

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Kinetik und Dynamik der oralen Supplementation mit Homoarginin in gesunden Probanden

Dissertation

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

vorgelegt von:

Mirjam Schönhoff
geboren in Georgsmarienhütte

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.05.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

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

Inhaltsverzeichnis

1	Publikation	4
2	Darstellung der Publikation	13
2.1	Einleitung	13
2.2	Methoden	15
2.2.1	Probanden	15
2.2.2	Studiendesign	16
2.2.3	Pulswellengeschwindigkeit (PWV) und Augmentations-Index (AIx)..	17
2.2.4	Flow-mediated vasodilation (FMD)	18
2.2.5	Transkranielle Magnetstimulation (TMS)	19
2.2.6	Studienprodukt.....	19
2.2.7	Messung und Analyse der kinetischen Parameter.....	20
2.2.8	Statistische Auswertung	20
2.3	Ergebnisse	21
2.3.1	Charakteristika der Probanden	21
2.3.2	Kinetikanalysen.....	22
2.3.3	Dynamische Endpunkte der Studie.....	22
2.4	Diskussion.....	25
2.5	Zusammenfassung.....	28
2.6	Summary.....	29
2.7	Abkürzungsverzeichnis	30
2.8	Literaturverzeichnis	31
3	Erklärung des Eigenanteils	34
4	Danksagung.....	35
5	Lebenslauf	36
6	Eidesstattliche Erklärung	37

CLINICAL TRIALS

Oral supplementation with L-homoarginine in young volunteers

Correspondence Edzard Schwedhelm, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel.: +49 40 7410 54891; Fax: +49 40 7410 59757; E-mail: schwedhelm@uke.de

Received 13 April 2016; **Revised** 14 July 2016; **Accepted** 17 July 2016

Dorothee Atzler^{1,2,3}, Mirjam Schönhoff¹, Kathrin Cordts^{1,2}, Imke Ortland⁴, Julia Hoppe⁵, Friedhelm C. Hummel⁵, Christian Gerloff⁵, Ulrich Jaehde⁴, Annika Jagodzinski^{2,6}, Rainer H. Böger^{1,2}, Chi-un Choe⁵ and Edzard Schwedhelm^{1,2}

¹Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ²DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Germany, ³Vascular Biology, Institute for Stroke and Dementia Research, Klinikum der Universität München Ludwig Maximilians-University of Munich, Munich, Germany, ⁴Institute of Pharmacy Department of Clinical Pharmacy, University of Bonn, Bonn, Germany, ⁵Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, and ⁶Department of General and Interventional Cardiology, University Heart Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Keywords asymmetric dimethylarginine, L-arginine, L-homoarginine, nitric oxide, vascular function

AIMS

Low blood concentrations of the naturally occurring amino acid L-homoarginine (L-hArg) are related to impaired cardiovascular outcome and mortality in humans and animals. L-hArg is a weak substrate of nitric oxide synthase and an inhibitor of arginases *in vitro*. The aim of our study was to obtain kinetic and dynamic data after oral L-hArg supplementation.

METHODS

In a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover study, 20 young volunteers received 125 mg L-hArg once daily for 4 weeks. Kinetic parameters (C_{\max} , T_{\max} and AUC_{0-24h}) were calculated after ingestion of single and multiple doses of oral supplementation as primary endpoint. Secondary endpoints that were evaluated were routine laboratory, L-arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA), pulse wave velocity (PWV), augmentation index (AIx), flow-mediated vasodilatation (FMD), corticospinal excitability, i.e. motor threshold (MT), and cortical excitability, i.e. intracortical inhibition (ICI) and facilitation (ICF).

RESULTS

One hour after ingestion (T_{\max}), L-hArg increased the baseline L-hArg plasma concentration ($2.87 \pm 0.91 \mu\text{mol l}^{-1}$, mean \pm SD) by 8.74 ± 4.46 [95% confidence intervals 6.65; 10.9] and 17.3 ± 4.97 [14.9; 19.6] $\mu\text{mol l}^{-1}$ (C_{\max}), after single and multiple doses, respectively. Once-only and 4 weeks of supplementation resulted in AUC_{0-24h} of 63.5 ± 28.8 [50.0; 76.9] and 225 ± 78.5 [188; 2624] $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}$, for single and multiple doses, respectively. Routine laboratory parameters, L-arginine, ADMA, PWV, AIx, FMD, MT, ICI and ICF did not change by L-hArg supplementation compared to baseline.

CONCLUSION

Once daily orally applied 125 mg L-hArg raises plasma L-hArg four- and sevenfold after single dose and 4 weeks of supplementation, respectively, and is safe and well tolerated in young volunteers.

WHAT IS ALREADY KNOWN ABOUT THIS SUBJECT

- L-Homoarginine (L-hArg) is an amino acid found in pea pulses (*Lathyrus sativus* and *cicera*). It is a weak substrate for nitric oxide (NO) synthases (NOS) and an inhibitor of arginases.
- In clinical and epidemiological studies, low circulating L-hArg is associated with impaired cerebrovascular and cardiovascular outcome.
- Orally administered L-hArg is readily absorbed in rats and pigs with a recovery of >95% of unmetabolized L-hArg in urine.

WHAT THIS STUDY ADDS

- Our data show that oral supplementation with 125 mg L-hArg raises plasma L-hArg concentrations four- and sevenfold after single and multiple dosing in humans, respectively.
- Four weeks of supplementation did not change vascular and neuronal function in young volunteers, nor did any toxic side-effects occur.

Tables of Links

TARGETS	
Enzymes [1]	Nitric oxide synthases
Arginase	Transporters [2]
Dimethylarginine dimethylaminohydrolases	SLC7 family
Arginine:glycine amidinotransferase	

LIGANDS	
L-arginine	N^G, N^G -dimethyl-L-arginine
creatine	

These Tables list key protein targets and ligands in this article that are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [3], and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16 [1, 2].

Introduction

The L-arginine/nitric oxide (NO) pathway plays an important role in vascular haemostasis and L-arginine has been supplemented to optimize health and welfare [4]. However, after oral administration, L-arginine is subject to extensive pre-systemic and systemic elimination by arginases and oral doses required to increase plasma concentrations range from 3 to 8 g/day [5, 6]. The non-proteinogenic amino acid L-homoarginine (L-hArg) interferes with the L-arginine/NO pathway and has been identified as a risk marker for cardiovascular, cerebrovascular and kidney diseases as well as for cardiovascular and all-cause mortality (reviewed in [7, 8]). L-hArg is a weak substrate of NO synthase (NOS) and arginase. The maximal activity (V_{max}) for murine NOS-dependent NO formation is similar for L-hArg and L-arginine, but the Michaelis–Menten constant (K_m) is 10–20 times higher for L-hArg [9]. The K_m value for L-hArg of rat liver arginase is 7.2 mmol l⁻¹ which is about 70-fold above its actual concentration in rat liver [10, 11]. The V_{max} of rat liver arginase is 130 times faster for L-arginine compared with L-hArg [10]. These properties make L-hArg a competitive inhibitor of rat liver arginase and render unlikely a strong catabolism in mammals. L-hArg is a substrate for the y⁺-transporter system which is responsible for stereoselective uptake and secretion of cationic amino acids in many cells [12]. Furthermore, *in vitro* data identified high L-hArg as a non-competitive inhibitor of alkaline phosphatases (ALP, [13–15]). Of note, L-hArg originating

from guanidated lysine residues in casein and soya-bean proteins is readily absorbed in the jejunum and ileum of Göttingen minipigs and broiler chickens [16, 17]. In line with these *in vitro* and *in vivo* data, oral supplementation of 1 and 10 mg kg⁻¹ body weight L-hArg were almost quantitatively (>95%) excreted unmetabolized in urine in pigs and rats, respectively [18]. The aim of this study was to investigate the kinetic and dynamic properties of single and multiple oral doses of 125 mg L-hArg in young humans and the effect of multiple doses on the endothelial and vascular function and cortical excitability.

Methods

Subjects

Twenty-four healthy volunteers (15 female, 9 male) without evidence of disease were found eligible for this study (Figure 1). They were recruited from the participating departments and from students at the University Medical Centre Hamburg-Eppendorf. Exclusion criteria were sitting blood pressure $\geq 160/100$ or $\leq 90/60$ mmHg, sitting heart rate ≥ 99 bpm or ≤ 50 beats per minute (bpm), a history of clinically significant hypotensive episodes or symptoms of fainting, dizziness, or light-headedness, a body mass index (BMI) ≥ 32 or ≤ 16 at screening, a history or symptoms of cardiovascular disease, particularly coronary artery disease, arrhythmias, or

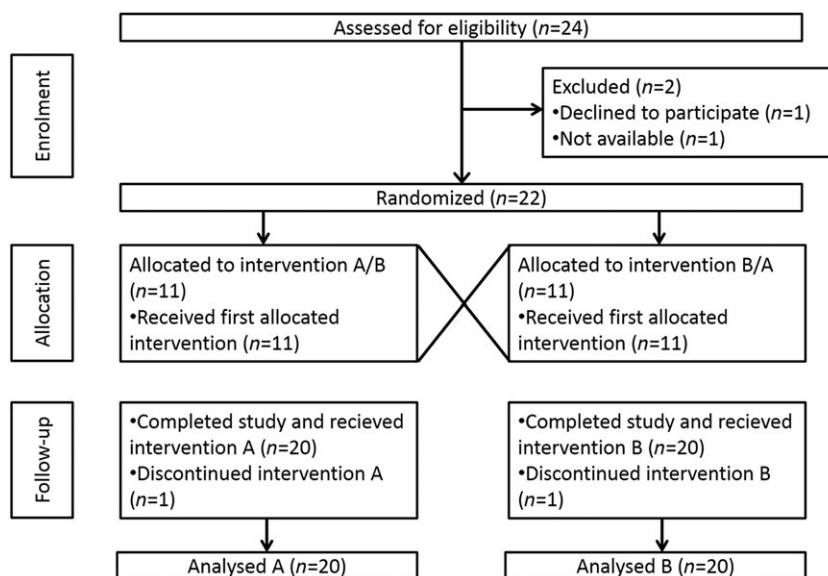


Figure 1

CONSORT diagram

congestive heart failure, a history of significant central nervous system disease, including transient ischemic attack, stroke, seizure disorder, or behavioural disturbances, the use of any drugs, a history of hepatitis B or C, and/or human immunodeficiency virus (HIV 1 + 2), participation in an investigational drug or medical device study within 30 days of first dosing, donation of blood or blood products within the last 2 months (male) or 3 months (female) prior to study, and pregnancy (female). Written informed consent was obtained from all participants. The study was planned as a non-drug study and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (PV4038) accordingly. The investigation was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and registered at clinicaltrials.gov (NCT02675660).

Study design

In a double-blind, placebo-controlled crossover design, 22 participants were randomized to receive either 125 mg L-hArg or placebo once daily in the morning for 4 weeks each (Figure S1). Placebo and L-hArg capsules were provided by Wellnest International Ltd. (West Sussex, UK), the latter being marketed as a dietary supplement. Cellulose capsules contained lactose or 119 ± 13 mg L-hArg (mean \pm SD, $n = 7$) and cornstarch as excipient. The study periods were separated by a washout phase of 4 weeks, and the sequence of the medications was randomly chosen in each participant. The study was preceded by a run-in phase, where all participants received a single dose of 125 mg L-hArg. Blood samples (2.7 ml EDTA vacutainer) for plasma L-hArg determinations were drawn at time points 0, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 120 h after single and multiple doses of L-hArg and placebo, respectively. At baseline, after each supplementation period (L-hArg and placebo) and after 4 weeks of follow-up, biochemical analyses including L-arginine and asymmetric

dimethylarginine (ADMA) determinations were performed and adverse events were evaluated. At baseline and after each supplementation period (L-hArg and placebo), dynamic analyses applying plethysmography [i.e. pulse wave velocity (PWV) and augmentation index (AIx)], ultrasound [i.e. flow-mediated vasodilatation (FMD)], and transcranial magnetic stimulation [TMS, i.e. motor threshold (MT), intracortical inhibition (ICI), intracortical facilitation (ICF)] were recorded. Two individuals abandoned study participation without statement of reasons.

