

AKUT MİYOKARD ENFARKTÜSÜNDE SERUM FOLİK ASİT VE B12 VİTAMİNİ DÜZEYLERİ Serum folic acid and vitamin B12 levels in acute myocardial infarction

A Binnur ERBAĞCI¹, Necat YILMAZ², M.Şahin KILINÇER¹

Özet

Amaç: Son yıllarda periferik, serebrovasküler ve koroner ateroskleroz ile yüksek homosist(e)in düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmiş ve ateroskleroz için cinsiyet, yaş, sigara tüketimi ve lipid düzeylerinden bağımsız bir risk faktörü olabileceği görüşüne varılmıştır. Bu çalışmada homosistein metabolizmasında önemli rol oynayan B12 ve folik asit vitaminlerinin serum düzeyi akut miyokard enfarktüsü tanısı ile koroner yoğun bakım ünitesinde gözleme alınan 12 hasta (8 E, 4 K) ve sağlıklı 14 bireyde (7 E, 7 K) analiz edilmiştir.

Gereç ve yöntem: Serum folik asit ölçümlerine: kaynatmalı, yarışmalı, protein bağlayıcı kemiluminesans bir yöntem olan Immulite (DPC) folik asit analizi, serum B12 ölçümünde mikropartikül enzim immün analiz yöntemi olan IMx (Abbott) B12 analizi uygulanmıştır.

Bulgular: Hasta grubu serum B12 ve folik asit düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. İki vitamin düzeyi hasta ve kontrol gruplarında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon göstermektedir. Serum vitamin ve glukoz, üre, total lipid, kolesterol, CK, ALT, AST düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Sonuç: Bu çalışma düşük serum B12 ve folik asit düzeylerinin koroner arter hastalıkları için risk faktörü olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, B12 vitamini, Folik asit, Koroner arter

Abstract

Purpose: The relation between mild hyperhomocyst(e)inemia and periferic, cerebrovascular and coronary atherosclerosis has been established in recent years and has been determined to be an independent risk factor from sex, age, tobacco consumption and lipid levels for atherosclerosis. Vitamin B12 and folic acid are important determinants of homocysteine metabolism. In this study, folic acid and vitamin B12 levels of 12 patients (8M, 4 F) observed in coronary intensive care unit for acute myocardial infarction and 14 healthy subjects (7M, 7F), were analyzed.

Material and methods: For serum folic acid determination Immulite (DPC) folic acid analysis which is a boiling, competitive, protein-binding, chemiluminescence method and for serum vitamin B12 determination IMx (Abbott) B12 analysis, a microparticule enzyme immune analysis (MEIA) method were carried out.

Results: Vitamin B12 and folic acid levels of the patient group were significantly increased as compared with healthy controls. Vitamin concentrations were positively correlated in both groups. There was no relation between the vitamin concentrations and serum glucose, urea, total lipid, cholesterol, CK, ALT, AST levels.

Conclusion: This study supports the concept that decreased vitamin B12 and folic acid levels are risk factors for coronary artery disease.

Key Words: Atherosclerosis, Coronary artery, Folic acid, Vitamin B12

Homosistein, homosistin ve homosistin-homosistein disülfidden oluşan homosist(e)in H(e) düzeyleri,

homosistinürili bireylerde artmakta ve erken ateroskleroz, arteriyal ve venöz trombotik hastalıklarla seyredebilmektedir. Son çalışmalar daha hafif düzeydeki hiperhomosisteineminin de damar tıkaçıcı hastalık riskini artırdığını göstermektedir (1,2).

*XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997, Kayseri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi GAZİANTEP Biyokimya. Arş. Gör. Dr.¹, Yrd.Doç.Dr.².

