

Homosistein ve MTHFR Genotipinin Koroner Arter Hastalığı Risk ve Yaygınlığının Belirlenmesindeki Önemi

Prof. Dr. S. Lale TOKGÖZOĞLU, Y. Doç. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU*, Dr. Enver ATALAR, Y. Doç. Dr. Kudret AYTEMİR, Dr. Necla ÖZER, Doç. Dr. İbrahim ÜNSAL**, Doç. Dr. Kenan ÖVÜNÇ, Prof. Dr. Sırrı KES, Prof. Dr. Ergül TUNÇBİLEK**
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı*,
Biyokimya Bölümü**, Ankara

ÖZET

Bu çalışma, plazma homosistein düzeyleri ve metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genotipinin koroner arter hastalığı (KAH) risk ve yaygınlığına etkilerini araştırmak amacıyla planlandı. Bu amaçla 242 hasta, konvansiyonel risk faktörleri, plazma homosistein, B₁₂, folat ve MTHFR genotipi açısından değerlendirildi. Koroner arter hastalığı mevcut olan 151 hastada plazma homosistein değerleri ortalama 18.5±11 µmol/L, koronerleri normal olan 91 hastada ise 15.6±10 µmol/L olarak bulundu (p>0.05). Plazma homosistein değerlerinin 15 µmol/L'nin üzerinde olması koroner arter hastalığı için önemli ve bağımsız bir risk faktörü olarak bulundu. (p=0.03, RR 2.1, %95 CI 1.07-4.4). Yine 15 µmol/L üzeri homosistein değerleri koroner arter hastalığı yaygınlığı ile de ilişkili bulundu (p=0.04, RR 3.2, %95 CI 1.3-8.2). Folat düzeyleri hasta grubunda 5.1±1.3 ng/ml, kontrol grubunda 7.0±3.2 ng/ml bulundu. MTHFR genotipi açısından değerlendirilme yapıldığında, TT genotipi hastaların %7.7'sinde, kontrol grubunun %5.2'sinde mevcuttu (p>0.05). TT genotipi plazma homosistein düzeyi ile ilişkili bulundu (p=0.001). Ayrıca TT genotipi koroner arter hastalığı yaygınlığı ile de ilişkili bulundu (p=0.03).

Sonuç olarak, homosistein düzeylerinin 15 µmol/L üzerinde olması koroner arter hastalığı varlığı ve yaygınlığı için önemli bir risk faktörü olarak bulundu. Bunun yanı sıra, TT genotipinin plazma homosistein düzeyi ve koroner arter hastalığı yaygınlığı için önemli bir belirleyici olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Koroner arter hastalığı, B₁₂, folat, MTHFR mutasyonu

Koroner arter hastalığı gelişiminde rol oynayan bağımsız risk faktörlerine yakın zamanda eklenen bir yenis, plazma homosistein düzeylerindeki yükselmedir (1). Bugüne kadar yapılan ve 3000 den fazla hastanın incelendiği çalışmalarda, hafif ve orta dere-

cede yükselmiş homosistein düzeylerinin ateroskleroz gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (2). Plazmadaki homosistein düzeylerinin iki ana belirleyicisi genetik ve çevresel faktörlerdir (3,4). Çevresel faktörlerden en önemlisi beslenme alışkanlıkları, B vitaminleri ve folat içeren gıdaların tüketimidir. Genetik olarak ise homosistein düzeyini belirleyen iki ana etmeden biri metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genotipidir. MTHFR enziminin aktivitesini belirleyen bu genin sıkça görülen bir mutasyonu mevcuttur. Eğer MTHFR geninin 677. nükleotidindeki mutasyonla sitozin timidine dönerse; oluşan termolabil MTHFR in enzim aktivitesi, orjinaline göre daha düşük olur. Düşük enzim aktivitesi nedeni ile bu genotipe sahip kişilerde plazma homosistein düzeyi yükselir (5). Daha önce yapılan çalışmalar, MTHFR genindeki bu mutasyonun koroner arter hastalığı gelişimi ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir (6). Bu mutasyonun koroner arter hastalığı gelişimine katkısı toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir (7). Özellikle folat düzeyi düşük toplumlarda bu genotipin daha büyük önem taşıdığı düşünülmektedir (8). Ülkemizde de, total kolesterol düzeyleri batı toplumlarına göre düşük olmasına karşın koroner arter hastalığı prevalansı azımsanmayacak düzeydedir (9). Ayrıca, folat eksikliğinin ülkemizde sık rastlanan bir sorun olduğuna ilişkin yayınlar mevcuttur. Bu nedenlerle hiperhomosisteinemi Türkiye'de KAH gelişimi için bir risk faktörü olabilir. Ancak ülkemizde homosistein düzeylerinin koroner arter hastalığına katkısı ile ilgili yapılmış çalışma yoktur. Bu nedenle, planlanan bu çalışma homosistein düzeylerinin ve MTHFR genotipinin koroner arter hastalığı gelişimi ve yaygınlığına etkisini araştırmak amacıyla yapıldı.

