) >1.5 µmol/L	p-Value
Blood-thinning, %	105 (84.0)	107 (86.3)	109 (87.2)	0.756
Lipid-lowering, %	81 (64.8)	94 (75.8)	95 (76.0)	0.078
Antihypertensive, %	93 (74.4)	90 (72.6)	85 (68.0)	0.512
Neurological parameters				
NIHSS, points	2 [0, 4]	2 [0, 3]	1 [0, 3]	0.019 *
cIMT, mm	1.4 [1.1, 1.8]	1.2 [1.0, 1.6]	1.2 [1.0, 1.4]	<0.001 *

Continuous data are presented as the mean (SD), n (%), or median [25th, 75th percentile], as appropriate. Categorical variables are given as numbers (percentages) of participants. ANOVA, Kruskal–Wallis or Chi2 tests were used for comparisons between patient’s characteristics categorized by homoarginine tertiles (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Abbreviations: cIMT, carotid intima-media thickness; GFR, glomerular filtration rate; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale.

Table 2. Correlation of homoarginine with clinical and laboratory parameters in MARK-STROKE.

	Correlation Coefficient r	FDR-Corrected p-Value
Age	−0.312	<0.001 *
BMI	−0.042	0.431
NIHSS at admission	−0.140	0.007 *
GFR	0.225	<0.001 *
Triglycerides	0.159	0.002 *
cIMT	−0.232	<0.001 *

Spearman correlation coefficients with FDR-corrected p -values. * Indicates statistical significance after FDR adjustment for 6 tests.

Table 3. Linear and logistic regression analysis of homoarginine concentrations with NIHSS, cIMT, and AF.

Model	NIHSS		cIMT		AF		
	Mean Factor [95% CI]	p-Value	Mean Factor [95% CI]	p-Value	Odds Ratio [95% CI]	p-Value	
Homoarginine (per 2-fold increase)	1	−0.77 [−1.35, −0.19]	0.010 *	−0.18 [−0.26, −0.10]	<0.001 ***	0.41 [0.25, 0.67]	<0.001 ***
	2	−0.65 [−1.27, −0.04]	0.038 *	−0.13 [−0.22, −0.05]	0.002 **	0.53 [0.32, 0.89]	0.017 *
	3	−0.68 [−1.30, −0.07]	0.030 *	−0.14 [−0.22, −0.05]	0.002 **	0.57 [0.33, 0.96]	0.036 *

Linear and logistic regression analysis with beta coefficients and odds ratios [95% confidence interval (CI)]. Model 1: unadjusted; model 2: adjusted for age and sex; model 3: additionally adjusted for hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking, and GFR (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Abbreviations: AF, atrial fibrillation; NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale; cIMT, carotid intima-media thickness.

3.2. Homoarginine Levels and Stroke Outcome

During follow-up (median 284 [25th, 75th percentile: 198, 431] days), we registered 30 major adverse events among 273 stroke patients. A total of 18 patients died during the follow-up period. The causes of death were cardiac, malignant, organ failure, lethal stroke, or of other/unknown etiology. One patient suffered from a nonfatal myocardial infarction; 11 patients had another stroke. In the Kaplan–Meier plots, lower homoarginine levels were associated with incident events across homoarginine tertiles (Figure 1; $p = 0.041$, log-rank test). In the unadjusted and adjusted Cox regression analyses, patients in the highest homoarginine tertile had a significantly lower risk of events compared with the lowest homoarginine tertile (HR 0.22 [95% CI: 0.08, 0.63], model 3 (Table 4)).

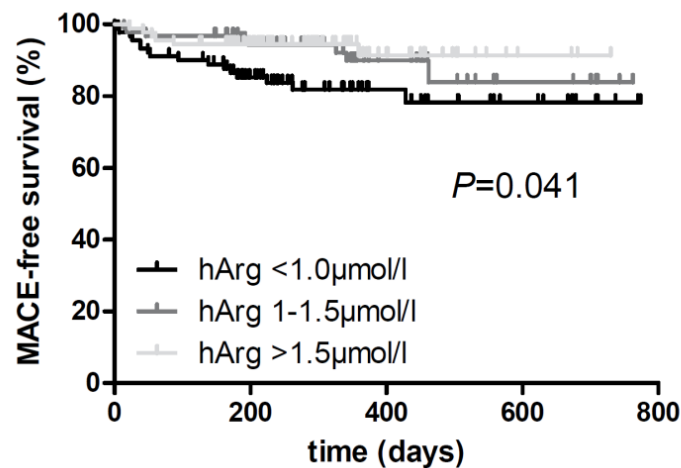


Figure 1. Kaplan–Meier curves for homoarginine tertiles during a median follow-up time of 284 [25th, 75th percentile: 198, 431] days after stroke (lowest tertile: $<1.0\ \mu\text{mol/L}$; second tertile: $1.0\text{--}1.5\ \mu\text{mol/L}$; highest tertile: $>1.5\ \mu\text{mol/L}$). Univariate associations between homoarginine and events were compared using a Mantel–Cox log-rank test ($n = 273$). Abbreviations: hArg, homoarginine; MACE, major adverse cardiovascular event (i.e., death, nonfatal stroke, and myocardial infarction).

Table 4. Cox regression analysis of high homoarginine to predict incident events.

	Model	3rd Tertile Versus 1st Tertile	
		Hazard Ratio [95% CI]	<i>p</i> -Value
Risk of major adverse events	1	0.37 [0.14, 0.94]	0.036 *
	2	0.24 [0.09, 0.66]	0.006 **
	3	0.22 [0.08, 0.63]	0.005 **

Cox regression analysis with hazard ratios [95% confidence interval (CI)]. Model 1: unadjusted; model 2: adjusted for age and sex; model 3: additionally adjusted for hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking, and GFR; $n = 273$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Major adverse events were death, nonfatal stroke, and myocardial infarction.

4. Discussion

Cerebro- and cardiovascular disease are still the leading causes of death worldwide. In preliminary work, we and others identified potential therapeutic targets to prevent or monitor disease and treatment; i.e., homoarginine and its anabolic enzyme AGAT [4,5]. In experimental models of AGAT deficiency, we investigated the functional and mechanistic role of homoarginine to elucidate underlying (patho)mechanisms of atherosclerosis and metabolic disorders [4,28]. In the MARK-STROKE clinical cohort, we now show that a two-fold increase of homoarginine is inversely associated with (1) cIMT and (2) prevalent atrial fibrillation and (3) that individuals with homoarginine levels in the highest tertile had fewer incident events compared with patients in the lowest homoarginine tertile independent of traditional risk factors.

In a large US population-based study with more than 3500 participants, we associated low homoarginine with increased aortic wall thickness; however, in 78 patients with stroke or TIA, homoarginine was neither correlated with aortic stiffness nor with aortic intima-media thickness [18,19]. In line with our previous results, a study on 5-year changes in carotid wall thickness in a South African cohort showed that higher levels of homoarginine played a protective role against vascular injury and delayed progression of carotid wall thickening [29]. We can now provide evidence that the cIMT inversely associates with homoarginine in stroke and TIA patients independently of other risks for atherosclerosis like hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, or smoking. Of particular note, not only does the cIMT decrease with increasing tertiles of homoarginine but also the functional decline as measured by NIHSS, which improves with increasing tertiles of homoarginine. This association might depend on the severity of the atherosclerotic burden. In a study of

40 healthy children and adolescents, neither homoarginine nor other arginine derivatives correlated with cIMT, suggesting that the inverse association of homoarginine and cIMT might be age- and disease-dependent [30]. Supplementation with homoarginine improves the outcome after acute ischemic stroke and suppresses T-cell proliferation and migration in diet-induced atherosclerosis in mice [31]. Moreover, in the second and third trimester of pregnancy, increasing homoarginine was found to be related to improved flow-dilated vasodilation [17]. Taking these results together, homoarginine might be a sharpened sword that ameliorates atherosclerosis by suppressing the immune response and improving vascular function.

Further, we uncovered an association of low homoarginine levels with atrial fibrillation in patients with acute stroke or TIA. Atrial fibrillation causes a detrimental increase in morbidity and mortality and elevates the risk of cardiogenic stroke. Previously, we found that patients with persistent atrial fibrillation at the time of blood sampling had the lowest homoarginine concentrations compared to paroxysmal atrial fibrillation [22]. In contrast, homoarginine levels did not correlate with the occurrence or persistence of atrial fibrillation in a population-based study [32]. Therefore, it seems likely that the association of homoarginine with atrial fibrillation depends on the underlying pathology.

Finally, we showed that low homoarginine is one predictor of incident events after stroke or TIA. In patients after stroke, comprehensive screening tools and risk assessments are needed to prevent further vascular events. For comparison, in patients with acute chest pain, low plasma homoarginine also was a risk marker for major adverse events (death, non-fatal myocardial infarction, and stroke), in particular for those with elevated high-sensitive troponin I [21]. Therefore, low homoarginine levels might be used to identify patients at increased cerebrovascular and cardiovascular risk to improve their aftercare. In the North West province arm of the Prospective Urban and Rural Epidemiology (PURE) South African study, it was examined whether homoarginine was associated with a 10-year risk of all-cause and cardiovascular mortality in a Black South African population. Cardiovascular mortality was defined as death due to cardiac failure, myocardial infarction, or stroke. The participants who survived had higher homoarginine plasma concentrations compared with those who died during the follow-up-period [33]. In another analysis from the PURE South African study, the plasma homoarginine levels of 166 participants who developed arterial hypertension were compared with the plasma homoarginine levels of 166 participants who remained normotensive for a follow-up period of 10 years. A positive association of plasma homoarginine with blood pressure in participants who remained normotensive could be demonstrated, suggesting a protective role of homoarginine for preserving normal blood pressure [34]. These findings also suggest a potential indirect protective effect of high homoarginine for individuals at acute stroke or TIA risk by ameliorating stroke risk factors such as hypertension.

Analyses from the population-based Young Finns Study ($n = 2106$; 54.6% females, aged 24–39) aimed to evaluate the predictive value of homoarginine in the development of cardiometabolic risk factors (hyperglycaemia, abdominal obesity, and type 2 diabetes) and outcomes like fatal stroke, heart failure, or sudden cardiac death [35]. A Mendelian randomization approach was used to test causal associations. In the 10-year follow-up analysis, homoarginine served as an independent predictor but did not reveal evidence of causal associations between serum homoarginine and cardiometabolic outcomes. Here, elevated concentrations of circulating homoarginine did not seem to change cardiometabolic disease risk [35].

The median homoarginine plasma concentration of our patients in the lowest tertile was $0.77 [0.59, 0.87] \mu\text{mol/L}$. Recently, we defined the sex-specific 2.5th and 97.5th percentiles of reference intervals of homoarginine plasma concentrations to be 0.84 and $3.89 \mu\text{mol/L}$ in women and 0.98 and $4.10 \mu\text{mol/L}$ in men, respectively [16]. The median homoarginine plasma concentrations of patients in the lowest tertile were barely within the lower 2.5th percentile of the reference intervals and represented the highest risk for major adverse events. Interestingly, homoarginine can be supplemented to healthy humans with-

out harm by applying a once-daily dosing of 125 mg [36]. This dosage was well tolerated without vascular or neurological abnormalities or any other significant side effects [37]. Our findings provide a clear rationale to conduct prospective studies with homoarginine supplementation [38]; e.g., such a study has been initiated in patients with acute ischemic stroke ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03692234) identifier: NCT03692234).

The limitations of these findings were a relatively small sample size and that the study did not include a control group, thus the prevalence of stroke and homoarginine levels in the population were not determined. Also, no records of eating habits were obtained, although the alimental effect of homoarginine ingestion seemed to be small, and foods containing noteworthy amounts of homoarginine are very rare in the standard Central European diet. Furthermore, there was a selection bias because our patients had to be capable of giving informed written consent. For strongly affected patients, a legal representative was allowed to give informed written consent alternatively. This reduced the number of participating patients with severe stroke or a high NIHSS score. In line with this notion, the mean NIHSS scores were relatively low, meaning most patients of our study had minor strokes.

5. Conclusions

In conclusion, low homoarginine significantly correlates with advanced arteriopathy, atrial fibrillation, and major adverse events in patients with recent stroke or TIA. Therefore, homoarginine may be a mediator that prevents mortality and morbidity in cerebrovascular patients. However, the evidence for causality is weak, and it remains to be determined if homoarginine is a protective cardiovascular mediator or a clinically useful biomarker of cerebrovascular and cardiovascular risk. Clinical studies that examine the effect of homoarginine supplementation in patients after acute stroke or TIA could provide further insights into possible positive effects of elevated plasma homoarginine levels in stroke pathology.

