




MY DOK GmbH
z.Hd. Herrn Thomas Krug
Glückaufsegenstr. 86
44265 Dortmund



Tel.: (03 91) 67-1 30 60
Fax: (03 91) 67-1 30 62

Ihre Zeichen, Ihre Nachricht vom

Unsere Zeichen

 (03 91) 67-

Datum

25.09.2008

Abschlussbericht

Prüfung der Wirkungen von Haartonikum MY DOK auf den Arginin- und ADMA-Gehalt im menschlichen Haar

L-Arginin ist eine semiessentielle Aminosäure und das Substrat für das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), welches für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich ist. Es ist gezeigt worden, dass sowohl die akute als auch die chronische Gabe von L-Arginin die Endothelfunktion in Tiermodellen mit Hypercholesterinämie und Atherosklerose verbessern kann. Studien haben gezeigt, dass die diätetische Gabe von L-Arginin die NO-Bildung beim Menschen steigern kann und dadurch letztlich präventiv die Gefäßgesundheit verbessert werden kann. Mittlerweile gibt es vielversprechende Studienergebnisse mit intravenöser und oraler Gabe von L-Arginin beim Menschen, die ein breites Spektrum von Dosierungen, Studiendauer und Surrogatparametern für die Endothelfunktion widerspiegeln. L-Arginin hemmt die Blutplättchenaggregation, die Anlagerung von weißen Blutzellen an die Gefäßwand sowie das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen. L-Arginin spielt als eine basische, semiessentielle Aminosäure in vielen Gebieten der menschlichen Physiologie eine Rolle, die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), ein Schlüsselmolekül der Gefäßregulation, Immunaktivität und endokrinen Funktionen eingeschlossen. Arginin ist außerdem u.a. an der Proteinproduktion, Wundheilung und erektilen Funktion beteiligt. Es ist deshalb nicht als essentiell zu betrachten, da der

erwachsene menschliche Körper es de novo aus Glutamin, Glutamat und Prolin synthetisieren kann. Beim Erwachsenen erfolgt die Synthese aus Citrullin, ein Nebenprodukt des Glutamin-Metabolismus im Darm und in der Leber. Citrullin wird in den Kreislauf ausgeschieden und von der Niere reabsorbiert und dort wiederum zu L-Arginin konvertiert. Trotzdem bleibt die diätetische Zufuhr die primäre Determinante des Argininspiegels im Plasma, da die Argininbiosynthese eine inadäquate Zufuhr oder einen Mangel nicht ausgleichen kann.

Im Harnstoffzyklus, welcher der Ausscheidung nichtessentieller stickstoffhaltiger Verbindungen dient, wird L-Arginin durch das Enzym Arginase zu Ornithin und Harnstoff gespalten. Weiterhin erfolgt die Synthese von Creatin aus L-Arginin und L-Glycin als Substrat der Creatinkinase, die das Creatinphosphat synthetisiert.

Die Bedeutung der Aminosäure L-Arginin wurde jedoch erst 1980 durch die Erkenntnis unterstrichen, dass L-Arginin die Vorstufe der NO-Synthese bildet: die NO-Synthase katalysiert die 5-Elektron-Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und produziert dabei stöchiometrische Mengen von NO. Die Identifizierung von NO als aktives Wirkprinzip des von Furchgott entdeckten endothelialen relaxierenden Faktors konnte die Wirkungsweise der Nitrate durch exogene Bereitstellung von NO als muskelrelaxierendes Agens der erkrankten Blutgefäße aufklären. NO wird durch das Enzym NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. NO vermittelt protektive Funktionen des Endothels: es hemmt die Blutplättchenaggregation und

-adhäsion, es hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen, es hemmt die Adhäsion von Leukozyten durch Inhibition der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen. Zusammengefasst bedeutet dies, dass NO gebildet aus L-Arginin ein antiarteriosklerotisches Molekül ist.

Letztes Jahr konnte gezeigt werden, dass **L-Arginin, verwendet als Haartonikum**, über 12 Monate an 19 Teilnehmern bei 9 Teilnehmern eine steigende Haaranzahl und Haardichte während der Anwendung bewirkte. L-Arginin als Haartonikum ist bereits von Herrn Maindok patentiert (EP 20000106766).