Alındığı tarih: 22 Nisan , revizyon 13 Temmuz 1999
Yazışma adresi: Prof. Dr. S. Lale Tokgözoğlu, Güven sok. No:9,
Kavaklıdere 06540 Ankara
Faks: (0 312) 466 19 06
Bu çalışma, European Society of Cardiology'nin 1998 Viyana toplantısında sunulmuştur.

MATERYEL ve METOD

Çalışmaya tanınal amaçlı koroner anjiyografi yapılan 242 hasta alındı (89 kadın, 153 erkek). Hastaların hepsi kateterizasyon öncesinde detaylı olarak sorgulandı, fizik muayeneleri yapıldı, EKG ve akciğer filmleri çekildi. Hastalar konvansiyonel koroner arter hastalığı risk faktörleri olan; sigara, hiperlipidemi, diyabetes mellitus, hipertansiyon, aile öyküsü yönünden değerlendirildi. Halen sigara içmekte olan hastalar sigara kullananlar grubuna dahil edildi.

Kardiyak kateterizasyon Judkins tekniği ile yapıldı. 30 derece sağ ön oblik (RAO) ve 60 derece sol ön oblik (LAO) pozisyonunda yapılan sol ventrikülogram sonrasında koroner anjiyografi yapıldı. Koroner anjiyogramda en az bir damarda > %50 darlık saptanması koroner arter hastalığı olarak tanımlandı. Bu tanımlamaya göre 151 kişide koroner arter hastalığı (hasta grubu) saptanırken 91 kişi tamamen normal koroner anatomiye sahipti (kontrol grubu). Hasta grubunun yaş ortalaması 57±11 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 52±11 di. Koroner skorlama iki farklı değerlendirici tarafından Leaman skor sistemi ile yapıldı (10).

Lipid Ölçümü: Kan örnekleri koroner anjiyografi yapılacak günde aç karına alındı. Plazma örneklerinde açlık şekeri, lipid profili, BUN, kreatinin ve karaciğer enzimleri çalışıldı. Total kolesterol, HDL kolesterol ve trigliserid konvansiyonel yöntemlerle ölçüldü.

Homosistein, folat ve B₁₂ Ölçümü: Kan örneklerinde total homosistein seviyesi immunoassay yöntemi ile (Axis Biochemicals ASA, Norway) ölçüldü. Ölçüm metodunun temeli, homosisteinin S-adenozil-L-homosisteine dönüşümü ve takiben S-adenozil-L-homosisteinin enzim-linked immunoassay yöntemi ile ölçülmesiydi (11). B₁₂ vitamini ve folat seviyeleri mikropartikül enzim immunoassay (Abbott Laboratuvarları, Abbott Park, IL) yöntemi ile saptandı.