Author Contributions: C.-u.C. and E.S. conceived and designed the study. L.S., E.S. and C.-u.C. acquired and analyzed the clinical data. E.S. performed the homoarginine measurements. All authors interpreted the data. L.S. and C.-u.C. drafted the manuscript. All other authors revised the manuscript for intellectual content. L.S., E.S. and C.-u.C. had access to the clinical data. All authors had access to the data generated in the study (including the statistical analysis) and decided to submit the paper for publication. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.-u.C. and R.S. were supported by an Else Kröner Exzellenzstipendium from the Else Kröner-Fresenius Stiftung (grant numbers: 2018 EKES.04 to C.-u.C. and 2020 EKES.16 to R.S.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (PV4715; date of approval: 8 July 2014).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request by a qualified investigator for 3 years after the date of publication from the corresponding author.

Conflicts of Interest: L.S., R.B., G.T., E.S., and C.-u.C. report no disclosures relevant to this manuscript. C.G. received consultant or lecture fees from Bayer Vital, Boehringer Ingelheim, EBS Technologies, GlaxoSmithKline, Lundbeck, Pfizer, Sanofi Aventis, Silk Road Medical, and UCB.

References

1. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol.* **2021**, *20*, 795–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. O’Leary, D.H.; Polak, J.F.; Kronmal, R.A.; Manolio, T.A.; Burke, G.L.; Wolfson, S.K., Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 14–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Lorenz, M.W.; Markus, H.S.; Bots, M.L.; Rosvall, M.; Sitzer, M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. *Circulation* **2007**, *115*, 459–467. [[CrossRef](#)]
4. Choe, C.-U.; Atzler, D.; Wild, P.S.; Carter, A.M.; Böger, R.H.; Ojeda, F.; Simova, O.; Stockebrand, M.; Lackner, K.; Nabuurs, C.; et al. Homoarginine Levels Are Regulated by L-Arginine: Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome. *Circulation* **2013**, *128*, 1451–1461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Karetnikova, E.S.; Jarzebska, N.; Markov, A.G.; Weiss, N.; Lentz, S.R.; Rodionov, R.N. Is Homoarginine a Protective Cardiovascular Risk Factor? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 869–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bell, E.A. The isolation of L-homoarginine from seeds of *Lathyrus cicera*. *Biochem. J.* **1962**, *85*, 91–93. [[CrossRef](#)]
7. Rao, S.L. A look at the brighter facets of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid, homoarginine and the grass pea. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 620–622. [[CrossRef](#)]
8. Lambein, F.; Travella, S.; Kuo, Y.H.; Van Montagu, M.; Heijde, M. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.): Orphan crop, nutraceutical or just plain food? *Planta* **2019**, *250*, 821–838. [[CrossRef](#)]
9. Schmitz, M.; Hagemester, H.; Erbersdobler, H.F. Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *J. Nutr.* **1991**, *121*, 1575–1580. [[CrossRef](#)]
10. Bollenbach, A.; Cordts, K.; Hanff, E.; Atzler, D.; Choe, C.U.; Schwedhelm, E.; Tsikas, D. Evidence by GC-MS that lysine is an arginase-catalyzed metabolite of homoarginine in vitro and in vivo in humans. *Anal. Biochem.* **2019**, *577*, 59–66. [[CrossRef](#)]
11. Papageorgiou, N.; Androulakis, E.; Papaioannou, S.; Antoniadis, C.; Tousoulis, D. Homoarginine in the shadow of asymmetric dimethylarginine: From nitric oxide to cardiovascular disease. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1741–1750. [[CrossRef](#)]
12. Tsikas, D.; Bollenbach, A.; Hanff, E.; Kayacelebi, A.A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): The ADMA, SDMA and hArg paradoxes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 1. [[CrossRef](#)]
13. Ryu, W.S.; Lee, S.H.; Kim, C.K.; Kim, B.J.; Yoon, B.W. Increased serum alkaline phosphatase as a predictor of long-term mortality after stroke. *Neurology* **2010**, *75*, 1995–2002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Adams, S.; Che, D.; Qin, G.; Farouk, M.H.; Hailong, J.; Rui, H. Novel Biosynthesis, Metabolism and Physiological Functions of L-Homoarginine. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2019**, *20*, 184–193. [[CrossRef](#)]
15. Atzler, D.; Schwedhelm, E.; Nauck, M.; Ittermann, T.; Böger, R.H.; Friedrich, N. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, *52*, 1835–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Atzler, D.; Appelbaum, S.; Cordts, K.; Ojeda, F.M.; Wild, P.S.; Münzel, T.; Blankenberg, S.; Böger, R.H.; Blettner, M.; Beutel, M.E.; et al. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
17. Valtonen, P.; Laitinen, T.; Lyyra-Laitinen, T.; Raitakari, O.T.; Juonala, M.; Viikari, J.S.; Heiskanen, N.; Vanninen, E.; Punnonen, K.; Heinonen, S. Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ. J.* **2008**, *72*, 1879–1884. [[CrossRef](#)]
18. Atzler, D.; Gore, M.O.; Ayers, C.R.; Choe, C.U.; Böger, R.H.; de Lemos, J.A.; McGuire, D.K.; Schwedhelm, E. Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2501–2507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Haghikia, A.; Yanchev, G.R.; Kayacelebi, A.A.; Hanff, E.; Bledau, N.; Widera, C.; Sonnenschein, K.; Haghikia, A.; Weissenborn, K.; Bauersachs, J.; et al. The role of L-arginine/L-homoarginine/nitric oxide pathway for aortic distensibility and intima-media thickness in stroke patients. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1111–1121. [[CrossRef](#)]
20. Cordts, K.; Grzybowski, R.; Lezius, S.; Lüneburg, N.; Atzler, D.; Neu, A.; Hornig, S.; Böger, R.H.; Gerloff, C.; Magnus, T.; et al. Guanidino compound ratios are associated with stroke etiology, internal carotid artery stenosis and CHA(2)DS(2)-VASc score in three cross-sectional studies. *J. Neurol. Sci.* **2019**, *397*, 156–161. [[CrossRef](#)]
21. Atzler, D.; Baum, C.; Ojeda, F.; Keller, T.; Cordts, K.; Schnabel, R.B.; Choe, C.U.; Lackner, K.J.; Münzel, T.; Böger, R.H.; et al. Low Homoarginine Levels in the Prognosis of Patients With Acute Chest Pain. *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*, e002565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Büttner, P.; Bahls, M.; Böger, R.H.; Hindricks, G.; Thiele, H.; Schwedhelm, E.; Kornej, J. Arginine derivatives in atrial fibrillation progression phenotypes. *J. Mol. Med.* **2020**, *98*, 999–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schwedhelm, E.; Song, R.J.; Vasan, R.S.; van den Heuvel, E.R.; Hannemann, J.; Xanthakis, V.; Böger, R. Association of Lower Plasma Homoarginine Concentrations with Greater Risk of All-Cause Mortality in the Community: The Framingham Offspring Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zinellu, A.; Paliogiannis, P.; Carru, C.; Mangoni, A. Homoarginine and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Schwedhelm, E.; Schwieren, L.; Tiedt, S.; Lucadou, M.V.; Gloyer, N.-O.; Böger, R.; Magnus, T.; Daum, G.; Thomalla, G.; Gerloff, C.; et al. Serum Sphingosine-1-Phosphate Levels Are Associated With Severity and Outcome in Patients With Cerebral Ischemia. *Stroke* **2021**, *52*, 3901–3907. [[CrossRef](#)]
26. Atzler, D.; Mieth, M.; Maas, R.; Böger, R.H.; Schwedhelm, E. Stable isotope dilution assay for liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of L-homoarginine in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2294–2298. [[CrossRef](#)]
27. Cordts, K.; Atzler, D.; Qaderi, V.; Sydow, K.; Böger, R.H.; Choe, C.U.; Schwedhelm, E. Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC-MS/MS and ELISA: A comparison and a biological application. *Amino Acids* **2015**, *47*, 2015–2022. [[CrossRef](#)]

28. Stockebrand, M.; Hornig, S.; Neu, A.; Atzler, D.; Cordts, K.; Böger, R.H.; Isbrandt, D.; Schwedhelm, E.; Choe, C.U. Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1921–1929. [[CrossRef](#)]
29. Mokhaneli, M.C.; Fourie, C.M.T.; Botha-Le Roux, S.; Böger, R.H.; Schwedhelm, E.; Mels, C.M.C. Asymmetric dimethylarginine and L-homoarginine prospectively relate to carotid wall thickness in a South African cohort. *Amino Acids* **2020**, *52*, 965–973. [[CrossRef](#)]
30. Jaźwińska-Kozuba, A.; Martens-Lobenhoffer, J.; Kruszelnicka, O.; Rycaj, J.; Chyrchel, B.; Surdacki, A.; Bode-Böger, S.M. Opposite Associations of Plasma Homoarginine and Ornithine with Arginine in Healthy Children and Adolescents. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21819–21832. [[CrossRef](#)]
31. Nitz, K.; Lacy, M.; Bianchini, M.; Wichapong, K.; Küçükgoze, I.A.; Bonfiglio, C.A.; Migheli, R.; Wu, Y.; Burger, C.; Li, Y.; et al. The Amino Acid Homoarginine Inhibits Atherogenesis by Modulating T-Cell Function. *Circ. Res.* **2022**, *131*, 701–712. [[CrossRef](#)]
32. Niekamp, C.; Atzler, D.; Ojeda, F.M.; Sinning, C.R.; Lackner, K.J.; Böger, R.H.; Munzel, T.; Beutel, M.E.; Schmidtman, I.; Pfeiffer, N.; et al. Cross-Sectional Associations between Homoarginine, Intermediate Phenotypes, and Atrial Fibrillation in the Community-The Gutenberg Health Study. *Biomolecules* **2018**, *8*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mokhaneli, M.C.; Botha-Le Roux, S.; Fourie, C.M.T.; Böger, R.; Schwedhelm, E.; Mels, C.M.C. L-homoarginine is associated with decreased cardiovascular- and all-cause mortality. *Eur. J. Clin. Investig.* **2021**, *51*, e13472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mokhaneli, M.C.; Botha-Le Roux, S.; Fourie, C.M.T.; Böger, R.; Schwedhelm, E.; Mels, C.M.C. Homoarginine and blood pressure: A 10-year prospective relationship in normotensives. *J. Hum. Hypertens.* **2022**, *36*, 135–143. [[CrossRef](#)]
35. Seppälä, I.; Oksala, N.; Jula, A.; Kangas, A.J.; Soininen, P.; Hutri-Kähönen, N.; März, W.; Meinitzer, A.; Juonala, M.; Kähönen, M.; et al. The biomarker and causal roles of homoarginine in the development of cardiometabolic diseases: An observational and Mendelian randomization analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1130. [[CrossRef](#)]
36. Atzler, D.; Schönhoff, M.; Cordts, K.; Ortland, I.; Hoppe, J.; Hummel, F.C.; Gerloff, C.; Jaehde, U.; Jagodzinski, A.; Böger, R.H.; et al. Oral supplementation with L-homoarginine in young volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *82*, 1477–1485. [[CrossRef](#)]
37. Schönhoff, M.; Weineck, G.; Hoppe, J.; Hornig, S.; Cordts, K.; Atzler, D.; Gerloff, C.; Böger, R.; Neu, A.; Schwedhelm, E.; et al. Cognitive performance of 20 healthy humans supplemented with L-homoarginine for 4 weeks. *J. Clin. Neurosci.* **2018**, *50*, 237–241. [[CrossRef](#)]
38. Kleist, C.J.; Choe, C.U.; Atzler, D.; Schönhoff, M.; Böger, R.; Schwedhelm, E.; Wicha, S.G. Population kinetics of homoarginine and optimized supplementation for cardiovascular risk reduction. *Amino Acids* **2022**, *54*, 889–896. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2 Darstellung der Publikationen

2.1 Einleitung

Weltweit erleiden ca. 12 Millionen Menschen jährlich einen Schlaganfall, etwa 101 Millionen Menschen leben mit den Folgen dessen. Damit sind Schlaganfälle weltweit die zweithäufigste Todesursache und die dritthäufigste Ursache für sekundäre Behinderung und vorzeitigen Tod (Feigin et al., 2021).

Auffällig dabei ist die Zunahme der Inzidenz- und Prävalenzraten in Ländern mit niedrigerem mittleren Einkommen und der Anstieg eben dieser bei Patient:innen unter 70 Jahren. Dies könnte durch die globale Zunahme schlaganfallbezogener Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Übergewicht, Diabetes mellitus, Luftverschmutzung und Rauchen) erklärt werden. (Feigin et al., 2021).

Zusätzlich ist die Datenlage zu Häufigkeit und Zeitpunkt von Rezidiven bzw. unerwünschten Ereignissen nach Schlaganfällen noch unzureichend. Daten basierend auf einer GKV-Datenanalyse zeigten, dass das Risiko eines Rezidivs ein Jahr nach Erstereignis bei 7,4 % lag (Stahmeyer, 2019).

