

Hómócytein, fólát og kóbalamín í íslenskum konum og körlum

Ágrip

Elín Ólafsdóttir^{1,4},
Björk Snorradóttir⁴,
Arndís Theodórs¹,
Örn Ólafsson²,
Anna Helgadóttir³,
Vilmundur
Guðnason⁴

Tilgangur: Að finna viðmiðunarbíl (reference intervals) og millifjórðungsbil (interquartile ranges) fyrir heildarhómócytein (Hcy), fólát og kóbalamín í blóði íslenskra karla og kvenna og kanna sambandið milli Hcy annars vegar og fólats og kóbalamíns (vítamín B₁₂) í sermi hins vegar.

Efniviður og aðferðir: Blóðsýnum var safnað á þriggja mánaða tímabili 1999-2000 úr 449 einstaklingum, 291 karli (meðalaldur 48,3 ár) og 158 konum (meðalaldur 49,8 ár). Hcy í plasma var mælt með HPLC aðferð og flúorskímu- (fluorescence) greiningu, en fólát og kóbalamín í sermi var greint með rafónæmisáðferð á ELECSYS tæki frá Roche.

Niðurstöður: Viðmiðunarbíl fyrir Hcy, milli 2,5% og 97,5% fraktíla, ákvörðuð með stikabundinni (parametric) aðferð reyndust vera 6,2-17,5 μmól/L fyrir karla og 4,8-14,1 μmól/L fyrir konur. Gögnin sýna ennfremur aldursháða hækkun á Hcy bæði í körlum og konum og eru efri mörk 70 ára karla yfir 19 μmól/L en 70 ára kvenna yfir 16 μmól/L. Viðmiðunarmörk voru ákvörðuð á sama hátt fyrir fólát og kóbalamín. Neikvæð línuleg fylgni milli Hcy og fólats er marktæk ($p < 0,01$) bæði í körlum og konum með fylgnistuðul -0,39 þegar hópurinn er skoðaður óskiptur. Sama niðurstaða fæst milli Hcy og kóbalamíns ef hópurinn er skoðaður í heild en þar er fylgnistuðullinn -0,20.

Ályktanir: Viðmiðunarmörk fyrir Hcy fengin í óvöldum hópi íslenskra karla og kvenna eru birt hér í fyrsta sinn og munu þau nýtast við áhættumat á hjarta- og æðasjúkdómum. Samband Hcy við gildi á fólati og kóbalamíni í blóði ber saman við niðurstöður í erlendum rannsóknum og benda til þess að hluti Íslendinga gæti hagnast af bættum vítamínúskap við að lækka Hcy í blóði.

Inngangur

Rannsóknir hafa sýnt að hár styrkur hómócysteins í blóði fylgir hjarta- og æðasjúkdómum (1). Hómócytein (Hcy) er metið þar sem sjálfstæður áhættuþáttur, en þó er ekki enn vitað hvort það er beint þátttakandi í meingerð æðakölkunar (2-5). Styrkur Hcy í frumum líkamans er háður virkni þeirra ensíma sem koma að efnaskiptum hómócysteins, en aðrir þættir eins og nægilegt framboð af fólati, kóbalamíni og pyridoxal fosfati hafa einnig umtalsverð áhrif til lækkunar á Hcy í blóði (1,3). Hcy myndast úr amínósýrunni methíonín og er það eina þekkta myndunar-

ENGLISH SUMMARY

Ólafsdóttir E, Snorradóttir B, Theodórs A, Ólafsson Ö, Helgadóttir A, Guðnason V

Homocysteine, folate and cobalamin in Icelandic men and women

Læknablaðið 2001; 87: 793-7

Objective: To determine reference intervals and interquartile ranges for total homocysteine (Hcy) folate and cobalamin in Icelandic men and women and to evaluate the correlation of Hcy to serum levels of the vitamins folate and cobalamin.

Material and methods: Blood samples were collected from 449 individuals over a period of three months, 291 men (mean age 48.3 years) and 158 women (mean age 49.8 years). Plasma Hcy was measured by a HPLC method with fluorescence detection; folate and cobalamin levels in serum were measured by an electroimmunochemical method on an ELECSYS system from Roche.