Genotip Analizi: DNA izolasyonundan sonra daha önce tanımlanan yöntemlerle, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulandı (12). Toplamı 20 µl olacak şekilde her örneğe 0.4 µl genomik DNA, 0.1 nmol/µl primer, 4 mM

dNTP, 10 mM Taq buffer ve 1 ünitelik termostabil Taq polimeraz konuldu. Alaninin valine dönüşümünü göstermek için 198 bp'lik amplifikasyon sağlayan şu primerler kullanıldı: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' (ekzonik) ; 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (intronik). PCR şu şartlar altında uygulandı: İlk denatürasyon 94°C'de 1 dakika yapıldı. Bunu takiben 40 döngüde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 68°C'de 1 dakika "annealing" ve 72°C'de 2 dakika ekstansiyon yapıldı. Son olarak örnekler 72°C'de son ekstansiyon yapıldı. Alaninin valine dönüşümü, Hinf I restriksiyon enzimi ile RFLP yapılarak incelendi. Bu enzim 198 bp lik bölgeyi dönüşüm durumunda 175 ve 23 bp lik parçalara kesmektedir. Kesim sonuçları %9'luk poliakrilamid jelde görüntülendi. Çok küçük olan 23 bp lik parça jel üzerinden aktığından sonuçta üç farklı genotipin ortaya çıkma olasılığı vardır: NN (198 bp), TT (175 bp) ve TN (198 bp).

İstatistik: Kontrol ve hasta gruplarındaki allel genotip sıklığı ki-kare testi ile karşılaştırıldı ve değerler Hardy-Weinberg eşitliği ile belirlendi. Odds ratio MTHFR genotipi ile fenotipi ilişkisi ölçülerek hesaplandı. Her odds ratio için, two-tailed p değerleri ve %95 güvenilirlik aralıkları hesaplandı. Genotip ve plazma homosistein düzeyleri ANOVA ve ki-kare testleri ile araştırıldı. Fenotiplerde allel ilişkisini saptamak için multiple lojistik regresyon analizi uygulandı. Değişkenlerin ortalamasını karşılaştırmada Leuvene'in two-tailed t testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışma grubunun özellikleri: Çalışma grubumuz, koroner anjiyografi yapılan 242 hasta oluşturdu. Bunların 151'inde koroner arter hastalığı saptanırken (46 kadın, 105 erkek, ortalama yaş 57±11), 91'inde koronerler normal olarak bulundu (45 kadın, 46 erkek, ortalama yaş 52±11). Koroner arter hastalığı olan hastalardan %58'inde eski miyokard infarktüsü

Tablo 1. Koroner arter hastalarında ve kontrol grubunda risk faktörlerinin dağılımı

	Kontrol (n=91)	KAH (n=151)	P değeri	Odds ratio	%95 CI
Total Kolesterol (mmol/l)	5.36 (1.22)	5.57 (1.17)	0.09	1.78	0.93-3.41
Trigliserid (mmol/l)	1.70 (0.79)	1.99 (0.90)	0.009	3.10	1.33-7.23
HDL (mmol/l)	1.06 (0.28)	1.03 (0.23)	1.0	1.04	0.45-2.39
LDL (mmol/l)	3.31 (0.85)	3.75 (0.75)	0.01	2.60	1.23-5.46
Total kolesterol/HDL	5.04	5.37	0.015	2.70	1.25-5.84
Sigara kullanımı (%)	28	52	0.002	2.84	1.47-5.47
Hipertansiyon (%)	25	43	0.015	2.34	1.19-4.60
Diyabetes mellitus	0.6	18	0.025	3.42	1.12-10.46
Aile hikayesi (%)	43	31	0.1	1.71	0.82-3.54

CI; Güvenilirlik aralığı
HDL; yüksek dansiteli lipoprotein

KAH; koroner arter hastalığı
LDL; düşük dansiteli lipoprotein

vardı. Risk faktörlerinin dağılımı Tablo 1'de görüldüğü gibi, koroner arter hastalığı için bilinen konvansiyonel risk faktörlerinin sıklığını yansıtmaktaydı. Konvansiyonel risk faktörleri arasından, LDL kolesterol ($p=0.004$), sigara ($p=0.002$), hipertansiyon ($p=0.015$), diyabetes mellitus ($p=0.025$) koroner arter hastalığı için anlamlı risk faktörleri olarak bulundu (Tablo 1). Koroner arter hastalığı olan grupta ortalama Leaman skoru 13.5 ± 12 bulundu.

