

**Menopause,
menopausal therapies
and
asymmetric dimethylarginine,
an emerging cardiovascular risk factor**

Marieke O. Verhoeven



**Menopause,
menopausal therapies
and
asymmetric dimethylarginine,
an emerging cardiovascular risk factor**

Marieke O. Verhoeven

The studies carried out in this thesis were performed at the Departments of Obstetrics and Gynaecology, and Clinical Chemistry, Institute for Cardiovascular Research-Vrije Universiteit, VU University Medical Center, Amsterdam.

Parts of this work were supported by the Netherlands Heart Foundation (grant 95.201), Biocare Foundation (grants 96.21, 96.312, 97.31, 99.315, 01.049, and 02.60), Schering AG (grant 96.083), Hoechst Marion Roussel/Wyeth Ayerst International, Eli Lilly and Company, Recherches Internationales Servier, and Numico Research BV.

This thesis is typeset in L^AT_EX by NEL.

VRIJE UNIVERSITEIT

**Menopause, menopausal therapies and asymmetric
dimethylarginine, an emerging cardiovascular risk factor**

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad Doctor aan
de Vrije Universiteit Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus
prof.dr. L.M. Bouter,
in het openbaar te verdedigen
ten overstaan van de promotiecommissie
van de faculteit der Geneeskunde
op donderdag 19 april 2007 om 15.45 uur
in de aula van de universiteit,
De Boelelaan 1105

door

Marieke Oda Verhoeven

geboren te Amsterdam

promotor: prof.dr. P. Kenemans
copromotoren: dr. M.J. van der Mooren
dr. T. Teerlink

Contents

Summary	3
Nederlandse samenvatting	9

Summary



This thesis evaluates the relationship between endogenous or exogenous oestrogen or oestrogen-related substances and asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase (NOS) inhibitor and arterial disease risk marker, in middle-aged women. The effect of endogenous oestrogens was investigated in a longitudinal study of women going through the menopausal transition, in a case-control study in which postmenopausal women were compared with age-matched premenopausal women and in a study of women with a surgical menopause. In five randomised clinical trials, the effects of oral and non-oral oestrogen therapies as well as oral oestrogen therapy combined with a progestogen and oestrogen-related substances on ADMA concentrations were investigated. Concentrations of ADMA, arginine and symmetric dimethylarginine (SDMA) were measured by high-performance liquid chromatography in all studies described in this thesis.

Background

Arterial disease is the main cause of death in the industrialised countries. Pre-menopausal women have lower arterial disease incidence than men of the same age. After the menopause, the risk for arterial disease increases rapidly in women. Possibly, a strong reduction in oestrogen production after the menopause plays an important role in this acceleration of the arterial disease risk in women. Observational studies indicated that the use of oestrogen therapy alone or combined with a progestogen (both will further be referred to as hormone therapy (HT)) could protect postmenopausal women from this increase in arterial disease risk. However, large randomised placebo-controlled trials reported no cardiovascular benefit of long-term oral HT use, and possibly even an early increase of arterial disease risk in late postmenopausal women. The effects of HT in early postmenopausal women as well as the effects of non-orally administered HT on arterial disease risk in postmenopausal women are still unclear.

Studies with large numbers of women are needed to study the influence of endogenous or exogenous oestrogens on hard clinical arterial disease endpoints such as myocardial infarction and stroke. An interesting alternative could be to investigate the influence of oestrogens on arterial disease risk markers instead. Many of these risk markers are related to different processes involved in the pathogenesis of arterial disease, such as coagulation, lipid metabolism, endothelial function, inflammation and oxidation.

Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator produced by the endothelium. A reduced NO availability has been suggested to play a role in the development of

arterial disease. ADMA, an endogenously produced methylated form of arginine, inhibits the enzyme NOS, resulting in low NO concentrations. High blood levels of ADMA have been associated with increased risk of cardiovascular events and mortality risk in specific patients populations. Male participants dominated most of these study populations.

From the available literature, a link between oestrogens and ADMA can be inferred. However, the influence of menopause on ADMA concentrations in women is not clear and reports on the effect of HT on ADMA concentrations in postmenopausal women are scarce. Therefore, this thesis addressed the following question: Do menopause, HT and alternatives for HT modify ADMA concentrations in middle-aged women?

