

당뇨병 Goto-Kakizaki 랫트에서 호모시스테인의 대사조절

오정민, 여수정, 김봉희, 김상겸*

충남대학교 약학대학 형질전환 복제돼지 센터

Metabolic Regulation of Homocysteine in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats

Jung Min Oh, Su Jeong Yeo, Bong-Hee Kim and Sang Kyum Kim*

College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs,
Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

ABSTRACT

Elevation of homocysteine levels is a risk factor for cardiovascular diseases and liver diseases. It has been reported that both streptozotocin-induced type I diabetic rats and obese type II diabetic rats have plasma total homocysteine lower than each control rats. We determined the effects of lean type II diabetes on homocysteine levels using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. The concentrations of serum glucose were increased to ~two-fold of control levels and the total cholesterol levels were also increased in GK rats. Hepatic aspartate, histidine, threonine, alanine and methionine levels were significantly increased in GK rats. Plasma aspartate and glutamate levels were elevated, but threonine and arginine levels were decreased in GK rats. Plasma total homocysteine levels were not changed in GK rats, but hepatic total homocysteine levels were increased to ~three-fold of control levels. These results suggest that hepatic metabolism of sulfur-amino acid may be altered in diabetic condition.

Key words : type II diabetes, homocysteine, hepatic metabolism, amino acid

서 론

호모시스테인 (homocysteine)의 증가는 고혈압, 동맥경화 등과 같은 심혈관계질환 (Rodrigo *et al.*, 2003)과 간섭유화증 (Mato and Lu, 2005)을 유발시키는 중요한 요인 중 하나이다. 역학조사에 따르면 20~30%의 homocysteine 증가만으로도 심혈관계

질환의 발병위험을 증가시키며 homocysteine의 증가는 기존에 알려진 심혈관계질환의 위험요인과는 무관한 독립적인 위험요인이다 (Sutton-Tyrrell *et al.*, 1997; Boers, 2000). Homocysteine에 의한 심혈관계질환의 발생기전은 불분명하나 nitric oxide의 유용성감소, 산화적 스트레스의 증가, 혈관 근육세포의 증식 등이 제시되고 있다 (Voutilainen *et al.*, 1999; van Guldener and Stehouwer, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

혈액에서 homocysteine의 증가는 주로 간장에서

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-821-5930, E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

homocysteine의 대사교란을 반영한다(Finkelstein and Martin, 2000). 즉, 간장에서 homocysteine의 제거반응이 억제되어, 그 결과 간장에서 homocysteine이 축적되고 혈액으로 유리가 증가한다. Homocysteine은 황을 함유하고 있는 아미노산으로 methionine의 대사과정에서 생성된다. 정상상태에서 methionine은 S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH)을 거쳐 homocysteine으로 전환되며 각각의 단계는 methionine adenosyltransferase (MAT), 각종 SAM 의존성 methyltransferase와 SAH hydrolase에 의해 매개된다(Finkelstein, 2000). Homocysteine은 cystathionine beta-synthase (C β S)와 cystathionine gamma-ligase (C γ L)에 의해 cystathionine을 거쳐 cysteine으로 전환되는 transsulfuration pathway 대사과정으로 제거되거나 methyl-tetrahydrofolate를 cofactor로 이용하는 methionine synthase (MS) 또는 betaine을 methyl donor로 이용하는 betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)에 의해 methylation되어 다시 methionine으로 전환된다(Stipanuk, 2005).