Plazma homosistein, B₁₂, folat seviyeleri: Plazma ortalama homosistein düzeyi kontrol grubunda 15.6 ± 10 $\mu\text{mol/L}$, koroner arter hastalığı olanlarda 18.5 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı ($p>0.05$). Plazma homosistein düzeyinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması koroner arter hastalığı için anlamlı bir risk faktörü olarak bulundu ($p=0.03$, Risk ratio 2.1, %95 güvenilirlik aralığı 1.07-4.4). Diğer risk faktörleri ile beraber değerlendirildiği multivariate analiz sonucunda da plazma homosistein düzeyinin koroner arter hastalığı için halen bağımsız olarak ve anlamlı bir risk faktörü olduğu gösterildi ($p=0.04$). Multivariate analiz sonucuna göre diğer koroner arter hastalığı belirleyicileri olarak, sigara ($p=0.02$), diyabetes mellitus ($p=0.005$), hipertansiyon ($p=0.002$), LDL ($p=0.0003$) ve total kolesterol/HDL oranı ($p=0.015$) bulundu. Homosistein seviyeleri sigara içenlerde 17 ± 9 $\mu\text{mol/L}$ ve içmeyenlerde 16 ± 9 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu ($p>0.05$). Ayrıca homosistein seviyesinin 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde olması, Leaman skoru ile belirlenen koroner ateroskleroz yaygınlığı ile anlamlı ilişkili bulundu ($p=0.014$, risk oranı 3.2, %95 güvenilirlik aralığı 1.3-8.2).

Koroner arter hastalarında plazma B₁₂ düzeyi ortalama 238 ± 100 pg/ml iken kontrol grubunda 244 ± 111 pg/ml olarak bulundu ($p>0.05$). Plazma homosistein düzeyi ile B₁₂ düzeyi arasında ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Ayrıca plazma B₁₂ düzeyi ile koroner arter

hastalığı varlığı ve yaygınlığı arasında ilişki yoktu ($p>0.05$).

Kontrol grubunda folat seviyesi 7.0 ± 3.2 ng/ml, koroner arter hastalığı olanlarda 5.1 ± 1.3 ng/ml olarak bulundu ($p=0.04$). Plazma homosistein ve folat seviyeleri arasında anlamlı bir ters ilişki saptandı ($p=0.03$). Koroner arter hastalığı varlığı ve plazma folat seviyesi de anlamlı olarak ilişkilidir ($p=0.036$, risk oranı= 2.42, güvenilirlik aralığı 1 ± 5.5). Alt-grup analizi yapıldığında sigara içenlerde folat seviyesi sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.04$).

Homosistein'in lipid değişkenleri üzerine etkisi de incelendi ancak total kolesterol ve trigliserid düzeyine etkisi olmadığı görüldü ($p>0.05$). Ancak, HDL ile plazma homosistein seviyesi arasında zayıf bir ters ilişki saptandı ($p>0.05$, $r = -0.037$).

Genotip Dağılımı ve Fenotiple İlişkisi: Genotiple- rin dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. TT genotipi koroner arter hastalarının %7.4'ünde, kontrol grubunun %5.2'sinde mevcuttu. Allelerin prevalansları Hardy-Weinberg eşitliği ile belirlenene göre anlamlı olarak farklı değildi (TT %7.1, TN %40.2, NN %53.7) (ki-kare=2.3, $p=0.3$).

Plazma homosistein düzeyleri, üç farklı genotipte bakıldığında, en yüksek değerler TT genotipi olanlarda bulundu. Multivariate analizde, B₁₂ ve folat düzeyleri gözönüne alındıktan sonra da TT genotipi, plazma homosistein düzeyinin önemli bir belirleyicisi olarak devam etti ($p=0.004$) (Şekil-1).

