

## SİGARA İÇENLERDE PLAZMA TOTAL HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE LİPİT PARAMETRELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gürkan ÇIKIM M. Ferit GÜRSU

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Investigation of Effects of Lipid Profiles on Plasma Total Homocysteine Levels in Smokers

### SUMMARY

Several epidemiological studies demonstrated that seriously coronary heart disease (CHD) cases are increased by 70% in smokers. Homocysteine is determined to be a new cardiovascular risk factor. Purpose of present study was to examine the effects of serum lipid profiles on plasma total homocysteine levels.

Total of 84 males (32 smokers 52 non-smokers) were recruited into the study. Plasma total homocysteine and serum lipid components were determined by ELISA and autoanalyser using commercially available kits. Diets and body mass index (BMI) of subjects were similar.

Plasma total homocysteine levels in smokers were found to be statistically significantly higher (up to 50%) compared to non-smokers ( $p<0.001$ ). On the other hand, total cholesterol, LDL, VLDL-cholesterol, ApoB and lipoprotein(a) levels were significantly high in smokers whereas levels of serum HDL-cholesterol, ApoA were significantly lower.

CHD risk factors and protection from these factors are vitally important. Results of several studies clearly show that the best way to protect one from heart diseases is to keep homocysteine level under control. Smoking, which is a preventable risk factor, must be quit, lowered or diets of smokers should contain substances increasing metabolism and eliminating of homocysteine such as vitamins.

**Key Words:** Smoking, homocysteine, lipid profile

### ÖZET

Çok sayıda epidemiyolojik çalışma sigara içenlerde ölümcül koroner olayların %70 arttığını göstermiştir. Homosistein yeni bir kardiyovasküler risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, sigara içenlerde plazma total homosistein düzeyleri üzerine serum lipit profilinin etkilerini araştırmaktır.

32 sigara içen ve 52 sigara içmeyen erkek bireyin plazma total homosistein düzeyleri Eliza tekniği ile serum lipit bileşenleri ise ticari kitlerin kullanıldığı otoanalizörlerde çalışılmıştır. Bireylerin vücut kitle indeksleri ve beslenme koşullarının benzer olmasına dikkat edilmiştir.

Plazma total homosistein düzeyleri sigara içenlerde içmeyenlere oranla %50'ye varan ve istatistiksel açıdan anlamlı yüksek olarak tespit edilmiştir ( $p<0.001$ ). Bununla birlikte sigara içenlerde total kolesterol, LDL, VLDL-kolesterol, ApoB ve lipoprotein(a) anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken serum HDL-kolesterol, ApoA düzeylerinde anlamlı düşme görülmüştür.

KKH gelişimine neden olan risk faktörleri ve bu risk faktörlerinden korunmak çok önem arz etmektedir. Pek çok çalışmanın sonuçları açıkça göstermektedir ki kalp hastalıklarından korunmanın en iyi yolu homosisteini kontrol altına almaktan geçmektedir. En önemli önlenebilir risk faktörü olarak sayılan sigaranın içiminin azaltılması ya da aşırı sigara içenlerin diyetlerine mutlaka homosisteinin metabolizmasını artıran ve elimine edilmesini sağlayan vitaminlerin eklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sigara, homosistein, Lipit profili

## GİRİŞ

Framingham çalışmasında 45 yaş üzerindeki erkeklerde ve 65 yaş üzerindeki bayanlarda ölüm

