

# Klinik Laboratuvarlarda Homosistein Ölçümünde Kullanılan İki Farklı Yöntemin Performans Değerlendirmesi

## The Performance Evaluation of Two Different Homocysteine Measurement Methods Used in Clinical Laboratories

Sebahat Özdem\*

S. Halide Akbaş\*

Meral Gültekin\*\*

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı, Antalya

\*Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ünitesi , \*\*Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ünitesi

### ÖZET

**Amaç:** Metionin metabolizması sırasında ortaya çıkan homosisteinin (Hcy) son yıllarda birçok hastalığın etyopatogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Özellikle serebrovasküler ve koroner arter hastalıkları ile ilişkili bağımsız bir risk faktörü olduğunun ortaya konması plazma Hcy ölçümlerine olan ilgiyi artırmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada HP1100 cihazında Chromsystems kitleri ve Drew DS30 sistemi kullanılarak plazma Hcy düzeyleri ölçüldü ve iki sistemin klinik kimya laboratuvarlarında Hcy ölçümleri açısından analitik performansları incelendi.

**Bulgular:** Drew DS30 sistemi ve Chromsystems kitleri ile HPLC'de tekrarlanabilirlik sırasıyla %2.1 ve 1.6 olarak bulundu ( $p=0.043$ ). Ölçümler arası doğruluk üç ayrı Hcy konsantrasyonunda değerlendirildiğinde standart sapmalar Drew DS30 ve Chromsystems kitleri ile HPLC için sırasıyla düşük ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) konsantrasyonda %4.9 ve 4.0, orta ( $12.5 \mu\text{mol/L}$ ) konsantrasyonda %5.2 ve 4.2 ve yüksek ( $24.8 \mu\text{mol/L}$ ) konsantrasyonda %5.8 ve 4.2 olarak bulundu. Ortalama geri kazanımın Drew DS30 için  $101.8 \pm 2.3$ , HPLC için  $98.9 \pm 1.4$  olduğu saptandı. Drew DS30 ve HPLC sistemlerinin ölçüm yapabildiği en düşük Hcy konsantrasyonları sırasıyla  $2.8$  ve  $1.6 \mu\text{mol/L}$  olarak kaydedildi. Her iki sistemle ölçülen Hcy düzeyleri arasında iyi bir korelasyon bulundu ( $r= 0.948$ ). Linearite sınırları Drew DS30 sistemi ve Chromsystem kitleri ile HPLC'de sırasıyla  $100$  ve  $200 \mu\text{mol/L}$  olarak bulundu.

**Tartışma:** Hiperhomosisteinemisi olduğu düşünülen gruplarla yapılacak çalışmaların yanı sıra numune miktarlarının az, hasta sayısının yüksek ve çalışma zamanının kısıtlı olduğu laboratuvarlarda plazma homosistein ölçümlerinde Chromsystems HPLC kitlerinin kullanımının daha yararlı olabileceği, yukarıda belirtilen kısıtlamaların olmadığı laboratuvarlarda ise Chromsystems kitleri yanında yakın performansta olan DS30 sisteminin de kullanılabileceği görüldü.

**Anahtar Sözcükler:** Homosistein, Chromsystems, HPLC, DS30, Ölçüm yöntemleri

### ABSTRACT

**Objective:** It has been proposed that the homocysteine (Hcy) produced during the metabolism of methionine plays a role in etiopathogenesis of several diseases. The interest in measurement of

plasma Hcy levels has increased recently upon the finding that Hcy is an independent risk factor for cerebral, vascular and coronary artery diseases.

**Materials and Methods:** In the present study, we measured plasma Hcy levels with two different systems; Chromsystems kits in HPI 100 and Drew DS30 and investigated the analytical performances of these two systems in Hcy measurements in clinical laboratories.

