大韓不妊學會誌: 第29卷 第3號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 3, 2002, 9

반복자연유산 환자에서 Homocysteine과 Methylenetetrahydrofolate Reductase 돌연변이의 상관관계에 대한 분석

포천중문 의과대학 산부인과학교실, 임상의학연구소*

남윤성 · 차광렬 · 김남근* · 강명서* · 김세현* · 오도연*

The Analysis of Interrelationship between Homocysteine and Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation in Patients with Recurrent Spontaneous Abortion

Yoon Sung Nam, Kwang Yul Cha, Nam Keun Kim*, Myung Seo Kang*, Se Hyun Kim*, Doyeon Oh*

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute for Clinical Research, College of Medicine, Pocheon CHA University, Pocheon, Korea*

Objective: To analyze the interrelationship between homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation in patients with recurrent spontaneous abortion.

Material and Method: Homocysteine and MTHFR mutation were tested by fluorescent polarizing immunoassay and PCR-RFLP method, respectively.

Results: In patients with homocysteine level less than 5 ?mol/L, there was no case of normal group but there were four cases of heterozygosity and one case of homozygosity. In patients with homocysteine level 5~10 ? mol/L, the number of normal, heterozygosity and homozygosity group were eleven, eighteen and eight, respectively. In patients with homocysteine level 10~15 ? mol/L, the number of normal, heterozygosity and homozygosity group were four, one and one, respectively. In patients with homocysteine level more than 15 ? mol/L, there was no case of normal and heterozygosity group but there were two cases of homozygosity.

Conclusions: Hyperhomocysteinemia due to MTHFR mutation is a cause of recurrent spontaneous abortion. And there was a significant relationship between homocysteine and MTHFR mutation.

Key Words: Recurrent spontaneous abortion, Homocysteine, MTHFR mutation

Homocysteine 과다증은 선천적으로 발생하거나 환경요인이 복합된 결과로 나타난다. 지난 20년 동안의 연구 결과 homocysteine 과다증이 혈전색전증(thromboembolism)의 위험인자라는 사실이 밝혀졌다. 또 최근에는 homocysteine 과다증이 반복자연유산과도 관계가 있다는 것이 증명되었다. Homocysteine 과다증이 혈전을 유발하는 기타의 위험인자와 다른 점은 다음과 같다. 첫째, 이것은 동맥과 정맥 모두에서 혈전을 유발한다. 둘째, 이것은 엽산이나 다른 비타민으로 쉽게 치료가 가능하다.

Homocysteine은 필수 아미노산인 methionine으로부터 전환된 비단백성 sulfhydryl 아미노산이다. 이것은 유리형과 단백결합형의 두 가지 형태로 존재하며 혈장에서 산화되어 homocysteine-homocysteine

주관책임자: 남윤성, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 650-9, 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3412, Fax: (02) 555-9007, e-mail: ysnam@cha.ac.kr

과 homocysteine-cysteine으로 된다. 유리형과 단백결합형 뿐만 아니라 disulfide를 통틀어 총 homocysteine이라 한다. 세포내에서 homocysteine의 대사는 비타민과 관계된 효소경로를 통하여 일어난다. Homocysteine이 methinone으로 되는 데는 두 가지 경로의 재메틸화 (remethylation)가 있고 cysteine으로 되는 데는 한 가지의 황전환작용 (trans-sulfuration)이 있다. Methinone synthase에 의해 촉매되는 재메틸화 경로에는 cobalamin이 조인자 (cofactor)로 작용한다. Methyl기는 혈장의 주요한 엽산인 5-methyltetrahydrofolate에 의해 부가된다. 5-methyltetrahydrofolate는 5,10-methylenetetrahydrofolate가 Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)에 의하여 환원 (reduction)된 것이다. MTHFR의 무내열성 변이 (thermolabile variant)는 핵산염 (nucleotide) 677 부위에서 cytosine이 thymine으로 바뀌어 alanine이 valine으로 치환되는 것이다. 간에서 이루어지는 재메틸화 경로에서는 betaine이 methyl donor이며 이 반응은 betaine-homocysteine methyltransferase에 의하여 촉매된다. 황전환작용에서는 homocysteine이 cystathionine ?-synthase (CBS)에 의해서 cystathionine으로 전환된다. 여기에서는 비타민 B_6의 부산물인 pyridoxal-5-phosphate가 조인자로 작용한다. 비타민 B_6는 cystathionine이 cysteine과 alpha-ketobutyric acid로 전환되는데 필요하다.