Aus diesen epidemiologischen Daten lässt sich die dringende Notwendigkeit einer Verbesserung der primär- und sekundärpräventiven Behandlungsstrategien ableiten. Insbesondere stellt sich die Frage, ob es zirkulierende Biomarker gibt, die einen prädiktiven Nutzen bei zerebraler Ischämie haben. Anhand von zwei Studien soll untersucht werden, ob Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Homoarginin (hArg) als Biomarker beim akuten Schlaganfall bzw. der transitorisch ischämischen Attacke (TIA) eingesetzt werden können. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob diese Marker ggf. auch einen therapeutischen Nutzen besitzen.

Sphingosin-1-Phosphat ist ein Signalmolekül aus der Gruppe der Sphingolipide bzw. Lysophospholipide. Extrazelluläres S1P bindet an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ist dadurch an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Spiegel and Milstien, 2002).

Die Bezeichnung „Sphingosin“ geht auf den deutschen Arzt Johann Thudichom zurück, der 1884 die chemische Zusammensetzung des Gehirns untersuchte und dabei eine neue Lipidklasse, die Glycosphingolipide, beschrieb. Das chemische Lösungsverhalten des Sphingosins, Grundbaustein dieser Stoffklasse, fand Thudichom rätselhaft: „In Anbetracht der vielen Rätsel, die es [das Sphingosin] dem

Fragesteller präsentierte, nenne ich es Sphingosin“, als Anspielung auf die Rätsel der Sphinx (Thudichum, 1884).

Zwei Untersuchungen zu S1P-Normwerten im Serum gesunder Proband:innen ergaben Referenzintervalle von 0,592 – 1,509 nmol/mL (Daum et al., 2020) und 0,534 - 1,242 µmol/L (Moritz et al., 2017).

Der Organismus produziert S1P aus Sphingomyelin oder Glykosphingolipiden, beides Bestandteile der Plasmamembran. In einem Zwischenschritt werden diese zu Sphingosin hydrolysiert und anschließend von Sphingosin-Kinasen phosphoryliert. Die Hauptsyntheseorte für S1P sind Endothelzellen, Erythrozyten sowie Thrombozyten. Die zelluläre Sekretion erfolgt in Endothelzellen über einen spezifischen Transporter, während der Mechanismus in Erythrozyten bislang wenig erforscht ist. Thrombozyten setzen S1P bei ihrer Aktivierung frei (Proia and Hla, 2015). Der Großteil des plasmatischen S1Ps ist an Transportproteine wie HDL (60%) oder Albumin (30%) gebunden (Argraves and Argraves, 2007).

Die S1P-Rezeptoren₁₋₅ sind im menschlichen Körper nahezu ubiquitär vorhanden. Eine Ligand-Rezeptor-Bindung an die unterschiedlichen S1P-Rezeptoren induziert diverse rezeptorspezifische, intrazelluläre Signalkaskaden, die unter anderem Zellüberleben, Lymphozytenmigration und Inflammation sowie die endotheliale Barrierefunktion regulieren (Proia and Hla, 2015).

Da die zuvor genannten, regulativen Funktionen von S1P allesamt Funktionen sind, die während eines ischämischen Schlaganfalls eine Rolle spielen bzw. gestört werden, wurde bereits das therapeutische Potenzial von S1P-Analoga *nach* akutem Schlaganfall in Mausmodellen (Brait et al., 2016, Dang et al., 2021, Hasegawa et al., 2010) und klinischen Pilotstudien (Zhu et al., 2015, Tian et al., 2018) untersucht.

Im Mausmodell zeigte sich eine Reduktion des Infarktolumens und besseres neurologisches Outcome. In den Pilotstudien zeigte die gleichzeitige Applikation von Alteplase und dem S1P-Analagon Fingolimod weniger Blutungen, reduzierte Infarktolumina und Infarktexpansion sowie weniger neurologische Defizite bei den Patient:innen (Brait et al., 2016, Dang et al., 2021).

Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass S1P sowohl Biomarker als auch therapeutisches Target beim akuten Schlaganfall ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die S1P-Serumkonzentrationen bei Patient:innen mit akutem Schlaganfall mit dem Schweregrad des Schlaganfalls und dem neurologischen Outcome korrelieren.

Homoarginin ist eine endogen im Menschen vorkommende, nicht proteinogene Aminosäure, welche im Unterschied zu der für den Menschen semi-essenziellen Aminosäure Arginin eine weitere Methylengruppe in ihrer Kohlenstoffhauptkette besitzt.

Es wurde 1962 erstmals von dem englischen Botaniker und Chemiker Ernest Arthur Bell aus den Samen der roten Platterbse (*Lathyrus cicera*) isoliert (Bell, 1962). Phylogenetisch verwandte Hülsenfrüchte enthalten ebenfalls nennenswerte Mengen an Homoarginin, wobei bislang unklar ist, ob der regelmäßige Konsum dieser Nahrungsmittel zu einer relevanten Erhöhung der Homoarginin-Konzentration im Blut führt (Rao, 2011).

Drei Untersuchungen zu Homoarginin-Normwerten im Plasma ergaben durchschnittliche Konzentrationen von $2,5 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$ (Atzler et al., 2011), $1,88 \mu\text{mol/l}$ ($1-4 \mu\text{mol/l}$), (Atzler et al., 2016a) und $2,87 \mu\text{mol/l}$ (Atzler et al., 2016c). Die Werte scheinen alters- und geringfügig geschlechtsabhängig (Frauen < Männer) sowie in Gesunden höher als in Kranken zu sein.

Neben der Aufnahme über die Nahrung kann der menschliche Organismus Homoarginin auch endogen in Leber, Nieren und Pankreas bilden. Das mitochondriale Enzym Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) katalysiert dabei die Übertragung der Guanidino-Gruppe von Lysin auf Arginin (Choe et al., 2013).

In hohen Konzentrationen hemmt Homoarginin das Enzym Arginase, welches auch im Gefäßendothel exprimiert wird und dort durch den Abbau von Arginin an der Regulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese beteiligt ist (Huynh and Chin-Dusting, 2006). NO-Synthase und Arginase konkurrieren um das Substrat Arginin. Durch Inhibition der Arginase können hohe Konzentrationen an Homoarginin die Verfügbarkeit von Arginin für die NO-Synthase verbessern und größere Mengen NO synthetisiert werden.

NO wirkt im Gefäß und übernimmt viele regulierende Funktionen für die Aufrechterhaltung der Gefäßhämostase. Es senkt lokal den Gefäßtonus, hemmt die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten sowie die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur. Eine verringerte Bioverfügbarkeit von NO spielt in der Pathogenese verschiedener vaskulärer Erkrankungen (arterieller Hypertonus, Atherosklerose, Reperfusionsschaden) eine entscheidende Rolle (Durante et al., 2007).

Bei Patient:innen mit kardiovaskulären Erkrankungen wurden geringere Homoarginin-Konzentrationen (Plasma oder Serum) gemessen, sodass die Verwendung von Homoarginin als Biomarker intensiv untersucht wird (Tsikas and Wu, 2015). In einer Studie (Choe et al., 2013) konnte gezeigt werden, dass sich hohe Homoarginin-Konzentrationen positiv auf Überleben nach einem ischämischen Schlaganfall auswirken.

Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Homoarginin sowohl für die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalles als auch für das Outcome nach ischämischem Schlaganfall von Bedeutung ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Homoarginin-Plasmakonzentration bei Patient:innen mit akutem Schlaganfall mit der Intima-Media-Dicke der Karotiden (cIMT) und mit unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen nach Entlassung korreliert.

2.2 Methoden

2.2.1 Patient:innen

Für diese Studie wurden zwischen November 2017 und August 2019 insgesamt 413 Patient:innen der Stroke Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Patient:innen, bei denen sich im Rahmen weiterer Diagnostik die Diagnose ischämischer Schlaganfall oder TIA nicht bestätigen ließ, wurden im Nachgang ausgeschlossen. Nach Ausschluss dieser Patient:innen wurden 374 Patient:innen mit der Diagnose ischämischer Schlaganfall oder TIA in die Studie eingeschlossen und ihre Daten ausgewertet. Von den 374 Patient:innen waren 132 weiblich und 242 männlich. Die Patient:innen waren zum Zeitpunkt der Studie durchschnittlich $67,9 \pm 13$ Jahre alt. Grundvoraussetzung für den Studieneinschluss waren Volljährigkeit, Einwilligungsfähigkeit, eine vollständige Aufklärung und eine unterschriebene Einverständniserklärung.

Ausschlusskriterien waren eine akut oder chronisch eingeschränkte Nierenfunktion sowie ein schwerwiegender Substanzmissbrauch.

Zwischen Dezember 2019 und März 2020 wurden alle Patient:innen postalisch und/oder telefonisch für ein Follow-up kontaktiert.

Von 374 Patient:innen konnten 270 (72,2 %) bzw. bei Versterben deren Angehörige erreicht werden. Diese wurden standardisiert befragt, ob sich nach Entlassung von der Stroke Unit des UKEs ein schweres unerwünschtes kardiovaskuläres Ereignis

(erneuter Schlaganfall/TIA, Myokardinfarkt, Tod) oder eine erneute Hospitalisierung ereignete.

2.2.2 Studiendesign und klinische Untersuchung

Bei dieser Studie handelt es sich um die Teilauswertung der fortlaufenden prospektiven Single-Center-Studie *MARK-STROKE* (biomarkers in stroke) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die Studie begann im November 2017 auf der Stroke Unit des UKEs. Patient:innen, die nach derzeitiger medizinischer Auffassung für die Studie infrage kamen, wurden über die Studie sowie Studienziele informiert und bei Teilnahmeinteresse vollumfänglich aufgeklärt. Nach schriftlicher Einwilligung erfolgte die venöse Blutentnahme zweier Monovetten (1x Serum-Gel, 1x EDTA K, 7,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben bei 4° C mit 1000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert.

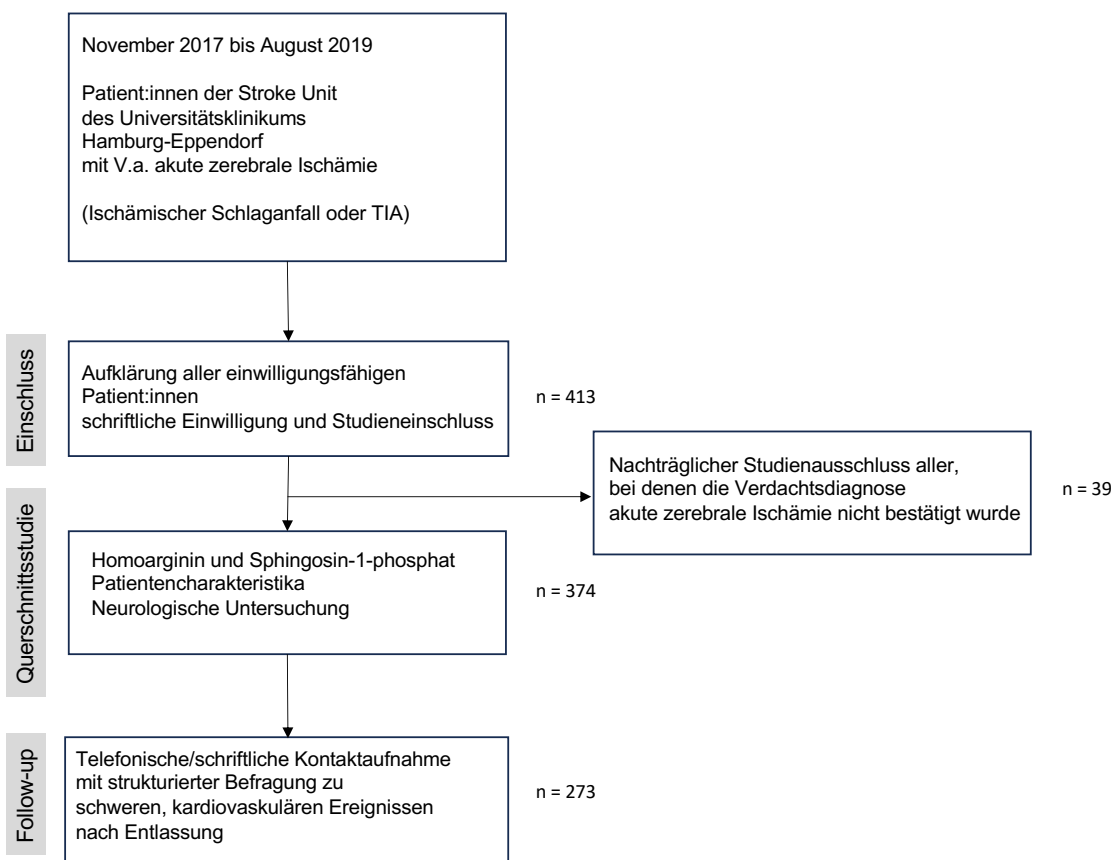


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Studienablaufs

Aus den Monovetten wurden ca. 3 ml (zweimal 1,5 ml) des überstehenden Plasmas in zwei Eppendorf-Tubes (á 2 ml) pipettiert und bei - 80° C eingefroren. Aus der EDTA-Monovette wurden zusätzlich 1,5 ml Cruor sanguinis (Blutkuchen) abpipettiert und

ebenfalls in Eppendorf-Tubes bei - 80° C eingefroren, sodass pro Patient:in fünf Proben konserviert wurden.

