

Açlık ve Metiyonin Yükleme Sonrası Plazma Homosistein Düzeylerinin HPLC Yöntemi İle Saptanması

DETERMINATION OF FASTING AND POST METHIONINE LOAD PLASMA HOMOCYSTEINE LEVELS WITH HPLC

Ahmed AL MARAFİ*, Mustafa ÖZKAN**, M.Kemal ERBİL*, Munzer AL RASHED*,
Emin Özgür AKGÜL*, Hakan BOYUNAĞA*, Cumhur BİLGİ*, Türker KUTLUAY*

* Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD,

**Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kardiyoloji AD, ANKARA

Özet

Amaç: Yükselmiş plazma homosistein düzeylerinin koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü olduğu çok çeşitli araştırmalarda ileri sürülmektedir. Homosistein düzeylerinin diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile arasındaki ilişkinin araştırılması ve plazma homosistein konsantrasyonlarının, floresans detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile, Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA)'nda rutin olarak kullanılabilen bir test olarak kurulması planlanmıştır.

Materyal ve Metod: GATA'da çalışan ve hikaye, fizik muayene, EKG ve telegrafik olarak herhangi bir kalp hastalığı bulgusuna rastlanmayan 43' ü erkek ve 21'i kadın toplam 64 personelde, total plazma homosistein düzeylerinin başlangıç açlık değerleri ile bu kişilere oral metiyonin yüklenmesi sonrası homosistein düzeyleri saptanmış ve diğer kardiyovasküler risk faktörlerinden sigara, alkol ve kahve kullanımları ile serum total kolesterol, HDL kolesterol ve LDL kolesterol değerleri ile karşılaştırılmıştır. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan floresans detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, laboratuvarımız şartlarında optimize edilerek plazma homosistein ölçümleri için rutin kullanılabilir bir yöntem haline getirilmiştir.

Bulgular: GATA sağlık personelinde açlık homosistein düzeyleri, erkeklerde $7,01 \pm 2,9$ $\mu\text{mol/L}$, kadınlarda $7,23 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçülürken, oral metiyonin yüklemesinden (0.100 g/kg) 2 saat sonra, homosistein düzeyleri erkeklerde $21,16 \pm 5,20$ $\mu\text{mol/L}$, kadınlarda ise $21,60 \pm 8,20$ $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Açlık ve yükleme sonrası homosistein değerlerinin diğer kardiyak risk faktörlerinden bağımsız olduğu saptanmıştır.

Sonuç: GATA biyokimya laboratuvarlarında rutin amaçlar için plazma homosistein düzeylerini ölçen bir yöntem kurulmuştur. Metiyonin yüklemesinin gelecekteki koroner kalp hastalığı ve miyokard infarktüsü riskini önceden bildiren ve homosistein metabolizmasındaki olası enzimatik defektlerin saptanmasında da önemli bir parametre olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Homosistein, Ateroskleroz, Metiyonin

T Klin Kardiyoloji 2003, 16:82-87

Summary

Purpose: Elevated plasma homocysteine levels is suggested to be a risk factor for coronary heart disease in many studies. We aimed to investigate relation between the plasma homocysteine levels and the other cardiovascular risk factors, and to establish a method for the measurement of plasma homocysteine levels by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection (FD) as a routine test.

Material and Method: Plasma homocysteine levels were determined at baseline and after oral methionine load in 43 male and 21 female healthy control of Gulhane Military Medical Academy (GMMA) with no history or physical; electrocardiographic or radiological finding of cardiac disease. The effects of daily habits like smoking, alcohol intake, coffee consuming, and serum lipid levels (total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol) on homocysteine levels were also investigated. Measurement of plasma homocysteine levels has been optimized for the routine test in our laboratory conditions by using high sensitive and specific technique of High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection (FD).

Results: Initial homocysteine levels were found to be 7.02 ± 2.9 $\mu\text{mol/L}$ in female (n=21) and 7.23 ± 2.0 $\mu\text{mol/L}$ in male health staff (n=43). After oral methionine loading (0.100 g/kg), the homocysteine levels were 21.16 ± 5.2 $\mu\text{mol/L}$ and 21.60 ± 8.2 $\mu\text{mol/L}$ in man and female subjects, respectively. Plasma homocysteine levels at baseline and after methionine loading were not found to be related to other cardiac risk factors.

Conclusion: We establish a HPLC method for the measurement of plasma homocysteine levels for routine use in our laboratory. It was concluded that methionine loading may be an important parameter in determining of coronary heart disease and myocardial infarction and enzyme defects in homocysteine metabolism in the future.

Key Words: Homocysteine, Atherosclerosis, Methionine

T Klin J Cardiol 2003, 16:82-87

Aterosklerotik hastalıklar, özellikle koroner arter hastalığı, sanayileşen ülkelerde başlıca ölüm nedeni olarak bilinmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarda artmış mortalite riski, cinsiyet, hipertansiyon, sigara kullanımı, hiperlipoproteinemi gibi bilinen risk faktörleriyle tam olarak açıklanamamaktadır (1-4). Son yıllarda yapılan araştırmalar plazma homosistein düzeyinin saptanması, homosistein metabolizmasının kalıtsal bozukluklarının tanı ve tedavisinin takibinde önemli olduğu kadar (4-7), erken döneme kardiyovasküler hastalıkların erken tanısında da kullanılabilir bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (8-11).

Son on yıldaki araştırmalar, hafif yükselmiş plazma homosistein seviyesinin bile, aterosklerotik hastalıklar ve tromboembolizm oluşumunda ciddi bir risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir (12).

Son yıllarda yükselmiş plazma homosistein düzeyine ilave olarak metiyonin yüklemesi sonrası anormal artış gösteren homosistein düzeylerinin de vasküler hastalıkların bir göstergesi olabileceği belirtilmiştir. Metiyonin yüklemesi özellikle transülfürasyon yolundaki metiyonin metabolizması bozukluğunu göstermesi açısından önemlidir (13-15).

Bu çalışmada, GATA da görevli personelin total plazma homosistein düzeylerinin başlangıç değerlerini saptamayı ve bu düzeylerin kardiyovasküler hastalıkların başlıca risk faktörleriyle arasındaki ilişkiyi araştırmayı ve oral metiyonin yüklemesi yaparak, olası enzim defektleri nedeniyle oluşan yüksek homosistein düzeylerinin erken belirlenmesini araştırmayı planladık.

Materyal ve Metod

GATA'da görev yapan; yaş ortalaması: $33,37 \pm 9,1$ olan 43 erkek ile yaş ortalaması $33,47 \pm 7,61$ olan 21 kadından, gece açlığının ardından homosistein analizi için EDTA'lı tüplere ve diğer rutin testler için düz tüplere venöz kanlar alındı. Kanlar santrifüj edilene kadar buzlu kaplarda, ışıktan korunarak saklandı ve ilk yarım saat içinde 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ayrılan plazmalar -20°C'de çalışma gününe kadar saklandı. Metiyonin

yüklemesi için, 0.1 g/kg metiyonin aminoasidi portakal suyuna karıştırılarak çalışma kapsamına alınan kişilere içirildi ve 2 saat sonra venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı ve hemen santrifüj edilerek ayrılan plazmalar -20°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

Plazma total homosisteini, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)-floresans detektör yardımıyla saptandı. Redüksiyon, presipitasyon ve derivatizasyon aşamalarından geçirilen plazma örnekleri 4.6 x 150 mm 5 µm partikül büyüklüklü Chromsystems ODS 2 reverse faz kolonları kullanılarak ayrıştırıldı. İzokratik elüsyonda 1.7 ml/dakika akış hızıyla mobil faz geçirildi. Eksitasyon 385, emisyon 515 nm.'de ölçümler yapıldı. Homosistein piki ile internal standarda ait piki elde ettiğimiz zamanlar sırası ile 2.3 ve 4.1 dakika olarak bulundu.

Farklı beş seviyede standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edildi. Pik alanlarıyla konsantrasyonlar arasındaki regresyon analizi 0.9986 olarak saptandı.

Total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol ve VLDL kolesterol ölçümleri Technicon Dax 48 (Bayer Corporation, Tarry Town, New York) otoanalizör kullanılarak yapıldı.

Tanımlayıcı istatistikler SPSS for Windows programında yapılarak, değerler elde edildi.

Bulgular

Çalışma Haziran 2000 - Ekim 2001 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD HPLC Laboratuvarlarında yapılmıştır. Floresans detektörlü izokratik HPLC sisteminde homosistein piki 2.6 ncı dakikada oluşmuştur. Yöntemin hassasiyeti 1 µmol/L olarak, gün içi tekrarlanabilirliği %4.23, günler arası tekrarlanabilirlik ise %1.36 olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusalılığı 100 µmol/L olarak saptanmıştır. Sağlık personelinin plazma homosistein değerleri ile diğer kardiyak risk faktörlerinin ölçülen değerlerinin karşılaştırılması Tablo-1'de gösterilmiştir.

Kırküç erkek, yirmibir kadın sağlık personelinin açlık ve metiyonin yükleme sonrası plazma

Tablo 1. GATA sağlık personelinin plazma homosistein değerleri ile diğer kardiyak risk faktörlerinin değerleri (Dağılım Analizi)

Testler	Ortalama ± SS	Ortanca	% 25. Değer	% 75. Değer
Yaş (yıl)	33 ± 4.2	34	31	35
Açlık homosistein (µmol/L)	7.12 ± 2.45	7.82	6.91	8.65
Yükleme sonrası homosistein (µmol/L)	21.38 ± 6.6	22.8	16.7	27.8
Total kolesterol (mg/dL)	182.7	185.1	178.9	191.3
HDL-kolesterol (mg/dL)	47.6	46.3	45.3	48.6
LDL-kolesterol (mg/dL)	110.26	113.9	108.6	121.2
Total kolesterol / HDL-kolesterol	4.9 ± 1.5	4.5 ± 1.0	4.1 ± 0.9	5.2 ± 1.6
Sigara içen (%)	44	45	41	48
Sigara içmeyen (%)	56	57	53	59

Tablo 2. GATA personelinin açlık ve metiyonin yüklemeye sonrası plazma homosistein düzeyleri

		Metiyonin Yükleme	
		Öncesi	Sonrası
		Ortalama ± SS	Ortalama ± SS
Homosistein (µmol/L)	Kadın (n=21)	7.01 ± 2.9	21.6 ± 8.1
	Erkek (n=43)	7.23 ± 2.0	21.6 ± 5.2

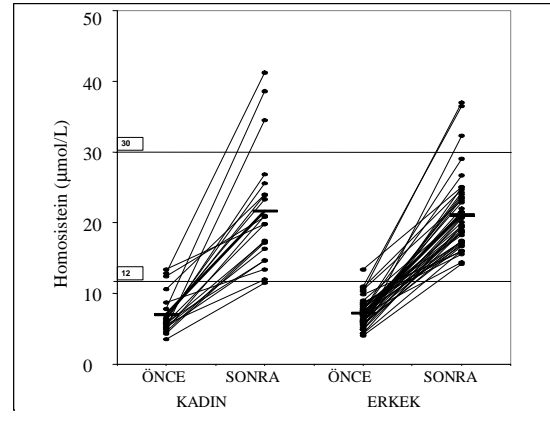
homosistein düzeyleri Tablo 2’de sunulmuştur. Çalışmamızda cinsiyete göre açlık homosistein düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Altmışdört sağlık personelinde metiyonin yüklemeye öncesi ve sonrası homosistein düzeyleri Şekil 1’de gösterilmiştir.

Kadın ve erkek grubunda 3’er denegin metiyonin yüklemeye sonrasında plazma homosistein düzeylerinin, yüklemenin üst düzeyi olan 30 µmol/L sınır konsantrasyonunu aştığı saptanmıştır. Sınırı aşan bu olgularda, açlık plazma homosistein değerlerinin kadın deneklerin hepsinde, erkek deneklerin ise yalnızca birinde, açlık sınır konsantrasyonu olan 12 µmol/L’yi geçtiği belirlenmiştir (Şekil 1).

Tartışma

Homosisteinin arter duvarlarını hasara uğrattığına dair kuvvetli ipuçları 30 yıl öncesine dayanmaktadır (3).Yüksek homosistein düzeylerinin oluşturduğu damar hasarları, ya arterleri kaplayan hücrelerin zedelenmesi ya da köpük hücre gelişme-

**Şekil 1.** Sağlık Personelinde Metiyonin Yükleme Öncesi ve Sonrası Plazma Homosistein Düzeyleri.

sinin artması ile izlenir ki, her iki durumda da kanallarda daralmaya yol açan lezyonlar meydana gelir. Aynı zamanda homosisteinin kan pıhtılaşma mekanizmasını da etkileyerek kalp krizi ya da felce neden olan pıhtı riskini artırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (16).

Yükselmiş plazma homosistein konsantrasyonları karotid, koroner ve periferik arterleri içine

alan vasküler tıkaçıcı hastalıkların gelişiminde bağımsız bir risk faktörüdür (16). Plazma homosistein konsantrasyonlarının artması, hem metabolizmasında yer alan enzimlerin genetik defektlerinden hem de ilaç veya beslenmeye bağlı olarak folik asit, B₁₂ veya B₆ vitaminlerinin eksikliğinden kaynaklanabilir (17,18).

Homosistein arteroskleroz için bir risk faktörü olmasının yanında, yukarıda bahsedilen vitaminlerin eksikliğinin hassas bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir; bu yönüyle de homosistein ölçümü bu vitaminlerin eksikliklerine bağlı değişik hastalık durumlarının belirlenmesinde ve önlenmesinde de önem arz etmektedir.

Ancak homosisteinin normal düzeyleri ile klinik olarak anormal düzeyleri arasındaki fark genellikle en çok normalin üst limitinin 2 katı kadar olmakta ve en sık olarak da 1.3 ile 1.5 katı arasında görülmektedir (19). Bu kadar az artışları saptayabilecek derecede hassas ve özgüllüğü iyi metotlara ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır.

Son zamanlardaki çalışmaların, yükselmiş homosistein düzeylerinin erken dönem vasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu ispatlamasından sonra, homosistein düzeylerini doğru olarak ölçmeye yönelik çeşitli teknikler ve yöntemler geliştirilmiştir. Homosistein düzeyini saptayan bu yöntemler içinde aminoasit analizörler (20), elektrokimyasal detektörlü HPLC yöntemleri (21), ELISA (22), polarizasyon immunoassay (23) yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler pahalı ve zaman alıcı yöntemler olup, rutin olarak kullanımı zordur. Bizim kullandığımız yöntem, sülfidril (tiyol) gruplarına spesifik ajanlarla kolon öncesi işaretleme (derivatizasyon) yapılarak HPLC ve floresans detektörle saptama yöntemidir. Bu yöntem yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir ve homosistein piki 2.6 dakikada saptanmaktadır. Böylece bu yöntemde çok sayıda örnekler, otomatik örnekleyici sistemiyle çalışılabilen ve rutin kullanıma uygun olmaktadır.

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan homosistein standartlarının regresyon analizi 0.99861 gibi bir korelasyon göstermiş, düşük ve yüksek serum kontrolleri de beklenen değerlerde

sonuç vermiştir. Bu yöntemin gün içi ve günler arası terarlanabilirlik sonuçları sırasıyla gün içi %4.23, günler arası %1.36 olarak bulunmuş olup, bu sonuç yöntemimizin terarlanabilir, doğru ve güvenilir olduğu ve laboratuvarımızda rutin kullanıma hazır hale geldiğini göstermiştir.

GATA'da çalışan personelde homosistein düzeyi ile, olası homosistein metabolizma defektlerini de metiyonin yüklemesi yaparak saptamaya çalıştık. Ön çalışmada, metiyonin yüklemesi sonrası kan örnekleri 2, 4 ve 8. saatlerde alındı. Homosistein düzeylerinin ölçümü sonucunda, 2 saatlik metiyonin yüklemesi sonrası ile diğer saatler arasında çok önemli bir fark olmadığı saptandı. Çeşitli literatürlerde de metiyonin yüklemesinden 2 saat sonra kan alınması önerilmekteydi (13,24). Bazı literatürler kalp rahatsızlığı olan hastalara metiyonin yüklemesi testinin yapılmasını önermezken (25), bazı çalışmalar, oksidatif stresin endotel fonksiyon üzerine bir etkisinin olmadığını deneysel olarak göstermiştir (26,27). Yükleme yaptığımız olguların ortalama yüklemesi sonrası homosistein düzeyleri, kadınlarda 21.60 ± 8.1 $\mu\text{mol/L}$, erkeklerde ise 21.16 ± 5.2 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı. Ancak metiyonin yüklemesi yapılan başka araştırmalarda normal olgularda biraz daha yüksek (28.7 ± 4.4 $\mu\text{mol/L}$) değerler bildirilmiştir (26), bu farklılığın çalışma gurubumuzdaki çeşitli olguların değişik metabolizmalarından kaynaklandığına inanılmaktadır.

Çalışmamızdaki 3 kadın ve 3 erkek denekte metiyonin yüklemesi sonrasında plazma homosistein düzeylerinin, yüklemenin üst düzeyi olan 30 $\mu\text{mol/L}$ sınır konsantrasyonunu aştığı saptanmıştır. Sınırı aşan bu olgularda, açlık plazma homosistein değerlerinin kadın deneklerin hepsinde, erkek deneklerin ise yalnızca birinde, açlık sınır konsantrasyonu olan 12 $\mu\text{mol/L}$ 'yi geçtiği belirlenmiştir (Şekil 1). Bu durum, bize yalnızca açlık homosistein düzeyinin yeterli olmadığını, yüklemesi sonrası alınan homosistein sonuçlarının olgulardaki metiyonin ve homosistein metabolizmasını daha iyi yansıttığını göstermektedir. Bazı çalışmalar, orta derecede homosisteinin tanısında metiyonin yüklemesi testinin gerekli olduğuna dikkat çekmişlerdir (27). Ayrıca bazı araştırmalarda

açlık homosistein düzeylerini riskli olgularda yeterli bilgi vermediği ve % 40 oranında olgulara tanı konulmadığı bildirilmektedir (26).

Nedeni ne olursa olsun plazma homosistein seviyesini yükselten çeşitli sendromlar (genetik bozukluklar, vitamin eksiklikleri, yanlış beslenme vs.) damar yapısını bozmakta ve kolesterol birikimine neden olmaktadır. Araştırmamız sırasında, açlık homosistein düzeyi 13 µmol/L ve metiyonin yüklemeye sonrası homosistein düzeyi 35 µmol/L olarak saptanan genç bir sağlık personelinin, bir süre sonra kalp krizi geçirdiğini ve ailesinde kalp hastalığı hikayesi bulunduğunu tesbit ettik. Bu bize, amacımızda da belirtildiği gibi açlık ve metiyonin yüklemeye sonrası yüksek homosistein düzeylerine sahip olgulara daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini ve bu şahıslara vitamin tedavisi verilmesinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca prospektif olarak yapılan çalışmaların sonucuna göre, yalnızca açlık homosistein düzeylerinin miyokardiyal infarktüs ve serebrovasküler hastalıkların tanısında yeterli olamayacağı, önce metiyonin yüklemesi yapılarak alınacak cevaba göre değerlendirme yapılması gerektiği anlaşılmaktadır (28).

Sonuç olarak araştırmamızda homosistein düzeyleri basit, hassas ve tekrarlanabilir bir HPLC-Floresans detektör yöntemi ile saptanmış ve laboratuvarımızda rutin amaçlar için kullanılabilir bir test olarak yerini almıştır. Bu yöntemle GATA personelinde açlık ve metiyonin yüklemeye sonrası plazma homosistein düzeylerinin laboratuvarımız şartlarındaki değerleri elde edilmiştir. Metiyonin yüklemesinin gelecekteki koroner kalp hastalığı ve miyokard infarktüsü riskini saptamada önemli olabileceği kanısına varılmış ve olgu sayıları artırılarak bu araştırmaya devam edilmesinin uygun olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998; 71(2-3): 227-33.
- 2 Hankey GJ, Eikelboom JJ. Homocysteine and vascular disease. *The Lancet* 1999; 354: 407-13.
- 3 McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* 1996; 2 (4): 386-9.
- 4 McCully KS, McCully M. *The heart revolution*. 1st ed. New York: HarperPerennial Publishing, 2000: 7-10.
- 5 Robinson K. Homocysteine, B vitamins and risk of cardiovascular disease. *Heart* 2000; 83: 127-30.
- 6 Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, Newcomer LM, Upson B, Ullman D, Tishler PV, Hennekens CH. A Prospective Study of Plasma Homocysteine and Risk of Myocardial Infarction in US Physicians. *JAMA* 1992; 268 (7):877-81.
- 7 Nevruz O, Avcu F, Yaman H, Ural A U, Kaptan K, Erbil M K, Kutluay T, Yalçın A. The Evaluation of Relationship between Plasma Total Homocysteine Level and Coronary Artery Disease. *Gülhane Tıp Dergisi* 1999; 41 (3): 367-74.
- 8 Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Anderson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993; 39 (9): 1764-79.
- 9 Janseen MJFM, Guldener C, Van Den Berg M, Stehauwer CDA, Donker AJM. Folic acid treatment of hyperhomocystenemia in dialysis patients. *Liner Electrolyte Metab.* 1996; 22: 110-4.
- 10 Verhoef P, Henkens CH, Allen RH, Stabler SP, Willett WC, Stampfer MJ. Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent Coronary Artery Bypass Surgery. *Am J Cardiology* 1997; 79: 799-805.
- 11 Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, Newcomer LM, Upson B, Ullman D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268 (7):877-81.
- 12 Erg MV, Boers GHJ. Homocystinuria: What about mild hyperhomocysteinemia. *Postgrad Med J* 1996; 72: 513-8.
- 13 Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hultberg B. The effect of excess daily methionine intake on plasma homocysteine after a methionine loading test in humans. *Clin Chim Acta* 1990; 192(1):69-76.
- 14 Choa CL, Kuo T, Li L, Yuan T. Effects of methionine – induced hyperhomocysteinemia on endothelium – dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation* 2000; 101: 485-90.
- 15 Heijer M, Bos GMT, Bouwer I.A, Gerricks WBT, Blom HJ. Variability of the methionine loading test; no effect of a low protein diet. *Ann Clin Biochem* 1996; 33: 551-4.
- 16 Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels M, Amiral J, Fiehn W, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1997; 20 (12) 1880-86.
- 17 Chen N, Liu Y, Greiner CD, Holtzmann JL. Physiological concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *Lab Clin Med* 2000; 136: 58-65.
- 18 Tsai MY, Garg Uttam, Key NS, Hansen NQ, Suth A, Schwichtenberg K. Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria. *Atherosclerosis* 1996; 122: 69-77.
- 19 Keichle FL, Malinski T. Nitric oxide, biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 567-75.

- 20 Cornwell PE, Morgan SL, Vaughn WH. Modification of a high - performance liquid chromatographic method for assay of homocysteine in human plasma. *J Chromatogr* 1993; 617: 136-9.
- 21 Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. *Clin Chem* 1999; 45:1261-68.
- 22 Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, Aras O, Tsai MY. Interlaboratory Variation of Plasma Total Homocysteine Measurements: Results of Three Successive Homocysteine Proficiency Testing Surveys. *Clin Chem* September 1, 2002; 48(9): 1539-45.
- 23 Frank F, Faren AL, Alfheim I, Nordhei AK. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-6
- 24 Boers GH, Smals AG, Drayer JI, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kloppenborg PW. Pyridoxine treatment does not prevent homocystinemia after methionine loading in adult homocystinuria patients. *Metabolism* 1983; 32 (4): 390-7.
- 25 Silberberg J, Crooks R, Fryer J, Wlodarczyk J, Nair B, Guo XW, Xie LJ, Dudman N. Gender differences and other determinants of the rise in plasma homocysteine after L-methionine loading. *Atherosclerosis* 1997; 133: 105-10.
- 26 Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum T, Rooijmans DF, Johnson SM, Boyd JL, Cockcroft JR, Webb DJ. Acute methionine loading does not alter arterial stiffness in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37 (1): 1-5.
- 27 Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR. Post-methionine load hyperhomocysteinaemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: Initial results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 147-51.
- 28 Van der Griend R, Biesmal JH, Banga JD. Postmethionine-load homocysteine determination for the diagnosis hyperhomocysteinemia and efficacy of homocysteine lowering treatment regimens. *Vasc Med* 2002; 7 (1): 29-33.

Geliş Tarihi: 26.08.2002

Yazışma Adresi: Dr.M.Kemal ERBİL

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD
06018, Etlik, ANKARA
kerbil@gata.edu.tr