Das Haartonikum enthält Propylenglykol, L-Arginin, Wasser und Ethanol und ist ein Kosmetikum.

Haarausfall verursacht psychologischen Stress und reduziert die Lebensqualität. Es ist allerdings festzustellen, dass bislang das Verständnis von der Funktion der Haarfollikel sehr begrenzt ist, und dass selbst Situationen wie androgener Haarausfall oder Alopecia areata bis heute kaum behandelbar sind. Ziel unserer Studie soll deshalb sein, festzustellen, wie

hoch der Anteil von L-Arginin im Haar ist und ob durch externe Anwendung des Haartonikums MyDok dieser Arginin-Gehalt beeinflussbar ist.

Bislang ist allerdings völlig unklar, auf welchem Wirkmechanismus die Wirkung von L-Arginin als Haarwuchsmittel beruht. Basierend auf dem oben skizzierten Mechanismus der Arginin-Wirkung wäre es allerdings denkbar, dass auch im Haar der endogene Hemmstoff der NO-Synthase zu detektieren ist, nämlich das asymmetrische Dimethylarginin ADMA.

Bildung und Abbau von ADMA

ADMA wird durch die Methylierung von Arginin in spezifischen Proteinen durch eine Gruppe von Enzymen (Proteinargininmethyltransferasen) gebildet und bei der Hydrolyse der Proteine freigesetzt.

Der gesunde Mensch bildet am Tag ca. 60 mg ADMA, 10 mg davon werden mit dem Urin ausgeschieden. Der enzymatische Abbau von ADMA erfolgt durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), und es ist sehr wahrscheinlich, dass die Erhöhung von ADMA durch eine eingeschränkte Aktivität der DDAH, wie sie beispielsweise bei erhöhtem oxidierten LDL oder Hyperhomozysteinämie beschrieben ist, bedingt ist. Ein rationaler therapeutischer Ansatz war daher, Patienten mit inadäquater Substratversorgung der NO-Synthase mit L-Arginin zu substituieren. Dieses therapeutische Paradigma wurde in den letzten Jahren mit Erfolg praktiziert. Deshalb ist es weiterhin Ziel der Studie, zu untersuchen, ob auch im Haar der endogene Hemmstoff der NO-Synthase, ADMA, nachzuweisen ist. Es ist denkbar, dass durch vermehrte Aufnahme von Arginin die Blutversorgung der Papille verbessert wird, möglicherweise durch kompetitive Verdrängung von ADMA an dem Enzym NO-Synthase.

Studienziel: Hauptziel dieser Studie war die Bestimmung von Arginin und ADMA im Haar von freiwilligen Personen. Diese Bestimmung wurde nach Anwendung des Haartonikums MyDok über 3 Wochen wiederholt. Die Studie sollte belegen, dass durch Anwendung des Haartonikums sich der Arginingehalt der Haare verändert.

Studienbegründung:

Auf dem Kosmetikmarkt befinden sich eine große Anzahl von Präparaten, für die propagiert wird, dass sie den Haarwuchs fördern. Nur für wenige ist der Wirkmechanismus bekannt. Diese Studie soll Hinweise darauf geben, ob sich der Arginin- und ADMA-Gehalt oder das Verhältnis der beiden Substanzen zueinander durch das Haartonikum Mydok beeinflussen lässt. In weiteren Studien sollte dann geklärt werden, ob im Haar auch die NO-Synthase zu detektieren ist und ob das Haartonikum zu einer Reduktion des oxidativen Stress mit Anti-Aging-Effekten führt.

Studienkollektiv und Studiendurchführung:

40 freiwillige Teilnehmer (20 Frauen, 20 Männer), von denen randomisiert 20 das Haartonikum mit L-Arginin und 20 das Haartonikum ohne L-Arginin bekamen (randomisierte, placebo-kontrollierte Studie). Vor Beginn der Applikation wurden ca. 10 mg Haare gewonnen. Die Applikation erfolgt zweimal täglich über 3 Wochen auf die Kopfhaut und wird ca. 1-2 Minuten gut einmassiert. Sie sollte nicht ausgespült werden. Am 21. Tag nach dem Auftragen des Haartonikums unter Aufsicht werden nach 45 Minuten wieder ca. 10 mg Haare gewonnen. An den letzten beiden Tagen der Anwendung und am Morgen der Haargewinnung nach Studienende durften die Haare nicht gewaschen werden.

