

PERUBAHAN DISFUNGSI ENDOTEL AORTA PADA TIKUS GALUR PUTIH REMAJA YANG TERPAPAR ALCOHOL TERHADAP PEMBERIAN CURCUMIN

Puguh Widiyanto¹ Budi Ekanto²

Abstrak

Tubuh manusia memiliki kemampuan untuk mencegah dan memperbaiki disfungsi endotel dengan memproduksi antioksidan. Antioksi dan primer ini akan mencegah timbulnya oksidasi akibat radikal bebas, sehingga endotel pembuluh darah tidak akan mengalami disfungsi dan tidak terjadi aterosklerotik pada arteri. Dalam keadaan, dimana jumlah radikal bebas sangat berlebih di dalam darah, antioksidan yang diproduksi oleh tubuh tidak efektif lagi, sehingga diperlukan antioksidan dari luar (sekunder).

Penelitian ini merupakan penelitian Eksperimen, dengan metode post test only control group design. Analisis statistik yang dipergunakan adalah uji T, untuk menilai pengaruh pemberian antioksidan (curcumin).

Dari hasil penelitian ini maka terbukti bahwa ada pengaruh positif, bahwa Curcumin dapat mencegah disfungsi sel endotel dengan karakteristik tidak timbulnya sel busa pada aorta tikus jantan remaja yang terpapar alkohol kronik. Saran yang diajukan adalah menambah konsumsi antioksidan (curcumin) untuk memperbaiki kerusakan endotel pembuluh darah (sklerosis).

Keywords : Terpapar alkohol, disfungsi endotel aorta, pemberian curcumin

PENDAHULUAN

Pengaruh mengkonsumsi alkohol dalam jangka panjang dapat menurunkan Nitric Oxide Synthase-dependent (NOS) terkait dengan respons arteriole yang belum jelas mekanismenya terjadinya. Mengkonsumsi alkohol dalam waktu lama memberikan kontribusi pada patogenesis beberapa penyakit kardiovaskuler, termasuk cardiomiopati, hipertensi sistemik, aritmia, stroke hemoragik dan non hemoragik. (Hong Sun & William G.M., 2000).

Akibat : aterosklerotik arteri karotis dan lengkung aorta akan meningkatkan sensitivitas Baroreseptor, sehingga sedikit saja perubahan tekanan akan menimbulkan gangguan irama jantung (Bradikardia) (Guyon, 2006). Penurunan denyut jantung akan mengurangi jumlah darah yang dipompa oleh jantung (Kardiak Output), sehingga akan menimbulkan penurunan jumlah darah yang disuplai ke semua organ tubuh. Keadaan ini akan menjadikan fungsi tiap organ tidak efektif bahkan tidak berfungsi sama sekali dan berakhir dengan kematian.

Tubuh manusia memiliki kemampuan untuk mencegah dan memperbaiki disfungsi endotel dengan memproduksi antioksidan. Antioksidan primer ini akan mencegah timbulnya oksidasi akibat radikal bebas, sehingga endotel pembuluh darah tidak akan mengalami disfungsi dan tidak terjadi aterosklerotik pada arteri. Dalam keadaan, dimana jumlah radikal bebas sangat berlebih di dalam darah, antioksidan yang diproduksi oleh tubuh tidak efektif lagi, sehingga diperlukan antioksidan dari luar (sekunder).

Salah satu antioksidan sekunder yang terdapat dalam tanaman berkasiat yang banyak tumbuh di Indonesia adalah *Curcumin*. Penanganan dengan Curcumin mencegah proses patologis akibat mengkonsumsi alkohol (Nanji, Amin A, 2002)

REVIEW LITERATUR

Pengaruh mengkonsumsi alkohol dalam jangka panjang dapat menurunkan Nitric Oxide Synthase-dependent (NOS)

terkait dengan respon arteriole yang belum jelas mekanismenya. Mengonsumsi alkohol dalam waktu lama memberikan kontribusi pada patogenesis beberapa penyakit kardiovaskuler, termasuk cardiomiopati, hipertensi sistemik, aritmia, stroke hemoragik dan non hemoragik. (Hong Sun & William G.M., 2000).

