دراسة بعض العوامل الجينية وغير الجينية المؤثرة في مستويات الهوموسستئين عند مرضى الإقفار القلبي

د. إيمان باكير[**] أ. د. وفيقة زرزور[**] أ. د. دولفغانغ هيرمان[*]

الملخص

يعدُّ فرط الهوموسستئين الخفيف mild-hyperhomocysteinemia عامل خطورة للإصابة بداء الإقفار القلبي (داء الشرايين الإكليلية(coronary artery disease (CAD)، ويمكن أن ينجم عن اضطراب في استقلاب الهوموسستئين،ومن ذلك الاضطراب في إمتال الهوموسستئين إلى ميتيونين الناجم عنMTHFR الذي يحفز اصطناع ٥-ميتيل تيتراهيدروفولات الذي يقوم بدور معطٍ للميتيل، فقد وصفت طفرة في الـMTHFR تؤدي إلى استبدال الفالين بالألانين وتؤدي إلى حدوث فرط في الهوموسستئين عند مرضى داء الشرايين الإكليلية. ولاختبار هذه الفرضية دُوسَ ٧٨ مريضاً مصاباً بداء الشرايين الإكليلية وتمت مقارنتهم مع ٤٨ فرداً سوياً، حيث أجري التنميط الجيني للـMTHFR، وقيست مستويات الهوموسستئين، والفولات ، والـB_{12}.

لم يكن الاختلاف بين تواتر النمط الطافر بين مجموعة الـCAD ١٢% وبين الأسوياء٨,٥% ذا دلالة إحصائية. لكنَّ الأفراد من النمط الطافر يعانون من ارتفاع في مستويات الهوموسستئين خاصة عندما تكون مستويات الفولات أخفض من الوسيط median،و يمكن أن يؤهب هذا التأثر الجيني البيئي إلى حدوث الإصابة بداء الشرايين الإكليلية.

Genetic and nongenetic factors influencing plasma homocysteine levels in-patients with ischemic heart disease

[**] كلية الصيدلة _ جامعة دمشق _سوريا.
[*] كلية الطب _ جامعة السارلاند _ألمانيا.

**W.Zarzour	**E.Bakir	*W.Herrmann

Abstract

Mild hyperhomocysteinemia, a risk factor for ischemic heart disease (coronary heart disease CAD) can be caused by disturbans of homocysteine metabolism. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalysis of ٥-methylenetetrahydrofolate, to methyl donor for homocysteine remethylation to methionin. A common mutation in MTHFR, an alanine-to- valine substitution, may contribute to mild hyperhomocysteinemia in coronary artery disease. To test this hypothesis, we studied ٧٨ patients with CAD by mutation analysis. And measurements of plasma homocysteine and several vitamins (Folate, $B_{١٢}$). The difference in the prevalence of the homozygous mutant genotype between the CAD patients (٨,٥٪) and healthy subjects (١٢٪) was not significant. However, individuals with homozygous mutant genotype had higher plasma homocysteine, particularly when plasma Folate was below the median value. The genetic environmental interaction is proposed to be a risk factor for CAD.

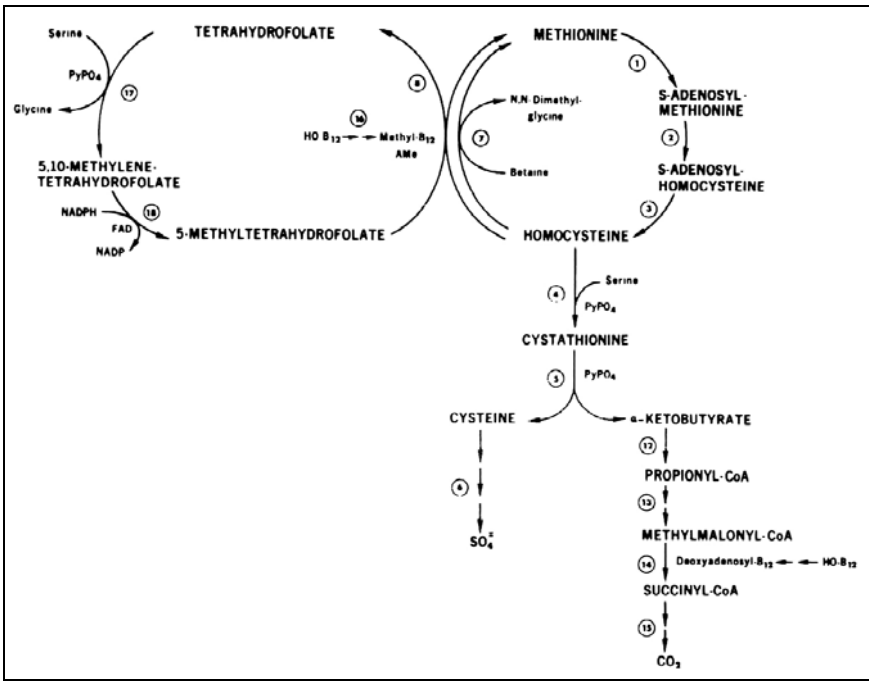
*Facully Of Medicine – SaarLand University – Germany.

**Facully Of Pharmacy – damascus University – Syria.

المقدمة introduction

الهوموسستئين هو مركب وسيط ينتج عن تحويل الميثيونين إلى سستئين [١، ٢]، حيث يتم استقلابه من خلال طريقين مختلفين: طريق نقل الكبريت transsulfuration، وطريق إعادة الميتيل remethylation [٣،٤]، ففي طريق نقل الكبريت يتم تحويل الهوموسستئين إلى سستئين المحفز من خلال سستاتيونين بيتا سينتاز ، وهذه العملية تحتاج إلى البيردوكسال فوسفات(B_6) كعامل مشارك. من جهة أخرى يتم تحفيز إعادة إمتال الهوموسستئين إما من خلال: بيتئين هوموسستئين ميتيل ترانسفيراز، أو الميتيونين سينتاز methionin syntase والذي يقوم الميتيل كوبالامين بوظيفة عامل مشارك له[٥،٢٢].

الشكل-١ -استقلاب الهوموسستئين



ولمَّا كان الهوموسستئين حوى مجموعة سلفيدريل التي تجعل منه عرضة للأكسدة في الـPH الفيزيولوجية مما يؤدي إلى تشكيل ثنائيات السلفيد لدى اتحاده مع التيولات الأخرى،لذا يوجد الهوموسستئين في عدة أشكال: الشكل المرجع١%، الشكل المرتبط مع الألبومين٧٠ % ، ويوجد بنسبة٣٠% مرتبطاً مع السستئين، ويدعى المجموع الكلي بالهوموسستئين[٧،٢٣].

إن المجال السوي عند البالغين هو ٥-١٥ مكمولاً/ل ويعرف فرط الهوموسستئين عند ارتفاع مستويات الهوموسستئين أعلى من ١٥ مكمولاً، ويكون هذا الارتفاع خفيفاً moderateعندما تقع مستويات الهوموسستئين ضمن المجال١٥-٣٠مكمولاً،أما ارتفاع

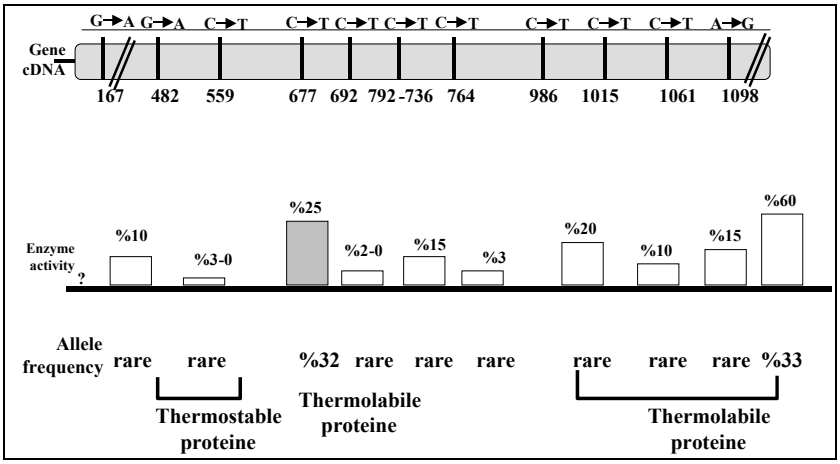
الهوموسستئين المتوسط intermediate فهو ارتفاع إلى مستويات الهوموسستئين ضمن المجال ٣٠-١٠٠مكمول/ل، أما ارتفاع الهوموسستئين الشديدsevere فهو ارتفاع إلى مستويات الهوموسستئين أعلى من ١٠٠مكمول/ل [٧،١٥].

