

Mr sc. dr Zoran Čeperković

Interno odeljenje Vrnjačka Banja

Hiperhomocisteinemija i vaskularna oboljenja

Ključne reči

homocistein
vaskularne bolesti
vitamini

Sažetak

Homocistein je aminokiselina koja nastaje u toku metabolizma metionina, esencijalne aminokiseline. Dokazano je da produžena ekspozicija endotelijalnih ćelija visokim koncentracijama homocisteina (1-5 mmol/l) dovodi do progresivnog opadanja u bioaktivnosti potentnog vazodilatatora i antitrombotičkog medijatora azotmonoksida (NO). Takođe, zapaženo je da homocistein menja balans između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Pored ostalih, hiperhomocisteinemija može imati i genetski uslovljene uzroke nastanka, deficit ili smanjenu aktivnost cistationin beta sintetaze, N5-10-metilentetrahidrofolat reduktaze, N5-metiltetrahidrofolat transferaze (MTHFT), metionin sintetaze, betain homocistein metiltransferaze. Pacijenti sa cerebrovaskularnim oboljenjima imaju hiperhomocisteinemiju u oko 40% slučajeva, pacijenti sa perifernim arterijskim oboljenjima u oko 25% slučajeva, dok 15-25% pacijenata sa koronarnim arterijskim oboljenjima imaju povišene nivoe homocisteina u plazmi. Vitamin B₆, B₁₂ i folat predstavljaju determinante koncentracije homocisteina u plazmi, tj. imaju značajnu ulogu u razgradnji homocisteina. Nivo serumskog ukupnog homocisteina kod zdravih osoba varira sa unosom metionina hranom. Način ishrane i unos pojedinih vitamina (B₆, B₁₂) u znatnoj meri određuju koncentraciju homocisteina u krvi.

Metabolizam homocisteina

Homocistein je tiolna alfa aminokiselina i nalazi se na raskrsnici puta transsulfuracije kojim se metionin prevodi u cistein i puta remetilacije ove aminokiseline ponovo u metionin.¹ Homocistein se ili konvertuje u cistationin pomoću cistationin beta-sintetaze ili se metiluje u metionin.² Ponovno stvaranje metionina kroz remetilaciju homocisteina može se ostvariti kroz dve reakcije. U prvoj reakciji homocistein dobija metil grupu od betaina, derivata holina.³ Ova ireverzibilna reakcija je katabolizovana betain-homocistein metiltransferazom (EC 2.1.1.5), koja je prisutna u jetri i bubrezima, ali odsutna u mozgu.⁴ U drugoj reakciji remetilacije, 5-metiltetrahidrofolat je donor metil grupe u reakciji katalizovanoj enzimom 5-metiltetrahidrofolat: homocistein metiltransferaza (metionin sintaza; EC 2.1.1.13) koji sadrži B₁₂ vitamin i prisutan je svuda u organizmu. Kada je intracelularna produkcija homocisteina veća od one koja je

neophodna, intracelularni homocistein biva transportovan u ekstracelularni prostor.⁵

Pomoću transsulfuracije, homocistein se ireverzibilno degradira kroz seriju reakcija, a sulfatna komponenta metionina se konačno izlučuje u urin u formi sulfata.¹ Homocistein se kondenzuje sa serinom i daje tioetar cistation. Reakcija je katalizovana cistation beta-sintetazom (EC 4.2.1.22) i predstavlja reakciju kondenzacije koja je ireverzibilna u fiziološkim uslovima.⁶ Enzim koristi kao kofaktor piridoksal 5-fosfat, biološki aktivnu formu vitamina B₆. Cistationin se hidrolizuje jednom drugom vrstom enzima koji sadrži piridoksal 5-fosfat i to je gama-cistationinaza (EC 4.4.1.1) i u toj reakciji nastaju cistein i alfa-keto butirat. Višak cisteina se oksiduje do taurina i eventualno neorganskog sulfata koji se izlučuje u urin. Na ovaj način transsulfuracijom se efektivno katabolizuje višak homocisteina, koji nije neophodan za reakcije