Aterosklerosis dapat disebabkan oleh stres oksidatif akibat radikal bebas yang beredar dalam tubuh seseorang. Stres oksidatif akibat mengonsumsi alkohol secara kronik dapat dikurangi dengan adanya antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas.

Dengan melihat keterkaitan antara aritmia, aterosklerosis, stres oksidatif, alkohol dan antioksidan, maka sangat mungkin digunakan antioksidan dari luar tubuh dan alami untuk mencegah timbulnya aritmia jantung. Antioksidan ini akan bekerja menghambat reaksi oksidasi yang pada gilirannya akan mengurangi timbulnya aterosklerosis dan berdampak tidak terjadinya aritmia jantung akibat radikal bebas.

Terdapat tiga macam antioksidan yaitu:

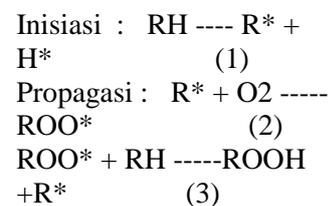
- 1). Antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri yang berupa enzim antara lain superoksida dismutase, glutathione peroxidase, peroxidasi dan katalase.
- 2). Antioksidan alami yang dapat diperoleh dari tanaman atau hewan yaitu tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid dan senyawa fenolik.
- 3). Antioksidan sintetik, yang dibuat dari bahan-bahan kimia yaitu Butylated Hydroxyanisole (BHA), BHT, TBHQ, PG dan NDGA

yang ditambahkan dalam makanan untuk mencegah kerusakan lemak.

Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan adalah bahan tambahan yang digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Meskipun demikian antioksidan dapat pula digunakan untuk melindungi komponen lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap di dalam strukturnya.

Mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat oksidasi radikal bebas (misalnya lemak, alkohol). Untuk mempermudah pemahaman tentang mekanisme kerja antioksidan perlu dijelaskan lebih dahulu mekanisme oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri dari tiga tahap utama yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen (reaksi 1). Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (reaksi 2). Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru (reaksi 3).



Hidroperoksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi lebih lanjut menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton yang bertanggung jawab atas flavor makanan berlemak.

Antioksidan yang baik akan bereaksi dengan radikal asam lemak segera setelah

senyawa tersebut terbentuk. Dari berbagai antioksidan yang ada, mekanisme kerja serta kemampuannya sebagai antioksidan sangat bervariasi. Seringkali, kombinasi beberapa jenis antioksidan memberikan perlindungan yang lebih baik (sinergisme) terhadap oksidasi dibanding dengan satu jenis antioksidan saja. Sebagai contoh asam askorbat seringkali dicampur dengan antioksidan yang merupakan senyawa fenolik untuk mencegah reaksi oksidasi lemak. Dalam proses melumpuhkan radikal bebas, vitamin E menjadi pelopor diikuti oleh vitamin C dan dengan bantuan senyawa glutathion, betakaroten, seng, mangan dan selenium akan memudahkan pelumpuhan radikal bebas. Selain itu Curcumin yang merupakan antioksidan fenolik mampu mencegah kerusakan sel hepar sebagai dampak mengkonsumsi alkohol (Nanji, Amin A.,2002)

METODOLOGI PENELITIAN

Hewan coba yang dipergunakan adalah Tikus Putih Wistar Jantan berusia 1 bulan dengan berat badan antara 200 – 250 gram.

Kelompok	Perlakuan(4 Minggu)	Dekapitasi
A (6 ekor)	Tanpa perlakuan	Histopatologi Aorta
B (6 ekor)	Alkohol 15 % 1 cc/gram BB	Histopatologi Aorta
C (6 ekor)	Alkohol 15 % 1 cc/ gram BB + Curcumin 0,1 mg/gam BB	Histopatologi Aorta

Variabel

Analisis

1. Variabel Bebas Curcumin

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Curcumin yang telah dipisahkan dari tanaman aslinya, bahan ini diperoleh dari bagian farmakologi Universitas Gadjah Mada.