ينجم فرط الهوموسستئين عن عوامل عدة منها: عوز السيستاتيونين بيتا سينتاز CBS ، عوزميتيلين تيتراهيروفولات MTHFR ، القصور الكلوي المزمن ، عوز (B_{12},B_6)، الفولات)، عوز هرمون التيروكسين، والأدوية(الأزريبين، ميوتريكسات،أكسيد الأزوت،مضادات الاختلاج، الاستروجين)، السموم البيئية التي تعاكس B_6 مثل التبغ[٨،١٥،١٨،٢١] .وهي موضحة في الجدول١.

كما تم التعرف على فرط الهوموسستئين الخفيف mild-hyperhomocysteinemia الذي يعد عامل خطورة للإصابة بداء الشرايين الإكليلية، وأشارت عدة دراسات إلى أن مرضى الأوعية يعانون من ارتفاع بمستويات الهوموسستئين الصيامي بمعدل ٣٠% أكثر من الأسوياء[٦،١٨].

تم عزل cDNA من MTHFR ووصفت عشر طفرات في هذا الجينوم منها ٩ طفرات نادرة موجودة عند عوز MTHFR الشديد، وواحدة من هذه الطفرات تؤدي إلى استبدال الفالين بالآلانين وتؤدي إلى حدوث العطوبية بالحرارة[٦].

الشكل ـ٢ ـ الطفرات في أنزيم MTHFR



الطرائق Results

المرضى Patient

أجريت الدراسة على ٧٨ مريضاً ثبت إصابتهم بداء الشرايين الإكليلية بعد إجراء القثطرة القلبية في مشفى الأسد الجامعي بدمشق، و شملت الدراسة ١٠٥من الأفراد الأسوياء، القسم الأول منهم وعددهم ٤٨ فرداً سوياً خضعوا لقثطرة قلبية أظهرت عدم وجود أي انسداد في شرايينهم

الإكليلية. وكان متوسط أعمار هذه المجموعة متناسباً مع المجموعة المرضية، وأما القسم الثاني من الأسوياء فقد تم اختيارهم من الأسوياء ظاهرياً بلغ متوسط أعمارهم ٢٦عامًا أضيفت إلى مجموعة الأسوياء السابقة، وتم الاعتماد عليها فقط في مقارنة تواتر الأنماط الجينية بين مجموعة مرضى الإقفار القلبي والأسوياء بعد أن ثبت في الدراسة عدم وجود تأثير للعمر والجنس في الطفرة.

الاختبارات المخبرية
Laboratory tests

جمعت عينات المرضى الصيامية على مانع التخثر (EDTA) و فصلت البلازما عن عينة الدم بالتثفيل خلال ٤٥ دقيقة من سحب العينة، وجمدت في الدرجة°C ٣٠ - وذلك من أجل إجراء مقايسة الهوموسستئين. و استخدم الدم المأخوذ على الهيبارين لمقايسة الفيتامينات تجنباً من حدوث الانحلال فيما لو استعملنا العينات المصلية، أما لمقايسة المعالم الشحمية فقد تم الاعتماد على العينات المصلية .

١. العوامل المؤثرة في مستويات الهوموسستئين في البلازما

	العوامل التي تزيد مستويات الهوموسستئين	العوامل التي تنقص مستويات الهوموسستئين
١.العوامل الوراثية :	الطفرات في الأنزيمات الآتية: ١-سيستاتيونين سينتاز . ٢-ميتيلين تيتراهيدرو فولات ريدوكتاز. ٣-غاما سينتاز. ٤-عوز ميتيونين سينتاز . ٥-٥-ميثيل تيتراهيدو فولات هوموسستئين ميثيل ترانسفيراز. ٦-أنزيمات اصطناع كو أنزيم الكوبالامين.	متلازمة داونSyndrome Down
٢.العوامل الفيزيولوجية:	١-التقدم بالعمر. ٢-الجنس(الذكور). ٣-سن الإياس. ٤-الوظيفة الكلوية،تناقص GFR. ٥-ازدياد الكتلة العضلية. ٦-البدانة.	

٣.نمط الحياة:	١-القوت وزيادة تناول الميتيونين. ٢-التدخين. ٣-تناول الكحول الشديد. ٤-تناول القهوة. ٥-السموم :ثنائي سولفيد الكربون. ٦-الكرب. ٧-تخزين الطعام(التجميد،التجفيف).	١-تناول الفيتامينات. ٢-الفعالية الفيزيائية. ٣-تناول الكحول المتوسط. ٤-تناول الشاي. ٦-تناول زيت السمك.

تتمة جدول ١:

٤.العوامل السريرية:	١.عوز الفولات،B_{12}،B_6. ٢.القصور الكلوي. ٣.الاضطرابات التكاثرية . ٤.قصور الغدة الدرقية. ٥.الصداف. ٦.السرطان:ابيضاض الدم،سرطان الثدي ،المبيض،البنكرياس ٧.الذئبة الحمامية. ٨.زرع الأعضاء:القلب،الكلية. ٩.العته الشيخي .	
٥.الأدوية:	١.ميتوتريكسات (methotrexate). ٢.مضادات الصرع: Antiepileptic drugs. ٣.أدوية التخدير:أكسيد الآزوت ٤.خافضات الكوليسترول. ٥.أخرى: Cyclosporine،Niacin، L-dopa) ٦.مانعات الحمل: Contraceptives	١.AdoHcyhydrolase inhibition ٢.Aminothiols: penicillamine,Acetylcysteine ٣.المعالجة الهرمونية: ٤.مضادات الأستروجين تاموكسيفينTamoxifen

الطرائق

أولاً . مقايسة الهوموسستئين بطريقة الاستشراب السائل فائق الإنجاز HPLC

خطوات العمل

A - مرحلة ماقبل العمود : الاستخلاص والاشتقاق

١-تحل العينات في درجة حرارة الغرفة

٢-تحضر مجموعتان من أنابيب الاختبار الزجاجية وترقم بعدد العينات .

٣-يضاف إلى المجموعة الأولى ٢٤٠ مكل من كل عينة في الأنبوب المطابق لرقم العينة .

٤-يضاف ٣٠مكل من المعياري الداخلي(أسيتيل سستئين) إلى كل أنبوب .

٥-يضاف ٣٠مكل من ثلاثي -ن-بوتيل فوسفين ١٠% إلى كل أنبوب .

٦-تمزج الأنابيب وتغطى وتحضن في الدرجة +C°٤ لمدة ٣٠دقيقة .

٧-يضاف٣٠٠مكل من حمض فوق كلور الماء إلى كل أنبوب ، تمزج الأنابيب وتثفل لمدة ١٠دقائق ب٣٠٠٠rpm .

٨-ينقل ٥٠مكل من الطافي إلى المجموعة الثانية من الأنابيب .

٩-يضاف ١٠مكل منNAOH.

١٠-يضاف ١٢٥مكل من البوتاسيوم رباعي البورات .

١١-يضاف ٥٠مكل منSBDF.

١٢-تغطى الأنابيب وتوضع في حمام مائي بالدرجة٦٠ C° لمدة ٩٠ دقيقة.

١٣-ثم تبرد العينات ، وتثفل لمدة ٥دقائق ، ويؤخذ الطافي ويحقن .

B-شروط جهاز HPLC

الشروط التي تم العمل بها

- العمودColumn: استخدم عمود الطور المقلوب C١٨، ٠,٤٦×١٥،
- الوقاء : استخدم وقاء الأسيتات ٠,١مول (PH=٤)مع ميتانول ٢%.
- سرعة الجريان Flow rarte:١,١مل/دقيقة .
- حجم العينة :١٥مكل.
- الزمن اللازم لكل عينة Run time :١٢دقيقة .