Results: The reference interval for Hcy, between 2.5% and 97.5% fractiles, estimated by parametric statistics, are 6.2-17.5 μmol/L for men and 4.8-14.1 μmol/L for women. Similarly the 95% reference intervals for folate and cobalamin were estimated using parametric statistics. A significant negative correlation was found between concentrations of folate and Hcy for both men and women ($p < 0.01$) with a correlation coefficient of -0.39 and also between cobalamin and Hcy where the correlation coefficient is -0.20.

Conclusions: Reference interval for Hcy from the general presumed healthy population is estimated here for the first time in Icelandic men and women and will be of value in cardiovascular risk assessments. The negative correlation between Hcy and folate and also Hcy and cobalamin, is in agreement with results from other studies and suggests that an improved vitamin status might be beneficial in lowering Hcy in a section of the population as has been suggested in numerous studies in other countries.

Key words: homocysteine, reference interval, folate, cobalamin.

Correspondence: Elín Ólafsdóttir: E-mail: elino@landspitali.is

ferli Hcy í líkamanum. Þrjú ensím sem taka þátt í myndun Hcy nota fólát, kóbalamín og pyridoxal fosfat sem kófaktor og því getur lágur styrkur þeirra haft áhrif til lækkunar á styrk Hcy ekki síður en erfðabreytileiki í genum þeirra ensíma sem stýra efnaskiptaferli amínósýrunnar. Rannsóknir á ensímum þremur, cystathion-beta-syntetasa (6), methí-

¹Meinefnafræðideild, Rannsóknastofnun Landspítala Hringbraut, ²Eirberg, Landspítala Hringbraut, ³Íslensk erfðagreining, ⁴Rannsóknarstöð Hjartaverndar. Fyrirspurnir, bréfaskipti: Elín Ólafsdóttir, meinefnafræðideild, Rannsóknastofnun Landspítala Hringbraut, 101 Reykjavík. Sími: 560 1000; netfang: elino@landspitali.is

Lykilorð: Hómócytein, viðmiðunarmörk, fólát, kóbalamín.

onín syntetasa og methylen tetrahydrófólat redúktasa hafa leitt í ljós algenga erfðabreytileika, sem hafa áhrif á virkni ensímanna og þar með á styrk Hcy (7). Greinileg milliverkun er þó milli ensímanna og getur ákveðin arfgerð í einu bætt upp galla og þar með minnkaða virkni í öðru (8).

Hcy hækkar með aldri í báðum kynjum og er að jafnaði hærri í körlum en konum (9,10). Meiri vöðvamassi í körlum skýrir að hluta þennan mun kynjanna, þar sem Hcy er aukaafurð í myndunarferli kreatíns, og við 40 ára aldur mælist munurinn að meðaltali um 2 $\mu\text{mol/L}$. Ólíkar matarvenjur karla og kvenna geta einnig skýrt hluta af mismuninum. Aldursháðar hækkunarir eiga sér vafalítið margþættar orsakir, meðal annars hægir á efnaskiptaferlum líkamans á efri árum, ennfremur getur vanfrásog (malabsorption) eða ónógt framboð af fólati og pyridoxal fosfati ásamt minnkaðri nýrnastarfsemi átt sinn þátt í hækkuninni (11). Aðeins um 1% af Hcy sem síast (filtrates) um nýrun fer út með þvagi, afgangurinn er frásogaður í nýrnarpíplum og brotinn niður í nýrum.

Hér verður greint frá mælingum á Hcy, fólati og kóbalamíni í um 450 einstaklingum sem leituðu til Hjartaverndar á þriggja mánaða tímabili, um áramótin 1999-2000. Reiknuð eru 95% viðmiðunarmörk fyrir efnin þrjú ásamt fylgni Hcy við styrk vítamínanna í sermi.

Efniviður og aðferðir

Efniviður: Sýnum var safnað úr 158 konum (meðalaldur 49,8 ár, staðalfrávik 11,8) og 291 karli (meðalaldur 48,3 ár, staðalfrávik 11,4) á tímabilinu desember 1999 til febrúar 2000. Fólkið kom af höfuðborgarsvæðinu og var valið úr hópi fólks, sem heimsótti Hjartavernd og voru að eigin mati við góða heilsu.

