

HUBUNGAN ANTARA HOMOSISTEIN DAN NITRIT OKSID PADA HIPERTENSI ESENSIAL DI JAWA TENGAH, INDONESIA

Sunarti¹, Ahmad Husain Asdie², Mohammad Hakimi³, Abdul Salam M Sofro⁴

¹Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, UGM, Yogyakarta

²Bagian Ilmu Penyakit Dalam, FK UGM/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta

³Bagian Ilmu Kebidanan dan Penyakit Kandungan, FK UGM/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta

⁴Bagian Biokimia YARSI

ABSTRACT

Background: The essential hypertension has been related to endothelium-dependent vasodilatation disorders that result of decreasing of nitric oxide (NO) bioavailability. Decreasing of NO can be caused by increase of homocysteine level.

Objective: This study is aimed at finding out the effect of homocysteine level on nitric oxide level in essential hypertension, and relationship between NO and blood pressure and hypertension risk in Central Java.

Method: This study was case-control nested, in "Surveillance of Non-Communicable Diseases" in Purworejo, Central Java. The subjects were men with essential hypertension and 20-60 years old that had normal value of urine creatinine, blood glucose, cholesterol and triacylglycerol. They didn't take antihypertension drugs. The methods of Pfeiffer, *et al.*¹ was used to identify total plasma homocysteine level. NO level was determined by Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision Cat.K262200).

Result: The homocysteine level of the hypertension is higher than that of the non- hypertension (16.15 + 12.69 vs 12.73 + 5.73; P=0.035), whereas the nitric oxide level of the hypertension is lower than that of the non-hypertension (8.22 + 1.88 vs 9.49 + 3.05; P=0.003). Homocysteine level was significantly correlated with nitric oxide level (P=0,016). Negative correlation between nitric oxide level and systolic and diastolic pressures was significant (P=0,005; P=0,045), respectively in subjects of 40-60 years old but not significant (P=0,106; P=0,269), respectively in those younger (20-39 years old). The relationship between nitric oxide and hypertension risk was significant (P=0,005) in subjects of 40-60 years old but not significant (P=0,062) in those younger (20-39 years old).

Conclusion: The high homocysteine level is a risk factor of hypertension, that reduces the NO bioavailability. The reducing of NO bioavailability was related to increase of blood pressure and hypertension risk, especially it was in the old men.

Keywords: homocysteine, nitric oxide, hypertension, Central Java, Indonesia

PENDAHULUAN

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gangguan vasodilatasi yang tergantung endotel terjadi pada penderita hipertensi esensial. Gangguan vasodilatasi yang tergantung endotel pada penderita hipertensi esensial ini dikarenakan penurunan ketersediaan nitrit oksid (NO). Nitrit oksid (NO) merupakan *Endothel Derived Releasing Factor* (EDRF) yang bersifat sebagai vasodilator dan pelicin untuk mencegah perlekatan *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan sel-sel darah.²

Nitrit oksid merupakan suatu faktor vasodilator dari sel endotel pada pembuluh arteri maupun pembuluh resisten. Nitrit oksid dapat menyebabkan guanilil siklase dalam otot polos vaskuler tidak aktif, sehingga terjadi akumulasi guanosin monofosfat sitosol (cGMP) dan relaksasi. Nitrit oksid diproduksi oleh sel endotel dari asam amino L-arginin dalam suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim nitrit oksid sintase (NOS).³ Sintesis NO dari endotel vaskuler terjadi secara terus menerus untuk mempertahankan

tonus vaskuler. Produksi NO dari endotel dipengaruhi oleh kadar homosistein plasma.⁴ Hiperhomosisteinemia akut mengganggu dilatasi mikrovaskuler pada sirkulasi koroner sebagai akibat penurunan ketersediaan NO.⁵ Mekanisme hiperhomosisteinemia menurunkan ketersediaan NO yang menyebabkan disfungsi endotel dapat melalui perubahan status oksidatif (stres oksidatif)⁶ maupun tanpa mengubah status oksidatif.⁷