C-شروط الفلورة

استخدم متحري فلورةFluorescence detector ،وكانت شروط العمل بالمتحري كالآتي :

- طول موجة الاستثارة Exctation wavelenghth ٣٨٥ نم .
- طول موجة الإصدار Emission wavelenghth ٥١٥ نم .
- تواتر اللمبة Lamp Frequency ١١٠HZ.

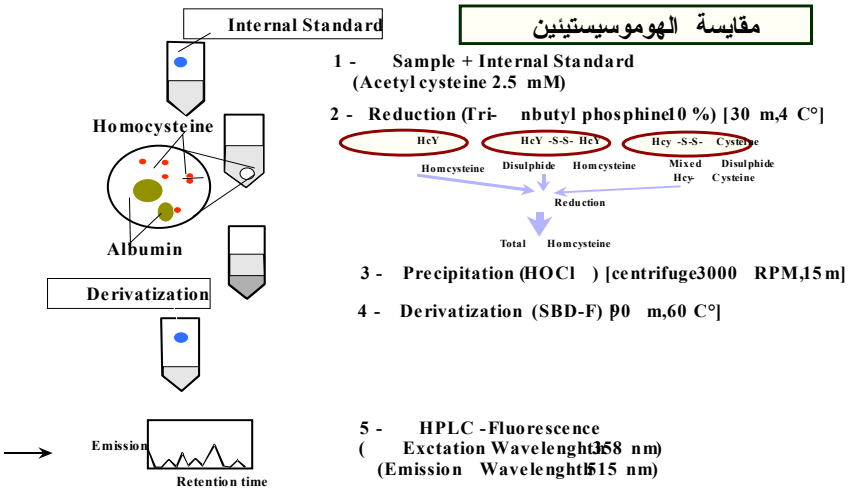
حساب النتائج

تركيز المجهول =	ارتفاع قمة المجهول/ارتفاع قمة المعياري الداخلي للمجهول / ارتفاع قمة المعياري /ارتفاع قمة المعياري الداخلي للمعياري	× تركيز المعياري

المجال المرافق للطاقم :١٧-٤مكمول/ل

تم إجراء تحضير العينات في كلية الصيدلة، في حين تم إجراء مرحلة حقن العينا ت في جهاز الـHPLC في مخبر الكيمياء المركزي في كلية العلوم.

الشكل -٣- مقايسة الهوموسستئين



Dithiothreitol solution	٢٠

يجب أن يتم تحضير محلول العمل قبل البدء بالعمل مباشرة ، وإذا لم يستخدم مباشرة يجب أن يتم وضعه بالبراد في الدرجة ٢-٨ Cº مدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة

٤ـخطوات العمل

١ـيؤخذ ٢٠٠مكل من العينة المرضية ، المحكم Adjustor ،محلول المراقبة Control.

٢- يضاف ١٠٠٠مكل من محلول العمل إلى كل الأنابيب ثم ترج .

٣ـتغطى الأنابيب وتوضع في حمام ماء غالٍ ١٠٠Cº مدة ١٥-٢٠دقيقة .

٤ـثم ترفع العينات من الحمام المائي ، وتبرد في حمام مائي مدة ٥ دقائق .

٥ـيضاف ٣٠٠مكل من العينات المعالجة إلى حجرات جهاز IMMULIT

ثانياً:مقايسة الفيتامين B_{12}

١ - المبدأ Principle of procedure

إن طريقة IMMULITE هي ترجمة عن طريق لمعان كيميائي chemiluminescent للطريقة التقليدية (المقايسة الشعاعية radioassay).

٢- تحضير محلول العمل preparation of working solution

تحسب المقادير حسب عدد العينات المراد إجراء مقايستها ، والمقادير المحسوبة لعينة واحدة

	مكل/عينة
Borate-KCN Buffer solution	١٠٠٠

٥-المجـــال الســـوي:المرافـــق للطـــاقم :١٨٠-٩٠٠بغ/مل

المجال السوي المحسوب: x±٢SD

١٨٧-٨٧٤⇔١٧١±٥٣١

ثالثاً:مقايسة حمض الفولي

١- المبدأ

١- بعد إجراءات تحضير العينة ، يتم إدخال كل من العينة المرضية ،و مضاهئ حمض الفولي الموسوم(الربيطة Ligand)،والبروتينات الرابطة لحمض لفولي معاً إلى وحدة الاختبار .

٢-وتحضن في الدرجة ٣٧ C° لمدة ٣٠ دقيقة مع الهز المستمر .

٣-وخلال هذا الوقت يتنافس حمض الفولي الموجود في العينة المرضية مع مضاهئ حمض الفولي الموسوم (الربيطة)على كمية محدودة من البروتينات الرابطة لحمض الفولي ، و يحتبس حمض الفولي المرتبط بالبروتينات من قبل الأضداد الموجودة على الحبيبات ، ويزال المضاهئ غير المرتبط من خلال عملية غسل وتثفيل)

٤-ثم تضاف الفوسفاتاز القلوية الموسومة ضد الربيطة .

٥-وتحضن وحدة الاختبار لمدة ٣٠دقيقة أخرى ويزال الأنزيم غير المرتبط بعملية غسل وتثفيل .

٦-ثم يتم إضافة الركازة ،وتحضن وحدة الاختبار مدة ١٠ دقائق أخرى، إن ركازة اللمعان الكيميائي phosphate esrer of adamantyldioxtane تحضع لإماهة بوجود الفوسفاتاز القلوية لتعطي منتجاً وسيطاً غير ثابت ، ويؤدي الإنتاج المستمر لهذا المنتج الوسيط إلى إصدار Emission ثابت للضوء ،ومن ثم يؤدي إلى تحسين الدقة عن طريق التزويد بنافذة للقراء ة المتعددة .

يقاس المعقد المرتبط- وهكذا إنتاج الفوتونات بمقياس اللمعان luminometer بشكل متعاكس مع تراكيز حمض الفولي في العينة .

٢- طريقة العمل

-تحضير محلول العمل preparation of working solution

تحسب المقادير حسب عدد العينات المراد إجراء مقايستها ، والمقادير المحسوبة لعينة واحدة

مكل/عينة	
١٠٠٠	Borate-KCN Buffer solution
٢٠	Ligand-labeled Folate
٢٠	Dithiothreitol solution

يجب أن يتم تحضير محلول العمل قبل البدء بالعمل مباشرة ، وإذا لم يستخدم مباشرة يجب أن يتم وضعه بالبراد في الدرجة ٢-٨ C° مدة لا تزيد على ٢٤ساعة

٤-خطوات العمل

١- يؤخذ ٢٠٠مكل من العينة المرضية ، المحكم Adjustor ،محلول المراقبة Control.

٢- يضاف ١٠٠٠مكل من محلول العمل إلى كل الأنابيب ثم ترج .

٣- تغطى الأنابيب وتوضع في حمام ماء غال (C°١٠٠) مدة ١٥-٢٠دقيقة .

٤- ثم ترفع العينات من الحمام المائي ، وتبرد في حمام مائي مدة ٥ دقائق .

٥ -يضاف ٣٠٠مكل من العينات المعالجة إلى حجرات جهاز IMMULTE.

٥-المجال السوي:المرافق للطاقم :٣-١٧نغ/مل

المجال السوي المحسوب : x±٢SD

٩,٧±٧,٧⇔٢,٠٥ -
١٧,٤

رابعاً:مقايسة المعالم الشحمية

١.مقايسة الكوليسترول

حيث تم إجراء مقايسة الفيتامينات في مخبر الدكتور ميشيل عبيد.

تمت مقايسة الكوليسترول على جهاز ٧٠٤ Hitachi باستخدام طواقم جاهزة من شركة روش Boehringer Mannheim تعتمد الطريقة الأنزيمية الكاملة CHOD-PAP-method

Cholesterol esterase

Cholesterol esters +H٢O ⟶ Cholesterol +RCOOH

Cholesterol Oxidase

Cholesterol +O٢ ⟶ Cholesterol-٤,one-٣+H٢O٢

Peroxidase

٢H٢O٢+٤-aminophenazone +Phenol ⟶ ٤-(p-benzoquinone-mono-imino)-phenazone+H٢O imino)-phenazone+٤H٢O

يمكن استخدام المصل أو البلازما المأخوذة على هيبارين أو EDTA وتبقى العينات ثابتة مدة أسبوع في الدرجة +C°٤ ومدة أربعة أشهر في الدرجة –٢٠ C° .