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

Demetile metiyonin türevi olan homosistein iki yolla

metabolize olmaktadır. B6 vitamini gerektiren transsülfürasyon reaksiyonu ile sistatyonine veya folat ve B12 vitamini bağımlı bir enzim olan metiyonin sentaz ile yeniden metiyonine dönüşebilmektedir. Bu metabolik yolların koenzim veya enzim eksikliğine bağlı duraklaması H(e) birikimine yol açmakta, H(e) hızla hücreden uzaklaştırılmaktadır (3,4-6). Homosistein plazmada çoğunlukla sistein ve diğer sülfidril grubu içeren bileşiklerle homo-dimer ve hetero-dimer oluşturarak ve proteine bağlı olarak bulunur. H(e) plazmada başlıca albumin tarafından taşınır.

Koroner, serebral ve periferik arteriyel hastalıkları olan hastaların yaklaşık %15-40'ında total H(e)düzeyleri yüksek bulunmuştur (7). Son çalışmalarda açık plazma H(e) düzeyleri üst beşinci persantildeki hastalar için rölatif damar hastalığı riski 2.2 olarak saptanmıştır (8). H(e)'in atherogenez ve trombogenezdeki rolü ise tam olarak bilinmemekte ancak antikoagülasyon sistemi, serbest oksijen radikalleri oluşumu, düz kas gelişimi ve metilasyon aktivitesinin değişimine bağlı ikincil olayları da içeren çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir. Protein C antikoagülasyon sisteminin aktivasyonu trombomodulin gerektirmektedir. H(e) endotel dokusunda trombomodulin oluşumunu inhibe etmektedir (9). H(e)'in oksijen aracılı bir reaksiyonla H₂O₂ oluşumunu başlattığı bilinmekte, buna bağlı lipoprotein oksidasyonu ve doku hasarı oluşabileceği düşünülmektedir (10,11). Ayrıca H(e)'in siklin gen transkripsiyonel aktivitesinin artırılması ve özgün proto-onkogenlerin uyarılması ile düz kas gelişimini stimule ettiği de saptanmıştır (12-14). H(e)'in hücre içi metilasyon aktivitesini etkileyerek dolaylı bir rol üstlenmesi de olasıdır. Bilindiği gibi S- adenozil homosistein (SAH), S- adenozil metiyonin (SAM) bağımlı metilasyon reaksiyonlarının etkin bir inhibitörüdür. Hücrede H(e) birikimi SAH hidrolizini etkileyerek normal metilasyon reaksiyonlarını engelleyebilir (15).

H(e) ve H(e) metabolizmasının önemli koenzimleri olan folat ve B12 vitaminlerinin kantitatif ölçümleri farklılık göstermektedir. H(e) ölçümünde amperometrik yöntemler ve HPLC, folat ve B12

vitaminlerinin ölçümünde immunokimyasal yöntemler ve mikrobiyolojik analizler kullanılmaktadır.

Bu çalışma, ölüm nedenlerinin önemli bir kısmını oluşturan iskemik kalp hastalıklarında folat ve B12 vitamini ve folik asit eksikliklerinin olası rolünün gösterilmesini amaçlayan pilot araştırma niteliğindedir. Bu vitaminlerin eksikliğinde atherogenez ve trombogenez eğilimi artıran tek ajanın H(e) mi olduğu, vasküler hasara yol açabilen serum vitamin düzeyleri için geçerli bir eşik değer saptanması gibi çalışmalarla koruyucu hekimlikte önemli bir yarar sağlayacağına inanıyoruz.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Gaziantep Devlet Hastanesi Koroner Yoğun Bakım Ünitesinde akut miyokard enfarktüsü (AMI) tanısı ile gözleme alınan 12 hastadan (8 E, 4 K) ve kontrol grubunu oluşturan 14 sağlıklı bireyden (7 E, 7 K) sağlanan kan örnekleri analiz edilmiştir. Serum glukoz, üre, total lipid, kolesterol, kreatin kinaz (CK), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri aynı gün Kone Selective Chemistry analizörü ile ölçülmüştür. B12 ve folik asit analizleri için serum çalışma gününe dek karanlıkta ve - 20 °C' da saklanmıştır.

Serum B12 düzeyleri Mikropartikül Enzim İmmun Analiz (MEIA) yöntemi olan IMx B12 reaktifi ve IMx (Abbott) analizörü ile ölçülmüştür. Bu test denatürasyon aşamasını takiben serumun sırasıyla intrinsik faktör kaplı mikropartiküllerle ve alkalen fosfataz konjugatı ile inkübasyonunu içeren bir sandviç yöntemidir. Konsantrasyonlar floresans bir sinyal ile ölçülmektedir.

Serum folik asit düzeylerinin ölçümünde kaynatmalı, yarışmalı protein bağlayıcı kemiluminesans bir yöntemle çalışan Immulite (DPC) analizörü ve folik asit reaktifi kullanılmıştır. Bu yöntem numunenin ditiotreitol, KCN ve ligand işaretli folatla birlikte kaynatılarak folatın endojen bağlayıcı proteinlerden ayrıştırılması aşamasını gerektirmektedir. Konsantrasyon antiligand dedeksiyon sistemi ile

kemiluminesant substrattan yayımlanan ışınların luminometrik ölçümü ile saptanmaktadır.

İstatistiksel analizler: Gruplar arası farklılıklar Mann Whitney-U testi, ilintiler korelasyon ve regresyon analizleri ile incelenmiştir. Verilerin değerlendirilmesi bilgisayar ile Statgraphics istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalar ve kontrol grubuna ait serum B12 ve folik asit düzeyleri Tablo 1' de görülmektedir. Hasta grubunda serum B12 vitamini düzeyleri ortanca (minimum-maksimum) 183 (70-318) pg/ml ve folik asit düzeyleri 9.3 (2.2-14.4) ng/ml, kontrol grubu serum B12 vitamini 234 (83-934) pg/ml ve folik asit 13.2 (10.5-16.4) ng/ml düzeylerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Koroner arter hastaları ve kontrol grubunda B12 vitamini ve folik asit düzeyleri arasında saptanan korelasyon değerleri Tablo 2' de görülmektedir. İki vitamin düzeyi hasta grubu ($r: 0.7, p < 0.05$) ve kontrol grubunda ($r: 0.6, p < 0.05$) pozitif yönde anlamlı ilişki göstermektedir.

Hasta ve kontrol gruplarında iki vitamin düzeyi arasında matematiksel bir ilişki varlığı regresyon analizi ile incelenmiştir. Hasta grubunda regresyon analizine ait istatistiksel veriler ve regresyon eşitliği aşağıda belirtilmektedir.

Eğim Standart Hata (SH): 14.3 4.4, $p < 0.01$

Kesişim noktası SH: 73.3 41.9, $p > 0.05$.

Bu veriler ile hasta grubunda aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir:

Serum B12 düzeyi : (14.3 serum folik asit düzeyi) 73.3

Ancak doğrunun kesişim noktası için $p > 0.05$ olması bu ilişkinin tüm noktalarda geçerli olmadığına işaret etmektedir (Şekil 1).

Kontrol grubunda regresyon analizine ait istatistiksel veriler ve regresyon eşitliği aşağıda belirtilmektedir.

Eğim SH: 97.6 36.5, $p > 0.05$

Kesişim noktası SH: 975 490, $p > 0.05$.

Bu veriler ile kontrol grubunda aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir:

Serum B12 düzeyi : (97.6 serum folik asit düzeyi) 975

Ancak eğriye ait her iki veri de istatistiksel olarak anlamsız olduğundan bu matematiksel ilişki de geçersiz olmaktadır (Şekil 2). Korelasyon ve regresyon analizleri sonucunda sağlıklı bireylerde ve koroner arter hastalarında serum B12 vitamini ve folik asit düzeyleri arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu ancak matematiksel bir eşitlikle birbirlerine dönüştürülemedikleri anlaşılmaktadır.

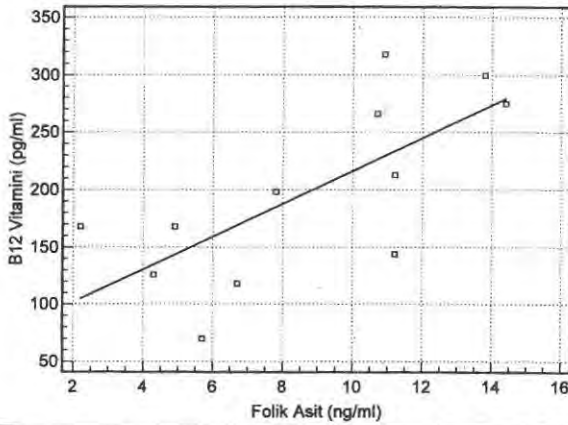
Serum B12 vitamini ve folik asit düzeyleri ile serum glukoz, üre, total lipid, kolesterol, CK, ALT, AST düzeyleri arasında ise anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo I. Koroner arter hastalarında ve kontrol grubunda serum B12 ve folik asit düzeyleri

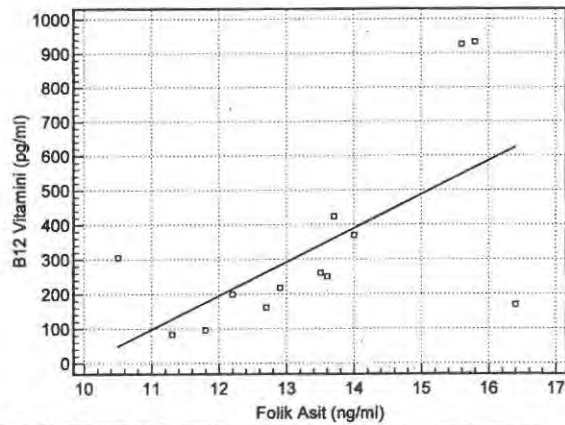
Değişkenler	Kontrol grubu (n:14) ortanca (min-max)	Hasta grubu (n: 12) ortanca (min-max)	p
Serum B12 (pg/ml)	234 (83- 934)	183 (70- 318)	<0.05
Serum folik asit (ng/ml)	13.2 (10.5- 16.4)	9.3 (2.2- 14.4)	<0.05

Tablo II. Koroner arter hastalarında ve kontrol grubunda serum B12 ve folik asit düzeyleri arasındaki korelasyonlar

Değişkenler	Kontrol grubu	Hasta grubu
Serum B12 -folik asit		
r	0.6	0.7
p	<0.05	<0.05



Şekil 1. Koroner arter hastalarında serum B12 vitamini ve folik asit düzeyleri arasında regresyon grafiği ve değerlerin dağılımı



Şekil 2. Kontrol grubunda serum B12 vitamini ve folik asit düzeyleri arasında regresyon grafiği ve değerlerin dağılımı

TARTIŞMA

Hiperhomosisteineminin erken atheroskleroz için risk faktörü olabileceği görüşü çeşitli çalışmalarla desteklenmiş ve kabul görmüştür. Bu ilişkinin periferik ve serebrovasküler hastalıklarda koroner arter hastalıklarına (KAH) göre daha kuvvetli olduğu ileri sürülmektedir (16).

Yüksek H(e) düzeylerinin atheroskleroz patogenezindeki rolünü açıklayan hipotezlerden birisi de serbest oksijen radikallerinin rolünü kapsamaktadır. Frauscher ve ark. (16) farelere altı haftalık oral homosistein tiyolaktan verilmesinden sonra plazma homosisteinik asit ve trigliserid düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığını gözlemlemişlerdir. Trigliserid düzeylerindeki artışın yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonuna bağlı olduğunu saptamışlardır. Potent bir nörotransmitter olan homosisteinik asit artışı ise vasküler hasarda serbest oksijen radikali hipotezini desteklemektedir. H(e)' in trombositler ve pıhtılaşma faktörleri üzerinde olumsuz etkileri olabileceği de ileri sürülmüştür. Aronson ve ark. (17) bacakta tıkaçıcı arteriyal hastalıkları olan 80 genç erişkinde metiyonin yükleme testi uygulamış ve % 19 oranında H(e) metabolizması bozukluğu saptamışlardır. Ancak H(e) metabolizması bozuk olan grupta protein S, protein C ve fibrinojen düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir (17).

Çeşitli çalışmalarda yüksek H(e) düzeylerinin klasik kardiyovasküler risk faktörlerinden (yaş, cinsiyet, lipid ve lipoprotein kolesterol düzeyleri, hipertansiyon, sigara tüketimi gibi) bağımsız olduğu saptanmıştır (1). Malinow ve ark. (7) ise diğer değişkenlere göre eşleştirilen bireylerde sistolik kan basıncı, hematokrit ve plazma ürik asit düzeyinin H(e) konsantrasyonları ile ilgili olduğunu gözlemlemişlerdir. Dalery ve ark. (18) da sağlıklı kadınlarda H(e) düzeylerinin erkeklere oranla düşük olduğunu saptamışlardır.

Serum B12 vitamini ve folat ile H(e) düzeyleri arasında negatif yönde bir ilişki varlığı bilinmektedir. Dalery ve ark. (18) folik asit, B12

vitamini ve piridoksal fosfat düzeyleri yirmibeş persantil ve altında olan bireylerde ortalama H(e) düzeylerinin yüksek bulunduğunu ancak KAH olan bireylerde vitamin düzeylerinin anlamlı bir farklılık göstermediğini saptamışlardır. Hultberg ve ark. (3) ise vasküler bir olayın akut döneminde negatif akut faz reaktanı olan albumin ve plazmada büyük oranda albumine bağlı taşınan H(e) düzeylerinin düştüğünü ama konvelesan dönemde anlamlı bir yükseklik ve plazma folik asit düzeyleri ile negatif yönde korelasyon gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Giles ve ark. (19) ise 92 nmol/L ve altındaki folik asit düzeylerinin hyperhomosisteinemi ve iskemik serebrovasküler olay riskinde artışa yol açtığını gözlemlemişlerdir. Ubbink (20) epidemiyolojik bir çalışmada düşük folik asit düzeylerinin KAH ile ilişkisini saptamıştır. Verhoef ve ark. (21) diyetle alınan B12 vitamini ve folik asit plazma düzeylerinin AMI tanısı konulan hastalarda düşük olduğunu ancak B12 vitamini düzeyinin farklılık göstermediğini gözlemlemişlerdir. Bazı homosistein metabolitlerinin düzeylerini de inceleyen araştırmacılar homosistein metabolizmasındaki bozukluğun B6 bağımlı transsülfürasyon reaksiyonu değil folik asit ve B12 vitamini bağımlı remetilasyon kusurundan kaynaklandığını ve plazma H(e)' in esas belirleyicisinin folik asit olduğunu ileri sürmüşlerdir (21).

Yüksek H(e) düzeylerinin B6, B12 vitamini ve folik asit verilerek düzeltilmesi önerilmektedir. Klinik olarak folik asit eksikliğinin olmadığı durumlarda bile farmakolojik dozda uygulanan folik asit ve bazen de piridoksin, B12 vitamini, kolin veya betainin plazma H(e) düzeylerini düşürdüğü ileri sürülmektedir (7, 22-24). Bu yaklaşımların H(e)' e bağlı komplikasyonları önlemekte ne ölçüde etkili olduğu klinik çalışmalarla desteklenmeyi beklemektedir.

H(e) ölçümünde çeşitli HPLC teknikleri kullanılabilir. Bu teknikler homosisteinin floresan bir türevini kullanmakta veya bileşiği elektrokimyasal olarak ölçmektedirler. Her iki yöntem bileşiğin dedektöre ulaşmaya kadar indirgenmiş kalması gibi zorluklar taşımaktadır.

Bileşiğin bozunmayan türevlerinin oluşturulması ise akışın yavaşlaması gibi yeni sorunlara yol açabilmektedir (25-26). Yöntemsel zorlukların yanı sıra HPLC için gerekli ekipmanın rutin amaçlı klinik laboratuvarlarda bulunmayışı, pahalı ve henüz otomatize edilmemiş bir sistem oluşu H(e) ölçümünün yaygın olarak kullanımına kısıtlamalar getirebilmektedir. H(e)'in numune alımından sonra hızla artış göstermesi ve plazma albumin düzeyine bağlı değişebilmesi de önemli sakıncalarıdır. Günümüzde otomatize, güvenilir yöntemlerle ölçülebilen B12 vitamini ve folik asit düzeylerinin KAH ve KAH riskinin değerlendirilmesi yanı sıra koruyucu ve tedavi amaçlı yaklaşımlarında hekimi direkt olarak yönlendirebilme avantajını da taşımaktadır.

Sonuç olarak B12 vitamini ve folik asit düzeyleri KAH ile ilişkili gibi görülmekte ve vasküler olayın akut döneminde de H(e) metabolizması bozukluğunu göstermekte etkin olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fortin LJ, Genest J. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin Biochem* 1995; 28: 155-162.
2. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Mc Graw Hill, Montreal 1995, pp 1279-1327.
3. Hultberg B, Andersson A, Lindgren A. Marginal folate deficiency as a possible cause of hyperhomocysteinaemia in stroke patients. *Eur J Chem Clin Biochem* 1997; 35: 25-28.
4. Boers GHJ, Fowler B, Smals AGH, et al. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Human Genetics* 1985; 69:164-169.

5. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Mc Graw Hill, Montreal 1995, pp 3111-3128.
6. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111-113.
7. Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases : a mini review. *Clin Chem* 1995; 41: 173-176.
8. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European concerted action project. *JAMA* 1997; 277:1775-1781.
9. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: Pathogenic mechanisms predisposing to trombosis . *J Nutr* 1996; 126:1285-1289.
10. Blom HJ, Kleinvelde HaBoers GH, Demacker PN et al. Lipid peroxidation and susceptibility of low density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinaemia. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:149-154.
11. Schlüssel E, Preibisch G, Putter B et al. Homocysteine-induced oxidative damage: Mechanisms and possible roles in neurodegenerative and atherogenetic processes. *Z Naturforsch* 1995; 50:699-707.
12. Dalton ML, Gadson PJ, Wrenn J et al. Homocysteine signal cascade: Production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-mybin smooth muscle cells. *Faseb J* 1997; 11:703-711.
13. Tsai 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; 91:6369-7633.
14. Tsai JC, Wang H, Perella MA et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 146:146-153.
15. Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreura et al. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocystein in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 1994; 50:348-360.
16. Frauscher G, Karnaukhova E, Muehl A, Hoeger H, Lubec B. Oral administration of homocysteine leads to increased plasma triglycerides and homocysteinic acid-additional mechanisms in homocysteine induced endothelial damage *J Life Sci* 1995 ; 57: 813-817.
17. Aronson DC, Okenhaut W, Roben AM et al. Impaired homocysteine metabolism: a risk factor in young adults with atherosclerotic arterial occlusive disease of the leg. *Br J Surg* 1994; 81 : 1114-1118.
18. Dalery K, Lussier-Cacan S., Selhub J et al. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects : relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate, and folate *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-1111.
19. Giles WH, Kittner SJ, Anda RF, Croft JB, Casper Mi.. Serum folate and risk for ischemic stroke. First National Health and Nutrition Examination Survey epidemiologic follow-up study. *Stroke* 1995; 26: 1166-1170.
20. Ubbink JB. Vitamin nutrition status and homocysteine an atherogenic risk factor. *Nutr Rev* 1994; 52: 383-387.
21. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction : relation with vitamins B6, B12 and folate. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 845-859.
22. Frohlich JJ. Lipoproteins and homocyst(e)ine as risk factors for atherosclerosis: assesment and treatment. *Can J Cardiol* 1995; 11: 18C-23C.
23. Malinow MR. Homocyst(e)ine and anerial occlusive diseases. *J Intern Med* 1994; 236 : 603-617.
24. Benvanger CS, Jeremy JY, Stansby G. Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 1995; 85: 726-731.

25. *Candito MP, Bedoucha MH, Mahagne G et al. Total plasma homocysteine determination by liquid chromatography before and after methionine loading. Results in cerebrovascular disease. J Chromatogr B Biomed Appl 1997; 692: 213-216.*
26. *Jakobsen DW, Gatautis VJ, Green R et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. Clin Chem 1994; 40:873-881.*