Awal paparan homosistein pada sel endotel yang dikultur menyebabkan pembentukan dan pelepasan NO, S-nitrosotiol, dan S-nitrosohomosistein, senyawa dengan sifat-sifat vasodilator poten dan *inhibitor platelet*. Akan tetapi paparan yang terus-menerus mempengaruhi efek oksidatif homosistein dengan hasil akhir radikal O_2^- dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang menyebabkan penurunan produksi dan atau inaktivasi NO yang berakibat vasokonstriksi.⁸ Austin⁹ mengemukakan bahwa mekanisme hiperhomosisteinemia menurunkan ketersediaan NO melalui peningkatan inaktivasi oksidatif NO atau

penghambatan produksi NO oleh asimetrik dimetilarginin (ADMA). Kadar ADMA diatur oleh aktivitas enzim *dimetilarginin dimetilaminohidrolase* (DDAH). Homosistein menurunkan ekspresi DDAH yang kemungkinan menyebabkan akumulasi ADMA. Peningkatan ADMA menghambat produksi NO dan terlibat “*uncoupling*” nitrit oksid sintase endotel, sehingga menyebabkan peningkatan produksi O_2^- yang selanjutnya menurunkan ketersediaan NO.¹⁰ Pada sel otot polos vaskuler tikus, homosistein meningkatkan akumulasi ADMA yang menurunkan kadar basal NO.¹¹

Homosistein merupakan suatu senyawa hipertensif yang bereaksi dengan faktor relaksasi derivat endotel membentuk S-nitroso-homosistein dan superoksid yang menyebabkan hilangnya kekuatan vasodilatasi.¹² Homosistein pertama kali dideskripsi oleh Butz dan du Vigneaud pada tahun 1932. Homosistein merupakan asam amino yang mengandung sulfur yang tidak terdapat dalam diet tetapi dibentuk sebagai hasil antara katabolisme metionin.¹³ Dalam sel, homosistein terutama berada dalam bentuk tereduksi, sedangkan di ekstrasel homosistein sebagian besar ditemukan dalam bentuk teroksidasi baik sebagai suatu disulfida atau terikat protein. Homosistein tereduksi mempunyai gugus tiol bebas yang sangat reaktif, yang dapat berpartisipasi dalam reaksi redoks pada pH fisiologis, mudah mengalami autooksidasi membentuk ikatan disulfid antara dua molekul homosistein (homosistin) atau campuran disulfid dengan sistein. Kemungkinan lain, homosistein tereduksi dapat membentuk ikatan disulfid dengan protein misal albumin.¹⁴

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Rancangan penelitian adalah *Case-Control* yang tersarang pada penelitian survai *Non Communicable Diseases* di Kabupaten Purworejo yang dilakukan oleh *Community Health Nutrition* (CHN), FK UGM, Yogyakarta. Subjek penelitian adalah laki-laki hipertensi, umur 20 – 60 tahun, tidak mempunyai riwayat gagal ginjal, tidak menderita diabetes mellitus, tidak hiperlipidemia atau *obese*. Definisi hipertensi berdasarkan *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC VII). Seseorang dikatakan hipertensi apabila tekanan darah diastolik ≥ 90 mm Hg dan atau sistolik

≥ 140 mm Hg. Subjek kontrol adalah orang sehat dengan kriteria sama dengan subjek kasus tetapi tidak hipertensi.

a. Pengumpulan Data

Identifikasi subjek hipertensi dilakukan dengan mengukur tekanan darah sebanyak tiga kali selama penelitian survei oleh CHN, FK UGM, Yogyakarta dan tekanan darah dicek kembali saat pengambilan darah. Pemilihan subjek yang sesuai kriteria dilakukan di lapangan dengan kuesioner dan dilaboratorium dengan pengukuran kadar kreatinin urin, glukosa, kolesterol dan trigliserida darah.

b. Analisis laboratorium

Kadar glukosa, kolesterol, trigliserida darah serta kreatinin urin diukur dengan spektrofotometer menggunakan Kit Diasys. Kadar total homosistein plasma ditentukan menurut metode Pfeiffer¹ dengan HPLC, sedangkan kadar nitrit oksid ditentukan dengan *Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision Cat.K262200)*.