심혈관계질환을 가지고 있는 당뇨병환자의 혈장에서 homocysteine의 농도가 증가하며 hyperhomocysteinemia증은 당뇨병에서 심혈관계질환과 사망을 유발하는 중요한 위험인자로 보고되었다(Munshi *et al.*, 1996; Hoogeveen *et al.*, 2000). 또한 Fonseca *et al.* (1998)은 인슐린의 처리가 정상인에서는 homocysteine의 농도를 감소시키며 반면 인슐린 비의존성 당뇨병환자에게는 효과가 없음을 보고하였다. 그러나 Jacobs *et al.* (1998)은 streptozotocin을 처리하여 유발된 1형 당뇨병 랫트에서 homocysteine의 transsulfuration을 매개하는 C β S의 활성이 증가하여 혈중 homocysteine의 농도가 감소하며 insulin 처리에 의하여 정상화됨을 관찰하여 임상증상에서와 상반된 결과를 보고하였다. 또한 최근 비만형 이형 당뇨 모델인 Zucker diabetic fatty (ZDF) 랫트에서 혈중 homocysteine의 농도가 감소하며 betaine이 homocysteine의 조절에 중추적인 역할을 담당하는 것으로 보고되었다(Wijekoon *et al.*, 2005). 그러나 현재까지 비만이 아닌 이형 당뇨 모델에서 homocysteine의 대사에 관한 연구는 보고되지 않았다.

본 연구는 비만이 동반되지 않는 2형 당뇨 모델인 Goto-Kakizaki (GK) 랫트의 간과 혈장에서

homocysteine의 농도를 측정하여 이전 연구결과와 비교하고자 수행되었다. GK 랫트는 비만과 ketone body의 증가가 동반되지 않는 2형 당뇨 모델로 glucose tolerance의 정규분포에서 upper limit를 가지는 Wistar 랫트를 근친교배시켜 구축된 당뇨 모델이다(Portha, 2005). GK 랫트는 정상 Wistar 랫트에 비하여 약 2배의 혈당을 가지며 몸무게가 동일 주령의 Wistar 랫트에 비하여 주령에 따라 약 10~30%가 낮다. 본 연구는 간에서 homocysteine의 대사를 이해하기 위해 신장의 기능과 구조가 정상인 9 주령의 GK 랫트를 사용하였다(Witte *et al.*, 2002; Schrijvers *et al.*, 2004).

재료 및 방법

1. 시약

Amino acid standards, homocysteine, 1-heptanesulfonic acid, ammonium phosphate monobasic, boric acid 그리고 O-phthalaldehyde 는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. Ethanol 은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, High performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용한 methanol은 Burdick and Jackson 사 (Muskegon, MI, USA)에서 구입하였다. 그 외 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

2. 실험 동물

웅성 GK 랫트는 중앙실험동물(서울광역시)에서 구입하여 2주 동안 사육실에서 적응시키고 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 와 환기가 조절되는 동물동에서 사용하였다. 오전 7시와 오후 7시를 기준으로 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었으며 사료와 물은 제한없이 공급하였다. 9주령의 웅성 GK 랫트와 동일 주령의 Wistar 랫트를 대조군으로 사용하였다.

3. 아미노산 분석

랫트를 diethyl ether로 마취시킨 후 복강을 절개하고 복대동맥에서 헤파린이 처리된 10 mL 주사기로 전혈을 취하고 간을 절취하였다. 혈액을 바로

헤파린에 처리된 1.5 mL tube에 가하고 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장에 2배 부피의 ice-cold methanol을 가하고 원심분리하여 재단백한 후 상등액을 2배 부피의 주사용수로 희석하여 -70°C 에서 보관하였다. 간 약 1g을 3배 부피의 1.15% KCl에서 polytron으로 분쇄하고 분쇄액 0.4 mL에 2배 부피의 ice-cold methanol을 가하고 원심분리하여 재단백하였다. 원심분리에서 얻어진 상등액을 2배 부피의 주사용 증류수로 희석한 후 -70°C 에서 보관하였다.

아미노산은 O-phthalaldehyde를 이용하여 형광유도체화하고 4.6×75 mm의 역상 column (3.5 μm Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 fluorometric 검출기 (RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC (pump, model LC-10AT; system controller, model SCL-10A; injector, 20- μL loop가 장착된 Rheodyne)로 분리 및 정량하였다. 아미노산의 분리 및 정량을 위해 표준품을 멸균 증류수에 녹여서 사용하였으며 glutamine만은 따로 녹인 후 분석 직전에 나머지 아미노산이 녹아 있는 표준 용액에 섞어 분석하였다. HPLC의 분석 조건은 이전 보고를 따랐다 (Kim and Kim, 2005).