Die klinische Untersuchung der Patient:innen fand im Rahmen ihres stationären Aufenthalts auf der Stroke Unit statt und war Teil der standardmäßigen Schlaganfalldiagnostik und -behandlung (Vgl. Neurologische Komplexbehandlung des akuten Schlaganfalls).

Die Untersuchungsergebnisse wurden im Nachgang der Patientenakte entnommen. Zu den entnommenen Informationen zählen demographische Parameter (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht), Vorerkrankungen (arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Vorhofflimmern, stattgehabter ischämischer Schlaganfall/TIA, stattgehabter Myokardinfarkt), Laborparameter (HbA1c, Glomeruläre Filtrationsrate, Kreatinkinase, Kreatin, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, C-reaktives Protein, Triglyceride, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin) sowie Ergebnisse der Bildgebung (CT/MRT für Infarkttyp, Sonographie der Hirngefäße für Intima-Media-Dicke und Stenosen der Arteria carotis interna). Zur Quantifizierung neurologischer Defizite wurden der National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und modified Rankin Scale (mRS) herangezogen.

2.2.3 Messung und Analyse der Biomarker

Sphingosin-1-Phosphat

Für die Bestimmung der S1P-Konzentration in den Proben wurden jeweils 20 µl der Serumproben aufgetaut und mit 20 µl internem Standard (1 µmol/L ²H₇-S1P) in Methanol verdünnt. Zur Ausfällung der Proteine wurden 350 µl Acetonitril und Wasser im Verhältnis 80 zu 20 (vol/vol) hinzugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und die Überstände mittels hochauflösender Umkehrphasenchromatographie (HPLC) aufgetrennt. Dabei wurden S1P und ²H₇-S1P mit Acetonitril und Methanol im Verhältnis 50 zu 50 und 0,1 % Ameisensäure in Wasser über einen Gradienten mit abnehmendem Wasseranteil aus der stationären Phase (C8-modifiziertes Silika) eluiert und anschließend mit Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert. Die absolute S1P-Konzentration der Proben wurde durch das Verhältnis der Peakflächen von S1P zu internem Standard berechnet. Es wurden Qualitätskontrollen mitgemessen, deren Variationskoeffizient unter 10 % lag.

Homoarginin

Für die Bestimmung der Homoarginin-Konzentration in den Proben wurden jeweils 25 µl der EDTA-Plasmaproben aufgetaut und mit 100 µl internem Standard (2,5 µmol/L $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -L-Homoarginin) in Methanol verdünnt. Nach Ausfällung der Proteine wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände mittels HPLC aufgetrennt. Dabei wurden Homoarginin und $^{13}\text{C}_7^{15}\text{N}_4$ -L-Homoarginin mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril und 0,1% Ameisensäure in Wasser über einen Gradienten mit abnehmendem Wasseranteil aus der stationären Phase (C18-modifiziertes Silika) eluiert. Die absolute Homoarginin-Konzentration der Proben wurde durch das Verhältnis der Peakflächen von Homoarginin zu internem Standard berechnet. Es wurden Qualitätskontrollen mitgemessen, deren Variationskoeffizient unter 15% lag.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Werte kontinuierlicher Variablen wurden bei normaler Verteilung als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Bei Abweichung von der Normalverteilung wurden der Median sowie die 25. und 75. Perzentile angegeben. Kategoriale Variablen wurden in Zahlen (Prozentwerte) angegeben.

Die Beziehung zwischen den S1P-Werten und kontinuierlichen Variablen wurde mittels Pearson-Korrelation oder linearer Regressionsanalyse untersucht (β -Koeffizient und 95%-Konfidenzintervall).

Der statistische Vergleich zweier Gruppen wurde mittels zweiseitigem Student t-Test oder mittels logistischer Regressionsanalyse (Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervall) durchgeführt. Bei der Regressionsanalyse wurden β -Koeffizienten und Odds Ratios für drei unterschiedliche Modelle (nicht adjustiert; adjustiert nach Alter und Geschlecht; adjustiert nach Alter, Geschlecht, LDL-Cholesterin, Kreatinin, arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie) berechnet.

Die Beziehung zwischen den Homoarginin-Werten und kontinuierlichen Variablen wurde mittels Spearman-Korrelation oder linearer Regressionsanalyse untersucht (β -Koeffizient und 95%-Konfidenzintervall).

Der statistische Vergleich der Terzile (= drei Gruppen) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA,) Kruskal-Wallis oder Chi-Quadrat-Test entsprechend

durchgeführt. Der statistische Vergleich zweier Gruppen wurde mittels logistischer Regressionsanalyse (Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervall) durchgeführt.

Univariate Assoziationen zwischen S1P und klinischen Ereignissen sowie zwischen Homoarginin und klinischen Ereignissen wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt und mittels Log-Rang-Test verglichen.

Die unabhängigen Assoziationen zwischen S1P und klinischen Ereignissen wurden mittels multivariabler Cox-Regressionsanalyse bestimmt und die Ergebnisse als Hazard Ratio mit 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Die Hazard Ratios für die Cox-Regressionsanalyse wurden nach drei unterschiedlichen Modellen (nicht adjustiert; adjustiert nach Alter und Geschlecht; adjustiert nach Alter, Geschlecht, NIHSS bei Aufnahme, LDL-Cholesterin, Kreatinin, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie) berechnet.

Die unabhängigen Assoziationen von Homoarginin und Zeit bis zum klinischen Ereignissen wurden mittels multivariabler Cox-Regressionsanalyse bestimmt und die Ergebnisse als Hazard Ratio mit 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Für Assoziationen mit der Intima-Media-Dicke der Karotiden wurden β -Koeffizient, Odds Ratios und Hazard Ratios für drei unterschiedliche Modelle (nicht adjustiert; adjustiert nach Alter und Geschlecht; adjustiert nach Alter, Geschlecht, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Rauchen, Hypercholesterinämie und GFR) berechnet.

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Für die statistische Analyse wurden SPSS Statistics (Version 22 bzw. Version 27, IBM Corp., Armonk, NY) und GraphPad Prism (Version 5 für Windows, La Jolla, USA) verwendet.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Charakteristika der Patient:innen

Die untersuchte Population ist in beiden Publikationen dieselbe.

Von den ursprünglich eingeschlossenen Patient:innen wurden im Nachgang 39 ausgeschlossen, da sich die Ursache des initialen, akut neurologischen Defizits im Rahmen der stationären Abklärung als nicht-ischämisch oder nicht-akut herausstellte.

Die nicht-ischämischen oder nicht-akuten Ursachen umfassten epileptische Anfälle, atypische intracerebrale Blutung, Delir, Zunahme einer Gangstörung, vasovagale Präsynkope, bekannte ACI-Stenose und eine Aspergillose am N. opticus. Bei einem Teil der ausgeschlossenen Patient:innen blieb die Diagnose bis zur Entlassung unklar und wurde nicht als TIA aufgefasst.

Von den eingeschlossenen 374 Patient:innen zeigte sich bei 266 bildmorphologisch ein ischämischer Schlaganfall, das akut neurologische Defizit der anderen 108 Patient:innen (28,9 %) wurde als TIA aufgefasst.

Die Patient:innen waren zum Einschluss der Studie 67,9 Jahre alt \pm 13 Jahre alt. 35,3% der Untersuchten waren weiblich.

Vorerkrankungen, die gleichsam zerebrovaskuläre Risikofaktoren darstellen, wurden der Patientenakte entnommen. Unter alle Patient:innen hatten 72,2 % eine arterielle Hypertonie, 21,7 % ein Vorhofflimmern, 16,8 % einen Diabetes mellitus und 32,4 % eine Hyperlipidämie. Der durchschnittliche BMI betrug $26,3 \pm 4,5$ kg/m². Ein Viertel (25,1%) der Patient:innen hatte einer positive Rauchanamnese.

Die gemessenen Serum-S1P-Spiegel betragen im Durchschnitt $1,50 \pm 0,35$ μ mol/l. Die Homoarginin-Messungen ergaben für das erste Terzil einen Spiegel von $0,77$ μ mol/l [0,59; 0,87], für das zweite Terzil $1,22$ μ mol/l [1,11; 1,34] und für das dritte Terzil $1,94$ μ mol/l [1,66; 2,21].

Demographische Parameter	
Alter, Jahre	67,9 ± 13,0
Weibliches Geschlecht, %	132 (35,3)
Raucher:innen, %	94 (25,1)
art. Hypertension, %	270 (72,2)
Hyperlipidämie, %	121 (32,4)
Diabetes mellitus, %	63 (16,8)
Vorhofflimmern, %	81 (21,7)
Vorheriger Myokardinfarkt, %	41 (11)
Vorheriger Schlaganfall, %	62 (16,6)
BMI (kg/m ²)	26,3 ± 4,5
ΔT (Std.)	65,2 ± 57,5
Laborchemische Parameter	
Hämoglobin (mg/dL)	13,6 ± 1,8
Leukozyten (10 ⁹ /L)	7,7 ± 2,4
Thrombozyten 10 ⁹ /L)	244 ± 82
Gesamt-Cholesterin (mg/dL)	187,1 ± 46,6
HbA1c (%)	5,7 [5,4; 6,0]
GFR (mL/min)	77,7 [61,3; 92,7]
Triglyzeride (mg/dL)	142 ± 72
HDL-Cholesterin (mg/dL)	51,0 ± 17,2
LDL-Cholesterin (mg/dL)	108,3 ± 42,4
AST (U/L)	23,7 ± 10,9
ALT (U/L)	29,2 ± 34,3
CK (U/L)	126 ± 151
Kreatinin (mg/dL)	1,04 ± 0,94
CRP (mg/dL)	1,31 ± 2,42
Homoarginin (μmol/L)	1,31 [1,12; 1,47]
S1P (μmol/L)	1,50 ± 0,35
Vormedikation	
Blutverdünnend, %	321 (85,8)
<i>Thrombozytenaggregationshemmend, %</i>	<i>259 (69,3)</i>
Blutfettsenkend, %	270 (72,2)
Blutdrucksenkend, %	268 (71,7)
Klinische/neurologische Parameter	
NIHSS (Punkte)	2,7 ± 3,6
cIMT (mm)	1,3 [1,1; 1,6]
TIA, %	108 (28,9)
mRS (Stufe)	1,5 ± 1,4
ACI-Stenose, %	90 (24,1)

Abbildung 2: Merkmale der Studienpopulation

Unter allen Patient:innen nahmen 71,7 % Antihypertensiva und 72,2% Lipidsenker ein. Bei Medikamenten, die in die Blutgerinnung eingreifen, wurde für die Auswertung der S1P-Studie die Einnahme thrombozytenaggregationshemmender Medikamente betrachtet (69,3%), für die Auswertung der Homoarginin-Studie die Einnahme thrombozytenaggregationshemmender und gerinnungshemmender Medikamente (85,8%).

Zur klinischen Einschätzung des neurologischen Outcomes wurden der NIHSS-Wert und der mRS-Wert herangezogen. Der NIHSS betrug im Durchschnitt $2,7 \pm 3,6$ Punkte bzw. im ersten Terzil 2 Punkte [0; 4], im zweiten Terzil 2 Punkte [0; 3] und im dritten Terzil 1 Punkt [0; 3]. Der mRS-Wert betrug im Durchschnitt $1,5 \pm 1,4$ Punkte.

Die Darstellung der hirnversorgenden Arterien mittels Doppler-Sonographie ergab bei 24,1 % der Patient:innen eine ACI-Stenose und eine cIMT von 1,4 mm [1,1; 1,8] im ersten Terzil, 1,2 mm [1,0; 1,6] im zweiten Terzil und 1,2 mm [1,0; 1,4] im dritten Terzil.

2.3.2 Risikofaktoren (Homoarginin)

Im statistischen Vergleich der drei Terzile zeigte sich, dass Patient:innen mit steigendem Homoarginin-Wert seltener Vorhofflimmern hatten und die Intima-Media-Dicke der Karotiden abnahm. Dies ging auch mit niedrigerem NIHSS-Score einher. Patient:innen in den höheren Terzilen hatten eine niedrigere glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Interessanterweise befanden sich in den Gruppen mit höherem Homoarginin-Wert mehr Raucher:innen.