Ausschlusskriterien: keine

Über einen Zeitraum von 12 Monaten erwies sich das Haartonikum MyDok als einwandfrei verträglich. Es wurde in keinem Fall über unerwünschte oder gar pathologische Haut- oder Haarveränderungen berichtet.

Alter, Größe, Gewicht, Haarstatus (gefärbt ja/nein), Frequenz des Haarewaschens wurden zu Studienbeginn erfasst.

Probengewinnung und Messung:

Die Haarentnahme erfolgte, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, primär über dem Hinterhauptshöcker (Ineon) des Probanden. War dies nicht möglich, wurde die Entnahmestelle entsprechend dokumentiert.

Die Haare wurden vor dem Abschneiden mit einem Faden, 2-3 cm von der Kopfhaut entfernt, fest zusammengebunden.

Die zusammengebundenen Haare wurden direkt an der Kopfhaut abgeschnitten.

Die entnommene Haarprobe wurde fest in Aluminiumfolie eingerollt und mit Tesafilm auf einem Briefbogen fixiert.

Die Probenbeschriftung mit Probenerkennung wurde auf dem Briefbogen vermerkt.

Die Haare wurden entsprechend für die Analytik aufbereitet. Danach erfolgte die Bestimmung von L-Arginin und ADMA mittels tandem-massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS).

Durchführung:

Alle Probanden schlossen die Studie ab. Nebenwirkungen wurden keine berichtet, lediglich ein „gewisses Kleben“ der Haare nach der Anwendung des Tonikums wurde beschrieben, einige Probanden wuschen deshalb die Haare öfter als üblich. Die Überprüfung nach der Entblindung ergab, dass dieser Effekt unabhängig vom Arginingehalt des Tonikums war, also war offensichtlich die Gundzusammensetzung des Tonikums dafür verantwortlich.

Beschreibung der Analytik von Arginin und ADMA aus Haarproben

Analytik von Arginin und ADMA in Haarproben:

Die Gehalte von Arginin und ADMA in Haarproben wurden mit einem validierten Verfahren auf der Basis von Hochleistungsflüssigchromatographie – Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durchgeführt. LC-MS/MS ist eine besonders leistungsfähige analytische Methode. Sie ermöglicht durch die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor in der Hochleistungs-Flüssigchromatographie eine besonders selektive Identifikation der zu bestimmenden Analyten. Dadurch wird es möglich, auch aus biologischen Matrices mit ihren komplexen Mischungen einer Vielzahl von biologischen Substanzen besonders präzise quantitative Bestimmungen von Analyten auch ohne extrem aufwendige Probenvorbereitung zu erstellen. Ein weiterer Vorteil ist die Benutzbarkeit von isotope markierten internen Standards, die die Präzision und Richtigkeit der analytischen Ergebnisse nochmals steigert.

Das hier verwendete Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Arginin und ADMA ist im internationalen wissenschaftlichen Journal *Clinical Chemistry* (J. MARTENS-LOBENHOFFER, S.M. BODE-BÖGER, FAST AND EFFICIENT DETERMINATION OF ARGININE, SYMMETRIC DIMETHYLARGININE, AND ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HYDROPHILIC-INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY, *CLIN. CHEM.* 52 (2006) 488-493) von uns veröffentlicht worden. Dieses Verfahren ist in der Lage, präzise quantitative Ergebnisse für Arginin und ADMA frei von Störungen durch andere endogenen Substanzen aus einer Vielzahl von biologischen Quellen zu bestimmen. Im Rahmen dieser Studie wurden die Kalibrierbereiche des Messverfahrens für Arginin (1600 – 16000 µmol/l) und ADMA (1 – 10 µmol/l) und die Probenvorbereitung auf die Verhältnisse in Haarproben angepasst und das Verfahren neu validiert.