ADMA and menopause

The changes in ADMA concentrations resulting from a physiological and a surgical menopause are evaluated in Chapter 2. In a longitudinal study, women were examined annually from two years before until two years after physiological menopause, and in a case-control study, postmenopausal women were compared with age-matched premenopausal women. Surgical menopause effects were investigated in women undergoing a prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy. The following parameters were measured: serum concentrations of oestradiol, follicle-stimulating hormone (FSH), inhibin A, inhibin B, ADMA, lipids, leptin, homocysteine, C-reactive protein (CRP) and coenzyme Q10. Length and weight were measured as well, and the body mass index was calculated.

After the physiological and surgical menopause, serum oestradiol and inhibin A and B decreased, whereas FSH increased. Serum ADMA, total and low-density lipoprotein (LDL-)cholesterol and leptin concentrations were significantly higher in postmenopausal women compared to premenopausal women and serum homocysteine increased during the menopausal transition. Furthermore, total and LDL-cholesterol increased after the surgical menopause as well. None of the other parameters was influenced statistically significantly by the menopausal transition.

In conclusion, the arterial disease risk profile is affected unfavourably by menopause. Changes in most arterial disease risk markers were small, despite substantial changes in the hormonal parameters studied.

ADMA and oral oestrogen-only or combined oestrogen-progestogen therapy

In Chapter 3 the effects of short-term oral HT on ADMA, arginine and SDMA were investigated in a prospective, randomised, placebo-controlled 12-week study. Healthy postmenopausal women received daily placebo or oral 17β -oestradiol, either unopposed or sequentially combined with dydrogesterone or trimegestone. Fasting plasma concentrations of ADMA, arginine and SDMA were measured at baseline and after four and twelve weeks.

ADMA concentrations reduced in all active treatment groups. Compared to baseline and placebo, the largest reduction in ADMA levels was observed after 17β -oestradiol combined with trimegestone (-18.7% and -21.1% at four and twelve weeks, respectively). At four and twelve weeks, this combination significantly reduced arginine concentrations as well (-30.9% and -36.3%, respectively). SDMA

concentrations were significantly lower after 17β -oestradiol combined with dydrogesterone after twelve weeks (-11.6%).

In conclusion, oral 17β -oestradiol, either alone or combined with dydrogesterone or trimegestone, reduced plasma levels of the NOS inhibitor ADMA. The largest reduction was seen after 17β -oestradiol combined with trimegestone. Whether the reduction of the NOS substrate arginine in the group receiving 17β -oestradiol combined with trimegestone counteracts the potentially beneficial effect of ADMA reduction or only reflects increased NO production remains to be investigated.

In Chapter 4, the effects of oral unopposed 17β -oestradiol versus 17β -oestradiol continuously combined with gestodene were investigated in a placebo-controlled, double-blind study. The study duration was 13 (28-day) cycles and fasting plasma concentrations of ADMA, arginine and SDMA were measured at baseline and in treatment cycles four and 13.

Unopposed oral 17β -oestradiol reduced ADMA concentrations with 7.7% and combined therapy reduced ADMA concentrations by 7.5% compared with placebo after 13 cycles. Both treatment regimens significantly reduced arginine concentrations compared to placebo as well. Only unopposed 17β -oestradiol treatment significantly reduced SDMA concentrations. In summary, adding gestodene to oral 17β -oestradiol did not modify the reduction in ADMA concentrations seen with 17β -oestradiol alone therapy.

The effect of an oral combination of 17β -oestradiol and norethisterone acetate on ADMA concentrations was investigated as well (Chapter 5). The oral combination reduced ADMA concentrations with 7%. This decrease was similar to the decrease found with 17β -oestradiol alone (Chapter 3 and 4) and 17β -oestradiol combined with dydrogesterone (Chapter 3) and gestodene (Chapter 4). Both these progestogens did not modify the ADMA-reducing effect of 17β -oestradiol. Possibly, norethisterone acetate also does not change the ADMA-reducing effect of oestrogen as well.

ADMA and route of HT administration

In the same study as described in Chapter 4, the effects of transdermal versus oral 17β -oestradiol on ADMA concentrations were also investigated. After oral 17β -oestradiol administration a significantly larger reduction in ADMA concentration was observed than after transdermal administration. Oral, but not transdermal treatment, significantly reduced arginine and SDMA concentrations compared to placebo.

