



## ARAŞTIRMA YAZISI

### HOMOSİSTEİNİN İNSAN GÖBEK KORDON VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE eNOS ve DDAH GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Mustafa Akkiprik<sup>1</sup>, Duygu Çevik<sup>2</sup>, Ayşe Özer<sup>1</sup>, Kaya Emerk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

#### ÖZET

**Amaç:** Artmış plazma homosistein seviyeleri, miyokard enfarktüsü, felç ve periferik vasküler hastalıklarda bağımsız bir risk faktördür. Bu çalışmada, homosisteinin nitrik oksit (NO) sentezini, biyoyararlanımını ve yıkımını nasıl etkilediğini ortaya koymak amacı ile endotel hücre kültüründe endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) gen ekspresyonları ile NO düzeyleri araştırılmıştır.

**Yöntem:** Çalışmada insan göbek kordon ven endotel hücre kültürü (HUVEC) yapılmış ve kültür hücreleri 10, 50, 100, 500 ve 1000 µM homosistein konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bu hücrelerden (~1x10<sup>6</sup> hücre) total RNA izolasyonu yapılarak ters transkriptaz (RT) reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA) eldesi sağlanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri eNOS ve DDAH transkriptlerine özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında dijital jel görüntüleme sistemi ile dansitometrik olarak ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca hücre kültürü medyumlarından elektrokemilüminesans yöntemi ile NO analizleri yapılmıştır.

**Bulgular:** Elde edilen veriler ışığında, homosisteinin endotel hücre kültüründe eNOS ve DDAH gen ekspresyonları üzerine istatistiksel anlamlılık yaratacak herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Buna karşın homosisteinin NO düzeyine hafif bir baskılayıcı etkisi olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Sonuç olarak, homosisteinin NO üzerine etkisinin eNOS ve DDAH gen ekspresyonları düzeyinde olmadığı bu nedenle özellikle substrat düzeyinde denetim mekanizmaları üzerine yoğunlaşılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Homosistein, eNOS, DDAH, Nitrik oksit (NO)

### EFFECTS OF HOMOCYSTEINE ON eNOS AND DDAH GENE EXPRESSION LEVELS IN PRIMARY HUMAN UMBILICAL ENDOTHELIAL CELL CULTURE

#### ABSTRACT

**Aim:** Elevated plasma homocysteine levels are independent risk factors for myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease. The aim of this study was to investigate effects of homocysteine on nitric oxide (NO) synthesis, bioavailability and degradation by analysis gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and also NO levels in endothelial cell line.

**Material and Methods:** Human umbilical vein endothelial cell culture (HUVEC) was performed and incubated with various homocysteine concentrations (10µM, 50µM, 100µM, 500µM, 1000µM). After that, total RNA was extracted from these cells and converted to cDNA. These cDNA samples were amplified with PCR for eNOS and DDAH genes. Then the products were run in agarose gel electrophoresis and analysed for densitometric measurement by gel imaging system. In addition, NO<sub>x</sub> was analysed in cell culture mediums with electrochemiluminescence method.

#### İletişim Bilgileri:

Prof. Dr. Kaya Emerk

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

e-mail: kemerk@ttnet.net.tr

Marmara Medical Journal 2007;20(3);144-149



**Results:** All these studies show that homocysteine has no statistically significant effect on eNOS and DDAH gene expressions in endothelial cell culture. On the other hand, homocysteine has a minor suppressive effect on NOx levels.

**Conclusion:** These data suggest that the effect of homocysteine on NO levels is not through gene expression levels of eNOS and DDAH but it is at substrate level.

**Keywords:** Homocysteine, eNOS, DDAH, Nitric oxide (NO)

## GİRİŞ

Homosistein, metiyonin metaboliti olarak bulunan, sülfür taşıyan bir amino asittir. Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında, iki metabolik yolun kesişmesinde anahtar rolü oynar. Plazmada birçok formda bulunur: 70-80% proteine bağlı, 20-30% disülfid ve çok az bir miktarda serbest ve indirgenmiş halde bulunur<sup>1</sup>. Homosistein ya transsülfürasyon yolu ile sistatiniyone sonra da sistine katabolize olur ya da metiyonin haline yeniden metillenir. Homosisteininin metillenmesi folat ve kobalamin bağımlı bir enzim olan metiyonin sentaz tarafından yapılır. Artmış plazma homosistein seviyeleri, miyokard enfarktüsü, felç ve periferik vasküler hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olarak belirtilmiştir. Folik asit, vitamin B6 ve vitamin B12 eksikliği, sistatiniyon  $\beta$ -sentaz ve 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz gibi metabolizmasında yer alan değişik enzimlerin eksiklikleri, plazma homosistein düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Homosistein vasküler fonksiyonu bozarak aterosklerozda komplikasyon riskini artırır<sup>2</sup>.