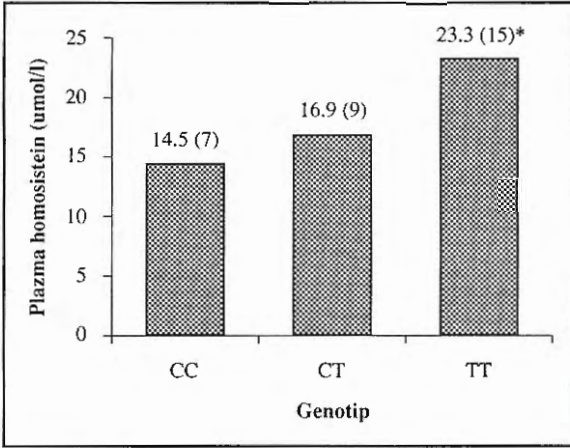
Plazma folat düzeylerinin de etkisini araştırmak amacıyla, popülasyonun median folat düzeyi belirlendi, ve bu düzeye göre hastalar median altı ve üstü folat değerlerine göre ikiye ayrıldı. Hem median altı folat düzeyi olup hem de TT genotipinde olan hasta-

Tablo 2. Koroner arter hastalarında ve kontrol grubunda genotiplerin dağılımı

	Genotipler			Alleller	
	TT	TN	NN	T	N
KAH	%7.4	%46.8	%45.8	%30.9	%69.1
Kontrol	%5.2	%43.1	%51.7	%26.7	%73.3
%95 CI	0.32-5.31	0.56-2.19	0.42-1.66	0.37-1.62	
P değeri	0.701	0.765	0.622	0.6335	

CI: Güvenilirlik aralığı

KAH : Koroner Arter Hastalığı



Şekil 1. Genotipe göre plazma homosistein düzeyinin dağılımı. *p=0.001, CC ile TT kıyaslaması.

ların en yüksek homosistein değerine sahip olduğu gözlemlendi (p=0.01) (tablo 3). Bu ilişki ANOVA testi ile değerlendirildiğinde F=7.74, p=0.01 olarak bulundu.

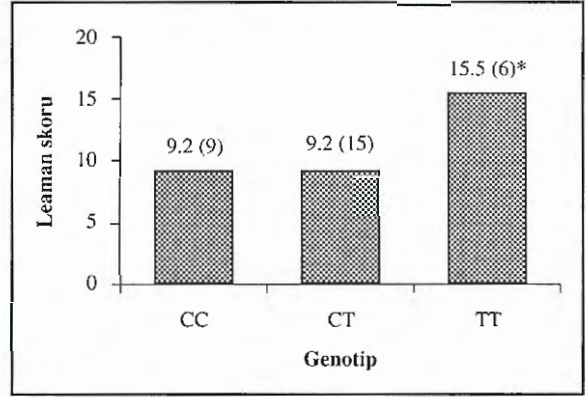
TT genotipine sahip hastalarda aynı zamanda en yüksek Leaman skoru bulundu (Şekil-2). Koroner arter hastalığının bağımsız belirleyicileri olan, yaş, cinsiyet, aile öyküsü, hipertansiyon, diyabetes mellitus, sigara, total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K, folat, homosistein düzeyleri ve MTHFR genotipi, multipl lojistik regresyon analizinde araştırıldığında, plazma homosistein ve folat düzeylerinin bağımsız belirleyiciler olduğu, TT genotipinin ise bağımsız belirleyici olmadığı anlaşıldı (tablo 4).

TARTIŞMA

Günümüze dek yapılan çok sayıda çalışma, artmış homosistein düzeylerinin koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğunu kanıtlamıştır (13). Bu çalışmaların meta-analizinde; homosistein'de 5 µmol/L bir artışın, total kolesteroldeki 0.5 µgr/L artı-

Tablo 3. Popülasyon median folat düzeyine göre ayrıldığında, genotip ve plazma folat düzeyine göre plazma homosistein düzeyinin dağılımı

	CC	CT	TT	p değeri
Plazma homosistein (µmol/l)	14.5 (7.0)	16.9 (9.0)	23.3 (15.0)	0.001
Folat düzeyi <12.9 nmol/l olan hastalardaki plazma homosistein (µmol/l)	15.2 (8.0)	19.5 (10.0)	28.4 (15.0)	0.01
Folat düzeyi >12.9 nmol/l olan hastalardaki plazma homosistein (µmol/l)	14.0 (6.0)	14.5 (8.0)	12.0 (4.0)	AD



Şekil 2. Genotipe göre Leaman skoru dağılımı. *p=0.03, CC ile TT kıyaslaması

Tablo 4. Multipl lojistik regresyon analizine göre koroner arter hastalığı prediktörleri

Değişken	p değeri
Sigara kullanımı	0.02
Diyabet	0.005
Hipertansiyon	0.002
LDL kolesterol	0.003
Total kolesterol/HDL kolesterol	0.015
Homosistein	0.04
Folat	0.03
TT genotipi	0.25

HDL; yüksek dansiteli lipoprotein
LDL; düşük dansiteli lipoprotein

şa eşdeğer düzeyde koroner arter hastalığı riskini artırdığı gösterilmiştir (14). Risk faktörleri, popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Ülkemizde hiperhomosisteinemisinin ne denli önemli bir risk faktörü olduğuna ait çalışma yoktur. Ancak bazı ipuçları, önemli risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir: Ülkemizde, folat eksikliğine bağlı gelişen konjenital nöral tüp defektleri, diğer ülkelere göre çok daha sıktır (15). Eilindiği gibi folat düşüklüğü homosiste-

tein düzeylerini arttıran bir çevresel etmendir. Ayrıca COMAC grubunun çalışmasında, düşük folat düzeyi ile aterosklerotik damar hastalığı ve koroner mortalite arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (16). Dünya Sağlık Örgütü; folat düzeylerinin alt sınırı olarak 13.6 µmol/L (6 ng/ml)'yi kabul etmektedir; 12.5 µmol/L (5.5 ng/ml) altında ise homosistein düzeyleri artmaya başlamaktadır. Bizim çalışmamızda da özellikle kontrol grubunda olmak üzere hastalarda folat düzeylerinin genel olarak beklenenden düşük olduğunu saptadık. Bunun yanısıra; 15 µmol/L üzerindeki homosistein değerlerinin koroner arter hastalığı için anlamlı ve bağımsız bir risk faktörü olduğunu gördük (RR 2.1). Ayrıca homosistein düzeyi ile koroner ateroskleroz yaygınlığı arasında da önemli ilişki saptadık. Daha önceden yapılan çalışmalarda da genelde 10-15 µmol/L üzerindeki homosistein değerlerinin koroner arter hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir (18). Bu değerler üzerindeki homosisteinin endotel hasarı, düz kas proliferasyonu, LDL oksidasyonu ve protrombotik etki yaptığı çeşitli in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (19-21). Homosistein, ateroskleroz gelişimine diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak katkıda bulunmaktadır (22). Bizim çalışmamızda da konvansiyonel risk faktörleri ile homosistein düzeyleri arasında bir ilişki saptanmamıştır. Homosistein'in iki önemli belirleyicisinin TT genotipi ve plazma folat düzeyleri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda en yüksek homosistein değerleri hem TT genotipi olup hem de folat düzeyleri düşük bulunan bireylerdir. Literatürde, TT genotipinin homosistein düzeylerini arttırdığı, bu artışın folat düzeyi düşük kişilerde daha da önemli olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (22,23). Bizim popülasyonumuzda TT genotipi %7.4 gibi azımsanmayacak oranda görülmüş, ortalama folat düzeyleri de çoğu batı ülkelerinden az bulunmuştur. Bu bulgular, ülkemizde hiperhomosisteinemi prevalansının yüksek olmasını açıklamaktadır. Hiperhomosisteineminin oldukça sık görülmesi ve koroner ateroskleroz ile bağımsız ilişkisinin olması, ülkemizdeki koroner arter hastalığı prevalansına katkıda bulunan bir parametre olduğunu düşündürmektedir.