The difference in influence of intranasal versus oral 17β -oestradiol combined with norethisterone (acetate) on ADMA concentrations in postmenopausal women was investigated in a study reported in Chapter 5. In a randomised, double-blind, comparative study, healthy postmenopausal women daily received intranasally or orally administered 17β -oestradiol combined with norethisterone (acetate), in comparable dosages. At baseline, week twelve and 52, fasting plasma concentrations of ADMA, arginine and SDMA were measured.

ADMA concentrations reduced with 7.4% after oral administration, while after intranasal administration no effect (0.8%) was observed after 52 weeks. In both groups, arginine decreased transiently by approximately 6% compared to baseline at week twelve. Only oral administration reduced SDMA concentrations. Therefore,

the two studies of Chapters 4 and 5 provide evidence that both transdermally and intranasally administered HT are not as effective in reducing ADMA and SDMA concentrations as orally administered HT.

ADMA and alternatives for HT

Chapter 6 discusses the effects of a supplement containing soy isoflavones and *Actaea racemosa L.* on several arterial disease risk markers in menopausal women. In a randomised, placebo-controlled, double-blind study, menopausal women received daily either placebo or a supplement containing soy isoflavones and *Actaea racemosa L.* for twelve weeks. Fasting concentrations of ADMA, lipids and CRP were measured at baseline and week twelve.

In the supplement group, total cholesterol and LDL-cholesterol showed a small reduction at week twelve (both -0.2 mmol/l). Concentrations of ADMA, arginine, SDMA, triglycerides, lipoprotein(a) and CRP did not change significantly. After the 12-week study period, none of the parameters investigated revealed significant between-group differences.

Therefore, twelve weeks of administration of a supplement containing soy isoflavones and *Actaea racemosa L.* had little or no influence on the arterial disease risk markers studied. This supplement probably has neither protective nor adverse effects on the cardiovascular system, however, large long-term studies are needed to confirm this.

In addition, in Chapter 7 in the same women described in Chapter 6 we investigated the influence of the supplement intervention on menopausal symptoms as well. The modified Kupperman Index, the Greene Climacteric Scale, a visual analogue scale designed to measure quality of life and the daily number and severity of hot flushes, were evaluated at screening and at weeks six and twelve.

At weeks six and twelve, all scores in both groups had improved compared with baseline, though the overall difference in scores between the groups was not statistically significant. Therefore, the supplement containing soy isoflavones and *Actaea racemosa L.* had no additional effect compared with placebo on menopausal symptoms in women experiencing at least five vasomotor symptoms per day.

The short-term effects of three different doses of the SERM HMR 3339 in comparison with placebo and raloxifene on ADMA, arginine and SDMA concentrations are described in Chapter 8. In a randomised, placebo-controlled, double-blind, dose-ranging study, healthy postmenopausal women received daily either placebo, HMR 3339 2.5 mg, HMR 3339 10 mg, HMR 3339 50 mg, or raloxifene 60 mg for twelve weeks. Fasting plasma concentrations of ADMA, arginine and SDMA were measured at baseline and after four and twelve weeks.

HMR 3339 induced a dose-dependent reduction of ADMA and SDMA concentrations, with the largest effects in the HMR 3339 50 mg group compared to baseline and placebo (at twelve weeks: -7.0%, for ADMA and -16.2%, for SDMA). Twelve weeks of raloxifene 60 mg significantly reduced SDMA but not ADMA concentrations. Arginine concentrations were not changed by any treatment. These results suggest that HMR 3339 may have a potentially beneficial effect on the cardiovascular system by reducing the NOS inhibitor ADMA in postmenopausal women.

Conclusion

The results of the present thesis are discussed in Chapter 9. In this same chapter, briefly is speculated upon the implications for the clinical practice of these results and some suggestions are made for future research. Both endogenous and exogenous oestrogens as well as the SERM HMR 3339 reduced ADMA concentrations in healthy middle-aged women. Adding the progestogen trimegestone to oral oestrogen therapy augmented the oestrogen-induced ADMA reduction, whereas adding dydrogesterone or gestodene to oral oestrogen therapy did not modify this reduction in ADMA concentrations. In addition, norethisterone acetate did not seem to modify the oestrogen-induced ADMA reduction. Neither transdermally nor intranasally administered HT was as effective in reducing ADMA and SDMA concentrations as orally administered HT. Also, neither soy isoflavones combined with *Actaea racemosa L.*, nor the SERM raloxifene modified ADMA concentrations.