2. Variabel Terikat :

Gambaran histopatologi Aterosklerotik Aorta pada ketiga kelompok hewan coba merupakan variabel yang akan diuji dalam penelitian ini. Preparat ini diambil langsung dari aorta hewan coba setelah dilakukan dekapitasi.

Hewan coba dikelompokkan menjadi tiga kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor. Kelompok pertama (A) merupakan kelompok kontrol akan diberikan konsumsi makanan standar dengan minum air kran. Kelompok B merupakan kelompok perlakuan, akan diberikan alkohol (ethanol) 15 % dengan dosis 1 cc/gram berat badan selama 30 hari, diberikan melalui suntikan intra peritoneal sekali dalam sehari. Kelompok C sama dengan kelompok B, ditambah dengan pemberian Curcumin dengan cara oral (disonde), sekali sehari dengan dosis 0,1 mg / gram berat badan.

Setelah hewan coba mengalami perlakuan selama 30 hari, akan dilakukan dekapitasi ("disembelih"), selanjutnya organ terkait (aorta) dari semua hewan coba diambil, difiksasi, dibuat preparat (histpatologi) untuk diambil gambarnya. Dari hasil pengambilan gambar akan dilihat kerusakan endotel arteri (ateroskelrotis) pada ketiga kelompok hewan coba. Selanjutnya diperbandingkan antar ketiga kelompok dan dilakukan analisis. Secara rinci, pengelompokan hewan coba, seperti tertera pada tabel di bawah ini.

Penelitian ini merupakan penelitian Eksperimen, dengan metode post test only control group design. Analisis statistik yang dipergunakan adalah uji T.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Berikut ini ditampilkan hasil pemeriksaan terhadap sediaan aorta tikus jantan remaja yang dibuat dengan pengecatan HE (Hemoksisilin Eosin) dan pengamatan dengan mikroskop cahaya. Pengamatan dilakukan terhadap ada dan tidaknya sel buas yang terbentuk di bawah lapisan endotel pembuluh darah.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan mikroskopis pembuluh darah aorta dengan pengecatan HE (Hemoksisilin Eosin)

Kelompok	Sampel	Hasil
A	1	Negatif
	2	Negatif
	3	Negatif
	4	Negatif
	5	Negatif
	6	Negatif
Kelompok	Sampel	Hasil
B	1	Positif (1)
	2	Positif (1)
	3	Positif (1)
	4	Positif (1)
	5	Negatif
	6	Positif (1)
Kelompok	Sampel	Hasil
C	1	Negatif
	2	Negatif
	3	Negatif
	4	Negatif
	5	Negatif
	6	Negatif

Keterangan :

Positif (1) = jumlah sel busa satu

Positif (2) = jumlah sel busa lebih dari satu .

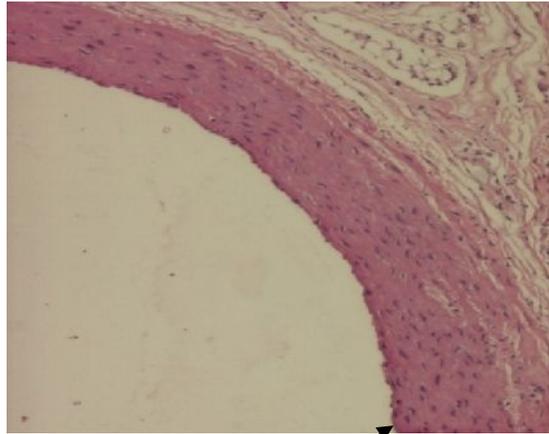
Negatif (-) = Tidak ditemukan plak .