Hiperhomosisteineminin ateroskleroza yol açma mekanizmalarından bir tanesi de NO yolağıdır<sup>3</sup>. Endotelial NO vazodilatatördür ve anti-trombosit etkileri vardır. Hiperhomosisteinemide endotel bağımlı relaksasyonun bozulması NO'nun biyo-yararlanımının azalması sonucunda olmaktadır. Biyo-yararlanımın azalması başlıca; üretiminin azalmasından, degradasyonunun artmasından veya nitrozotiyol türevlerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Homosisteinin NO üretimini etkilediği bilinen bir konu olmasına rağmen mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır<sup>4</sup>.

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), özellikle endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO

yolağının önemli bir endojen regülatörüdür. ADMA düzeyindeki artışın, endotel disfonksiyonunun derecesi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir ve ADMA'nın endotel disfonksiyonunun yeni bir belirteci olabileceği ileri sürülmektedir<sup>5</sup>. ADMA, çoğunlukla endotel hücrelerde ve böbrekte bulunan dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından L-sitrüline ve dimetilamine metabolize olur<sup>6</sup>. ADMA düzeyinin artmasının önemli bir nedeni DDAH fonksiyon yetersizliğidir<sup>7,8</sup>.

Bu çalışmada, hiperhomosisteineminin nitrik oksit (NO) üzerine etkisini ortaya koyarak daha önce elde edilen ancak netleşmemiş sonuçlara ışık tutmak amacı ile endotel hücre kültüründe endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) gen ekspresyonları ile NO düzeyleri araştırılmıştır.

## GEREÇ-YÖNTEM

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Etik Kurul Komitesince onaylanmıştır. Göztepe Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi Doğum Servisi'nden normal doğum yapan hastalara ait göbek kordonları steril HEPES tampon salin (HBS) içerisine alınarak, 1-3 saat içerisinde Jaffe ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak endotel hücreleri kollejenaz ile izole edildi<sup>9</sup>. Hücreler, % 20 fetal dana serumu, amfoterisin B penisilin/ streptomisin içeren medyum 199 (M2520) ile kültür kablarına ekildi ve 37°C'lık %5'lik CO2 inkübatörüne konuldu. Prekonfluent oluncaya kadar iki günde bir medyumları değiştirildi. Prekonfluent primer kültür hücrelerinin medyumları atılarak, yerine normal medyum, 10 mmol/L, 50 mmol/L, 100  $\mu$ mol/L, 500  $\mu$ mol/L ve 1000  $\mu$ mol/L L-homosistein'li medyumlar konuldu. Yirmi dört saat inkübasyondan sonra, medyumlar ependorflara 1'er ml paylaştırılarak NO cihazı



ile NO ölçümü yapılması için  $-20^{\circ}$  C'a kaldırıldı, hücreler ise  $-70^{\circ}$  C' de saklandı.

Hücrelerden ( $\sim 1 \times 10^6$  hücre) total RNA izolasyonu Qiagen Rneasy Mini Kiti kullanılarak protokolüne uygun olarak yapıldı. RNA'nın saflığını ve miktar tayinini spektrofotometre ölçümleri ile yapıldı. Bunun için kullanılacak küvetler 0.1 M NaOH ve 1mM EDTA çözeltisi ve daha sonra %0.1 DEPC'li saf su ile yıkandı. RNA dilüsyonu 1/50 olacak şekilde hazırlanarak örnekler 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülüp, absorbans değerleri saptandıktan sonra, [A260x40xDF] eşitliğine göre mililitredeki RNA miktarı mg olarak hesaplandı. Ardından Qiagen Omniscript RT kiti kullanılarak ters transkriptaz (RT) reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA) eldesi sağlandı. Elde edilen cDNA örnekleri eNOS ve DDAH transkriptlerine özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltıldı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında dijital jel görüntüleme sistemi ile dansitometrik olarak ölçümleri yapılmış ve referans gen olarak  $\beta$ -aktin geni kullanılmıştır.

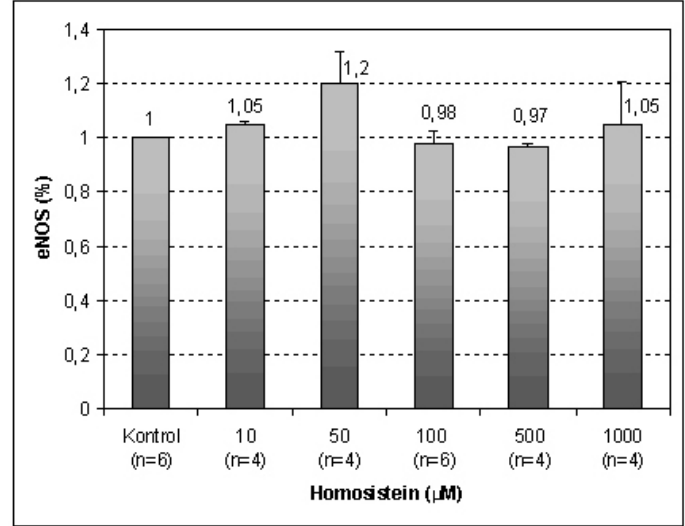
Jel görüntüsünün yoğunluk ölçümleri önce kendi pozitif kontrolü olan  $\beta$ -aktin ile oranlanmış daha sonra her çalışma grubundaki örnek kendi grubuna ait kontrole oranlanmıştır. İstatistiksel analizler "Instant 2.0" programı kullanılarak, nonparametrik Mann-Whitney testi ile yapılmıştır. Tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p > 0,05$ 'dir ve istatistiksel olarak anlamsızdır.

Nitrit oksit ölçümleri ise, NO'nun metabolitleri (NOx) olan nitrit ve nitratın tekrar NO'ya çevrilmesi ve ozon ile reaksiyonu sonucunda oluşan kemilüminesana dayalı teknikle ölçen, yüksek derecede sensitif detektöre sahip olan Sievers model 280i NO analizör (NOA) kullanılarak yapılmıştır.

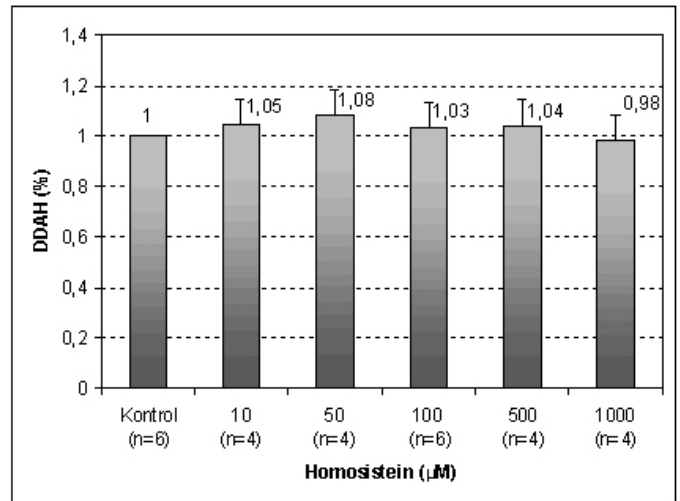
## BULGULAR

Hücre kültürleri çeşitli konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) Hcy (homosistein) ile 24 saat inkübe edildikten sonra eNOS ve DDAH gen ekspresyon değişimleri referans gen  $\beta$ -aktin ile

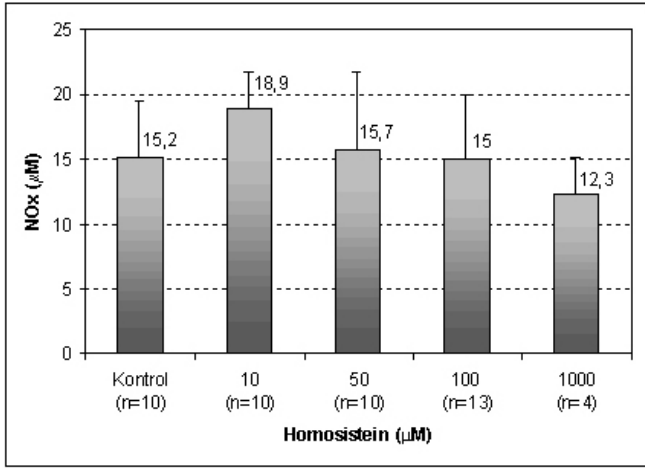
kıyaslandığında elde edilen sonuçlar Şekil 1 ve 2'de; NO metabolitlerinin ölçümleri ise Şekil 3'de görülmektedir.



**Şekil 1:** HUVEC'lerin homosisteinin farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 500, 1000 mM) 24 saat süre ile inkübasyonu sonrasındaki eNOS gen ekspresyonu değişimleri. eNOS jel görüntüsünün yoğunluk ölçümünün kendi pozitif kontrolüne ve daha sonra kendi grubuna ait kontrole oranlarının grafiği.