Sýnataka og sýnameðhöndlun: Blódtaka fór fram að morgni og voru þátttakendur fastandi frá kvöldinu áður. EDTA blóð var dregið fyrir Hcy mælingar og voru sýnin sett á ís strax að blóðtöku lokinni og skilin innan klukkutíma. Plasma var tekið frá og geymt við -20 gráður. Fólat og kóbalamín voru mæld í sermi og var það einnig geymt við -20 gráður í nokkrar vikur fram að mælingu. Allar mælingar voru gerðar innan fjögurra mánaða frá sýnatöku. Hcy var mælt í 407 sýnum en fólat og kóbalamín úr 391 sýni. Allar þrjár mælingarnar voru gerðar á 349 sýnum, sem valin voru af handahófi úr sýnasafninu.

Mæliaðferðir: Til mælinga á Hcy var notað sérhannað HPLC tæki og mæliefni frá Drew Scientific Ltd, Cumbria, UK. Afoxað Hcy hefur mjög virkan thíolhóp, sem oxast greiðlega í líkamsvökvum og tengist við það öðrum thíolhópum í próteinum eða smærri mólíkúlum sem hafa fría thíolhópa. Í plasma er aðeins um 1% af Hcy afoxað, það er að segja frítt, um 70% er bundið albúmíni, en afgangurinn er að mestu tengdur amínósýrunni cystein. Algengast er að mæla heildarmagn Hcy í plasma, sem ýmist er

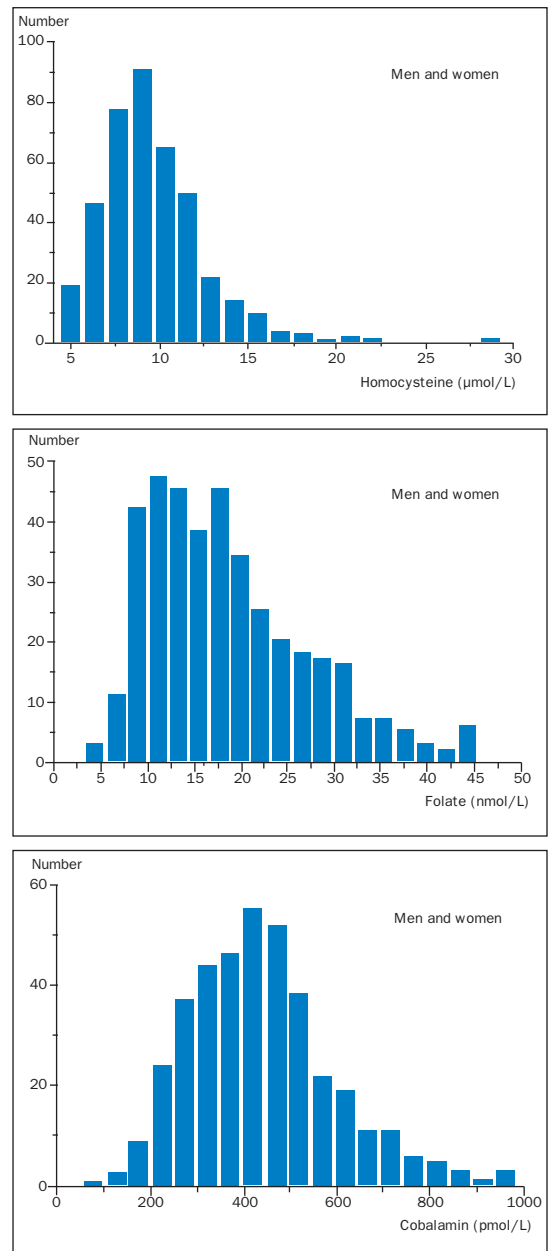


Figure 1. Histograms showing the distribution of plasma-homocysteine, serum-folate and serum-cobalamin in Icelandic men and women. Total number of data points are the same as shown in table I.

