

## بررسی سطح هوموسیستین تام، فولات و ویتامین B12 در جمعیت شهری ۶۴-۲۵ ساله ساکن پایگاه تحقیقات جمعیتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر حسین فخرزاده<sup>۱\*</sup>، دکتر سارا قطبی<sup>۲</sup>، دکتر رسول پور ابراهیم<sup>۳</sup>، دکتر معصومه نوری<sup>۳</sup>، دکتر رامین حشمت<sup>۴</sup>، دکتر علیرضا شفايي<sup>۵</sup>، دکتر باقر لاریجانی<sup>۶</sup>

### چکیده

مقدمه: هوموسیستین به عنوان یک عامل خطرزای مستقل بیماری‌های قلب و عروق شناخته شده است. میزان مقادیر هوموسیستین تام پلاسما، یک شاخص حساس در تشخیص موارد کمبود اسید فولیک و ویتامین B12 محسوب می‌گردد. فولات و ویتامین B12 دارای یک اثر محافظتی بر روی بیماری‌های قلبی - عروقی هستند. مطالعه حاضر اولین پژوهشی است که به توصیف مقادیر هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 در ۱۲۱۴ ایرانی سالم می‌پردازد.

روش‌ها: این بررسی طی انجام یک مطالعه مقطعی در قالب "مطالعه هوموسیستین تهران" در چارچوب مطالعه عوامل خطر بیماری‌های قلبی - عروقی، با رعایت دستورالعمل مدون MONICA بر روی ۱۵۷۳ فرد ۶۴-۲۵ ساله ساکن منطقه ۱۷ شهر تهران (پایگاه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران) با روش نمونه‌گیری خوشه‌ای، به منظور تعیین مقادیر هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 پلاسمایی با مراجعه به منازل، تکمیل پرسشنامه، مصاحبه، معاینه و خونگیری از نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های خون در لوله‌های Venoject جمع‌آوری شده، مورد بررسی آزمایشگاهی با رعایت شرایط لازم قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مجموع، ۱۲۱۴ فرد از نظر متغیرهای مذکور مورد مطالعه قرار گرفتند، ۴۲۸ نفر (۳۵/۳٪) مذکر و ۷۸۶ نفر (۶۴/۷٪) مونث بودند. شیوع هیپرهوموسیستینمی در مردان و زنان به ترتیب ۹۶/۴٪ و ۸۳/۳٪ محاسبه گردید که اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0/0001$ ). میانگین غلظت هوموسیستین در هر دو جنس (مردان)  $19/02 \pm 1/46 \mu\text{mol/l}$ ، زنان  $14/05 \pm 1/45 \mu\text{mol/l}$  و  $P < 0/004$ ) با افزایش سن افزایش نشان می‌داد. تعداد ۵۲۷ نفر (۹۸/۹٪) از مردان و ۸۳۳ نفر (۹۸/۰٪) از زنان دچار کمبود اسید فولیک و تعداد ۱۶۱ نفر مرد (۳۰/۱٪) و ۲۳۲ نفر زن (۲۷/۲٪) با کمبود ویتامین B12 مواجه بودند.

نتیجه‌گیری: در بررسی انجام شده، شیوع هیپرهوموسیستینمی تام و کمبود اسید فولیک و ویتامین B12 نسبت به سایر جوامع بطور قابل توجهی بالاست. اجرای مداخلات پیشگیرانه از طریق غنی‌سازی مواد غذایی با اسید فولیک ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: هوموسیستین، اسید فولیک، ویتامین B12، بیماری‌های قلب و عروق، سن، جنس

۱- استادیار بیماری‌های قلب و عروق، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- محقق مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- محقق مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- دستیار اپیدمیولوژی، محقق مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- محقق مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶- استاد بیماری‌های غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، نبش جلال آل احمد، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛

تلفن: ۰۲۶۹۰۲-۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

## مقدمه

هوموسیستین یک اسید آمینه ضروری است و از دمتیلاسیون اسید آمینه ضروری متیونین حاصل می‌شود [۱]. در متابولیسم هوموسیستین، فولات به عنوان کوسوبسترا و ویتامین B12 به عنوان کوفاکتور دخالت دارد [۲]. همچنین در مسیر رمتیلاسیون هوموسیستین به متیونین، حضور این کوآنزیم‌ها ضروری است [۳]. مطالعات جمعیتی مختلف نشان داده‌اند که متابولیسم هوموسیستین علاوه بر آنکه به میزان این ویتامین‌های کوفاکتور بستگی دارد، با نقایص ژنتیکی آنزیم‌های شرکت کننده در متابولیسم هوموسیستین [۴] و نیز نژاد و قومیت افراد ارتباط دارد [۵].

سطوح بالای هوموسیستین تام گردش خون، در ارتباط با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، آترواسکلروز، سکت، نقایص مادرزادی نظیر نقص لوله عصبی، آلزایمر، اختلالات شناختی و مشکلات مختلف نورولوژیک است [۶-۱۵]. به علاوه هوموسیستین باعث ایجاد تغییراتی در DNA سلولها می‌شود که می‌تواند اثرات سرطان‌زا داشته باشد [۱۶ و ۱۷].

هوموسیستین یک شاخص عملی حساس در تشخیص غلظت‌های ناکافی فولات و ویتامین B12 سلولی است [۱۸] و افزایش سطح آن مدت زمان زیادی قبل از وقوع کمبود کلاسیک این ویتامین‌ها قابل ملاحظه است. میزان ناکافی این ویتامین‌ها در بدن، بر تندرستی انسان اثرات قابل توجهی بجای می‌گذارد که ممکن است مستقل از نقش این ویتامین‌ها در متابولیسم هوموسیستین باشد. افزایش غلظت پلاسمایی هوموسیستین نشانگر وضعیت اجتماعی - اقتصادی پایین و تغذیه نامناسب است و ممکن است هیپر هوموسیستینمی به جای این که علت بیماری‌های قلبی - عروقی باشد، زائیده این بیماری‌ها به شمار آید [۱۹].

غلظت‌های بالای هوموسیستین تام ناشتا، در ارتباط با غلظت کم فولات و ویتامین B12 گردش خون و یا مصرف ناکافی این ویتامین‌هاست [۲۰]. به همین سبب آزمایش خون برای تعیین هیپرهوموسیستینمی در ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای

افراد، رویکردی سودمند محسوب می‌شود [۲۱] و در آزمون‌های آزمایشگاهی، سطح پلاسمایی هوموسیستین تام به عنوان یک نشانگر حساس در تشخیص کمبود فولات و کوبالامین پذیرفته شده است [۲۲]. از طرفی، غلظت پلاسمایی فولات به عنوان قوی ترین عامل تعیین کننده غلظت هوموسیستین تام شناخته شده است، هر چند میزان غلظت فولات می‌تواند تحت تأثیر عواملی نظیر مصرف ناکافی، پلی‌مورفیسم ژنتیکی و یا تداخل اثر با داروهای مختلف، کاهش یافته باشد. البته کمبود ویتامین B12 نیز سطوح بافتی و سرمی هوموسیستین را افزایش می‌دهد [۲۳]. فولات و ویتامین B12 دارای یک اثر محافظتی بر روی بیماری‌های قلبی - عروقی هستند که احتمالاً بخشی از این اثر، توسط مکانیسم‌های مستقل از هوموسیستین اعمال می‌شود [۲۴ و ۲۵]. کمبود میزان فولات با ایجاد نقایص لوله عصبی و نیز ابتلا به سرطان مرتبط است [۴].

مطالعات جمعیتی حاکی از آن است که بیشتر افرادی که غلظت‌های ناکافی سرمی فولات و ویتامین B12 دارند، از غلظت‌های بالای هوموسیستین برخوردارند [۱۹]. یک روش عملی برای ارزیابی میزان فولات بدن، تعیین میزان فولات خون به عنوان یک نشانگر زیستی تغذیه‌ای است [۲۶] و سطح فولات خون، نشانگر میزان مصرف فولات می‌باشد. هر چند عوامل مختلفی بر مراحل جذب و دسترسی سلول‌ها<sup>۱</sup> اثر گذاشته، سبب تفاوت سطوح فولات در بافت‌های مختلف می‌شود [۲۷].

پژوهش‌ها نشان داده اند که در اکثر موارد، غلظت‌های بالای هوموسیستین تام با غلظت پایین ویتامین‌ها همراه می‌شود. اما تعیین درصد مواردی که بتوان غلظت‌های بالای هومو-سیستین را به میزان ناکافی ویتامین B منتسب ساخت، نیازمند داشتن یک تعریف استاندارد برای هیپرهومو-سیستینمی تام است که متأسفانه هنوز چنین تعریفی بطور جامع ارائه نشده است و همهٔ مجامع علمی از محدودهٔ مرجع<sup>۲</sup> غلظت هوموسیستین استفاده می‌کنند [۱].

<sup>1</sup> bioavailability

<sup>2</sup> reference ranges

بعضی از داروها مانند مکمل‌های غذایی، داروهای ضد صرع و ضد سرطان در نظر گرفته شده بود. کلیه نمونه‌ها از روز قبل از اندازه‌گیری فشار خون و خون‌گیری، نسبت به رعایت موارد توصیه شده از جمله مدت زمان ناشتا بودن، توجیه شده بودند و فرم رضایتنامه کتبی از تک تک افراد اخذ گردید. پرسشنامه‌ای حاوی پرسش‌هایی در زمینه سوابق بیماری‌های دیابت، فشار خون بالا، مصرف داروها و آگاهی افراد از بیماری‌شان و همچنین عادات زندگی و کشیدن سیگار جهت کلیه نمونه‌ها تکمیل گردید. وزن افراد با حداقل پوشش و بدون کفش با ترازوی استاندارد Soehnle بر روی سطح کاملاً سخت و هموار اندازه‌گیری شد و ترازو در هر خوشه نمونه‌گیری دو بار یعنی در هر ۱۲ بار اندازه‌گیری کالیبره گردید. قد نمونه‌ها توسط قدسنج در وضعیت ایستاده بدون کفش، کلاه و گیره سر به نحوی اندازه‌گیری شد که سر کاملاً عمودی، بدن کاملاً قائم، نگاه به روبرو، پاها جفت و پاشنه پاها چسبیده به قدسنج بود. اندازه دور کمر با قرار دادن متر پارچه‌ای روی فوقانی‌ترین قسمت ستیغ ایلیاک مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه خون پس از ۱۲ ساعت ناشتا بودن، توسط لوله‌های Venoject گرفته شد و پس از جداسازی، جهت اندازه‌گیری بیوشیمیایی هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 به آزمایشگاه مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران منتقل گردید. از مجموع ۱۵۷۳ نفری که تکمیل پرسشنامه و خون‌گیری از آنان انجام گرفته بود، تعداد ۳۵۹ نفر از مطالعه تعیین سطوح هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 خارج شدند که علت آن نداشتن معیارهای ورود به مطالعه و یا مناسب نبودن نمونه‌های خون بود. هوموسیستین پلاسما را به روش HPLC<sup>1</sup> بر طبق شیوه Gilfix و همکاران [۳۰] اندازه گرفتیم. اندازه‌گیری اسید فولیک و ویتامین B12 با روش رادیوایمونواسی صورت پذیرفت.

هر چند توزیع غلظت‌های پلاسمایی هوموسیستین در برخی از جمعیت‌ها گزارش گردیده، اما اطلاعات ناچیزی از توصیف غلظت‌های هوموسیستین در جمعیت ایرانیان سالم در دست است [۲۸]. در مطالعه حاضر، غلظت‌های هوموسیستین تام، اسیدفولیک و ویتامین B12 پلاسما ۱۲۱۴ ایرانی سالم در قالب "مطالعه هوموسیستین تهران" مورد اندازه‌گیری قرار گرفته است. این پژوهش در نوع خود اولین مطالعه‌ای است که به توصیف مقادیر هوموسیستین تام، اسیدفولیک و ویتامین B12 در چنین حجم نمونه‌ای از ایرانیان سالم پرداخته است.

## روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه مقطعی است که بر روی ۱۵۷۳ فرد (۶۱۵ نفر مرد و ۹۵۸ نفر زن) ۶۴-۲۵ ساله در ۱۱۵ خوشه انتخاب شده از منطقه ۱۷ شهر تهران انجام شده است. منطقه ۱۷ از نظر ویژگی‌های ترکیب جمعیتی و وضعیت دموگرافیک، بعنوان منطقه هدف مطالعات جمعیتی دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شده است. این پژوهش با الگوسازی از پروژه مونیکی سازمان بهداشت جهانی در این منطقه پیاده شد. طراحی روش نمونه‌گیری این مطالعه شبیه به سایر مطالعاتی است که در چارچوب پروژه مونیکی انجام گرفته‌اند [۲۹]. انتخاب خوشه‌ها طبق سرشماری نفوس و مسکن سال ۱۳۷۵ و با مشاوره مرکز آمار ایران انجام گردیده است. عملیات میدانی جمع‌آوری داده‌ها با همکاری ۱۰ نفر از کارشناسان علوم اجتماعی گرایش مردم‌شناسی و ۱۰ نفر از پرستاران آموزش دیده، تحت نظارت کارشناسان مرکز آمار ایران به مدت ۶ ماه در منطقه ۱۷ شهر تهران انجام شده است. کلیه افراد سالم ۲۵ تا ۶۴ ساله در این پژوهش وارد شدند. معیار خروج از مطالعه، ابتلا به بیماری‌های سیستمیک مزمن نظیر بیماری‌های قلب و عروق، نارسایی کلیه و کبد، بیماری‌های غدد درون‌ریز و تیروئید، بیماری‌های پرولیفراتیو، بعضی از حالت‌های فیزیولوژیک نظیر حاملگی و مصرف

<sup>1</sup> high-performance liquid chromatography

جدول ۱ - مقادیر هوموسیستین مورد استفاده در مطالعه

هوموسیستین طبیعی	>	۱۰ $\mu\text{mol/l}$
هیپرهوموسیستینمی خفیف		۱۰ - ۳۰ $\mu\text{mol/l}$
هیپرهوموسیستینمی متوسط		۳۰ - ۱۰۰ $\mu\text{mol/l}$
هیپرهوموسیستینمی شدید	<	۱۰۰ $\mu\text{mol/l}$

سنی ۲۵ تا ۶۴ سال انتخاب شده بودند. تعداد ۴۱۳ نفر از مردان (۹۶/۴٪) و تعداد ۶۵۵ نفر از زنان (۸۳/۳٪) از هیپرهوموسیستینمی رنج می بردند که بین دوجنس اختلاف معنی داری را نشان می دهد ( $p < 0/0001$ ). به علاوه، تعداد ۵۲۷ نفر (۹۸/۹٪) از مردان و ۸۳۳ نفر (۹۸/۰٪) از زنان دچار کمبود اسید فولیک بودند که البته اختلاف بین دوجنس معنی دار نبود ( $p = 0/281$ ). همچنین تعداد ۱۶۱ نفر از مردان (۳۰/۱٪) و ۲۳۲ نفر از زنان (۲۷/۲٪) با کمبود ویتامین B12 مواجه بودند که اختلاف معنی دار نبود ( $p = 0/846$ ).

مطابق جدول ۲، در مردان گروه سنی ۴۵ - ۶۴ و ۵۵ - ۶۴ سال، به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۹٪ افراد دچار هیپرهوموسیستینمی هستند. این ارقام در زنان همین دو گروه سنی به ترتیب ۸۳/۱٪ و ۹۰/۳٪ است.

از ۱۲۱۴ نفر، ۱۰۰۲ نفر (۸۲/۵٪) دارای هیپرهوموسیستینمی خفیف، ۲۶ نفر (۵/۴٪) هیپرهوموسیستینمی متوسط و ۱۴۶ نفر (۱۲٪) هوموسیستین طبیعی داشتند. همچنین ۹۳/۱٪ و ۳۵/۸٪ از افراد به ترتیب از کمبود اسید فولیک و ویتامین B12 رنج می بردند. در حالی که تنها ۱/۷٪ و ۶۹/۲٪ از افراد مقادیر طبیعی اسید فولیک و ویتامین B12 را دارا بودند. برای بررسی ارتباط هوموسیستین تام با مقادیر مختلف اسید فولیک و ویتامین B12، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد که به ترتیب اعداد ۰/۲۷ - و ۰/۱۹ - به دست آمد و با توجه به  $p < 0/0001$ ، نتیجه می گیریم که با افزایش غلظت اسید فولیک، غلظت هوموسیستین کاهش می یابد و به طور مشابه، با افزایش غلظت ویتامین B12 نیز، غلظت هوموسیستین کاهش نشان می دهد.

با توجه به این که بر پذیرش یک طبقه بندی خاص برای مقادیر هوموسیستین در بین مجامع علمی جهان اتفاق نظری وجود ندارد، در مطالعه ما هوموسیستین با مقادیر بیش از  $10 \mu\text{mol/l}$ ، هیپرهوموسیستینمی در نظر گرفته شد [۳۱]. جدول یک، طبقه بندی مورد استفاده در مطالعه ما را نشان می دهد.

همچنین مقادیر پلاسمایی اسید فولیک کمتر از  $11 \text{nmol/l}$  را به عنوان کمبود اسید فولیک و مقادیر پلاسمایی کمتر از  $185 \text{pmol/l}$  ویتامین B12 را کمبود ویتامین B12 محسوب نمودیم [۱].

اطلاعات تکمیل شده در پرسشنامه ها پس از پایان هر جلسه توسط بازبین مرکز آمار ایران مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات ناقص جهت تکمیل مجدد به پرسشگران عودت داده شد. کلیه مراحل جمع آوری اطلاعات با نظارت کارشناسان مرکز آمار ایران انجام پذیرفت. داده ها پس از ورود در بانک اطلاعات رایانه ای با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقادیر هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 به دلیل عدم برخورداری از توزیع طبیعی و وجود چولگی<sup>۱</sup> شدید با تغییر متغیر در پایه لگاریتم طبیعی به صورت نرمال در آمده و مقایسه های مربوطه با استفاده از آزمون های پارامتری انجام شده و مقادیر میانگین هندسی و فاصله اطمینان ۹۵٪ آنها ارائه گردید.

## نتایج

از مجموع ۱۲۱۴ فرد مورد مطالعه، ۴۲۸ نفر (۳۵/۳٪) مذکر و ۷۸۶ نفر (۶۴/۷٪) مونث بودند. کلیه این افراد در محدوده

<sup>1</sup>skewness

دو جنس اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/0001$ ) و در مورد ویتامین B12 اگر چه بین سطوح پلاسمایی این ویتامین در دو جنس اختلاف دیده می‌شود، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ( $p=0/063$ ). میانگین هندسی غلظت هوموسیستتین، اسید فولیک و ویتامین B12 در کل افراد به ترتیب  $15/64 \mu\text{mol/l}$  ( $SD=1/50$ )،  $3/94 \text{nmol/l}$  ( $SD=1/67$ ) و  $262/88 \text{pmol/l}$  ( $SD=1/82$ ) بوده است. جدول ۴ بر اساس چارک‌های مقادیر هوموسیستتین، اسید فولیک و ویتامین B12 ترسیم شده است. با توجه به این جدول، ملاحظه می‌شود که درصد مردان هر گروه سنی، با افزایش چارک هوموسیستتین، بالا می‌رود. اما در زنان این رویه معکوس است. همچنین با افزایش سن، نسبت مردان و زنان در چارک اول مربوط به هوموسیستتین و اسید فولیک در مقایسه با چارک چهارم افزایش نشان می‌دهد. در مردان، درصد چارک چهارم هوموسیستتین نسبت به زنان به‌طور قابل توجهی بالاتر است. با ملاحظه توزیع افراد در چارک‌های مربوط به هوموسیستتین، مشاهده می‌گردد که در گروه سنی ۵۵ - ۶۵ سال مردان و ۲۵-۳۴ سال زنان، بالاترین میزان توزیع دیده می‌شود.

برطبق جدول ۳، میانگین هندسی غلظت هوموسیستتین در گروه سنی ۵۵-۶۴ سال در هر دو جنس بیش از سایر گروه‌ها و در مردان بالاتر از زنان بود. به علاوه، غلظت اسید فولیک در مردان گروه سنی ۴۵-۵۴ سال و در زنان گروه‌های سنی ۲۵-۳۴ و ۴۵-۵۴ سال کمترین مقدار را داشت. در مورد ویتامین B12، کمترین غلظت در مردان گروه سنی ۴۵-۵۴ سال و در زنان گروه سنی ۳۵-۴۴ سال مشاهده گردید. به‌طور کلی میانگین هندسی غلظت هوموسیستتین در هر دو جنس با افزایش سن افزایش نشان می‌داد و در تمامی گروه‌های سنی، میانگین هندسی غلظت هوموسیستتین در افراد مذکر بالاتر از افراد مونث بود. اما میانگین هندسی غلظت فولات در تمام گروه‌ها در زنان بیش از مردان مشاهده گردید. میانگین هندسی غلظت ویتامین B12 به استثنای گروه سنی ۳۵-۴۴ سال، در کلیه گروه‌های سنی زنان بیشتر از مردان بود. میانگین هندسی مقادیر هوموسیستتین در مردان  $19/02 \mu\text{mol/l}$  ( $SD = 1/46$ ) و در زنان  $14/05 \mu\text{mol/l}$  ( $SD=1/45$ ) بوده که مقایسه آنها اختلاف معنی‌داری را بین دو جنس نشان می‌دهد ( $p=0/004$ ). میانگین هندسی اسیدفولیک در مردان  $3/66 \text{nmol/l}$  ( $SD = 1/65$ ) و در زنان  $4/1 \text{nmol/l}$  ( $SD = 1/67$ ) و در مورد ویتامین B12 به ترتیب  $251/39 \text{pmol/l}$  ( $SD = 1/94$ ) و  $269/27 \text{pmol/l}$  ( $SD=1/75$ ) اندازه‌گیری شد. مقایسه غلظت اسید فولیک بین

جدول ۲ - شیوع غلظت‌های بالای هوموسیستتین و پایین اسید فولیک و ویتامین B12 به تفکیک جنس و گروه‌های سنی

جنسیت	گروه‌های سنی	تعداد نمونه	هوموسیستتین (%)	اسیدفولیک (%)	ویتامین B12 (%)
مردان	۲۵ - ۳۴	۱۶۵	۹۴/۵	۹۵/۲	۲۳/۶
	۳۵ - ۴۴	۱۰۱	۹۵/۰	۸۹/۱	۲۳/۸
	۴۵ - ۵۴	۶۷	۱۰۰/۰	۹۱/۰	۲۵/۴
	۵۵ - ۶۴	۹۵	۹۹/۰	۹۳/۷	۲۹/۵
زنان	۲۵ - ۳۴	۳۰۲	۷۹/۴	۹۳/۰	۲۳/۵
	۳۵ - ۴۴	۱۸۵	۸۴/۹	۹۴/۱	۲۷/۶
	۴۵ - ۵۴	۱۶۶	۸۳/۱	۹۲/۸	۲۹/۵
	۵۵ - ۶۴	۱۳۳	۹۰/۳	۹۳/۲	۲۵/۶

جدول ۳ - میانگین غلظت هوموسیستتین، فولات و ویتامین B12 به تفکیک جنس و گروه های سنی.

مشخصات نمونه	گروه های سنی افراد مذکر				گروه های سنی افراد مونث				جمع
	۲۵ - ۳۴	۳۵ - ۴۴	۴۵ - ۵۴	۵۵ - ۶۴	۲۵ - ۳۴	۳۵ - ۴۴	۴۵ - ۵۴	۵۵ - ۶۴	
تعداد افراد	۱۶۵	۱۰۱	۶۷	۹۵	۳۰۲	۱۸۵	۱۶۶	۱۳۳	۱۲۱۴
هوموسیستتین $\mu\text{mol/l}$ *	۱۸/۰	۱۸/۵	۱۹/۵	۲۱/۳	۱۳/۳	۱۴/۱	۱۴/۲	۱۵/۶	۱۵/۶۴
**	۱۶/۹-۱۹/۱	۱۷/۲-۱۹/۹	۱۷/۹-۲۱/۱	۱۹/۹-۲۲/۸	۱۲/۸-۱۳/۹	۱۳/۳-۱۴/۹	۱۳/۴-۱۵	۱۴/۷-۱۶/۷	۱۵/۳-۱۶
فولات $\text{nmol/l}$ *	۳/۶	۳/۷	۳/۳	۳/۹	۴/۰	۴/۱	۴/۰	۴/۳	۳/۹۴
**	۳/۴-۳/۹	۳/۳-۴/۲	۳/۹-۳/۷	۳/۶-۴/۳	۸/۳-۴/۳	۳/۸-۴/۵	۳/۷-۴/۳	۴/۰-۴/۷	۳/۸-۴/۱
ویتامین B12 $\text{pmol/l}$ *	۲۵۵/۸	۲۶۲/۶	۲۳۵/۱	۲۴۴/۱	۲۷۶/۱	۲۵۶/۵	۲۶۴/۸	۲۷۸/۰	۲۶۲/۸۸
**	۲۳۲-۲۸۱	۲۲۴-۳۰۸	۱۹۴-۲۸۴	۲۱۶-۲۷۶	۲۵۹-۲۹۴	۲۳۶-۲۷۸	۲۴۱-۲۹۰	۲۵۱-۳۰۷	۲۵۴-۲۷۲

\* میانگین هندسی (Geometric Mean)

\*\* فاصله اطمینان ۹۵٪ (Confidence Interval)

باتوجه به وضعیت چارک های مربوط به اسید فولیک، بیشترین توزیع در گروه سنی ۴۵-۵۴ سال مردان و ۵۵-۶۵ سال زنان دیده می شود.

### بحث

پژوهش های مختلف، سطوح بالای هوموسیستتین تام پلاسما را به عنوان یک عامل خطر مستقل بیماری های قلب و عروق معرفی کرده اند [۶، ۱۰-۱۲، ۳۲]. در مطالعات متعدد غلظت هوموسیستتین در مردان بیشتر از زنان ارزیابی شده و با افزایش سن، افزایش یافته است [۳۳، ۳۴]. همچنین سطح فولات و ویتامین B12 به عنوان دو عامل مهم تعیین کننده میزان هوموسیستتین پلاسما معرفی شده اند [۳۵]. پژوهش ها نشان داده اند، در افرادی که سطح اسید فولیک و ویتامین B12 پایین است، غلظت هوموسیستتین تام بالاتر است و درمان با این ویتامین ها سبب کاهش سطح هوموسیستتین می شود [۱].

در مطالعات اپیدمیولوژیک کشورهای مختلف، تعیین میزان غلظت هوموسیستتین پلاسما همواره مورد توجه بوده است. هرچند که تعریف هیپروهوموسیستتینمی هنوز به طور استاندارد ارایه نگردیده و البته علت آن این است که هنوز هم در تعیین میزان طبیعی آن تفاوت ها و اختلافاتی بین مراکز علمی

مختلف وجود دارد [۸]. مطالعه NHANES III بر روی ۸۰۸۶ فرد بالای ۱۲ سال نشان داده است که در حدود دوسوم افراد مورد مطالعه، غلظت هوموسیستتین تام بالا و کاهش سطح اسید فولیک و ویتامین B12 داشته اند. به عبارت دیگر نظیر سایر مطالعات [۳۳، ۳۴]، غلظت هوموسیستتین سرم با غلظت اسید فولیک و ویتامین B12 رابطه معکوس و با سن و جنسیت مذکر رابطه مستقیم داشته است [۳۳، ۳۶]. همچنین میانگین غلظت هوموسیستتین پلاسما  $9/6 \mu\text{mol/l}$  گزارش شده است [۳۷]. در مطالعه Hordaland در کشور نروژ، بر روی ۱۱۹۴۱ فرد ۴۰-۶۷ سال بدون سابقه بیماری های عروقی، دیابت و HTN در گروه سنی ۴۰-۴۲ سال غلظت هوموسیستتین تام در مردان  $10/8 \mu\text{mol/l}$  و در زنان  $9/1 \mu\text{mol/l}$  اندازه گیری شده است. در گروه سنی ۶۵-۶۷ سال، این ارقام به ترتیب  $12/3 \mu\text{mol/l}$  و  $11/0 \mu\text{mol/l}$  گزارش گردیده و میانگین هندسی هوموسیستتین به طور کلی  $5/1-16/5 \mu\text{mol/l}$  در زنان و  $6/2-18/7 \mu\text{mol/l}$  در مردان بوده است [۲۲، ۱۰].

در پژوهش انجام شده در فلسطین اشغالی بر روی ۱۶۵۶ فرد بالای ۶۹ سال با معیاری مشابه مطالعه ما، شیوع کمبود اسید فولیک در کل جامعه  $12/6\%$  گزارش شده است [۳۸]. در بررسی مشابهی در کشور کره بر روی افراد ۲۳-۷۲ سال،

جدول ۴- توزیع مقادیر هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 به تفکیک جنس و گروه های سنی

مستطیر	مستطیر	چارکها <sup>۱</sup> (%)				گروه های سنی
		۴	۳	۲	۱	
هوموسیستین	مذکر	۳۷/۲	۲۵/۶	۱۹/۵	۱۷/۷	۲۵ - ۳۴
		۴۳/۶	۲۳/۸	۲۰/۸	۱۱/۹	۳۵ - ۴۴
		۳۸/۸	۳۲/۸	۲۶/۹	۱/۵	۴۵ - ۵۴
		۵۶/۸	۲۸/۴	۱۱/۶	۳/۲	۵۵ - ۶۴
هوموسیستین	مؤنث	۱۲/۰	۱۸/۳	۳۲/۹	۳۶/۹	۲۵ - ۳۴
		۱۴/۶	۲۵/۹	۲۶/۵	۳۳/۰	۳۵ - ۴۴
		۱۶/۱	۲۴/۸	۲۶/۱	۳۲/۹	۴۵ - ۵۴
		۲۲/۶	۳۱/۶	۲۶/۳	۱۹/۵	۵۵ - ۶۴
اسید فولیک	مذکر	۱۸/۷	۲۵/۲	۲۷/۱	۲۹/۰	۲۵ - ۳۴
		۲۴/۴	۲۴/۴	۲۳/۳	۲۷/۸	۳۵ - ۴۴
		۱۱/۷	۲۳/۳	۲۵/۰	۴۰/۰	۴۵ - ۵۴
		۲۷/۰	۲۴/۷	۲۰/۲	۲۸/۱	۵۵ - ۶۴
	مؤنث	۲۷/۳	۲۳/۸	۲۶/۶	۲۲/۳	۲۵ - ۳۴
		۳۰/۴	۲۱/۶	۲۷/۵	۲۰/۵	۳۵ - ۴۴
		۳۰/۳	۲۳/۹	۲۲/۶	۲۳/۲	۴۵ - ۵۴
		۳۳/۹	۲۶/۴	۲۱/۵	۱۸/۲	۵۵ - ۶۴
ویتامین B12	مذکر	۲۱/۴	۳۲/۱	۲۳/۳	۲۳/۳	۲۵ - ۳۴
		۲۴/۲	۳۳/۰	۱۷/۶	۲۵/۳	۳۵ - ۴۴
		۲۱/۰	۲۵/۸	۲۷/۴	۲۵/۸	۴۵ - ۵۴
		۲۲/۵	۱۸/۰	۲۹/۲	۳۰/۳	۵۵ - ۶۴
	مؤنث	۲۶/۸	۲۸/۹	۲۱/۶	۲۲/۶	۲۵ - ۳۴
		۲۶/۰	۱۵/۸	۳۳/۳	۲۴/۹	۳۵ - ۴۴
		۲۵/۸	۲۵/۲	۲۰/۶	۲۸/۴	۴۵ - ۵۴
		۲۸/۶	۲۵/۴	۲۳/۰	۲۳/۰	۵۵ - ۶۴

<sup>۱</sup> quartiles

اعلام شده است که در ۴۰٪ نمونه‌ها غلظت هوموسیستتین تام بالاتر از  $10 \mu\text{mol/l}$  بوده است. در این مطالعه نیز بین غلظت هوموسیستتین تام پلاسما و اسید فولیک و ویتامین B12 رابطه منفی مشاهده شده است [۴۲]. در مطالعه Framingham با بررسی ۱۹۶۰ فرد ۸۲-۲۸ ساله، میانگین هندسی هوموسیستتین تام به طور معنی داری در مردان (۱۱٪) بالاتر از زنان و در افراد بالای ۶۵ سال (۲۳٪) بالاتر از ۴۵ سال به بالا بوده است. به علاوه، رابطه هوموسیستتین تام با اسید فولیک و ویتامین B12 به طور معنی داری مثبت بوده است [۴۳]. نتایج پژوهشی در کانادا بر روی ۵۸۴ فرد ۲۳-۵۹ ساله نشان داده که غلظت هوموسیستتین تام پلاسما در مردان ( $9.7 \pm 4.9 \mu\text{mol/l}$ ) به طور قابل توجهی بالاتر از زنان ( $7.6 \pm 4.1 \mu\text{mol/l}$ ) است به طوری که در زنان ۲۱٪ پایین‌تر از مردان بوده است. همچنین اختلاف غلظت اسید فولیک پلاسمای مردان ( $8.6 \pm 5.2 \text{ nml/l}$ ) با زنان ( $9.1 \pm 6.6 \text{ nml/l}$ ) معنی دار بوده است [۴۴].

در ایران مطالعات محدودی در توصیف مقادیر هوموسیستتین رایج شده و البته اندازه‌گیری همزمان مقادیر اسید فولیک و ویتامین B12 در هیچ مطالعه‌ای انجام نشده است. تنها یک مطالعه در شیراز بر روی ۴۰۲ فرد بالای ۱۵ سال، میانگین هندسی هوموسیستتین را در مردان  $7.3 \text{ mmol/L}$  و در زنان  $6.3 \text{ mmol/l}$  گزارش کرده که اختلاف بین مرد و زن معنی دار بوده و با افزایش سن، افزایش یافته است [۲۸].

مقایسه نتایج این پژوهش‌ها با مطالعه منطقه ۱۷ شهر تهران نشان می‌دهد شیوع اختلالات هوموسیستتین، اسید فولیک و ویتامین B12 در این منطقه بالاست. شیوع هیپرهومو-سیستینمی در همه گروه‌های سنی و در هر دو جنس با افزایش سن افزایش می‌یابد. شیوع به دست آمده در مردان مانند سایر مطالعات ذکر شده بالاتر از زنان است. میانگین غلظت هوموسیستتین تام با افزایش سن در هر دو جنس افزایش می‌یابد. البته سایر مطالعات نیز چنین یافته‌هایی را گزارش کرده‌اند: افزایش سن و جنسیت مذکر، در ارتباط با غلظت‌های بالاتر هوموسیستتینمی تام هستند. به ازای هر ۲۰ سال افزایش سن، سطح هوموسیستتین به طور متوسط

شیوع کمبود اسید فولیک در مردان و زنان با معیار اسید فولیک کمتر از  $3 \text{ ng/ml}$  به ترتیب ۶/۱٪ و ۲/۱٪ اعلام شده است [۲۸].

در بررسی انجام شده در عربستان سعودی بر روی ۱۴۲۶ فرد ۶۹-۲۰ سال، میانگین هندسی هوموسیستتین در مردان  $9.0 \mu\text{mol/l}$  و در زنان  $8.08 \mu\text{mol/l}$  اندازه‌گیری شده است که در مردان به طور معنی داری بالاتر بوده است. در هر دو جنس، غلظت اسید فولیک و ویتامین B12 رابطه معکوس قابل ملاحظه‌ای با غلظت هوموسیستتین داشته‌اند (۳۹).

پژوهشی در کاستاریکا با حجم نمونه ۴۶۲ نفر، غلظت هوموسیستتین را در مردان مناطق شهری  $5.5 \mu\text{mol/l}$  و در زنان  $7.3 \mu\text{mol/l}$  و در مناطق روستایی به ترتیب  $12.0 \mu\text{mol/l}$  و  $8.9 \mu\text{mol/l}$  گزارش کرده است که به طور معنی داری در مناطق روستایی بالاتر بوده است. ۳۱٪ از زنان شهرنشین و ۴۰٪ از زنان روستانشین غلظت فولات کمتر از  $6.8 \text{ nmol/l}$  داشته‌اند و به طور کلی ساکنین روستاها به ویژه زنان در مقایسه با شهرنشینان، غلظت هوموسیستتین تام بالاتر و مصرف کمتر ویتامین‌های B را داشته‌اند (۴۰).

در مطالعه‌ای در تایلند بر روی ۳۳۴۵ فرد ۶۵-۲۰ ساله، میانگین غلظت هوموسیستتین پلاسما در مردان  $11.495 \mu\text{mol/l}$  و در زنان  $8.547 \mu\text{mol/l}$  اندازه‌گیری شده است. به علاوه شیوع هیپر هوموسیستینمی در میان مردان بیش از زنان بوده است [۴۱].

نتایج تحقیقی در آلمان بر روی ۲۶۰ بزرگسال ۵۰-۲۶ ساله نشان داده سطح هوموسیستتین پلاسمایی مردان ( $11.4 \pm 4.5 \mu\text{mol/l}$ ) به طور معنی داری بالاتر از زنان ( $9.2 \pm 3.3 \mu\text{mol/l}$ ) بوده است. همچنین غلظت اسید فولیک پلاسمای مردان  $6.3 \pm 2.6 \text{ ng/l}$  و زنان  $7.3 \pm 3.4 \text{ ng/l}$  اندازه‌گیری شده است. غلظت ویتامین B12 در پلاسمای مردان و زنان به ترتیب  $447.4 \pm 133.8 \text{ pg/l}$  و  $496.7 \pm 143.5 \text{ pg/l}$  بوده، ارتباط هوموسیستتین پلاسما با غلظت اسید فولیک و ویتامین B12 معکوس بوده است [۲۱]. در مطالعه New South Wales با حجم نمونه ۳۸۷ نفر، میانگین غلظت هوموسیستتین تام  $10.3 \pm 5.2 \mu\text{mol/l}$  بوده و



یک علت ژنتیکی برای ایجاد هیپروموسیستینمی، پلی‌مورفیسم C677T در ژن MTHFR (متیلن‌ترا هیدروفولات ردوکتاز) می‌باشد که در موارد هوموزیگوت آن، غلظت هوموسیستین بالا می‌باشد [۴۴،۲۸]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که از علل نسبتاً شایع هیپروموسیستینمی، موتاسیون هوموزیگوت C677T همراه با وضعیت مختل اسید فولیک بدن است [۵۹،۵۸]. هیپروموسیستینمی به ویژه در افراد مسن‌تر ممکن است در نتیجه کاهش عملکرد آنزیم CBS (Cystathionine  $\beta$ -Synthase) که در ترانس سولفوراسیون هوموسیستین به Cystathionine دخالت دارد، باشد [۶۰].

پخت طولانی مدت سبزیجات احتمالاً تا ۹۰٪ محتوای فولات غذاها را تخریب می‌کند [۵۵-۵۷]. از طرف دیگر گزارش شده که در میان مهاجرین شهرنشین که از نظر اجتماعی - اقتصادی در مضیقه‌اند، دریافت اسید فولیک و ویتامین B12 که بر سطح هوموسیستین اثر معکوس دارند، کم بوده و در بین این افراد خطر بیماری‌های عروقی بالاتر است [۶۱]. با توجه به تأثیر عوامل ژنتیکی و نژاد بر سطح هوموسیستین، انجام یک پژوهش در باره ژن‌های MTHFR و CBS ضروری به نظر می‌رسد. به‌علاوه انجام تحقیقات بیشتر برای بررسی غلظت هوموسیستین، اسید فولیک و ویتامین B12 پلاسما به‌ویژه در سایر شهرها و روستاها لازم است. همچنین باید با انجام این پژوهش‌ها مبادرت به تعیین محدوده مرجع براساس سن و جنس برای افراد ایرانی نمود. زیرا به‌نظر می‌رسد مقادیر ارایه شده از سوی سایر کشورها برای مملکت ما کارایی نداشته باشد. به دلیل فقر اطلاعات و پژوهش‌های لازم در بررسی همه این زمینه‌ها در کشور ما، ممکن است مطالعات آینده بتوانند علل ناشناخته‌ای را در ایجاد هیپروموسیستینمی آشکار سازند.

از آنجا که غلظت اسید فولیک به عنوان عامل پیشگویی‌کننده غلظت هوموسیستین شناخته شده است، ارزیابی اثرات غذاهای سرشار از فولات بر روی غلظت هوموسیستین تام پلاسما سودمند به‌نظر می‌رسد [۶۲]. به‌علاوه برای پیشگیری از وقوع بیماری‌های مرتبط با هیپروموسیستینمی و کمبود

۱/۳umol/l بالا می‌رود [۴۵]. دلایل غلظت‌های بالاتر هوموسیستین در سن بالا به درستی مشخص نیست. هر چند احتمالاً با افزایش سن، متابولیسم کلیوی هوموسیستین به دلیل کاهش عملکرد کلیه دستخوش تغییر می‌شود [۴۷،۴۶] به علاوه به دلیل سوء جذب ویتامین B12 در روده افراد مسن، غلظت هوموسیستین افزایش می‌یابد [۴۸]. به‌طور کلی در مردان غلظت هوموسیستین به‌طور متوسط ۱umol/l بالاتر از زنان است [۴۵، ۴۹]. احتمالاً علت اختلاف سطح هوموسیستین در دو جنس مذکر و مؤنث به اختلاف وضعیت ویتامین‌های بدن [۳۳]، بالاتر بودن توده عضلانی [۵۰] و تولید بیشتر کراتین فسفات [۵۱] در مردان و اثرات کاهنده استروژن در زنان [۵۳،۵۲] مربوط می‌شود. بخشی از ارتباط بین سن و جنسیت مؤنث باید به وسیله فرآیند یائسگی شرح داده شود زیرا غلظت هوموسیستین تام همانطور که ذکر شد در خانم‌های یائسه بالاتر از پیش یائسه است [۴۹، ۵۴].

در مطالعه ما اختلاف قابل توجهی در میانگین غلظت هوموسیستین تام سرم با سایر مطالعات انجام شده وجود دارد. با توجه به این بررسی که نشان دهنده ۸۲/۵٪ شیوع ابتلا به هیپروموسیستینمی خفیف ( $10 < \text{Hcy} < 30 \mu\text{mol/l}$ ) می‌باشد، به‌نظر می‌رسد که نحوه توزیع هوموسیستین و تمرکز آن در این محدوده و نیز فراوانی ناچیز مقادیر طبیعی آن در جمعیت، موجب افزایش میانگین هوموسیستین شده است و شاید بتوان گفت که علیرغم بالا بودن میانگین، شدت هیپروموسیستینمی در این جمعیت خیلی بالا نیست. مقایسه مقادیر اسید فولیک و ویتامین B12 در سایر پژوهش‌ها با نتایج حاصل از مطالعه ما، نشان دهنده کاهش قابل توجه این مقادیر در منطقه ۱۷ است. در توجیه علت این تفاوت‌ها می‌توان به عوامل جغرافیایی، ژنتیک، قومیت و نژاد، عادات تغذیه‌ای متفاوت، دریافت ناکافی ویتامین B در رژیم غذایی، روش‌های پخت ناصحیح سبزیجات و همچنین عدم غنی‌سازی فرآورده‌های غلات در کشور ما اشاره نمود [۲۱، ۲۸، ۳۷، ۵۵-۵۷].

غنی‌سازی، کاهش نقایص لولهٔ عصبی و در درجات بعدی کاهش وقوع بیماری‌های قلبی و ابتلا به سرطان است که هر دو با وضعیت فولات بدن در ارتباطند [۶۷-۶۵]. موفقیت‌های حاصل از غنی‌سازی، شامل کاهش موارد کمبود فولات و کاهش همزمان هوموسیستتین تام پلاسما، به‌سرعت در جامعه نمود خواهند یافت [۶۸].

اسید فولیک و ویتامین B12 باید به اندازه گیری سطح هوموسیستتین و فولات در خون افراد اقدام شود و به‌ویژه در کسانی که غلظت هوموسیستتین بالاتر از  $14 \mu\text{mol/l}$  دارند، مکمل‌های با دوز  $400-800 \mu\text{g}$  در روز تجویز شود. تنها راه برای تعیین میزان تاثیر درمان با فولات، آزمایش دوبارهٔ سطح هوموسیستتین پلاسما است [۶۳].

اقدام ضروری بعدی، غنی‌سازی فراورده‌های غلات با اسید فولیک، همانند سایر کشورهاست [۶۴]. انگیزهٔ اصلی از انجام

### مآخذ

1. Sipponen P, Laxen F, Houtari K, et al. Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population : association with atrophic gastritis and helicobacter pylori infection . Scand J Gastroenterol 2003;38 (12 ):1209 -16 .
2. Gerhard GT, Malinow MR, DeLoughery TG, et al. Higher total homocysteine concentrations and lower folate concentrations in premenopausal black women than in premenopausal white women . Am J Clin Nutr 1999 ; 70 : 252 – 60 .
3. Graham IM , OCallaghan P. The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease . Curr Opin Lipidol 2000 ; 11 : 577 – 587 .
4. 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. 1991 ; 55 :131 – 8 .
5. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 concentrations and risk for early – onset coronary artery disease . Am J Clin Nutr 1994 ; 59 : 940 – 8 .
6. Refsum H, Ueland P, Nygrad O, and Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Ann Rev Med 1998; 49: 31- 62.
7. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease : systemic review of published epidemiologic studies . J Cardiovasc Risk . 1998 ; 229 – 232 .
8. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hanjey G, et al. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. Ann Intern med 1999; 131: 363-75
9. Clarke R , Collins R. Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk ? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease . J Cardiovasc Risk 1998 ; 5 : 249 – 55 .
10. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, et al . Homocysteine and cardiovascular disease : a systemic review of the evidence with special emphasis on case- control studies and nested case- control studies . Int J Epidemiol 2002 ; 31 : 59 –7.
11. 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: 1775-81.
12. Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, et al . the relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene . J Nutr 2002 ; 132 : 283 – 8 .
13. Daly LE , Kirke PN , Molly A , Weir DG, et al . Folate levels and neural tube defects , implications for prevention . JAMA 1995 ; 274 : 1698 – 702 .
14. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, et al . Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. N Engl J Med. 1988; 318 : 1720 – 8 .
15. Nygrad O, Refsum H, Ueland PM, et al . Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution : the Hordaland Study . Am J Clin Nutr. 1998 ; 67 : 263 – 70 .
16. Houlston RS, Tomlinson IPM . Polymorphism and Colorectal Tumour Risk. Gastroenterology 2001 ; 121 : 282 – 301 .
17. Lucock M, Daskalakis I. New perspectives on folate status: a differential role for the vitamin in cardiovascular disease , birth defects and other conditions . Br J Biomed Sci 2000 ; 57 : 254 – 260 .

18. Lucock M, Daskalakis I, Schorad CJ, et al. Folate – homocysteine interrelations : potential new markers of folate status. *Mol genet Metab* 1999 ; 67 : 23 – 35 .
19. Refsum H, Ueland P, Nygrad O, and Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 1998; 49: 31- 62.
20. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ et al . Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample . *Am J Epidemiol* 2001 ; 154 : 150 -154 .
21. Rauh M, Verwied S, Knerr I, et al . Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals : Reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents . *Amino Acids* 2001; 20: 409-418.
22. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, et al. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med.* 1994; 96: 239–46.
23. Sipponen P, Laxen F , Houtari K, et al . Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population : association with atrophic gastritis and helicobacter pylori infection . *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(12 ):1209 -16 .
24. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 concentrations and risk for early – onset coronary artery disease . *Am J Clin Nutr* 1994; 59 : 940–8.
25. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, et al . Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996; 275: 1893–6.
26. Alfthan G, Laurinen MS, Valsta LM, et al . Folate intake , plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population . *European Journal of Clinical Nutrition* 2003 ;57 : 81 -88 .
27. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 – 1994 . *Am J Epidemiol* 2002 ; 156 : 1105 – 1113 .
28. Golbahar J, Rezaian G, and Bararpour H. Distribution of plasma total homocysteine concentrations in the healthy Iranians . *Clinical Biochemistry* 2004 ;37 :149 151 .
29. WHO MONICA Project. Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 25-64 years. *World Health Stat Q* 1988; 41: 115-37.
30. Gilfix BM, Blank DW, Rosenblatt DS. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clin Chem* 1997; 43:687-8.
31. Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. *Arc Intern Med* 1998; 158: 1301-1306.
32. Ward M, McNulty H, McPartlin J, et al. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological dose of folic acid. *QJM* 1997; 90:519-24.
33. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1995; 270: 2693-8.
34. Nygrad O, Vollset SE, Refsum H. Plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland homocysteine study. *JAMA* 1995 ; 274 : 1526 – 33 .
35. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, et al. Serum total homocysteine concentration is related to self – reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III . *J NUTR* 2000 130 ( 12 ) : 3073 – 6 .
36. Kang S-S , Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987; 36: 458 – 62.
37. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 – 1994 . *Am J Epidemiol* 2002 ; 156 : 1105 – 1113 .
38. Figlin E, Chetrit A, Shahar A, et al . High prevalences pf vitamin B12 and folic acid deficiency in elderly subjects in Israel . *British Journal of Haematology* 2003; 123: 696 – 701.
39. Ardawi Ms , Rouzi AA, Qari MH, et al. influence of age, sex, folate and vitamin B12 status on plasma homocysteine in Saudis . *Saudi Med J* 2002 ; 23 ( 8 ) : 959– 68 .
40. Kim MK, Ordovas JM, Selhub J, et al . B vitamins and plasma homocysteine concentrations in an urban and rural area of Costa Rica . *J Am Coll Nutr* 2003 ; 22 ( 3 ) : 224 – 31 .
41. Leowattana W, Bhuripanyo K, Mahanonda N, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in normal healthy Thai subjects. *J Med Assoc Thai* 2001; 84 ( Suppl 3 ) : S722 – 9 .
42. Naumovski N, Roach PD, Blades B, et al . The relationship between plasma homocysteine , red cell folate and plasma vitamin B12 in a sample of the New South Wales Central Coast population. *Asia Pac J Clin Nutr* 2003; 12: S24
43. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, et al. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring Cohort. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 613-621.
44. Lussier – Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, et al. Plasma total homocysteine in healthy subjects : sex – specific relation with biological traits . *Am J Clin Nutr* 1996; 64 : 587 – 93.
45. Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. *Arc Intern Med* 1998; 158: 1301-1306.

46. Norlund L, Grubb A, Flex , et al . The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function als determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36 : 175–8.
47. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, et al . Kinetic basis of hyper homocysteinemia in patients with chronic renal failure . *Kidney Int* 1997; 52 : 495 – 502 .
48. van Asselt DZ, de Groot LC, van Staveren WA, et al . Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998 ; 68 : 328 – 34 .
49. Andersson A, Brattstorm L, Israelsson B, et al. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.
50. Norlund L, Grubb A, Fex G, et al. The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 175-178.
51. Malinow MR. Homocysteine and arterial occlusive diseases . *J Intern Med* 1994 ; 53 : 603 – 7 .
52. Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JM, Gooren LJ, et al. Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 550-553.
53. Andersson A, Hultberg B, Brattstorm L, et al. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 377-379.
54. Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren, et al. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 801-805.
55. Dawson DW, Waters HM. Malnutrition: folate and cobalamin deficiency .*Br J Biomed Sci* 1994 ; 51: 221–7 .
56. Abraham R, Brown MC, North WR, et al . Diets of Asian pregnant women in Harrow : iron and vitamins. *Hum Nutr Appl Nutr* 1987 ; 41 : 164 – 73 .
57. Matthews JH, Wood JK. Megaloblastic anaemia in vegetarian Asians . *Clin Lab Haematol* 1984 ; 6 : 1 – 7 .
58. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al . Determinants of vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia ( $\geq 40$  mmol/l ) . The Hordaland Homocysteine Study . *J Clin Invest* 1996 ; 98 :2174 – 83 .
59. Jacques PF, Bostom AG, Wiliams PR, et al . Relation between folate status ,a common mutation in methylenetetrahydrofolatereductase, and plasma homocysteine concentrations . *Circulation* 1996 ; 93 : 7 – 9 .
60. Gartler SM, Hornung SK, Motulsky AG. Effect of chronologic age on induction of cystathione synthase, uroporphyrinogen I Synthase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1916–9 .
61. Misra A, Vikram NK, Pandey RM, et al . Hyperhomocysteinemia, and low intakes of folic acid and vitamin B12 in urban North India. *Eur J Nutr* 2002; 41( 2 ): 68–77 .
62. Ganji V, Kafai M. Demographic, health , lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 826–33 .
63. Malvin PJ. Elevated homocysteine unresponsive to vitamins. *Medscape Primary Care* 2003 ; 5 (1) . <http://www.medscape.com/viewarticle/449296?src=search>
64. Quinlivan EP, Gregory JF. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 221–5.
65. Food and Drug Administration. Food labeling: health claims and label statements; folate and neural tube defects. *Fed Regist* 1993; 58: 53254–95 .
66. MRC Vitamin Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131–7.
67. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000; 130: 129–32.
68. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ. et al. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 2001; 258: 2981–6.