Berdasar tabel 1 di atas, dibuatlah prosentase nedotel yang mengalami diafunksi / ditemukan adanya sel buas, seperti terlihat pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Prosentase Sel Busa pada pemeriksaan mikroskopis pembuluh darah aorta dengan pengecatan HE (Hemoksisilin Eosin)

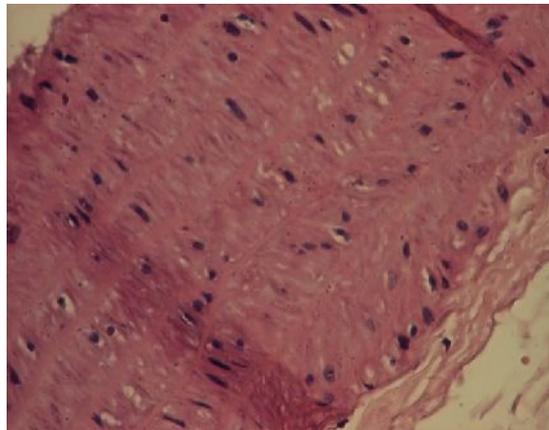
Kelompok	Prosentase (%)	Ket.
A	0	
B	83	
C	0	

Gambaran mikroskopis hasil pengecatan dan pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran tertentu terlihat di bawah ini.



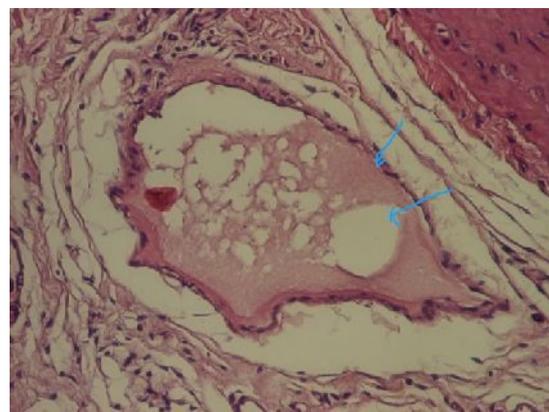
Gambar 1

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 10 x pada kelompok A tidak ditemukan sel busa (foam cell).



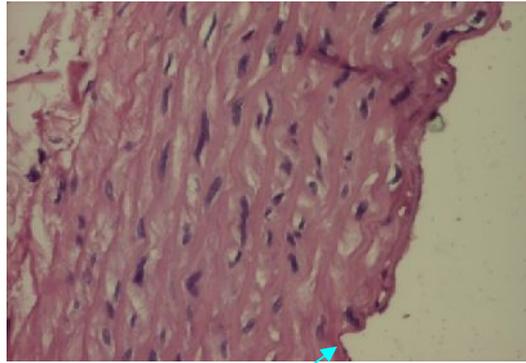
Gambar 2

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 40 x pada kelompok A tidak ditemukan sel busa (foam cell).



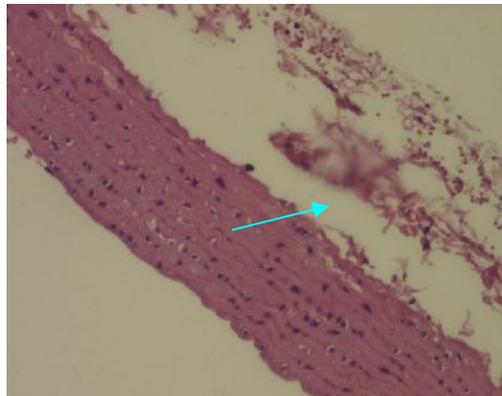
Gambar 3

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 10 x pada kelompok B ditemukan sel busa (foam cell).



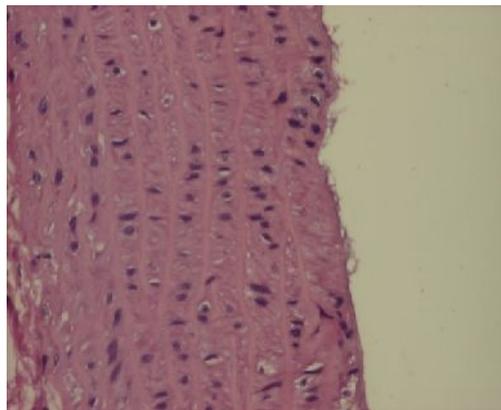
Gambar 4

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 40 x pada kelompok B ditemukan sel busa (foam cell) .



Gambar 5.

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 10 x pada kelompok C tidak ditemukan sel busa (foam cell) .



Gambar 6.

Pengecatan HE pada aorta dengan pembesaran 40 x pada kelompok C tidak ditemukan sel busa (foam cell) .

Pembahasan

Pemberian alkohol akan meningkatkan radikal bebas dan nilai Low Density Lipoprotein (LDL) yang mempunyai peranan penting dalam patogenesis terjadinya arteriosklerosis.

Hipotesis terjadinya aterosklerosis yaitu : respon terhadap injuri oleh radikal bebas. Injuri pada endotel menyebabkan perubahan struktur dan atau fungsi sel endotel. Alkohol menyebabkan disfungsi pada lapisan endotel, salah satunya Tetrahydrobiopterin (BH₄) yang merupakan co-faktor pembentukan Nitric Oxide (NO). Penurunan aktivitas (BH₄) akan menurunkan pembentukan NO.

Jumlah dan aktivitas NO yang berkurang menjadikan fungsinya sebagai anti agregasi platelet dan anti inflamasi tidak dapat dilakukan. Kondisi menyebabkan permeabilitas endotel mengalami perubahan dan memungkinkan LDL dan komponen lain dalam darah melewati endotel dan berada di sub endotel.

Alkohol, disamping menurunkan produksi dan kerja NO, juga meningkatkan nilai LDL dan mengurangi aktivitas antioksidan tubuh akibat adanya radikal bebas yang ditimbulkan oleh alkohol. Meningkatkan LDL dalam darah dan menurunkan antioksidan tubuh (Superoksida dismutase) akan memungkinkan terjadinya oksidasi LDL. Proses ini mengawali terbentuknya aterosklerosis dalam pembuluh darah.

Proses aterosklerosis adalah proses yang kompleks yang disebabkan oleh interaksi dan migrasi sel-sel radang, proliferasi sel-sel otot polos dengan menghasilkan matriks ekstraseluler. Modifikasi oksidatif lipoprotein dalam intima oleh radikal bebas menghasilkan teroksidasi (OxLDL). Pembentukan sel busa (foam cell) akibat ambulan LDL – teroksidasi yang berlebihan oleh receptor Scavenger yang non down regulating. Nekrosis dari sel busa akibat efek sitotoksik Ox-LDL membentuk inti lipid ekstraseluler merupakan transisi dari garis lemak yang reversible menjadi lesi aterosklerotik lanjut .

Endotelium mempunyai peran penting pada fase awal aterosklerosis. Pada stadium awal atherogenesis, dislipidemia dapat mengakibatkan pembuluh darah kehilangan kemampuan vasorelaksasi yang diatur oleh endotel (endothelium regulated); pada sel –sel endotel yang meliputi fatty streak memperlihatkan peningkatan ekspresi athero ELAM (Atherosclerosis-associated Endotelial Leucocyte Adhesive Molecule), suatu faktor yang mengikat monosit, Sebagai respon terhadap LDL. Endotel menghasilkan monosit chemotactic peptide type 1 (MCP-1), bahan yang mampu merangsang monosit yang terikat [ada endotel untuk migrasi ke dalam ruang eubendotel.

Struktur maupun fungsi LDL dapat mengalami bermacam – macam modifikasi. Modifikasi oksidatif sangat penting dalam proses atherogenesis, Modifikasi LDL akan berdampak receptor Scavenger mengakibatkan receptor LDL tidak dikenali. Namun dikenali oleh macrophage Scavenger receptor sehingga terjadi status jalar ambulan LDL modifikasi (Ox-LDL) yang terus menerus selanjutnya membentuk sel busa.

Kerusakan sel endothel akibat peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida, yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endothel dan otot polos pembuluh darah dengan manifestasi tingginya kadar malondialdehid dalam darah. Hidroksil radikal ini bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang banyak terdapat membran sel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi yang akan menghasilkan lipid peroksida (Bertil, 1990). Oksidasi lipid dan lipid peroksida yang terbentuk akan merusak sel endothel dan sel endothel menjadi disfungsi.

Gangguan pada produksi dan aktivitas NO merupakan beberapa penyebab terjadinya penyakit vaskular. Penelitian mengenai efek NO pada pembuluh darah harus terus dilakukan mengingat hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya peran NO sebagai faktor risiko terjadinya aterosklerosis.

Aterosklerosis merupakan sebuah penyakit inflamasi. Secara luas diketahui Low-density Lipoprotein (LDL) menjadi penyebab timbulnya aterosklerotik. Namun demikian Patogenesis aterosklerotik sebenarnya melibatkan tidak hanya LDL tetapi adanya unsur inflamasi pembuluh darah (Ross R., 1999:115).

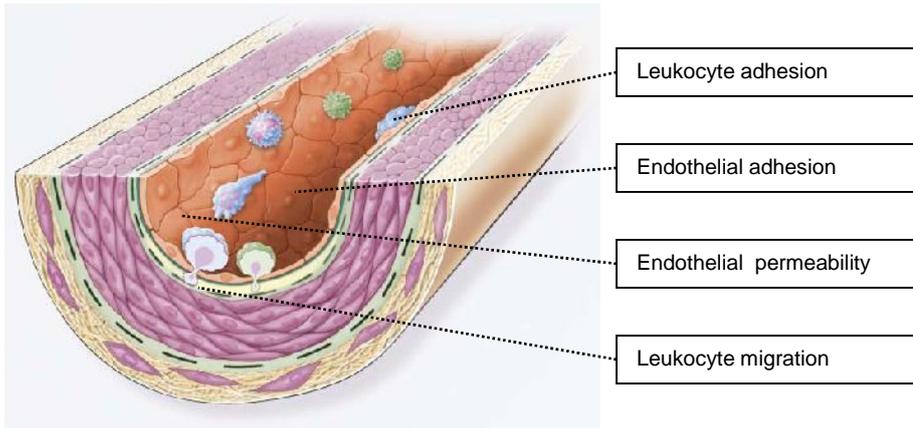
Lesi aterosklerotik melibatkan inflamasi, disfungsi endotelium, dan lipid (Mark AC, 2005:436). Menurut Ross R., 1999:115 lesi eterosklerotik terbentuk melalui tiga (3) proses utama :

1. Disfungsi Endothelium pada Atherosklerosis. Perubahan awal terbentuknya lesi aterosklerotik dimulai di endothelium. Perubahan ini termasuk peningkatan permeabilitas endotelium terhadap lipoprotein dan zat terlarut lain dalam plasma, hal ini melibatkan *NO*, *prostacyclin*, *platelet-derived growth factor*, *angiotensin II*, and *endothelin*. Selanjutnya adesi leukocyte, termasuk *L-selectin*, *integrins*, dan sel platelet–endothelial, migrasi leukosit ke dalam dinding arteri, oksidasi *LDL*, *monocyte chemotactic protein 1*, *interleukin-8*, *platelet-derived growth factor*, *macrophage colony-stimulating factor*, and *osteopontin* (gambar 7).
2. Terbentuknya Fatty-Streak pada Atherosklerosis. Fatty streaks awalnya terbentuk dari lipid, monocytes dan macrophages (foam cells) bersama dengan T lymphocytes. Lebih lanjut bergabung dengan sel otot polos. Tahap ini termasuk migrasi sel otot polos, yang distimulasi oleh platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor 2, and transforming growth factor *b*; T-cell activation, diperantarai oleh tumor necrosis factor *a*, interleukin-2, and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; terbentuk foamcell (sel busa), yang distimulasi oleh