skammstafað tHcy (total homocysteine) eða Hcy, þótt átt sé við heildarmagnið, og er sá háttur hafður á hér. Sýnið er meðhöndlað þannig að Hcy afoxast og tengist litarefni, það er síðan aðskilið á „reverse-phase“ HPLC súlu og styrkur þess reiknaður út frá tveimur stöðlum. Breytileiki á mæliniðurstöðum milli daga reyndist um 3% og í ytra gæðamati voru mæliniðurstöður nálægt meðaltali danskra rannsóknastofa. Fólat og kóbalamín voru mæld með mótefnamæliaðferð (immunometric) á ELECSYS, sjálfvirku mælitæki frá Roche, og voru mæliefnin frá sama fyrirtæki. Breytileiki milli daga á þeim mæling-

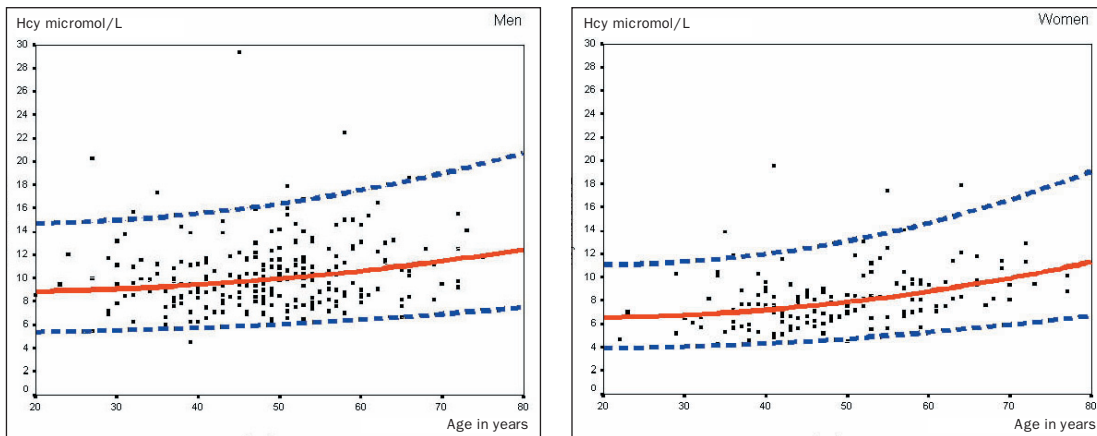


Figure 2. Age related distribution of homocysteine values in men and women. The bold center graph shows the predicted geometric mean and the upper and lower graphs are the 97.5% and 2.5% fractiles of the distribution respectively.

um er innan við 3,5% og áreiðanleiki er innan settra marka samkvæmt ytra gæðamati.

Tölfræði: Þar sem dreifing hvers efnis er skekkt (skewed) með hala til hægri, hafa ýmsir notað óstikabundnar (non-parametric) aðferðir (10,12) við útreikninga á viðmiðunarmörkum. Hér var stikabundin (parametric) aðferð notuð við útreikninga á 95% viðmiðunarmörkum, það er 2,5% og 97,5% fraktílum á Hcy, fólati og kóbalamíni og eru umbreytt (transformed) mæligildi notuð við útreikninga. Tölfræðiforrit Solbergs, RefVal, útgáfa 3.43 (13), var notað til að reikna þessi viðmiðunarmörk og millifjórðungsbil (interquartile ranges), fyrir aðra útreikninga var SPSS tölfræðiforritið notað. Aðeins ein kóbalamínsmæling var óeðlilega há (outlier) og því ekki tekin með í útreikningum. Reiknuð var línuleg fylgni (Pearsons) milli mæligilda á fólati, kóbalamíni og Hcy fyrir bæði kynin. Við samanburð á meðaltölum var t-prófi beitt og munur metinn marktækur ef $p < 0,05$. Til að sýna aldursháðu breytinguna á Hcy hjá hvoru kyni var notuð annars stigs aðhvarfsmargliða (quadratic regression model) sem lýsir breytingunni á spáðu meðalgildi (predicted mean) $\log(\text{Hcy})$ gilda með aldri. Samkvæmt þessum margliðum voru 95% viðmiðunarmörk reiknuð (2,5% og 97,5% fraktíli) fyrir hvort kyn ásamt margfeldismeðaltali (geometric mean), en andhverfa logaritma tekin til að gefa niðurstöður í upprunalegum einingum, sjá mynd 2.

Rannsóknin er hluti af stærri rannsókn Hjartaverndar sem hlotið hefur tilskilin leyfi frá tölvunefnd og vísindasiðanefnd.

Niðurstöður

Rannsókuð voru 449 blóðsýni úr einstaklingum sem leituðu til Hjartaverndar kringum áramótin 1999-2000, 291 karli og 158 konum. Meðalaldur karla í hópnum er 48,3 ár en kvenna 49,8 ár og eru konurnar því um einu og hálfu ári eldri að meðaltali, en munurinn er ekki marktækur ($p=0,2$). Þar sem nokkur munur er á mæligildum kynjanna eru niðurstöður reiknaðar og sýndar fyrir hvort kyn fyrir sig. Dreifing á niðurstöðum mælinga á Hcy, fólati og kóbalamíni er sýnd á mynd 1 en þar sem lögun dreifinganna er

Table I. Reference intervals and interquartile ranges for Hcy, folate and cobalamin in Icelandic men and women.

	N	Units	Geometric mean	Reference interval (95%)	Median	Interquartile range
P-Hcy						
Men and women	407	$\mu\text{mol/L}$	9.2	5.3-16.5	9.1	7.6-11.0
Men	260	$\mu\text{mol/L}$	9.9	6.2-17.5	9.8	8.4-11.6
Women	147	$\mu\text{mol/L}$	7.9	4.8-14.1	8.1	6.5-9.5
S-Folate						
Men and women	391	nmol/L	16.7	6.9-39.0	17.0	11.9-23.7
Men	253	nmol/L	16.1	7.0-37.7	16.1	11.6-22.3
Women	138	nmol/L	18.0	6.5-41.6	18.6	12.7-26.1
S-Cobalamin						
Men and women	390	pmol/L	407	180-792	417	325-527
Men	252	pmol/L	417	190-781	426	341-528
Women	138	pmol/L	390	172-814	402	295-523

P: plasma
S: serum

Table II. Association between folate and Hcy as well as cobalamin and Hcy estimated by using Pearson correlation. The correlation coefficient is calculated for the group as a whole and for men and women separately. The correlation is significant in all cases except between cobalamin and Hcy when estimated in women alone.

Subjects	N	Folate/Hcy correlation		Cobalamin/Hcy correlation	
		coefficient	p (2-tailed)	coefficient	p (2-tailed)
Men and women	349	-0.39	<0.01	-0.20	<0.01
Men	223	-0.35	<0.01	-0.27	<0.01
Women	126	-0.42	<0.01	-0.16	NS

NS: non significant

áþekkt í körlum og konum, þótt nokkur munur sé á meðaltölum mæligilda (sjá töflu I) þótti ekki ástæða til að sýna dreifinguna kynjaskipta hér. Hcy er heldur lægra í konum en körlum og er munurinn á meðaltali hópanna 2 $\mu\text{mol/L}$ og er þetta marktækur munur ($p < 0,001$). Á mynd 2 má sjá hvernig mæligildi Hcy breytast með aldri og sést þar hvernig margfeldismeðaltal hækkar hjá körlum og konum yfir allt aldursskeiðið. Viðmiðunarmörk Hcy reiknuð fyrir hvort kyn, óháð aldri, sýna að 95% kvennanna eru innan 4,8-14,1 $\mu\text{mol/L}$ marka meðan 95% karla eru á bilinu 6,2-17,5 $\mu\text{mol/L}$, eins og sést í töflu II. Séu kynin sett saman í hóp verða mörkin 5,3-16,5 $\mu\text{mol/L}$.

Viðmiðunarmörk fyrir fólát og kóbalamín eru einnig sýnd í töflu II, bæði fyrir karla, konur og hóp-

inn óskiptan. 95% mörk fyrir hópinn óskiptan reyndust vera 6,9-39,0 nmól/L fyrir fólát og 180-792 pmól/L fyrir kóbalamín. Þegar niðurstöður fólátmælinga eru skoðaðar sést að viðmiðunarmörk kvenna eru víðari en karla, því gildin eru dreifðari í kvennahópnum, fleiri konur hafa lágan fólátstyrk í sermi en um leið eru fleiri konur en karlar með háan styrk (tafla I). Ennfremur má sjá að konur hafa að meðaltali um 2 nmól/L meira fólát í sermi en karlar, eða 18,0 nmól/L miðað við 16,1 nmól/L í körlum og er þessi munur marktækur ($p < 0,02$). Styrkur kóbalamíns í sermi mælist hins vegar heldur hærri í körlum en konum en munurinn milli kynjanna er minni en í hinum efnunum tveimur, Hcy og fóláti, og ekki marktækur. Mæligildi kvennanna dreifast einnig meira hér, eins og sjá má í töflu I, það er fleiri konur eru með lágan og háan kóbalamínstyrk í sermi heldur en karlar. Við mat á rannsóknarniðurstöðum hjá sjúklingum eru viðmiðunarmörk að jafnaði ekki kynjaskipt, ef munurinn á mæligildum karla og kvenna hefur ekki læknisfræðilega þýðingu.

Samband Hcy og vítamínanna fólats og kóbalamíns var skoðað tölfræðilega í rannsóknarhópnum. Reiknuð var línuleg fylgni milli mæligilda fyrir fólát og kóbalamín og Hcy í rannsóknarhópnum og eru niðurstöður sýndar í töflu II. Neikvæð línuleg fylgni er milli fólats og Hcy og er fylgnistuðullinn $-0,39$ ($p < 0,01$) í óskiptum hópnum og eins er fylgnin marktæk ef kynin eru skoðuð sitt í hvoru lagi. Neikvæð línuleg fylgni er milli kóbalamíns og Hcy þar sem fylgnistuðullinn er $-0,20$, þegar hópurinn er skoðaður óskiptur og er sú fylgni einnig tölfræðilega marktæk ($p < 0,01$) í hópi karla en ekki kvenna.

Umræða

Þar sem mæling á Hcy í plasma er orðinn mikilvægur þáttur í áhættumati varðandi hjarta- og æðasjúkdóma (14,15) var nauðsynlegt að fá íslensk viðmiðunarmörk fyrir bæði karla og konur. Samanburður við aðrar rannsóknir sýnir að Danir (126 konur og 106 karlar) hafa svipuð Hcy gildi og Íslendingar en viðmiðunarmörk sem reiknuð voru með óstikabundinni aðferð í nýlegri rannsókn í Danmörku voru 6,3-15,7 $\mu\text{mol/L}$ fyrir karla og 4,9-14,9 $\mu\text{mol/L}$ fyrir konur (10). Meðalaldur í dönsku rannsókninni var 50 ár og aldursdreifingin svipuð og í okkar rannsókn. Aðrar rannsóknir sýna meiri breytileika, sem kann að vera að hluta aðferðarháður eða svæðisbundinn (16,17). Faraldsfræðilegum rannsóknum ber þó saman um að áhætta á æðasjúkdómum er verulega aukin í einstaklingum sem mælast með há Hcy gildi (2,18). Wald og samstarfsmenn fundu að 35-64 ára karlar sem voru í efsta fjórðungi mæligilda voru í 2,9 sinnum meiri hættu á að fá hjartasjúkdóma af völdum blóðþurrðar en þeir sem voru í neðsta fjórðungi dreifingarinnar (19) og er þá búið að leiðrétta vegna annarra áhættuþátta. Niðurstöður okkar eru í samræmi við aðrar

sem sýna samband milli efnaskipta Hcy og vítamínanna fólats og kóbalamíns, en rannsóknir sem metið hafa áhrif vítamínanna á styrk Hcy í blóði, sýna að stór hluti einstaklinga gæti lækkað Hcy í blóði með aukinni inntöku á fóláti (20) og kann það einnig að eiga við á Íslandi.

Líffræðilegur breytileiki á Hcy í sama einstaklingi er minni en 10% (21,22) og er því óhætt að nota eina mæliniðurstöðu við áhættumat í hjarta- og æðasjúkdómum. Hins vegar er nauðsynlegt að standa rétt að sýnatöku og meðhöndlun sýna, þar sem Hcy í plasma hækkar umtalsvert á stuttum tíma ef sýnin eru ekki sett á ís og skilin innan klukkutíma frá töku. Sé mæliskekku einnig haldið í lágmarki (23), má nota niðurstöður stakra mælinga við mat á áhættu.

Allmargir hafa valið að miða æskilegan styrk Hcy við fast markgildi (cut off value) í stað þess að miða við dreifingu í heilbrigðum einstaklingum og er víða stuðst við $< 15 \mu\text{mol/L}$ sem æskilegt hámark (12). Sumir telja það jafnvel of hátt, þar sem unnt sé að lækka Hcy gildi með aukinni neyslu vítamínanna fólats, B₁₂ og B₆ og faraldsfræðilegar rannsóknir hafi sýnt að þeir sem eru í efsta fjórðungi dreifingarinnar eru í tvö- til þrefaldri áhættu á að fá kransæðasjúkdóma en þeir sem eru í neðsta fjórðungi.

Þakkir

Guðnýju Eiríksdóttur lífefnafræðingi Hjartavernd, eru færðar þakkir fyrir yfirlestur handrits og góðar ábendingar.

Heimildir

1. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulski AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.
2. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in United States physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-81.
3. Arnesen E, Refsum H, Børnaa KH, Ueland PM, Førde OH, Nordrehaug JE. The Tromsø study: serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-9.
4. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
5. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentrations and risk of stroke in middle aged men. *Lancet* 1995; 346: 1395-8.
6. De Stefano V, Dekou V, Nicaud V, Chasse JF, London J, Stansbie D, et al. Linkage disequilibrium at the cystathionine B synthetase (CBS) locus and the association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 481-90.
7. Gudnason V, Humphries SE. Hyperhomocysteinemia: genetics and cardiovascular disease risk [editorial]. *Eur Heart J* 1999; 20: 552-3.
8. Dekou V, Gudnason V, Hawe E, Miller GJ, Stansbie D, Humphries SE. Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Tromb Haemost* 2001; 85: 67-74.
9. Nygaard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total homocysteine and cardiovascular risk profile: The Hordaland homocysteine study. *JAMA* 1995; 274: 1526-33.
10. Rasmussen K, Möller J, Lyngbak M, Holm Pedersen A-M, Dybkjær L. Age- and gender-specific reference intervals for

- total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996; 42: 4, 630-6.
11. Arnadottir M, Gudnason V, Hultberg B. Treatment with different doses of folic acid in haemodialysis patients: effects on folate distribution and aminothioli concentrations. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 524-8.
 12. Rasmussen K, Möller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627-48.
 13. Solberg HE. RefVal: a program implementing the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry on the statistical treatment of reference values. *Comput Methods Programs Biomed* 1995; 48: 247-56.
 14. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, et al. Association between plasma homocysteine and extra-cranial carotid-artery sclerosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-91.
 15. Rossi E, Beilby JP, McQuillan BM, Hung J. Biological variability and reference intervals for total plasma homocysteine. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 56-61.
 16. Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive disease: a mini-review. *Clin Chem* 1995; 41: 173-6.
 17. denHeijer M, Blom HJ, Gerrits WBJ, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, et al. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 345: 882-5.
 18. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 1998; 49: 31-62.
 19. Wald N, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 862-7.
 20. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-8.
 21. Garg UC, Zheng ZJ, Folsom AR, Moyer YS, Tsai MY, McGovern P, et al. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurements. *Clin Chem* 1997; 43: 141-5.
 22. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik Afrost C, Sherliker P, Refsum H, Ueland PM, et al. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. *Clin Chem* 1998; 44: 102-7.
 23. Rasmussen K, Möller J, Lyngbak M. Within-person variation of plasma homocysteine and effects of posture and tourniquet application. *Clin Chem* 1999; 45: 1850-5.