In Korrelationsanalysen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Homoarginin-Spiegel und den Triglycerid-Werten sowie der GFR. Eine negative Korrelation bestand zwischen Homoarginin-Spiegel und dem Lebensalter, dem NIHSS-Score und der Intima-Media-Dicke der Karotiden.

Nach Adjustierung von Alter und Geschlecht sowie den Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie, Rauchen und GFR blieb nur die Assoziation von höherem Homoarginin-Spiegel und geringerem NIHSS-Score, weniger Vorhofflimmern und eine Abnahme der Intima-Media-Dicke der Karotiden signifikant.

2.3.3 Phänotyp (S1P)

In Korrelationsanalysen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen S1P und Gesamt-Cholesterin, Triglyceriden und LDL-Cholesterin. Eine negative Korrelation zeigte sich zwischen S1P und dem Lebensalter und dem Schweregrad der neurologischen Behinderung (NIHSS-Score, mRS). Zwischen S1P und HDL-Cholesterin, Kreatinin und CRP zeigte sich keine korrelative Verbindung.

Nach Adjustierung von Alter und Geschlecht sowie LDL-Cholesterin, Kreatinin, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie blieb nur die Assoziation von höherem S1P und niedrigerem NIHSS-Score signifikant.

In der Querschnittsanalyse zeigte sich, dass Schlaganfall-Patient:innen, die zuvor einen Myokardinfarkt erlitten, niedrigere S1P-Werte als Patient:innen hatten, die zuvor keinen erlitten. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung signifikant.

Außerdem hatten Patient:innen mit niedrigeren S1P-Spiegeln häufiger nicht-lakunäre Infarkte im anterioren Stromgebiet als lakunäre Infarkte ($1,43 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$ vs. $1,57 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$, $P = 0.008$). Dieses Ergebnis passt zu der Assoziation von höherem S1P mit niedrigerem NIHSS-Score, da nicht-lakunäre bzw. territoriale Infarkte naturgemäß höhere NIHSS-Skalenwerte ergeben als kleine, lakunäre Infarkte. Diese Assoziation erwies sich nach vollständiger Adjustierung allerdings nur noch als Trend.

Es konnte keine Assoziation von S1P und klassischen Atherosklerose-Parametern (cIMT, ACI-Stenose) gezeigt werden.

2.3.4 Outcome (S1P & Homoarginin)

Alle 374 Patient:innen wurden für ein Follow-up via Brief, E-Mail oder Telefon kontaktiert. 273 Patient:innen bzw. Angehörige konnten erreicht werden. Die durchschnittliche Follow-up-Zeit betrug 284 Tage (198-431 Tage).

Es kam zu 79 unerwünschten Ereignissen (Tod, Schlaganfall, Myokardinfarkt, Rehospitalisierung; betrachtet in der statistischen Analyse zu S1P) bzw. zu 30 schweren unerwünschten *kardiovaskulären* Ereignissen (Tod, Schlaganfall, Myokardinfarkt; betrachtet in der statistische Analyse zu Homoarginin).

Sphingosin-1-Phosphat

Im statistischen Vergleich der zwei Gruppen (kein unerwünschtes Ereignis vs. unerwünschtes Ereignis) zeigte sich, dass Patient:innen mit niedrigerem S1P-Wert signifikant häufiger ein unerwünschtes Ereignis erlitten als Patient:innen mit höherem S1P-Wert.

Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung von Geschlecht und Lebensalter allerdings signifikant. Nach vollständiger Adjustierung (Geschlecht, Lebensalter, NIHSS bei Aufnahme, LDL-Cholesterin, Kreatinin, prävalente Gefäßerkrankung [arterielle Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie]) zeigte sich dieser Zusammenhang allerdings nur noch als Trend.

Für die Kaplan-Meier-Analyse zu unerwünschten Ereignissen wurden die Patient:innen nach S1P-Werten stratifiziert (niedrigstes Terzil < 1,33 µmol/L, mittleres Terzil 1,33 – 1,58 µmol/L, höchstes Terzil > 1,58 µmol/L).

Die Analyse zeigte, dass bei Patient:innen mit niedrigerem S1P-Wert signifikant häufiger unerwünschte Ereignisse vorkommen.

Im statistischen Vergleich der Gruppe *niedrigstes Terzil* und der Gruppe *höchstes Terzil* zeigte sich sowohl ohne Adjustierung als auch nach vollständiger Adjustierung (Geschlecht, Lebensalter, NIHSS bei Aufnahme, LDL-Cholesterin, Kreatinin, arterielle Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie), dass Patient:innen mit den niedrigsten S1P-Werten (im Vergleich zu Patient:innen mit den höchsten S1P-Werten) ein signifikant reduziertes krankheitsfreies Überleben hatten.

Homoarginin

Die Kaplan-Meier-Analyse zu schweren unerwünschten Ereignissen zeigte, dass bei Patient:innen mit niedrigerem Homoarginin-Wert signifikant häufiger schwere unerwünschte Ereignisse vorkommen.

Im statistischen Vergleich der Gruppe *niedrigstes Terzil* und der Gruppe *höchstes Terzil* zeigte sich sowohl ohne Adjustierung als auch nach vollständiger Adjustierung (Geschlecht, Lebensalter, arterielle Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie, Rauchen, GFR), dass Patient:innen mit den niedrigsten Homoarginin-Werten (im Vergleich zu Patient:innen mit den höchsten Homoarginin-Werten) ein signifikant reduziertes krankheitsfreies Überleben hatten.

2.3.5 Validierungskohorte (S1P)

Die Ergebnisse der S1P-Messungen wurden zudem mit einer Münchner Schlaganfallkohorte der CIRCULAS-Studie (Circulating Biomarkers in Stroke) verglichen. Diese Studie umfasste 219 Patient:innen mit akutem Schlaganfall. Auch hier zeigte sich eine negative Korrelation zwischen niedrigem Serum-S1P-Spiegel und höherem NIHSS-Punktwert. Es konnte ein negativ-linearer Zusammenhang zwischen S1P-Spiegel und Infarktvolume gefunden werden.

Dies passt zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen über den Zusammenhang von niedrigem S1P-Spiegel und vermehrten Infarkten im anterioren Stromgebiet.

Während einer 90-tägigen Follow-up-Periode war ein niedriger S1P-Spiegel mit erhöhter Mortalität und schwererer Behinderung unter den überlebenden Patient:innen

assoziiert. Auch dies deckt sich mit dem zuvor beschriebenen Ergebnis, dass Patient:innen mit den niedrigsten S1P-Werten ein signifikant reduziertes krankheitsfreies Überleben hatten.

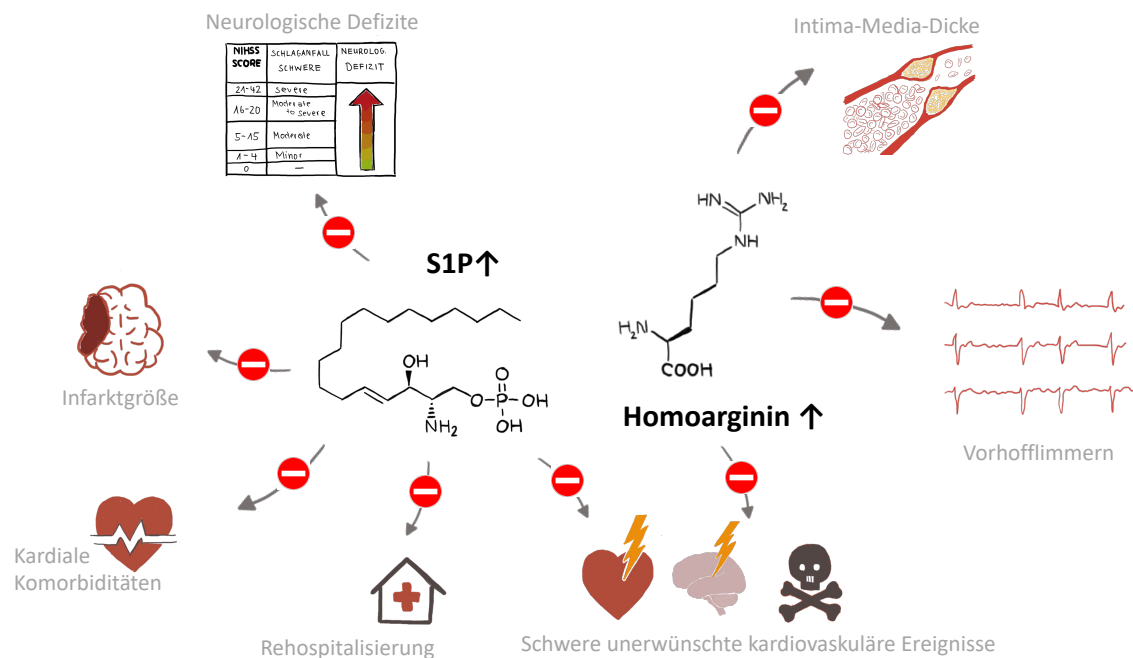


Abbildung 3: Effekte von S1P und Homoarginin

2.4 Diskussion

Mit unserer Studie, in der wir die Eignung von S1P und Homoarginin als Biomarker beim akuten Schlaganfall untersuchten, konnten wir für beide Moleküle Assoziationen zwischen Schlaganfall-begünstigenden Vorerkrankungen, dem ischämischen Schlaganfall selbst und dem Outcome nach Schlaganfall zeigen. Dies ist die erste Untersuchung, die eine direkte Verbindung von Serum-S1P-Spiegeln und klinischen Parametern sowie Outcome Parametern nachweist.

Bei den Patient:innen dieser Studie waren niedrige S1P-Serumkonzentrationen mit vermehrten kardialen Komorbiditäten assoziiert, niedrige Homoarginin-Plasmakonzentrationen mit häufigerem Vorhofflimmern und einer Zunahme der Intima-Media-Dicke der Karotiden assoziiert. Außerdem waren niedrige S1P-Werte mit größeren Infarkten vergesellschaftet. Zusätzlich zeigten Patient:innen mit niedrigem S1P-Werten ein höheres Ausmaß neurologischer Behinderung sowie ein schlechteres Outcome, niedrige Homoarginin-Plasmakonzentrationen konnten schwere unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse bei Patient:innen vorhersagen.

Eine vorherige Studie am UKE konnte zeigen, dass die mittlere S1P-Konzentration von Gefäßpatient:innen geringer waren als die einer Vergleichsgruppe gesunder Blutspender:innen. Assoziationen zwischen Atherosklerose und Serum-S1P-Konzentration wurden nicht beobachtet. Dies liegt wahrscheinlich in der hohen Prävalenz nicht detektierter, geringgradiger Atherosklerose begründet. Zudem ist es möglich, dass die niedrigen S1P-Spiegel eher von der frühen Schädigung der endothelialen Funktion herrühren als von der Prävalenz vorhandener Plaques (Soltau et al., 2016).

Passend dazu konnte eine Untersuchung von 200 Carotis-Plaques zeigen, dass es keine Korrelation zwischen Plaque-Stabilität und S1P-Konzentration gab, wohl aber eine Korrelation zwischen Plaque-Stabilität und allen anderen Sphingolipiden (Edsfeldt et al., 2016)

Dafür war S1P invers mit kardialen Komorbiditäten (stattgehabter Myokardinfarkt und möglichem VHF) assoziiert. Untersuchungen an Mäusen mit kardialer Hypertrophie und Myokardischämie konnten vorteilhafte Effekte von S1P-Rezeptor-Agonisten zeigen, was die These der vorteilhaften Effekte von hohem Serum-S1P stützt (Ryba et al., 2019, Theilmeier et al., 2006).

Vorhofflimmern ist ein Risikofaktor für einen (kardiogenen) Schlaganfall (O'Donnell et al., 2016). In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe wurden die Homoarginin-Spiegel bei Patient:innen mit persistierendem VHF und paroxysmalen VHF verglichen. Diejenigen mit persistierendem VHF hatten die niedrigsten Homoarginin-Spiegel (Büttner et al., 2020).

In einer bevölkerungsbasierten Studie korrelierte Homoarginin nicht mit dem Auftreten oder Persistieren von VHF (Niekamp et al., 2018)

Daher ist es wahrscheinlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Schlaganfall, VHF und Homoarginin besteht.