Homocysteine은 sulfhydryl 기를 iodoacetate로 masking하고 O-phthalaldehyde를 이용하여 형광유도체화하였다. 분석은 3.5 μm Kromasil C18 column (4.6×100 mm; Eka, Bohus, Sweden)과 fluorometric 검출기를 장착한 HPLC를 사용하였다. 분석 방법은 이전 보고를 따랐다 (Kim and Kim, 2005).

4. 혈청생화학적 분석

랫트를 diethyl ether로 마취시킨 후 복대동맥에서 채혈하고 상온에 방치하여 응고시킨 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 취하였다. 혈청생화학적인 분석은 automatic blood chemistry analyzer, Selectra II (Merck, Darmstadt, Germany)를 이용하였다.

5. 식이량 및 식수량 측정

식이량과 식수량을 측정하기 위해 GK 랫트와 Wistar 랫트를 대사상자 (metabolic cage)에서 한 마리씩 사육하였다 (Kim *et al.*, 2003). 식이량과 식수

량은 가한 양에서 남은 양을 감하고 몸무게로 나누어 산출하였다.

6. 통계 분석

실험군 사이의 통계적 차이는 Student's *t*-test ($p < 0.05$)로 검사하였다. 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. GK 랫트의 혈청 생화학적 분석

대사상자에서 개별적으로 사육된 GK 랫트의 일일 식이량과 식수량은 각각 86 ± 16 g/kg과 111 ± 13 mL/kg으로 정상 Wistar 랫트의 값인 87 ± 7 g/kg과 102 ± 13 mL/kg과 유의적인 차이가 없었다. 9주령 GK 랫트의 몸무게는 198 ± 11 g으로 같은 주령의 Wistar 랫트의 몸무게에 비하여 약 80%로 감소하였다 (Table 1). 그러나 간무게는 차이가 없었으며 결과적으로 몸무게로 나눈 상대적 간무게는 $3.6 \pm 0.2\%$ 에서 $4.5 \pm 0.1\%$ 로 증가하였다.

혈청 생화학적 분석결과는 Table 2에 정리하였다. 혈청 glucose 농도는 GK 랫트에서 약 2배로 증가하여 당뇨상태인 것으로 확인되었다. 간독성 지표인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), protein, albumin, total-bilirubin 함량에는 유의적인 변화가 없었다. 또한 신장 독성 지표인 BUN (blood urea nitrogen)과 creatinine 농도 역시 정상 수준이었다. 첨가적으로 중성지방의 함량은 정상 수준이었으나 cholesterol 값이 유의적으로 상승하였다. 이상의 결과는 9주령의 GK 랫트가 경증의 당뇨병을 가지고 있으며 간이나 신장에는 독성이 없음을 시

Table 1. Body weight, liver weight and relative liver weight of diabetic GK rats

	Control rats	GK rats
Body weight (g)	250 ± 7	$198 \pm 11^{***}$
Liver weight (g)	9.0 ± 0.3	8.9 ± 0.6
Relative liver weight (%)	3.6 ± 0.2	$4.5 \pm 0.1^{***}$

Each value represents the mean \pm SD for 4 rats

***Significantly different from the control, $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

Table 2. Serum biochemical values of diabetic GK rats

	Control rats	GK rats
AST (IU/L)	75.1 ± 6.7	75.0 ± 6.4
ALT (IU/L)	38.2 ± 5.2	36.1 ± 3.7
ALP (IU/L)	425.2 ± 41.7	385.4 ± 34.6
BUN (mg/dL)	14.6 ± 1.7	13.0 ± 2.8
Creatinine (mg/dL)	0.27 ± 0.08	0.24 ± 0.09
Glucose (mg/dL)	165.3 ± 7.2	332.1 ± 45.2***
Cholesterol (mg/dL)	64.8 ± 3.2	94.2 ± 3.5***
Protein (g/dL)	5.7 ± 0.3	5.9 ± 0.4
Albumin (mg/dL)	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Total-bilirubin (mg/dL)	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.05
Triglyceride (mg/dL)	104.3 ± 24.1	107.2 ± 24.3

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CPK, creatine phosphokinase.