Zur Probenvorbereitung wurden 8-12 mg Haar pro Proband und Datum eingewogen und die genaue Masse der Haarproben dokumentiert. Diese Haarproben wurden für 16 h in 1 ml 6M HCl bei 100°C in fest verschlossenen Polypropylenröhrchen zur Reaktion gebracht, um die Proteinstruktur der Haare aufzubrechen und die Aminosäuren inklusive Arginin und ADMA freizusetzen. In der Validierungsphase des Verfahrens konnte festgestellt werden, dass

freies Arginin wie auch freies ADMA die Reaktionsbedingungen ohne Zersetzung überstehen, so dass keine Verfälschungen der quantitativen Ergebnisse entstehen. Von den nach den oben beschriebenen Bedingungen erhaltenen Reaktionsgemischen wurden nach Abkühlung 10 μl abgenommen, mit Pufferlösung auf pH 4,5 gebracht und mit isotopenmarkierten internen Standards ($^{13}\text{C}_6$ -Arginin und $^2\text{D}_7$ -ADMA) und Acetonitril versetzt, um die Proben zur Injektion in das LC-MS/MS Gerät vorzubereiten.

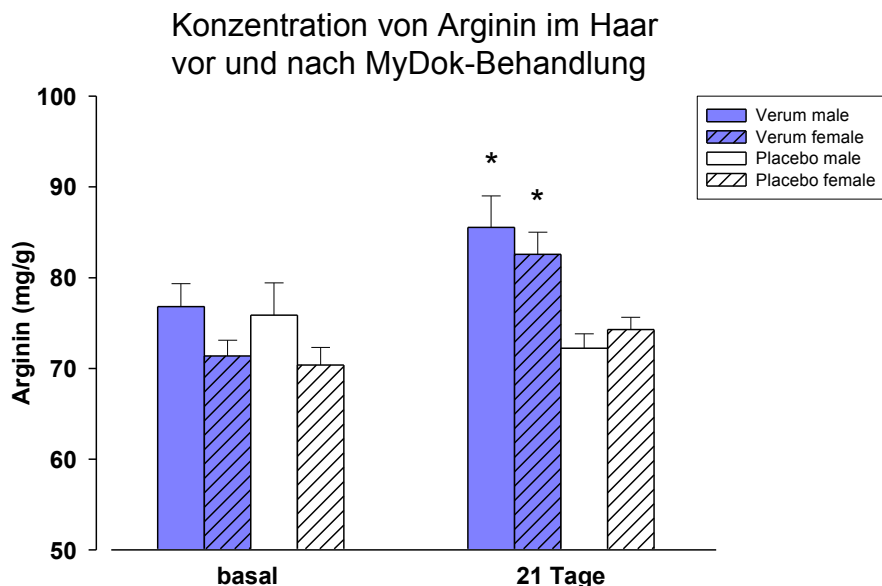
Aus den Messergebnissen, die in der Einheit $\mu\text{mol/l}$ anfielen, wurden durch Division durch die Masse der Haarproben in den Reaktionsgemischen und Multiplikation mit der molaren Masse von Arginin bzw. ADMA die endgültigen Ergebnisse in der Einheit mg/g Haar gewonnen. Diese wurden für die statistische Auswertung herangezogen. Die relativen Standardabweichungen der Messergebnisse wurden durch wiederholte Bestimmungen identischer Haarproben festgestellt und betragen für Arginin $\pm 4,56\%$ und für ADMA $\pm 6,75\%$.