Biochemical analyses

Plasma L-hArg, L-arginine and ADMA concentrations were determined in 20 participants by liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS) analysis as described previously [19, 20]. Briefly, 25 μ L aliquots of plasma were spiked with stable isotope-labelled L-hArg, L-arginine and ADMA, which served as internal standards. Proteins were precipitated with 100 μ L of methanol, filtrated through a 0.22 μ m hydrophilic membrane (Multiscreen HTS™, Millipore, Molsheim, France), derivatized with butanolic 1 N HCl, and analysed by LC-tandem MS (Varian 1200 MS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Quantification was performed by calculation of peak area ratios and calibration with known concentrations of analytes in dialysed EDTA plasma. Limits of quantification were 0.01 μ mol l⁻¹ for L-hArg, 0.25 μ mol l⁻¹ for L-arginine and 0.005 μ mol l⁻¹ for ADMA. For all arginine metabolites, coefficients of variation were $\leq 7.5\%$ [19, 20]. Blood counts, blood glucose, serum creatinine, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), ALP, and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) were determined with routine laboratory assays. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated with the CKD-EPI formula [21].

Kinetic analyses

Kinetic parameters, i.e. maximum plasma concentration (C_{\max}), time to maximum plasma concentration (T_{\max}) and area under the plasma concentration–time curve (AUC_{0-24h}), were calculated for L-hArg after single dose and multiple doses. AUCs were calculated for up to 24 h. To account for possible circadian rhythms of endogenous L-hArg, plasma concentrations following L-hArg administration at each time point were corrected for individual baseline (time point zero of single and multiple measurement) and placebo data prior to calculation of C_{\max} , T_{\max} , and AUC_{0-24h} values. Even for corrected data, the calculation of half-life was still not possible. All kinetic calculations were performed using Excel (version 2010, Microsoft Corporation, Redmont, USA).

Dynamic analyses

Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) was measured at baseline in three independent examinations at supine position after 5 min of resting, and results were averaged. PWV and AIx were obtained in supine position by plethysmography, applying the vascular explorer system (Enverdis, Jena, Germany). Augmented pressure was calculated as the difference between the second systolic peak and the first systolic peak, and AIx was calculated as the ratio between augmented pressure and pulse pressure. Values were normalized to a heart rate of 75 bpm. Central PWV was assessed recording waveforms at the femoral and carotid site, sequentially. FMD was assessed in the volunteers' right arm by high resolution ultrasound (12 MHz linear array transducer, Sienna, Siemens, Munich, Germany) as described previously [22]. In brief, longitudinal echo scans of the brachial artery were obtained before and after reactive hyperaemia. FMD was calculated as the percent in artery diameter 1 min after cuff release relative to the diameter before cuff release. Corticospinal excitability, i.e. MT, and cortical excitability, i.e. ICI and ICF, were evaluated during rest with well-established single and paired-pulse TMS protocols using a 7 cm diameter figure of 8 shaped coil and two Magstim 200 stimulators (Magstim Co., Whitland, Carmarthenshire, UK) and Signal software 4.05 and a CED1902-amplifier (both Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) for TMS data recording and processing [23, 24]. Two subjects were excluded from ICI and ICF measurement; due to high MT and low recruitment, no stable test stimulus motor evoked potential >0.2 mA could be achieved (and with low amplitude test stimuli no reliable ICI nor ICF can be elicited [25]).

Statistical analyses

All data are given as mean \pm standard deviation (SD) [95% confidence intervals, if appropriate] or median [25th; 75th percentile]. Statistical comparisons were made by Student's *t*-test (two-tailed) for unpaired or paired data of two groups and repeated measures ANOVA with Newman–Keuls post hoc test for paired data of four groups. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 5 for Windows, La Jolla, USA).

Results

Baseline characteristics of investigated subjects are listed in Table 1. All participants were healthy Asian-Caucasian with no history or symptoms of cardiovascular disease, particularly coronary artery disease, arrhythmias, congestive heart failure, transient ischemic attack, stroke, seizure disorder or behavioural disturbances. Baseline L-hArg concentration was $2.87 \pm 0.91 \mu\text{mol l}^{-1}$, mean \pm SD, with no difference between women and men, i.e. 2.66 and $3.13 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively ($P = 0.26$, Student's *t*-test for unpaired data). Oral supplementation with 125 mg L-hArg increased the plasma concentrations of L-hArg (C_{\max}) after single and multiple doses by 8.74 ± 4.46 [95% confidence intervals 6.65; 10.9] and 17.3 ± 4.97 [14.9; 19.6] $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively (Table 2). The AUC_{0-24h} was 3.5-fold higher after multiple dosing compared with a single dose of L-hArg. C_{\max} was reached after 1 h irrespectively of the dosing regimen.

Table 1

Baseline characteristics of participants^a

	Mean	Standard deviation
Age (years)	35	14
Gender (n, %)	11 females (55%)	
Smoker (n, %)	5 (25%)	
BMI (kg m⁻²)	24	2.9
Blood pressure (mmHg)^b		
Systolic	119	9.3
Diastolic	75	6.8
Blood counts/clinical chemistry		
Leukocytes (c/nL)	6.0	1.3
Thrombocytes (c/nL)	255	62
GOT (U/L)	25.8	9.8
GPT (U/L)	21.3	8.9
ALP (U/L)	46	18
Blood glucose (mg/dL)	76	18
hsCRP (mg/dL)^c	0.9	[0.9; 2.2]
eGFR (ml min⁻¹)	100	15
L-hArg ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	2.87	0.91
L-Arginine ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	80	20
ADMA ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.60	0.08

^aData are given as mean \pm standard deviation unless otherwise indicated.

^bAverage of three independent measurements.

^cMedian [25th; 75th percentile].

ADMA, asymmetric dimethylarginine; ALP, alkaline phosphatase; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate computed using the CKD-EPI formula; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; L-hArg, L-homoarginine, hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein.

Table 2Kinetic characteristics of L-homoarginine in human plasma after a single dose and four weeks of 125 mg oral supplementation^a

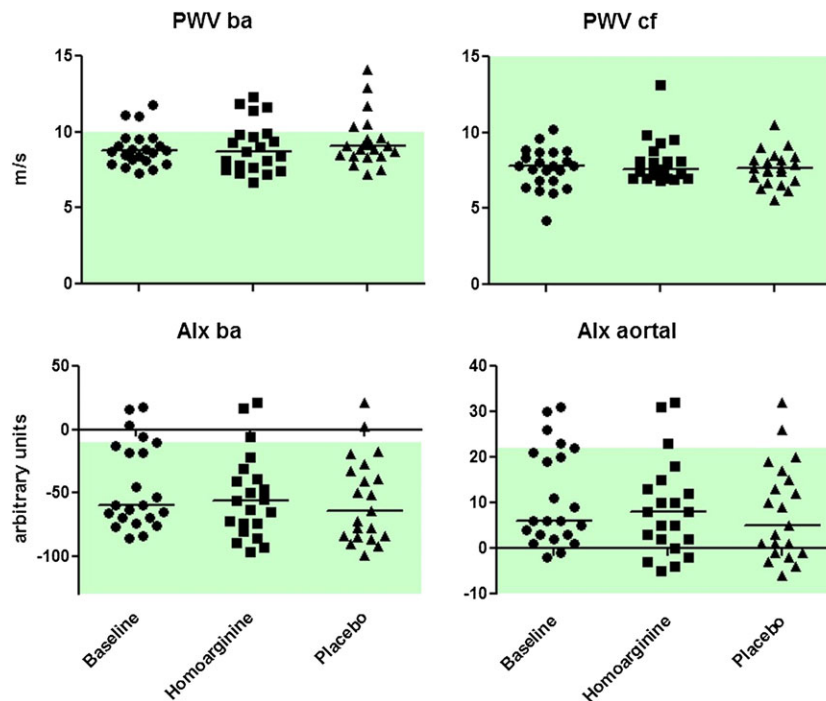
	Single dose	Multiple dose	P value ^b
C_{\max} [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	8.74 \pm 4.46 [6.65; 10.9]	17.3 \pm 4.97 [14.9; 19.6]	<0.001
T_{\max} [h]	1.15 \pm 0.54 [0.90; 1.40]	1.28 \pm 0.50 [1.05; 1.51]	0.22
AUC_{0-24h} [$\mu\text{mol l}^{-1}\cdot\text{h}$]	63.5 \pm 28.8 [50.0; 76.9]	225 \pm 78.5 [188; 2624]	<0.001

^aKinetic parameters are calculated for baseline-placebo corrected data. Data are given as mean \pm standard deviation [95% confidence intervals].^bP-value: single vs. multiple dose, Student's *t*-test (paired, two-tailed). C_{\max} indicates maximum plasma concentration; T_{\max} , time to maximum plasma concentration; AUC_{0-24h} , area under the plasma concentration–time curve (24 h).

Baseline characteristics given in Table 1 were not altered by supplementation, except for blood glucose, which was increased after L-hArg supplementation and ALP activity, which was increased after placebo and at follow-up ($P < 0.05$ for all; Table S1). L-hArg supplementation for 4 weeks did not change L-arginine or ADMA plasma concentrations. Adverse events were equally distributed in both study arms (Table S2). Supplementation with L-hArg had no impact on PWV and Aix as compared with baseline or placebo (Figure 2). FMD, ICI and ICF were also unchanged after placebo and L-hArg supplementation (Figure 3). MT was slightly increased after placebo supplementation compared with baseline ($P < 0.05$), but no significant difference was observed between L-hArg and placebo.

Discussion

The major finding of our study is that oral administration of 125 mg L-hArg once daily increases L-hArg plasma concentrations in healthy humans four- and sevenfold over baseline levels, after single and 28 daily doses, respectively. A median plasma concentration of $1.88 \mu\text{mol l}^{-1}$ L-hArg has previously been determined in 786 healthy individuals (aged from 35 to 54 years) with a tendency of higher L-hArg concentrations in younger participants [26]. In our study group of young individuals (mean age 35 years), we observed a mean L-hArg concentration of $2.87 \mu\text{mol l}^{-1}$ at baseline. The higher L-hArg concentration at baseline might be attributed to the younger age of our participants. Although we did not observe a

**Figure 2**

Pulse wave velocity (PWV) and augmentation index (Aix) data at baseline and after 4 week of supplementation with L-homoarginine and placebo ($n = 20$). PWV was calculated for the *A. brachialis* (ba) and the carotid-femoralis (cf). Aix was calculated for the aorta and the *A. brachialis* (ba). Normal range values according to the vascular explorer system (Enverdis, Jena, Germany) are depicted in green

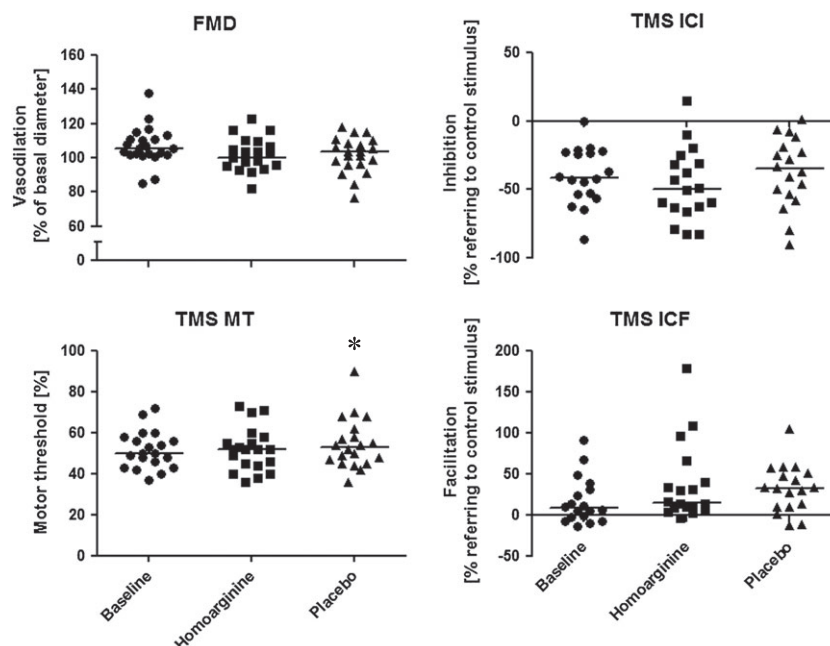


Figure 3

Transcranial magnetic stimulation (TMS) and flow-mediated vasodilatation (FMD) were performed at baseline and after 4 weeks of supplementation with L-homoarginine and placebo ($n = 20$ for FMD, $n = 18$ – 20 for TMS). Corticospinal excitability, i.e. motor threshold (MT), cortical excitability, i.e. intracortical inhibition (ICI) and facilitation (ICF), were evaluated with single and paired-pulse TMS protocols. $*P < 0.05$ vs. baseline, repeated measures ANOVA with Newman–Keuls post hoc test

difference in L-hArg concentrations between women and men, 125 mg L-hArg tended to increase C_{max} more in women compared with men, i.e. by 18.6 and 15.7 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively ($P = 0.20$, Student's t -test for unpaired data). The sex difference was most likely due to the lower body weight in women, i.e. 63 vs. 82 kg.