**Results:** Reproducibilities for Drew DS30 system and HPLC with Chromsystems kits were found to be 2.1 and 1.6%, respectively ( $p=0.043$ ). Inter-assay variability for three different Hcy concentrations revealed standard deviations of 4.9 and 4.0% for low (5  $\mu\text{mol/L}$ ), 5.2 and 4.2% for moderate (12.5  $\mu\text{mol/L}$ ) and 5.8 and 4.2% for high (24.8  $\mu\text{mol/L}$ ) concentrations for Drew DS30 and HPLC with Chromsystems kits, respectively. Mean recovery was  $101.8 \pm 2.3\%$  for Drew DS30 and  $98.9 \pm 1.4\%$  for HPLC. The lowest measurable Hcy concentrations for Drew DS30 and HPLC systems were recorded as 2.8 and 1.6  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. There was a good correlation between the Hcy levels measured with both systems ( $r= 0.948$ ). Limits of linearity were found to be 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$  for Drew DS30 system and HPLC with Chromsystems kits.

**Conclusion:** We demonstrated that the use of Chromsystems HPLC for homocysteine measurement might be more useful both in groups with predicted hyperhomocysteinemia and in laboratories with high number of patients where there are limitations in sample amounts, and working hours. On the other hand, in laboratories without the limitations mentioned above, DS30 system might be used with a similar performance to Chromsystems kits.

**Key Words:** Homocysteine (Hcy), Chromsystems, HPLC, DS30, Measurement methods

## GİRİŞ

Homosistein (Hcy) methioninden köken alan ve sülfür içeren esansiyel bir amino asittir. İçerdiği serbest sülfidril (thiol) grubu ile çeşitli disülfid formlarına kolaylıkla okside olabilir (1,2). Plazmada Hcy'in büyük bir kısmı (>%80) disülfid bağları ile proteinlere bağlı olarak bulunur. Bunun bir kısmı simetrik disülfid Hcy, diğer bir kısmı karma disülfid Hcy-sistein, %2'den daha az bir kısmı ise serbest tiyol şeklindedir (1,2). Hcy diyetle alınan metioninin metabolizması sırasında ortaya çıkar. Hcy metabolizmasında sistationin -sentaz veya termolabil metilentetrahidrofolat redüktaz enzimleri yanı sıra B12, B6 ve Folik asit gibi vitaminler de kofaktör olarak görev alır (3). Söz konusu vitaminler ile serum Hcy düzeyleri arasında ters bir ilişki gösterilmiştir (4,5). Hcy, folat ve vitamin B12 eksikliğinin duyarlı bir göstergesidir (4,5). Hcy düzeylerindeki artış, doğum defektleri, hamilelik komplikasyonları, psikiyatrik bozukluklar ve yaşlılarda bilişsel yetersizlik gibi durumlarla ilişkilidir (6-9).

Serebrovasküler ve koroner arter hastalıklar gelişmiş batılı ülkelerde en önemli ölüm nedenleridir. Hcy düzeylerindeki artışın kardio-

vasküler, serebrovasküler ve periferik vasküler hastalıklarla ilişkili bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanması ile Hcy'e olan ilgi oldukça artmıştır. Kalıtsal hiperhomosisteinemi de gözlenen aterosklerotik ve trombotik komplikasyonların nedeninin Hcy olduğu ilk olarak McCully tarafından ortaya atılmıştır (10). Ardından, 1976'da Wilcken, hiperhomosisteinemi bir vasküler hastalık risk faktörü olarak tanımlamıştır (11). Epidemiyolojik çalışmalarda, toplumun %9-15'inde orta derecede hiperhomosisteinemi (plazma Hcy düzeyi >16  $\mu\text{mol/L}$ ) olduğu ve hiperhomosisteineminin diğer risk faktörlerinin etkilerinden bağımsız bir şekilde periferik vasküler, serebrovasküler ve koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12-14). Yirmiyedi çalışmanın meta analizi sonucunda, dolaşımdaki total Hcy düzeyinde 5  $\mu\text{mol/L}$ 'lik bir artışın koroner kalp hastalığını 1.7 kat, serebrovasküler hastalığı ise 1.5 kat arttırdığı gösterilmiştir (13,15). Dolayısı ile total Hcy ölçümü klinik biyokimya laboratuvarlarının önemli parametrelerinden biri haline gelmiş, kolay ve otomatik şekilde Hcy ölçümü yapabilecek teknikler aranmaya başlanmıştır.