Each value represents the mean ± SD for 4 rats.

***Significantly different from the control, $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

Table 3. Hepatic amino acid levels in diabetic GK rats

	Control rats	GK rats
Aspartate (μmol/g liver)	824.4 ± 114.4	1432.2 ± 247.2*
Glutamate (μmol/g liver)	1270.1 ± 87.4	1267.5 ± 137.7
Asparagine (μmol/g liver)	72.7 ± 8.4	77.3 ± 12.4
Serine (μmol/g liver)	548.2 ± 73.2	487.4 ± 63.3
Glutamine (μmol/g liver)	4883.0 ± 267.3	5231.7 ± 427.3
Histidine (μmol/g liver)	874.0 ± 63.2	1121.2 ± 67.2*
Glycine (μmol/g liver)	1543.5 ± 176.3	1662.0 ± 188.2
Threonine (μmol/g liver)	1075.2 ± 132.6	1513.3 ± 75.6*
Arginine (nmol/g liver)	176.5 ± 85.5	168.6 ± 45.0
Alanine (μmol/g liver)	1325.4 ± 273.6	1942.7 ± 226.6*
Tyrosine (μmol/g liver)	27.8 ± 6.2	30.9 ± 16.8
Valine (μmol/g liver)	166.7 ± 16.9	180.0 ± 36.4
Methionine (μmol/g liver)	29.2 ± 3.9	44.8 ± 8.7*
Tryptophan (μmol/g liver)	27.5 ± 3.2	30.1 ± 5.6
Phenylalanine (μmol/g liver)	55.1 ± 3.2	60.3 ± 12.7
Isoleucine (μmol/g liver)	103.1 ± 21.2	102.0 ± 23.2
Leucine (μmol/g liver)	170.2 ± 16.3	180.2 ± 33.7
Lysine (μmol/g liver)	220.2 ± 34.7	230.7 ± 32.3

Each value represents the mean ± SD for 4 rats.

*Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

사한다.

2. GK 랫트에서 homocysteine의 변화

GK 랫트에서 간(Table 3) 및 혈장(Table 4)에서 아미노산의 함량을 측정하였다. 간에서 aspartate,

Table 4. Plasma amino acid levels in diabetic GK rats

	Control rats	GK rats
Aspartate (μM)	10.3 ± 1.2	15.1 ± 1.2**
Glutamate (μM)	51.3 ± 2.7	133.3 ± 13.7***
Asparagine (μM)	61.3 ± 4.2	62.2 ± 6.3
Serine (μM)	219.8 ± 26.2	194.8 ± 21.3
Glutamine (μM)	712.3 ± 35.4	726.7 ± 24.3
Histidine (μM)	43.2 ± 4.6	45.4 ± 5.4
Glycine (μM)	245.2 ± 34.2	232.7 ± 30.8
Threonine (μM)	302.1 ± 23.2	206.1 ± 22.1**
Arginine (μM)	70.2 ± 7.3	38.4 ± 4.3***
Alanine (μM)	327.1 ± 19.7	339.0 ± 20.2
Tyrosine (μM)	71.2 ± 8.2	66.4 ± 8.7
Valine (μM)	202.3 ± 13.4	202.4 ± 21.4
Methionine (μM)	36.2 ± 3.6	37.0 ± 4.2
Tryptophan (μM)	102.7 ± 8.3	104.2 ± 12.4
Phenylalanine (μM)	59.2 ± 3.6	62.3 ± 6.4
Isoleucine (μM)	98.2 ± 12.3	90.4 ± 12.1
Leucine (μM)	130.3 ± 8.7	123.2 ± 12.4
Lysine (μM)	236.0 ± 27.4	218.7 ± 24.5

Each value represents the mean ± SD for 4 rats.