Multiple doses of 125 mg L-hArg increased the C_{max} sevenfold over baseline as compared with a fourfold increase after a single dose. We did not perform serial blood collections to evaluate C_{max} , T_{max} , and AUC_{0-24h} at different time-points after multiple dosing regimens and thus do not know if the tripling of AUC_{0-24h} represents the steady state kinetics. As a substrate for the y^+ -transporter system, L-hArg is likely to be taken up by several organs [12]. Even though we corrected our data for baseline and placebo concentrations to account for diurnal variation in L-hArg plasma concentrations, we were not able to calculate the terminal half-life in our study.

In line with previous observations made for the oral supplementation with L-arginine, L-hArg did not follow first-order elimination kinetics in a single compartment model [22]. L-hArg is a competitive inhibitor of rat liver arginase [10]. We therefore investigated whether 4 weeks of 125 mg L-hArg supplementation increases L-arginine plasma concentrations or its endogenous methylation product ADMA [27]. Even though we did not find increased L-arginine nor ADMA concentrations in our investigation, we cannot rule out that alternative dosing regimens, i.e. higher doses or shorter dosing intervals, might influence L-arginine metabolism. L-Arginine is not only subject to systemic but also to extensive pre-systemic elimination by arginases, and the

latter might not sufficiently be inhibited by a single dose once daily of a weak arginase inhibitor [5]. Experimental data showed that L-hArg is an inhibitor of ALP [13–15] and clinical observations revealed a negative correlation between circulating L-hArg and ALP levels in patients undergoing coronary angiography [28]. However, physiological concentrations of L-hArg, i.e. 0.2–3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ do not inhibit ALP, but induce osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells, augmenting vascular calcification in experimental atherosclerosis [29]. In the present investigation, the applied dosing regime of L-hArg did not alter ALP activity or vascular phenotypes.

Lower plasma concentrations of L-hArg have been reported in a variety of clinical conditions, among them coronary artery disease, congestive heart failure, ischemic stroke and myocardial infarction [28, 30–35]. Low L-hArg has been linked to a worsened prognosis in patients with renal and cardiovascular disease as well as to cardiovascular and all-cause mortality in the general population [28, 36–38]. These retrospective and prognostic cohort studies provide no experimental evidence in favour of a supplementation with L-hArg.

To date, L-hArg has only been supplemented in several animal models [16–18, 32, 39, 40]. In all studied species (i.e. chickens, pigs, rats and mice) orally supplemented L-hArg was readily absorbed in the intestine, it increased L-hArg plasma concentrations and was excreted almost quantitatively and unmetabolized into the urine. Oral supplementation of C57BL/6 mice for 4 weeks with 14 mg l^{-1} L-hArg in drinking water (approx. 2 mg kg^{-1} body weight) resulted in a threefold increase in L-hArg plasma concentration from

0.14 to 0.46 $\mu\text{mol l}^{-1}$ [32]. Supplementation of 125 mg L-hArg once daily (approx. 2 mg kg^{-1} body weight) for 4 weeks in humans resulted in a sevenfold increase (C_{max}) in L-hArg plasma concentration. These data clearly indicate that metabolism of L-hArg is different between mice and men and needs further investigation. Although the increase in L-hArg observed in mice was rather moderate, the applied dose significantly improved neurological outcome in an experimental model of stroke [32]. So far, murine and human data indicate that genetic alterations of L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) are responsible for changes in L-hArg levels [32, 41]. Therefore, AGAT itself might represent a possible target for future interventions to regulate L-hArg levels. Furthermore, it is still unknown whether the therapeutic potential of L-hArg supplementation is translatable to humans. However, our data show that L-hArg supplementation in humans is feasible.

In experimental and clinical studies L-hArg was associated with endothelial function, e.g. FMD [42], kidney function, e.g. eGFR [38], neurotoxicity, e.g. altered neuronal excitability [43], blood pressure [44] and glucose metabolism [39]. Supplementing 20 young individuals with 125 mg L-hArg once daily did not change FMD, eGFR, ICI, ICF, SBP or DBP. We observed a moderate increase in blood glucose after L-hArg supplementation (Table S1). This could be an adverse reaction to the supplement, but experimental findings in obese mice have shown an opposite effect of L-hArg supplementation on blood glucose. Oral supplementation of C57BL/6 mice for 16 weeks with 14 and 28 mg l^{-1} L-hArg in drinking water blunted a metabolic phenotype induced by a high-fat diet; i.e. L-hArg fostered insulin secretion and ameliorated blood glucose levels [39]. MT seemed significantly increased after placebo compared with baseline, but one outlier contributed to this effect. Furthermore, MT of placebo and L-hArg supplementation groups did not differ significantly from each other. Despite the clinical studies showing associations between L-hArg and clinical phenotypes, no evidence for a direct effect is given. At least for the dosing period applied to healthy individuals in the current study, no impact, neither harm nor benefit, was observed.

Na^+/K^+ -ATPase is a crucial enzyme responsible for the active transport of sodium and potassium ions in the nervous system necessary to maintain the ionic gradient for neuronal excitability. *In vitro* studies showed an inhibitory effect of L-hArg on Na^+/K^+ -ATPase in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of young rats at concentrations of 5–20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ [43]. However, in our study we did not observe any alterations of the cortical excitability by hArg supplementation, i.e. neither ICI nor ICF were changed. Given its polarity, transport of L-hArg across the blood-brain barrier is likely to require an active transport system. L-hArg is a substrate for the γ -transporter system [12] and has been reported to act as a competitive inhibitor of L-arginine uptake by porcine endothelial cells [45]. However, in mice, L-hArg was reported to be taken up into the brain [32]. Thus, it can only be concluded from the present data that supplementation of 125 mg L-hArg for 4 weeks does not seem to interfere with cortical excitability in healthy individuals.

AGAT is expressed predominantly in the kidney and liver, L-hArg and GFR are positively associated in cohort

studies, and L-hArg plasma concentrations decline with progression of chronic kidney disease [38, 46]. At baseline we observed relatively high L-hArg plasma concentrations possibly attributed to the young age and normal kidney function in our study population (Table 1). We did not investigate urinary excretion of L-hArg or AGAT expression, which might be altered upon L-hArg supplementation. Previously it was shown that L-arginine is extensively metabolized by arginase in the gut wall and liver [5, 47]. This limits its oral bioavailability as a substrate for NOS and subsequent effect on vascular function. L-hArg is an alternative substrate for NOS not subjected to elimination by arginase [9, 10]. However, to date it is still speculative whether the beneficial effects of L-hArg are solely due to interactions with L-arginine/NOS metabolism. The ratio of L-arginine over the endogenous NOS inhibitor ADMA is one predictor for the substrate availability for NOS [48]. In our study, supplementation with L-hArg did not change L-arginine, ADMA or the L-arginine/ADMA ratio. In line with this, we did not observe any improvement of endothelial function; neither FMD, nor PWI or A1x were changed. This does not render changes in endothelial function impossible after longer supplementation period or in subjects with pre-existing cardiovascular diseases. Nevertheless, the primary endpoint of our study was the determination of kinetic parameters and our study was sufficiently powered for this purpose.

In conclusion, the results of the present study provide a rationale for larger, prospective clinical studies with longer treatment periods to investigate the effects of oral supplementation with 125 mg L-hArg in patients with cardiovascular or metabolic disease.

Competing Interests

All authors have completed the Unified Competing Interest form at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: DA had a grant from the European Community in the previous 3 years; CG had grants and personal fees with Bayer Healthcare, Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKline, Lundbeck, Pfizer, Sanofi Aventis, UCB, Merck Serono, EBS technologies, Silk Road Medical, German Research Council, German Ministry of Science and Education and the European Community in the previous 3 years; CUC had a grant with the Else Kröner-Fresenius Stiftung in the previous 3 years; there are no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

The excellent medical and technical assistance of A. Dehn, S. Griesbach, M. Kastner, J. Lockowandt A. Steenpass and J. Wiener is appreciated. Dr Atzler acknowledges the support of the European Community under a Marie Curie Intra-European Fellowship for Career Development and Dr Choe was funded by an Else Kröner Memorial Stipendium from the Else Kröner-Fresenius Stiftung. This publication was funded by LMU Munich's Institutional Strategy LMUexcellent within the framework of the German Excellence Initiative (DA). The contributions to sample and data collection made by volunteers are gratefully acknowledged.

Contributors

Conception and design of the work: DA, CUC, ES. Analysis and interpretation of data: DA, MS, KC, IO, JH, CUC, ES. Drafting or revising the manuscript: DA, MS, KC, IO, UJ, CUC, AJ, ES. Final approval of the manuscript: DA, MS, KC, IO, JH, FCH, CG, UJ, AJ, RHB, CUC, ES. DA, MS, ES, and CUC contributed equally.

References

- Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, *et al.* The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Enzymes. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 6024–109.
- Alexander SPH, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, *et al.* The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Transporters. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 6110–202.
- Southan C, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Alexander SP, *et al.* The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucl Acids Res* 2016; 44: D1054–68.
- Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr* 2000; 130: 2626–9.
- Morris SM Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 2004; 134 (10 Suppl): 2743S–2747S ;discussion 65S–7S.
- Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *Altern Ther Health Med* 2014; 20: 48–54.
- Atzler D, Schwedhelm E, Choe CU. L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; 18: 83–8.
- Pilz S, Meinitzer A, Gaksch M, Grübler M, Verheyen N, Drechsler C, *et al.* Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids* 2015; 47: 1703–13.
- Moali C, Boucher JL, Sari MA, Stuehr DJ, Mansuy D. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry* 1998; 37: 10453–60.
- Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 31–7.
- Yang Y, Wu Z, Jia S, Dahanayaka S, Feng S, Meininger CJ, *et al.* Safety of long-term dietary supplementation with L-arginine in rats. *Amino Acids* 2015; 47: 1909–20.
- White MF, Gazzola GC, Christensen HN. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1982; 257: 4443–9.
- Lin CW, Fishman WH. L-Homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *J Biol Chem* 1972; 247: 3082–7.
- Rufo MB, Fishman WH. L-homoarginine, a specific inhibitor of liver-type alkaline phosphatase, applied to the recognition of liver-type enzyme activity in rat intestine. *J Histochem Cytochem* 1972; 20: 336–43.
- Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A. Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunit–subunit interaction. *Jpn J Pharmacol* 1994; 64: 97–102.
- Schmitz M, Hagemester H, Erbersdobler HF. Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *J Nutr* 1991; 121: 1575–80.
- Siriwan P, Bryden WL, Annison EF. Use of guanidinated dietary protein to measure losses of endogenous amino acids in poultry. *Br J Nutr* 1994; 71: 515–29.
- Hou Y, Hu S, Jia S, Nawaratna G, Che D, Wang F, *et al.* Whole-body synthesis of L-homoarginine in pigs and rats supplemented with L-arginine. *Amino Acids* 2016; 48: 993–1001.
- Atzler D, Mieth M, Maas R, Böger RH, Schwedhelm E. Stable isotope dilution assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of L-homoarginine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 2294–8.
- Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851: 211–19.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604–12.
- Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 51–9.
- Zimmerman M, Heise KF, Hoppe J, Cohen LG, Gerloff C, Hummel FC. Modulation of training by single-session transcranial direct current stimulation to the intact motor cortex enhances motor skill acquisition of the paretic hand. *Stroke* 2012; 43: 2185–91.
- Ziemann U, Reis J, Schwenkreis P, Rosanova M, Strafella A, Badawy R, *et al.* TMS and drugs revisited 2014. *Clin Neurophysiol* 2015; 126: 1847–68.
- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, *et al.* Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* 1993; 471: 501–19.
- Atzler D, Appelbaum S, Cordts K, Ojeda FM, Wild PS, Münzel T, *et al.* Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 1231–7.
- Tsikas D, Wu G. Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. *Amino Acids* 2015; 47: 1697–702.
- März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, *et al.* Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 2010; 122: 967–75.
- Alesutan I, Feger M, Tuffaha R, Castor T, Musculus K, Buehling SS, *et al.* Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc Res* 2016; 110: 408–18.
- Atzler D, Baum C, Ojeda F, Keller T, Cordts K, Schnabel RB, *et al.* Low homoarginine levels in the prognosis of patients with acute chest pain. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: e002565.
- Atzler D, Rosenberg M, Anderssohn M, Choe CU, Lutz M, Zugck C, *et al.* Homoarginine – an independent marker of mortality in heart failure. *Int J Cardiol* 2013; 168: 4907–9.

- 32** Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, *et al.* Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 2013; 128: 1451–61.
- 33** Drechsler C, Meinitzer A, Pilz S, Krane V, Tomaschitz A, Ritz E, *et al.* Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur J Heart Fail* 2011; 13: 852–9.
- 34** Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, *et al.* Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart* 2011; 97: 1222–7.
- 35** Pilz S, Tomaschitz A, Meinitzer A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, *et al.* Low serum homoarginine is a novel risk factor for fatal strokes in patients undergoing coronary angiography. *Stroke* 2011; 42: 1132–4.
- 36** Atzler D, Gore MO, Ayers CR, Choe CU, Böger RH, de Lemos JA, *et al.* Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 2501–7.
- 37** Pilz S, Teerlink T, Scheffer PG, Meinitzer A, Rutters F, Tomaschitz A, *et al.* Homoarginine and mortality in an older population: the Hoorn study. *Eur J Clin Invest* 2014; 44: 200–8.
- 38** Tomaschitz A, Meinitzer A, Pilz S, Rus-Machan J, Genser B, Drechsler C, *et al.* Homoarginine, kidney function and cardiovascular mortality risk. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 663–71.
- 39** Stockebrand M, Hornig S, Neu A, Atzler D, Cordts K, Böger RH, *et al.* Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids* 2015; 47: 1921–7.
- 40** Pentylala J, Rao SLN. Sustained nitric oxide generation with L-homoarginine. *Res Commun Biochem Cell Mol Biol* 1999; 3: 223–32.
- 41** Davids M, Ndika JD, Salomons GS, Blom HJ, Teerlink T. Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett* 2012; 586: 3653–7.
- 42** Valtonen P, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JS, *et al.* Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ J* 2008; 72: 1879–84.
- 43** da Silva CG, Parolo E, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT. *In vitro* inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain Res* 1999; 838: 78–84.
- 44** van der Zwan LP, Davids M, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CD, Teerlink T. L-Homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population: the Hoorn study. *J Hypertens* 2013; 31: 1114–23.
- 45** Bogle RG, Moncada S, Pearson JD, Mann GE. Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 768–70.
- 46** Drechsler C, Kollerits B, Meinitzer A, März W, Ritz E, König P, *et al.* Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *PLoS One* 2013; 8: e63560.
- 47** Castillo L, deRojas TC, Chapman TE, Vogt J, Burke JF, Tannenbaum SR, *et al.* Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 193–7.
- 48** Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 1–3.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcp.13068/supinfo>.

Figure S1 Study design. Time points indicated are days. Kinetic and dynamic parameters were evaluated after single dose and at the end of multiple doses (L-homoarginine and placebo).

Table S1 Laboratory and anthropometric phenotypes at baseline, after 4 weeks of supplementation (L-homoarginine and placebo), and after four weeks of follow-up.

Table S2 Treatment-emergent adverse events experienced by one or more participants during the treatment period.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
2 Darstellung der Publikation	13
2.1 Einleitung	13
2.2 Methoden	15
2.2.1 Probanden	15
2.2.2 Studiendesign	16
2.2.3 Pulswellengeschwindigkeit (PWV) und Augmentations-Index (AIx) 17	
2.2.4 Flow-mediated vasodilation (FMD)	18
2.2.5 Transkranielle Magnetstimulation (TMS)	19
2.2.6 Studienprodukt.....	19
2.2.7 Messung und Analyse der kinetischen Parameter.....	20
2.2.8 Statistische Auswertung	20
2.3 Ergebnisse	21
2.3.1 Charakteristika der Probanden	21
2.3.2 Kinetikanalysen.....	22
2.3.3 Dynamische Endpunkte der Studie.....	22
2.4 Diskussion	25
2.5 Zusammenfassung.....	28
2.6 Summary	29
2.7 Abkürzungsverzeichnis	30
2.8 Literaturverzeichnis	31
3 Erklärung des Eigenanteils	34
4 Danksagung.....	35
5 Lebenslauf	36
6 Eidesstattliche Erklärung	37

2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

In dieser Studie soll die Kinetik und Dynamik von Homoarginin bei seiner Supplementation in gesunden Probanden untersucht werden.

Homoarginin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die sich besonders durch ihr natürliches Vorkommen in Pflanzen als auch im Menschen als Nahrungsergänzungsmittel eignen könnte. Man findet Homoarginin im Menschen in geringen Konzentrationen von 2-3 $\mu\text{mol/l}$ (Atzler et al. 2015). Zum einen produziert der menschliche Körper selbst in geringen Mengen Homoarginin, indem die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) die Guanidinogruppe des Arginins auf Lysin überträgt (Choe et al. 2013, Davids et al. 2012). Zum anderen kann die Aminosäure über die Nahrung aufgenommen werden, so wurde sie in Spezies der Platterbse (*Lathyrus cicera* und *Lathyrus sativus*) sowie der Linse (*Lens culinaris*) gefunden (Rao 2011). In der menschlichen Ernährung spielen die Platterbsen vor allem in Afrika und Asien, aber auch im südlichen Europa eine Rolle, während sie diesbezüglich in Mitteleuropa kaum Verwendung finden.

Für ein geeignetes Nahrungsergänzungsmittel ist natürlich von Relevanz, ob und wie es überhaupt vom Körper aufgenommen wird, hierzu existieren bislang nur wenige Untersuchungen. Eine Studie von 1991, bei der Göttinger Minischweinen Homoarginin über die Nahrung zugeführt wurde, hat ergeben, dass die Aminosäure fast vollständig im Jejunum und Ileum des Dünndarms resorbiert wurde (Schmitz et al. 1991). In einer weiteren Studie wurde Schweinen und Ratten oral 1 oder 10 mg/kg Körpergewicht Homoarginin supplementiert. Diese Mengen wurden von den Tieren zu 95% unmetabolisiert im Urin wieder ausgeschieden. Dies zeigt zum einen, dass eine Resorption im Intestinaltrakt stattgefunden haben muss, zum anderen, dass die Metabolisierung des Homoarginins im Körper der Schweine und Ratten limitiert zu sein scheint (Hou et al. 2016).

Die Bedeutung des Homoarginins für den menschlichen Organismus ist noch nicht abschließend geklärt, es wurden aber verschiedene Zusammenhänge gefunden, in denen die Aminosäure eine Rolle spielt. So fungiert Homoarginin als alternatives Substrat der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (NOS) (Hrabak et al. 1994, Moali et al. 1998). Dieses Enzym findet sich unter anderem im

Gefäßendothel und dient dort als Signalmolekül und führt zur Vasodilatation der Gefäße. Die NOS zeigt im Vergleich zu Homoarginin eine deutlich höhere Affinität zu ihrem Hauptsubstrat Arginin (Moali et al. 1998). Außerdem dient Homoarginin auch als ein Inhibitor der Arginase, einem Enzym, das Arginin abbaut, sodass hohe Homoarginin-Konzentrationen auch zu erhöhten Arginin-Spiegeln und somit zu einem insgesamt erhöhten Substratangebot für die NOS führen können (Hrabak et al. 1994, Reczkowski und Ash 1994).

Wenn auch noch nicht ganz klar ist, auf welchem Weg Homoarginin im Körper wirkt, ist eine hohe Homoarginin-Plasmakonzentrationen in klinischen und epidemiologischen Studien mit verringerter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität assoziiert worden. Sowohl die Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC), bei der Patienten teilnahmen, die sich aufgrund von Herzkreislauferkrankungen einer Koronarangiographie unterzogen, als auch die deutsche Diabetes Dialyse (4D)-Studie, die dialysepflichtige Diabetiker einschloss, als auch die HOORN-Studie, die Frauen und Männer zwischen 50 und 75 Jahren untersuchte, zeigten einen Zusammenhang zwischen niedrigen Homoargininspiegeln im Blut und erhöhter Sterblichkeit insgesamt sowie erhöhter Sterblichkeit nach Herz-Kreislauferkrankungen. Daten dieser Studien ergaben außerdem eine Korrelation zwischen niedrigen Homoargininwerten und einem erhöhten Risiko für schwere Schlaganfälle und einem erhöhten Risiko für eine schlechtere Nierenfunktion (März et al. 2010, Pilz et al. 2011, Pilz et al. 2014).

Die Zusammenschau der Erkenntnisse, die bereits zu Homoarginin erhoben wurden, lässt es sowohl spannend als auch sinnvoll erscheinen, Homoarginin als mögliches Nahrungsergänzungsmittel näher zu untersuchen. Seine positiven Effekte auf das Herz-Kreislauf-System sind relevant, wenn man bedenkt, dass Erkrankungen dieses Systems wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle zu den häufigsten Erkrankungsgruppen und Todesursachen in den Industrienationen gehören. Diese Erkrankungen erfordern zumeist eine lebenslange Behandlung, die eine enorme Belastung für die Patienten als auch für das Gesundheitssystem darstellt. So sollte in der Forschung ein besonderes Augenmerk auf die Prävention von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems gelegt werden. Zudem geben zum einen die spezifischen Eigenschaften von Homoarginin als körpereigene Aminosäure und zum anderen Forschungsergebnisse an anderen

Säugetieren, die belegen, dass Homoarginin intestinal resorbiert wurde, Anhaltspunkte für die Annahme, dass eine Supplementation mit Homoarginin zunächst mal möglich und voraussichtlich auch sicher ist. Vor diesem Hintergrund entwickelte sich das Ziel der Studie, die Kinetik und Dynamik von Homoarginin nach der Einmalgabe bzw. einer vierwöchigen Einnahme zu beobachten. Dabei lag mein Schwerpunkt in dieser Arbeit insbesondere auf den dynamischen Endpunkten der Studie, nämlich dem Effekt des Homoarginins auf die Gefäßfunktion und die kortikale Erregbarkeit.

2.2 Methoden

2.2.1 Probanden

Es wurden 24 freiwillige und gesunde Probanden in die Studie aufgenommen, davon waren 15 weiblich und 9 männlich. Die Probanden waren zum Zeitpunkt des Einschlusses zwischen 21 und 60 Jahren alt. Grundvoraussetzung für die Teilnahme an der Studie war die unterschriebene Einverständniserklärung, die im Rahmen der Aufklärung über die Studie ausgefüllt wurde. Es bestand eine Reihe weiterer Ausschlusskriterien für mögliche Probanden dieser Studie. So durfte ein Proband bei der Erstuntersuchung keine Blutdruckwerte über 160/100 mmHg oder unter 90/60 mmHg, sowie keine Herzfrequenz größer 99 Schlägen pro Minute oder unter 50 Schlägen pro Minute aufweisen. Ein Body Mass Index über 32 kg/m² oder unter 16 kg/m² führte ebenfalls zum Ausschluss. Wenn der Proband in der Vorgeschichte entweder kardiologische Vorerkrankungen (z.B. Koronare Herzkrankheit, Arrhythmien oder Herzinsuffizienz) oder neurologische Vorerkrankungen (z.B. Transiente ischämische Attacken, Apoplex, Anfallserkrankungen oder psychische Verhaltensstörungen) aufwies, war die Teilnahme an der Studie nicht möglich. Die Probanden sollten nicht an Infektionskrankheiten, insbesondere nicht an Hepatitis B, C oder HIV leiden. Falls Grund zu der Annahme bestand, dass der Proband allergisch auf einen Inhaltsstoff des Supplements reagieren könnte oder ein Medikament einnimmt, das mit dem Supplement reagieren könnte, wurde ebenfalls von einer Teilnahme abgesehen. Zudem durften die Probanden keine Metallimplantate haben, um auch an allen Untersuchungen der Studie teilnehmen zu können. Für die Zeit der Teilnahme in der Studie wurden die Probanden gebeten, einige Empfehlungen zu berücksichtigen. Sie sollten 21

Tage vor Beginn sowie während der Studie keine Medikamente einnehmen, die sich auf die Untersuchungsergebnisse auswirken könnten, insbesondere nichtsteroidale Antiphlogistika, antioxidative Vitamine wie Vitamin C und E, Folsäure, Fischölkapseln, Knoblauchextrakt sowie allgemein vasoaktive Medikamente. Zudem wurde auf eine möglichst ausgewogene Ernährung inklusive Fleisch und Fisch hingewiesen. Auf die Teilnahme an weiteren Studien zu Medizinprodukten oder Medikamenten und auf eine Blutspende sollte während der Dauer der Studie verzichtet werden.

2.2.2 Studiendesign

Es handelt sich um eine doppelblinde, Placebo-kontrollierte, randomisierte Studie im Crossover-Design. Die Studie lässt sich in vier Phasen aufteilen, wobei Phase 1 aus den Voruntersuchungen sowie der Einmalgabe von 125 mg L-Homoarginin besteht. In den Phasen 2 und 3 findet jeweils eine vierwöchige Einnahmephase von L-Homoarginin oder Placebo mit den dazugehörigen Untersuchungen statt. Die beiden Phasen trennt eine vierwöchige Auswaschphase. Die letzte Phase folgt ebenfalls auf eine vierwöchige Auswaschphase und beinhaltet die Follow-up-Untersuchungen.

Zu Beginn fand bei jedem Probanden eine Basisuntersuchung statt, die so auch zu allen weiteren Messzeitpunkten durchgeführt wurde. Diese bestand aus der Messung des Blutdrucks und Pulses, der Messung verschiedener Laborparameter (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, GOT, GPT, Glukose, Kreatinin, CRP, Homoarginin, L-Arginin, Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)) sowie die Erhebung von Größe, Gewicht, Medikamentenanamnese, Vorerkrankungen sowie Sport- und Ernährungsgewohnheiten anhand eines Fragebogens. Außerdem wurden die dynamischen Endpunkte der Studie erhoben durch eine Plethysmographiemessung, eine Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis und durch Transkranielle Magnetstimulation. Die erste Phase endete mit einer Einmalgabe von 125 mg L-Homoarginin gefolgt von 11 Blutentnahmen zur Bestimmung der Single-dose-Kinetik. Die Einnahme der Kapsel entsprach dem Zeitpunkt 0 (t_0), hier erfolgte die erste Blutentnahme (EDTA-Monovette, 2,7 ml), weitere Blutentnahmen folgten nach 15 Minuten ($t_{1/4}$), 30 Minuten ($t_{1/2}$), 1 Stunde (t_1), 2 Stunden (t_2), 4 Stunden (t_4), 8 Stunden (t_8), 24 Stunden (t_{24}), 48 Stunden (t_{48}), 72 Stunden (t_{72}) und 120 Stunden (t_{120}). Die Proben wurden bei 4 °C in der

Zentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 2000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Mindestens eine Woche nach der Einmalgabe begann die vierwöchige Einnahme von Homoarginin oder Placebo einmal täglich morgens. Die Probanden wurden zu Beginn der Studie per Zufall einer Gruppe zugeordnet. In der letzten Einnamewoche fand erneut die Messung der dynamischen Parameter statt. Am Ende der Einnahmeperiode erfolgten die Blutentnahmen wie oben beschrieben sowie die Erhebung der Sicherheitsparameter (Laborparameter, Blutdruck und Puls). Vom Zeitpunkt der letzten Einnahme an folgte nun eine mindestens vierwöchige Auswaschphase. Die dritte Phase ähnelte der zweiten Phase, es erfolgte die vierwöchige Einnahme des Homoarginins oder Placebos, je nachdem welche Kapsel noch nicht eingenommen wurde. Erneut fanden die Messungen für die dynamischen Endpunkte und die Blutentnahmen für die kinetischen Endpunkte sowie die Erhebung der Sicherheitsparameter statt. Darauf folgte ebenfalls eine Auswaschphase von vier Wochen, am Ende dieser Zeit wurden erneut die Sicherheitsparameter in einer Follow-up-Untersuchung erhoben.

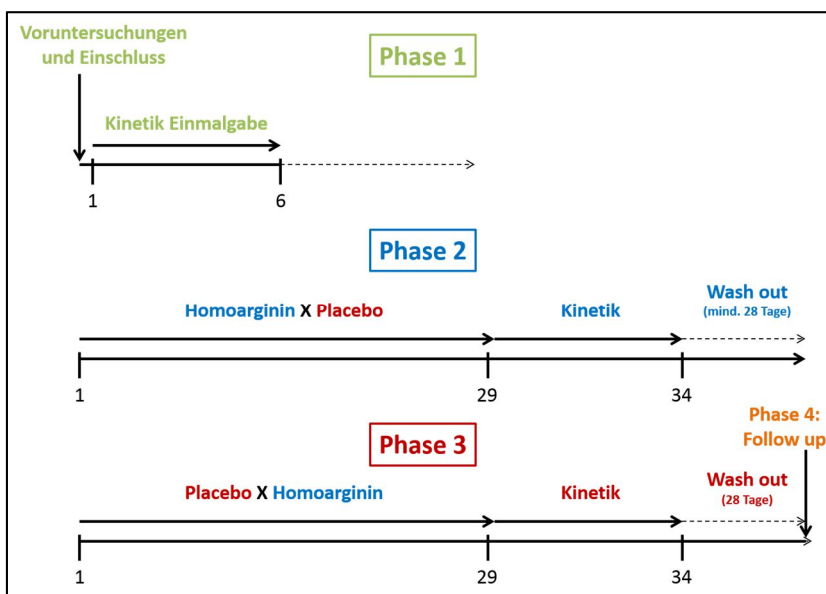


Abb.1: Ablauf der Studie in ihren einzelnen Phasen

2.2.3 Pulswellengeschwindigkeit (PWV) und Augmentations-Index (AIx)

Die Messung der PWV und des AIx erfolgte mit dem Vascular Explorer (enverdis GmbH, Jena, Deutschland). Die PWV wurde ermittelt über die gleichzeitige

Manschettenmessung am Oberarm und Knöchel auf diastolischem Druckniveau, so wurde die Zeitdifferenz der Pulswelle gemessen und daraus die Pulswellengeschwindigkeit brachial-ankle (PWV ba) errechnet. Über diese Methode sowie die Messung der reflektierten Pulswelle war es der Software außerdem möglich, über die aortale Pulswellengeschwindigkeit (PWV ao) die Pulswellengeschwindigkeit carotid-femoral (PWV cf) zu errechnen. Für die Messung des Alx nutzte die Software einen Schwingungssensor in der brachialen Manschette, dieser nahm die Oszillationen auf diastolischem und suprasystolischem Druckniveau wahr. Aus dem Verhältnis der Augmentation zum Pulsdruck errechnete die Software dann sowohl einen aortalen Augmentationsindex (Alx ao) als auch einen Augmentationsindex brachial-ankle (Alx ba). Die Werte wurden standardisiert auf eine Herzfrequenz von 75 Schlägen pro Minute angegeben.

2.2.4 Flow-mediated vasodilation (FMD)

Die Untersuchung erfolgte am liegenden Probanden bei leicht erhöhtem Oberkörper. Der Proband lag vor Messbeginn fünf Minuten in Ruhe. Zuerst wurde der Blutdruck nach Riva-Rocci gemessen. Zur Darstellung der Arteria brachialis in der rechten Ellenbeuge wurde ein 12 MHz-Linearschallkopf im B-Mode eines Ultraschallgeräts (Sonoline G50, Siemens, München, Deutschland) genutzt. Zu Beginn wurde eine basale Messung des Durchmessers der Arterie durchgeführt. Hierfür wurde die Arterie im Longitudinalschnitt dargestellt. Um sicher zu gehen, dass die Messung auch zu späteren Messzeitpunkten an derselben Lokalisation durchgeführt wird, wurde der Messpunkt etwa 2 cm oberhalb der Bifurkation der Arteria brachialis in die Arteria radialis und die Arteria ulnaris festgelegt. Nach der Messung des basalen Durchmessers wurde eine Blutdruckmanschette am Oberarm proximal des Messpunktes angelegt, auf suprasystolische Werte aufgepumpt und für fünf Minuten belassen, um eine Ischämie zu erzeugen. Daraufhin wurde die Luft aus der Manschette abgelassen und es stellte sich eine reaktive Hyperämie mit nachfolgender Vasodilatation im rechten Arm ein. Im Zeitraum von 45-60 Sekunden nach Ablassen der Luft wurde erneut der Durchmesser der Arterie gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Vasodilatation erwartet wird (Coretti et al. 2002). Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe des Brachial Analyzer for Research (Version 6, Medical Imaging

Applications, Coralville, USA). Die Software erkennt die Intima der Gefäßwände und analysiert und mittelt den Gefäßdurchmesser in einer Sequenz von 15 Sekunden. Für die Berechnung der FMD wurde der Anteil des Durchmessers bei reaktiver Hyperämie in Prozent des Ruhedurchmessers der Arterie angegeben.

2.2.5 Transkranielle Magnetstimulation (TMS)

Bei der TMS wurde der Motorkortex über magnetische Impulse stimuliert und daraufhin das Bewegungsausmaß am Zeigefinger bestimmt. Die Stimulation wurde mit einer Magnetspule des Magstim 200 Stimulators (Magstim Co., Whitland, Carmarthenshire, Großbritannien) über dem linken Motorkortex durchgeführt, die motorisch evozierten Potentiale (MEP) wurden am rechten Zeigefinger über dem Musculus interosseus dorsalis I abgeleitet und über die Signal Software und einen CED1902-Verstärker (beides Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien) ausgewertet. Zu Beginn der Untersuchung wurde die Stelle über dem Motorkortex, die mit den höchsten MEPs einherging, aufgesucht und mit einem Stift markiert. Zur Bestimmung der Erregungsschwelle wurde ein Ausschlag $> 0,05$ mA bei mindestens 5 von 10 Stimuli definiert. Für die folgende Untersuchung wurde die Stimulusstärke zunächst so eingestellt, dass über dem Muskel ein Ausschlag von etwa 1 mA abzuleiten war, dieser Stimulus wurde als Kontrollstimulus festgelegt. Ein zweiter Stimulus, der entweder inhibierend oder fazilitatorisch wirken sollte, wurde mit einer Stärke von 80% des Kontrollstimulus eingesetzt. Es folgte nun eine Messung mit 54 Stimuli, die per Zufall drei Gruppen zugeordnet waren, die Kontrollmessung via Kontrollstimulus, die Messung der intrakortikalen Inhibition (ICI) mit einem zweiten Stimulus 3 ms vor dem eigentlichen Stimulus und die Messung der intrakortikalen Fazilitation (ICF) mit einem weiteren Stimulus 10 ms vor dem eigentlichen Stimulus. Aus den jeweils 18 Werten wurden Mittelwerte für die ICI und ICF erhoben und jeweils in Prozent der MEPs der Kontrollstimuli angegeben. Zwei Probanden konnten nicht in die Auswertung einbezogen werden, da bei Ihnen auch bei hohen Stimuli kein MEP $> 0,2$ mA erzielt werden konnte.

2.2.6 Studienprodukt

Das Studienprodukt (Wellnest International LTD, West Sussex, UK) bestand aus einer Stärke kapsel, die mit 125 mg L-Homoarginin gefüllt wurde. Die Placebo-Kapsel hatte ein identisches Äußeres, hier befand sich im Inneren Speisestärke

ohne L-Homoarginin. Es wurde keine Färbung der Kapsel vorgenommen. Die Kapseln waren luftdicht und lichtgeschützt in Dosen à 60 Kapseln verpackt. Diese wurden bei Zimmertemperatur trocken gelagert. Es fand eine Etikettierung der Dosen statt. Die Kapseln, die L-Homoarginin enthielten, wurden mit der Aufschrift Kapsel A versehen, die Placebo-Dosen mit der Aufschrift Kapsel B. Beide Etiketten enthielten außerdem Hinweise für die Probanden zur Einnahme und Lagerung der Kapseln.

2.2.7 Messung und Analyse der kinetischen Parameter

Die Messung des L-Homoarginins aus den Plasmaproben der Probanden erfolgte mit der Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS). Hierbei werden Moleküle zunächst durch die Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und später über die Massenspektrometrie in ihrer Menge gemessen. Als Parameter bei der Kinetik wurden aus diesen Werten dann unter anderem die maximale Plasmakonzentration (C_{max}), die Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration (T_{max}) und die Fläche unter der Kurve für die ersten 24 Stunden (AUC_{0-24h}) ermittelt. Bei der Berechnung der Analyseparameter wurden Werte verwendet, die durch den Basalwert bzw. die Werte aus den Blutentnahmen nach Placebo-Einnahme korrigiert waren, um einen Fehler durch eine etwaige zirkadiane Rhythmik auszuschließen. Die Berechnungen wurden mit Excel (Version 2010, Microsoft Corporation, Redmont, USA) durchgeführt. Durch die Probengewinnung sowohl nach einer Einmalgabe von Homoarginin als auch nach der vierwöchigen Einnahme war es möglich, Werte für eine Single-dose-Kinetik als auch eine Kinetik im *steady state* zu berechnen.

2.2.8 Statistische Auswertung

Alle Werte wurden als Mittelwert mit Standardabweichung, 95 %-Konfidenzintervall oder Median mit 25. und 75. Perzentile angegeben. Die Auswertung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem T-Test. Für mehrfache Gruppenvergleiche wurde eine ANOVA mit Newman-Keuls Post-hoc-Test gerechnet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism verwendet (Version 5 für Windows, La Jolla, USA).

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Charakteristika der Probanden

Es wurden vier Probanden aus der Studie aus folgenden Gründen ausgeschlossen: Ein Proband hat nach ausführlicher Aufklärung die weitere Teilnahme abgelehnt, ein weiterer war nicht wieder zu erreichen. Bei zwei Probanden führten unvollständige Untersuchungsergebnisse zum Ausschluss. Von den verbleibenden 20 Probanden, die in die statistische Auswertung eingegangen sind, waren 11 weiblich und 9 männlich. Die Probanden waren zum Einschluss der Studie zwischen 21 und 60 Jahren alt, bei einem durchschnittlichen Alter von 35 ± 14 Jahren. Der mittlere BMI betrug $24 \pm 2,9$ kg/m² bei einer mittleren Größe von 171,8 cm und einem mittleren Gewicht von 70,3 kg. Unter den Probanden waren 5 Raucher (25 %). Der durchschnittliche Blutdruck betrug $119 \pm 9,3/75 \pm 6,8$ mmHg. Alle als Sicherheitsparameter bestimmten Laborwerte befanden sich im Normbereich. Homoarginin betrug im Durchschnitt $2,87 \pm 0,91$ µmol/l, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Frauen (2,66 µmol/l) und Männern (3,13 µmol/l) bestand. Die Basis-Charakteristika zeigten kaum signifikante Veränderungen nach Einnahme von Homoarginin. Lediglich die Blutglucose erhöhte sich signifikant nach vierwöchiger Einnahme des Homoarginins von 76 ± 18 mg/dl auf 89 ± 20 mg/dl, wobei die Werte weiterhin im Normbereich lagen. Es wurden vereinzelt Nebenwirkungen (Tabelle 1) von den Probanden beschrieben, diese traten sowohl nach der vierwöchigen Einnahme von Homoarginin als auch nach Placebo auf.

Tab. 1: Nebenwirkungen, die von den Probanden nach der vierwöchigen Einnahme von Homoarginin bzw. Placebo angegeben wurden, Angabe in Anzahl der Nennungen

	Homoarginin	Placebo
Diarrhoe	1	1
Abgeschlagenheit	1	1
Übelkeit	1	0
Epistaxis	0	1
Palpitationen	0	1

2.3.2 Kinetikanalysen

Nach Einnahme von einmalig 125 mg Homoarginin erhöhte sich der maximale Plasmaspiegel der Probanden C_{\max} um durchschnittlich $8,74 \pm 4,46$ [95 %-Konfidenzintervall 6,65; 10,9] $\mu\text{mol/l}$. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration T_{\max} betrug durchschnittlich $1,15 \pm 0,54$ [95 %-Konfidenzintervall 0,9; 1,4] Stunden. Die Fläche unter der Kurve in den ersten 24 Stunden betrug nach Einmalgabe $63,5 \pm 28,8$ [95 %-Konfidenzintervall 50; 76,9] $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$. Nach vierwöchiger Einnahme von einmal täglich 125 mg Homoarginin erhöhte sich der maximale Plasmaspiegel der Probanden C_{\max} um durchschnittlich $17,3 \pm 4,97$ [95 %-Konfidenzintervall 14,9; 19,6] $\mu\text{mol/l}$. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration T_{\max} betrug hier $1,28 \pm 0,5$ [95 %-Konfidenzintervall 1,05; 1,51] Stunden. Die Fläche unter der Kurve in den ersten 24 Stunden betrug nach vierwöchiger Einnahme $225 \pm 78,5$ [95 %-Konfidenzintervall 188; 262,4] $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$.

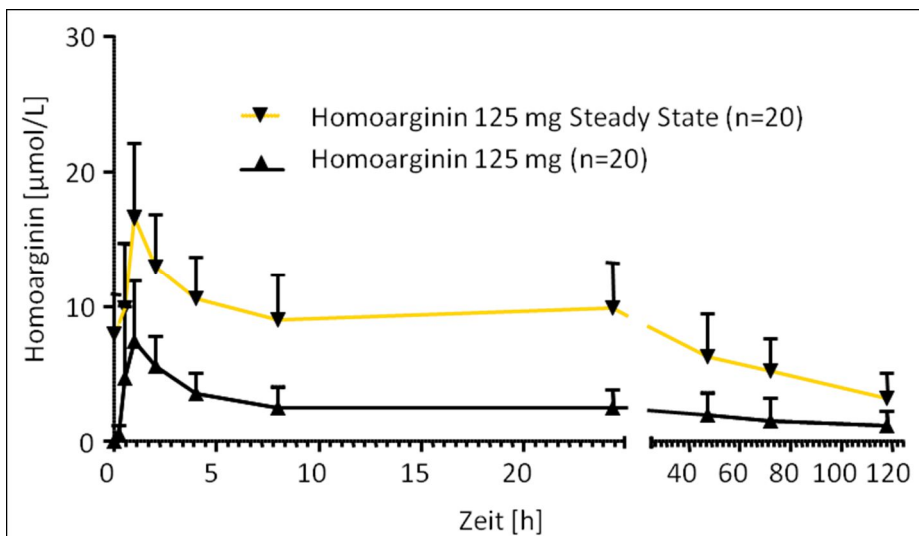


Abb. 2: Kinetik nach Einmalgabe und vierwöchiger Einnahme von 125 mg Homoarginin

2.3.3 Dynamische Endpunkte der Studie

2.3.3.1 PWV und Aix

Die Untersuchungen, die mit dem Vascular Explorer durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die PWV ba (Normbereich < 10 m/s) betrug zu Anfang durchschnittlich $8,92 \pm 1,2$ m/s, nach vierwöchiger Homoarginin-Einnahme $8,97 \pm 1,66$ m/s und nach Einnahme des Placebos $9,45 \pm 1,7$ m/s. Die errechnete PWV cf (Normbereich < 16 m/s) lag basal bei $7,62 \pm 1,37$ m/s, sowie

bei $8 \pm 1,43$ m/s und $7,7 \pm 1,12$ m/s nach Homoarginin- und Placebo-Einnahme. Der Alx ba (Normbereich < 10) betrug vor Einnahmebeginn $-44,65 \pm 33,92$, es zeigte sich keine signifikante Veränderung nach Homoarginin- ($-54 \pm 32,85$) bzw. Placebo-Einnahme ($-54,8 \pm 33,76$). Der Alx ao (Normbereich < 22) betrug zu Anfang $11,15 \pm 10,65$. Nach Homoarginin- und Placebo-Einnahme sank der Wert tendenziell auf $8,25 \pm 10,34$ bzw. $8,2 \pm 10,53$.

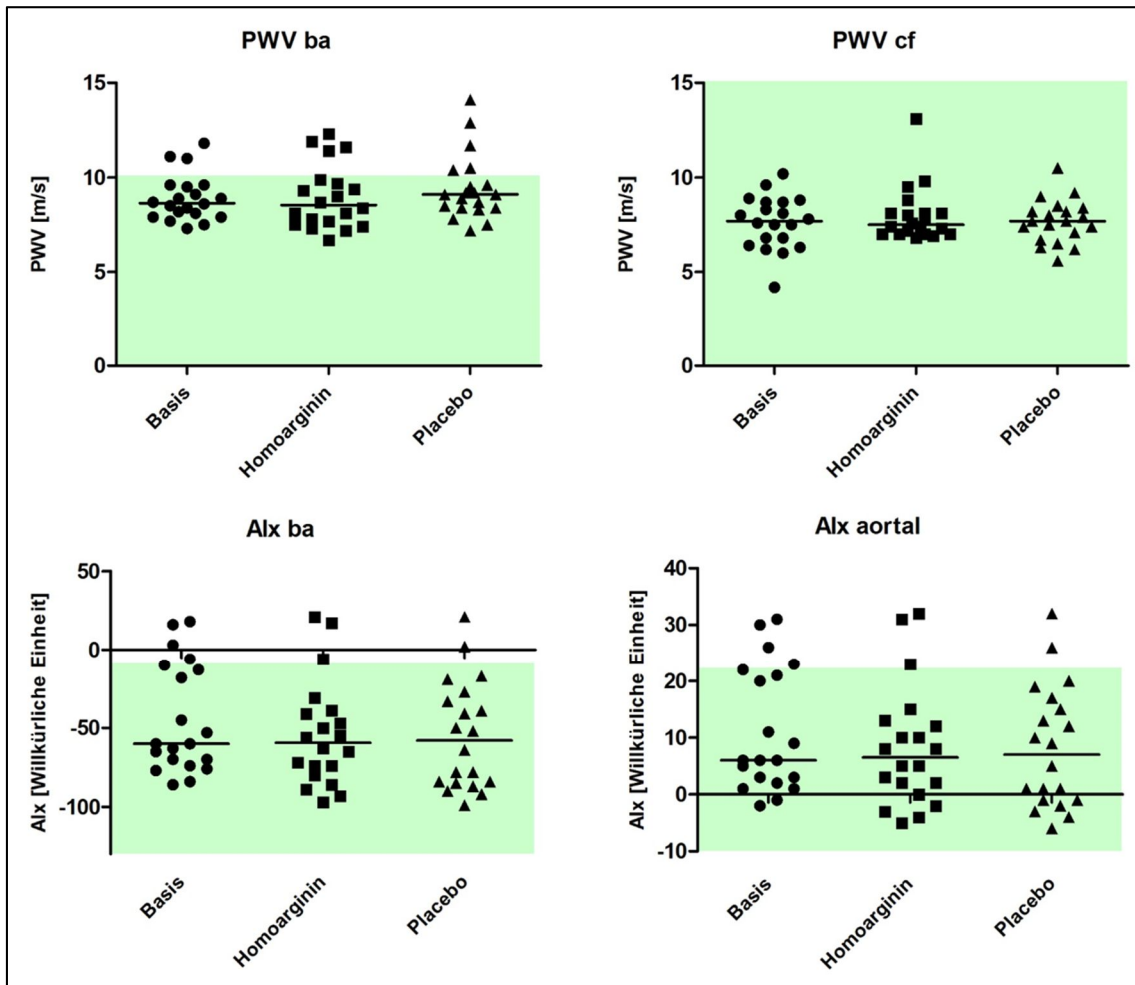


Abb. 3: PWV ba und cf sowie Alx ba und ao in den verschiedenen Studienphasen

2.3.3.2 FMD

Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser bei der Basisuntersuchung lag bei $3,93 \pm 0,66$ mm, nach Hyperämie stieg dieser auf $4,07 \pm 0,7$ mm, also auf $105,91 \pm 10,64$ % an. Nach vierwöchiger Homoarginin-Einnahme betrug der Basisdurchmesser $3,86 \pm 0,76$ mm, nach Hyperämie stieg dieser auf $3,96 \pm 0,89$ mm, also auf $102,14 \pm 9,43$ % an. Nach Placebo-Einnahme betrug die Werte $3,94 \pm 0,7$ mm für die Basismessung und $4,04 \pm 0,85$ mm, also

102,13 ± 10,29 % nach Hyperämie. Auch diese Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede.

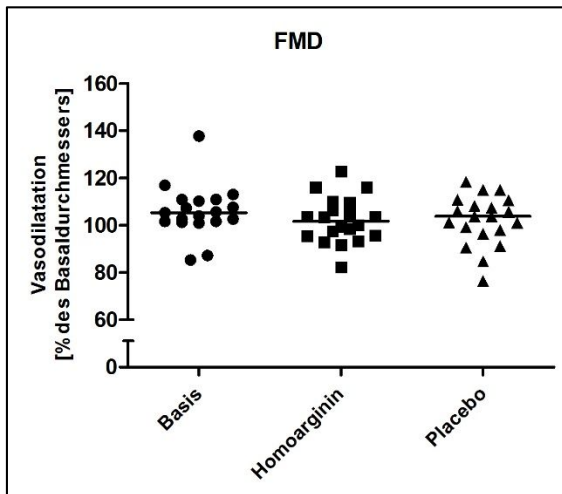


Abb. 4: Vasodilatation der Arteria brachialis nach Hyperämie

2.3.3.3 TMS

In der Basis-Untersuchung lag die Erregungsschwelle der Probanden bei durchschnittlich 51,7 ± 9 %. Es fand eine ICI von 39,8 ± 20,3 % und eine ICF von 17,4 ± 27,8 % des Kontrollausschlags statt. Nach Homoarginin-Einnahme wurde eine Erregungsschwelle von 52,1 ± 10,4 %, ICI von 46,5 ± 25,6 % und ICF von 37,4 ± 46,4 % gemessen. Die Erregungsschwelle nach Placeboeinnahme betrug 54,7 ± 12 %, die ICI betrug 37,2 ± 24,8 % und die ICF 33,1 ± 28,1 % des Kontrollausschlags. Zwischen der Erregungsschwelle der Basis-Untersuchung und der Untersuchung nach Placebo-Einnahme zeigte sich ein signifikanter Anstieg. Für ICI und ICF waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

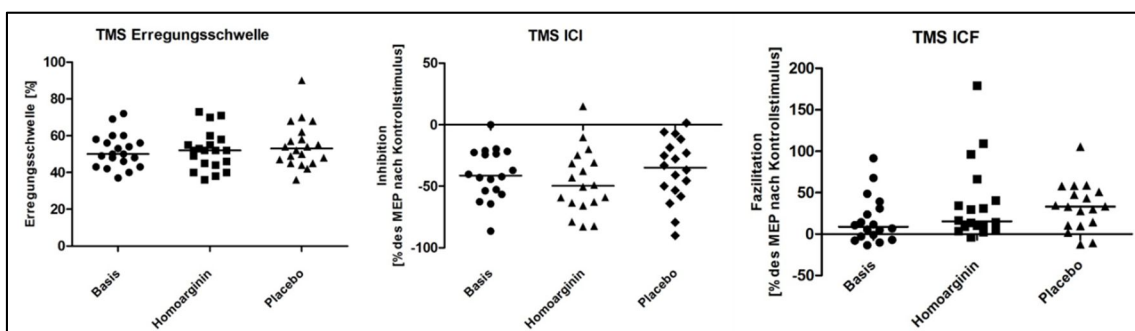


Abb. 5: Erregungsschwelle sowie die Änderung der MEPs nach Inhibition und Fazilitation

2.4 Diskussion

Die Studie lieferte zwei wesentliche Ergebnisse: 1. Die Supplementation von 125 mg Homoarginin über vier Wochen erhöht die Homoarginin-Plasmakonzentration in gesunden Probanden. 2. Die Supplementation von 125 mg Homoarginin über vier Wochen wird von gesunden Probanden gut vertragen.

Zu Studienbeginn lag die Homoarginin-Plasmakonzentration der Probanden durchschnittlich bei 2,87 $\mu\text{mol/L}$. In der German Gutenberg Health Study (GHS) lag die Homoarginin-Plasmakonzentration bei 1,88 $\mu\text{mol/L}$ im Durchschnitt bei einem Kollektiv von 786 gesunden Probanden zwischen 35 und 54 Jahren (Atzler et al. 2016). Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch das insgesamt jüngere Probandenkollektiv in unserer Studie erklären (im Mittel 35 Jahre). Alle 20 gemessenen Homoarginin-Plasmakonzentrationen lagen zu Beginn der Studie im zuvor in der GHS definierten Normwertebereich von 1 bis 4 $\mu\text{mol/L}$. Durch die Supplementation mit 125 mg Homoarginin erhöhten sich die Spiegel um das Vierfache nach Einmalgabe bzw. um das Siebenfache nach der vierwöchigen Einnahme von Homoarginin. Dies zeigt zunächst einmal, dass eine Supplementation von Homoarginin beim Menschen möglich ist und dass 125 mg eine Dosis darstellt, die den Plasmaspiegel deutlich anhebt.

Homoarginin war in einer vorherigen Studie mit der Gefäßfunktion assoziiert (Valtonen et al. 2008). Als Parameter der Gefäßfunktion haben wir die FMD, AIX und PWV untersucht. Keine dieser Untersuchungen zeigte eine Veränderung nach der Einnahme von Homoarginin. In einer weiteren vorausgehenden Studie wurde Homoarginin mit einer Senkung des Blutdrucks assoziiert (Van der Zwan et al. 2013). Aber auch beim Blutdruck zeigte sich bei uns keine Änderung der Werte unserer Probanden. Möglicherweise sind hierfür höhere Dosen oder längere Einnahmep perioden und somit auch höhere Wirkspiegel nötig. Dabei ist naheliegend, dass ein solcher Effekt bei gesunden Probanden deutlich geringer ausfällt als bei Patienten, die im Vorfeld eine schlechte Endothelfunktion zeigen. Aus bereits veröffentlichten Studien sind auch mögliche negative Effekte des Homoarginins bekannt. So soll Homoarginin eine Induktion der osteogenen Transformation mit vermehrter Verkalkung der Gefäße in Mäusen bewirken (Alesutan et al. 2016), was wiederum zu einer schlechteren Gefäßfunktion führen würde. Wie oben bereits erwähnt wurde bei unseren Probanden keine Auswirkung des Homoarginins -weder positiver noch negativer Natur- auf die

Gefäßfunktion festgestellt.

In einer Studie mit jungen Ratten wurde Homoarginin durch mögliche Inhibition der Na⁺/K⁺-ATPase ein neurotoxischer Effekt zugeschrieben (Da Silva et al. 1999). Deshalb setzten wir als ein Untersuchungsinstrument auch die Messung der kortikalen Erregbarkeit mit der TMS ein. Unsere Probanden zeigten allerdings keine Unterschiede in ICI und ICF nach Supplementation von Homoarginin, sodass wir unter den von uns erzielten Wirkspiegeln keine Änderung der kortikalen Erregbarkeit feststellen konnten.

Auffällig war hingegen eine signifikante Veränderung der Blutglucose nach der vierwöchigen Einnahme von Homoarginin. Diese erhöhte sich von 76 ± 18 mg/dl auf 89 ± 20 mg/dl, wobei es sich hierbei um Nicht-nüchtern-Blutglucosewerte handelt, die sich zu beiden Zeitpunkten im Normbereich befanden. Auch die HOORN-Studie zeigte eine positive Korrelation zwischen Homoarginin und HbA1c, einem Wert, der auch als „Langzeit-Blutzucker“ bezeichnet wird. Dieser Effekt konnte in der LURIC-Studie jedoch nicht nachgewiesen werden (Atzler et al. 2015). In einer weiteren Studie mit adipösen Mäusen zeigte Homoarginin hingegen einen positiven Effekt auf den Glukosemetabolismus mit erhöhter Insulinausschüttung und niedrigeren Blutglucosewerten (Stockebrand et al. 2015). Insgesamt scheint Homoarginin also in den Glukose- und Insulinstoffwechsel einzugreifen, wobei seine Auswirkung noch unklar bleibt. Die Betrachtung der Ergebnisse unserer Studie legt die nähere Untersuchung der Erhöhung der Blutglucose als mögliche Nebenwirkung der Supplementation jedoch nahe.

Auch die Probanden selbst beschrieben vereinzelt Nebenwirkungen nach Einnahme der Kapseln. Diese wurden sowohl unter Homoarginin- als auch unter Placebo-Einnahme beschrieben, es lässt sich allerdings kein gehäuftes Auftreten einer bestimmten Nebenwirkung beobachten. Dennoch gilt es, diesen beschriebenen Effekten in weiteren Studien besondere Aufmerksamkeit zu schenken, um mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen des Homoarginins besser verstehen zu können.

Insgesamt hat die Studie gezeigt, dass es möglich ist, Homoarginin im Menschen zu supplementieren und dass 125 mg hierfür eine geeignete Dosis ist, denn wir erreichten so einen siebenfach höheren Plasmaspiegel von Homoarginin. Außerdem zeigten sich unter dieser Dosierung keine schwerwiegenden

Nebenwirkungen, sodass man davon ausgehen kann, dass es sich um eine sichere Dosis handelt. Man sollte in weiteren Studien dennoch ein besonderes Augenmerk auf die von den Probanden beschriebenen Nebenwirkungen, aber auch die Erhöhung der Blutglucose legen. Leider ließen sich bei unserem Untersuchungsaufbau nicht auch schon positive Effekte des Homoarginins hinsichtlich der Herz-Kreislauffunktion erkennen. Dies ist möglicherweise durch die geringe Probandenzahl zu begründen. Es zeigt aber auf jeden Fall, dass sich eine Investition in weitere Forschung zu diesem Thema lohnt. So können zum einen höhere Dosen bzw. kürzere Einnahmeintervalle untersucht werden. Zum anderen ist aber auch die Wirkung des Homoarginins in einem anderen Probandenkollektiv, besonders bei kardiovaskulär vorbelasteten Patienten, äußerst interessant.

2.5 Zusammenfassung

Homoarginin ist eine natürlich vorkommende Aminosäure, die man im Menschen in Konzentrationen von 2-3 $\mu\text{mol/l}$ findet. Sie wird vom Körper über die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) produziert, kann aber auch über die Nahrung zugeführt werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass niedrigere Homoarginin-Plasmakonzentrationen zu einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen führen und auch deren Schwere beeinflussen können. In dieser doppelblinden, Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie sollte daher die Möglichkeit, Homoarginin als Nahrungsergänzungsmittel einzusetzen, untersucht werden.

20 gesunde Probanden zwischen 21 und 60 Jahren nahmen für vier Wochen täglich 125 mg Homoarginin oder ein Placebo ein und wechselten nach vierwöchiger Auswaschphase auf das andere Präparat. Zuvor erfolgte außerdem eine Einzelgabe. So konnten die Plasmakonzentrationen nach Einmaldosis sowie im *steady state* untersucht werden. In den einzelnen Phasen fanden Blutuntersuchungen sowie Messungen der Vitalzeichen als Sicherheitsparameter statt, außerdem maßen wir den Einfluss des Homoarginins auf die Gefäßeigenschaften mittels Pulswellengeschwindigkeit (PWV), Augmentationsindex (AIx) und Flow-mediated vasodilation (FMD) sowie auf die kortikale Erregbarkeit mittels transkranieller Magnetstimulation (TMS).

Durch die einmalige Einnahme von Homoarginin erhöhte sich der Plasmaspiegel innerhalb von $1,15 \pm 0,54$ Stunden um durchschnittlich $8,74 \pm 4,46 \mu\text{mol/l}$. Nach der vierwöchigen Einnahme wurde eine um $17,3 \pm 4,97 \mu\text{mol/l}$ erhöhte Konzentration erreicht. Hinsichtlich aller dynamischen Endpunkte der Studie, nämlich der PWV, des AIx, der FMD und des TMS ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten feststellen.

Die Studie lieferte dennoch zwei wesentliche Erkenntnisse, die Gabe von 125 mg Homoarginin täglich erhöht die Plasmakonzentration in gesunden Probanden und sie ist gut verträglich. Der ausbleibende Effekt in den dynamischen Endpunkten kann mit der kurzen Einnahmepériode und auch der geringen Probandenzahl zusammenhängen; insgesamt ist aber bei gesunden Probanden wohl ohnehin nur ein geringerer Effekt zu erwarten.

2.6 Summary

L-homoarginine is a naturally occurring amino acid found in humans in concentrations of 2-3 $\mu\text{mol/l}$. It is built by the arginine:glycine amidinotransferase (AGAT), but it is also possible to get it via nutrition. Multiple studies have shown that lower concentrations of L-homoarginine result in a higher risk of cardiovascular diseases and that they influence the severity of them. In this double blind, placebo-controlled and randomised study we wanted to investigate the possibility of using L-homoarginine as a dietary supplement.

20 healthy test subjects between 21 and 60 years old took 125 mg L-homoarginine or a placebo daily for four weeks. After four weeks of washout-phase they changed to the other product. In addition they took one capsule of L-homoarginine in the beginning of the study. So at the end we had the possibility to investigate the plasma concentrations after a single dose as well as in steady state. In all phases we took blood samples and measured the vital parameters as safety parameters. Furthermore we measured the influence on the vessels via pulse wave velocity (PWV), augmentation index (Aix) and flow-mediated vasodilation (FMD) as well as on the cortical excitation via transcranial magnetic stimulation (TMS).

After a single dose of L-homoarginine the plasma concentration was increased averagely by $8.74 \pm 4.46 \mu\text{mol/l}$ in 1.15 ± 0.54 hours. After four weeks the plasma concentration was raised averagely on $17.3 \pm 4.97 \mu\text{mol/l}$. Concerning the dynamic endpoints, namely PWV, Aix, FMD and TMS, we did not find any significant differences between the test phases.

Nevertheless the study yielded two essential findings, a dose of 125 mg L-homoarginine daily increases the plasma concentration in healthy probands and it is well tolerated. The missing effect on the dynamic endpoints can be associated with the short period of intake and the small number of test subjects, overall a reduced effect in healthy probands can be expected anyway.

2.7 Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGAT	Arginin-Glycin-Amidino-transferase
Alx	Augmentationsindex
ao	aortal
AUC	Fläche unter der Kurve
ba	brachial-ankle
cf	carotid-femoral
C _{max}	Maximale Plasmakonzentration
FMD	Flow-mediated vasodilation
GHS	German Gutenberg Health Study
ICF	Intrakortikale Fazilitation
ICI	Intrakortikale Inhibition
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
LURIC	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study
MEP	Motorisch evozierte Potentiale
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PWV	Pulswellengeschwindigkeit
T _{max}	Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration
TMS	Transkranielle Magnetstimulation
4D-Studie	Die deutsche Diabetes Dialyse Studie

2.8 Literaturverzeichnis

Alesutan I, Feger M, Tuffaha R, Castor T, Musculus K, Buehling SS, Heine CL, Kuro-O M, Pieske B, Schmidt K, Tomaschitz A, Maerz W, Pilz S, Meinitzer A, Voelkl J, Lang F (2016) Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc Res.* 110(3):408-418.

Atzler D, Schwedhelm E, Choe CU (2015) L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 18(1):83-88.

Atzler D, Appelbaum S, Cordts K, Ojeda FM, Wild PS, Münzel T, Blankenberg S, Böger RH, Blettner M, Beutel ME, Pfeiffer N, Zeller T, Lackner KJ Schwedhelm E (2016) Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin Chem Lab Med.* 54(7):1231-1237.

Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Müller C, Lüneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ, Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E (2013) Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation.* 128(13):1451-1461.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R (2002) Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. *J Am Coll Cardiol.* 39(6):257-265.

Da Silva CG, Parolo E, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT (1999) In vitro inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain Res.* 838(1-2):78-84.

Davids M, Ndika JD, Salomons GS, Blom HJ, Teerlink T (2012) Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of

the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett.* 586(20):3653-3657.

Hou Y, Hu S, Jia S, Nawaratna G, Che D, Wang F, Bazer FW, Wu G (2016) Whole-body synthesis of L-homoarginine in pigs and rats supplemented with L-arginine. *Amino Acids.* 48(4):993-1001.

Hrabak A, Bajor T, Temesi A (1994) Comparison of substrate and inhibitor specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogues and related compounds in murine and rat macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 198(1):206-212.

März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Böhm BO, Ritz E, Wanner C (2010) Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation.* 122(10):967-975.

Moali C, Boucher JL, Sari MA, Stuehr DJ, Mansuy D (1998) Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry.* 37(29):10453-10460.

Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, Wanner C, Boehm BO, März W (2011) Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart.* 97(15):1222-1227.

Pilz S, Teerlink T, Scheffer PG, Meinitzer A, Rutters F, Tomaschitz A, Drechsler C, Kienreich K, Nijpels G, Stehouwer CD, März W, Dekker JM (2014) Homoarginine and mortality in an older population: the Hoorn study. *Eur J Clin Invest.* 44(2):200-208.

Rao SL (2011) A look at the brighter facets of beta-N-oxalyl-L-alpha,beta-diaminopropionic acid, homoarginine and the grass pea. *Food Chem Toxicol.* 49(3):620-622.

Reczkowski RS, Ash DE (1994) Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 312(1):31-37.

Schmitz M, Hagemeister H, Ebersdobler HF (1991) Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *J Nutr.* 121(10):1575-1580.

Stockebrand M, Hornig S, Neu A, Atzler D, Cordts K, Böger RH, Isbrandt D, Schwedhelm E, Choe CU (2015) Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids.* 47(9):1921-1927.

Valtonen P, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JS, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JS, Heiskanen N, Vanninen E, Punnonen K, Heinonen S (2008) Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilation. *Circ J.* 72(11):1879-1884.

Van der Zwan LP, Davids M, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CD, Teerlink T (2013) L-homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population: the Hoorn study. *J Hypertens.* 31(6):1114-1123.

3 Erklärung des Eigenanteils

Ich habe die Doktorarbeit im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Edzard Schwedhelm und PD Dr. Chi-un Choe durchgeführt.

Die Idee zur Studie sowie der erste Studienentwurf wurden von meinen Betreuern gemeinsam mit Dr. Dorothee Atzler entwickelt. An den Weiterentwicklungen bis zum fertigen Studienentwurf habe ich dann mitgearbeitet.

Wir einigten uns schon zu Beginn der Studie, dass mein Schwerpunkt später die Auswertung der dynamischen Endpunkte sei. Während der Datenerhebung betreute ich jedoch die ganze Studie. Ich übernahm die Organisation und Koordination der Termine für die Probanden, deren klinische Untersuchung sowie Durchführung und Erstellung der Fragebögen. Die Plasmaproben für die Kinetikanalysen wurden ebenfalls von mir gesammelt und verarbeitet. Außerdem führte ich die Messungen für die FMD nach Anleitung und Einarbeitung durch Dr. Daniel Appel sowie die TMS-Messungen nach Einarbeitung durch Dr. Julia Hoppe selbstständig durch. Die Datenerhebung für die PWV und Aix erfolgte im Rahmen der ersten Testmessungen für die Hamburg City Health Study durch die dortigen Studienmitarbeiter.

Die Analyse der FMD-Messungen sowie der Aix- und PWV-Untersuchung habe ich übernommen. Die Auswertung des TMS erbrachte ebenfalls ich nach Beratung von Dr. Julia Hoppe. Die Messung der Plasmaproben und Auswertung der Kinetikanalysen erfolgte durch Kathrin Cordts. Die statistischen Analysen sowohl der kinetischen als auch der dynamischen Untersuchungen erfolgte jeweils mit Unterstützung durch Prof. Dr. Edzard Schwedhelm.

Beim Verfassen des Manuskripts lag mein Schwerpunkt wie schon in der Auswertung auf den dynamischen Endpunkten. Ich habe den Teil des Studiendesigns sowie der dynamischen Analysen verfasst sowie die entsprechenden Abbildungen. Auch bei der zusammenfassenden Diskussion lag mein Fokus in der Darstellung der dynamischen Endpunkte. Die Kinetikanalysen sowie deren Auswertung und Darstellung erfolgte durch Dr. Dorothee Atzler und Kathrin Cordts. Die Einleitung erarbeiteten Dr. Dorothee Atzler und ich gemeinsam.

Diese zusammenfassende Darstellung der Publikation sowie die verwendeten Abbildungen wurden durch mich erstellt.

4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben, meinen besonderen Dank aussprechen. Für die Möglichkeit meine Arbeit im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie zu erstellen sowie für den wissenschaftlichen Austausch möchte ich mich beim Institutsdirektor Prof. Rainer H. Böger bedanken. Die herzliche Arbeitsatmosphäre im ganzen Institut hat zur Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Edzard Schwedhelm und meinem Betreuer PD Dr. Chi un Choe für den Anstoß zu dieser Arbeit und ihre Unterstützung, durch Ideen und Anregungen zur Durchführung und Ausgestaltung des Projektes, und nicht zuletzt für ihre wohlthuende Gelassenheit in stressigen Situationen bedanken.

Ich danke Dorothee Atzler, Kathrin Cordts und Eileen Mudersbach für die hilfreichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit in der Studie und die schönen gemeinsamen Pausen.

Anna Steenpaß und Mariola Kastner danke ich für die technische Unterstützung im Labor und die vielen aufmunternden Worte, wenn mal etwas nicht nach Plan lief.

Für meine Arbeit habe ich einige Untersuchungsmethoden erlernt und durchgeführt, dies wäre mir ohne die Hilfe und Geduld von Dr. Julia Hoppe, Gabriele Weineck und Dr. Daniel Appel sicher nicht so gelungen.

Mein Dank geht an das Team der Hamburg City Health Study für die Untersuchungen und Messungen, die dort für unsere Studie durchgeführt wurden.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Probanden, die sehr viel Zeit investiert haben, sich auf manche Abenteuer einlassen mussten und die mich trotzdem immer wieder mit guten und hilfreichen Gesprächen aufgebaut und vor Verzweiflung bewahrt haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Annette und Stephan Schönhoff beispielhaft für alle, die mir sehr nahe stehen, für die moralische Unterstützung und das Verständnis, das sie mir während dieser Zeit entgegen gebracht haben, danken.

5 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

6 Eidesstattliche Erklärung

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 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: