

HOMOSİSTEİN : BİYOKİMYASI VE KLİNİK ÖNEMİ

Banu ÖNVURAL, Hülya ÖZTÜRE

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Plazma homosistein ölçümleri için hassas yöntemlerin kullanılmaya başlamasından sonra, homosistein ve değişik hastalıklar arasındaki ilişkiyi yansıtan bir çok çalışma yapılmıştır. Plazma homosisteini, folat ve kobalamin eksikliklerinin tanınması ve izlenmesinde değerlidir. Bu durumlarda plazma homosistein konsantrasyonları, kan tablosundaki bozukluklar oluşmadan önce artış gösterir. Bu vitamin eksikliklerinde erken bir göstergedir. Ayrıca homosistinürilere neden olan kalıtsal hastalıklarda da plazmada yüksek bulunur. Son yıllarda orta derecedeki plazma homosistein yükseklikleri ile prematür kardiyovasküler hastalık arasında bağlantı kurulmuş ve bu yüksekliğin diğer risk faktörlerinden bağımsız olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Homosistein, folat eksikliği, kobalamin eksikliği, homostinüri, prematür kardiyovasküler hastalık.

SUMMARY

After the establishment of sensitive methods for plasma homocysteine measurement, many studies reflecting the relation of homocysteine with different diseases were reported. Plasma homocysteine is useful in diagnosis and follow-up of folate and cobalamin deficiencies. In these situations, plasma homocysteine concentrations increase before the hematological abnormalities develop. It is an early indicator of these deficiency states. Plasma homocysteine is also elevated in inborn errors causing homocystinuria. In recent years relation between moderate elevations in plasma homocysteine levels and premature cardiovascular disease was observed, and this increase was independent of other risk factors.

Key words: Homocysteine, folate deficiency, cobalamin deficiency, homocystinuria, premature cardiovascular disease.

Homosistein, proteinlerin yapısına girmeyen bir amino asittir. Ancak, metiyoninden sisteine giden yolun önemli dallanma noktasında yer alır (1).

Homosistein, serumda ve plazmada, serbest ve proteine bağlı formlarda bulunur. Bu iki şeklin toplamı total homosisteini oluşturur. Homosisteinin hücre içinde oluşumu, metabolizması ve hücre dışına salınması plazma veya serumdaki homosistein konsantrasyonu-

nunu tayin eder (2). Homosisteinin hücreden dışarı atılması, plazma homosistein konsantrasyonu için önem taşır. Hücre dışına atılımı, homosistein yapımı ve metabolizması arasındaki denge durumunun bir göstergesidir (3,4).

Homosistein ilk defa 1932'de De Vigneaud tarafından metiyoninin dimetilasyon ürünü olarak bulundu (5). 1962'de Carson ve Neill, mental geriliği olanlarda yaptıkları taramada

homosistinüri saptadılar. 1964'de ilk defa, sistatyonin β -sentaz eksikliği, karaciğer biyopsisi ile gösterildi (6).

Homosisteinin eskiden fizyolojik şartlarda plazmada ve dokularda bulunmadığı düşünülür iken, son 10 yılda biyolojik materyalde homosistein ölçümü için kullanılan tekniklerdeki ilerlemeler ile, homosistinüri dışındaki hastalarda ve normal kişilerde de ölçülmesi mümkün olmuştur (5).

1985'den beri homosistein tayini, folat ve kobalamin eksiklik durumlarının tanınması ve izlenmesinde değerli görülmüştür. Serum homosistein değerlerinde belirgin artış yapan en sık neden, bu eksiklik durumlarıdır (7-9).

Son yıllarda orta derecede yükselme gösteren plazma homosistein düzeylerinin prematür vasküler hastalık riskini artırması giderek dikkat çekmektedir. (10). Bugüne kadar, homosisteinin orta derecede yüksekliğinin prematür kardiyovasküler hastalık için bağımsız risk faktörü olduğu yaklaşık 20 klinik çalışmada gösterilmiştir. Prematür kardiyovasküler hastalığı olan hastaların %30'unda normalin üzerinde plazma homosistein değerleri bildirilmiştir ve bu hastalarda bilinen risk faktörleri bulunmamaktadır (11,12).

Bu yazıda homosistein metabolizması ve çeşitli hastalıklar ile ilişkisinden söz edeceğiz.

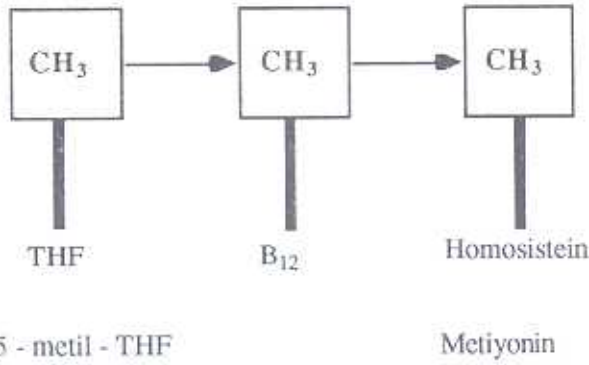
Homosistein Biyokimyası:

S-adenozil homosistein, metil vericisi olan

S-adenozil metiyoninden, metil grubunun selülüler akseptörlere transferi ile meydana gelen bir üründür. S-adenozil homosisteinin homosistein ve adenezine bölünmesi, vertebralalarda homosistein oluşumuna yol açan tek bilinen metabolik yoldur. Reaksiyonu, Sadenozil homosistein hidrolaz katalize eder.

Intrasellüler homosistein, ya metiyonine remetile olur, ya da serin ile kondanase olur, sistatyonini yapar. Bu reaksiyon, sistatyonin β -sentaz ile katalize olur. Bu enzim kofaktör olarak piridoksal 5'-fosfat gerektirir. Sistatyonin, γ -sistatyonaz ile sistein ve α -ketobutirata bölünür. Bu enzim de, piridoksal 5'-fosfat gerektirir. γ -sistatyonaz başamağı, metiyoninin sisteine dönüşümünü yani, transsulfurasyon yolunu tamamlar (13).

Homosisteinin, metiyonine yeniden metillenmesi ya betain homosistein metil transferaz ile, ya da metiyonin sentaz (=5-metil tetrahidrofolat-homosistein metil transferaz) ile katalize edilir. İlk enzim sadece karaciğerde, ikinci enzim ise tüm hayvan dokularında bulunur. Metiyonin sentaz, metil vericisi olarak 5-metil tetrahidrofolat ve kofaktör olarak, B₁₂ vitamini gerektirir. Metil kobalaminin, homosisteini metillediği ve 5-metil tetrahidrofolatın da kobalamini yeniden metillediği yolunda kanıtlar vardır. 5-metil tetrahidrofolat bu reaksiyonda tetrahidrofolata dönüşür (Şekil 1) (5).



5 - metil - THF

Metiyonin

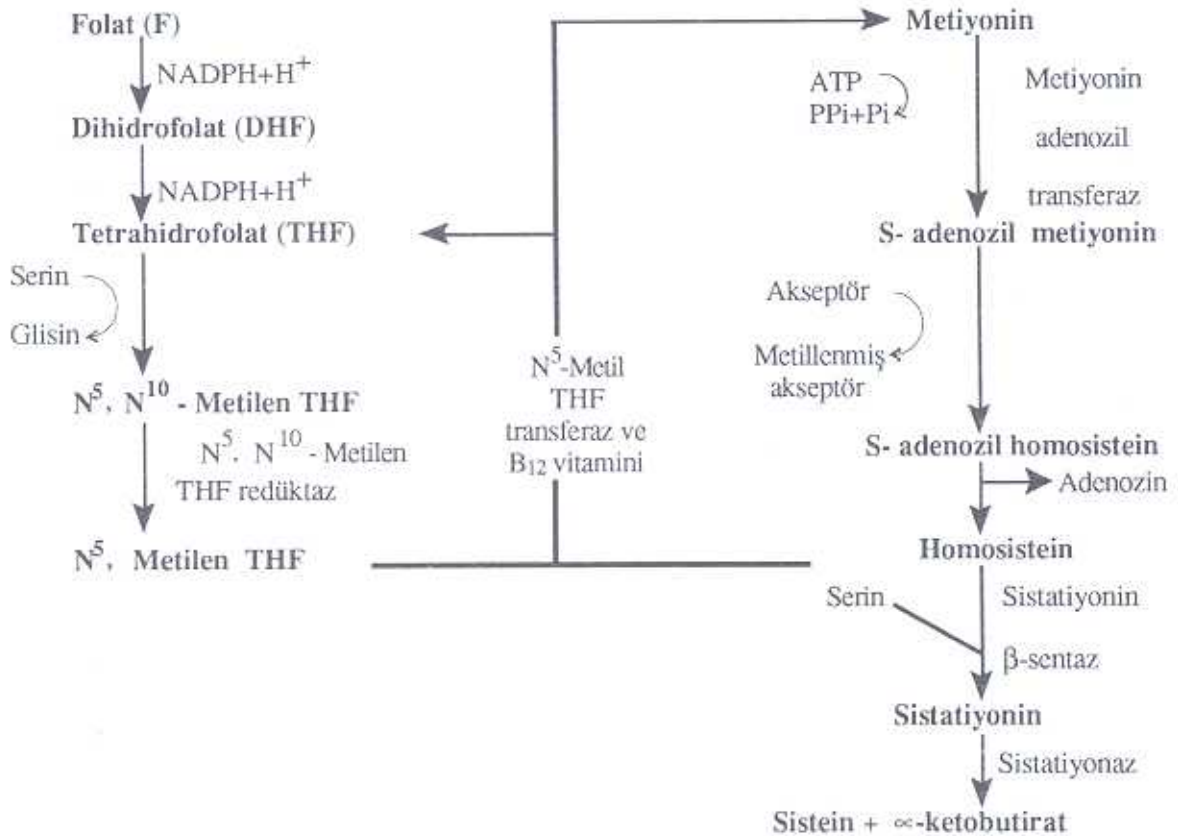
Şekil 1. 5- metil tetrahidrofolat - homosistein metil transferaz reaksiyonunda folat, kobalamin ve homosistein arasında metil transferi.

Metiyonin sentaz, homosistein metabolizmasını folat ve B₁₂ vitamini metabolizmasına bağlar.

Homosisteinin folat ve B₁₂ vitaminine bağlı olarak yeniden metillenmesi, klinik olarak folat ve B₁₂ vitamini arasında kurulan ilişkiyi açıklamaktadır. Bu iki vitaminden birindeki eksiklik, megaloblastozis ile kendini gösteren, kan ve kemik iliği değişiklikleri ile sonuçlanır.

Homosisteinin metiyonine çevrilmesi, betain-homosistein metiltransferaz ile de katalize olmaktadır. Bu enzim, metil verici olarak betain gerektirir ve karaciğere özel bir enzimdir (14,15).

Homosistein metabolizması, Şekil 2'de özet olarak gösterilmektedir (1).



Şekil 2. Homosistein metabolizması

Klinik Önemi

Kobalamin Eksikliği

B₁₂ vitamini eksikliğinin genellikle 60 yaşın üzerinde görüldüğü ve genelde megaloblastik anemi, makrositoz ve hipersegmente nörofiller ile karakterize olup buna sıklıkla nörolojik bozuklukların da eşlik ettiği klasik bilgilerdir. Bu tür olgularda hematolojik tablo tanı koydurucudur (16). Nörolojik bozuklukların ancak ilerlemiş olgularda bulunduğu düşünülmüştür. Ancak, son klinik araştırmalar, klasik görüşün yanlış olduğunu ve hematolojik bozukluklar olmadan da, çok sayıda hastada bazı biyokimyasal değişikliklerin bulunduğunu göstermiştir (17-19). Hatta, B₁₂ vitamini eksikliğine bağlı nöropsikiyatrik bozuklukların sıklıkla anemi ve makrositoz bulunmadan görüldüğü bildirilmektedir (18).

B₁₂ vitamin eksikliği tanısı için kullanılmakta olan testlerin bazı dezavantajları vardır. Serumda B₁₂ vitamini ölçümleri, eksiklik olan hastaları normallerden tam ayırmaz. Örneğin, normal kişilerin %2.5'unda düşük değerler saptanırken, klinik olarak kobalamin eksikliği doğrulanmış hastaların %5-10'unda normal serum kobalamin değerleri bulunmuştur (18,20). Kemik iliği incelemesi ve klasik Schilling testi de hatalı sonuçlar verebilmektedir (19, 21). Deoksiüridin supresyon testi de rutin laboratuvar tanıda uygulaması çok zahmetli bir testtir (22).

Kobalamin eksikliği olan hastaların çoğunda plazmada total homosistein konsantras-

yonları artmıştır (18,19,21,23). Klinik çalışmalar plazma homosistein düzeyinin, kobalamin eksikliği için hassas bir marker olduğunu göstermiştir (2,7,9,26). Ancak serum metilmalonik asid ile karşılaştırıldığında, plazma veya serum homosisteini, kobalamin eksikliği için spesifik marker değildir, çünkü folat eksikliği başta olmak üzere, plazma homosistein konsantrasyonu diğer şartlarda da belirgin artar. Bilindiği gibi, folat eksikliği de benzer hematolojik bozukluklara yol açar. Her iki testin de spesifikliğini artırmak için, kobalamin veya folik asid ile tedaviden önce ve sonra metabolit konsantrasyonları ölçülür, eksik olan vitamin verildikten sonra, homosistein ve metilmalonik asid konsantrasyonları hızla normale doğru azalma gösterir (21).

Vitamin eksikliğinin doğru tanınması çok önemlidir. Eğer B₁₂ vitamin eksikliği olan, yanlışlıkla folat ile tedavi edilir ise, hematolojik bozukluklar düzelebilir, fakat nöropsikiyatrik bozukluklar ilerlemeye devam eder (21,24).

Plazma total homosisteininin duyarlı bir marker olduğu, intrasellüler kobalamin fonksiyonunun bozulmasından sonra hızla arttığı, nitroz oksit ile anestezi verilen hastalarda gösterilmiştir. Nitroz oksit, metiyonin sentazın kofaktörü olan kobalamini okside etmekte ve buna bağlı olarak total homosisteinde belirgin bir artış gözlenmektedir (25).

Atipik kobalamin eksikliğinin en az klasik eksiklik kadar sık görüldüğü (26) ve geri-

yatrik popülasyonda sık olarak meydana geldiği (27) bildirilmiştir. Sonuç olarak, plazma homosistein tayini kobalamin eksikliğinin hassas göstergesidir denebilir.

Folat Eksikliği

Folat eksikliği sıklıkla besinseldir ve genellikle alkolikler, gebeler gibi yatkınlığı olan kişilerde ve malabsorbsiyonlu hastalarda gelişir. Klasik belirtiler makroovalositoz, anemi ve hipersegmente nötrofillerdir (22,24).

Folat eksikliği olanların plazmalarında homosistein düzeyinin artış gösterdiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (7,8,23). Serum folat düzeyi ile serum homosistein düzeylerinin negatif korrele olduğu saptanmıştır (8). Folattan yoksun diyet ile beslenen farelerde, normalin alt sınırı ve subnormal serum folat konsantrasyonlarında, serum homosistein düzeylerinde 2-4 kat artış görülmüştür (28). Klinik veya laboratuvar olarak folat eksikliği ihtimali olmayan kişilerde, aslında intraselüler folat eksikliği olabileceği, yüksek doz folik asit verilmesinden sonra plazma homosisteininde azalma olduğunun gösterilmesi ile desteklenmiştir. Folik asidin homosistein üzerine olan bu etkisi hiperhomosisteinemik postmenapozal kadınlarda (29) ve sağlıklı görünümlü kişilerde gözlenmiştir (30).

Plazma homosistein düzeyinde artış, intraselüler folat eksikliğini veya folat bağımlı reaksiyonların bozulmuş fonksiyonunu yansıtmaktadır. Plazma homosistein konsantrasyonunun antifolat metotreksat verilmesini izleyen saatler içinde belirgin arttığı saptanmıştır

(31-33).

Folat eksikliği göstergesi olarak plazma homosistein konsantrasyonu, konvansiyonel laboratuvar testlerin bazı defektlerini kompanse edebilir. Serum folat ölçümü, folat almında geçici bir azalma ile kronik folat eksikliğine bağlı doku folat tükenmesini birbirinden ayıramaz (34).

Alkolizm ve megaloblastik anemili hastaların serum ve eritrositlerinde folat normal olabilir (35). Ek olarak, eritrosit folat ölçümünün bir çok teknik sakıncaları vardır. Laboratuvarlar arası varyasyon yüksektir (36). Serum veya eritrosit folat eksikliğini saptamada deoksiüridin sepresyon testi daha güvenilir yöntem olarak kabul edilmiştir (37). Fakat yöntemin kompleks oluşu bu tekniğin yaygın kullanımını engellemiştir.

Kobalamin ve folat eksikliğini tanımda ve birbirinden ayırmada serum kobalamin, folat, total homosistein ve metil malonik asit konsantrasyonları maksimal yarar sağlar. Klinik olarak doğrulanmış kobalamin veya folat eksikliği (19,20) olan hastaların bazılarında bu testlerden birisi normal sonuç verebilir. Fakat panelin tamamının kullanımı hemen her hastada tanıyı mümkün kılar (2).

Homosistinüri

İdrar ile homosisteinin fazla atılımı ile karakterize bir grup kalıtsal bozukluktur. En sık görüleni β -sentaz eksikliğidir. Daha nadir olarak homosistein remetilasyonunda defekt (5,10-metilen-tetrahidrofolat redüktaz eksikliği) ve kobalamin metabolizmasında bozuk-

luklar ile meydana gelebilir. Homosistinüride klinik belirti, mental retardasyon ve prematür vasküler hastalıktır ve son yıllarda homosistinüri konusunda yayınlar yoğunlaşmıştır (2,11).

Değişik homosistinüri formlarının tanısı için plazmada homosistein, idrarda homosistin tayini uygulanan laboratuvar testlerdir. Sistasyonin β -sentaz eksikliği olan hastalarda plazma homosisteininde artışlar olmaktadır. 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz eksikliği veya bozulmuş metil kobalamin sentezi olan hastalar, plazma ve idrarda yüksek konsantrasyonda homosisteine, normal veya subnormal konsantrasyonda plazma metiyonin düzeyine ve yüksek konsantrasyonda serum veya plazma sistasyonin düzeyine sahiptir. Plazma ve idrarda metilmalonik asit ve 2-metilsitrik asitin ölçümü redüktaz eksikliğini kobalamin metabolizmasındaki defektlerden ayırır. Bu metabolitler redüktaz eksikliğinde normal konsantrasyonda bulunurken kobalamin metabolizmasındaki defektlerde konsantrasyonları artmıştır (2).

Plazma ve idrarda çeşitli metabolitlerin ölçümü homosistein metabolizmasının belli bir defektini gösterebilir. Fakat tanının doğrulanması ancak fibroblast kültürlerinde enzim aktivitesinin tayinini gerektirir.

Prematür Kardiyovasküler Hastalık

Yaklaşık 1800 hastayı içine alan çalışmalar ve yeterli sayıda kontroller hiperhomosisteinemi ve prematür kardiyovasküler hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

korelasyon olduğunu göstermiştir. Sağlıklı kişilere göre erken kardiyovasküler hastalığı olanlarda plazma homosistein düzeyinde yaklaşık %30'luk bir fazlalık vardır. Fakat vasküler lezyonun yerine göre bu rakam değişiklik göstermektedir. Koroner arter hastalığı olanlarda ortalama plazma homosistein düzeyinin kontrollere oranı 1.2-1.3, periferik ve serebrovasküler hastalığı olanlarda bu oran 1.5-1.8 olarak saptanmıştır (12).