Proband	Gruppe	Geschl.	Vor Beginn der Studie			Nach 21 Tagen		
			Arginin (nmol/g Haar)	(mg/g Haar)	(mol/mol ADMA)	Arginin (nmol/g Haar)	(mg/g Haar)	(mol/mol ADMA)
1	Placebo	m	421	73	968	459	81	901,00
3	Placebo	m	435	76	891	451	81	937,00
5	Placebo	m	596	104	883	436	70	929,00
7	Placebo	m	432	75	828	406	92	845,00
9	Placebo	m	457	80	889	403	78	942,00
11	Placebo	m	418	73	815	411	81	835,00
13	Placebo	m	419	73	888	409	65	933,00
15	Placebo	m	403	70	809	376	79	868,00
17	Placebo	m	436	76	847	426	76	978,00
19	Placebo	m	340	59	918	369	67	899,00
22	Placebo	w	449	78	846	435	80	953,00
24	Placebo	w	448	78	1007	480	81	1010,00
26	Placebo	w	429	75	784	424	70	860,00
28	Placebo	w	351	61	848	419	65	915,00
30	Placebo	w	368	64	1031	436	71	934,00
32	Placebo	w	390	68	818	412	70	879,00
34	Placebo	w	385	67	761	388	73	722,00
36	Placebo	w	386	67	805	427	74	907,00
38	Placebo	w	393	69	824	405	65	870,00
40	Placebo	w	442	77	1071	438	67	990,00
2	Verum	m	463	80	939	478	83	1011,00
4	Verum	m	463	79	812	491	86	994,00
6	Verum	m	399	76	837	504	88	1158,00
8	Verum	m	526	71	881	476	83	953,00
10	Verum	m	449	70	782	434	76	819,00
12	Verum	m	464	72	808	650	113	1065,00
14	Verum	m	371	71	768	455	79	1019,00
16	Verum	m	453	66	788	475	83	951,00
18	Verum	m	436	74	953	519	90	1195,00
20	Verum	m	385	64	828	429	75	946,00
21	Verum	w	458	76	864	476	83	976,00
23	Verum	w	463	84	817	464	81	902,00
25	Verum	w	400	74	889	580	101	1129,00
27	Verum	w	373	73	837	463	81	829,00
29	Verum	w	407	76	868	478	83	948,00
31	Verum	w	399	72	907	503	88	1011,00
33	Verum	w	419	68	744	452	79	945,00
35	Verum	w	423	74	856	467	81	1017,00
37	Verum	w	374	71	766	407	71	920,00
39	Verum	w	382	76	909	450	79	1081,00
Mittelwert	Verum		425	73	842,65	483	84	993,45
SD	Verum		41	5	58,86	54	9	97,96
Mittelwert	Placebo		420	73	876,55	421	74	905,35
SD	Placebo		53	9	84,56	27	7	64,04

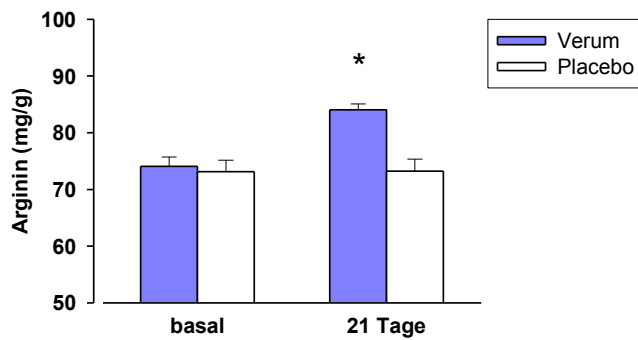
Statistische Auswertung

Alle 40 Probanden beendeten die Studie nach Protokoll. Alle entnommenen Proben konnten analysiert werden.

In der statistischen Analyse mittels Analyse mit Messwiederholungen (Innersubjektfaktor Zeit (basal; 21 Tage Behandlung); Intersubjektfaktor Behandlung (Placebo, Verum (Arginin) und Intersubjektfaktor Geschlecht (weiblich, männlich) ergab sich eine signifikante Zeit/Behandlungsinteraktion für die Konzentration von Arginin pro Gramm Haar ($F= 11,4$; $p=0,002$). Diese ist zurückzuführen auf einen signifikanten Anstieg der Argininkonzentration im Haar nur in der mit Arginin-behandelten Gruppe. In der Placebogruppe blieb die Argininkonzentration im Haar statistisch betrachtet konstant, bei den Männern zeigte sich ein Trend zum Abfallen der Argininkonzentration in der Placebogruppe (Zeit/Geschlechtsinteraktion $F= 2,96$; $p= 0,094$).

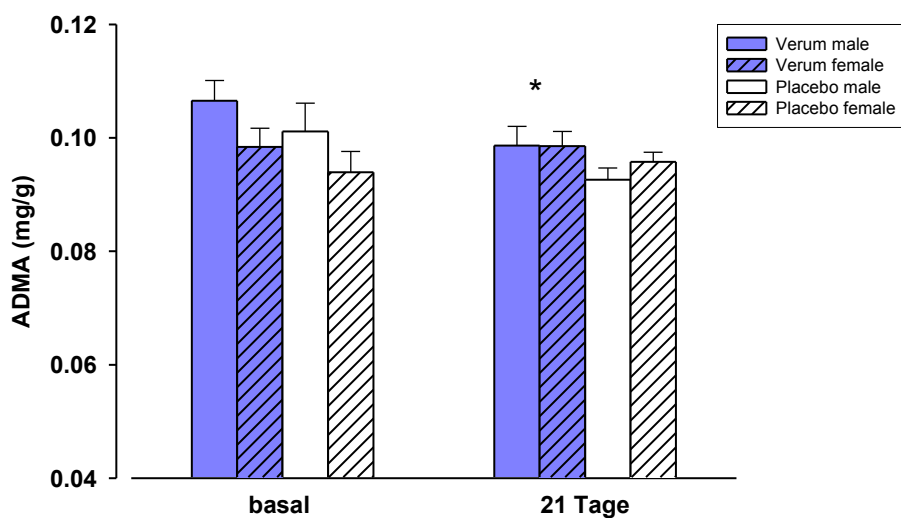


Arginin im Haar vor und nach MyDok

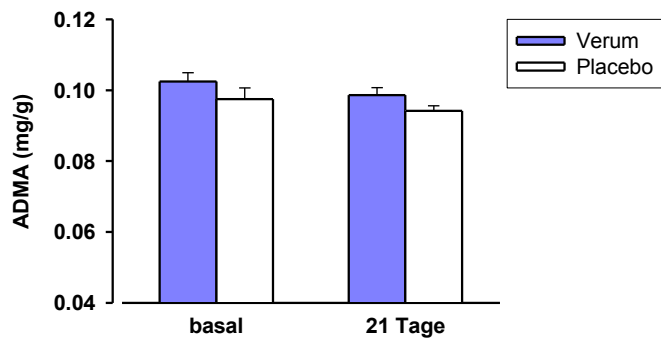


Der endogene Inhibitor der NO-Synthase ADMA blieb statistisch gesehen konstant. Hier ergab sich eine signifikante Zeit/Geschlechtsinteraktion ($F= 5,89$; $p=0,02$), die darauf zurückzuführen ist, dass die Haarwasserbehandlung bei Männern egal ob mit oder ohne Arginin zu einer signifikanten Abnahme der ADMA-Konzentration führt, während dieses bei Frauen nicht der Fall ist.