٢.مقايسة ثلاثيات الغليسيريد

تمت ثلاثيات الغليسيريد على جهاز ٧٠٤ Hitachi باستخدام طواقم جاهزة من شركة Boehringer Mannheim تعتمد الطريقة الأنزيمية الكاملة

Lipase

Triglycerides +٣H٢O ⟶ Glycerol +٣RCOOH

Glycerokinase

Glycerol +ATP ⟶ Glycerol-٣-phosphate+ADP

Glycerophosphateoxidase

Glycerol-٣-phosphate+O٢ ⟶ Dihydroxyacetonephosphate + H٢O٢

Pyroxidase

H٢O٢+٤-aminophenazon+٤-chlorophenol ⟶ ٤-(p-benzoquinone- mono-imino)-phenazone+H٢O imino)-phenazone+H٢O ٢+HCL

يمكن استخدام المصل أو البلازما المأخوذة على هيبارين أو EDTA وتبقى العينات ثابتة مدة أسبوع في الدرجة +C°٤ ومدة أربعة أشهر في الدرجة –C°٢٠

٣.مقايسة البروتين الشحمي رفيع الكثافة HDL-C

تمت مقايسةHDL-C على جهاز ٧٠٤ Hitachi باستخدام طواقم جاهزة من شركة Boehringer Mannheim تعتمد الطريقة الأنزيمية الكاملة HDL-C plus method

PEGCholesterol esterase

HDL-Cholesterol esters +H٢O ——————————→ Cholesterol +RCOOH

PPG Cholesterol Oxidase

Cholesterol +O٢ ——————————→ Cholesterol-٤,one-٣+H٢O٢

Peroxidase

٢H٢O٢+٤-aminophenazone +HSDA+H+H٢O ————→ quinoniminedye +٤H٢O

HSDA :N-(٢-hidroxi-٣-sulfoprpil)-٣،٥-dimetoxianilina

يمكن استخدام المصل أو البلازما المأخوذة على هيبارين أو EDTA وتبقى العينات ثابتة مدة أسبوع في الدرجة ٤C° +

٤. مقايسة البروتين الشحمي LDL

تم حساب قيمLDL اعتماداً على معادلة Friedwald

[TG/٥ +HDL]

LDL = CHOL-

يمكن استخدام هذه المعادلة ضمن تراكيز لاتتجاوز ٤٠٠مغ/دل.

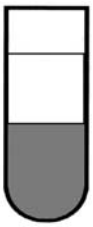
المبدأ

يؤدي إضافة الفيكول إلى الدم المأخوذ على مانع تخثر والتثفيل لفترة قصيرة إلى هجرة متنوعة خلال التثفيل ينجم عنها تشكيل عدة طبقات تحوي أنماطاً محتلفة من الخلايا .فالطبقة السفلية تحوي على الكريات الحمراء، والطبقة التي فوقها مباشرة تحوي على المحببات granulocytes، وبسبب كثافة اللمفاويات الأقل تتوضع على السطح الفاصل بين البلازما و الفيكول ، تؤخذ هذه الطبقة الحاوية على اللمفاويات وتُجرْى لهاعملية غسل لإزالة أي صفيحات ، البلازما ، الفيكول.

خامساً عزل الـDNA

طريقة الفيكول Ficoll

الشكل ـ ٤ـ عزل الـ DNA بطريقة الفيكول



١

تمـزج زجاجـة الفيكـول بقلبهـا عـدة مـرات، ثـم يسحب الفيكول بواسطة السيرنغ.

يضاف ٤ مل من الفيكول إلى عينة دم [٦ مل مـأخوذة علـى مـانع تخثـر EDTA] علـى الجـدار الـداخلي للأنبـوب مـع ملاحظـة عـدم حدوث امتزاج الطورين.

٣

يثفل الأنبوب ٣٠-٤٠ دقيقـة فـي السـرعة ١٣٠٠ RPM في الدرجة ١٨-٢٠ C.

٤

تؤخذ طبقة اللمفاويات وتنقل إلى أنبوب آخر.

ثم أرسلِت عينات الـDNA المعزولة في مخابر كلية الصيدلة إلى مخبر البروفسور هيرمان في جامعة السارلاند حيث تم إجراء التنميط الجيني.

الجدول.٢ صفات المجموعة المدروسة

	مجموعة مرضى الإقفار القلبي	مجموعة المراقبة
عددالأشخاص المدروسين	٧٨	٤٨
العمر بالسنوات	٤٨±٩	٤٦,٩±١١,٥
عددالذكور%	٨٤,٦	٧٧,٠٨

.

عددالأشخاص المدخنين%	٥٠	١٧
ارتفاع التوتر الشرياني%	١٤	١٤,٥
الداء السكري%	٢٩,٤	
عدد الأوعية المصابة% انسداد في وعاء واحد n=٣١ انسداد في وعائين n=٢٧ انسداد في ثلاثة أوعية n=١٧	 ٤١,٣ ٣٦ ٢٢,٦	

الجدول.٣ مقارنة المعالم الحيوية المدروسة بين مجموعتي مرضى الإقفار القلبي و الأسوياء

	مجموعة مرضى الإقفار القلبي (n=٧٨)	مجموعة المراقبة (n=٤٨)
T.CHOL	٥٠±٢٢٧	٤٥±٢٠١
TG	٩١,٦±٢٣١	٦٣±١٧٠
HDL-C	٨,٧٧±٣٠,٤	٨,٢±٣١,٦
LDL-C	١٣٩,٧±٥٤,٦	٣٧ ±١٣٠
Homocysteine*	١١,٨٨± ١٦,٠١	٨,٩٨± ١١,٤٣
Folic acid***	٣±٦,٠٦	٤,١٦±٦,٧٤
B_{12}***	٢٧٥,١٣١±٣٩٠,٩١	٢٧٥,٦٦±٣٨٠,٧١
* (P<٠. ٠١) ** (p<٠,٠٥) *** NS Not significant		

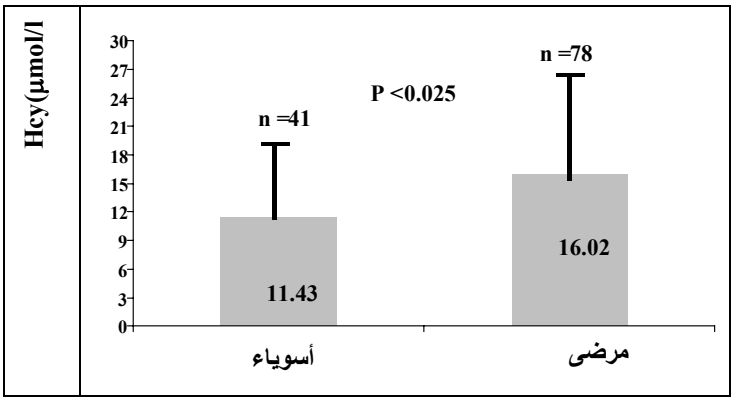
٣.النتائجResults

بينت النتائج أن التدخين كان في مقدمة العوامل المؤهبة للإصابة بداء الإقفار القلبي، وهذا يتماشى مع مختلف الدراسات العالمية، ولم نغفل دور الجنس(الذكورة)بوصفه عامل خطورة هاماً يؤدي إلى ارتفاع معدل الإصابات الوعائية عند الرجال عما هو عليه عند النساء قبل الإياس.