Hiperhomosisteinemi görülme sıklığı:

Serebrovasküler hastalıkta %40 (38,39)

Periferik arter hastalığında %25 (40)

Koroner kalp hastalığında %15 (41)

olarak bulunmuştur.

Hiperhomosisteinemi prematür vasküler hastalık için olası risk faktörüdür ve hipertansiyon, diyabet, sigara ve plazma kolesterolünden bağımsızdır. Yapılan çalışmalar homosisteinin özellikle genç grupta miyokard enfarktüsü için güçlü bir risk faktörü olduğunu doğrulamaktadır (42). Fakat homosisteinin aterogenezdaki rolü henüz bilinmemektedir. Ancak diğer risk faktörü bulunmayan prematür kardiyovasküler hastalığı olanlarda plazma homosistein düzeyinin tayini önerilmektedir.

Diğer Hastalıklar ve İlaçlar

Renal yetmezliği olan hastalarda plazma homosistein konsantrasyonu yüksek bulunmuştur, ve serum kreatinin düzeyi ile pozitif bir korelasyon saptanmıştır (5,43).

Psöriasisli hastaların çoğunda, lösemili hastaların bir kısmında, bazı solid tümörlerde plazma homosistein düzeyleri yüksek, Down Sendromunda ise düşük bulunmuştur (2,33).

Bazı ilaçların da plazma homosistein konsantrasyonu üzerine etkisi olduğu görülmüştür (45). Antifolat ilaç olan metotreksat (31-33) ve nitroz oksit anestezinin (25) plazma homosistein konsantrasyonlarında hızlı ve geçici artışlar oluşturduğu bildirilmiştir.

Antiepileptiklerden fenitoin ve karbamazepinin folat metabolizması ile interferans yaparak, homosistein düzeyini yükselttiği, ayrıca kolesterol düşürmek amacıyla kullanılan kolestipol ve niasinin de hiperhomosisteinemiye neden olduğu ileri sürülmektedir (46). Yüksek doz folik asitin, yüksek plazma homosistein konsantrasyonlarında düşmelere neden olduğu bildirilmiştir (47).

KAYNAKLAR

1. Lawrence MŞ, Robert HC. Amino acids and proteins. In: Tietz N.W. ed. Textbook of Clinical Chemistry, 1994; 663-667; 2058.
2. Ueland PM, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications Clin Chem. 1983; 39/9: 1764-1779.
3. Svardal AM, Djurhuus R, Refsum H, Ueland PM. Disposition of homocysteine in rat hepatocytes and in nontransformed and malignant mouse embryo fibroblasts following exposure to inhibitors of S-adenosylhomocysteine; metabolism. Cancer Res 1986; 46: 5095-5100.
4. Christensen B, Refsum H, Vazermeyr O, Ueland PM. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological, or superfluous levels of methionine: methionine loading of nontransformed, transformed, proliferating and quiescent cells in culture. J Cell Physiol 1991; 146: 52-62.
5. 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; 114: 473-501.
6. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in the survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child 1962; 37: 505-513.
7. Stabler SP, Marcell PD, Podel ER, Allen RH, Lindenbaum J. Serum homocysteine (Hcy) is a sensitive indicator of cobalamin (Cbl) and folate deficiency. Blood: 1985; 66 (Suppl): 50a.
8. Kang S-S, Wong PWK, Noruss M. Homocysteinemia due to folate deficiency. Metabolism 1987; 36: 458-462.
9. Hall CA, Chu RC. Serum homocysteine in the routine evaluation of potential vitamin B₁₂ and folate deficiency. Eur J Haematol 1990; 45: 143-149.
10. MC Cully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis development and current status. Atherosclerosis Review 1983; 11: 157-240.