There is a clear relation between endogenous oestrogen concentrations as well as oestrogen therapy and ADMA concentrations. Higher oestrogen concentrations coincide with lower ADMA concentrations. The clinical implications of this relation between oestrogens or oestrogen-related substances and ADMA concentrations remain unclear and the mechanisms underlying the oestrogen-induced ADMA reductions are not fully understood. Future research should focus on these two aspects of the relationship between oestrogens and ADMA in women.

Nederlandse samenvatting



In dit proefschrift wordt de relatie tussen endogene oestrogenen of exogene oestrogenen of oestrogeen verwante stoffen en asymmetrisch dimethylarginine (ADMA), een endogene stikstofoxide synthase (NOS) remmer en een hart- en vaatziekten (HVZ) risicomarker onderzocht in vrouwen van middelbare leeftijd. Het effect van endogene oestrogenen wordt onderzocht in drie verschillende studies, een longitudinale studie waarin vrouwen gevolgd worden van pre- naar postmenopauzaal, een case-controle studie waarin postmenopauzale vrouwen worden vergeleken met premenopauzale vrouwen van gelijke leeftijd en een studie van vrouwen met een chirurgische menopauze. In vijf gerandomiseerde klinische studies worden de effecten van oraal en niet-oraal toegediende oestrogeen therapieën en orale oestrogeen therapie gecombineerd met een progestageen en oestrogeen verwante stoffen op ADMA concentraties onderzocht. ADMA, arginine en symmetrisch dimethylarginine (SDMA) concentraties zijn in alle studies van dit proefschrift gemeten door middel van high-performance liquid chromatography.

Achtergrond

HVZ vormen de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld. Premenopauzale vrouwen hebben een lager risico op HVZ dan mannen van dezelfde leeftijd. Na de menopauze stijgt de kans op HVZ snel bij vrouwen. De daling in oestrogeen concentraties in het bloed na de menopauze speelt mogelijk een belangrijke rol in deze versnelde toename van het HVZ risico. Observatieve studies suggererden dat oestrogeen therapie alleen of gecombineerd met een progestageen (naar beide wordt verder verwezen met hormoontherapie (HT)) postmenopauzale vrouwen zouden kunnen beschermen tegen de versnelde toename van het risico van HVZ na de menopauze. Grote gerandomiseerde placebo-gecontroleerde studies lieten echter geen preventief (en mogelijk zelfs een vroeg optredend nadelig) effect op HVZ zien bij langdurig gebruik van orale HT door vrouwen die al langere tijd postmenopauzaal waren. De effecten van HT op het HVZ risico bij vrouwen in de overgang die nog maar kort postmenopauzaal zijn is echter niet duidelijk. Ook het effect van niet-orale toedieningsvormen van HT op het risico van HVZ bij postmenopauzale vrouwen is nog niet opgehelderd.

Grootschalige studies zijn nodig om de invloed van endogene en exogene oestrogenen op harde klinische eindpunten van HVZ zoals myocardinfarct en beroerte te onderzoeken. Een interessant alternatief wordt gevonden in de bestudering van de invloed van oestrogenen op risicomarkers voor HVZ. Vele van deze risicomarkers zijn gerelateerd aan een of meer processen die geassocieerd worden met HVZ,

zoals stolling, vetmetabolisme, endotheelfunctie, ontstekingsreacties en oxidatieve processen.

Stikstofdioxide (NO) is een stof die geproduceerd wordt door het endotheel en heeft een sterk vaatverwijdend effect. Er wordt verondersteld dat lage NO concentraties in het bloed een belangrijke rol spelen in het ontstaan van HVZ. ADMA is een endogeen geproduceerde gemethyleerde vorm van arginine, die het enzym NOS remt, wat resulteert in lagere NO concentraties. Hoge ADMA concentraties zijn geassocieerd met een verhoogd HVZ risico en een verhoogde mortaliteit in diverse patiëntenpopulaties. Deze populaties bestonden echter voornamelijk uit mannelijke participanten.

Studie van de wetenschappelijke literatuur suggereert een mogelijk verband tussen oestrogenen en ADMA. Er zijn echter tot nu toe geen studies gepubliceerd die het effect van menopauze op ADMA concentraties in vrouwen hebben onderzocht en het effect van oestrogeen therapie op ADMA concentraties in vrouwen is zelden beschreven. Daarom zal er in dit proefschrift gepoogd worden een antwoord te geven op de volgende vraag: kunnen menopauze, HT en alternatieven voor HT ADMA concentraties beïnvloeden in vrouwen van middelbare leeftijd?

ADMA en menopauze

De veranderingen in ADMA concentraties na de fysiologische en chirurgische menopauze worden geëvalueerd in Hoofdstuk 2. In een longitudinale studie werden vrouwen jaarlijks onderzocht vanaf twee jaar voor de fysiologische menopauze tot twee jaar erna. In een case-controle studie werden postmenopauzale vrouwen met een fysiologische menopauze in de voorgeschiedenis vergeleken met premenopauzale vrouwen van dezelfde leeftijd. De chirurgische menopauze werd onderzocht in vrouwen die een profylactische bilaterale salpingo-oophorectomie hadden ondergaan. De volgende markers werden gemeten: serum concentraties van oestradiol, follikel stimulerend hormoon (FSH), inhibine A, inhibine B, ADMA, lipiden, leptine, homocysteïne, C-reactief proteïne (CRP), en coënzym Q10. Het gewicht en de lengte werden gemeten, waaruit de body mass index werd berekend.

Na fysiologische en chirurgische menopauze daalden de serum concentraties van oestradiol en inhibine A en B terwijl de FSH concentratie steeg. Serum ADMA, totaal en low-density lipoproteïne (LDL-)cholesterol en leptine concentraties waren significant hoger in postmenopauzale vrouwen dan in premenopauzale vrouwen en serum homocysteïne steeg tijdens de overgangperiode. Verder stegen het totaal en LDL-cholesterol ook na de chirurgische menopauze. Geen van de andere risicomarkers werd statistisch significant beïnvloed door de menopauze.

Uit deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat het HVZ risicomarker profiel ongunstig beïnvloed wordt door de menopauze. De veranderingen in de meeste risicomarkers waren echter klein, terwijl er substantiële veranderingen in de hormoonspiegels waarneembaar waren.

ADMA en oraal oestrogeen al dan niet gecombineerd met een progestageen

In Hoofdstuk 3 worden de effecten van korte termijn behandeling met orale HT op ADMA, arginine en SDMA concentraties beschreven van een prospectief, gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde, twaalf weken durende studie. Gezonde

postmenopauzale vrouwen kregen dagelijks óf placebo, óf oraal 17β -oestradiol zonder een progestageen, óf oraal 17β -oestradiol sequentieel gecombineerd met dydrogesteron of trimegeston. ADMA, arginine en SDMA concentraties werden gemeten in nuchter afgenomen plasma op baseline en na vier en twaalf weken.

ADMA concentraties daalden in alle groepen behalve in de placebo groep. De grootste daling in ADMA concentraties werd gevonden na behandeling met 17β -oestradiol gecombineerd met trimegeston (-18,7% na vier weken en -21,1% na twaalf weken) in vergelijking met baseline en de placebo behandeling. Dezelfde behandeling verlaagde ook de arginine concentraties na vier en twaalf weken (30,9% en -36,3%, respectievelijk). Na twaalf weken daalden de SDMA concentraties in de groep die behandeld werd met 17β -oestradiol gecombineerd met dydrogesteron (-11,6%).

Dus oraal 17β -oestradiol, alleen of gecombineerd met dydrogesteron of trimegeston, verlaagde de plasma concentraties van de NOS remmer ADMA. De grootste daling werd gezien na de combinatie van 17β -oestradiol met trimegeston. Of de door de combinatie van 17β -oestradiol met trimegeston veroorzaakte daling in arginine, het substraat van NOS, een mogelijk gunstig effect op ADMA concentraties tegenwerkt of dat het alleen maar een stijging van de NO productie weerspiegelt, moet verder worden onderzocht.

In Hoofdstuk 4 wordt het effect van oraal 17β -oestradiolnalleen vergeleken met een combinatie van 17β -oestradiol met gestodeen in een placebo-gecontroleerde, dubbel-blinde studie. De studie duurde 13 cycli (van 28-dagen). Nuchtere plasma concentraties van ADMA, arginine en SDMA werden gemeten op baseline en tijdens de vierde en 13e cyclus.