Bu bulguların önemli klinik sonuçları vardır. Yeni klinik çalışmalarda TT genotipli hastalarda B₆, B₁₂, folat içeren besinlerin tüketimi ile plazma homosistein düzeylerinin düşürüldüğü gösterilmiştir. Diyetle 1000 mg/gün folat ilavesi ile plazma homosistein

düzeylelerini %21 azaltmak mümkündür (24). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998 yılından itibaren sık tüketilen gıdalara (ör. kahvaltılık gevreği) folat suplementasyonu yapılmaya başlanmıştır (25). Buna rağmen, günümüzde homosistein düzeylerini düşürmenin, aterosklerozun ilerlemesini durdurduğunu kanıtlayan çalışmalar henüz yoktur.

Sonuç olarak, hiperhomosisteinemi koroner arter hastalığı gelişmesi ve yaygınlığı için ülkemizde de önemli bir risk faktörü olarak belirlemektedir. Konvansiyonel risk faktörleri ile açıklanamayan hastalarda homosistein düzeyleri hatta genotipinin belirlenmesi, folik asit tedavisinden fayda görecektir bir alt grubu ortaya çıkaracaktır.

Teşekkür

Bu proje Türk Kardiyoloji Derneği tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Montalescot G:** Homocysteine: the new player in the field of coronary risk. *Heart* 1996; 76:101-2
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al:** A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease; probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57
- Meleady RA, Mulcahy DA, Graham IM:** Genes, greens and homocysteine. *Heart* 1996;76:103-4
- Daly L, Robinson K, Tan KS, et al:** Hyperhomocysteinemia: a metabolic risk factor for coronary heart disease determined by both genetic and environmental influences? *Quarterly J Med* 1993;86:685-9
- Kang SS, Wong PW, Susmeno A, et al:** Thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45
- Morita H, Taguchi J, Kurihara H, et al:** Genetic polymorphism of 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997;95:2032-6
- Bockxmeer FM, Ma motte CDS, Vasikaran SD, et al:** Methylene tetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 1997;95:21-3
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al:** Relation between folate status, a common mutation in MTHFR, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9
- Onat A, Dursunoglu D, Sansoy V:** Relatively high coronary death and event rates in Turkish women. Relation to three major risk factors in 5 year follow-up of cohort. *Interventional J Cardiol* 1997;61:69-77

10. **Leaman DM, Brower RW, Meester GT, et al:** Coronary atherosclerosis: severity of the disease, severity of angina pectoris and compromised left ventricular function. *Circulation* 1981;63:285-99
11. **Frantzen F, Faaven AL, Alfheim I, et al:** Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clinical Chemistry* 1998;44:311-16
12. **Frosst P, Blom R, Milos P, et al:** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR. *Nature Genetics* 1995;10:111-3
13. **Mc Cully KS:** Vascular pathology of homocysteine-mia: implications for the pathogenesis for arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28
14. **Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al:** A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049-57
15. **Boduroğlu K, Alikasıfoğlu M, Anar B, et al:** The 677 CT mutation of the MTHFR gene is not a risk factor for neural tube defects in the Turkish population. *Arch Dis in Childhood* (in press)
16. **Robinson K, Arheert K, Refsum H, et al for the European COMAC group:** Low circulating folate and vitamin B6 concentrations. Risk factors for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease. *Circulation* 1998;97:437-43
17. **Food Nutrition Board. National Research Council:** Folic acid: Biochemistry and physiology in relation to human nutrition requirement. Washington DC. National Academy of Sciences 1977
18. **Stampfer MJ, Malinow R, Willett W, et al:** A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-81.
19. **Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR:** Homocysteine induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976;58:731-41
20. **Tsia JC, Perella MA, Yoshizumi M, et al:** Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:6369-73
21. **Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K:** Homocysteine, a thrombogenic agent supresses anticoagulant heparan sulfate expression in culture porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1381-6
22. **Tonstad S:** Correlates of plasma total homocysteine in patients with hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest* 1997;27:1025-9
23. **Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky AG:** Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation* 1998;97:421-4
24. **Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, et al:** The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and MTHFR genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1157-62
25. **Food Standards:** Amendment of the standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid (21 CFR 136,137 and 139). *Fed Regist* 1996;61:781-97