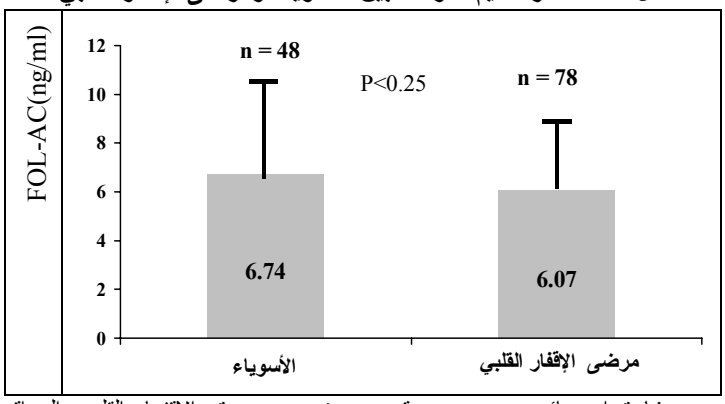
أولاً: تركيز الهوموسستئين،

الفولات، الـB_{12} ،الأنماط الجينية للـMTHFR حيث كانت مستويات الهوموسستئين أعلى عند مجموعة الـCAD من الأسوياء بفارق إحصائي جوهري P<٠,٠١. مما يدل على أن الهوموسستئين يشكل عامل خطورة قلبية الشكل ٥

الشكل ـ ٥ ـ مقارنة قيم الهوموسستئين بين الأسوياء ومرضى الإقفار القلبي



الشكل ـ ٦ ـ مقارنة قيم الفولات بين الأسوياء ومرضى الإقفار القلبي



لم نلحظ وجود فارق إحصائي جوهري بين قيم الفولات والـ B_{12} بين مجموعتي المرضى والأسوياء الشكل ٦.

دُرِسَتْ تكرارية زيادة الهوموسستئين، وتناقص الفيتامين عند المجموعات المرضية والأسوياء وهي موضحة في الجدول ٤

فقد لحظنا وجود فرط في الهوموسستئين عند مرضى الإقفار القلبي بنسبة ٣٣% وهي أعلى من نسبة وجوده في مجموعة المراقبة بنحو ٢٠% وهذا يتفق مع العديد من الدراسات العالمية.

أما بالنسبة لعوز الفولات فقد كان تقريباً متماثلاً عند مجموعتي الإقفار القلبي المراقبة وهي على الترتيب ٥%، ٤%.

تم تحديد تواتر الطفرة MTHFRC٦ ويبين الجدول ٦ تواتر الأليل والأنماط الجينية لدى الأسوياء والمرضى، تواتر النمط متماثل الزيجوت للطفرة (V/V) لدى مجموعة المرضى ١٢% كان أعلى من تواتره لدى الأسوياء ٨,٥ ولكن ليس بفارق ذي دلالة إحصائية. ووجد أن تواتر الأليل الطافر ٣٢% فالطفرة كانت شائعة لدى المجموعتين .

الجدول. ٤. تواتر زيادة لهوموسستئين، وتناقص الفيتامينات

	Controls	CHD
Increased HCY%	١٣	٣٣
Decreased folate%	٤	٥
Decreased $B_{١٢}$%	١١	٢٣

الجدول ٦. تواتر الأنماط الجينية للـMTHFR النمط السوي (ألانين) والنمط الطافر(فالين)، والأنماط الجينية الثلاثة (A/A,A/V,V/V) عند الأفراد الأسوياء n=١٠٥ ومرضى الـCAD ٧٥ n=

	مجموعة مرضى الإقفار القلبي		مجموعة المراقبة	
	العدد	التواتر	العدد	التواتر
النمط السوي A/A	٣٥	% ٤٦,٧	٤٦	%٤٣,٨
النمط متخالف الزيجوت A/V	٣١	%٤١,٣	٥٠	%٤٧,٦
النمط متماثل الزيجوت V/V	٩	%١٢	٩	%٨,٥٨
	٧٥		١٠٥	

ثانيـاً: علاقـة الأنمـاط الجينيـة للـ MTHFR مـع مسـتويات الفـولات، الهوموسستئين

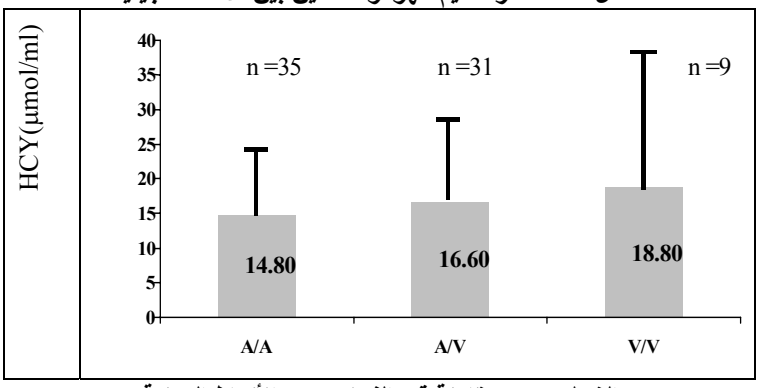
يبين الجدول٧ .مقارنة للمعالم الحيوية المدروسة بين الأنماط الجينية المختلفة لدى مجموعتي المرضى والأسوياء.

الجدول ٧.مقارنة المعالم الحيوية بالاعتماد على الأنماط الجينة للـMTHFR

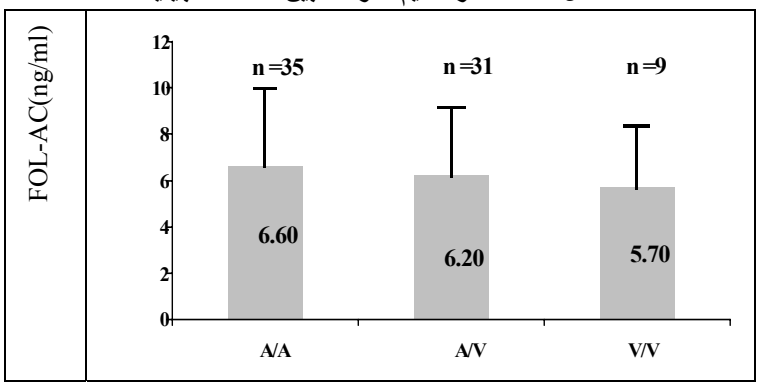
MTHFR			
	النمط متماثل الزيجوت V/V	النمط متخالف الزيجوت A/V	النمط السوي A/A
Age	١٢,٥±٥٤,٧	٨,٦±٥٢,٤	٨,٥±٥٤,٣
BMI(g/m²)	٤±٢٥,٥	٣,٥±٢٦,٣	٣,٣٤±٢٦,٩
T- CHOL	٩٢,٣±٢٥٢,٥	٦٦,٢±٢٠٧,٢	٨٦,٩±٢٣٩,٩
TG	١٥٧,٣±٣١٤,٦	١١١,٤±٢١٢,٥	١١٥±٢٣٦,٦
LDL	٥٤,٥±١٠٤,٤	٤٨,٥±١٣١,٥	٤٦,٣±١٥٤,٥

HDL	١١,٦٥±٣٦	٧±٣١,٣	٩,٣±٢٦,٨
Smoke	٥	١٦	١٨
Diabetes	٢	١٢	٧
Folic acid	٢,٩±٥,٧	٣,١±٦,٢	٣,٤±٦,٦
$B_{١٢}$	٣٢٦±٤٤٧	٢٩١±٣٨٢	٢٥١±٣٩٤,١
Homocysteine	١٠,٨±١٨,٨	١١,٨±١٦,٦	٩,٢±١٤,٨

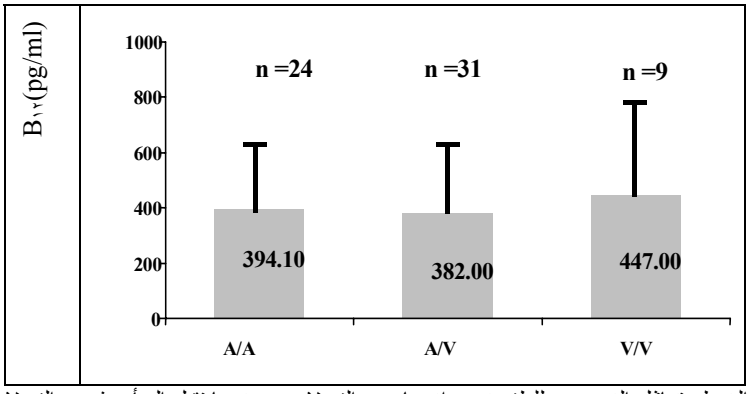
الشكل ـ ١٠ ـ مقارنة قيم الهوموسستئين بين الأنماط الجينية