Total Hcy ölçümleri ilk olarak amino asid analizörlerinde, ninhidrinin kullanıldığı duyarlılığı düşük yöntemlerle başlamıştır. Total Hcy düzeyinin klinik öneminin anlaşılmasıyla birlikte, 1980'lerin ortasından başlayarak Hcy araştırmaları için yeni bir çağ açılmıştır. 1990'ların ikinci yarısında ise immün yöntemler geliştirilmiş, bu şekilde Hcy ölçümleri araştırma aracı olmaktan çıkıp yaygın bir şekilde kullanılan klinik kimyasal testler haline gelmiştir. Bu gelişmelere paralel olarak hem rutin tanı hem de araştırma açısından bu alana olan ilgi belirgin bir şekilde artmıştır (16,17).

Her ne kadar bu kromatografik yöntemler göreceli olarak karmaşık ve oldukça özel cihazlar gerektiriyorlarsa da, plazma total Hcy ölçüm yöntemlerinin çoğunda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. Oldukça karmaşık olmaları ve pahalı cihazların kullanılması gerektiği için bu yöntemler rutin klinik kimya laboratuvarlarında genellikle bulunmamaktadır. Hcy ölçümü için bilinen birkaç tam otomatik kromatografik metod mevcuttur. Bu çalışmada total Hcy düzeyleri HP1100 cihazında Chromsystems kitleri ve Drew DS30 sistemi kullanılarak ölçülmüş ve bu iki sistemin klinik kimya laboratuvarlarında Hcy ölçümleri açısından avantaj ve dezavantajları incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Cihazlar ve Kullanımları:

Chromsystems kitleri Hewlett Packard 1100 İsokratik pompası, HP 1100 floresan dedektörlü kromatografik parça içeren HPLC cihazında değerlendirildi. Bu kitlerde modifiye silikondioksit kartilaj içeren 4.6X125 mm ters faz kolunu (Munchen, Germany) bulunmaktadır. Hareketli fazın akış hızı 1.7 ml/dak olarak ayarlandı. Sistemin plazma Hcy ölçüm işlemi aşağıda açıklandığı şekilde idi: 100 µL plazma, 25 µL iç standart ve 25 µL indirgeyici solüsyon (tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)) ile karıştırılır ve 5 dakika oda

ısısında inkübe edilir. Ardından proteinlerin çökmesi için 100 µL çöktürücü solüsyon (trichloroacetic acid (TCA)) eklenir. 30 saniye vorteksenerek 9000xg'de 5-7 dakika santrifüj edilir. Aynı bir eppendorf içinde 100 µL thiol'e özel floresan boya içeren türevlendirici çözeltiye, oluşturulan süpernatandan 50 µL eklenir. 50-55 °C'de 15 dakika beklenir ve cihazda ölçülür. Bir numunenin piklerinin değerlendirilip sonuçlanması 4-5 dakika sürer. Kitlerle beraber standart ile 9.64 (7.71±11.6) ve 20.9 (16.8± 25.1) µmol/L Hcy içeren iki ayrı kontrol plazması verilen bu sistemde 100 numuneyi aynı anda cihaza yüklemek mümkün olabilmektedir.

Drew DS30 Total Hcy sistemi 5 cm boyunda revers faz kolonu, içerisinde 5-20 µmol/L değerinde kalibratörler ve kontrolleri içermektedir. Gerekli plazma miktarı 200 µl'dir. 30 numune aynı anda cihaza yüklenebilmektedir. Gerekli plazmaya 10 µL internal standard (IS; 2-mercaptoethylamine) eklenir. Disülfidlerin karışması için karıştırılır. Protein bağlı tioller azaltmak için 20µL tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) eklenir. Ardından proteinlerin çökmesini sağlamak için trikloroasetik asid (TCA) konulur. Üst faz alınır ve floresan tiyol spesifik boya olan ve EDTA/borat tamponunda çözülmüş ammonium 7-fluorobenze-2-oxa 1,3-diazole-4-sulfonate (SBDF) ile türevlendirme işlemi için 60 °C'de 50 dakika beklenir. Drew DS30 HPLC sisteminde tiyol türevleri ardarda çıkarlar ve oluşan floresan miktarı ile orantılı olarak miktarları ölçülür. Bu sistemde 30 numunenin çalışılması 5-6 saat sürer. Hcy miktarları iki noktali kalibrasyon eğrisi kullanılarak verilir.