Patofiziologija i uzroci vaskularnih oboljenja kod hiperhomocisteinemije

Stammler i saradnici su pokazali da produžena ekspozicija endotelijalnih ćelija visokim koncentracijama homocisteina (1-5 mmol/l) dovodi do progresivnog opadanja u bioaktivnosti potentnog vazodilatatora i antitrombotičkog medijatora azot-monoksida (NO).⁷

Tiolna grupa homocisteina se lako oksidiše, stvarajući anjonski radikal superoksid, vodonik peroksid i posledično hidroksilni radikal.⁸ Nekoliko mehanizama može dovesti do disfunkcije vaskularnog tkiva. Prvo, superoksidni anjon i hidroksilni radikali mogu da započnu peroksidaciju lipida kako na površini endotelijalnih ćelija, tako i u lipoproteinskim česticama u plazmi.

Direktno toksično dejstvo superoksid radikala se ogleda u njegovoj sklonosti ka oksidaciji lipoproteina male gustine (LDL), odnosno uticaju na povećano preuzimanje LDL čestica od strane *scavenger* ćelija. Ovo je glavni preduslov za nastanak penastih (*foam*) ćelija. Endotelijalna citotoksičnost homocisteina može biti suprimirana dejstvom azot-oksida, kao "relaksirajućeg faktora", koga proizvodi endotelijum.

Drugo, superoksidni anjon dovodi do smanjene endotelijalne produkcije azot-monoksida, pri čemu se formira pe-roksinitrit. Smanjeno oslobađanje azot-monoksida od strane endotelijalnih ćelija može zatim olakšati proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija.^{9,10} Sam homocistein takođe povećava proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija.

Konačno, vodonik-peroksid, koji slobodno prolazi membranu ćelija, redukuje se i detoksifikuje pomoću glutathion pe-roksidaze. Homocistein ali ne i cistein može inhibirati aktivnost glutathion peroksidaze.⁸ Postoji dokaz uključenosti vodonik-peroksida u ispoljavanju toksičnosti homocisteina.¹¹ Takođe, dokazano je da homocistein menja balans između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Selektivna inhibicija delovanja i sekrecije trombomodulina, redukcija aktivacije proteina C i aktivacija proteoliznog aktivatora faktora V, neka su od karakterističnih dejstava homocisteina.

Jedna druga hipoteza vaskularne bolesti povezane sa hiperhomocisteinemijom, jeste da hiperhomocisteinemija može odražavati neefikasnost intracelularnih reakcija metilacije, što može dovesti do vaskularnih oboljenja, jer je intracelularna metilacija neophodna za normalnu regeneraciju oštećenih proteina.¹² Neefikasna intracelularna metilacija bi mogla dovesti do postojanja oštećenih proteina, koji potom mogu biti uključeni u proces aterogeneze.¹³

Hiperhomocisteinemija može imati različite uzroke nastanka.

Genetski uslovljeni uzroci hiperhomocisteinemije:

- deficit ili smanjena aktivnost cistationin beta sintetaze (CBS)
- deficit ili smanjena aktivnost enzima uključenih u proces remetilacije:
- N5-10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR),
- N5-metiltetrahidrofolat transferaze (MTHFT)
- metionin sintetaze
- betain homocistein metiltransferaze (BHMT).