c. Analisis statistik

Hubungan antara kadar homosistein dan nitrit oksid, antara nitrit oksid dan tekanan darah dianalisis dengan uji regresi linier. Hubungan antara kadar nitrit oksid dan risiko hipertensi dianalisis dengan uji regresi logistik.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini diperoleh 150 subjek penelitian yang terdiri dari 76 kasus dan 74 kontrol. Semua subjek mempunyai kadar glukosa, kolesterol, trigliserida darah serta kreatinin urin dalam kisaran normal walaupun secara statistik kadar trigliserida antara kasus dan kontrol berbeda bermakna ($p=0,023$). Rata-rata indeks massa tubuh pada kasus dan kontrol secara statistik berbeda secara bermakna ($p=0,010$), akan tetapi seluruh subjek tidak ada yang *obese* atau secara klinis dalam keadaan normal. Distribusi umur agak berbeda di antara kasus dan kontrol. Pada kasus, sebanyak 20 (26,32%) subjek berumur 20-39 tahun dan 56 (73,68%) subjek berumur antara 40-60 tahun. Pada kontrol yang berumur 20-39 tahun sebanyak 43 (58,11%) dan umur 40-60 tahun sebanyak 31 (41,89%) (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Subjek Hipertensi Esensial dan Kontrol

Variabel	Hipertensi n = 76	Non Hipertensi n = 74	P (CI; 95%)
Sistolik (mmHg):	149,3 ± 15,3	120,2 ± 9,5	0,000 (-33,2;-25,0)
Diastolik (mmHg)	94,0 ± 8,9	78,8 ± 6,9	0,000 (-17,8;-12,7)
BMI (kg/m ²)	21,2 ± 2,5	20,2 ± 2,0	0,010 (-1,7; -0,2)
Glukose (mg/dl)	98,4 ± 14,4	97,9 ± 13,3	0,840 (-4,9; 4,0)
Trigliserida (mg/dl)	112,7 ± 33,4	101,0 ± 29,0	0,023 (-21,8; -1,6)
Kolesterol (mg/dl)	173,3 ± 29,5	170,1 ± 27,9	0,495 (-12,5; 6,1)
Kreatinin urin (mg/dl)	4,51 ± 2,25	5,34 ± 2,97	0,054 (0,02; 1,68)
Umur: 20-39 tahun;n(%)	20 (26,32%)	43 (58,11%)	
Umur: 40-60 tahun;n(%)	56 (73,68%)	31 (41,89%)	

Kadar homosistein dan nitrit oksid pada kasus dan kontrol secara statistik berbeda secara signifikan (Tabel 2).

umur 20-39 tahun korelasi tersebut tidak signifikan. Pada subjek umur 40-60 tahun, kadar nitrit oksid juga berkorelasi negatif secara signifikan dengan

Tabel 2. Kadar Homosistein dan Nitrit Oksid Subjek Hipertensi Esensial dan Kontrol

Variabel	Hipertensi n = 76	Non Hipertensi n = 74	P (CI; 95%)
Homosistein (µmol/L)	16,15 ± 12,69	12,73 ± 5,73	0,035 (-6,59; 0,24)
Nitrit oksid (µmol/L)	8,22 ± 1,88	9,49 ± 3,05	0,003 (0,44; 2,08)

Pada subjek umur 40-60 tahun, kadar homosistein dan nitrit oksid berkorelasi negatif yang secara statistik signifikan, sedangkan pada subjek

tekanan darah diastolik maupun sistolik, sedangkan pada subjek umur 20-39 tahun korelasi tersebut tidak signifikan (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Analisis Regresi antara Kadar Homosistein dan Nitrit Oksid, Kadar Nitrit Oksid dan Tekanan Darah Diastolik maupun Sistolik

	Subjek	Beta	P (95%, CI)	R ²
Homosistein <i>versus</i> nitrit oksid	Total subjek	-0,051	0,017 (-0,09; 0,01)	0,038
	20-39 tahun	-0,021	0,358 (-0,07; 0,02)	0,014
	40-60 tahun	-0,105	0,007 (-0,18; -0,03)	0,083
Nitrit oksid <i>versus</i> diastolik	Total subjek	-0,699	0,043 (-1,38; -0,02)	0,027
	20-39 tahun	-0,559	0,269 (-1,56; 0,44)	0,020
	40-60 tahun	-0,901	0,045 (-1,78; -0,02)	0,047
Nitrit oksid <i>versus</i> sistolik	Total subjek	-1,666	0,006 (-2,84; -0,49)	0,050
	20-39 tahun	-1,214	0,106 (-2,69; 0,27)	0,042
	40-60 tahun	-2,200	0,005 (-3,73; -0,67)	0,087