In dem südafrikanische Studienarm der prospektiven Bevölkerungsstudie PURE (Prospective Urban and Rural Epidemiology) wurden die Veränderungen der Plasma-Konzentration von Homoarginin sowie seinen Derivaten asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) und die Zunahme cIMT über 5 Jahre untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Homoarginin

eine protektive Wirkung vor Gefäßschaden und Verlangsamung des Fortschreitens einer Gefäßerkrankung zu bewirken scheint (Mokhaneli et al., 2020)

Eine Untersuchung der Plasma-Homoarginin-Konzentration und der cIMT von 40 gesunden Kindern (3-18 Jahre) zeigte keinen Zusammenhang zwischen Homoarginin-Spiegeln und cIMT, der Zusammenhang von Homoarginin und Gefäßgesundheit scheint demnach auch altersabhängig zu sein (Jaźwińska-Kozuba et al., 2013).

Im Schlaganfallmodell unterdrückte die Supplementierung von Homoarginin die T-Zell-Proliferation und Migration bei Mäusen, bei denen alimentär Atherosklerose erzeugt wurde (Nitz et al., 2022). Im zweiten und drittem Trimenon der Schwangerschaft konnte gezeigt werden, dass höhere Homoarginin-Werte mit verbesserter flussvermittelter Vasodilatation vergesellschaftet sind (Valtonen et al., 2008).

Dies lässt vermuten, dass Homoarginin durch eine Suppression der Immunreaktion bei Atherosklerose diese vermindert und dadurch die Gefäßfunktion aufrechterhält bzw. verbessert.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass S1P das Kollateralen-Wachstum sowie die mikrovaskuläre Zirkulation verbessert und eine Blut-Hirn-Schranken-Dysfunktion abschwächt (Kim et al., 2015, Li et al., 2019). Diese drei Mechanismen könnten dazu beitragen, dass hohe Konzentrationen von S1P im Blut die Infarktgrößen vermindert. Passend zu diesen Ergebnissen waren die S1P-Spiegel bei unseren Patient:innen mit nicht-lakunären, anterioren Infarkte (d.h. größeren Infarkten) niedriger als bei den Patient:innen, die einen lakunären (kleinen) Infarkt hatten.

In der CIRCULAS Studie konnte eine inverse Assoziation von Serum-S1P und Infarktvolumen festgestellt werden. (Tiedt et al., 2020)

Wir konnten zeigen, dass ein niedriger S1P-Werte mit höherem NIHSS-Score, sprich ausgeprägteren neurologischen Defiziten assoziiert ist. Dies beruht vermutlich auf den bereits genannten Funktionen von S1P, die ein geringeres Infarktvolumen begünstigen. Denn in aller Regel führen kleinere Infarkte auch zu weniger neurologischen Defiziten bzw. geringeren NIHSS-Scores, außer strategisch enorm wichtige Zentren sind betroffen. Diese Ergebnisse waren zudem unabhängig von möglichen Störfaktoren wie Alter, Geschlecht und kardiovaskulärem Risikoprofil.

Wir konnten demonstrieren, dass niedriges Serum-S1P mit unerwünschten Ereignissen nach dem initialen Schlaganfall assoziiert ist. Zu den von uns als unerwünschtes Ereignis gewerteten Ereignissen zählten Tod, erneuter Schlaganfall, Myokardinfarkt oder Rehospitalisierung. Bereits nach 200 Tagen konnten signifikante Unterschiede zwischen dem niedrigsten und höchsten S1P-Terzil festgestellt werden (HR 0,507; 0,281, 0,915; $p = 0,024$, vollständig adjustiertes Modell).

In der CIRCULAS-Studie konnte bereits nach 90 Tagen eine signifikante Assoziation von S1P mit mRS und Mortalität festgestellt werden. Wahrscheinlich konnte diese Arbeitsgruppe bereits früher signifikante Assoziationen feststellen, da die Patient:innen dieser Kohorte insgesamt etwas höhere NIHSS-Scores und damit stärker betroffen waren als die Patient:innen unserer Kohorte.

Passend zu unseren Ergebnissen konnte eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt an Patient:innen mit hohem kardiovaskulären Risiko einen Zusammenhang zwischen niedrigem S1P und akutem Koronarsyndrom zeigen, da verringerte Plasma-HDL/S1P-Spiegel mit höherem Risiko für ein akutes Koronarsyndrom (ACS) assoziiert sind (Soria-Florido et al., 2020). In einer vorherigen Studie konnte HDL-gebundenes S1P die Schwere einer KHK voraussagen (Sattler et al., 2014).

Diese und vorherige Untersuchungen suggerieren eine protektive Rolle von HDL-gebundenem S1P als integraler Bestandteil von funktionalem HDL (Soria-Florido et al., 2020, Sattler et al., 2014). Ob der vorteilhafte Effekt von S1P auch mit der HDL-Funktion zu tun hat, muss noch erforscht werden.

Das Risiko, nach dem ersten Schlaganfall einen weiteren Schlaganfall zu erleiden, ist hoch. Daher ist eine umfängliche Sekundärprävention sinnvoll. Gleichzeitig sind die Ressourcen für Reha und Nachsorge knapp. Daher wäre ein Risiko-Assessment-Tool nützlich. Wir konnten zeigen, dass Patient:innen mit höheren Homoarginin-Werten bei Aufnahme seltener unerwünschte zerebro- bzw. kardiovaskuläre Ereignisse nach Entlassung hatten im Vergleich zu Patient:innen mit niedrigeren Homoarginin-Werten. Zum Vergleich: auch bei Patient:innen mit akuten Thoraxschmerzen war niedriges Homoarginin ein Risikomarker für ein vorliegendes MACE, besonders in Kombination mit erhöhtem hs-Troponin I (Atzler et al., 2016b).

Damit könnte ein niedriger Homoarginin-Wert wohlmöglich als Indikator für intensivere Nachsorge fungieren. Sinnvolle cut-off-Werte müssten dafür weiter untersucht und festgelegt werden.

Aufgrund der bereits genannten, positiven Effekte von S1P auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke (Nitzsche et al., 2021) wurde die Applikation von S1P-Analoga in Schlaganfall-Tiermodellen bereits untersucht und deren Effektivität bestätigt (Dang et al., 2021)

In zwei klinischen Pilotstudien erhielten Schlaganfall-Patient:innen im Rahmen der Lysetherapie zusätzlich zu Alteplase auch Fingolimod, ein S1P-Analagon, welches bislang für die Therapie der Multiplen Sklerose zugelassen ist. Diese Patient:innen hatten kleinere Infarkt volumina und eine stärkere klinische Verbesserung binnen 24 Stunden. Beide Studien beinhalteten Patient:innen mit großen Gefäßverschlüssen (Anteriore Zirkulation und intrakranieller Großgefäßverschluss) (Zhu et al., 2015, Tian et al., 2018).

Auch in unserer Studie hatten die Patient:innen mit nicht-lakunären Infarkten besonders niedrige S1P-Werte. Daher kann man annehmen, dass vor allem Patient:innen mit großen Gefäßverschlüssen niedrige S1P-Werte haben und S1P-Rezeptor-Agonisten scheinen besonders bei Patient:innen mit großen Infarkten von Vorteil zu sein.

Eine kürzlich erschienene Studie, bei der Wissenschaftler:innen zwei unterschiedliche Fingolimod-Präparate an zwei unterschiedlichen Maus-Schlaganfallmodellen und in Abhängigkeit von den zirkadianen Phasen testeten, konnte keine Reduktion der Infarktgröße durch die Applikation von Fingolimod zeigen. Allerdings applizierten die Autor:innen dieser Studie keine Alteplase, sodass dies die Frage aufwirft, ob die vorteilhaften Effekte, die in vergangenen Studien an Nagetieren und Patient:innen beschrieben wurden, auf die Kombination von Alteplase und Fingolimod zurückzuführen sind.

Limitierende Faktoren für die Ergebnisse der Publikationen sind die kleine Studienkohorte, eine relativ kurze follow-up-Periode und ein Selektionsbias, da zu stark betroffene Patient:innen nicht einwilligen konnten und daher nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Zudem hatte diese Studie keinen zuvor definierten, sondern einen multifaktoriellen Endpunkt. Ursachen für die Rehospitalisierung und Tod konnten nur für einen kleinen Anteil der Patient:innen zuverlässig erfasst werden, sodass zu einem Zusammenhang der Biomarker-Spiegel und spezifischen Gründen für

Rehospitalisierung sowie Todesursachen im Follow-up-Zeitraum keine Aussage getroffen werden kann.

Infektiologischen Erkrankungen im zeitlichen Rahmen der Blutentnahme wurden nicht erfasst, sodass es nicht auszuschließen ist, dass Confounder wie eine Pneumonie oder Sepsis die S1P-Spiegel unserer Patient:innen beeinflussten. Zwei Studien zeigten, dass auch bei Patient:innen mit Pneumonie und Sepsis die S1P-Spiegel erniedrigt waren, was auf die endotheliale Dysfunktion zurückzuführen sein könnte, die man bei diese Patient:innen beobachtet hat (Winkler et al., 2015, Hsu et al., 2019).

Aufgrund unterschiedlicher Messmethoden können absolute S1P-Werte zwischen MARK-Stroke und CIRCULAS nicht verglichen werden.

Ernährungsgewohnheiten der Patient:innen wurden nicht erfasst. Allerdings scheinen alimentäre Effekte auf den Serum-Homoarginin-Spiegel gering zu sein (Rao, 2011).

2.5 Konklusion

Unsere Ergebnisse zeigen nachteilige Effekte niedriger S1P-Serumkonzentrationen bei Patient:innen mit akutem Schlaganfall und untermauern das therapeutische Potenzial von S1P-Rezeptor-Agonisten.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Homoarginin ein prädiktiver Risikomarker für zerebrovaskuläre Ereignisse ist. Eine Supplementierung im Rahmen der Sekundärprävention könnte die Morbidität und Mortalität nach Schlaganfall verringern.

2.6 Zusammenfassung

In dieser Studie prospektiven Kohortenstudie (MARK-STROKE) an Patient:innen mit akutem ischämischen Schlaganfall oder Transitorisch Ischämischer Attacke (TIA) sollte der Zusammenhang zwischen den Blut-Biomarkern Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Homoarginin (hArg) sowie Atherosklerose, Infarktvolume, Schweregrad des Schlaganfalls und Outcome untersucht werden.

S1P ist ein Signalmolekül aus der Gruppe der Sphingolipide bzw. Lysophospholipide. Über die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren S1PR₁₋₅ beeinflusst es diverse physiologische und pathologische Vorgänge, darunter Angiogenese und immunologische Prozesse.

Homoarginin ist eine endogene, nicht proteinogene Aminosäure. Als Substrat der NO-Synthase spielt für die Regulation der Gefäßhomöostase eine wichtige Rolle.

413 Patient:innen mit akutem ischämischem Schlaganfall oder TIA wurden in die Studie eingeschlossen und Blut abgenommen. Nach Ausschluss fehldiagnostizierter Patient:innen wurde die Höhe der Serum-Konzentrationen beider Biomarker in den Proben von 374 Patient:innen untersucht.

Das mittlere Alter der Patient:innen betrug $67,9 \pm 13$ Jahre, 35,3 % der Studienteilnehmer:innen waren weiblich. Die Werte beider Biomarker wurden mittels Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. 273 Patient:innen konnten im Rahmen einer Follow-up-Umfrage (294 ± 170 Tage) erreicht werden, dabei wurden 79 unerwünschte Ereignisse bzw. 30 schwere unerwünschte Ereignisse erfasst.

Die Ergebnisse zu S1P konnten in einer unabhängigen Schlaganfall-Kohorte (CIRCULAS, n = 219) validiert werden.

Wir konnten zeigen, dass niedrige Serum-S1P-Werte mit höherem Behinderungsgrad, größeren Infarktvolume, kardialen Begleiterkrankungen und schlechterem Outcome korrelieren. Außerdem konnten wir zeigen, dass niedrige Plasma-Homoarginin-Werte mit einer Zunahme der Karotis-Intima-Media-Dicke und prävalentem Vorhofflimmern korrelieren sowie schwere unerwünschte Ereignisse vorhersagen können.

Diese Ergebnisse implizieren eine wesentliche Rolle von niedrigen S1P- und Homoarginin-Konzentrationen beim akuten Schlaganfall und stellen daher möglicherweise ein therapeutisches Ziel und einen prognostischen Nutzen dar.

2.7 Summary

In this prospective cohort study (MARK-STROKE) on patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) we analysed the connection of blood-borne sphingosin-1-phosphate (S1P) and homoarginine (hArg) as well as atherosclerosis, infarct volume, degree of neurological impairment and outcome.

S1P is a signalling molecule and part of the class of lysophospholipids. Via G-protein coupled receptors, it mediates a plethora of physiological and pathological processes including angiogenesis and immune defense.

Homoarginine is an endogenic, non-proteinogenic amino acid. It serves as a substrate for NO-synthase and as such, it is involved in the regulation of vascular homeostasis. 413 patients with acute ischemic stroke or TIA were enrolled and blood was collected. After exclusion of misdiagnosed patients, S1P and homoarginine blood levels 374 patients were measured.