الشكل ـ ١١ ـ مقارنة قيم الفولات بين الأنماط الجينية



الشكل ـ ١٢ ـمقارنة قيم الـB١٢ بين الأنماط الجينية



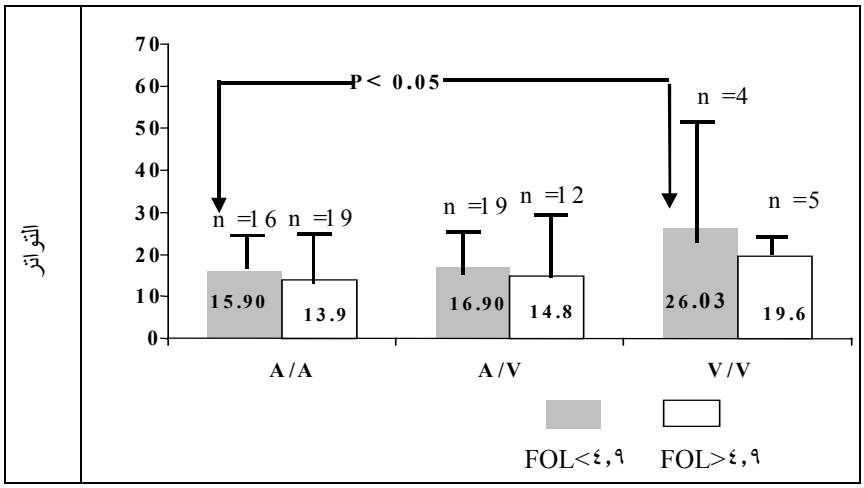
يترافق النمط متماثل الزيجوت للطفرة مع ازدياد مستويات الهوموسستئين أكثر من النمط السوي ولكن يبقى هذا الفارق غير جوهري الشكل ١٠. ولم تختلف أيضاً مستويات الفولات، B_{12} بين الأنماط الجينية عند الأسوياء ومجموعة الـCAD الشكل ١١،١٢.

من المحتمل أن تؤثر طفرة MTHFR (C٦٧٧T) في مستويات الفولات لأن ٥- ميتيل تيتراهيدروفولات هو الشكل الأهم في دورة الفولات وعندما تقل المأخوذ من الفولات فإن الطفرة تغير مستويات الفولات عند الأفراد الحاملين لهذه الطفرة، لذا تم تقسيم العينات بالاعتماد على مستويات الفولات حيث تم حساب قيم الوسط median للفولات لدى مجموعة الـCAD وبلغت ٤,٩ نغ/مل . ويلخص الجدول ٦ مستويات الهوموسستئين عند مجموعة الـ CAD بالاعتماد على قيم الوسط لمستويات الفولات

الجدول٨.مقارنة قيم الهوموسستئين بالاعتماد على قيمة الوسيط للفولات

	النمط متماثل الزيجوت VV(٢)	النمط متخالف الزيجوت AV(١)	النمط السوي AA(٠)	P value
FOL<٤,٩ ng/ml	١٨,٧±٢٦,٠٣	١٠,١±١٦,٩	٨,٢±١٥,٩	P<٠,٠٥
FOL>=٤,٩ng/ml	٢,٨±١٩,٦	٤,٨±١٤,٨	١٠,١±١٣,٩	NS

الشكل ـ ١٣ـ مقارنة قيم الهوموسستئين بين الأنماط الجينية بالاعتماد على مستويات الفولات



الجدول٧.علاقة ارتباط الهوموسستئين مع كل من الفولات والـ $B_{١٢}$

	مجموعة الإقفار القلبي		مجموعة المراقبة	
	R	**معادلة الانحدار**	R	**معادلة الانحدار**
Homocysteine Folic acid	R=٠,٢١ p<٠,٠١	HCY=-٢٠,١٣ FOL٠,٦٧٩	R=٠,١٣ p<٠,٠٠٥	HCY.=-١٥,٨٥ FOL٠,٦٩
Homocysteine $B_{١٢}$	P<٠.١(NS)	HCY= $B_{١٢}$ ٠,٠٠٦-١٧,٨٩	R=٠,١٢ p<٠,٠٠٥	HCY=٠,٠٠٦-١٢,٢ $B_{١٢}$
Folic acid $B_{١٢}$	NS			

حيث لم نجد فارقاً إحصائياً جوهرياً عندما كانت القيم أعلى من الوسط، ولكن ظهر هذا الاختلاف في مستويات الهوموسستئين بين النمط الطافر وبين النمط السوي عند قيم الفولات الأخفض من الوسط. هذه البيانات أوضحت التآثر بين النمط الطافر وحالة للفولات في إحداث ارتفاع في مستويات الهوموسستئين الشكل١٣

ثالثاً: الهوموسستئين والفولات والـ$B_{١٢}$

أبدت دراسة العلاقة بين الهوموسستئين وكل من الفولات والـ$B_{١٢}$وجود علاقة ارتباط عكسية بين الهوموسستئين والفولات عند مجموعتي المرضى والأسوياء، في حين توجد علاقة عكسية بين الهوموسستئين والـ$B_{١٢}$ فقط عند مجموعة الأسوياء ولم نلحظ علاقة مماثلة عند المرضى، ونتائج هذه العلاقات ومعادلات الانحدار موجودة في الجدول٩ .

المناقشة DISCUSSION

يوجد فرط الهوموسستئين الخفيف لدى ٥-٧% من عامة الشعوب [٢٥]، كما لوحظ أنه يشكل عاملَ خطورةٍ مستقلاً للإصابة بداء الشرايين الإكليلية.[١٠،٢٦،٩،١٤]

إلا أن الأسباب المؤدية إلى حدوث زيادة في مستويات الهوموسستئين ما زالت مجهولة، فالارتفاع في مستويات الهوموسستئين قد تنجم عن أخطاء جينية أو أعواز تغذوية(السبب الأكثر شيوعاً في حدوث فرط الهوموسستئين الخفيف قد يكون ناجماً عن أعواز تغذوية خاصة الفولات)[١٧،٢٤].

ولحظ وجود أخطاء إنزيمية شديدة ولكنها نادرة في عدة نقاط من طريق استقلاب الهوموسستئين سواء في طريق نقل الكبريت أو طريق إعادة الميتيل، والتي يمكن أن تؤدي إلى حدوث أمراض وعائية في سن الشباب. من ذلك الـMTHFR التي تحفز إرجاع ٥،١٠ ميتيلين تيتراهيدروفولات إلى ٥-ميتيل تيتيراهيدروفولات وهو الشكل الجائل للفولات وكما أنه معطٍ للميتيل لإعادة إمتال الهوموسستئين إلى الميتيونين. [١٣،٢٧]

وقد تم التعرف إلى طفرة تؤدي إلى استبدال الـ C إلى T في النيوكلوتيد ٦٧٧ (حيث يستبدل الحمض الأميني الفالين مكان الآلانين)في جين أنزيم MTHFR، والتي تؤدي إلى حدوث عطوبية بالحرارة للأنزيم، والتي ترتبط مع حدوث ارتفاع في مستويات الهوموسستئين ولا سيما الأفراد متماثلي الزيجوت ذوي مستويات الفولات المنخفضة. [١٢،٢٢،٢٦]

تم التعرف في دراستنا إلى ما يأتي

أولاً: يشكل الهوموسستئين عاملَ خطورةٍ قلبية.ولم تختلف قيم الفولات الـ B_{12} بين المجموعتين بفارق إحصائي جوهري.ونتائج دراستنا تشبه دراسة Christensen، Jing Ma إذ لم يلحظا وجود فارق جوهري بين تركيز الفولات عند المرضى والأسوياء.[٦،٢٧]

وقد لحظ Pancharunti في دراسته وجود فارق إحصائي جوهري بين مستويات الفولات عند الأسوياء لدى مقارنتها مع مرضى داء الشرايين الإكليلية، كما وجد علاقة بين الفولات وبين الإصابة بداء الشرايين الإكليلية [١٦].

ولحظ Ann M Molly في دراسته والتي قاس فيها مستويات الفولات المصلية ،ومستويات الفولات داخل الكريات الحمراء واستنتج أنه لا تعكس بالضرورة مستويات الفولات المصلية حالة الفولات في الجسم، ويفضل قياس الفولات داخل الكريات الحمراء كبديل عنها، لأن تناول الفولات يكون له تأثير خفيف في مستويات فولات الكريات الحمراء، ولكن يؤدي إلى حدوث انحراف في قيم الفولات المصلية [١٩]. وأخفقت إحدى الدراسات الأوربية في التأكيد على ذلك إذ لوحظ أن مستويات فولات الكريات الحمراء أخفض عند المرضى من الأسوياء، ولكن بقي هذا الفارق غير جوهري.ويمكن أن يعزى الاختلاف بين الدراسات إلى الاختلاف في تواتر الطفرة MTHFR($C_{٦٧٧}T$) بين مجموعتي المرضى والأسوياء بين الشعوب المدروسة.

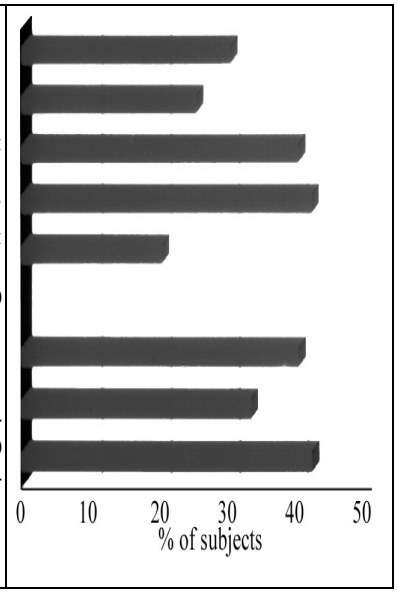
ثانياً: تواتر الأليل لهذه الطفرة وبلغ لدى جمهرة سورية ٣٢%، ويوجد النمط الطافر عند ١٢% من مرضى الإقفار القلبي، بينما يوجد عند٨،٥% لدى الأفراد الأسوياء. في حين يوجد النمط متخالف الزيجوت عند ٤١،٣ % من مرضى الإقفار القلبي، ويوجد عند ٤٧،٦% من الأسوياء.ولمّا كان لا يوجد فارق إحصائي جوهري بين تواتر النمط الطافر بين مرضى الإقفار القلبي والأسوياء فقد تم استنتاج أن الطفرة المدروسةMTHFRC٦٧٧T لاتشكل عامل خطورة قلبية.

ثانياً: كما لحظنا وجود فرط في الهوموسستئين عند مرضى الإقفار القلبي بنسبة ٣٣% وهي أعلى من نسبة وجوده في مجموعة المراقبة بنحو ٢٠% وهذا يتفق مع

العديد من الدراسات العالمية.حيث يلخص الجدول٨.والشكل١٤. نسبة انتشار فرط الهوموسستئين عند مرضى الأوعية في العديد من الدراسات العالمية،في بعض هذه الدراسات ارتفعت مستويات الهوموسستئين الصيامية، على حين في الدراسات الأخرى ارتفعت مستويات الهوموسستئين بعد حمل الميتيونين، وكان لدى بعض المرضى ارتفاع في مستويات الهوموسستئين الصيامية وبعد حمل

الميتيونين.وكما وجد Boers ومساعدوه ارتفاعاً ٢٨% من مرضى الشرايين المحيطيةوالأوعية لمستويات الهوموسستئين بعد حمل الميتيونين عند الدماغية [٩].

الشكل.١٤.انتشار فرط الهوموسستئين



الجدول ـ ٨ ـ نسبة انتشار فرط الهوموسستئين

Author	population	Basal versus post HH(e)	Findings
Boers	Early onset arterial disease	Post load	HH(e)in ٢٨٪of patient
Malinow	Healthy and vascular disease	Basal	High H(e)in patients
Stampfer	Male physicians(prospective)	Basal	High H(e) in physicians who had and MI
Clarke	Early vascular disease	Post load	High H(e) in٢٨-٤٢٪of patients
Den Heijer	Venous thrombosis	Basal	High risk of thrombosis if H(e)>٩٠ th percentile

Alfthan	Finnish epidemiology study	Basal	No association between high H(e)and vascular disease
Fermo	Venous and arterial disease(age<٤٥ years)	Basal and post load	Post load detected higher incidence of H(e)in patients
Falcon	Juvenile venous thrombosis	Basal and Post load	١٩٪of patients hadHH(e)
Selhub	Elderly in Framingham study	Basal and Post load	Twofold increase in carotid disease in subjects with highest H(e)
Munshi	Diabetes with vascular study age <٦٠ years	Post load	٤٢٪DM with vascular disease gad high H(e)
Bostom	End-stage renal disease	predialysis	High H(e)
HH (e)=hyperhomocysteinemia, H (e) homocysteine, MI=myocardial infraction, DM=diabetes mellitus.			

أما بالنسبة لعوز الفولات فقد كان تقريباً متماثلاً عند مجموعتي الإقفار القلبي المراقبة وهي على الترتيب٥%،٤%.

وهذا يتوافق مع نتائج بعض الباحثين، ففي الدراسة التي أجراها Joosten على ٦٤ شخصاً سوياً تتراوح أعمارهم ٦٥-٨٨ سنة، وقارنهم مع ٢٨٦ مريضاً تتراوح أعمارهم ٦١-٩٧ سنة وجد نسبة عوز B٦ عند ٩%، ٥١%،وعوز الفيتامين$B_{١٢}$ موجود عند ٦%،٥%،وعوز الفولات موجود عند ٥%،٩%.

وفي الدراسة التي أجراها Berg على ١٠٢ من الأفراد الأسوياء أعمارهم ٦٥< عاماً حظ وجود فرط للهوموسستئين عند ٣٨% وأمّا عوز الفيتامين B٦ فهو موجود عند ١٧%، وعوز الفيتامين $B_{١٢}$ والفولات عند ٦% .وأما نسب عوز الفيتامينات عند المرضى فهي ٦% $B_{٦}$ ،و٥% $B_{١٢}$ ، و١٤% للفولات، وبلغت قيم فرط الهوموسستئين عند المرضى ٥١%.

وفي الدراسة التي أجراها Herrmann على مجموعة من المتقدمين بالعمر إذ لاحظ وجود عوز في B٦ عند٤٣ % من المسنين٨٥-١٠٢سنة في حين يوجد عند ٢٢% من الكبار١٩-٦٠ سنة، ويوجد عوز الفيتامين $B_{١٢}$ عند ٢٠% من المتقدمين في العمر،وعند ٨% من الكبار.[٤]

وأما عوز الفولات فيوجد لدى ١% من المسنين،وقد تعزى وجود نسبة قليلة من عوز الفولات من وجهة نظره إلى الحاجة إلى إعادة تحديد المجالات المرجعية للطاقم المستخدم.

ثالثاً: تم التعرف إلى طبيعة العلاقة بين الهوموسستئين والفولات فلوحظ وجود علاقة عكسية قوية سواء في مجموعة المرضى أو مجموعة المراقبة . كما تم التعرف إلى طبيعة العلاقة بين الهوموسستئين والفيتامين$B_{١٢}$ فلوحظ وجود علاقة عكسية لدى مجموعة المراقبة، في حين لم توجد هذه العلاقة عند مجموعة المرضى (الإقفار القلبي) حيث تم ملاحظة التأثير المباشر في حدوث ازدياد في مستويات الهوموسستئين والناجم عن تناقص مستويات الفولات.في حين

نلحظ أن هذا التأثير كان أقل وضوحاً مع الفيتامينB_{12} ، وقد يكون السبب في قوة تأثير تناقص مستويات الفولات في حدوث ازدياد مستويات الهوموسستئين عما هو ملاحظ مع تناقص مستويات B_{12} إلى أن الفولات تؤدي دور ركيزة، ومن ثمَّ تكمن ضرورتها في استقلاب الهوموسستئين، بينما يقوم الـB_{12} بدور عامل مشارك ومن ثم يكون دوره أقل أهمية،أوقد يكون السبب في ذلك هو الحاجة إلى مشعر أكثر حساسية للتعبير عن مستويات الـ B_{12} مثل قياس مستويات حمض المالوني.[٢٠]

كما تم ملاحظة أن العلاقة بين الهوموسستئين والفولات كانت أقوى عند مجموعة المراقبة عما هو عليه في المرضى، وقد يكون السبب في أن ازدياد مستويات الهوموسستئين لدى المجموعة المرضية أدت إلى إضعاف العلاقة بين الهوموسستئين عند الأسوياء عما هو ملاحظ لدى المجموعة المرضية، وتم استنتاج قوة تأثير الفولات في الهوموسستئين كما يأتي: فعندما تكون قيمة الفولات مساوية للصفر تكون قيمة الهوموسستئين مساوية ٢٠,٣عند المرضى في حين تكون مساوية عند الأسوياء ١٥,٨٥ مما يدل على وجود عوامل أخرى عند المرضى تؤدي إلى حدوث فرط هوموسستئين(مثلاً:الطفرات الأخرى فيMTHFR أو في الميتيونين سينتاز أو عوامل أخرى..)

رابعاً: MTHFR (C٦٧٧ T) و الهوموسستئين وقد تمت مقارنة مستويات الهوموسستئين عند مجموعة مرضى الإقفار القلبي وعلى الرغم من وجود تزايد تدر يجي في قيم الهوموسستئين بين الأنماط الجينية على الترتيب(AA ، AV،VV) إلا أن هذا الفارق لم يكنْ ذا دلالة إحصائية .وقد يعود السبب إلى أن مستويات هوموسستئين البلازما قد تتأثر بعدد كبير من العوامل (مثلاً :الوظيفة الكلوية، الطفرات الأنزيمية الأخرى،)لذا لجأنا إلى تقسيم العينات وفقاً لقيم وسيط الفولات (مجموعة مرضى الإقفار القلبي) ووجد ت علاقة إحصائية بين النمط الجيني الطافر(VV)للـ MTHFR (C٦٧٧ T) وبين الهوموسستئين في العينات ذات مستوى الفولات الأقل من الوسيط، في حين لم يوجد فارق إحصائي بين النمط (VV)للـ MTHFR (C٦٧٧ T) وبين الهوموسستئين في العينات ذات مستوى الفولات الأعلى أو المساوية للوسيط. مما مكننا من القول إنَّ الطفرة المدروسةMTHFR C٦٧٧T لاتشكل عامل خطورة قلبية، ولكنها تؤدي إلى إحداث فرط في مستويات الهوموسستئين لدى الأفراد الذين يعانون من عوز في الفولات، ومن ثمَّ تؤدي إلى زيادة خطورة الإصابة القلبية لديهم، وعلى العكس من ذلك تم تعديل دور الطفرة في حال وجود كفاية من حمض الفولي.

المصادر

١.Ueland.PM, Refsum.H, Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in healthy, disease, and drug therapy. J lab Clin Med.١٩٨٩: ١١٤-٤٧٣.

٢.Mayer.E L, Jacobsen.W D, Robinson .K. Homocysteine and Coronary Atherosclerosis .J Am Coll Cordial, ٢٧:٥١٧-٢٧،١٩٩٦.

٣.Wong XL, et al,Relationship between total plasma homocysteine, polymorphism of homocysteine metabolism related enzymes,risk factors and

coronary artery disease in the Australian hospital- based population.Atherosclersis,١٤٦(١):١٣٣-٤٠،١٩٩٩.

٤. Herrmann.W. Quast.S, Ullrish, Schultze.H,Bodis.M, Geisel.J...Hyperhomocysteinemia in high aged subjects:relation of B-vitamins,folic acid,renal function and methyltetrahydrofolate reductase

mutation, Atherosclerosis,١٤٤،٩٩-١٠١,١٩٩٩.

٥.Rosenson S.R.Kang.S.S.Hperhomcysteinemia, atherosclerosis, and venous hrombolism.١٩٩٧,

٦.Christensen.B, Frosst.P, Cacan.L, Selhub J, Gyotte P, Rossenblatt D.S, Genest J, Rozen.R.Coorelation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate redyctase gene with

٧.Refsum.H, Ueland.M, Homocysteine and cardiovascular disease

٨.Andrzej.J, Olszewski, McCully.Fish oil decrease serum homocysteine in hyperlipemic men. Coronary Artery Disease.١٩٩٣, ٤:٥٣-٦٠.

٩.Guba S. C, et al. Hypehomocysteinenemia. Clinical chemistry, ١٠٦(٦): ٧٠٩-٧٢٢،١٩٩٦.

١٠. Gallagher PM, et al, Homocysteine and risk of premature coronary artery disease. Evidence for common gene mutation. Circulation, ٩٤(٩): ٢١٥٤-٨،١٩٩٦

١١.McQullan BM, et al. Hyperhomocysteinemia but not C٦٧٧Tmutation of methylene tetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant carotid wall thickening theperth carotid ultra sound disease. Assessment study.Circulation.٩٩ (١٨): ٢٣٨٣-٨,١٩٩٩.

١٢. Van Bockxmeer FM, methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. Circulation.٩٥ (١): ٢١-٣.

١٣. Kluijtmans LS.et al. thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary disease.Circulation.٩٦ (٨): ٢٥٧-٧,١٩٩٧.

١٤. McCully k S. Homocysteine and vascular disease. Nature Medicine, ٢(٤): ٣٨٦-٣٨٩،١٩٩٦.

١٥. Eikelboom.W. J, et al. Homocysteine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiological evidence. Ann Intern med, ١٩٩٩،١٣١:٣٦٣-٣٧٥.

١٦.Pancharuniti.N, et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B١٢concentration and risk for early onset coronary artery disease. Am J Clin Nutr.١٩٩٤, ٥٩:٩٤٠-٨.

١٧. Kishore J, et al, and Potential new cardiovascular risk factors: left ventricular

Hypertrophy, Homocysteine, Lipoprotein (a), Triglycerides, Oxidative stress, and Fibrinogen, Ann Intern Med, ١٣١(٥): ٣٧٦-٣٨٦،١٩٩٩,

١٨. Selhub J, et al, Serum totals homocysteine concentration in the third national health and nutrition survey (١٩٩١-١٩٩٤): population to high serum concentrations, Ann Intern Med, ١٣١(٥): ٣٣١-٣٣٩،١٩٩٩.

١٩. Molloy .M.A, et al. Thermolabile variant of ٥،١٠-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folate: implications for folate intake recmmendations.Lancet.١٩٩٧, ٣٤٩:١٤٩١-٩٣.

٢٠. Herrmann.W.Rolr of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnostics of vitamin deficiency in high-aged subjects. European journal of clinical Investigation.٣٠٣٠,١-٨,٢٠٠٠.

٢١.McCully k S .the Homocysteine Revolution .١٩٩٧

٢٢-Verhoef. P.Stampfer.M,Rimm.E B.Folate and coronary heart disease.Lipidology.٩: ١٧-٢٢,١٩٩٨.

٢٣-Ueland. P.M. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin.chem.٣٩ (٩): ١٧٦٤-١٧٧٩,١٩٩٣.

٢٤.McCully k S. Homocysteine and vascular disease. Nature Medicine.١٩٩٦,٢ (٤): ٣٨٦-٣٨٩.

٢٥-Kang.S.S, Wong.P.W.K.Genetic and non-genetic factors for moderate Hypehomocysteinenemia. Atherosclerosis, ١١٩:١٣٥-١٣٨،١٩٩٦

٢٦.Lalouschc.k, Aull.S, Serles.W. Schnidwr.P, Mannhalter, Lang.T, Deecke.L, Zeifer,K, Genetic and nongenetic factors influencing plasma homocysteine levels in patents with ischemic cerebrovascular disease and healthy control subjects. J Lab clin Med.١٩٩٩, ١٣٣:٥٧٢-٢٧. Ma J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate homocysteine, and risk of myocardial infraction in in US physicians.Circulation.٩٤ (١٠): ٢٤١٠-٦,١٩٩٦.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: ٢٠٠١/١١/١١.
تاريخ قبوله للنشر: ٢٠٠٢/٣/٢٣.