Genetska deficijencija navedenih enzima dovodi do preterane koncentracije disulfida homocisteina, kao što su homocistin i kombinovani disulfidi sa cisteinom i proteinima, koji se mogu naći u plazmi i urinu. Deficijencija CBS-a kao razloga klasične homocistinurije, povezana je sa razvojem prevremene arterioskleroze i čestim tromboembolijskim epizodama.² Kod pacijenata sa prematurnom okluzivnom arterij-skom bolešću, nađeno je da je mnogo veća učestalost hete-rozigotnosti za deficit CBS-a.¹⁴ Hiperhomocisteinemija sa nivoima homocisteina u plazmi koji su 1,5 do 5 puta veći od normalnih, može dovesti do vaskularnih oboljenja.¹⁵ Hiperhomocisteinemija je generalno definisana kao vrednost homocisteina u plazmi iznad 15 $\mu\text{mol/l}$.¹⁶ Prisutne su tri forme hiperhomocisteinemije: umerena (16-30 $\mu\text{mol/l}$), srednja (31-100 $\mu\text{mol/l}$) i teška forma sa vrednostima homocisteina iznad 100 $\mu\text{mol/l}$.¹⁷ Učestalost umerene hiperhomocisteinemije u pacijenata sa vaskularnim oboljenjima pokazuje izvesne varijacije u odnosu na lokaciju vaskularne lezije. Pacijenti sa cerebrovaskularnim oboljenjima imaju hiperhomocisteinemiju u oko 40% slučajeva¹⁸, pacijenti sa perifer-nim arterijskim oboljenjima u oko 25% slučajeva,¹⁹ dok 15-25% pacijenata sa koronarnim arterijskim oboljenjima imaju povišene nivoe homocisteina u plazmi²⁰. Homocistein može svojim delovanjem da utiče na sistem koagulacije, funkciju trombocita i protektivna svojstva vaskularnog endotela u odnosu na proces trombogeneze. Takvi mehanizmi mogu objasniti pojavu ne samo venske i arterijske tromboembolije, već i razvoj arterioskleroze.²¹ Teška hiperhomocisteinemija, prisutna kod osoba sa deficijencijom enzima cistationin beta sintetaze, karakteriše se vaskularnom okluzijom kako u arterijskom tako i u venskom sistemu.²² Postoji nekoliko izveštaja niske aktivnosti antitrombina^{23,24,25} i niskog faktora VII u plazmi pacijenata sa deficijentnim CBS enzimom.²⁶ Deficit CBS se nasleđuje autozomnorecesivno, što su pokazala mnogobrojna ispitivanja familija obolelih, kao i studije enzima roditelja obolele dece. Heterozigotne individue obavezno imaju smanjenu aktivnost CBS u ekstraktima različitih tkiva. Otkrivanje heterozigota sa CBS deficijencijom ima svoj značaj u odnosu na rizik za potomstvo i kao faktor rizika za rane tromboembolijske komplikacije.

Lentz i Sadler su pronašli da homocistein inhibira ekspresiju trombomodulina i aktivaciju proteina C u endotelijalnim ćelijama humane umbilikalne vene *in vitro*.

Homocistein utiče na ekspresiju trombomodulina na površini ćelije uzrokujući oštećenje prenosa glikoproteina u endoplazmatskom retikulumu ćelije²⁷.

Hiperhomocisteinemija predstavlja nezavisan faktor rizika za vaskulopatiju. Metaanaliza²⁷ studija o vezi između povišenih koncentracija homocisteina i premturh vaskularnih oboljenja a koje su radili Boushey i saradnici, potvrdila je da rizik od vaskularnog oboljenja zavisi od koncentracije homocisteina u plazmi. Procenjeno je da povećanje nivoa homocisteina u krvi od 5 μmol , povećava rizik za nastanak koronarne bolesti srca 1,3 puta kod muškaraca a 1,4 puta kod žena²⁸.

Patološka ispitivanja posle smrti pacijenata sa teškim oblicima homocisteinurije pokazala su ozbiljna oštećenja arterijskog zida, sa upadljivom intimalnom hiperplazijom, vaskulizacijom i fibrozom. Mnogobrojni trombi zatvaraju i ovako sužen lumen krvnih sudova²⁹.

Relativno veliki broj studija ukazuje na pozitivnu korelaciju ukupnog holesterola, HDL, LDL holesterola i ukupnog homocisteina. Po prvi put se spominje mogućnost uticaja homocisteina kao nezavisnog faktora rizika za nastanak bolesti od lipidnog statusa 1995. i 1996. godine³⁰.