Mean patient age was $67,9 \pm 13$ years, 35.3 % were female. Both biomarkers were determined with tandem mass spectrometry. During a follow-up (294 ± 170 days), 273 patients could be reached. 79 adverse events occurred, respectively 30 major adverse cardiovascular events.

The results for S1P could be validated in an independent stroke cohort (CIRCULAS, $n = 219$).

We could demonstrate that low serum-S1P is associated with higher level of neurological impairment, larger infarcts, cardiac comorbidities and worse outcome. Furthermore, we could demonstrate that low homoarginine is associated with increased carotid intima-media-thickness (cIMT) and prevalent atrial fibrillation. Low homoarginine predicts major adverse cardiovascular events after stroke.

These results implicate an important role of low S1P and low homoarginine in patients with acute stroke and might be a potential therapeutic target and prognostic risk marker.

2.8 Abkürzungsverzeichnis

ACI	Arteria carotis interna
ACS	Acute Coronary Syndrome
AGAT	Arginin-Glycin-Amidino-transferase
aHT	arterielle Hypertonie
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ciMT	carotid Intima Media Thickness
CIRCULAS	Circulating Biomarkers in Stroke
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
hArg	Homoarginin
HDL	High Density Lipoprotein
HR	Hazard Ratio
KHK	Koronare Herzkrankheit
LACI	Lacunar Infarct
LC-MS	Liquid Chromatographie Mass Spectrometry
LDL	Low Density Lipoprotein
MACE	Major Adverse Cardiovascular Event
MARK-STROKE	Biomarkers in Stroke
MI	Myokardinfarkt
mRS	modified Rankin Scale
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
OR	Odds Ratio
PACI	Partial Anterior Circulation Infarct
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TACI	Total Anterior Circulation Infarct
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VHF	Vorhofflimmern

2.9 Literaturverzeichnis

- ARGRAVES, K. M. & ARGRAVES, W. S. 2007. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. *J Lipid Res*, 48, 2325-33.
- ATZLER, D., APPELBAUM, S., CORDTS, K., OJEDA, F. M., WILD, P. S., MÜNDEL, T., BLANKENBERG, S., BÖGER, R. H., BLETNER, M., BEUTEL, M. E., PFEIFFER, N., ZELLER, T., LACKNER, K. J. & SCHWEDHELM, E. 2016a. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin Chem Lab Med*, 54, 1231-7.
- ATZLER, D., BAUM, C., OJEDA, F., KELLER, T., CORDTS, K., SCHNABEL, R. B., CHOE, C. U., LACKNER, K. J., MÜNDEL, T., BÖGER, R. H., BLANKENBERG, S., SCHWEDHELM, E. & ZELLER, T. 2016b. Low Homoarginine Levels in the Prognosis of Patients With Acute Chest Pain. *J Am Heart Assoc*, 5, e002565.
- ATZLER, D., MIETH, M., MAAS, R., BÖGER, R. H. & SCHWEDHELM, E. 2011. Stable isotope dilution assay for liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of l-homoarginine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 879, 2294-2298.
- ATZLER, D., SCHÖNHOF, M., CORDTS, K., ORTLAND, I., HOPPE, J., HUMMEL, F. C., GERLOFF, C., JAEHDE, U., JAGODZINSKI, A., BÖGER, R. H., CHOE, C. U. & SCHWEDHELM, E. 2016c. Oral supplementation with L-homoarginine in young volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 82, 1477-1485.
- BELL, E. A. 1962. The isolation of L-homoarginine from seeds of *Lathyrus cicera*. *The Biochemical journal*, 85, 91-93.
- BRAIT, V. H., TARRASÓN, G., GAVALDÀ, A., GODESSART, N. & PLANAS, A. M. 2016. Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Agonist Is Protective Against Ischemia/Reperfusion in Mice. *Stroke*, 47, 3053-3056.
- BÜTTNER, P., BAHLS, M., BÖGER, R. H., HINDRICKS, G., THIELE, H., SCHWEDHELM, E. & KORNEJ, J. 2020. Arginine derivatives in atrial fibrillation progression phenotypes. *J Mol Med (Berl)*, 98, 999-1008.
- CHOE, C.-U., ATZLER, D., WILD, P. S., CARTER, A. M., BÖGER, R. H., OJEDA, F., SIMOVA, O., STOCKEBRAND, M., LACKNER, K., NABUURS, C., MARESCAU, B., STREICHERT, T., MÜLLER, C., LÜNEBURG, N., DEYN, P. P. D., BENNDORF, R. A., BALDUS, S., GERLOFF, C., BLANKENBERG, S., HEERSCHAP, A., GRANT, P. J., MAGNUS, T., ZELLER, T., ISBRANDT, D. & SCHWEDHELM, E. 2013. Homoarginine Levels Are Regulated by L-Arginine:Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome. *Circulation*, 128, 1451-1461.
- DANG, C., LU, Y., LI, Q., WANG, C. & MA, X. 2021. Efficacy of the sphingosine-1-phosphate receptor agonist fingolimod in animal models of stroke: an updated meta-analysis. *Int J Neurosci*, 131, 85-94.
- DAUM, G., WINKLER, M., MORITZ, E., MÜLLER, T., GEFFKEN, M., VON LUCADOU, M., HADDAD, M., PEINE, S., BÖGER, R. H., LARENA-AVELLANEDA, A., DEBUS, E. S., GRÄLER, M. & SCHWEDHELM, E. 2020. Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group. *TH Open*, 4, e12-e19.
- DURANTE, W., JOHNSON, F. K. & JOHNSON, R. A. 2007. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 906-11.
- EDSFELDT, A., DUNÉR, P., STÅHLMAN, M., MOLLET, I. G., ASCIUTTO, G., GRUFMAN, H., NITULESCU, M., PERSSON, A. F., FISHER, R. M., MELANDER, O., ORHO-MELANDER, M., BORÉN, J., NILSSON, J. & GONÇALVES, I. 2016.

Sphingolipids Contribute to Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36, 1132-40.

- FEIGIN, V. L., STARK, B. A., JOHNSON, C. O., ROTH, G. A., BISIGNANO, C., ABADY, G. G., ABBASIFARD, M., ABBASI-KANGEVARI, M., ABD-ALLAH, F., ABEDI, V., ABUALHASAN, A., ABU-RMEILEH, N. M. E., ABUSHOUK, A. I., ADEBAYO, O. M., AGARWAL, G., AGASTHI, P., AHINKORAH, B. O., AHMAD, S., AHMADI, S., AHMED SALIH, Y., AJI, B., AKBARPOUR, S., AKINYEMI, R. O., AL HAMAD, H., ALAHDAB, F., ALIF, S. M., ALIPOUR, V., ALJUNID, S. M., ALMUSTANYIR, S., AL-RADDADI, R. M., AL-SHAHI SALMAN, R., ALVIS-GUZMAN, N., ANCUCEANU, R., ANDERLINI, D., ANDERSON, J. A., ANSAR, A., ANTONAZZO, I. C., ARABLOO, J., ÄRNLÖV, J., ARTANTI, K. D., ARYAN, Z., ASGARI, S., ASHRAF, T., ATHAR, M., ATREYA, A., AUSLOOS, M., BAIG, A. A., BALTATU, O. C., BANACH, M., BARBOZA, M. A., BARKER-COLLO, S. L., BÄRNIGHAUSEN, T. W., BARONE, M. T. U., BASU, S., BAZMANDEGAN, G., BEGHI, E., BEHESHTI, M., BÉJOT, Y., BELL, A. W., BENNETT, D. A., BENSENOR, I. M., BEZABHE, W. M., BEZABIH, Y. M., BHAGAVATHULA, A. S., BHARDWAJ, P., BHATTACHARYYA, K., BIJANI, A., BIKBOV, B., BIRHANU, M. M., BOLOOR, A., BONNY, A., BRAUER, M., BRENNER, H., BRYAZKA, D., BUTT, Z. A., CAETANO DOS SANTOS, F. L., CAMPOS-NONATO, I. R., CANTU-BRITO, C., CARRERO, J. J., CASTAÑEDA-ORJUELA, C. A., CATAPANO, A. L., CHAKRABORTY, P. A., CHARAN, J., CHOUDHARI, S. G., CHOWDHURY, E. K., CHU, D.-T., CHUNG, S.-C., COLOZZA, D., COSTA, V. M., COSTANZO, S., CRIQUI, M. H., DADRAS, O., DAGNEW, B., DAI, X., DALAL, K., DAMASCENO, A. A. M., D'AMICO, E., DANDONA, L., DANDONA, R., DAREGA GELA, J., et al. 2021. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*, 20, 795-820.
- HASEGAWA, Y., SUZUKI, H., SOZEN, T., ROLLAND, W. & ZHANG, J. H. 2010. Activation of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 by FTY720 Is Neuroprotective After Ischemic Stroke in Rats. *Stroke*, 41, 368-374.
- HSU, S. C., CHANG, J. H., HSU, Y. P., BAI, K. J., HUANG, S. K. & HSU, C. W. 2019. Circulating sphingosine-1-phosphate as a prognostic biomarker for community-acquired pneumonia. *PLoS One*, 14, e0216963.
- HUYNH, N. N. & CHIN-DUSTING, J. 2006. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33, 1-8.
- JAŻWIŃSKA-KOZUBA, A., MARTENS-LOBENHOFFER, J., KRUSZELNICKA, O., RYCAJ, J., CHYRCHEL, B., SURDACKI, A. & BODE-BÖGER, S. M. 2013. Opposite Associations of Plasma Homoarginine and Ornithine with Arginine in Healthy Children and Adolescents. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 21819-21832.
- KIM, G. S., YANG, L., ZHANG, G., ZHAO, H., SELIM, M., MCCULLOUGH, L. D., KLUK, M. J. & SANCHEZ, T. 2015. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nat Commun*, 6, 7893.
- LI, H., ZHOU, X., LI, Y., MA, X., GONZALES, R. J., QIU, S., SHI, F. D. & LIU, Q. 2019. The selective sphingosine 1-phosphate receptor 1 modulator RP101075 improves microvascular circulation after cerebrovascular thrombosis. *Faseb j*, 33, 10935-10941.
- MOKHANELI, M. C., FOURIE, C. M. T., BOTHA-LE ROUX, S., BÖGER, R. H., SCHWEDHELM, E. & MELS, C. M. C. 2020. Asymmetric dimethylarginine and L-homoarginine prospectively relate to carotid wall thickness in a South African cohort. *Amino Acids*, 52, 965-973.