Homocysteine 과다증의 치료로는 엽산을 단독으로 투여하거나 cobalamin과 비타민 B_6를 복합적으로 투여하는 방법이 있다. 세 가지를 동시에 사용하는 경우 엽산이 가장 효과적인데 그 이유는 공복상태의 homocysteine 수치를 가장 빨리 감소시키기 때문이다. 그렇지만 비타민 B_6는 methionine 부하 후의 homocysteine 수치를 감소시키기 때문에 엽산에 추가하여 사용해야 한다. 이러한 사실은 methionine 부하검사가 비타민 B_6가 조인자로 작용하는 황전환작용 경로에 가장 민감하다는 것을 보여준다. 현재로서 homocysteine 과다증의 치료로 권장되는 것은 엽산을 하루에 최소 0.5 mg 복용하는 것이다. 또 cobalamin 신경병 (neuropathy)의 위험성 때문에 비타민 B_6와 B_{12}를 추가해서 사용해야 한다.

최근 들어 반복자연유산 환자들에 대한 연구에서 MTHFR 유전자의 돌연변이에 따른 homocysteine 과다증으로 인한 혈전과의 연관성이 보고되고 있다. 본 연구의 목적은 반복자연유산 환자에서 homocysteine을 측정하고 MTHFR 유전자의 돌연변이를 조사하여 그 상관관계를 조사하는데 있다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1999년 3월부터 2001년 2월까지 차병원을 방문한 반복자연유산 환자 50명을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) Homocysteine

검체는 EDTA 항응고제가 포함된 채혈관에 혈액을 채취하여 1,000 g에서 15분간 원심분리 후 얻은 혈장을 사용하였다. 바로 검사가 불가능한 경우는 -70도에서 보관하였다. 검체는 12시간 금식 후 채혈하는 것을 원칙으로 하였다. Homocysteine은 FPIA (fluorescent polarizing immunoassay) 방법으로 IMx (Abbott, USA) 기기를 이용하여 측정하였다.

2) MTHFR 유전자 돌연변이

DNA 분리는 DNA 추출키트 (extraction column, QIAmp blood kit, Qiagen)에 의해 제조자의 프로토콜에 따라 환자의 혈액에서 추출한 백혈구로부터 분리하였다. 분리한 DNA 표본은 시발체 세트 (primer set)인 sense primer (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3')와 antisense primer (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3')를 사용하여 GeneAmp PCR machine (Perkin Elmer 2400)으로 증폭시켰다. 198 bp 생성물을 증폭시키기 위해 95℃에서 60초 동안 변성시킨 후 61℃에서 60초 동안 시발체를 아닐링시킨 다음 72℃에서 120초 동안 시발체 연장반응을 시행하는 과정을 35사이클 반복하였다. 증폭된 단편에서 단편들에서 677 C → T 변이를 인식할 수 있는 제한효소 *Hinf* I (10 unit/reaction mixture)으로 37℃에서 3~4시간 동안 반응하였다. A (Ala) 대립유전자 (allele)에서 얻어진 198 bp 단편은 *Hinf* I로 분해되지 않는 반면에 V (Val) 대립유전자에서 얻어진 같은 길이의 단편들은 175 bp와 23 bp 단편으로 분해되었다. 이후 *Hinf* I으로 처리한 단편들을 2.5% agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 변이상태를

Table 1. MTHFR gene mutation according to different homocysteine levels in patients with recurrent spontaneous abortion

Homocysteine	CC	CT	TT	Total
5 ?mol / L ↓		4	1	5
5~10 ?mol / L	11	18	8	37
10~15 ?mol / L	4	1	1	6
15 ?mol / L ↑			2	2

Table 2. The analysis of interrelationship between homocysteine and MTHFR reductase mutation in patients with recurrent spontaneous abortion by Cochran-Mantel-Maenszel statistics

Statistic	Alternative Hypothesis	DF	Value	Prob
1	Nonzero Correlation	1	0.0089	0.9249
2	Row Mean Scores Differ	2	6.0689	0.0481
3	General Association	6	12.9491	0.0439

관찰하였다.

3. 통계 분석

각각의 homocysteine 수치에서 MTHFR 유전자 돌연변이와의 유의성 검정은 Cochran-Mantel-Maenszel 검정 방법을 이용하였다.