Vitamin B₆, B₁₂ i folat-determinante koncentracije homocisteina u plazmi

Vitamin B₆ u obliku piridoksal-5-fosfata je uključen u izgradnju cistationina iz homocisteina (tzv. put transulfuracije). Ovaj vitamin je takođe esencijalan za stvaranje 5,10 metilentetrahidrofolata (5,10-MTHF) iz tetra hidrofolata (THF) i stoga je u bliskoj vezi sa metabolizmom folata. Folat je zajedno sa vitaminom B₁₂ uključen u remetilaciju homocisteina u metionin. U ovoj reakciji metil grupa sa 5-metil-tetrahidrofolata prenosi se na vitamin B₁₂ koji je kofaktor enzima homocistein-metil-transferaze da bi se dobio kompleks metilkobalamin-enzim. Najzad, ovaj kompleks daje metil grupu homocisteinu pri čemu se formira metionin. U slučaju deficijencije jednog ili više vitamina uključenih u metabolizam homocisteina, nivoi homocisteina u krvi su često dosta povišeni u odnosu na one posmatrane u zdravoj populaciji (5-15 $\mu\text{mol/l}$)²⁹. U slučaju ozbiljne deficijencije kobalamina ili folata, koncentracija homocisteina u krvi može dostići toliko visoke koncentracije kao one koje se javljaju kod genetskih poremećaja u metabolizmu homocisteina, npr. kod disfunkcije enzima CBS. Visoki nivoi mogu biti objašnjeni povećanim transportom homocisteina iz ćelija u ekstracelularni prostor, uključujući plazmu³¹. Nakon tretmana vitaminima, koncentracija homocisteina u krvi se brzo vraća na normalu³². Mladim ženama od 21-31 godine davana je kombinacija folne kiseline 400 μg , vitamina B₁₂ - 6 μg , i vitamina B₆ 2 μg u toku dvanaest nedelja. Već nakon četiri nedelje srednja koncentracija homocisteina u plazmi bila je značajno redukovana - za 21%. Međutim, nakon toga nije opaženo dalje sniženje nivoa homocisteina³³. Oko 90% pacijenata sa klinički potvrđenom deficijencijom folata imaju izrazito povišen nivo homocisteina u plazmi³⁴. U ispitivanju koje je obuhvatilo 145 pacijena-

ta sa koncentracijom vitamina B₁₂ u serumu ispod 150 pmol/l, Stabler i saradnici su našli da je 73 od 86 pacijenata koji su odgovorili na tretman sa vitaminom B₁₂, imalo povišene nivoe homocisteina u serumu³⁵. U jednoj studiji izvedenoj na zdravim ljudima sa normalnim nivoima vitamina B₁₂ u serumu, folata u eritrocitima i piridoksal-5 fosfata u plazmi, meren je ukupni homocistein u plazmi pre i nakon dvonedeljnog oralnog uzimanja ili jednog miligrama cijanokobalamina, 5 mg folne kiseline ili 40 mg piridoksin hidrohlorida. Folna kiselina je redukovala srednju koncentraciju homocisteina u plazmi za 52%, individualna smanjenja su viđena kod svih ispitanika. Davanje cijanokobalamina ili piridoksin hidrohlorida nije imalo takav efekat.

Da bi se testirao efekat folne kiseline i vitamina B₆ na smanjenje nivoa homocisteina u plazmi, vršeno je ispitivanje na 20 pacijenata sa okluzivnom cerebralnom ili perifernom arterijskom bolešću, pri čemu su ovi pacijenti ponovo ispitivani nakon jedne godine. Svaki pacijent je testiran dva puta, prvo nakon oralnog tretmana sa 240 mg piridoksin hidrohlorida u toku dve nedelje, a potom nakon dve nedelje kombinovanog tretmana vitamina B₆ sa 10 mg folne kiseline dnevno. Nakon davanja samo piridoksina, srednja koncentracija homocisteina u plazmi bila je nepromenjena. Nakon kombinovanog tretmana (piridoksin + folna kiselina), ukupna koncentracija homocisteina u plazmi opala je u svih 20 pacijenata u proseku za 57%. Smanjenje koncentracije homocisteina bilo je najizraženije kod pacijenata sa homocisteinemijom, naročito u slučajevima sa subnormalnom ili niskom koncentracijom folata³⁶.