,Significantly different from the control, $P < 0.01$ or $P < 0.001$, respectively (Student's *t*-test).

histidine, threonine, alanine 및 methionine의 함량이 유의적으로 증가하였다. 실험에서 측정된 glutamate, asparagine, serine, glutamine, glycine, arginine, tyrosine, valine, tryptophan, phenylalanine, isoleucine, leucine 및 lysine의 함량에는 유의적인 변화가 없었다. 혈장에서 aspartate와 glutamate의 함량은 증가하였으며 반면 threonine과 arginine의 함량은 감소하였다(Table 4). GK 랫트의 혈장에서 측정된 나머지 아미노산은 유의적으로 변화되지 않았다.

Homocysteine의 농도를 간과 혈장에서 측정하였다(Fig. 1). 정상 Wistar 랫트의 혈장에서 homocysteine의 농도는 측정된 아미노산 중에서 가장 낮았으며 GK 랫트에서 유의적인 변화가 없었다. 반면 간에서 homocysteine의 농도는 약 3배로 증가하였다. 이 결과는 간에서 homocysteine의 대사가 변동되었을 가능성을 시사한다. 비만이 동반되는 이형 당뇨병 쥐인 ZDF 랫트 및 streptozotocin 처리에 의한 일형 당뇨병 쥐에서 혈중 homocysteine의 농도가 감소하였으며 간암세포를 이용한 실험에서 homocysteine의 대사를 담당하는 CBS의 발현이 인슐린 처리에 의해 감소하는 것으로 보고되었다(Jacobs *et al.*, 1998; Ratnam *et al.*, 2002; Wijekoon

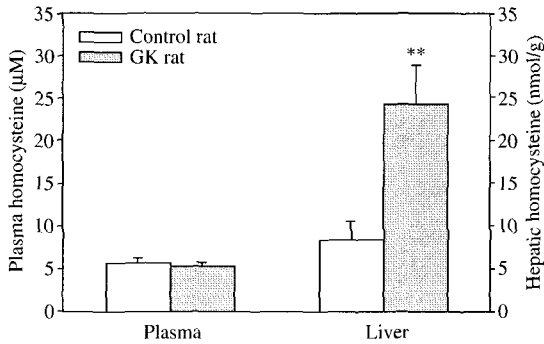


Fig. 1. Homocysteine levels in liver and plasma of GK rats. Each value represents the mean \pm SD for 4 rats. **Significantly different from the control, $P < 0.01$ (Student's *t*-test)

et al., 2005). 당뇨병은 인슐린뿐만 아니라 다양한 호르몬의 변동이 동반되며 특히 비만과 관련된 내인성 신호전달 물질의 분비 및 세포 반응이 변화한다. GK 랫트를 사용한 본 연구 결과는 인슐린 외에 다른 요인이 homocysteine의 대사 조절에 관여하며, 특히 비만의 유무가 homocysteine의 대사를 결정하는 중요한 요인임을 시사한다.

본 연구에서 간에서 homocysteine의 농도가 상승했음에도 불구하고 혈장에서 homocysteine의 농도는 정상으로 유지되었다. 당뇨 환자에서 homocysteine의 농도는 신장병과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 즉, 신장질환이 있는 당뇨환자는 신장을 통한 homocysteine의 제거 능력이 저하되어 혈액에서 homocysteine의 농도가 상승하게 된다. 혈청 생화학적 지표로 기준으로 판단할 때 본 연구에서 사용된 9주령의 GK 랫트는 정상적인 신장 기능을 가지고 있었다. 따라서 본 연구는 혈액에서 homocysteine의 증가는 간보다는 신장의 기능이 더욱 중요함을 시사하며 당뇨병의 주요 합병증인 심혈관계질환의 발생에서 homocysteine의 변화는 신장 기능을 중심으로 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구에서 관찰된 간에서 homocysteine의 증가와 간장질환의 관련성에 대한 추가적인 연구가 필요하며 이와 관련된 연구가 본 연구실에서 수행 중에 있다.