nedenleri arasında birinci sırada koroner kalp hastalığının (KKH) yer aldığı saptanmış, risk faktörleri ortaya çıkarılmaya çalışılmış, neden ve sonuçları araştırılmış, yapılan araştırmalar neticesinde elde edilen sonuçlara göre tedavi programları düzenlenerek koroner kalp hastalığına bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılması hedeflenmiştir (1, 2). Klinik olarak koroner kalp hastalığı belirtilerini öngörmeye yarayan ve bir bireyin koroner kalp hastalığı gelişme profilini araştıran bir matematik model Framingham çalışmasında gösterilmiştir. Hesaplamaya cinsiyet, yaş, total kolesterol, HDL kolesterol, hipertansiyon, diyabet tanısı ve sigara içimi olmak üzere 7 risk faktörü girmektedir (1). Sigara içimi KKH'na yol açan en önemli bağımsız risk faktörlerinden birisidir. Kolay elde edilebilir olması ve kısa sürede alışkanlık yapması sigarayı daha da önemli hale getirmektedir. Diğer bir özelliği ise sadece kullanıcıyı değil, pasif kullanıcı olarak tanımlanan sigara kullanmadığı halde aynı ortamda bulunanları da etkilemesidir. Bu nedenle toplum sağlığı açısından sigaranın önemi daha da artmaktadır. Sigara etkisini içerdiği nikotin ve başta CO olmak üzere bir çok zararlı bileşiklerle göstermektedir. KKH açısından bakıldığında sigara ile KKH ilişkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Bu ilişki sigara kullanım süresine ve dozuna bağlı olarak artmaktadır. Sigaranın kalpte sempatik etkiler meydana getirdiği, kalp hızını, kan basıncını, damarlardaki kaslarda spazm yaptığı, trombojenik bir faktör olduğu, fibrinojeni dolayısı ile koagülan sistemini aktive ederek pıhtılaşmayı artırdığı saptanmıştır (2). Sigara bırakıldıktan sonra risk giderek azalmakta ve birinci yılın sonunda % 50'ye düşmekte, onuncu yılın sonunda ise risk ortadan kalmaktadır (3). Bir başka çalışmada, sigaranın KKH riskini 2-3 kat artırdığı tespit edilmiştir (4). Sigaranın bir diğer etkisi de, lipitlerin özellikle LDL-kolesterolün oksidasyonunu sağlaması ve arter cidarını zararlı hale getirmesidir (5). Yine KKH açısından önemli etkilerinden birisi de endotelde zedelenme oluşturarak lipitlerin bu bölgelerden geçmesine neden olması dolayısı ile ateroskleroza zemin hazırlayan arterom plak oluşumunu artırmasıdır (6). Sigara damarların kasılmasını önleyerek vazodilatasyon yapan nitrik oksit salınımını da inhibe etmektedir (4). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sigaranın KKH'na neden olan bu etkilerinin bazılarının homosistein aminoasiti

ile etkileşimi neticesinde oluştuğunu göstermektedir (1, 5).

Homosistein kükürt içeren, proteinlerin yapısına katılmayan bir aminoasit olup, ilk kez 1932 yılında tanımlanmıştır (6). Normal olarak diyetle alınmayıp, metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olarak oluşmaktadır. Homosisteinin metabolize olmasında başlıca transülfürasyon ve remetilasyon olmak üzere iki yol vardır. Her iki metabolik yol da çeşitli vitaminler ile aktive edilmektedir. Homosistein düzeyleri hafif 15  $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak tanımlanmakta kardiovasküler hastalık oluşumunu hızlandırmaktadır (7). Hiperhomosisteinemi son yıllarda kalp damar hastalıkları için sigara, hipertansiyon, şişmanlık ve dislipidemi gibi risk faktörleri üzerine bağımsız bir risk faktörü olarak eklenmiştir (8). Homosistein endotel üzerine toksik etki göstermektedir. Bu etkisini homosisteinin taşıdığı sülfür gruplarının ootooksidasyona uğraması, hidrojen peroksiti katalizlemesi ve endotelde fonksiyonel bozulmaya neden olması ile açıklanmaktadır (9). Stampfer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada homosisteinin, vasküler endoteli koruyucu özelliği olan nitrik oksit salınımını azalttığı, salınan nitrik oksitle homosisteinin birleşerek, S-nitrozo-homosisteine dönüştüğünü ve bu bileşiğin antitrombotik ve endotele toksik etki gösterdiğini saptamışlardır (9).

Çalışmamızda KKH'nın gelişiminde bağımsız birer risk faktörü olan sigara içilmesi ve homosisteinin etkileşimini araştırmayı, konvansiyonel risk gruplarından sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı gruptaki bireylerin homosistein ve diğer lipit parametrelerinin düzeylerini belirleyip karşılaştırarak bölgemizde de risk oluşturup oluşturmadığını tespit etmek amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma KKH için bilinen risk faktörlerinden sadece sigara içen 32 erkek hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlerlemiş aterosklerotik lezyonlar erkeklerde kadınlardan yaklaşık 20 yıl daha erken ortaya çıkmaktadır. Erkeklerin major risk faktörlerine daha ağır ve uzun süre maruz kalmaları hormonal faktörler olarak açıklanmakta ise de henüz tam olarak ortaya konulamadığından özellikle erkek bireyler çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan renal, tiroid ve hepatik hastalığı olanlar ile kardiyomiyopati ya da kapak hastalığı olanlar, tanı almış psikiyatrik

bozukluğu olanlar, antikonvülzan tedavi görenler, alkol bağımlıları ve vitamin kullanma alışkanlığı olanlar çalışmaya alınmamıştır. Bu hastalardan 5 mililitre kan alınarak plazma ve serumları ayrılmış ve lipit parametreleri serum da, homosistein düzeyleri plazma da çalışılmıştır.

Çalışmaya alınanlarda obezite ölçütü olarak, vücut ağırlığının (kg) boy uzunluğunun karesine (metre) bölünmesiyle elde edilen vücut kitle indeksi (VKİ) kullanılmıştır. Çalışmaya alınanların obez olmamalarına ve erkeklerde VKİ < 30 kg/m<sup>2</sup> olmasına dikkat edilmiştir. Halen sigara içenler (günde ortalama 10 adet) ve daha önce uzun süreli içip henüz yeni bırakanlar sigara içimi yönünden pozitif risk faktörü sayılmış ve çalışmaya alınmıştır.

Kontrol grubu ise son bir ay içerisinde herhangi bir şikayeti olmayan, herhangi bir diyet yapmayan, genel olarak bir hastalığa ait ilaç kullanmayan, herhangi bir cerrahi operasyon geçirmemiş, hipertansiyon, diabetes mellitus gibi kronik bir hastalığı olmayan, gebe olmayan, sigara içmeyen, aile öyküsü ve aralarında akrabalık bağı olmayan tamamen sağlıklı 52 kişiden oluşturulmuştur. Kontrol grubunda, anamnez, tam kan sayımı, fizik muayene, EKG tetkikleri yapılmış ve sağlıklı olarak bulunmuştur.

Sigara içenlerden en az 12 saat açlık sonrası sabahları lipit parametreleri ve homosistein için kan alınmıştır. Lipit parametreleri için alınan kan, herhangi bir materyal içermeyen düz biyokimya tüpüne, homosistein için alınan kan, antikoagülan olarak EDTA içeren tüplere konulmuştur. Biyokimya tüplerine alınan kanlar yarım saat bekletilmiş ve 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Serumlar iki kısma ayrılmıştır. Birinci kısım serumlardan bekletilmeden; total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol ve trigliserit ölçümleri Randox (Randox Laboratories San Francisco, ABD) marka ticari kitler kullanılarak hassas Olympus AU 600 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) oto analizörlerinde yapılmıştır. Diğer serumlar haftalık olarak ölçülecek şekilde Lp(a), apo-A, apo-B çalışılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

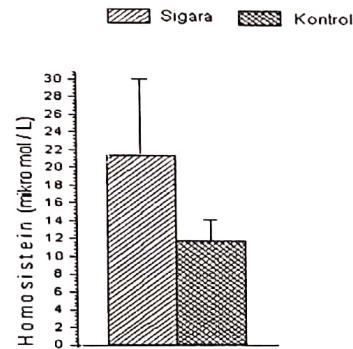
Homosistein için alınan kanlar santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve en fazla 1 ay sonra çalışılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Tüm örnekler toplandıktan sonra plazma homosistein düzeyleri, ELİZA (enzyme linked-immunosorbent assay) yöntemiyle (10), 450 nm dalga boyunda ELX<sub>800</sub> cihazında ölçülmüş ve sonuçlar µmol/L olarak

verilmiştir. Çalışmada, Axis (Biochemicals ASA, Norveç) marka ticari kitler kullanılmıştır.

Bulguların istatistiksel analizinde SPSS 9.0 programı kullanılmıştır. Gruplardaki değerlendirmeler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış sonuçların tümünde p < 0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Parametreler arasında Spearman's korelasyon analizi yöntemi uygulanmıştır.

## BULGULAR

Sigara içen grupta homosistein düzeyleri 21.3 ± 7.4 µmol/L, kontrol grubunda ise 11.8 ± 2.4 µmol/L olarak saptanmıştır. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.001). Diğer parametreler incelendiğinde Lp(a) düzeyleri sigara içen grupta 28.6 ± 10.8 ve sağlıklı sigara içmeyen kontrol grubunda 20.8 ± 14.6 mg/dl, kolesterol düzeyleri 202.5 ± 38.9 mg/dl kontrol grubunda 190.2 ± 37.2 mg/dl, trigliserit düzeyleri 192.7 ± 55.6 kontrol grubunda 164.6 ± 54.3 mg/dl, LDL düzeyleri 136.7 ± 15.3 kontrol grubunda 121.6 ± 32 mg/dl, HDL düzeyleri 42.5 ± 10.7 kontrol grubunda 46.2 ± 12.6 mg/dl, VLDL düzeyleri 34.5 ± 11.5 mg/dl, kontrol grubunda 31.6 ± 4.5 ApoA düzeyleri 0.7 ± 0.1 kontrol grubunda 1.2 ± 0.1 g/L, ApoB düzeyleri 0.9 ± 0.3 kontrol grubunda 0.8 ± 0.2 g/L olarak belirlenmiştir (Tablo 1). Tüm parametrelerde sigara içen grup ile sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlam tespit edilmiştir (p < 0.05). Spearman's korelasyon analizi ile bağıntı analizi yapıldığında plazma homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasında herhangi istatistiksel bir ilişki tespit edilememiştir (p > 0.05).



Şekil 1. Sigara içen ve içmeyen bireylerdeki homosistein düzeyleri

**Tablo 1.** Gruplarda homosistein ve lipit parametrelerinin karşılaştırılması

	Kontrol	Sigara Kullanan	P
Homosistein (µmol/L)	11.8 ± 2.4	21.3 ± 7.4	<0.001
Kolesterol (mg/dl)	190.2 ± 37.2	202.5 ± 38.9	<0.05
Trigliserit (mg/dl)	164.6 ± 54.3	192.7 ± 55.6	<0.05
VLDL (mg/dl)	31.6 ± 4.5	34.5 ± 11	<0.05
Lp(a) (mg/dl)	20.8 ± 14.6	28.6 ± 10.8	<0.05
HDL (mg/dl)	46.2 ± 12.6	42.5 ± 10.7	<0.05
LDL (mg/dl)	121.6 ± 32	136.7 ± 15	<0.05
ApoA (g/L)	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	<0.05
ApoB (g/L)	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3	<0.05

## TARTIŞMA

Sigara ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki iyi bilinse de, bu riskin altında yatan mekanizmalar yeterince aydınlık değildir. En önemli önlenilebilir risk faktörlerinden biri olan sigara, ülkemizdeki yaygın kullanımı nedeniyle özel bir önem taşımaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Türk erkeklerinin %60'ı sigara kullanmaktadır (2). Türk kadınlarının sigara tüketimi ise gittikçe artmaktadır. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma sigara içenlerde ölümcül koroner olayların %70 arttığını göstermiştir. Ayrıca nonfatal koroner olaylarda sigara kullananlarda 2-4 kat daha fazla görülür (2). Pasif olarak sigara dumanına maruz kalmak da riski artırır. Koroner olay geçiren kişilerin sadece üçte biri sigarayı kendiliğinden bırakmaktadır. Sigaranın bırakılması ile kardiyovasküler risk yaşlı hastalarda bile hızla düşmeye başlamaktadır. Sigaranın etki mekanizması hakkında bir çok araştırma yapılmıştır. Bunlardan bir çalışmada sigaranın içerdiği maddelerin neden olduğu oksidan stres artışının temel mekanizmalardan birisi olduğu görülmektedir (4). Ancak sigaranın nasıl bir mekanizmayla bu etkileri oluşturduğu tam olarak açıklanamamıştır. Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalarda sigara içenlerde homosistein düzeylerinin yükseldiği belirtilmektedir (5). Homosisteinin koroner kalp hastalığı için bağımsız bir risk olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bostom ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 10 yıl boyunca 60 yaş üstü kadın ve erkeklerde kardiyovasküler nedeni ölümler araştırılmış ve homosisteinin bu ölümlere neden olan bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır (8). Dalery ve arkadaşları ise 380 erkek, 204 kadın olmak üzere toplam 584 kontrol grubu ve 123 erkek ile 27 kadın olmak üzere toplam 150 KKH tanısı konmuş hastada plazma homosistein düzeyini karşılaştırdıklarında, KKH grubunda anlamlı yükseklik tespit etmişlerdir (10). Clark ve arkadaşları