결 과

Homocysteine 수치가 5 ?mol/L 이하인 집단에서 정상인 경우는 없었고 이형접합체 (heterozygosity)가 4명, 동형접합체 (homozygosity)가 1명이었다. Homocysteine 수치가 5~10 ?mol/L인 집단에서는 정상, 이형접합체, 동형접합체가 각각 11명, 18명, 8명이었다. Homocysteine 수치가 10~15 ?mol/L인 집단에서는 정상, 이형접합체, 동형접합체가 각각 4명, 1명, 1명이었다. Homocysteine 수치가 15 ?mol/L 이상인 집단에서는 정상과 이형접합체가 없었고 동형접합체인 경우가 2명이었다 (Table 1). 이상의 결과로 미루어 보아 p value = 0.048로 homocysteine 수치와 MTHFR 유전자 돌연변이 사이에는 유의한 상관관계가 존재한다고 할 수 있다 (Table 2).

고 찰

정상적인 homocysteine 대사에서 homocysteine 농도는 공복시에 5~15 ?mol/L이다.[1] 경증, 증등도, 중증 homocysteine 과다증은 16~30 ?mol/L, 31~100 ?mol/L, 100 ?mol/L 이상인 경우를 말한다. 관상동맥뇌혈관, 말초혈관 질환을 가지고 있는 환자의 40%에서 homocysteine 수치가 높은 것으로 조사되었다.

Homocysteine은 식이 단백질로부터 유래된 필수 단백질인 methionine의 탈메틸화 (demethylation)의 과정에서 생긴 sulfur를 포함한 아미노산이다. 미국의 경우 허용량은 하루 0.9 g이지만 성인들은 일반적으로 2.0 g 이상을 섭취하는 것으로 알려졌다.[2,3]

Homocysteine은 여러 경로를 통하여 생성되는데 그 중 하나가 methionine이 S-adenosylmethionine으로 되는 것이다. 다음으로 homocysteine은 황전환작용 (trans-sulfuration)이나 재메틸화 (remethylation) 경로로 대사된다. Methionine이 과다하면 비타민 B_6 의존성 효소인 cystathionine ?-synthase (CBS)가 작용하여 황전환작용이 일어나며 재메틸화 경로가 억제된다. CBS가 부족하면 homocysteine 체내에 과다하게 축적된다.[4,5] 재메틸화 경로에서는 비타민 B_{12}가 필수조인자 (cofactor)로 작용하며 homocysteine이 methionine으로 전환된다. 이 경로는 methionine이 부족할 때 일어난다.[6]

세포내에서의 homocysteine 농도는 좁은 범위 내에서 유지된다. 황전환작용이나 재메틸화 경로를 통하여 homocysteine이 세포에서 빠져나가면 homocysteine의 생성이 증가하거나 대사가 감소한다. 반면 homocysteine 생성이 감소하면 세포로부터 homocysteine의 유출이 감소한다. 그러므로 homocysteine 대사와 세포내 농도는 혈장에서의 homocysteine 수치에 따라 결정된다. 혈장에서 homocysteine은 disulfide와 peptide bond에 의하여 여러 가지 단백질과 결합한다. 혈장 내에서 유리형의 homocysteine은 거의 존재하지 않는다. 현재 homocysteine 농도는 총혈장 농도로 측정한다.

Homocysteine 과다증은 주로 영양 부족이나 유전적인 원인으로 인하여 발생한다. 나이, 성, 질병, 약제 등도 homocysteine의 대사에 영향을 미칠 수 있다.[7~10] 엽산, 비타민 B_6, B_{12} 등이 부족하면 homocy-

steine 과다증이 생길 수 있다. 아마도 homocysteine 농도에 가장 많이 영향을 미치는 것은 엽산이라고 추측된다. 엽산의 환원 (reduction)형인 methyltetrahydrofolate는 homocysteine이 methionine으로 재메틸화 되는데 필요하다.[11] 혈장의 엽산농도와 homocysteine 농도는 서로 반비례한다. 즉 혈중 엽산이 낮으면 homocysteine이 증가하게 된다.[12] 과거에는 엽산을 하루에 200 ?g 섭취하면 된다고 생각하였지만 이 용량으로 homocysteine 과다증을 예방하기에는 부족하다는 사실이 알려졌고 최근에는 400 ?g이 적정량이라고 추천된다.

미국의 식품위생국에서는 신경관결손 (neural tube defects)을 예방하기 위하여 엽산섭취를 권하고 있다.[13] 엽산은 푸른색 채소, 노란색 채소, 육류, 곡식 등에 포함되어 있지만 흡수율은 조건에 따라 달라진다. 엽산결핍은 알코올 중독자, 흡연자, 노인, 임산부 뿐만 아니라 피임약 복용시에도 생길 수 있다.[14]

엽산은 homocysteine 과다증과 가장 확실히 연관된 비타민이지만 비타민 B_6, B_{12}는 homocysteine과 밀접한 상관관계를 보이지 않는다.[15,16] Homocysteine 농도가 올라가도 비타민 B_6, B_{12}는 동일한 정도로 감소하지 않는다. 비타민 B_{12}는 homocysteine이 methionine으로 전환되는 재메틸화 반응에 필수적인 조효소이다. 반면 Homocysteine은 비타민 B_6에 의하여 촉매되어 cysteine으로 전환된다.

37℃에서 활성이 저하되고 46℃에서 내열성이 없는 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)의 돌연변이가 관상동맥 질환에서 보고되었다.[17] 대조군의 5%에 비하여 관상동맥 질환 환자군에서는 17%가 이상을 보였다. PCR/RFLP 방법에 의한 조사 결과 677 염기쌍에서 cytosine이 thymine으로 대치되어 alanine이 valine으로 치환되는 것으로 밝혀졌다. 이 돌연변이는 미국에서 아주 흔히 보고되었으며 대립형질의 빈도는 약 35%이다.[18] 그 중 12%가 동형접합체 (homozygosity)이고 40~45%가 이형접합체 (heterozygosity)이다. 그렇지만 이 빈도는 나라에 따라 많은 차이를 보인다. 동형접합체 돌연변이에서는 37℃에서 대조군의 40~50%에 해당하는 활성을 보이며 이형접합체인 경우에는 그 활성이 중간 정도이다. 동형접합체에서는 46℃에서 대조군에 비하여 35%의 잔여 활성을 나타내고 이형접합체에서는 중간 정도의 활성을 보인다. Alanine이 valine으로 치환되어 나타나는 활성은 높은 연관성을 보여서 전체 인구 중에서 다른 MTHFR 돌연변이는 존재하지 않는다는 것을 시사한다.

유전적인 homocysteine 뇨증 (homocystinuria) 환자 11명 중 6명에서 8세 이전에 정맥 혹은 동맥의 혈전이 보고되었다.[19] 또 6명 모두에서 5번 응고인자 Leiden 돌연변이가 발견되었다. 그 중 한 예에서는 homocysteine 뇨증과 5번 응고인자 Leiden 돌연변이의 동형접합체가 동시에 있었는데 이 환자는 출생시부터 warfarin을 복용하여 혈전을 예방하였다. 최근 중등도의 homocysteine 과다증과 5번 응고인자 Leiden 돌연변이가 동시에 존재하면 혈전색전증 (thromboembolism)의 위험성이 10배나 증가한다는 사실이 알려졌다.[20] 그러므로 homocysteine 과다증과 5번 응고인자 Leiden 돌연변이는 정맥의 혈전색전증에 서로 상승작용 (synergy)을 한다고 할 수 있다. 이탈리아와 미국에서 심부정맥혈전 (deep vein thrombosis)에 대한 연구도 발표되었다.[21] 여기에서 무내열성 (thermolabile) MTHFR의 동형접합체는 그 자체가 혈전의 위험인자는 아니지만 5번 응고인자 Leiden 돌연변이의 혈전위험성을 증가시키는 것으로 판명되었다. Homocysteine 과다증은 C단백질, S단백질, antithrombin III, 활성화 C단백질 저항성 (activated protein C resistance) 환자에서 혈전의 독립인자로 작용하며 5번 응고인자 Leiden 돌연변이가 있는 환자에서 혈전의 위험성을 증가시키지 않는다는 논문도 발표되었다.[22]

동형접합체 돌연변이에서는 혈중 homocysteine 수치가 유의하게 높지만 엽산이 homocysteine 수치를 조절하는데 중요한 역할을 한다.[23] 동형접합체 돌연변이인 경우 혈중 엽산수치가 정상 범위 이하에 있을 때 약간의 homocysteine 과다증을 보인다.[24] 그렇지만 엽산수치가 정상이 되면 homocysteine 과다증은 나타나지 않는다. 이런 관계는 심혈관 질환 뿐만 아니라 정상군에서도 증명되었다. 이 사실은 엽산을 투여하면 돌연변이를 가진 사람에서 homocysteine 과다증을 예방할 수 있다는 것을 의미한다.

Homocysteine을 측정하는 방법으로는 homocysteine과 homocysteine thiolactone, 유리형의 homocysteine, 그리고 단백질과 결합한 homocysteine을 포함하

는 총 homocysteine 수치가 이용된다. 단백질과 결합된 homocysteine은 전체 양의 70~80%에 달한다.[25] 정상 총 homocysteine의 농도는 공복시에 5~15 ?mol/L이다.[26] Homocysteine 과다증은 15~30 ?mol/L, 30~100 ?mol/L, 100 ?mol/L 이상 등의 3가지로 분류할 수 있다.

공복시 homocysteine 수치가 정상이지만 homocysteine 과다증이 의심되는 경우에는 methionine 부하검사 (methionone loading test)를 시행한다.[28] Methionine 부하검사시 수치가 2 표준편차 이상이면 homocysteine 과다증이라고 진단할 수 있다. 그렇지만 methionine 부하검사에 대해서는 아직 많은 논란이 있다. 결론적으로 MTHFR은 homocysteine의 기저치를 조절하기 때문에 그 활성은 methionine 부하검사로 정확히 측정하기 어렵다. 반면에 황전환작용에 관여하는 효소는 일시적으로 발생한 식후의 homocysteine 상승을 낮추기 때문에 methionine 부하검사로 활성을 측정하는 것이 가능하다.

76명의 유산 환자와 106명의 대조군을 대상으로 조사한 결과 무내열성의 동형접합성 MTHFR 돌연변이가 유산의 위험성을 증가시키는 것으로 판명되었다.[29] 정맥혈전이 있는 30세 이상의 여성들은 대조군보다 homocysteine 수치가 증가할 확률이 7배나 되었다.[30] 혈전이 재발되는 환자에서 homocysteine 과다증은 대조군에서보다 2~3배나 흔하다. Homocysteine 과다증과 임신 중의 혈전과의 관계는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 제태기간 17주 전에 2번 이상의 유산을 경험한 여성들은 대조군보다 무내열성의 동형접합성 MTHFR 돌연변이를 가지고 있을 확률이 2~3배나 높다.[31] 이것은 homocysteine 과다증 혹은 낮은 엽산농도와 관계가 있다.[32] 전자간증이 조기에 발생한 산모의 18%에서 methionine 부하검사상 양성으로 판명되었다.[33] 최근 연구 결과 태반조기박리 환자의 26%, 자궁내 태아사망의 11%, 자궁내 성장지연의 38%에서 homocysteine 과다증이 발견되었다.[34] 현재까지의 연구를 종합한 결과 homocysteine 과다증은 반복자연유산의 위험인자라는 사실이 밝혀졌다.[35]

엽산과 비타민 B_6와 B_{12}를 같이 복용하면 homocysteine 수치가 감소한다. 신선한 과일과 채소를 비타민과 함께 복용하면 조리 중에 소실된 영양분을 보충할 수 있다.[36] 그렇지만 음식만으로 homocysteine 농도를 감소시킬 수는 없다. 엽산을 복용하고 homocysteine이 감소하기까지는 수일에서 수주까지 걸리는데 최대효과는 4~6주 사이에 일어난다.[37,38] 엽산을 단독으로 혹은 엽산과 비타민 B_6와 B_{12}를 같이 투여하거나 비타민 B_6와 B_{12}를 투여하여도 homocysteine 과다증을 치료할 수 있다. 이것은 비타민 B_6가 homocysteine 농도를 감소시키는데 일정한 역할을 한다는 것을 시사한다. 비타민 B_{12}는 체내에서 부족하지 않으면 homocysteine 농도에 영향을 미치지 않는다.[39,40]

본 연구에서는 반복자연유산 환자에서 homocysteine 수치와 MTHFR 돌연변이를 조사하였고 이들 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocysteine, diet, and cardiovascular disease. A healthcare statement for healthcare professionals from the nutrition committee. American Heart Association. Circulation 1999; 99: 178-82.
2. Ubbink JB. Homocysteine - an atherogenic and a thrombogenic factor? Nutr Rev 1995; 53: 323-5.
3. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 517-27.
4. Olszewski AJ, McCully KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. Free Rad Biol Med 1993; 14: 683-93.
5. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. Blood 1997; 90: 1-11.
6. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. Ann Clin Lab Sci 1994; 24: 27-59.
7. Ubbink JB. Vitamin nutrition status and homocysteine: an atherogenic risk factor. Nutr Rev 1994; 52: 383-93.
8. Nordstrom M, Kellstrom T. Age dependency of cystathionine ?-synthase activity in human fibroblasts in homocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. Atherosclerosis 1992; 94: 213-21.

9. Masser P, Taylor LM, Porter JM. Importance of elevated homocysteine concentrations as a risk factor for atherosclerosis. Ann Thorac Surg 1994; 58: 1240-6.
10. Guttormsen A, Nesthus I, Uleland P, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, et al. Determinants and vitamin resp onsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 ? mol/L). J Clin Invest 1996; 68: 2174-83.
11. Blom HJ, Kleinveld HA, Boers GHJ, Demacker PNM, Hak-Lemmers HLM, Poele-Pothoff MTWB, et al. Lipid peroxidation and susceptibility of low density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinemia. Eur J Clin Invest 1995; 25: 149-54.
12. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, et al. Association between plasma homocysteine concentration and extracranial carotid artery stenosis. N Engl J Med 1995; 332: 286-91.
13. Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, et al. Reduction of plasma homocysteine concentrations by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. N Engl J Med 1998; 338: 1009-15.
14. Tucker KL, Mahnken B, Wilson WF, Jacques P, Selhub J. Folic acid fortification of the food supply: Potential benefits and risk for the elderly population. JAMA 1996; 276: 1879-85.
15. Franken PDG, Boers GHJ, Blom HJ, Cruysberg JRM, Trijbels FJM, Hamel BCJ. Prevalence of familial mild hyperhomocysteinemia. Atherosclerosis 1996; 125: 71-80.
16. Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. Am J Cardiol 1995; 75: 132-6.
17. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary disease. Am J Hum Genet 1991; 48: 536-45.
18. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996; 93: 7-9.
19. Mandel H, Brenner B, Berant M. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden-effect on thrombosis. N Engl J Med 1996; 334: 763-8.
20. Selhub J, D'Angelo A. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. Thromb Haemost 1997; 78: 527-31.
21. Zighetti ML, Cattaneo M, Tsai MY. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V: Q^{506}). Thromb Haemost 1997; Supplement: 570.
22. den Heijer M, Koster T, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. N Engl J Med 1996; 334: 759-62.
23. Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, et al. Mutated methy lenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet 1995; 346: 1070-1.
24. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in U.S. physicians. Circulation 1996; 94: 2410-6.
25. Carey MC, Donovan DE, FutzGerald O, McAuley FD. Homocystinuria: A clinical and pathological study of nine subjects in six families. Am J Med 1968; 48: 7-25.
26. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 1993; 39: 1764-79.
27. Kang SS, Wong PW, Manilow MR. Homocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Ann Rev Nutr 1992; 12: 279-98.
28. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Ma-

cey D, Lundberg P. Disordered methionine / homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence, cofactor therapy and enzymology. Arterioscler Thromb 1993; 13: 1253-60.

29. Brenner B, Sarig G, Weinner Z, Younis Y, Blumfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. Thromb Haemost 1999; 82: 6-9.
30. Girling J, de Swiet M. Inherited thrombophilia and pregnancy. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10: 135-44.
31. Nelson WLDM, Steegers EAP, Eskes TKAB, Blom JH. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. Lancet 1997; 350: 861.
32. Nelen WLDM, Heil SG, Steegers EAP, Eskes TKAB. Recurrent early pregnancy loss and genetic- related disturbances in folate and homocysteine metabolism. Br J Hosp Med 1997; 58: 511-3.
33. Dekker GA, de Vries JIP, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Kakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early onset preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1042-8.
34. de Vries JIP, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BME, van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. Br J Obstet Gynecol 1997; 104: 1248-54.
35. Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, Heijer MD, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: meta-analysis. Fertil Steril 2000; 74: 1196-9.
36. Welch GN, Upchurch GR, Loscalzo J. Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. Hosp Pract 1997; 70: 87-92.
37. 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 and intakes. JAMA 1995; 274: 1049-57.
38. Ubbink J, Vermaak W, Van der Merwe A, Becker P, Delport R, Potgeiter H. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinaemia in humans. J Nutr 1994; 124: 1927-33.
39. Malinow R, Javier F, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults. Circulation 1993; 87: 1107-13.
40. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, Van-Lente F, Gupta A, et al. Hyperhomocysteinaemia and low pyridoxal phosphate. Circulation 1995; 92: 2825-30.