ADMA Konzentration im Haar

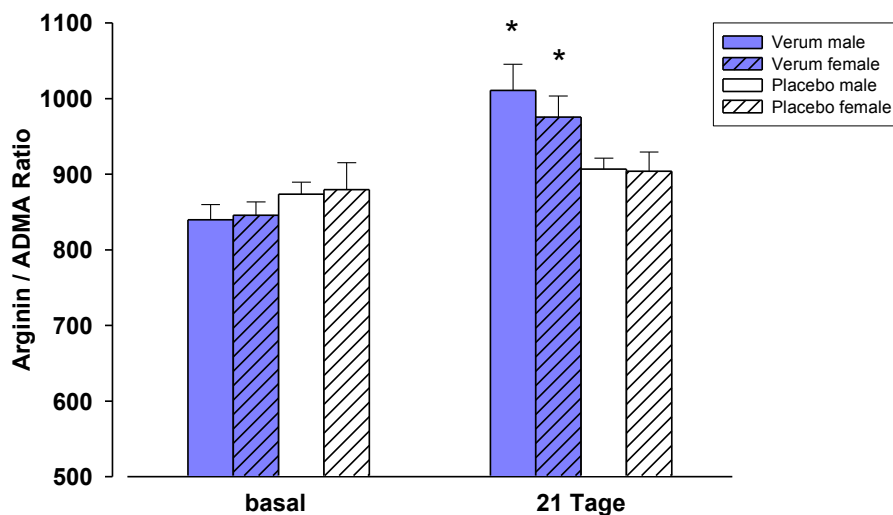


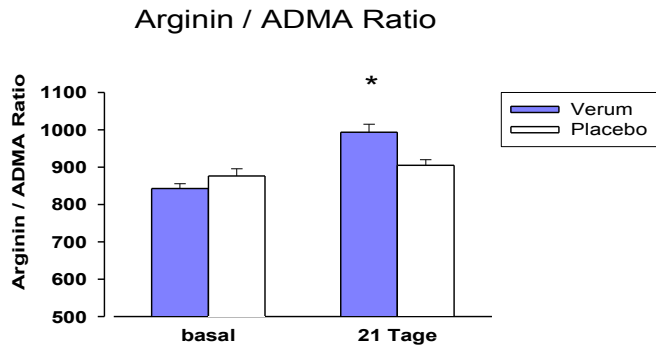
Konzentration von ADMA im Haar



Der therapeutisch bedeutsamste Parameter ist die Arginin/ADMA-Ratio, die das Verhältnis über Substratangebot und Inhibitor (ADMA) an der NO-Synthase beschreibt. Hier zeigte sich eine extrem große Zeit / Behandlungsinteraktion ($F= 26,6!$; $p<0,0001$). Bei den Männern wurde eine 20%ige Steigerung der Arginin/ADMA-Ratio erreicht, bei den Frauen um 15%. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant, d.h. dass Männer und Frauen gleichermaßen profitieren.

Arginin / ADMA Ratio





Beurteilung:

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass durch Anwendung des Haartonikums MyDOK der Arginingehalt in den Haaren der Testpersonen signifikant gesteigert werden konnte. Nach Behandlung mit dem Haartonikum ohne Arginin aber mit der gleichen Zusammensetzung der Zusatzstoffe wurde keine signifikante Änderung des Arginingehalts beobachtet. Dies ist unseres Erachtens erstmals der Hinweis für ein Haarwuchsmittel, dass der Protein bzw. Aminosäuregehalt beeinflusst werden konnte. Somit konnte durch Anwendung von MyDOK ein analytisch detektierbarer Effekt im Haar nachgewiesen werden.

Von besonderer Bedeutung ist jedoch, dass es uns erstmals gelungen ist, den endogenen kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase, nämlich asymmetrisches Dimethylarginin, im Haar zu detektieren. Über diesen Inhibitor wird die Aktivität der NO-Synthase u.a. reguliert. Es ist denkbar, dass durch vermehrte Aufnahme von Arginin die Blutversorgung der Papille verbessert wird, möglicherweise durch kompetitive Verdrängung von ADMA an dem Enzym NO-Synthase. Somit würde vermehrt NO gebildet, welches letztlich den Haarwuchs verbessern könnte. Die Arginin / ADMA Ratio ist somit als sehr guter Parameter anzusehen, der die Situation an der NO-Synthase mit Bezug auf Arginin und ADMA am besten beschreibt. In weitergehenden Studien müsste zunächst *in vitro* geklärt werden, wie sich die Aktivität und Expression der NO-Synthase im Haarfollikel verhält und wie diese durch Arginin modifiziert werden könnte.

We could show for the first time in this study that the application of the hair tonic MY DOK significantly increased the concentration of L-arginine in human volunteers. Application of the hair tonic with the same chemical composition but without L-arginine did not change the L-arginine concentration significantly. To our point of view this is the first hint for a hair restorer influencing the protein and ADMA content, respectively. Consequently, an analytically detectable effect of My DOK could be verified in hair.

Moreover, of particular importance is the fact that we were able to detect the competitive inhibitor of the NO synthase, asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with analytical procedures in human hair for the first time. This competitive inhibitor regulates the activity of the NO synthase amongst other factors. It is quite possible that an increased incorporation of L-arginine improves the blood supply of the hair papilla by competitive displacement of ADMA with respect to the enzyme NO synthase. Thus, more NO could be synthesized possibly improving the growth of hair. The L-arginine/ ADMA ratio could be regarded as a suitable parameter describing the situation of the NO synthase regarding substrate provision. Further in vitro studies are needed to evaluate the activity and expression of the NO synthase in the hair follicle and their modification by L-arginine.

Prof. Dr. S.M. Bode-Böger

Literatur:

Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther.* 2007;114:295-306

Scalera F, Borlak J, Beckmann B, Martens-Lobenhoffer J, Thum T, Träger M, Bode-Böger SM. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1816-1822.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2006;52:488-493

Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine. The über Marker? *Circulation.* 2004;109:1813-1819