Tablo 1'de her iki sistemin özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

### Numune Örnekleri:

Hcy kan hücrelerinde üretilebilmekte ve plazmaya salınabilmektedir. Bu salınım zamana ve ortam ısısına bağlı olarak değişir. Buz içerisinde EDTA'lı örnekler 1 saat kadar stabil kalabilirler. Ancak örnek plazmalarının bir an önce ayrılması gerekmektedir. Kan hücre-

**Tablo 1.** Hcy ölçümlerinde kullanılan Chromosystems kitleri ve Drew DS30 sisteminin özellikleri.

	HPLC Kitleri	Drew DS30 Sistemi
Numune hacmi	100 µL	200 µL
Ön hazırlık süresi	25 dak	75 dak
Bir numunenin cihazda değerlendirme süresi	4-5 dak	11-12 dak
Hcy için ölçüm aralığı	1.6-200 µmol/L	2.8-100 µmol/L
Cihaza yüklenebilen numune sayısı	100 adet	30 adet

lerinden ayrıldıktan sonra plazma total Hcy düzeyi oda ısısında 4 gün, 2-8 °C'de birkaç hafta, -20 °C'de ise birkaç yıl stabil kalır (18).

Çalışma için 76 kadın (yaş ortalaması 38, yaş aralığı 24-52 yıl) ve 58 erkek (yaş ortalaması 41, yaş aralığı 25-57 yıl) toplam 134 gönüllüden 12 saatlik açlık sonrasında EDTA'lı kan örnekleri alındı. Buzlu kap içerisinde laboratuvara ulaştırılan kan örneklerinin plazmaları 20 dakika içerisinde ayrıldıktan sonra, çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı. Örnek matrisinde gözlenen genel problem nedeniyle plazma örneklerinin çözündükten sonra homojen olmayabileceği göz önüne alınarak, tüm numuneler iyice karıştırıldıktan sonra analiz işlemine alındı.

Chromsystems kitleri ve Drew DS30 sistemlerinde ölçümü yapılan Hcy için yöntemin performansı ile ilişkili özellikler doğruluk, kesinlik, geri kazanım, ölçümler arası tekrarlanabilirlik, ölçüm limitleri ve linearite değerlendirildi.

## BULGULAR

Aynı örnekte ölçümün 5 kez tekrarlanması ile Drew DS30 Sisteminde tekrarlanabilirlik %2.1, Chromsystems kitleri ile HPLC'de %1.6 olarak bulundu ( $p=0.043$ ). Ölçümler arası doğruluk üç ayrı konsantrasyonda (düşük: 5 µmol/L, orta: 12.5 µmol/L ve yüksek: 24.8 µmol/L) QC plazma havuzları hazırlanarak değerlendirildi. Ölçümler arası doğruluk için iki ayrı sistem için 10 ayrı günde 10'ar ölçüm yapıldı. Standart sapma Drew DS30 ve Chromsystems kitleri ile HPLC için düşük konsantrasyonda sırasıyla %4.9 ve %4.0, median kon-

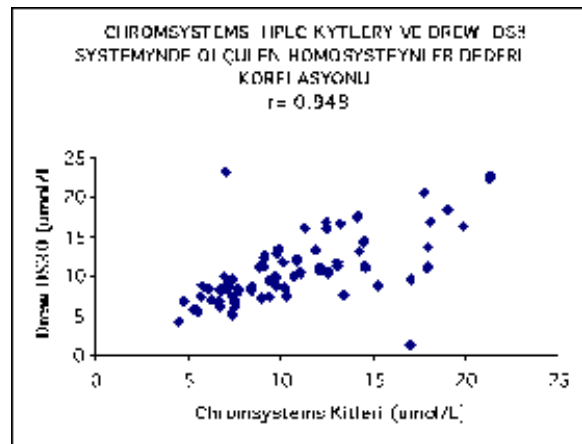
santrasyonda %5.2 ve %4.2, yüksek konsantrasyonda ise %5.8 ve %4.2 olarak bulundu.

Geri kazanım ölçümleri için 6 plazma örneğine 5 ve 15 µmol/L L-homosistin eklenerek her iki sistemde ölçüm yapıldı. Ortalama geri kazanım Drew DS30 için  $101.8 \pm 2.3\%$ , HPLC için  $98.9 \pm 1.4\%$  olarak bulundu. Drew DS30 ve HPLC sistemlerinin ölçüm yapabildiği en düşük Hcy konsantrasyonu sırasıyla 2.8 µmol/L ve 1.6 µmol/L olarak kaydedildi.