**Şekil 2:** HUVEC'lerin homosisteinin farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 500, 1000 mM) 24 saat süre ile inkübasyonu sonrasındaki DDAH gen ekspresyonu değişimleri. DDAH jel görüntüsünün yoğunluk ölçümünün kendi pozitif kontrolüne ve daha sonra kendi grubuna ait kontrole oranlarının grafiği.



**Şekil 3:** HUVEC'lerin homosisteinin farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 500, 1000 mM) 24 saat süre ile inkübasyonu sonrasındaki NO metabolitlerinin (NOx) düzeyleri.

## TARTIŞMA

Aterosklerotik kalp hastalıkları son derece önemli olup batı ülkelerinde bir numaralı ölüm nedenidir. Artmış homosistein seviyelerinin, ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara yol açtığı bilinmektedir<sup>2,10</sup>. Homosistein, bu etkisini endotel hasarı yolu ile göstermektedir. Homosisteinin vasküler hastalıklara yol açma patogeneğinde NO'nun önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir<sup>3</sup>.

Hiperhomosisteineminin endotel bozukluğunu hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği açıklığa kavuşmamıştır. Her ne kadar hiperhomosisteinemi MCP-1 ekspresyonunu artırarak monositlerin intimaya girişini hızlandırır da eNOS ekspresyonuna önemli bir etkisi gösterilememiştir<sup>11</sup>. Bu bulgular normal miktarda NO sentezi olduğunu ancak NO miktarlarının bir başka mekanizma ile azaldığını ve/veya eNOS'un inhibe edildiğini göstermektedir.

Homosisteinin, NO üzerine etkisini inceleyen araştırma grupları birbiri ile çelişen sonuçlar elde etmişlerdir. Homosisteinin NO sentezini arttırdığını gösteren çalışmaların yanı sıra<sup>12-15</sup>, homosisteinin NO sentez aktivitesine etki etmeden, NO düzeyini azalttığı bulgularıda mevcuttur<sup>16</sup>.

Yapılan bazı çalışmalar homosisteinin NO biyoyararlanımını azalttığını göstermektedir.

Homosistein, NO biyoaktivitesini birçok mekanizma ile azaltabilir. Bu mekanizmalardan en önemlileri homosisteinin oksidatif stres yaratması ve NO'yu S-nitrozohomosistein haline çevirerek ortamdan uzaklaştırmasıdır. NO katabolizması sırasında otooksidasyonla, homosisteine bağımlı oksijen serbest radikallerinin üretildiği gösterilmiştir<sup>17</sup>. NO'nun homosisteinin serbest tiol grubu ile anormal etkileşimi sonucu yıkılması, NO'nun biyoyararlanımını azaltabilir. Tioller, NO ile reaksiyona girerek, S-nitrozotioller oluştururlar. Ancak, S-nitrozotioller, guanilat siklazı aktive etme yolu ile, hem vazodilatör hem de antitrombosit etkiler oluşturabilirler<sup>18</sup>. Upchurch ve ark. 1997'de yaptıkları bir çalışmaya göre ise, homosistein doza bağımlı olarak, glutation peroksidaz mekanizması ile, NO'nun biyoyararlanımını azaltmaktadır<sup>12</sup>. Stamler ve ark. 1993'de yaptıkları bir çalışmaya göre ise homosisteine uzun süre maruz kalma (3 saatten fazla), NO cevabını bozmuştur<sup>3</sup>. Bunlara karşılık yapılan bir çalışmada endotel hücrelerinin, homosisteine 15 dakika gibi kısa bir süre maruz kalmasının bile NO salınmasını uyardığını, ve vazodilatör ve antitrombosit bir madde olan S-NO-Hcy oluşumu ile sonuçlandığını göstermiştir<sup>17</sup>.

Bu çalışma, homosisteinin 24 saat inkübasyon sonrasında, homosisteinin değişik konsantrasyonlarda, eNOS ekspresyonu üzerine etkisi olmadığını göstermiştir. İstatistiksel olarak da eNOS ekspresyon düzeylerinde herhangi bir fark saptanamamıştır. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da eNOS ekspresyon düzeylerinde bir fark olmadığı ileri sürülmüştür. Chow ve ark.<sup>16</sup>, insan göbek endotel hücrelerinde yaptıkları çalışma ile homosisteinin eNOS ve iNOS aktivitesine etki etmediğini, Zhang ve ark.<sup>4</sup>, ise endotel hücrelerini 24 saat 10µM, 20µM, ve 50µM homosisteinle uyarılma ile eNOS düzeyinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Sığır aortik endotel hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında eNOS proteini ve bazal NOS aktivitesi seviyelerinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır<sup>19</sup>. Bu konuda yapılan çalışmaların bir kısmında ise tam tersi sonuçlar gözlemlenmiş ve eNOS ekspresyonu



artmış olarak bulunmuştur. Sıçan aort halkası<sup>20</sup> ve sıçan aort endotel hücrelerinde<sup>15</sup> yapılan benzer çalışmalarda eNOS ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu çalışmalar arasındaki en önemli fark kültüre karşı hayvan deneyi olmasıdır.