Hasil analisis regresi logistik menunjukkan bahwa pengaruh kadar nitrit oksid terhadap risiko hipertensi dipengaruhi umur. Perbedaan pengaruh kadar nitrit oksid terhadap risiko hipertensi pada subjek umur 20-39 tahun dan 40-60 tahun terdapat dalam Tabel 4.

endotel, sehingga akan mengurangi produksi NO dari sel endotel. Dalam kultur sel endotel yang dipapar homosistein secara terus-menerus dihasilkan radikal O_2^- dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang akan menyebabkan penurunan produksi nitrit oksid.⁸ Pendapat yang sama dikemukakan oleh Hucks²⁰

Tabel 4. Hasil Uji Regresi Logistik antara Nitrit Oksid dengan Kejadian Hipertensi

Subjek	β	SE	OR (95%, CI)	P
Total subjek	-0,253	0,078	0,776 (0,68; 0,92)	0,002
Umur <40 tahun	-0,283	0,151	0,754 (0,56; 1,01)	0,062
Umur \geq 40 tahun	-0,270	0,096	0,764 (0,63; 0,92)	0,005

PEMBAHASAN

Hasil menunjukkan bahwa kadar homosistein pada kasus lebih tinggi dan berbeda secara signifikan dengan kontrol ($P=0,035$). Hasil ini sesuai yang dilaporkan oleh Rodríguez-Esparragón¹⁵ bahwa pada laki-laki hipertensi, kadar total homosistein lebih tinggi dibandingkan dengan laki-laki non-hipertensi ($P=0,039$). Lim dan Cassano¹⁶ dan Neugebauer¹⁷ juga mengemukakan bahwa peningkatan homosistein dapat meningkatkan tekanan darah. Jiang¹⁸ melaporkan bahwa pada penderita hipertensi, peningkatan homosistein plasma berhubungan secara positif dengan tekanan darah. Individu yang diberi pengobatan penurunan homosistein, terjadi penurunan tekanan darah.

Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa hubungan antara kadar homosistein dan nitrit oksid dipengaruhi usia. Pada subjek dengan umur ≥ 40 tahun hubungan tersebut signifikan ($R=-0,288$; $p=0,007$), tetapi pada subjek dengan umur <40 tahun tidak signifikan ($R=-0,118$; $p=0,358$) (Tabel 2). Pada subjek usia <40 tahun kemungkinan sel endotel belum mengalami penurunan fungsi, sehingga endotel masih mampu mengkompensasi efek negatif dari kadar homosistein yang tinggi.

Pengaruh peningkatan kadar homosistein terhadap penurunan produksi NO oleh sel endotel telah dikemukakan oleh Szolnoki.⁴ Walaupun mekanisme pengaruh peningkatan homosistein terhadap penurunan kadar nitrit oksid belum diketahui secara pasti, tetapi sebagian besar hasil penelitian menunjukkan bahwa penurunan kadar nitrit oksid akibat peningkatan homosistein melalui stres oksidatif. Viridis¹⁹ mengemukakan bahwa hiperhomosisteinemia akan meningkatkan produksi radikal superoksida (O_2^-) yang akan menurunkan fungsi

bahwa homosistein menyebabkan penurunan ketersediaan NO melalui pengaturan sistem penghasilan O_2^- .

Mekanisme hiperhomosisteinemia menginduksi disfungsi endotel dengan penurunan ketersediaan NO melalui mekanisme alternatif seperti peningkatan inaktivasi oksidatif NO atau penghambatan produksi NO oleh asimetrik dimetilarginin (ADMA).⁹ Pada sel otot polos vaskuler tikus, homosistein meningkatkan akumulasi ADMA yang menurunkan kadar basal NO.¹¹ Asimetrik dimetilarginin disintesis oleh sel endotel manusia dari arginin dan dimetabolisme menjadi sitrulin sebelum diekskresi ke dalam urin. Pada manusia, peningkatan ADMA juga ditemukan pada anak-anak hipertensi. Akumulasi ADMA meningkatkan aterosklerosis melalui kehilangan NO.²¹

Stühlinger²² juga mengemukakan bahwa homosistein mengganggu jalur sintesis NO dengan menghambat aktivitas enzim dimetilarginin dimetilaminohidrolase (DDAH), meningkatkan akumulasi ADMA yang selanjutnya menurunkan pelepasan NO dari sel endotel. Thambyrajah dan Townend²³ mengemukakan bahwa homosistein akan meningkatkan stres oksidatif melalui produksi radikal bebas dan penghambatan aktivitas enzim glutathion peroksidase. Stres oksidatif ini akan meningkatkan degradasi NO, sehingga menurunkan ketersediaan NO. Penurunan ketersediaan NO akan menurunkan pertahanan endotel, sehingga endotel mudah rusak atau mengalami disfungsi. Disfungsi endotel akhirnya juga akan menurunkan ketersediaan NO melalui penurunan sintesis NO oleh endotel.