Oraal 17β -oestradiol alleen verlaagde ADMA concentraties met 7,7% en de combinatie behandeling verlaagde ADMA concentraties met 7,5% in vergelijking met baseline en placebo na 13 cycli. Beide behandelingen verlaagden ook de arginine concentraties significant in vergelijking met placebo. De SDMA concentraties werden alleen verlaagd door 17β -oestradiol zonder gestodeen. Samenvattend, de behandeling met de combinatie van 17β -oestradiol met gestodeen had geen ander effect op ADMA concentraties dan de behandeling met 17β -oestradiol alleen.

Tot slot wordt in Hoofdstuk 5 het effect van oraal 17β -oestradiol gecombineerd met norethisteron acetaat op ADMA concentraties beschreven. Na 52 weken behandeling met deze combinatie werd een ongeveer even grote daling gezien in ADMA concentraties als werden gevonden met 17β -oestradiol alleen (Hoofdstukken 3 en 4) of met 17β -oestradiol gecombineerd met dydrogesteron (Hoofdstuk 3) of met gestodeen (Hoofdstuk 4). Deze beide progestagenen hadden geen invloed op het effect van 17β -oestradiol op ADMA concentraties. Het is waarschijnlijk dat het toevoegen van norethisteron acetaat aan 17β -oestradiol therapie geen ander effect op ADMA concentraties heeft dan 17β -oestradiol alleen.

ADMA en verschillende toedieningsvormen voor HT

In dezelfde studie die beschreven wordt in Hoofdstuk 4, werd ook het effect van transdermale toediening vergeleken met orale toediening van 17β -oestradiol. Na orale toediening werd een grotere daling in ADMA concentraties gezien dan na transdermale toediening. Oraal 17β -oestradiol verlaagde de SDMA concentraties in vergelijking met placebo, terwijl transdermale 17β -oestradiol toediening geen effect had.

Het verschil in invloed op ADMA concentraties van intranasaal 17β -oestradiol gecombineerd met norethisteron (acetaat) ten opzichte van de orale toedieningsvorm van dezelfde combinatie wordt beschreven in Hoofdstuk 5. Gezonde postmenopauzale vrouwen kregen dagelijks intranasaal of oraal een combinatie van 17β -oestradiol met norethisteron (acetaat) in vergelijkbare doses in een gerandomiseerde, dubbel-blinde studie. Nuchtere plasma ADMA, arginine en SDMA concentraties werden gemeten op baseline, week twaalf en week 52.

Na 52 weken waren ADMA concentraties gedaald met 7,4% met orale 17β -oestradiol toediening, terwijl met intranasale 17β -oestradiol toediening geen effect gezien werd (0,8%). Na twaalf weken waren arginine concentraties kortdurend gedaald in beide groepen met ongeveer 6% in vergelijking tot baseline. Oraal 17β -oestradiol met norethisteron acetaat verlaagde ook de SDMA concentraties.

De resultaten van deze studies duiden erop dat zowel de transdermale als de intranasale toediening van HT minder effectief zijn in het verlagen van ADMA en SDMA concentraties dan de orale toedieningsvorm.

ADMA en alternatieven van HT

Hoofdstuk 6 gaat over de effecten van een supplement dat zowel soja isoflavonen als *Actaea racemosa L.* bevat op enkele HVZ risicomarkers in symptomatische vrouwen in de overgang. Vrouwen kregen twaalf weken lang dagelijks placebo of een supplement dat soja isoflavonen en *Actaea racemosa L.* bevat in een gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde, dubbel-blinde studie. ADMA, lipiden en CRP concentraties werden gemeten op baseline en in week twaalf in nuchter afgenomen bloedmonsters.

In de groep die het supplement kreeg werd een kleine daling gezien in totaal en LDL-cholesterol na twaalf weken (beide -0,2 mmol/L). Concentraties van ADMA, triglyceriden, lipoproteïne(a) en CRP veranderden niet. Na twaalf weken suppletie werd er geen verschil gevonden tussen de placebo en supplement groepen in effect op de onderzochte risicomarkers.

Twaalf weken suppletie met soja isoflavonen en *Actaea racemosa L.* had weinig tot geen invloed op de onderzochte HVZ risicomarkers. Dit supplement werkt waarschijnlijk noch beschermend noch ongunstig ten aanzien van het risico van HVZ. Om dit te kunnen bewijzen zijn er grote lange-termijn studies nodig.