ise KKH grubu ve kontrol grubu plazma homosistein düzeylerini karşılaştırdıklarında KKH olan grupta homosistein düzeylerinin % 30 oranında arttığını saptamışlardır (11). Artan homosistein düzeylerinin etki mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen normal olan koagülasyon sistemini bozan, koagülasyonu artıran neden olduğu (12), trombomodülin aktivitesini azaltarak protein C aktivitesini azalttığı ve protein C'nin inaktive ettiği koagülasyonun temel faktörlerini harekete geçirdiği (13), endotel hücrelerindeki doku faktörünü aktive ettiği (12), doku plazminojen aktivatörü olan endotel hücre reseptörlerini aktive ettiği (14), serum fibrinojen düzeylerini arttırdığı (15) ve lipitlerin (özellikle LDL olmak üzere) oksidasyonunu sağlayarak onların damar cidarında köpük hücrelerinin oluşturmasını sağladığı gösterilmiştir. Sigara ve homosisteinin etkileri düşünüldüğünde birbiri ile yakın ilişkide olduğu ya da sinerjistik etki gösterdiği düşünülebilir. Bu çalışmada sigara içen 32 ile sigara içmeyen 52 kişide serum homosistein düzeyleri ile diğer parametreler arasındaki ilişkiyi tespit etmek amaçlanmıştır. Hormonal değişimleri elimine etmek için 50 yaş grubundaki erkek bireyler çalışmaya alınmıştır. Ayrıca bu bireylerin vücut kitle indeksleri ile beslenme özelliklerinin de aynı olmasına dikkat edilmiştir. Sigara içen bireylerin plazma homosistein düzeylerinde %50'lere varan bir yükselmenin bulunması dikkat çekmiştir. Bu durumda 50 yaş grubundaki beslenme ve vücut kitle indeksleri benzer olan erkek ve sigara içen bireylerde serum homosistein düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 1, p<0.05). Avrupada aynı anda 19 merkezde yapılan "The European Concerted Action" çalışmasında bizim çalışmamızla uyumlu olarak sigara içen bireylerde homosistein düzeylerinin yüksek olduğu, bunun da KKH için artmış bir risk olduğu saptanmıştır (5). Serum homosistein düzeylerindeki

yükselik ile sigara içme ve yüksek kolesterol düzeyinin oluşturduğu hasarlar KKH'larında riski oldukça yükseltmektedir. Her iki grubun serum lipit bileşenleri ile homosistein düzeyleri arasındaki ilişki bağıntı analizi ile araştırıldığında çok zayıf ilişki ve anlamlı olmayan bağıntı ortaya çıkartılmıştır. Bu sonuca göre serum homosistein düzeylerindeki yükselme diğer lipit bileşenlerinden bağımsız bir risk olarak ortaya çıkmaktadır. Kontrollere göre kıyaslandığında sigara içen bireylerde serum homosistein de dahil diğer lipit bileşenlerinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Sigara içiminin ve bu kadar güçlü ve hızlı düzelebilen bir risk faktörünü ortadan kaldırmak için yoğun çaba gösterilmesi, gerekirse rehabilitasyon

programları ve farmakolojik yaklaşımlardan yararlanılması gerekmektedir. Bu çalışmanın sonucunda KKH'nın gelişiminde homosistein ve sigaranın bağımsız faktör olduklarını, etkilerini eş zamanlı olarak gösterdiklerinde KKH için çok daha fazla risk oluşturduklarını tespit edilmiştir. KKH gelişimine neden olan risk faktörleri ve bu risk faktörlerinden korunmak çok önem arz etmektedir, yapılan çalışmalar göstermektedir ki kalp hastalıklarından korunmanın olası yollarından birisi de homosisteini kontrol altına almaktan geçmektedir. Sigara içen KKH'nın diyetlerine homosisteinin metabolizmasını artıran ve elimine edilmesini sağlayan folat, B<sub>12</sub> ve B<sub>6</sub> vitaminlerinin eklenmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1077-1080.
2. Onat A, Şurdum-Avcı G, Şenocak M. Türkiye'de erişkinlerde kalp hastalığı ve risk faktörleri sıklığı taraması: 4. Kanda kolesterol ve trigliserid düzeyleri. *Türk Kardiyoloji Demeği Arşivi* 1991; 19: 88-96.
3. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, et al. Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. *Circulation* 1992; 86: 1664-1669.
4. Pagan K, Hou J, Goldenberg R, et al. Effect of smoking on total homocysteine and B vitamins in mid-pregnancy. *Clinica Chimica Acta* 2001; 306: 103-109.
5. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homosisteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-1781.
6. Challem J, Doldy V. Homocysteine the secret killer. Keats Publishing, New Canaan USA, 1997.
7. Gruba S, Fink L, Fanceso V. Hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Path* 1996; 106: 709-722.
8. Nygard O, Vollset SE, Refsum H. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA* 1995; 274: 1526-1533.
9. Stampfer MJ, Osborn JA, Jaraki M. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318.
10. Dalery K, Luise S, Selhup J, et al. Homocysteine and Coronary Artery Disease in French Canadian Subject: Relation With Vitamins B12, B6, Prydoxal Phosphate, and folat. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-1111.
11. Clarke R, Daly L, Robinson K. Hyperhomocysteinemia An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155.
12. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, et al. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-1333.
13. Rodgers GM, Cohn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
14. Hajjar KA. Homocysteine induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membran receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873-2876.
15. Von Eckardstein A, Malinow MR, Upson B, et al. Effects of age, lipoproteins and haemostatic parameters on the role of homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 460-464.
16. Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, et al. An enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-316.