Çalışmamızda, homosisteinin eNOS ekspresyonu üzerine etkisi olmadığı görülmüş ve S-nitrozohomosistein oluşumu ile NO düzeylerini etkilediği düşünülerek NOx seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, fizyolojik doz olan 10µM konsantrasyonda NOx seviyelerinde hafif bir artış, daha yüksek dozlarda azalma, denediğimiz en yüksek toksik doz olan 1000µM'da daha da azalma gözlemlenmiştir.

Yapılan araştırmalar plazma ADMA düzeylerinin hiperhomosisteinemi gibi patolojik durumlarda arttığını göstermektedir<sup>21</sup>. Çalışmamızda, DDAH gen ekspresyonlarında bir değişiklik bulamadığımızdan ADMA düzeylerindeki beklenen artışın onun yıkımından sorumlu enzim olan DDAH'nin ekspresyonunun azalmasına değil DDAH'nin aktivitesinin azalmasına bağlı olabileceğini ima eder. DDAH'nin aktif bölgesinde aktif bir sistein bulunur. Bu sistein homosistein ile oksitlenirse enzimin inaktif olması kaçınılmazdır. Ancak henüz hücre içinde iki molekül arasında böyle bir etkileşim gösterilememiştir. Bir diğer olasılık da hiperhomosisteineminin sebep olduğu oksidatif olaylara bağlı hasarlanma mekanizmalarıdır. Çalışmamızda 24 saat homosistein inkübasyonu sonrasında DDAH gen ekspresyonu incelenmiş olup, daha uzun süreli, örneğin 48 saat homosistein inkübasyonlarında DDAH ekspresyon düzeyinin muhtemel düşüşünün gözlemlenebileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda homosistein ile 24 saat boyunca inkübe edilen HUVEC serisinde eNOS ve DDAH gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. NOx düzeyleri için ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Her ne kadar literatürde homosisteinin NO

düzeylerini düşürdüğüne dair yayınlar varsa da bu düşüşün enzim ekspresyonuna bağlı olmadığı ve NO'nun kullanılabilir kısmını muhtemelen nitrozotiol türevlerinin oluşması aracılığı ile azaltmasına bağlı olduğu çalışmamızda anlaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Finkelstein JD. Homocysteine: a history in progress. Nutrition Reviews 2000; 58: 193-204.
2. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. J Clin Invest. 2001; 107: 675-683.
3. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of Homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. J Clin Invest 1993; 91: 303-318.
4. Zhang XH. Effects of homocysteine on endothelial NO production. Am. J Physiol Renal Physiol 2000; 279: F671-F678.
5. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. Atheroscler Suppl 2003; 4: 33-40.
6. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992; 339: 572-575.
7. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol 1996; 119: 1533-1540.
8. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cookie JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 1999; 99: 3092-3095.
9. Jaffe EA.: Culture and identification of large vessel endothelial cells. In: Jaffe EA, ed. Biology of Endothelial Cells. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984:1-11
10. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. J Clin Invest. 1976; 58: 731-741.
11. Wang G, O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. Biochem J. 2001; 357: 233-240.
12. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. Atherosclerosis 1997; 132: 177-185.
13. Welch GN, Upchurch GR Jr, Farivar RS, et al. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. Proc Assoc Am Physicians 1998; 110: 22-31.
14. Ikeda U, Ikeda M, Minota S, Shimada K. Homocysteine increases nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. Circulation 1999; 99: 1230-1235.
15. Wang S, Wright G, Harrah J, et al. Short-term exposure to homocysteine depresses rat aortic contractility by an endothelium-dependent mechanism. Can J Physiol Pharmacol 2000; 78: 500-506.



16. Chow K, Cheung F, Lao TT, O K. Effect of homocysteine on the production of nitric oxide in endothelial cells. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999; 26: 817-818.
17. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest 1986; 77: 1370-1376.
18. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem 1991; 266: 4244-4250.
19. Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, Caldwell RW. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. Med Sci Monit 2001; 7: 585-591.
20. Tyagi SC, Smiley LM, Mujumdar VS. Homocyst(e)ine impairs endocardial endothelial function. Can J Physiol Pharmacol 1999; 77: 950-957.
21. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 2001; 104: 2569-2575.