In dezelfde studie die beschreven is in Hoofdstuk 6 is gekeken naar het effect van hetzelfde supplement op overgangssymptomen en de resultaten hiervan worden besproken in Hoofdstuk 7. De gemodificeerde Kupperman Index, de Greene Climacteric Scale, een visueel analoge schaal ontworpen om de kwaliteit van leven te meten en het dagelijks aantal en de ernst van de opvliegers werden geëvalueerd tijdens de screening en na zes en twaalf weken.

De scores van al deze symptoomlijsten verbeterden zowel na zes als na twaalf weken in vergelijking met de baseline waarden in beide groepen. Er was echter geen significant verschil in de grootte van verandering in de verschillende scores tussen de placebo en supplement groepen. De combinatie van soja isoflavonen en *Actaea racemosa L.* gaf niet meer verlichting van overgangsklachten dan placebo bij vrouwen die tenminste vijf opvliegers per dag hebben.

Er is ook gekeken naar de korte termijn effecten van de SERM HMR 3339 op ADMA, arginine en SDMA concentraties in vergelijking met placebo en raloxifene. Dit onderzoek wordt beschreven in Hoofdstuk 8. Postmenopauzale vrouwen kregen twaalf weken lang dagelijks placebo of HMR 3339 2.5 mg of HMR 3339 10 mg of HMR 3339 50 mg of raloxifene 60 mg in een gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde, dubbel-blinde, studie. Nuchtere plasma concentraties van ADMA, arginine en SDMA werden gemeten op baseline en na vier en twaalf weken.

Er werd een dosis afhankelijke daling in ADMA en SDMA concentraties gevonden na behandeling met HMR 3339 en de grootste daling werd gezien met 50 mg HMR 3339 in vergelijking met baseline en placebo (7,0% daling in ADMA concentraties en 16,2% daling in SDMA concentraties, beiden na twaalf weken). Twaalf weken behandeling met 60 mg raloxifene verlaagde de SDMA concentraties ten opzichte van placebo maar had geen effect op ADMA concentraties. Arginine concentraties werden door geen van de behandelingen beïnvloed.

Deze resultaten suggereren dat HMR 3339 een potentieel gunstig effect heeft ten aanzien van het risico van HVZ in postmenopauzale vrouwen door het verlagen van de NOS remmer ADMA.

Conclusie

Tot slot worden in Hoofdstuk 9 de resultaten van de studies in dit proefschrift besproken en vergeleken met de bestaande literatuur. Verder wordt kort ook de betekenis van deze bevindingen voor de klinische praktijk besproken en er worden aanbevelingen gedaan voor toekomstig onderzoek. Zowel endogeen oestrogenen als 17β -oestradiol therapie als de SERM HMR 3339 beïnvloedde ADMA concentraties in vrouwen van middelbare leeftijd. Het toevoegen van het progestageen trimegeston aan 17β -oestradiol therapie vergrootte de daling in ADMA concentraties ten opzichte van 17β -oestradiol alleen. Het toevoegen van dydrogesteron of gestodeen aan 17β -oestradiol therapie had geen invloed op het effect van 17β -oestradiol op ADMA concentraties. Verder leek ook de toevoeging van norethisteron acetaat geen invloed te hebben op het effect van 17β -oestradiol op ADMA concentraties. Zowel de transdermale als intranasale toedieningsvorm van HT was minder effectief in het verlagen van ADMA en SDMA concentraties, dan de orale toedieningsvorm van HT. Een supplement van soja isoflavonen met *Actaea racemosa L.* en een behandeling met de SERM raloxifene hadden geen invloed op ADMA concentraties.

Er bestaat een duidelijk verband tussen zowel endogene oestrogeen concentraties als 17β -oestradiol therapie met ADMA concentraties. Hogere oestrogeen concentraties gaan gepaard met lagere ADMA concentraties in vrouwen. De klinische consequenties van dit verband tussen oestrogenen en ADMA zijn nog niet duidelijk. Ook het mechanisme van de door oestrogenen geïnduceerde ADMA verlaging is nog niet geheel opgehelderd. Onderzoek in de toekomst zou zich met name moeten richten op deze twee aspecten van het verband tussen oestrogenen en ADMA in vrouwen.

