

## Samenvatting

Het arginine-stikstofmonoxide systeem speelt een belangrijke rol bij infecties, ontstekingen, orgaanschade, afstotingsreacties tegen transplantaten en bij de regulatie van de bloedtoevoer naar belangrijke organen zoals het hart, de lever en de nieren (1-4). De vorming van stikstofmonoxide (NO) uit het aminozuur arginine wordt gekatalyseerd door het enzym NO-synthase (5). Asymmetrisch dimethylarginine (ADMA), een endogeen derivaat van arginine, remt het NO-synthase en speelt dus een essentiële rol bij de beschikbaarheid van NO (6). ADMA wordt gemetaboliseerd door het enzym dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) wat zich vooral in de lever en nieren bevindt (7-9). De laatste decennia hebben meerdere studies reeds aangetoond dat een verhoogde plasma ADMA concentratie geassocieerd is met aandoeningen zoals coronair en perifeer vaatlijden, diabetes mellitus, hypercholesterolemie en hyperhomocysteinemie (10). Daarnaast is gebleken dat ernstig zieke postoperatieve chirurgische IC patiënten vaak hoge plasma ADMA concentraties hebben, wat geassocieerd is met een toename van morbiditeit en mortaliteit (11).

In dit proefschrift met als titel '**The importance of the arginine/ADMA ratio on the bioavailability of nitric oxide and organ function in critically ill patients**' worden de effecten van ADMA op verschillende orgaansystemen onderzocht.

**Hoofdstuk 1** van dit proefschrift geeft een overzicht over de synthese en het metabolisme van ADMA. Verder beschrijven we de relaties tussen ADMA en verschillende klinische condities.

Afgelopen decennia is er veel onderzoek verricht naar het NO metabolisme en de rol van ADMA daarin bij volwassen patiënten. Het blijkt echter dat de plasma ADMA concentratie ook verhoogd is bij te vroeg geboren kinderen (prematuren) (12-14). De klinische consequenties van de verhoogde ADMA concentraties bij deze groep patiënten zijn onbekend. Een aandoening waarbij er aanwijzingen zijn dat het NO metabolisme een rol speelt is necrotiserende enterocolitis (NEC). NEC is een ernstige aandoening van de tractus digestivus die vrijwel uitsluitend voorkomt bij prematuren (15). Bij NEC is de darmmucosa beschadigd waardoor een bacteriële invasie kan ontstaan, die snel kan ontaarden in sepsis (16). NEC wordt beschouwd als een ziektebeeld met meerdere oorzaken waarbij ook het NO metabolisme mogelijk een rol speelt. Dit wordt ondersteund door eerdere studies waarin is aangetoond dat prematuren met NEC lage plasma arginine concentraties hebben (17;18). Op basis van de overeenkomst tussen NEC en sepsis is het aannemelijk te veronderstellen dat prematuren met NEC verhoogde ADMA spiegels hebben. In **hoofdstuk 2** onderzochten we in een prospectieve case-control studie of er een verschil is in de plasma concentraties van arginine

en ADMA en de arginine/ADMA ratio tussen prematuren met en zonder NEC. In deze studie vonden wij bij prematuren met NEC significant lagere concentraties van arginine en ADMA en bovendien een lagere arginine/ADMA ratio in vergelijking met de kinderen zonder NEC. Daarnaast bleek tevens dat binnen de groep kinderen met NEC de arginine concentratie en de arginine/ADMA ratio significant lager waren bij de kinderen die overleden. De resultaten van deze studie ondersteunen de hypothese dat het NO metabolisme een rol speelt bij de pathofysiologie van NEC. De publicatie van onze resultaten werd door de redactie voorzien van een begeleidend commentaar, waarin werd gesteld dat het wenselijk is dat er een klinische trial wordt opgezet naar het effect van arginine suppletie bij prematuren (19).

Naast de rol die NO speelt in de tractus digestivus, is het NO metabolisme ook betrokken bij de longontwikkeling (20-22). In eerder onderzoek is aangetoond dat NO geproduceerd in de longen een belangrijke bijdrage levert aan een normale longontwikkeling, relaxatie geeft van vasculair glad spierweefsel en zorgt voor een goede ventilatie en perfusie (23-27).

In **hoofdstuk 3** vergeleken we de plasma concentraties van ADMA en arginine van prematuren die na de geboorte moesten worden beademd met prematuren die na de geboorte niet hoefden te worden beademd. De plasma concentratie van ADMA was significant hoger bij de beademde kinderen. Daarnaast bleek ook dat de hoogte van de ADMA concentratie direct na de geboorte, gerelateerd was aan de duur van de beademing. Dit verband was onafhankelijk van de zwangerschapsduur en suggereert dat een verhoogde ADMA spiegel via een verlaging van de NO productie betrokken is bij een vertraagde ontwikkeling van de longen.

ADMA speelt niet alleen een rol in de tractus digestivus en tractus respiratorius van premature kinderen op de neonatale intensive care unit, maar heeft ook een voorspellende waarde voor mortaliteit bij volwassen intensive care patiënten (11). Omdat ADMA via verminderde NO productie interfereert met belangrijke fysiologische functies is er zelfs gesuggereerd dat ADMA betrokken is bij het ontstaan van multi-orgaan falen (MOF) (28).

Naast het feit dat ernstig zieke IC patiënten veelal verhoogde plasma concentraties van ADMA hebben, is het bekend dat de plasma concentratie van het aminozuur arginine vaak verlaagd is bij deze groep patiënten. Ook bij patiënten die een grote operatie, bijvoorbeeld thoracoabdominale aorta chirurgie (29) hebben ondergaan, maar ook na grote trauma's (30) of tijdens sepsis (31) is de arginine concentratie verlaagd. In het verleden zijn er veel studies gedaan naar de klinische effecten van lage arginine concentraties of verhoogde ADMA concentraties. Op dit moment is er echter nog niets bekend over de klinische effecten van de combinatie van verlaagde arginine en hoge ADMA concentraties. In **hoofdstuk 4** bestudeerden we in een rattenmodel het effect van lage arginine en hoge ADMA plasmaconcentraties op de hemodynamiek en de bloeddorstrooming van belangrijke organen. In deze studie creëerden we drie

groepen: een controle groep, een groep met alleen verhoogde plasma ADMA concentraties en een groep met lage arginine en hoge ADMA plasma concentraties. Ten opzichte van de controle groep waren bloeddruk en perifere vaatweerstand hoger in de groep met hoge ADMA concentraties. Wanneer we daarnaast ook de plasma arginine concentraties verlaagden, leidde dit tot een verslechtering van de hemodynamiek maar ook tot een verminderde doorbloeding van de nier, lever en milt. De resultaten van deze studie ondersteunen de hypothese dat een verminderde NO productie door een combinatie van lage arginine en hoge ADMA concentraties betrokken kan zijn bij het ontstaan van orgaan falen.

Ernstig zieke chirurgische IC patiënten hebben een verhoogde kans op het ontwikkelen van multi-orgaan falen hetgeen geassocieerd is met morbiditeit en mortaliteit. Uit de in 2001 gepubliceerde Leuven-studie (32) is gebleken dat strikte glucoseregulatie bij deze patiëntenpopulatie leidt tot minder complicaties en zelfs tot een betere overleving. Het onderliggende mechanisme hiervan is echter nog niet volledig opgehelderd. Een potentieel mechanisme dat een mogelijke bijdrage levert aan dit positieve effect is de regionale beschikbaarheid van NO (33). Recent is door Siroen en collega's aangetoond dat strikte glucoseregulatie door middel van insuline therapie de plasma ADMA concentratie van ernstig zieke chirurgische IC patiënten verlaagt (34). Daarnaast bleek dat patiënten die gedurende de IC opname kwamen te overlijden significant hogere ADMA spiegels hadden vergeleken met patiënten die van de IC werden ontslagen. In **hoofdstuk 5 en 6** hebben we geprobeerd meer inzicht te verkrijgen in het effect van strikte glucose regulatie op het NO metabolisme. In deze studie onderzochten we met behulp van een konijnenmodel de invloed van insuline en glucose op de beschikbaarheid van NO, de activiteit en expressie van het enzym NO synthase, de activiteit van DDAH en de concentraties van arginine en ADMA in verschillende organen. Hiertoe creëerden we met behulp van een "2x2 factorial design" vier experimentele groepen, waarbij zowel de insuline als de glucose concentraties werden gevarieerd. Vergeleken met de normoglycemische groepen bleek dat in de hyperglycemische groepen de NO plasma spiegel na drie dagen significant hoger was. Echter, na zeven dagen was dit verschil verdwenen. Verder was de NOS activiteit in de spier en in het aorta endotheel lager in de hyperglycemische groepen vergeleken met de normoglycemische groepen. Wat betreft de gen-expressie van NOS was er met name in de spieren een zeer hoge expressie van iNOS in de hyperglycemische groepen. De expressie van eNOS was vooral verhoogd in de aorta in de hyperglycemische groepen.

Vergeleken met de normoglycemische groepen bleek dat de ADMA concentratie was verhoogd in het plasma van de hyperglycemische groepen en dat de DDAH activiteit in de weefsels was verminderd.

De conclusie van deze studies is dat het onvoldoende reguleren van de de glucosespiegels kan leiden tot een verminderde activiteit van DDAH waardoor de

ADMA concentratie stijgt. Door de stijging van de ADMA concentratie vermindert de NOS activiteit voornamelijk in het vaatendotheel en de spier. Compensatoir zal er een toename zijn van de expressie van eNOS in het endotheel en van iNOS in de spier. Het handhaven van normoglycemie, onafhankelijk van insulinespiegels heeft een gunstige invloed op de ADMA concentratie, waarschijnlijk door bescherming van het enzym DDAH tegen inactivatie door glucose-geïnduceerde oxidatieve stress. Dit leidt tot een bescherming van de NOS activiteit op orgaanniveau hetgeen mogelijk een positief effect heeft op de microcirculatie en functie van belangrijke organen.

Zoals in dit proefschrift maar tevens door andere studies is aangetoond, is een verhoogde plasma ADMA concentratie geassocieerd met morbiditeit en mortaliteit. Het is dus van belang om de concentratie van ADMA binnen de fysiologische grenzen te houden. Een van de mogelijkheden, zoals in dit proefschrift beschreven, is het handhaven van normoglycemie bij ernstig zieke chirurgische IC patiënten. De laatste jaren is er veel onderzoek verricht naar therapieën die de ADMA concentratie kunnen verlagen. Zo ontdekten Stühlinger (35) en Wang (36) dat de peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonist rosiglitazon de ADMA concentratie verlaagt bij patiënten met insuline ongevoeligheid. Gebaseerd op de resultaten van deze studie, onderzochten we in **hoofdstuk 7** het effect van het geneesmiddel rosiglitazon op de plasma ADMA concentratie bij ernstig zieke IC patiënten in een gerandomiseerde studie. Twaalf patiënten kregen dagelijks 4 mg rosiglitazon gedurende een periode van maximaal zes weken of totdat ze werden ontslagen van de IC of kwamen te overlijden. Negen patiënten werden geïnccludeerd als controle patiënt. Vergeleken met gezonde individuen, was de ADMA concentratie in plasma van ernstig zieke IC patiënten significant hoger. In overeenstemming hiermee was de ADMA concentratie significant gecorreleerd met de hoogte van de SOFA score. De behandeling met rosiglitazon had geen effect op de plasma ADMA concentratie. Concluderend blijkt uit dit hoofdstuk dat ernstig zieke IC patiënten een verhoogde plasma ADMA concentratie hebben die is geassocieerd met de mate van orgaanfalen. Echter, een ADMA verlagend effect van rosiglitazon kon in deze relatief kleine pilot studie niet worden aangetoond.

## TOEKOMST PERSPECTIEF

De studies die in dit proefschrift beschreven worden, bevestigen het belang van ADMA en zijn voorloper arginine bij verschillende pathofysiologische processen. Voortschrijdend inzicht in het metabolisme van ADMA maakt het steeds duidelijker dat het verlagen van de plasma concentratie van ADMA in potentie een belangrijke therapeutische optie is. Hoewel verschillende publicaties hebben laten zien dat sommige bestaande geneesmiddelen een ADMA-verlagend effect hebben, zijn de resultaten van deze studies niet geheel consistent (37).

Bovendien zijn er nog geen geneesmiddelen ontwikkeld die specifiek gericht zijn op verlaging van ADMA. Het is dus van belang dat er meer onderzoek wordt gedaan naar farmaceutische of andere ADMA verlagende therapieën. Theoretisch zijn er vier mechanismen die kunnen leiden tot accumulatie van ADMA: (1) toename eiwitafbraak, (2) toename van methylering van arginine in eiwitten door proteïne arginine methyltransferases (PRMT), (3) verminderde renale excretie en (4) verminderd metabolisme door DDAH. Derhalve moeten we ons richten op therapieën die de mate van katabolisme verminderen, de renale excretie van ADMA bevorderen, de activiteit of expressie van DDAH enzymen kunnen verhogen en/of de activiteit of expressie van de ADMA producerende PRMT enzymen verminderen.

Meerdere studies hebben laten zien dat hemodialyse de plasma ADMA concentratie bij patiënten met nierfalen verlaagt (38;39). Rifai en collega's (40) hebben recentelijk aangetoond dat ook door middel van leverdialyse met behulp van het artificial liver support system Prometheus de ADMA concentratie met ongeveer 25% kan worden verlaagd.

Kortom, er is een aantal potentiële ADMA verlagende therapieën in ontwikkeling, maar er is meer onderzoek noodzakelijk om deze resultaten te bevestigen en te onderzoeken wat de klinische consequenties van ADMA verlaging zijn.

In de meeste studies is de ADMA concentratie alleen gemeten in het plasma in de veronderstelling dat de plasma ADMA concentratie een betrouwbare afspiegeling is van de intracellulaire ADMA concentratie. Echter, tot op heden is er weinig bekend over de intracellulaire ADMA concentratie. Meer onderzoek is noodzakelijk naar intracellulair ADMA in relatie tot het metabolisme van ADMA in de cel en naar de relatie tussen intracellulaire en circulatoire ADMA concentraties.

Tenslotte is het de vraag of een verlaging van ADMA per definitie altijd gunstig is. Zo is het bekend dat NO invloed heeft op tumor progressie en op de ontwikkeling van metastasen (41). Door verschillende onderzoeksgroepen is er een positieve correlatie tussen NOS expressie en tumorgroei aangetoond (42;43). Intracellulaire factoren, waaronder ADMA en DDAH, die de NO synthese reguleren kunnen dus belangrijke aangrijpingspunten zijn voor het controleren van tumorgroei. Mogelijk toekomstig onderzoek zal moeten worden toegespitst op de rol die ADMA en DDAH spelen bij tumor angiogenese.

## References

- (1) Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5(2):88-97.
- (2) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12(3):87-88.
- (3) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(11):4651-4655.
- (4) Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 1994; 21(1):91-97.
- (5) Anthony S, Leiper J, Vallance P. Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med* 2005; 10 Suppl 1:S3-S9.
- (6) Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 12:S60-S62.
- (7) Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977; 26(5):531-537.
- (8) Yudkoff M, Nissim I, Pereira G, Segal S. Urinary excretion of dimethylarginines in premature infants. *Biochem Med* 1984; 32(2):242-251.
- (9) Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264(17):10205-10209.
- (10) Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004; 109(15):1813-1818.
- (11) Nijveldt RJ, Teerlink T, van der Hoven B, Siroen MPC, Kuik DJ, Rauwerda JA et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003; 22:23-30.
- (12) Siroen MP, Teerlink T, Bolte AC, van Elburg RM, Richir MC, Nijveldt RJ et al. No compensatory upregulation of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62(1):7-13.
- (13) Maeda T, Yoshimura T, Okamura H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in maternal and fetal circulation. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10(1):2-4.
- (14) Vida G, Sulyok E, Ertl T, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Plasma asymmetric dimethylarginine concentration during the perinatal period. *Neonatology* 2007; 92(1):8-13.
- (15) Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43(2):409-432.
- (16) Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94(449):100-105.
- (17) Zamora SA, Amin HJ, McMillan DD, Kubes P, Fick GH, Butzner JD et al. Plasma L-arginine concentrations in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1997; 131(2):226-232.
- (18) Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor AR, Bose CL et al. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2000; 137(6):785-793.
- (19) Neu J. Arginine supplementation for neonatal necrotizing enterocolitis: are we ready? *Br J Nutr* 2007; 97(5):814-815.
- (20) Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(2 Pt 1):538-551.
- (21) Kawai N, Bloch DB, Filippov G, Rabkina D, Suen HC, Losty PD et al. Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):L589-L595.
- (22) Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 1995; 27(3):389-393.

- (23) Kang JL, Park W, Pack IS, Lee HS, Kim MJ, Lim CM et al. Inhaled nitric oxide attenuates acute lung injury via inhibition of nuclear factor-kappa B and inflammation. *J Appl Physiol* 2002; 92(2):795-801.
- (24) Ballard PL, Gonzales LW, Godinez RI, Godinez MH, Savani RC, McCurnin DC et al. Surfactant composition and function in a primate model of infant chronic lung disease: effects of inhaled nitric oxide. *Pediatr Res* 2006; 59(1):157-162.
- (25) Cotton RB, Sundell HW, Zeldin DC, Morrow JD, Roberts LJ, Hazinski TA et al. Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic lung injury in lambs. *Pediatr Res* 2006; 59(1):142-146.
- (26) McCurnin DC, Pierce RA, Chang LY, Gibson LL, Osborne-Lawrence S, Yoder BA et al. Inhaled NO improves early pulmonary function and modifies lung growth and elastin deposition in a baboon model of neonatal chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(3):L450-L459.
- (27) Tang JR, Markham NE, Lin YJ, McMurtry IF, Maxey A, Kinsella JP et al. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(2):L344-L351.
- (28) Nijveldt RJ, Teerlink T, van Leeuwen PAM. The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis. *Clin Nutr* 2003; 22(1):99-104.
- (29) Nijveldt RJ, Prins HA, Siroen MP, Rauwerda JA, Teerlink T, van Leeuwen PA. Low arginine plasma levels in patients after thoracoabdominal aortic surgery. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(8):615-617.
- (30) Houdijk AP, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RI, Weiss JK, McCamish MA et al. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 1998; 352(9130):772-776.
- (31) Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, Ramsay G, Deutz NE. Sepsis: an arginine deficiency state? *Crit Care Med* 2004; 32(10):2135-2145.
- (32) van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001; 345(19):1359-1367.
- (33) van den Berghe G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 2004; 114(9):1187-1195.
- (34) Siroen MP, van Leeuwen PA, Nijveldt RJ, Teerlink T, Wouters PJ, Van den BG. Modulation of asymmetric dimethylarginine in critically ill patients receiving intensive insulin treatment: a possible explanation of reduced morbidity and mortality? *Crit Care Med* 2005; 33(3):504-510.
- (35) Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287(11):1420-1426.
- (36) Wang TD, Chen WJ, Cheng WC, Lin JW, Chen MF, Lee YT. Relation of improvement in endothelium-dependent flow-mediated vasodilation after rosiglitazone to changes in asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, and C-reactive protein in nondiabetic patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2006; 98(8):1057-1062.
- (37) Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006; 58(2):159-178.
- (38) Errakonda PR, Paladugu R, Bitla AR, Musturu SM, Lakshman J, Pemmaraju SR et al. Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction. *J Nephrol* 2010.
- (39) Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(3):594-600.
- (40) Rifai K, Bode-Boeger SM, Martens-Lobenhoffer J, Ernst T, Kretschmer U, Hafer C et al. Removal of asymmetric dimethylarginine during artificial liver support using fractionated plasma separation and adsorption. *Scand J Gastroenterol* 2010.
- (41) Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7):521-534.

- (42) Moochhala S, Chhatwal VJ, Chan ST, Ngoi SS, Chia YW, Rauff A. Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1996; 17(5):1171-1174.
- (43) Loibl S, Buck A, Strank C, von Minckwitz G, Roller M, Sinn HP et al. The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(2):265-271.