11. Ueland PM, Refsum H, Brattstöröm L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis RB Jr, ed. Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function. New York Marcell Dekker, 1992; 183-236.
12. Kang S-S, Wong PWK, MR. Hyperhomocyst (e) inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-298.
13. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr* 1986; 6: 179-209.
14. Skiba WE, Taylor MP, Wells MS, Mangum JH, Awad WMJ. Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine: homocysteine S-methyltransferase. *J Biol Chem* 1982; 257: 14944-14948.
15. Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ. Methionine metabolism in mammals: Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *Arch Biochem Biophys* 1971; 146: 84-92.
16. McRue TD, Freedman ML. Why vitamin B₁₂ deficiency should be managed aggressively. *Geriatrics* 1989; 44: 70-79.
17. Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency-subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrated in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J Lab Clin Med* 1987; 109: 454-63.
18. Lindenbaum J, Heaton EB, Savage DG, Brust JCM, Garrett TJ, Podell ER et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia of macrocytosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1720-1728.
19. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990; 871-881.
20. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency. II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 99-107.
21. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency. I. Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 90-98.
22. Beck WS. Diagnosis of megaloblastic anemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 311-322.
23. Stabler SP, Marcell PD, Pojell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patient with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography - mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988; 81: 466-474.
24. Allen RH. Megaloblastic anemia. In: Wyngaarden JB, Smith LHJ, Bennett JC, Plum F, eds *Cecil textbook of medicine*, 19th ed. Orlando, FL: WB Saunders, 1991; 846-854.
25. Ermens AAM, Refsum H, Ruprecht J, Spijkers LJM, Gutformsen AB, Lindermans J, et al. Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 385-393.
26. Carmel R. Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *Am J Hematol* 1990; 34: 108-114.

27. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews M, Grigsby J, Kaye K, et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40: 1197-1204.
28. Lin J. Y, Kang S-S, Zhou J, Wong PWK. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. *Life Sci* 1989; *Sci* 1989; 33: 319-325.
29. Brattstöm LE, Hultberg BL, Hardebo JE. Folic acid responsive postmenopausal homocysteinemia. *Metabolism* 1985; 34: 1073-1077.
30. Brattstöm LE, Israelsson B, Jeppsson J-O, Hultberg BL. Folic acid-an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 215-221.
31. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter to antifolate effect. A study on psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 510-520.
32. Broxson EH, Stork LC, Allen RH, Stabler SP, Kolhouse JF. Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions. *Cancer Res* 1989; 49: 5858-5862.
33. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia. Changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51: 828-835.
34. Bailey LB. Folate status assessment. *J Nutr* 1990; 120: 1508-1511.
35. Savage D, Lindenbaum J. Anemia in alcoholics. *Medicine* 1986; 65: 322-338.
36. Brown RD, Jun R, Hughes W, Watman R, Arnold B, Kronenberg H. Red cell folate assay: some answers to current problems with radioassay variability. *Pathology* 1990; 22: 82-87.
37. Wickramasinghe SN, Saunders JE. Results of three years' experience with the deoxyuridine suppression test. *Acta Haematol* 1977; 58: 193-206.
38. Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, Garmo P. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21: 572-576.
39. Brattstöm L, Lindgren A, Israelsson B, Malinow MR, Norving B, Upson B. Hyperhomocysteinemia in stroke. Prevalence, cause and relationship to other risk factors or type of stroke. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 214-221.
40. Mølgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm A-C, Olsson AG. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for intermittent claudicatio. *J Intern Med* 1992; 231: 273-279.
41. Malinow MR, Sexton G, Averbuch M, Grossman M, Wilson DL, upson B. Homocys(e)inemia in daily practice: levels in coronary heart disease. *Coronary Artery Dis* 1990; 1: 215-220.
42. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in United States physicians. *J Am Med Assoc* 1992; 268: 877-881.
43. Soria C, Chadefaux B, Coude M, Gaillard O, Kamoun P. Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure (Tech Brief). *Clin Chem* 1990; 36: 2137-2138.

44. Chadeaux B, Ceballos I, Hamet M, Coude M, Poissonnier M, Kamoun P, Allard D. Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? *Lancet* 1988; ii: 741.
45. Refsum H, Ueland PM. Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism [Review]. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 411-416.
46. Blankerhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. *Coronary Artery Dis* 1991; 2: 357-360.
47. Young DS, Bermes EW. Specimen collection and processing. Sources of biological variation. In: Tietz NW, ed. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders. 1987; 266-286.