Pengaruh penurunan kadar NO terhadap tekanan darah terlihat lebih nyata pada tekanan sistolik dibandingkan tekanan diastolik. Hubungan

antara nitrit oksid dengan tekanan sistolik maupun diastolik terlihat signifikan pada subjek dengan umur >40 tahun, sedangkan pada subjek dengan umur <40 tahun tidak signifikan (Tabel 3). Hasil ini juga sesuai dengan nilai regresi logistik antara nitrit oksid dengan risiko kejadian hipertensi yang menunjukkan bahwa nilai regresi yang signifikan terjadi pada subjek dengan umur di >40 tahun, sedangkan pada subjek dengan umur <40 tahun tidak signifikan (Tabel 4). Salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan nilai signifikansi hubungan NO dengan tekanan darah pada umur <40 tahun dan >40 tahun adalah stres oksidatif pada subjek yang lebih tua. Menurut Blackwell²⁴, stres oksidatif terlibat dalam mekanisme penting disfungsi endotel vaskuler yang diinduksi penuaan. Pada mencit tua terjadi peningkatan pembentukan radikal bebas pada aorta dan penuaan berhubungan dengan peningkatan produksi O_2^- . Pada arteri tua, terjadi produksi NO dan O_2^- secara simultan yang menyebabkan terbentuknya peroksinitrit ($ONOO^-$). Dengan demikian, pada subjek usia tua (>40 tahun), disfungsi endotel akibat penurunan NO akan diperparah dengan adanya stres oksidatif terkait proses penuaan.

Menurut Smith dan Hagen²⁵, penuaan merupakan faktor risiko terbesar untuk penyakit kardiovaskuler karena pada penuaan terjadi gangguan fungsi vasomotor arteri yang terutama disebabkan oleh penurunan NO dari endotel. Hasil ini sesuai dengan teori bahwa NO berperan dalam pengaturan tekanan darah dan penurunan ketersediaan NO merupakan faktor penting selama penuaan sel endotel.²⁵ Peroksinitrit yang dihasilkan dari NO dan O_2^- menyebabkan kematian sel dalam penuaan dan penyakit degeneratif terkait umur.²⁶

KESIMPULAN DAN SARAN

Kadar homosistein tinggi merupakan suatu faktor risiko hipertensi melalui penurunan ketersediaan nitrit oksid, sehingga mengganggu vasodilatasi vaskuler. Penurunan kadar nitrit oksid berkaitan dengan peningkatan tekanan darah dan risiko hipertensi terutama pada orang tua. Untuk mencegah peningkatan kadar homosistein darah, terutama orang tua perlu mengurangi makanan yang dapat menginduksi peningkatan kadar homosistein seperti daging.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya tujukan kepada Kepala Dinas Kesehatan, Dokter, Perawat, Kepala Desa atau Kepala Dukuh di tempat sampel penelitian ini diambil di Purworejo, Jawa Tengah, dr.Nawi Ng, MPH., Ph.D Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat, FK, UGM, Agung Nugroho, M.Sc. Lembaga Penelitian Kesehatan dan Gizi Masyarakat (LPKGM), FK, UGM, Juergen Erhardt, Ph.D di Institute of Biological Chemistry and Nutrition, Universitas Hohenheim Germany.

KEPUSTAKAAN

1. Pfeiffer, C.M., Huff, D.L. and Gunter, E.W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem.* 1999; 45(2): 290-292
2. Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Salvetti, A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol.* 2000;13:205-210.
3. Lentz, S.R., Rodionov, R.N., Dayal, S. Hyperhomosisteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis suppl.* 2003; 4:61-5.
4. Szolnoki, Z., Havasi, V., Bene, J., Komlúsi, K., Szóke, D., Somogyvári, F., Kondacs, A., Szabó, M., Fodor, L., Bodor, A., Gáti, I., Wittman, I., Melegh, B. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Mammal Scand* 2005; 111: 29-33.
5. Tawakol, A., Forgiione, M.A., Stuehlinger, M., Alpert, N.M., Cooke, J.P., Loscalzo, J., Fischman, A.J., Creager, M.A. and Gewirtz, H. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;40:1051-8.
6. Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Versari, D., Taddei, S., Salvetti, A. hyperhomocysteinemia: Is this a novel risk factor in hypertension? *J Nephrol.* 2002; 15(4): 414 – 21.
7. Chao, C-L., Kuo, T-L., Lee, Y-T. Effects of methionine-induced hyperhomosisteinemia on endothelium-dependent vasodilatation and oxidative status in healthy adults. *Circulation.* 2000;101:485-90.
8. Chambers, J.C., Obeid, O.A. and Kooner, J.S. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial

- dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:2922-7.
9. Austin, R.C., Lantz, S.R. and Werstuck, G.H. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death and Differentiation* 2004;11:S56-S64.
 10. Tyagi, N., Sedoris, K.C., Steed, M., Ovechkin, A.V., Moshal, K.S. and Tyagi, S.C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:2649-56.
 11. Qureshi, I., Chen, H., Brown, A.T., Fitzgerald, R., Zhang, X., Breckenridge, J., Kazi, R., Crocker, A.J., Stühlinger, M.C., Lin, K., Cooke, J.P., Eidt, J.F. and Moursi, M.M. Homocysteine-induced vascular dysregulation is mediated by the NMDA receptor. *Vascular Medicine.* 2005;10:215-23.
 12. Lucock, M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ.* 2004;328:211-4.
 13. Nygård, O., Vollset, S.E., Refsum, H., Brattström, and Ueland, P.M. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Int Med.* 1999;246:425-54.
 14. Bolander-Gouaille, C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. Second enlarged et revised edition. 2002.
 15. Rodríguez-Esparragón, F., Hernández-Perera, O., Rodríguez-Pérez, J.C., Anabitarte, A., Díaz-Cremades, J.M., Losada, A., Fiuza, D., Hernández, E., Yunis, C. and Ferrario, C.M. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T common variant on hypertensive risk is not solely explained by increased plasma homocysteine values. *Clinical and experimental hypertension.* 2003;25(4):209-220.
 16. Lim, U. and Cassano, P.A. Homocysteine and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Epidemiol.* 2002; 156:1105-13.
 17. Neugebauer, S., Tarnow, L., Stehouwer, C., Teerlink, T., Baba, T., Watanabe, T. and Parving, H-H. *Diabetologia.* 2002;45:1315-24.
 18. Jiang, S., Hsu, Y-H., Niu, T., Xu, X., Xing, H., Chen, C., Wang, X., Zhang, Y., Peng, S. and Xu, X. A common haplotype on methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on blood pressure in essential hypertension patients—a family-based association study. *Clinical and experimental hypertension.* 2005;6:509-21.
 19. Viridis A., Ghiadoni, L., Cardinal, H., Favilla, S., Duranti, P., Birindelli, R., Magagna, A., Bernini, G., Salvetti, G., Taddei, S. and Salvetti, A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocysteinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *JAM Coll Cardiol.* 2001;38:1106-15.
 20. Hucks, D., Thuraingham, R.C., Raftery, M.J. and Yaqoob, M.M. Homocysteine induced impairment of nitric oxide-dependent vasorelaxation is reversible by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1999-2005.
 21. Vallance, P. and Chan, N. General cardiology: Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 2001;85:342-50.
 22. Stühlinger, M.C., Tsao, P.S., Her, J-H., Kimoto, M., Balint, R.F. and Cooke, J.P. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001;104:2569-75.
 23. Thambyrajah, J. and Townsend, J.N. Homocysteine and atherothrombosis—mechanisms for injury. *European Heart Journal.* 2000;21:967-74.
 24. Blackwell, K.A., Sorenson, J.P., Richardson, D.M., Smith, L.A., Suda, O., Nath, K. and Katusic, Z.S. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287: H2448-H2453.
 25. Smith, A.R., Hagen, T.M. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1447-9.
 26. Maruyama, W., Kato, Y., Yamamoto, T., Oh-hashii, K., Hashizume Y and Naoi, M. Peroxynitrite induces neuronal cell death in aging and age-associated disorders: A review. *AGE.* 2001;24(1):11-8.