Her iki sistemde ölçülen Hcy düzeyleri arasında iyi bir korelasyon bulundu ( $r= 0.948$ , Şekil 1).

Bland-Altman analizi, Drew DS30 sisteminin HPLC'ye göre Hcy düzeylerini ortalama 0.36 birim daha düşük ölçtüğünü gösterdi. %95 uyum sınırları -7.6 ve 6.9 olarak bulundu. (Şekil 2, Tablo 2)

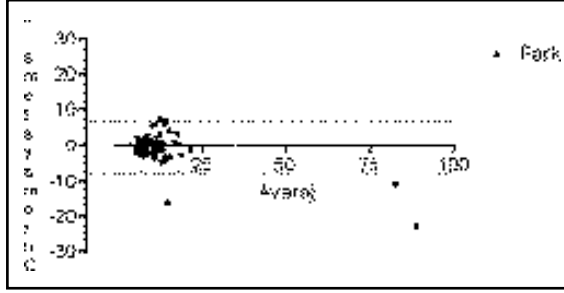
Chromsystem kitleri ile HPLC'deki linearite sınırı 200 µmol/L, Drew DS30 sisteminde ise 100 µmol/L olarak değerlendirildi.



**Şekil 1.** Drew DS30 sistemi ve HPLC kitleri ile yapılan Hcy ölçümlerinin korelasyon grafiği.

**Tablo 2.** Bland-Altman analizinde iki yöntemle elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki farkların ortalaması, standard sapma (SD) ve uyum sınırları.

	n	Farkların ortalaması	SD	Uyum sınırları (farkların ortalaması $\pm$ 1.96 SD)
Drew DS30- Chromsystem HPLC	132	-0.36	3.7	-7.6 ve 6.9

**Şekil 2.** Drew DS30 sistemi ve Chromsystems HPLC kitlerinin Bland-Altman Analizi ile değerlendirilmesi.

## TARTIŞMA

Hcy'in aterosklerotik hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olduğunun anlaşılmasıyla birlikte plazma total Hcy ölçümü klinik biyokimyanın önemli bir tanı testi durumuna gelmiştir.

Rutin klinik laboratuvarlarda kullanılan ölçümlerin fiyat olarak uygun, hızlı, doğru ve kolay uygulanabilir olması gerekir. Reaktiflerinin uzun süre stabil kalması bir diğer istenen özelliktir. Analitik ölçüm aralığınının genel populasyonun %0.5-99.5'ini kapsayacak şekilde geniş olması gerekir. Düşük kesinlik özelliğinin özellikle küçük popülasyonlu çalışmalarda ve total Hcy düzeylerinde ufak farklar olması durumunda önemli olduğu bildirilmiştir. Yukarıda belirtilen koşulları tam olarak sağlayabilen immünassay sistemi henüz yok denilebilir. Oldukça karmaşık ve özel şartlar gerektirse de Hcy ölçümü yapabilen çoğu yöntemde HPLC kullanılmaktadır.

1980'lerin ortalarında Hcy metodlarının gelişmesi ile birlikte birden çok anstabil Hcy türlerinin olduğunun anlaşılması, mevcut tüm ölçüm sistemleri için bir sorun oluşturmaya başladı. Bu nedenle öncelikle örneklerdeki Hcy'lerin indirgenmiş şekillerine dönüşmesi tüm ölçümlerde ilk basamak oldu.

Bu indirgenme basamağında dithiothreitol, dithioerythritol, mercaptoethanol sodyum veya potasyum borohydride veya tri-n-butylphosphine (TBP), tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) gibi sülfidril reaktifleri kullanıldı. Bizim incelediğimiz iki sistemde de indirgenme basamağı için tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) kullanılmaktadır. Bu madde ile yapılan indirgenme işleminin özellikle tri-n-butylphosphin'e göre üstünlükleri olduğu bildirilmiştir (19).