Važnost ishrane i unosa vitamina

Fiziološki faktori koji utiču na nivo homocisteina su: starost, pol i način života. Promene u načinu života mogu biti od velike koristi vezane za nivo homocisteina u krvi. Nivo serumskog ukupnog homocisteina kod zdravih osoba varira sa unosom metionina hranom. Kako je homocistein proizvod metionina, to znači da i unos velikih količina metionina dovodi do povećanog nivoa homocisteina. Opšte uzevši hrana životinjskog porekla je bogatija metioninom (meso, riba, žumanac jajeta, kravle mleko, mlečni proizvodi). Rezultati studije objavljene u časopisu *Preventive medicine* 2000. god. impliciraju da ishrana bogata metioninom može pomoći u smanjenju nivoa homocisteina u krvi.

Unos metionina ishranom gotovo je nemoguće izbeći, pa dodaci ishrani koji mogu biti od koristi su vitamin B₆, B₁₂ i folna kiselina. Preporučene doze piridoksina variraju od 250-500 mg/dan, a pozitivne terapijske rezultate, uz davanje piridoksina, pokazuje primena folata (do 400 mcg/d). Nakon istraživanja sprovedenih u Kanadi na velikom uzorku starijih osoba (gde folna kiselina po pravilu nedostaje), proglašena je praviu lekom. U pojedinim slučajevima bolesnici ne reaguju na kombinovanu terapiju folatom, vitaminom B₁₂ i piridoksinom. Betain (6g/dan) ili njegov prekursor holin (2g/dan) takođe snižavaju nivo homocisteina, pa se njihova upotreba preporučuje kada suplementacija folnom kiselinom i vitaminima B₆ i B₁₂ ne postigne zadovoljavajuće sniženje nivoa homocisteina.^{37,38}

Hyperhomocysteinemia and vascular disease

Key words

homocysteine
vascular disease
vitamines

Abstract

Homocysteine is an amino acid produced in the metabolism of methionine, an essential amino acid. It is approved that prolonged exposure to high homocysteine levels (1-5 mmol/L) causes a progressive reduction in the bioactivity of nitrogen monoxide, a potent vasodilator and antitrombic mediator. It is also observed that homocysteine alters the balance between procoagulant and anticoagulant factors. Furthermore, hyperhomocysteinemia may depend on hereditary causes - deficit or reduced activity of cystathionine beta-synthase, N5-10-methyltetrahydrofolat reductase, N5-Methyltetrahydrofolat-transferase, methionin-synthase, betaine-homocysteine methyltransferase. Hyperhomocysteinemia was detected in 42% of patients with cerebrovascular diseases, 28% of patients with peripheral artery disease, whereas 15-25% of patients with coronary artery disease have elevated homocysteine level. Vitamins B₆, B₁₂ and folic acid are determinants of plasma total homocysteine concentration, they play an very important part in homocysteine degradation. In healthy population, the total homocysteine concentration in plasma varies with intake of methionine from food. The way of nutrition and intake of respective vitamins (B₆, B₁₂) significantly determine the plasma homocysteine concentration.

Literatura

1. Stipanuk MH. *Metabolism of sulfur-containing amino acid*. Ann Rev Biochem 1986; 6:179-209.
2. Mudd SH, Levy HL. *Disorders of transsulfuration*. In: Stanbury JB, Wyngarden JB, Fredrickson, eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease New York, Mc Graw-Hill 1983; 522-59.
3. Selhub J, Miller JW. *The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine*. Am J Clin Nutr 1992;55:131-38.
4. Mc Keever MO, Wier DG, Molloy A, et al. *Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat*. Clin Science 1991;81:551-56.
5. Christensen B, Refsum H, Vintermyr O, et al. *Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine loading of non-transformed, proliferating, and quiescent cells in culture*. J Cell Phys 1991;146:52-62.
6. Ueland PM, Refsum H. *Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma level in health, disease, and*
7. *therapy*. J Lab Clin Med 1989;114:473-501.
8. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. *Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen*. J Clin Invest 1993;91:308-318.
9. Loscalzo J. *The oxidant stress of hyperhomocysteinemia*. J Clin Invest 1997;98:5-7.
10. Lubec B, Arbeiter K, Hoeger H, et al. *Increased cyclin dependent kinase in aortic tissue of rats fed homocysteine*. Thromb Hemostas 1996; 75: 542-45.
11. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:6369-73.
12. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, et al. *Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A Model for the study of vascular injury*. Thromb Res 1980;18:113-21.
13. Perna AF, Ingrosso D, Galletti P, et al. *Membrane protein damage and methylation reactions in chronic renal failure*. Kidney Int 1996; 50: 358-366.
14. Berg M van den, Stehouwer CDA, Bierdrager E, et al. *Plasma homocysteine and severity of atherosclerosis in young patients with lower-limb atherosclerotic disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:165-171.
15. Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels FJM, et al. *Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease*. N Engl J Med 1985;313:709-15.
16. Coull BM, Malinow MR, Beamer N, et al. *Elevated plasma homocysteine concentration as a possible independent risk factor for stroke*. Stroke 1990;21:572-576.
17. Bolander Gouaille C. *Focus on homocysteine*. Springer-Verlag, 2000.
18. Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, et al. *Assessment of homocysteine status*. J Inher Metab Dis 1997; 20: 286-294.
19. Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, et al. *Hyperhomocysteinemia in stroke: prevalence, cause, and relationships to type of stroke and stroke risk factors*. Eur J Clin Invest 1992;22:214-221.
20. Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, et al. *Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for intermittent claudication*. J Internal Med 1992; 231:273-79.
21. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. *Homocysteine and myocardial infarction*. Atherosclerosis 1988;71:227-233.
22. Mudd SH, Skovby F, Levy HL. *The natural*

- history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1-31.
22. Mudd SH, Skovby F, Levy HL. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CG, Ed. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York: Mc Graw Hill 1989:693-734.
 23. Giannini MJ, Coleman M, Innerfield A. Antithrombin activity in homocystinuria. *Lancet* 1975; 1:1094.
 24. Maruyama I, Fukuda R, Kaszama M, et al. A case of homocystinuria with low antithrombin activity. *Acta Hem Jap* 1977; 40: 267-71.
 25. Palareti G, Salardi S, Piazzzi S. Blood coagulation changes in homocystinuria: Effects of pyridoxine and other specific therapy. *J Pediatr* 1986;109:1001-6.
 26. Ben Dridi MF, Karoui S, Kastally R, et al. *L homocystinurie: Forme avec thrombose vasculaire et deficite en facteur VII*. *Arch Fr Pediatr* 1986; 43:41-4.
 27. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-14.
 28. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274: 1049-1057.
 29. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
 30. Obeid OA, Mannan N, Perry G, Iles RA, Boucher BJ. Homocysteine in healthy east London Bangladeshis. *Lancet* 1998; 352: 1829-30.
 31. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, et al. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B12, and vitamin B-status. *Am J Clin Nutr* 1996;63:220-224.
 32. Guttormsen AB, Schneede J, Ueland PM, et al. Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am J Nutr* 1996;126:1266S-1272S.
 33. Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B12 deficiency. *J Nutr* 1996;126:1266S-1272S.
 34. Dierkes J. Vitamin requirements for the reduction of homocysteine blood levels in healthy young women. Dissertation, Landwirtschaftl. Fakultät, University of Bonn, 1995.
 35. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, et al. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988;81:466-474.
 36. Stabler SR, Allen RH, Savage DG, et al. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76:871-81.
 37. Barber GW, Spaeth GI. Pyridoxine therapy in homocystinuria. *Lancet* 1967;1:337.
 38. Visok nivo homocisteina. 2004 dec. Available from: URL:<http://www.gmc-nutrition.com/visok%homocistein.htm>.