- MORITZ, E., WEGNER, D., GROS, S., BAHLS, M., DÖRR, M., FELIX, S. B., ITTERMANN, T., OSWALD, S., NAUCK, M., FRIEDRICH, N., BÖGER, R. H., DAUM, G., SCHWEDHELM, E. & RAUCH, B. H. 2017. Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania. *Clinica Chimica Acta*, 468, 25-31.
- NIEKAMP, C., ATZLER, D., OJEDA, F. M., SINNING, C. R., LACKNER, K. J., BÖGER, R. H., MUNZEL, T., BEUTEL, M. E., SCHMIDTMANN, I., PFEIFFER, N., LEUSCHNER, A., BLANKENBERG, S., WILD, P. S., ZELLER, T., SCHWEDHELM, E. & SCHNABEL, R. B. 2018. Cross-Sectional Associations between Homoarginine, Intermediate Phenotypes, and Atrial Fibrillation in the Community-The Gutenberg Health Study. *Biomolecules*, 8.
- NITZ, K., LACY, M., BIANCHINI, M., WICHAPONG, K., KÜCÜKGÖZE, I. A., BONFIGLIO, C. A., MIGHELI, R., WU, Y., BURGER, C., LI, Y., FORNÉ, I., AMMAR, C., JANJIC, A., MOHANTA, S., DUCHENE, J., HEEMSKERK, J. W. M., MEGENS, R. T. A., SCHWEDHELM, E., HUVENEERS, S., LYGATE, C. A., SANTOVITO, D., ZIMMER, R., IMHOF, A., WEBER, C., LUTGENS, E. & ATZLER, D. 2022. The Amino Acid Homoarginine Inhibits Atherogenesis by Modulating T-Cell Function. *Circ Res*, 131, 701-712.
- NITZSCHE, A., POITTEVIN, M., BENARAB, A., BONNIN, P., FARACO, G., UCHIDA, H., FAVRE, J., GARCIA-BONILLA, L., GARCIA, M. C. L., LÉGER, P. L., THÉRON, P., MATHIVET, T., AUTRET, G., BAUDRIE, V., COUTY, L., KONO, M., CHEVALLIER, A., NIAZI, H., THARAUX, P. L., CHUN, J., SCHWAB, S. R., EICHMANN, A., TAVITIAN, B., PROIA, R. L., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., SANCHEZ, T., KUBIS, N., HENRION, D., IADECOLA, C., HLA, T. & CAMERER, E. 2021. Endothelial S1P(1) Signaling Counteracts Infarct Expansion in Ischemic Stroke. *Circ Res*, 128, 363-382.
- O'DONNELL, M. J., CHIN, S. L., RANGARAJAN, S., XAVIER, D., LIU, L., ZHANG, H., RAO-MELACINI, P., ZHANG, X., PAIS, P., AGAPAY, S., LOPEZ-JARAMILLO, P., DAMASCENO, A., LANGHORNE, P., MCQUEEN, M. J., ROSENGREN, A., DEHGHAN, M., HANKEY, G. J., DANS, A. L., ELSAYED, A., AVEZUM, A., MONDO, C., DIENER, H.-C., RYGLEWICZ, D., CZLONKOWSKA, A., POGOSOVA, N., WEIMAR, C., IQBAL, R., DIAZ, R., YUSOFF, K., YUSUFALI, A., OGUZ, A., WANG, X., PENAHERRERA, E., LANAS, F., OGAH, O. S., OGUNNIYI, A., IVERSEN, H. K., MALAGA, G., RUMBOLDT, Z., OVEISGHARAN, S., AL HUSSAIN, F., MAGAZI, D., NILANONT, Y., FERGUSON, J., PARE, G. & YUSUF, S. 2016. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *The Lancet*, 388, 761-775.
- PROIA, R. L. & HLA, T. 2015. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*, 125, 1379-87.
- RAO, S. L. 2011. A look at the brighter facets of β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid, homoarginine and the grass pea. *Food Chem Toxicol*, 49, 620-2.
- RYBA, D. M., WARREN, C. M., KARAM, C. N., DAVIS, R. T., CHOWDHURY, S. A. K., ALVAREZ, M. G., MCCANN, M., LIEW, C. W., WIECZOREK, D. F., VARGA, P., SOLARO, R. J. & WOLSKA, B. M. 2019. Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulator, FTY720, Improves Diastolic Dysfunction and Partially Reverses Atrial Remodeling in a Tm-E180G Mouse Model Linked to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure*, 12, e005835.
- SATTLER, K., LEHMANN, I., GRÄLER, M., BRÖCKER-PREUSS, M., ERBEL, R., HEUSCH, G. & LEVKAU, B. 2014. HDL-bound sphingosine 1-phosphate (S1P)

- predicts the severity of coronary artery atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*, 34, 172-84.
- SOLTAU, I., MUDERSBACH, E., GEISSEN, M., SCHWEDHELM, E., WINKLER, M. S., GEFFKEN, M., PEINE, S., SCHOEN, G., DEBUS, E. S., LARENA-AVELLANEDA, A. & DAUM, G. 2016. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PLoS One*, 11, e0168302.
- SORIA-FLORIDO, M. T., CASTAÑER, O., LASSALE, C., ESTRUCH, R., SALAS-SALVADÓ, J., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. Á., CORELLA, D., ROS, E., ARÓS, F., ELOSUA, R., LAPETRA, J., FIOL, M., ALONSO-GÓMEZ, A., GÓMEZ-GRACIA, E., SERRA-MAJEM, L., PINTÓ, X., BULLÓ, M., RUIZ-CANELA, M., SORLÍ, J. V., HERNÁEZ, Á. & FITÓ, M. 2020. Dysfunctional High-Density Lipoproteins Are Associated With a Greater Incidence of Acute Coronary Syndrome in a Population at High Cardiovascular Risk. *Circulation*, 141, 444-453.
- SPIEGEL, S. & MILSTIEN, S. 2002. Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25851-25854.
- STAHMEYER, J. T. S., SARAH; GEYER, SIEGFRIED; WEISSENBORN, KARIN; EBERHARD, SVEJA 2019. Häufigkeit und Zeitpunkt von Rezidiven nach inzidentem Schlaganfall. *Deutsches Ärzteblatt*, 116.
- THEILMEIER, G., SCHMIDT, C., HERRMANN, J., KEUL, P., SCHÄFERS, M., HERRGOTT, I., MERSMANN, J., LARMANN, J., HERMANN, S., STYPMANN, J., SCHOBER, O., HILDEBRAND, R., SCHULZ, R., HEUSCH, G., HAUDE, M., VON WNUCK LIPINSKI, K., HERZOG, C., SCHMITZ, M., ERBEL, R., CHUN, J. & LEVKAU, B. 2006. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation*, 114, 1403-9.
- THUDICHUM, J. L. W. 1884. A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain: Based Throughout upon Original Researches. *Glasgow Medical Journal*, 22, 363-364.
- TIAN, D. C., SHI, K., ZHU, Z., YAO, J., YANG, X., SU, L., ZHANG, S., ZHANG, M., GONZALES, R. J., LIU, Q., HUANG, D., WATERS, M. F., SHETH, K. N., DUCRUET, A. F., FU, Y., LOU, M. & SHI, F. D. 2018. Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow. *Ann Neurol*, 84, 717-728.
- TIEDT, S., BRANDMAIER, S., KOLLMEIER, H., DUERING, M., ARTATI, A., ADAMSKI, J., KLEIN, M., LIEBIG, T., HOLDT, L. M., TEUPSER, D., WANG-SATTLER, R., SCHWEDHELM, E., GIEGER, C. & DICHGANS, M. 2020. Circulating Metabolites Differentiate Acute Ischemic Stroke from Stroke Mimics. *Ann Neurol*, 88, 736-746.
- TSIKAS, D. & WU, G. 2015. Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. *Amino Acids*, 47, 1697-1702.
- VALTONEN, P., LAITINEN, T., LYYRA-LAITINEN, T., RAITAKARI, O. T., JUONALA, M., VIIKARI, J. S., HEISKANEN, N., VANNINEN, E., PUNNONEN, K. & HEINONEN, S. 2008. Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ J*, 72, 1879-84.
- WINKLER, M. S., NIERHAUS, A., HOLZMANN, M., MUDERSBACH, E., BAUER, A., ROBBE, L., ZHRTE, C., GEFFKEN, M., PEINE, S., SCHWEDHELM, E., DAUM, G., KLUGE, S. & ZOELLNER, C. 2015. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care*, 19, 372.
- ZHU, Z., FU, Y., TIAN, D., SUN, N., HAN, W., CHANG, G., DONG, Y., XU, X., LIU, Q., HUANG, D. & SHI, F. D. 2015. Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial. *Circulation*, 132, 1104-1112.

3 Erklärung des Eigenanteils

Ich habe die Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Neurologie sowie im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von PD Dr. Chi-un Choe (CUC) und Prof. Dr. Edzard Schwedhelm (ES) durchgeführt.

Die Idee zur Studie sowie der erste Studienentwurf wurden von CUC und ES entwickelt. An der Planung der klinischen Umsetzung habe ich mitgewirkt. Nach kurzer Einarbeitung durch CUC und ES führte ich sämtliche Tätigkeiten, die die Erhebung der Daten betrafen, eigenständig durch. Ich übernahm den Studieneinschluss der Patient:innen auf der Stroke Unit, die Aufklärung, die Blutentnahme sowie die Verarbeitung und Asservierung der Blutproben. Im Rahmen einer Famulatur auf der Stroke Unit und der Gefäßambulanz untersuchte und sonografierte ich unter fachärztlicher Aufsicht einen kleinen Anteil meiner Studienpatient:innen selbst.

Im Rahmen ihrer Promotion entwickelte Dr. Kathrin Cordts (KC) einen qualitativen ELISA-Schnelltest für die Identifizierung von Patient:innen mit einer Homoarginin-Konzentration unter 2 $\mu\text{mol/L}$. Ich unterstützte KC bei der Testung der Messmethode mithilfe von Proben aus dieser Studienpopulation und führte nach Einarbeitung eigenständig ELISA-Schnelltests durch.

Für die Durchführung der Studie auf Station und die Durchführung der ELISA-Messungen erstellte ich umfangreiche Durchführungsprotokolle und arbeitete zwei neue Doktorandinnen ein.

Die Vorlage der Datentabelle stammte von CUC. Ich modifizierte diese Datentabelle und füllte sie mit Daten aus den Patientenakten. Dabei erhielt ich Unterstützung von CUC. Der Input zur Follow-up-Befragung stammt von CUC. Die Planung und Umsetzung der Follow-up-Befragung führte ich eigenständig durch.

Die Messung der Blutproben erfolgte durch ES. Die statistische Auswertung der Datentabelle erfolgte durch CUC. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung besprach ich mit CUC und Susanne Lezius gemeinsam.

Das Manuskript zu den S1P-Messungen verfassten CUC und ES. Ich las Kontrolle, gab Feedback und führte geringfügige Überarbeitungen durch. Für das Manuskript zu den Homoarginin-Messungen verfasste ich Abstract, Einleitung, Diskussion und Konklusion eigenständig. Methoden und Ergebnisse verfassten ES und CUC.

Diese zusammenfassende Darstellung der Publikation wurde von mir erstellt. Alle Abbildungen wurden von mir erstellt.

4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehend genannten Personen, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben, meinen besonderen Dank aussprechen!

Für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Neurologie und dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie zu erstellen, möchte ich mich beim ehemaligen Klinikleiter Herrn Prof. Dr. Christian Gerloff und dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Rainer Böger bedanken.

Den Ärztinnen und Ärzten der Neurologie sowie Pflegerinnen und Pflegern der Stroke Unit möchte ich für Unterstützung und Ermutigung besonders zu Beginn dieser Arbeit danken. Der frühmorgendliche Kaffee und stets heitere Arbeitsatmosphäre in der Funktionsdiagnostik haben ebenso zur Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, dafür möchte ich Roy Appel und Marleen Thiele danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Chi-un Choe und meinem Betreuer Prof. Dr. Edzard Schwedhelm für den Anstoß zu dieser Arbeit, die tatkräftige Unterstützung, die Zuverlässigkeit und die gute Zusammenarbeit bedanken. Von euch durfte ich in den letzten fünf Jahren viel lernen und eure Wertschätzung hat meine Studienzeit in einem besonderen Maße positiv geprägt.

Ich danke Kathrin Cordts für die angenehme Zusammenarbeit, das akribische Erklären der Durchführungsschritte und die regen Gespräche in gemeinsamen Schüttler-Pausen.

Anna Steenpaß und Mariola Kastner danke ich für die technische Unterstützung im Labor und die vielen herzlichen und aufbauenden Worte, wann immer sie nötig waren.

Mein besonderer Dank gilt den Patient:innen, die sich trotz der Umstände eines einschneidenden Krankheitsereignisses zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben. Ohne diese Bereitschaft wäre diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Stephanie und Peter, meinem kleinen Bruder Timmi und meinen Freund:innen für die moralische Unterstützung danken. Danke, dass ich euch habe. Postumer Dank gilt meinem Opa Heiner, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterlebt, aber sicher von anderswo mitfiebert. <3

5 Lebenslauf

Angaben zur Person

Nachname Schwierien
Vorname Laura

Adresse

Mobiltelefon
E-Mail

Staatsangehörigkeit Deutsch
Geburtsdatum
Geburtsort Neuss

Studium

Promotion 2017-2023
Approbation 29.11.2021, Universität Hamburg
Studienarbeit 2020, The Effects of Additive Probiotic Treatment in Schizophrenia – A Narrative Review
Immatrikulation 01.10.2015, Universität Hamburg

Berufserfahrung

UKE Neurochirurgie	seit Juli 2023	Ärztin in Weiterbildung
Kumi Health GmbH	Mai 2022-Mai 2023	Team Lead Customer Success
Kinder-UKE (PHO)	2018 – 2021	Studentische Hilfskraft, K1b
Institut für systemische Neurowissenschaften	2016 – 2017	Studentische Hilfskraft

Medizinische Praktika

Praktisches Jahr

Neurologie	Jun. – Okt. 2021	UKE, Hamburg
Innere Medizin	Mär. – Jun. 2021	Evangelisches KH, Wien
Chirurgie	Nov. 2020 – Mär. 2021	Stadtspital Triemli, Zürich

Famulaturen

Hausärztliche Versorgung	Jul./Aug. 2019	Hausarztpraxis Dorotheenstraße
Ambulante Versorgung	Aug./Sep. 2018	Neurovaskuläre Ambulanz/ZNA, UKE
Stationäre Versorgung	Jul./Aug. 2018	Stroke Unit, UKE
Stationäre Versorgung	Sep./Okt. 2017	Psychiatrie, UKE

Pflegepraktika

Gastroenterologie	Feb./Mär. 2016	Israelitisches KH, Hamburg
Neurochirurgie	Jul./Aug. 2015	Charité, Berlin
Psychiatrie	Jun. 2015	Jüdisches KH, Berlin

6 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter oder einer Fachvertreterin an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: *L. Schwieren*