Tokluk Hcy düzeyleri çok değişken sonuçlar verebildiği için Hcy düzeyleri açlık durumunda ölçülmelidir. Normal açlık plazma Hcy düzeyi 5-15 mmol/L'dir; 16-30 mmol/L hafif, 31-100 mmol/L orta, >100 mmol/L ise yüksek Hcy'emi düzeylerini temsil etmektedir (20). Bu çalışmada 25  $\mu$ mol/L 'ün altında her iki yöntem arasında iyi bir korelasyon ve oldukça küçük bir taraflılık olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla Hcy ölçümü için her iki yöntem de önerilebilir. Ancak genel toplumun 5%'ini hiperhomosisteinematik kişiler oluşturmaktadır. Bu kişilerin %13-47'sinde semptomatik aterosklerotik vasküler hastalık tespit edilmiştir (21). Hiperhomosisteinemi olgularında plazma total Hcy düzeyleri 250  $\mu$ mol/L dolaylarında olabilmektedir (22). Bu tip olgularda Drew DS30 sisteminde tekrar dilüsyon nedeniyle hem zaman ve numune kaybı hem de maliyet artması gibi durumlar oluşabileceği için ve ayrıca yüksek konsantrasyonlarda linearite sınırının daha geniş olması nedeniyle HPLC kitleri tercih edilebilir.

Ayrıca Chromsystems kitleri kullanılarak Hcy ölçümü yapıldığında numunenin hazırlanması aşaması daha kısa sürede yapılmakta (25 dakika) ve her bir numunenin raporlanması 4-5 dakikada sonuçlanmaktadır. Drew DS30 sisteminde ise numunenin hazırlanması için

75 dakika gerekirken ve her bir numunenin raporlanması 11-12 dakika sürmektedir. Chromsystems kitlerinin bir diğer avantajı da 100 hazır örneğin cihaza aynı anda yüklenebilmesidir (diğer sistemde 30 numune). Bu durum özellikle yoğun bir şekilde çalışan laboratuvarlar için önemli bir tercih nedeni olabilir.

Sonuç olarak Hcy ölçümünde Chromsystems HPLC kitleri DS30 sistemi ile karşılaştırıldığında, zaman tasarrufu, daha az numune kullanılması ve daha kolay uygulanabilir olması, yüksek linearite gibi avantajlara sahiptir. Ancak her klinik laboratuvarında HPLC sistemi olmayabilir veya laboratuvarın fiziki koşulları daha kompakt bir cihaz gerektirebilir. Numune sayısının az olduğu ve yüksek Hcy düzeylerinde seyreltme yapmanın getireceği ek maliyetin ve zamanın sorun oluşturmayacağı laboratuvarlarda DS30 sistemi Hcy ölçümü için iyi bir alternatif gibi görünmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 627-648.
2. Auer J, Berent R, Eber B. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Clin Basic Cardiol* 2001; 4: 261-264.
3. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalyn J, Strosch G. Intermediate homocysteinemia: a termolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-421.
4. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96: 239-246.
5. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation; measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. *Clin Chem* 2000; 46: 1277-1283.
6. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999; 20: 519-529.
7. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 962-968.
8. Nilsson K, Gustafson L, Faldt R, Andersson A, Brattstrom L, Lindgren A, et al. Hyperhomocysteinemia-a common finding in a psychogeriatric population. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 853-859.
9. Smith AD. Homocysteine, B vitamins, and cognitive deficit in the elderly (Editorial). *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 785-786.
10. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
11. Wilcken Del, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-1082.
12. Berwanger CL, Jeremy JY, Stansby GD. Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 1995; 82: 726-731.
13. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995; 274: 1049-1057.
14. Brattstrom LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate hyperhomocysteinemia: a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 1984; 15: 1012-1016.
15. Clarke R. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2015-2022.
16. Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1995; 41: 991-994.
17. Frantzen F, Faaren AL, Alheim I, Nordhei AK. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-6.
18. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32.
19. Krijt J, Vacková M and Kozich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin Chem* 2001; 47: 1821-1828.
20. Kang SS, Wong PWK. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 279-298.
21. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-408.
22. Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, Hennekens CH. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2000; 160: 422-34.

#### Yazışma adresi:

Dr. Sebahat Özdem  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez  
Laboratuvarı Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ünitesi  
Arapsuyu 07070 Arapsuyu, Antalya  
Tel : 0.242 227 43 43/35252 Fax: 0 242 2272535  
GSM: 0.505 662 90 03 E-posta: ozdem@akdeniz.edu.tr