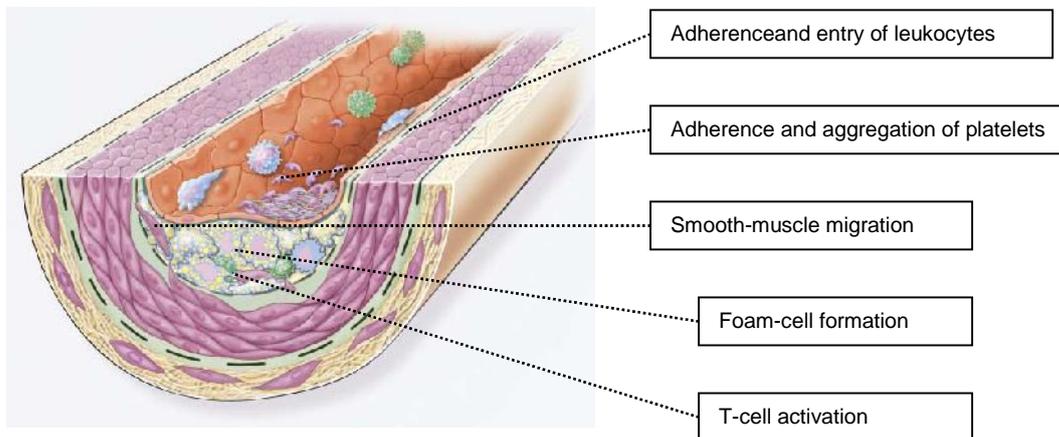
oksidasi LDL, macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor *a*, and interleukin-1; dan adesi serta agregrasi platelet, distimulasi oleh integrins, P-selectin, fibrin, thromboxane A 2, faktot jaringan, seperti terlihat pada gambar 8.

Pada hasil penelitian diperlihatkan pada gambar 3 dan 4, dimana ditemukan adanya sel busa pada aorta tikus yang diberikan alkohol secara intraperitoneal dengan dosis 1,5 g/kg BB perhari. Satu tikus tidak ditemukan adanya sel busa pada aortanya, dimungkinkan adanya terkait dengan sifat sel endotel tiap tikus yang mungkin berbeda dalam berespons terhadap radikal bebas yang ditimbulkan oleh pengaruh alkohol.

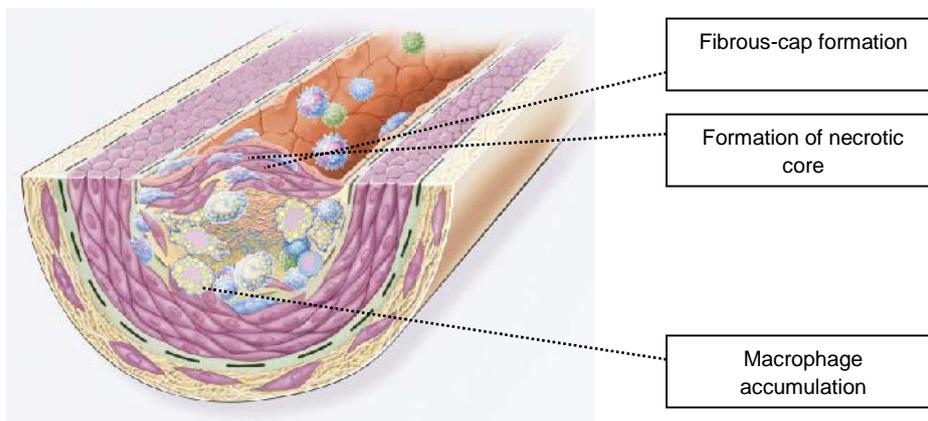
3. Perkembangan lesi dan komplikasi ateroskelrotik. Fatty streaks berkembang menjadi lesi, terbentuk fibrous cap pada dinding kearah lumen. Hal ini seperti proses pada penyembuhan luka atau respons terhadap trauma. Fibrous cap mengandung leukosit, lipid, and debris, yang mungkin membentuk awal nekrosis. Lesi ini berkembang lebih lanjut karena adesi leukosit dan factor yang lain seperti pada tahap 1 dan 2. pada prinsipnya terkait dengan akumulasi makrofag termasuk macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemotactic protein 1, dan oksidasi LDL. Inti nekrosis bekembang dan menghasilkan apoptosis and necrosis, peningkatan aktivitas proteolytic, dan akumulasi lipid. Fibrous cap terentuk sebagai hasil peningkatan aktivitas platelet-derived growth factor, transforming growth factor *b*, interleukin-1, tumor necrosis factor *a*, dan osteopontin serta penurunan degradasi jaringan penghubungn (connective-tissue). Terlihat pada gambar 9