유황함유 아미노산의 대사에서 homocysteine은 분지점에 위치한다. 즉 MS나 BHMT에 의한 remethylation을 통한 methionine으로의 전환 또는 CBS

와 C γ L를 통한 비가역적인 cysteine으로의 전환이 가능하다(Stipanuk, 2004). 간에서 homocysteine의 농도가 상승한 것은 homocysteine의 대사에 관여하는 효소의 발현이나 활성이 감소하였을 가능성을 시사한다. 본 연구실에서의 예비 연구 결과 CBS의 단백질 발현은 GK 랫트에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(data not shown). 그러나 CBS의 allosteric activator인 SAM(Finkelstein, 2000)의 농도는 GK 랫트에서 유의적으로 감소하였다. GK 랫트에서 homocysteine의 증가 기전을 규명하기 위해 homocysteine의 대사를 조절하는 MS, BHMT 및 CBS의 단백질 발현 및 효소활성에 대한 평가가 진행 중에 있다.

결론

당뇨병의 대표적인 합병증인 심혈관계질환에서 중요한 발생 요인인 homocysteine의 농도를 비만이 동반되지 않은 2형 당뇨병 쥐인 GK 랫트에서 측정하였다. 9주령의 GK 랫트는 경증의 고혈당을 보였으며 혈청 생화학적 분석결과 간독성이나 신장독성은 없는 것으로 판단되었다. Homocysteine의 농도는 혈장에서 유의적인 변화를 보이지 않았으나 간에서 3배 정도 높게 관찰되었다. 이 결과는 혈장의 homocysteine 농도가 간보다는 신장의 기능에 의해 조절됨을 시사한다. 추가적으로 간에서 homocysteine의 농도 상승에 대한 기전을 규명하기 위한 연구가 진행 중에 있다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단 신진교수 연구지원 사업(E00319)의 지원을 받았다.

참고 문헌

- Boers GH. Mild hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of arterial vascular disease, *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 291-295.
- Finkelstein JD and Martin JJ. Homocysteine, *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(4): 385-389.
- Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine

- metabolism in mammals, *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 219-225.
- Fonseca VA, Mudaliar S, Schmidt B, Fink LM, Kern PA and Henry RR. Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects, *Metabolism* 1998; 47(6): 686-689.
- Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM and Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study, *Circulation* 2000; 101(13): 1506-1511.
- Jacobs RL, House JD, Brosnan ME and Brosnan JT. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat, *Diabetes* 1998; 47(12): 1967-1970.
- Kim SK and Kim YC. Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice, *J Hepatol* 2005; 42(6): 907-913.
- Kim SK, Seo JM, Jung YS, Kwak HE and Kim YC. Alterations in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids induced by ethanol in rats, *Amino Acids* 2003; 24(1-2): 103-110.
- Mato JM and Lu SC. Homocysteine, the bad thiol, *Hepatology* 2005; 41(5): 976-979.
- Munshi MN, Stone A, Fink L and Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease, *Metabolism* 1996; 45(1): 133-135.
- Portha B. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm, *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21(6): 495-504.
- Ratnam S, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP and Brosnan JT. Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver, *J Biol Chem* 2002; 277(45): 42912-42918.
- Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M and Rivera G. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension, *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42(4): 453-461.
- Schrijvers BF, De Vriese AS, Van de Voorde J, Rasch R, Lameire NH and Flyvbjerg A. Long-term renal changes in the Goto-Kakizaki rat, a model of lean type 2 diabetes, *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(5): 1092-1097.
- Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine, *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 539-577.
- Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J and Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults, *Circulation* 1997; 96(6): 1745-1749.
- van Guldener C and Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction, *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3): 281-289.
- Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Alfthan G, Alho H, Nyysönen K and Salonen JT. Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(5): 1263-1266.
- Wijekoon EP, Hall B, Ratnam S, Brosnan ME, Zeisel SH and Brosnan JT. Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats, *Diabetes* 2005; 54(11): 3245-3251.
- Witte K, Jacke K, Stahrenberg R, Arlt G, Reitenbach I, Schilling L and Lemmer B. Dysfunction of soluble guanylyl cyclase in aorta and kidney of Goto-Kakizaki rats: influence of age and diabetic state, *Nitric Oxide* 2002; 6(1): 85-95.
- Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S and Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production, *Am J Physiol* 2000; 279(4): F671-678.