

Omocisteina, stress ossidativo e alterata sintesi di monossido d'azoto nelle patologie coronariche

Isabella Squellero¹, Giancarlo Marenzi¹, Fabrizio Veglia¹, Giuliana Cighetti², Elena Tremoli^{1,2}, Viviana Cavalca³

¹Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi, Milano

³Istituto di Cardiologia, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Homocysteine, oxidative stress and impairment of nitric oxide synthesis in coronary artery disease.

Homocysteine (Hcy) is considered an independent risk factor for cardiovascular disease, particularly in patients with renal insufficiency. Hyperhomocysteinemia appears to be related to an increase of oxidative stress and a decreased nitric oxide (NO) bioavailability. Aim of our study was to analyze the relationships among Hcy, NO metabolic pathway, and oxidative stress in coronary artery disease, considering renal function. Hcy, L-arginine, symmetric- (SDMA) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) and malondialdehyde (MDA) were determined in plasma of patients with acute coronary syndrome (ACS, n=19) or stable angina (SA, n=41) and of 38 healthy subjects (Ctr). Hcy was elevated in patients in comparison with Ctr (P=0.04 ACS vs. Ctr; P=0.01 SA vs. Ctr). MDA was also higher in patients than in Ctr (P < 0.0001 ACS vs. Ctr; P=0.003 SA vs. Ctr) and in ACS vs. SA (P=0.01). SA showed higher levels of ADMA (P=0.004 vs. ACS and P=0.0007 vs. Ctr) and SDMA (P=0.07 vs. ACS and P=0.0001 vs. Ctr). Positive correlations were found between Hcy and SDMA (r=0.32, P=0.002) and Hcy and MDA (r=0.20, P=0.07). Our study suggests that Hcy might be considered a key molecule in oxidative stress and in impaired NO synthesis. Furthermore, renal insufficiency might impair endothelial function by increasing both Hcy and SDMA, competing with the NO precursor L-arginine for uptake into the cells.

INTRODUZIONE

L'omocisteina (Hcy) è un amminoacido tiolico, non-proteinogenico, che deriva dalla demetilazione della metionina (1). Le sue concentrazioni plasmatiche sono determinate da due distinte vie metaboliche: il ciclo della metionina e la sequenza di trans-sulfurazione a formare cisteina (2,3). S-adenosilmetionina (SAM), un intermedio del ciclo della metionina, è il donatore universale di gruppi metil essenziali per numerose reazioni di metilazione. Quando SAM perde il gruppo metilico, si genera S-adenosilomocisteina (SAH) che si idrolizza per rigenerare Hcy propagando così il ciclo della metionina.

Un'elevata concentrazione plasmatica di Hcy (iperomocisteinemia) è considerata fattore di rischio indipendente per le patologie vascolari aterosclerotiche (4,5). La condizione di iperomocisteinemia si verifica quando i reni non sono più in grado di eliminare Hcy (6) o quando difetti genetici di enzimi o carenze nutrizionali di cofattori (vitamine), essenziali per le vie metaboliche di rimetilazione o di trans-sulfurazione, portano ad un aumento di Hcy rilasciata in circolo (3).

Nel 2003, alcuni Autori (7) hanno stabilito gli intervalli di concentrazione che definiscono i diversi gradi di iperomocisteinemia: 15-30 $\mu\text{mol/L}$, moderata; 30-100 $\mu\text{mol/L}$, intermedia e >100 $\mu\text{mol/L}$, severa. L'iperomocisteinemia severa è rara, mentre la forma moderata è presente nel 5-7% della popolazione generale (8,9). Numerosi studi clinici ed epidemiologici hanno mostrato che anche con-

centrazioni plasmatiche di Hcy moderatamente elevate (>15 $\mu\text{mol/L}$) sono associate con patologie vascolari, coronariche e cerebrovascolari premature (5,10-12).

La condizione di iperomocisteinemia può essere rilevata, rispettivamente, nel 30% dei pazienti coronaropatici e nel 42% dei soggetti con malattie cerebrovascolari (13). I possibili meccanismi aterogenici dell'Hcy includono: alterazione della funzione piastrinica, stimolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, disfunzione endoteliale diretta o indotta da un aumento di stress ossidativo (14-22) (Figura 1). In particolare, in condizioni di iperomocisteinemia, si osserva inibizione dell'attività degli enzimi antiossidanti, come glutatione perossidasi (Gpx) o eme ossigenasi 1, attivazione delle NADPH ossidasi con produzione di anione superossido, anche da parte dell'enzima NO sintasi (NOS) disaccoppiato, con conseguente maggior ossidazione di Hcy e induzione del processo di perossidazione lipidica.

Hcy potrebbe quindi compromettere la normale funzione dell'endotelio vascolare sia interferendo con il "signaling" ossidoriduttivo cellulare (23) che riducendo la biodisponibilità di monossido d'azoto (NO), la più potente molecola ad azione vasodilatatoria di origine endoteliale (14). Hcy, infatti, è in grado di diminuire la sintesi di NO inibendo il catabolismo della dimetilarginina asimmetrica (ADMA), potente inibitore competitivo di NOS (24,25).

ADMA e il suo stereoisomero, la dimetilarginina simmetrica (SDMA), sono sintetizzati durante la metilazione dei residui di arginina (L-arg) delle proteine ad opera del-

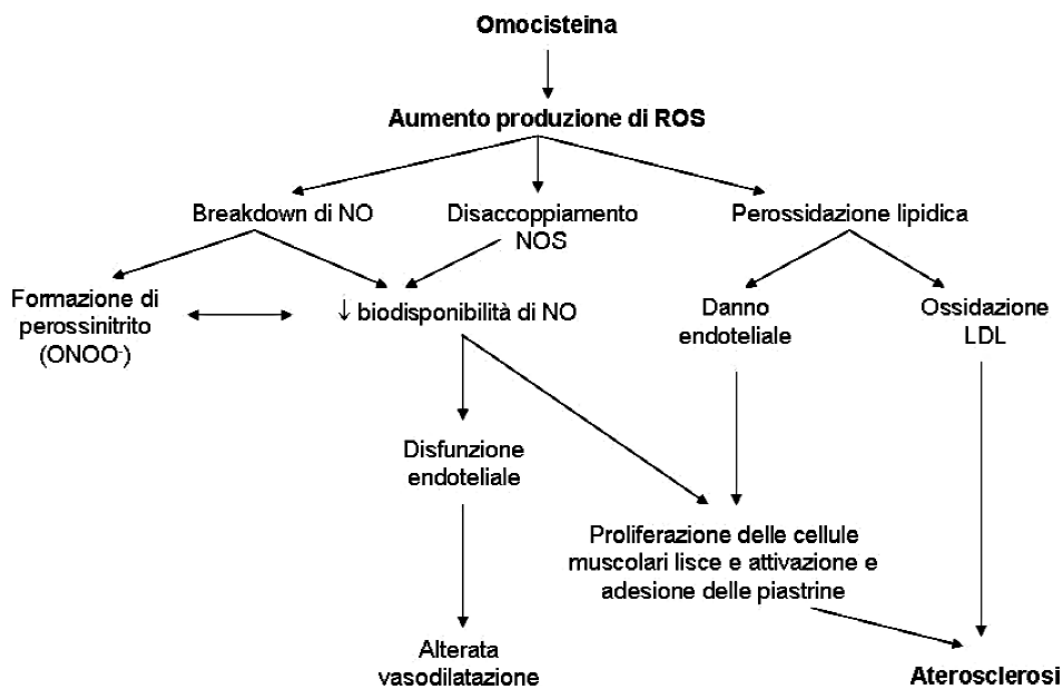


Figura 1

Possibili meccanismi attraverso i quali l'omocisteina può indurre lo sviluppo del processo aterosclerotico. ROS, specie reattive dell'ossigeno; NO, monossido d'azoto; NOS, enzima NO sintasi.

l'enzima S-adenosilmetionina:protein arginina metiltransferasi (PRMT) che trasferisce il gruppo metile da SAM a L-arg con formazione di metilarginina e SAH (Figura 2). Entrambe le dimetilarginine vengono eliminate per via urinaria; tuttavia, ADMA viene metabolizzata per il 90% dall'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH) che la degrada in citrullina e in dimetilammina (26). È stato dimostrato che l'enzima DDAH è particolarmente sensibile allo stress ossidativo perché contiene, nel sito catalitico attivo, un residuo di cisteina facilmente ossidabile (27).

Biochimicamente, Hcy e dimetilarginine sono legate da diversi meccanismi. Per primo, la metilazione dei residui di L-arg ad opera di PRMT, a dare ADMA e SDMA, porta alla formazione contemporanea di due molecole di Hcy. Secondo, Hcy può favorire la degradazione proteica destabilizzando la struttura delle proteine o aumentando lo stress ossidativo, portando quindi a una maggior formazione di dimetilarginine. Terzo, Hcy, inibendo l'enzima DDAH, può causare accumulo di ADMA.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la relazione tra le concentrazioni plasmatiche di Hcy, gli analiti coinvolti nel metabolismo di NO e lo stress ossidativo nella malattia coronarica, anche in rapporto alla funzionalità renale. A tal fine sono state misurate le concentrazioni plasmatiche di Hcy e confrontate con i livelli di malondialdeide (MDA), utilizzata come indicatore di stress ossidativo, e con le concentrazioni delle molecole implicate nel "pathway" metabolico di NO (L-arg, ADMA, SDMA).

MATERIALI E METODI

Pazienti e campioni

Sono stati arruolati 60 pazienti con coronaropatia, documentata angiograficamente, e 38 soggetti controllo (Ctr), reclutati tra lo staff ospedaliero o tra i parenti dei pazienti giudicati sani in quanto asintomatici e privi di anomalie all'ispezione clinica e agli esami ematochimici e strumentali di routine. Il gruppo pazienti, le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella 1, era costituito da 19 soggetti con sindrome coronarica acuta (SCA) e 41 con angina stabile (AS). I soggetti SCA, giunti in ospedale con sintomi anginosi, non presentavano soprasslivellamento del tratto ST all'esame elettrocardiografico; inoltre le concentrazioni di troponina plasmatica non risultavano alterate. I soggetti AS non presentavano cambiamenti della sintomatologia anginosa nei due mesi precedenti lo studio e mostravano una risposta stabile a ripetute prove da sforzo. La presenza di episodi di ischemia spontanea in questi pazienti è stata esclusa con monitoraggio Holter per 24 ore. I soggetti che presentavano patologie infiammatorie acute o croniche, malattie immunologiche, neoplastiche o carenze di vitamina B12 o folati sono stati esclusi dallo studio (28). Lo stato di insufficienza renale [clearance della creatinina (C_{Cr}) <60 mL/min] è risultato presente in 9 pazienti (IR). I valori di C_{Cr} sono stati calcolati utilizzando la formula di Cockcroft-Gault [C_{Cr} (mL/min) = [(140 - età) x peso (Kg)] / 72 x creatinina sierica (mg/dL) x (0,85 se femmina)].

Tutti i soggetti studiati hanno firmato il consenso informato e le procedure seguite sono state approvate

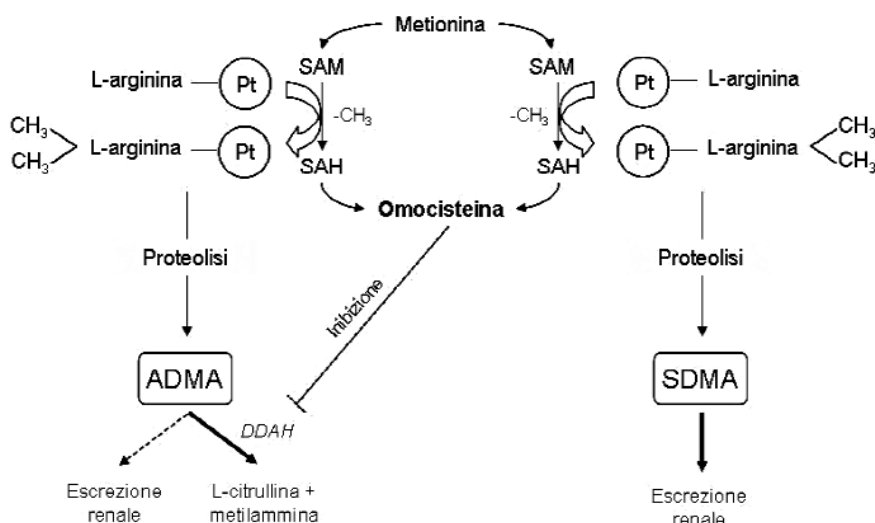


Figura 2

Sintesi ed eliminazione di dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e dimetilarginina simmetrica (SDMA).

Pt, proteina; SAM, s-adenosilmetionina; SAH, s-adenosilomocisteina; DDAH, dimetilarginina dimetilaminoidrolasi.

dal comitato etico e scientifico del Centro Cardiologico Monzino. Durante l'effettuazione dello studio è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996.

I campioni di sangue sono stati raccolti a digiuno in provette contenenti EDTA, tenute in ghiaccio e centrifugate (3000 x g per 10 min a 4 °C) entro 30 min dal prelievo. Per il siero, sono state utilizzate provette contenenti trombina (5 U NIH; Vacutainer Systems, Becton Dickinson), centrifugate a 3500 x g per 10 min a temperatura ambiente. Plasma e siero sono stati aliquotati e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Materiali e strumentazione

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich ove non specificato.

Il sistema HPLC utilizzato è costituito da due pompe a pistone ESA Model 582, autocampionatore termostatabile ESA Model 542 (ESA Biosciences) e detector fluorimetrico Jasco FP-1520 (Jasco, Inc). Il software EZ-star (Scientific Software Group) è stato utilizzato per l'acquisizione dei cromatogrammi e per la loro integrazione.

Determinazione di Hcy

Il dosaggio HPLC della Hcy prevede la derivatizzazione dei tioli con sale di ammonio dell'acido 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonico (SBD-F) e successiva analisi cromatografica. Brevemente, a 100 µL di plasma-EDTA vengono aggiunti 25 µL dell'agente riducente tris (2-carbossietil) fosfina cloridrato 10% (TCEP) e incubati per 30 min a temperatura ambiente. Le proteine plasmatiche vengono precipitate con l'aggiunta di 100 µL di acido tricloroacetico 10% e successiva centrifugazione a 10.000 rpm per 2 min. La derivatizzazione viene effettuata con SBD-F a pH 11 per 60 min a 60 °C al buio. Il campione (50 µL) viene separato su colonna a fase inversa Discovery C18 (250x4,6 mm, 5 µm; Supelco) in condizio-

ni isocratiche con l'utilizzo di una fase mobile costituita da tampone fosfato 100 mmol/L a pH 2,1 (10% di acetonitrile) a un flusso di 0,8 mL/min. L'eluato viene letto a 515 nm dopo eccitazione a 385 nm. I CV intra- e inter-assay sono risultati 1,8% e 5,5%, rispettivamente.

Determinazione di L-arg, ADMA e SDMA

La metodica HPLC per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di L-arg, ADMA e SDMA prevede la derivatizzazione degli aminoacidi con o-ftaldialdeide (OPA) e successiva analisi cromatografica (29). Brevemente, a 200 µL di plasma-EDTA vengono aggiunti 100 µL di monometilarginina (MMA) 2 µmol/L, quale standard interno, e 700 µL di tampone fosfato (PBS, 10 mmol/L). Il campione viene purificato su cartucce cromatografiche a scambio cationico (Oasis MCX, Waters), ed eluito con 1 mL di una miscela di ammoniaca/acqua/metanolo (1:4:5). Dopo evaporazione, il residuo secco è risospeso con 100 µL di acqua distillata a cui vengono aggiunti 100 µL di OPA 1 mg/mL in tampone borato di potassio 0,2 µmol/L pH 9,5. Il campione viene separato su una colonna a fase inversa Simmetry C18 (3,9x150 mm, 5 µm; Waters) munita di precolonna Simmetry C18 (3,9x20 mm, 5 µm; Waters) ed eluito a 30 °C, a un flusso di 1,4 mL/min, con tampone fosfato 50 mmol/L (8,7% di acetonitrile) a pH 6,5. Il campione viene rivelato a 455 nm dopo eccitazione a 340 nm. I CV intra- e inter-assay sono risultati 0,2% e 1,3% per L-arg, 1,6% e 4,0% per ADMA e 2,3% e 2,9% per SDMA.

Determinazione di MDA totale

La concentrazione di MDA totale è stata determinata utilizzando una metodica in gas-cromatografia-spettrometria di massa ad impatto elettronico (30). Come standard interno è stata utilizzata MDA deuterata (MDA-d₂) di sintesi. Le concentrazioni di MDA totale sono state determinate dopo idrolisi alcalina (NaOH 1 mol/L) a 60 °C prima

Tabella 1*Caratteristiche dei soggetti arruolati nello studio*

	Sindrome coronarica acuta	Angina stabile	Controlli	P
n	19	41	38	
Età (media ± SE)	62,8 ± 2,4	62,8 ± 1,2	60,3 ± 1,9	0,48
Sesso maschile (%)	12 (63,1)	33 (80,5)	23 (60,5)	0,69
Fumo (%)	3 (15,8)	6 (14,6)	5 (13,1)	0,96
Pregresso infarto miocardico (%)	2 (10,5)	4 (9,7)	-	0,92
Diabete (%)	1 (5,2)	6 (14,6)	-	0,29
Iperensione (%)	10 (52,6)	20 (48,8)	-	0,78
Ipercolesterolemia (%)	7 (36,8)	20 (48,8)	-	0,39
Clearance della creatinina <60 mL/min (%)	4 (21,0)	9 (21,9)	-	0,94

della procedura di derivatizzazione con fenilidrazina. I CV intra- e inter-assay sono rispettivamente 2,0% e 2,1%.

RISULTATI

I pazienti coronaropatici presentavano concentrazioni significativamente più elevate di Hcy plasmatica (media ± SE: 13,2 ± 1,3 μmol/L, 14,9 ± 1,5 μmol/L e 10,9 ± 0,4 μmol/L in SCA, AS e Ctr, rispettivamente) e di MDA (7,1 ± 0,2 μmol/L, 5,7 ± 0,3 μmol/L e 4,5 ± 0,2 μmol/L in SCA, AS e Ctr, rispettivamente) (Figura 3). Le concentrazioni plasmatiche dei fattori coinvolti nella sintesi di NO sono illustrate nella Figura 4. L-arg risultava diminuita significativamente solo in SCA (70,1 ± 4,4 μmol/L, 85,1 ± 2,8 μmol/L e 87,1 ± 3,5 in SCA, AS e Ctr, rispettivamente). Le concentrazioni di ADMA e di SDMA risultavano essere più elevate in AS (ADMA: 0,44 ± 0,02 μmol/L, 0,53 ± 0,02 μmol/L e 0,44 ± 0,02 μmol/L; SDMA: 0,44 ± 0,03 μmol/L, 0,52 ± 0,02 μmol/L e 0,40 ± 0,02 μmol/L in SCA, AS e Ctr, rispettivamente). I rapporti tra substrato e inibitori della sintesi di NO, espressi come rapporto tra L-arg e dimetilarginine, erano significativamente più bassi nei pazienti rispetto ai Ctr (L-arg/ADMA: 157,4 ± 7,5, 163,8 ± 4,5 e 205,2 ± 6,8; L-arg/SDMA: 167,7 ± 11,0, 170,4 ± 38,3 e 220,3 ± 47,4 in SCA, AS e Ctr, rispettivamente; P < 0,0001 in SCA e in AS vs. Ctr).

Nei soggetti studiati era presente una correlazione positiva tra le concentrazioni di Hcy e quelle di MDA e di SDMA (Figura 5). Nei pazienti con insufficienza renale le concentrazioni di SDMA e di Hcy risultavano essere più elevate rispetto ai pazienti con funzione renale normale (SDMA: 0,63 ± 0,08 μmol/L e 0,45 ± 0,02 μmol/L; Hcy: 18,1 ± 4,5 μmol/L e 13,4 ± 1,4 μmol/L, rispettivamente).

DISCUSSIONE

Alcuni Autori hanno suggerito che Hcy può danneggiare l'endotelio vascolare, sia attraverso un meccanismo diretto che attraverso l'alterazione dello stato ossidativo (31). Il nostro studio ha evidenziato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di Hcy e di MDA, prodotto terminale delle reazioni di perossidazione lipidica, nei soggetti coronaropatici rispetto ai soggetti sani. In

tutti i soggetti presi in considerazione è inoltre presente una correlazione positiva tra i livelli di Hcy e di MDA totale. Tale osservazione risulta in accordo con precedenti studi che hanno mostrato che elevate concentrazioni plasmatiche di Hcy sono associate ad aumentata perossidazione lipidica (32-34). Altri Autori hanno inoltre osservato un aumentato stress ossidativo dopo carico di metionina (35). I nostri risultati riflettono quindi un parallelo aumento di Hcy e di stress ossidativo, causato in particolare dai processi di perossidazione lipidica, nel processo aterosclerotico.

La determinazione dei fattori coinvolti nella sintesi di NO effettuata in questo studio ha messo in evidenza che nei soggetti coronaropatici sono presenti differenti alterazioni a seconda della presentazione clinica, acuta o cronica, della malattia. In particolare, abbiamo evidenziato che soprattutto i pazienti con SCA presentano significative diminuzioni delle concentrazioni di L-arg plasmatica, in accordo con lo studio di Frøbert et al. (36), i quali hanno osservato che i pazienti con patologia coronarica acuta presentavano concentrazioni più basse di L-arg rispetto ai soggetti con angina stabile. Tale diminuzione era giustificata da una ridotta sintesi di L-arg oppure da un aumentato catabolismo da parte dell'enzima arginasi. Altri Autori hanno evidenziato che alcuni farmaci, come i fibrati o i β-antagonisti, inibiscono il catabolismo di L-arg (37,38). A nostro avviso, l'utilizzo più frequente di questi farmaci da parte dei soggetti con AS potrebbe quindi fornire un'ulteriore spiegazione alla differenza riscontrata con i soggetti SCA.

Numerosi studi hanno evidenziato un'implicazione delle metilarginine nello sviluppo e nella progressione delle patologie aterosclerotiche (39-41). Il nostro studio ha rilevato che solo i soggetti con AS presentano in circolo concentrazioni più alte di ADMA e di SDMA. Tale risultato è in accordo con lo studio di Lu et al. (39) che evidenzia il ruolo di ADMA come fattore di rischio cardiovascolare indipendente nei pazienti con AS. Al contrario, Krempl et al. (42) hanno osservato che nei pazienti con patologia cardiovascolare, l'angina instabile è associata a concentrazioni significativamente elevate di ADMA, se confrontata con l'AS. In questo lavoro non sono però stati indagati gli effetti della procedura di rivascolarizzazione coronarica percutanea che è stata effettuata prima

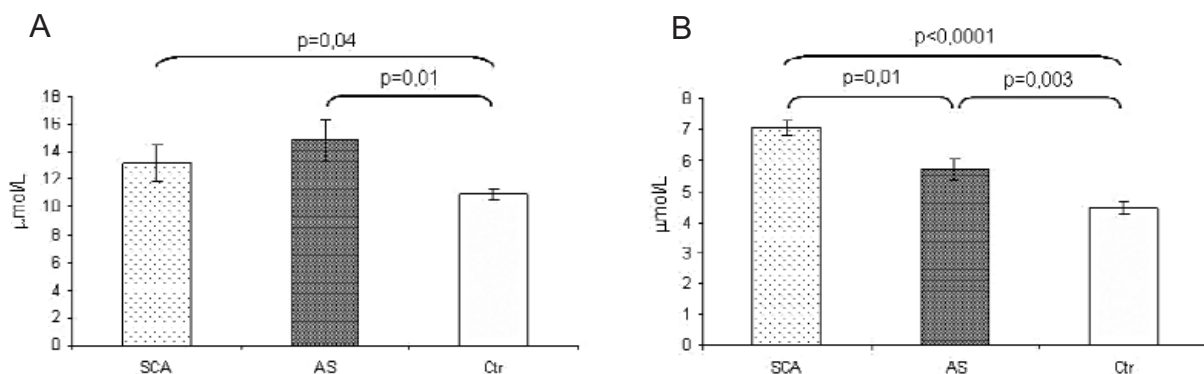


Figura 3
 Concentrazioni plasmatiche di omocisteina (A) e di malondialdeide (B) nei soggetti studiati. SCA, sindrome coronarica acuta; AS, angina stabile; Ctr, controlli.

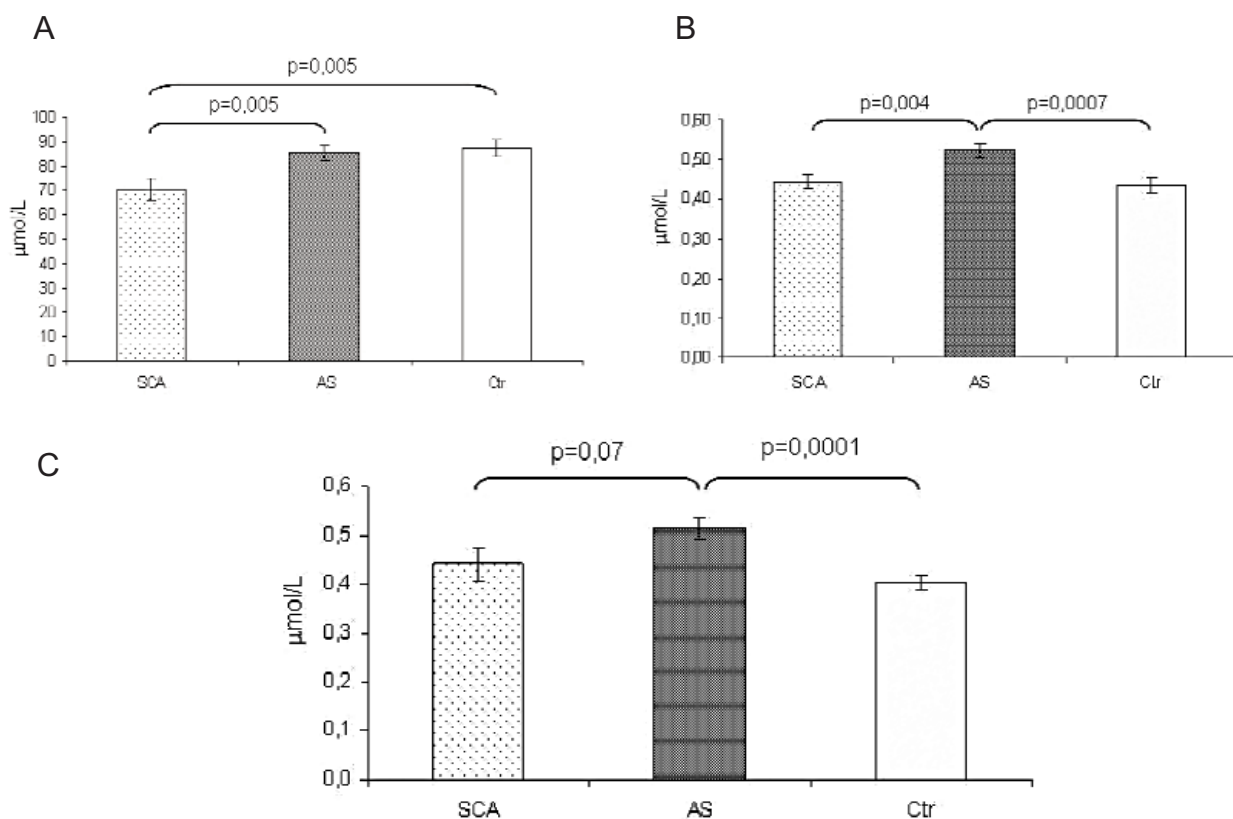


Figura 4
 Concentrazioni plasmatiche di L-arginina (A), dimetilarginina asimmetrica (B) e dimetilarginina simmetrica (C) nei soggetti studiati. SCA, sindrome coronarica acuta; AS, angina stabile; Ctr, controlli.

del prelievo per i dosaggi delle metilarginine. Questo tipo di procedura potrebbe, infatti, peggiorare lo stato infiammatorio ed ossidativo caratteristico della SCA ed influenzare i livelli di metilarginine.

Un fattore importante da considerare per le possibili implicazioni sulla concentrazione plasmatica di questi analiti è la funzionalità renale. Numerosi studi hanno mostrato che l'aumento della mortalità e degli eventi cardiovascolari in soggetti con insufficienza renale è indipendente dai fattori di rischio tradizionali, come l'iperten-

sione, il diabete, il fumo e l'iperlipidemia (43,44). Fattori di rischio alternativi che potrebbero contribuire alla patologia cardiovascolare nell'insufficienza renale includono l'iperomocisteinemia ed elevate concentrazioni di dimetilarginine plasmatiche.

Nel nostro studio, abbiamo osservato che le concentrazioni di Hcy e di SDMA sono più elevate nei pazienti con $C_{Cr} < 60$ mL/min. Non abbiamo invece evidenziato alcuna correlazione tra i livelli di ADMA e funzionalità renale. Questo risultato è in accordo con altri studi

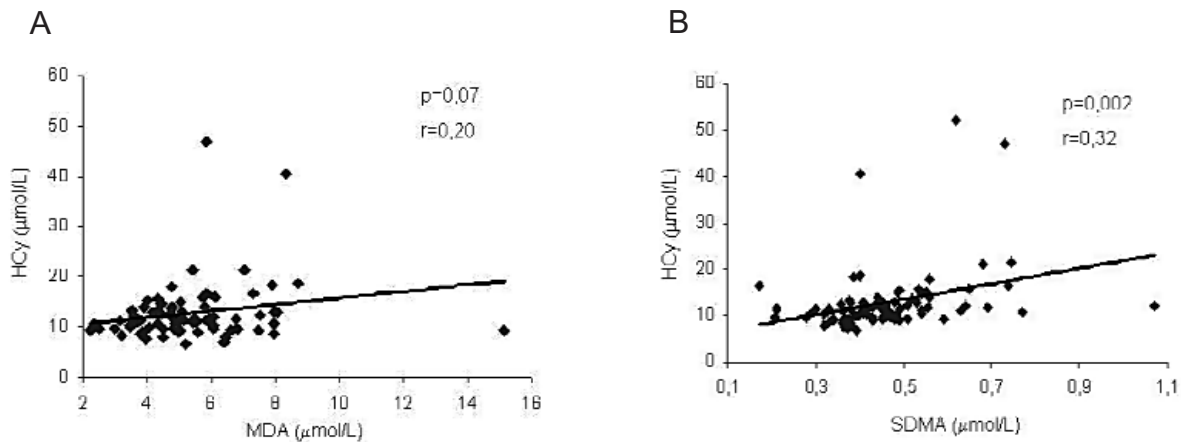


Figura 5

Relazione tra le concentrazioni di omocisteina (Hcy) e di malondialdeide (MDA) (A) e tra quelle di Hcy e di dimetilarginina simmetrica (SDMA) (B).

(45,46) che mostrano in tali pazienti un aumento pronunciato solo di SDMA, in quanto ADMA viene catabolizzata soprattutto per via enzimatica e solo parzialmente eliminata per via urinaria (26). Abbiamo inoltre osservato che Hcy e SDMA mostrano una significativa correlazione positiva in tutti i soggetti arruolati per lo studio. Casistiche più ampie consentiranno di determinare se questa correlazione è dipendente dalla funzionalità renale.

L'insufficienza renale potrebbe quindi indurre un aumento della concentrazione plasmatica di SDMA, che compete per il trasporto intracellulare della L-arg, causando una diminuita sintesi di NO e, come recentemente dimostrato, il disaccoppiamento dell'enzima NOS, con conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno e alterazione dello stato ossidativo (47). Inoltre l'elevata concentrazione di Hcy, con il suo potenziale ossidante, potrebbe peggiorare ulteriormente la funzionalità endoteliale e aumentare il rischio di patologie cardiovascolari nei soggetti con insufficienza renale (48,49).

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che Hcy potrebbe essere implicata nella patogenesi delle coronaropatie, da una parte per mezzo di un aumentato stress ossidativo e dall'altra attraverso l'alterazione della sintesi di NO. Ulteriori, più ampi studi sono necessari per comprendere il ruolo di Hcy e SDMA quali fattori di rischio cardiovascolare nel contesto dell'insufficienza renale.

BIBLIOGRAFIA

- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986;261:1582-7.
- Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
- Bautista LE, Arenas IA, Peñuela A, et al. Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Clin Epidemiol* 2002;55:882-7.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
- Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;144:471-501.
- Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. DACH-LIGA homocysteine (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;4:1392-403.
- Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-50.
- Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:517-27.
- Arnesen E, Refsum H, Børnaa KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995;24:704-9.
- Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049-57.
- Araki A, Sako Y, Fukushima Y. Plasma sulfhydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis* 1989;79:139-46.
- Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening and treatment. *Arch Intern Med* 1998;158:1301-6.
- Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005;6:27-36.
- Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, et al. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999;100:1161-8.
- Topal G, Brunet A, Millanvoye E, et al. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1532-41.
- Tawakol A, Omland T, Gerhard M, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997;95:1119-21.
- Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to

- copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77:1370-6.
19. Radomski MW, Salas E. Nitric oxide-biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1995;118:S69-80.
 20. McCully K. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996;2:386-9.
 21. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6369-73.
 22. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, et al. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976;58:731-41.
 23. Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:547-59.
 24. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933-8.
 25. Wanby P, Brattström L, Brudin L, et al. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:347-53.
 26. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205-9.
 27. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, et al. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13527-32.
 28. Duell PB, Malinow MR. Homocyst(e)inemia, risk of atherosclerosis: a clinical approach to evaluation and management. *Endocrinologist* 1998;8:170-7.
 29. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, et al. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131-7.
 30. Cighetti G, Debiasi S, Paroni R, et al. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. *Anal Biochem* 1999;266:222-9.
 31. Stampler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular events of homocysteine are modulated by endothelium derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;91:308-18.
 32. Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, et al. Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1263-6.
 33. Wang G, Mao JM, Wang X, et al. Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. *Chin Med J* 2004;117:1650-4.
 34. Moselhy SS, Demerdash SH. Plasma homocysteine and oxidative stress in cardiovascular disease. *Dis Markers* 2003-2004;19:27-31.
 35. Ventura P, Panini R, Verlato C, et al. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced methionine oral loading. *Metab Clin Exp* 2000;49:225-8.
 36. Frøbert O, Hjortshøj SP, Simonsen U, et al. Methylated arginines in stable and acute patients with coronary artery disease before and after percutaneous revascularization. *Int J Cardiol* 2008;129:288-91.
 37. Dierkes J, Westphal S, Martens-Lobenhoffer J, et al. Fenofibrate increases the L-arginine:ADMA ratio by increase of L-arginine concentration but has no effect on ADMA concentration. *Atherosclerosis* 2004;173:239-44.
 38. Bernard AC, Fitzpatrick EA, Maley ME, et al. Beta adrenoceptor regulation of macrophage arginase activity. *Surgery* 2000;127:412-8.
 39. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, et al. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003;24:1912-9.
 40. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-6.
 41. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.
 42. Krempl TK, Maas R, Sydow K. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J* 2005;26:1846-51.
 43. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:S16-23.
 44. Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296-305.
 45. Busch M, Fleck C, Wolf G, et al. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease-possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids* 2006;30:225-32.
 46. Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, et al. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1999-2002.
 47. Mueller CFH, Laude K, McNally Js, et al. Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:274-8.
 48. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.
 49. Kumagai H, Sakurai M, Takita T, et al. Association of homocysteine and asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis and cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2006;48:797-805.