Gambar 7
Kerusakan Endotel Tahap pertama



Gambar 8
Kerusakan Endotel Tahap 2



Gambar 9
Kerusakan Endotel Tahap 3

Proses aterosklerotik yang diawali dengan disfungsi endotel, dapat dicegah dengan adanya antioksidan yang memadai. Antioksidan ini akan berfungsi dalam mencegah terbentuknya radikal bebas yang dapat bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrit yang sangat toksik bagi tubuh dan mencegah oksidasi LDL. Dengan tidak teroksidasinya LDL akan memungkinkan fungsi NO berjalan optimal. Selain itu antioksidan juga akan mencegah reaksi antara NO dengan superoksida, sebagai hasil radikal bebas.

Curcumin mempunyai fungsi sebagai antioksidan dari luar tubuh yang diperlukan ketika antioksidan dalam tubuh (SOD) tidak dapat berfungsi optimal, karena pembentukan radikal bebas yang berlebihan yang ditimbulkan oleh alkohol. Hal ini dapat dilihat pada kelompok C, dimana tidak ditemukan adanya sel busa pada aorta tikus yang telah diberikan alkohol 1,5 kg/kg BB perhari dengan cara injeksi peritoneal. Seperti terlihat pada gambar 5 dan 6.

Secara ringkas peran alkohol dan curcumin dalam fungsi sel endotel dan NO seperti terlihat pada gambar 10 di bawah ini.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan pada bab sebelumnya, maka terbukti bahwa Curcumin dapat mencegah disfungsi sel endotel dengan karakteristik tidak timbulnya sel busa pada aorta tikus jantan remaja yang terpapar alkohol kronik, sesuai dengan hipotesis pada telah dikemukakan.

Dengan demikian dari penelitian ini, dianjurkan untuk mengkonsumsi antioksidan (curcumin) karena sangat baik bagi proses perbaikan jaringan pembuluh darah yang telah rusak (sklerosis)

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Duarte, Juan et al. (2001) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats, British Journal of Pharmacology 133, 117–124

- 2 Ganong WF (2003). Review of Medical Physiology, 22nd ed. Chapter 7, Pages: 138-147.
- 3 Guyton, Arthur C.(2006), Textbook of medical physiology, 11th ed.
- 4 Kumalaningsih, Sri (2007), Antioksidan, Sumber & Manfaatnya, Desember 2007
- 5 Nanji, Amin A., Kalle Jokelainen, et al, 2002. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- B-dependent genes, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284:321-327, 2003. First published Aug 28, 2002;
- 6 Rosdiana, NendandanSoewoto, Hafiz, (2008). Peranan Nitrogen Oksida Dalam Patofisiologi Penyakit Vaskular, Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- 7 Sherwood, L. (2005). Human Physiology, 6th Ed.
- 8 Squire LR et al (2003). Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications, 2nd ed
- 9 Sun, Hong and Mayhan, G.W, (2001) Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals, Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H992–H1001, 2001.
- 10 Sun, Hong and Mayhan, G.W, (2008) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for NOS, improves endothelial dysfunction during chronic alcohol consumption, Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:1863-1869, 2001.
- 11 Shiina Y, Funabashi N, Lee K, et al 2008. RE: Effect of Flavonoid-rich Dark Chocolate on Coronary Circulation in Healthy Adults, www.herbalgram.org.
- 12 Tortora GJ & Derrickson B (2006). Principles of Anatomy and Physiology, 11th ed.
- 13 Zitron, Edgar, et al. (2005) QTc Prolongation by Grapefruit Juice and Its Potential Pharmacological Basis HERG Channel Blockade by Flavonoids, Circulation is published by the American Heart Association. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX.