

Niedobór kwasu foliowego a bezpośredni, niezależny od homocysteiny, związek z ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca

Jacek Kądziała¹, Jadwiga Janas², Zofia Dzielińska¹,
 Walerian Piotrowski³ i Witold Rużyłło¹

¹I Klinika Choroby Wieńcowej; ²Zakład Biochemii Klinicznej;
³Zakład Epidemiologii, Prewencji Chorób Układu Krążenia i Promocji Zdrowia
 Instytutu Kardiologii w Warszawie

Plasma folic acid deficiency may be associated with the risk for coronary artery disease independently of homocysteine concentrations

Background: *The study was performed to explore the relationships between plasma concentrations of homocysteine, folic acid, vitamin B₁₂ and risk of coronary artery disease (CAD) and to evaluate the role of vitamin deficiency as a risk factor of CAD.*

Material and methods: *120 consecutive patients (78% males, mean age 59.2 ± 9 years) with angiographically confirmed CAD and 106 healthy controls (76% males, mean age 47.4 ± ± 6 years) were investigated. Plasma concentrations of folic acid and vitamin B₁₂ were assayed with chemiluminescency, plasma total homocysteine level was determined using HPLC method. Hyperhomocysteinemia (HHcy) was defined as plasma homocysteine level above 90th percentile of the control distribution (level ≥ 12.4 μmol/l), folate deficiency — as level below 20th percentile (level ≤ 6.2 ng/l).*

Results: *Patients had higher homocysteine levels than the controls (12.8 ± 5.1 μmol/l vs. 10.0 ± 5.0 μmol/l; p < 0.001). These groups did not differ in vitamin B₁₂ concentration (299 ± 134 pg/l vs. 313 ± 115 pg/l, respectively). In multivariate analysis, the odds ratio (OR) of CAD in subjects with HHcy was 2.7 (95% CI 1–7.2; p < 0.05, adjusted for age, hypertension, hyperlipidemia and family history of CAD). Mean folate level was much lower in patients as compared to the control group (7.7 ± 3.4 pg/l vs. 9.2 ± 4.2 ng/l; p < 0.005), also after adjustment for age (p < 0.05). Folate deficiency was observed in 38% of the patients and in 18% of the controls (p = 0.001). The OR for CAD in subjects with folate deficiency was 2.7 (95% CI 1.5–5.13; p < 0.005). We observed almost 40% reduction of CAD risk with every 4 ng/l increase in folate concentration (OR 0.63, 95% CI 0.46–0.85; p < 0.01). In multivariate analysis, after adjustment for homocysteine concentrations, age, hyperlipidemia, hypertension and family history of CAD, the folate deficiency remained independent risk factor for CAD (OR 2.6, 95% CI 1.1–6.5; p < 0.05).*

Conclusions: *Plasma folate deficiency seems to be a risk factor for coronary artery disease independently of homocysteine concentrations. (Folia Cardiol. 2003; 10: 619–624)*

folic acid, homocysteine, coronary artery disease, atherosclerosis

Adres do korespondencji: Dr Jacek Kądziała
 I Klinika Choroby Wieńcowej
 ul. Alpejska 42, 04–628 Warszawa
 Nadesłano: 13.05.2003 r. Przyjęto do druku: 30.07.2003 r.

Wstęp

Homocysteina jest aminokwasem powstającym przejściowo w wyniku przemian metioniny dostarczanej do ustroju z dietą. Jest metabolizowana w dwóch szlakach: remetylacji i transsulfuracji [1]. Pierwszy z tych szlaków — przemiana homocysteiny w metioninę — jest uwarunkowany obecnością enzymów zależnych od stężenia witaminy B₁₂ i kwasu foliowego (syntetaza metioninowa i reduktaza kwasu 5,10-metylenotetrahydrofoliowego — MTHFR). Drugi szlak — transsulfuracja homocysteiny w cysteinę — jest katalizowany przez syntetazę cystationinową, której kofaktorem jest witamina B₆. Zatem podwyższone stężenie homocysteiny może być spowodowane m.in. czynnikami dietetycznymi, prowadzącymi do niedoborów kofaktorów enzymatycznych, np. kwasu foliowego lub witaminy B₁₂, lub genetycznie uwarunkowanym defektem w postaci niedoboru enzymu uczestniczącego w metabolizmie homocysteiny, np. reduktazy kwasu 5,10-metylenotetrahydrofoliowego. Ostatnio opublikowano wyniki licznych prac oceniających związek między podwyższonym stężeniem homocysteiny a zwiększonym ryzykiem miażdżycy. W niektórych badaniach udowodniono związek między niedoborem kwasu foliowego a dysfunkcją śródbłonna, co może sugerować bezpośredni, niezależny od homocysteiny, związek niedoboru kwasu foliowego z aterosclerozą.

Celem niniejszej pracy była ocena relacji pomiędzy stężeniami homocysteiny, kwasu foliowego i witaminy B₁₂ w osoczu a ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej.

Materiał i metody

W badaniu wzięło udział 120 kolejnych pacjentów w wieku $59,2 \pm 9$ lat z angiograficznie potwierdzoną chorobą niedokrwienną serca. Grupę kontrolną stanowiło 106 zdrowych ochotników w wieku $47,4 \pm 6$ lat, bez klinicznych objawów choroby niedokrwiennej serca. Wszyscy uczestnicy świadomie wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Protokół badania zaakceptowała Terenowa Komisja Bioetyczna Instytutu Kardiologii w Warszawie.

Oznaczenia laboratoryjne

Próbki krwi pobrano na czczo. Stężenia kwasu foliowego i witaminy B₁₂ w osoczu oznaczono metodą chemiluminescencji za pomocą systemu IMMULITE firmy DPC (*Diagnostic Products Corporation*). Całkowite stężenie homocysteiny w osoczu oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high performance liquid*

chromatography). Pomiary całkowitego stężenia cholesterolu, stężenia cholesterolu frakcji HDL, triglicerydów i glukozy wykonano standardowymi technikami laboratoryjnymi. Stężenie cholesterolu frakcji LDL wyliczono ze wzoru Friedewalda, dla pacjentów, u których stężenie triglicerydów wynosiło poniżej 450 mg/dl.

Definicje

Podwyższone stężenie homocysteiny zdefiniowano jako stężenie ≥ 90 percentyla rozkładu stężeń w grupie kontrolnej, czyli stężenie wynoszące $12,4 \mu\text{mol/l}$ lub więcej. Niedobór kwasu foliowego i witaminy B₁₂ zdefiniowano jako stężenie nieprzewyższające wartości 20 percentyla grupy kontrolnej, czyli stężenie mniejsze lub równe $6,2 \text{ ng/l}$ dla kwasu foliowego i stężenie mniejsze lub równe 220 pg/l dla witaminy B₁₂.

Analiza statystyczna

Wszystkie ciągle zmienne przedstawiono jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe. Zmienne ciągle porównano za pomocą testu opartego na rozkładzie *t*-Studenta, zaś zmienne nieciągłe za pomocą testu niezależności χ^2 . Iloraz szans wystąpienia choroby wieńcowej u osób z hiperhomocysteinemią, niedoborem kwasu foliowego lub przy wzroście jego stężenia o jedno odchylenie standardowe wyliczono metodą regresji logistycznej. Korelacje stężenia witamin i homocysteiny z wiekiem i stężeniem kreatyniny określono za pomocą współczynnika korelacji Pearsona. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu SAS wersji 6.12.

Wyniki

Charakterystyka grupy badanej

Grupa badana różniła się od grupy kontrolnej wiekiem. U chorych częściej występowały także konwencjonalne czynniki ryzyka, takie jak: hiperlipidemia, obciążający wywiad rodzinny, nadciśnienie tętnicze oraz cukrzyca. W grupie badanej było mniej osób palących tytoń — prawdopodobnie jest to skutek zaprzestania palenia w momencie wystąpienia choroby (np. zawału serca), na długo przed udziałem w badaniu. Pacjenci charakteryzowali się niższym całkowitym stężeniem cholesterolu, jak również cholesterolu frakcji LDL i HDL, co jest efektem skutecznego leczenia hipolipemizującego — ponad 2/3 pacjentów (69%) leczono statynami. Chorobę jednonaczyniową w koronarografii zaobserwowano u 28% osób, w porównaniu z 38% z chorobą dwóch i 34% z chorobą trzech naczyń. U 53% pacjentów stwierdzono w wywiadzie przebyty zawał

Tabela 1. Charakterystyka grup**Table 1.** Baseline characteristics

	Grupa badana	Grupa kontrolna	p
Wiek [lata]	59,2 ± 9	47,4 ± 6	0,0001
Mężczyźni	78%	76%	NS
Otyłość	20%	22%	NS
Palenie tytoniu	24%	37%	< 0,05
Nadciśnienie tętnicze	56%	15%	0,001
Wywiad rodzinny	48%	31%	< 0,01
Zaburzenia lipidowe	88%	49%	0,001
Cukrzyca	21%	4%	0,001
Cholesterol [mmol/l]	4,56 ± 0,95	5,38 ± 1,13	< 0,001
Cholesterol HDL [mmol/l]	1,22 ± 0,68	1,41 ± 0,34	0,01
Cholesterol LDL [mmol/l]	2,63 ± 0,85	3,25 ± 0,95	< 0,001
Triglicerydy [mmol/l]	1,74 ± 0,80	1,63 ± 0,93	NS

W tabeli podano frakcję grupy albo średnią ± odchylenie standardowe

serca, 40% chorych leczono inwazyjnie (u 8% wykonano pomostowanie aortalno-wieńcowe, a u 32% przezskórną angioplastykę wieńcową). Charakterystykę grup przedstawiono w tabeli 1.

Stężenie homocysteiny w osoczu

Stężenie całkowitej homocysteiny w osoczu było wyższe w grupie pacjentów niż u osób zdrowych ($12,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $10,0 \pm 5,0 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$). W grupie pacjentów częściej obserwowano również podwyższone stężenie homocysteiny (42% vs. 10% ; $p = 0,001$). Iloraz szans (OR, *odds ratio*) wystąpienia choroby niedokrwiennej serca u osób z podwyższonym stężeniem homocysteiny wyniósł 7,1 (95% przedział ufności 3,4–14,9; $p = 0,001$). W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu innych czynników ryzyka (wiek, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe, obciążający wywiad rodzinny), OR był równy 2,7 (95% przedział ufności 1–7,2; $p < 0,05$).

Stężenie witamin

Pacjenci charakteryzowali się znacznie niższymi stężeniami kwasu foliowego w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną ($7,7 \pm 3,4 \text{ ng/l}$ vs. $9,2 \pm 4,2 \text{ ng/l}$; $p < 0,005$); zależność ta była istotna również po uwzględnieniu różnic w wieku pomiędzy badanymi grupami ($p < 0,05$). Niedobór kwasu foliowego zaobserwowano u 38% chorych i 18% osób z grupy kontrolnej ($p = 0,001$). Stężenie kwasu foliowego korelowało ze stężeniem homocysteiny ($r = -0,28$; $p = 0,0001$), witaminy B₁₂ ($r = 0,15$; $p < 0,05$). Stwierdzono także słabą zależność tego stężenia od wieku ($r = -0,14$; $p < 0,05$). Osoby otyłe

charakteryzowały się znacznie niższymi stężeniami kwasu foliowego niż osoby z prawidłową masą ciała ($7,5 \pm 2,9 \text{ ng/l}$ vs. $8,6 \pm 4,2 \text{ ng/l}$; $p < 0,05$). Iloraz szans wystąpienia choroby wieńcowej u osób z niedoborem kwasu foliowego wyniósł 2,7 (95% przedział ufności 1,5–5,1; $p < 0,005$). Wzrost stężenia kwasu foliowego o 4 ng/l wiązał się z 40-procentową redukcją ryzyka choroby wieńcowej (OR 0,63; 95% przedział ufności 0,46–0,85; $p < 0,01$). W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu czynników, takich jak stężenie homocysteiny, wiek, hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze i obciążający wywiad rodzinny, niedobór kwasu foliowego pozostał niezależnym czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej — OR był równy 2,6 (95% przedział ufności 1,1–6,5; $p < 0,05$).

Stężenie witaminy B₁₂ w osoczu nie różniło się istotnie między chorymi a grupą kontrolną ($299 \pm 134 \text{ pg/l}$ vs. $313 \pm 115 \text{ pg/l}$). Niedobór witaminy B₁₂ występował u 26% pacjentów i 20% osób z grupy kontrolnej (różnica frakcji nieznamiennej). Stężenie witaminy B₁₂ słabo korelowało z wiekiem ($r = -0,15$; $p < 0,05$), stężeniem kwasu foliowego ($r = 0,15$; $p < 0,05$) oraz stężeniem homocysteiny ($r = -0,19$; $p < 0,005$).

Dyskusja

W dotychczas opublikowanych badaniach autorzy skupili się na ocenie hiperhomocysteinemii jako czynnika ryzyka miażdżycy. Tylko w nielicznych badaniach oceniono związek między witaminami (kofaktorami enzymów metabolizujących homocysteinę) a miażdżycą. W niniejszym badaniu zaobserwo-

wano znacznie niższe stężenia kwasu foliowego u pacjentów z chorobą wieńcową — wynik ten pozostał istotny po uwzględnieniu różnic w wieku badanych podgrup (adiustacji). W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu czynników ryzyka choroby wieńcowej, w tym również stężenia homocysteiny, iloraz szans wystąpienia choroby wieńcowej przy niedoborze kwasu foliowego wyniósł 2,6. Wynik ten sugeruje, że niskie stężenie kwasu foliowego może być niezależnym od homocysteiny czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej. Wzrost jego stężenia o 4 ng/l wiązał się z prawie 2-krotnym zmniejszeniem ryzyka choroby wieńcowej.

Już w 1996 r. opublikowano pracę oceniającą związek między niskim stężeniem kwasu foliowego a śmiertelnością z powodu choroby wieńcowej [2]. Morison i wsp. przebadali 5065 Kanadyjczyków, spośród których 165 zmarło w trakcie 15-letniej obserwacji z powodu choroby niedokrwiennej serca. Okazało się, że osoby z niskim stężeniem kwasu foliowego (< 25 percentyla) charakteryzowały się znacznie wyższym ryzykiem zgonu niż osoby ze stężeniem powyżej 75 percentyla (ryzyko względne 1,69). U kobiet ryzyko to było znacznie większe niż u mężczyzn. Jednak wadą badania był brak oznaczenia stężenia homocysteiny — nie można więc jednoznacznie określić, czy to homocysteina, czy bezpośrednio kwas foliowy był niezależnym czynnikiem rokowniczym.

Dwa lata później opublikowano wyniki wielośrodkowego europejskiego badania *European Concerted Action Project* (ECAP), w którym uczestniczyło 750 pacjentów z chorobą o etiologii miażdżycowej (choroba wieńcowa, miażdżycy naczyń obwodowych i udar mózgu) oraz 800 zdrowych ochotników [3]. W badaniu tym, oprócz powiązania podwyższonego stężenia homocysteiny z miażdżycą, zaobserwowano istotną zależność między niskim stężeniem kwasu foliowego w erytrocytach a chorobą wieńcową, udarem mózgu i chorobą naczyń obwodowych. W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu stężenia homocysteiny (a właściwie jej wzrostu w teście obciążenia metioniną), osoby ze stężeniem kwasu foliowego poniżej 10 percentyla charakteryzowały się o 50% większym ryzykiem wystąpienia choroby układu sercowo-naczyniowego. Dalsza analiza podgrup uczestników badania ECAP wykazała, że niedobór kwasu foliowego jest czynnikiem ryzyka głównie u mężczyzn [4]. Potwierdzili to Pancharuniti i wsp. [5], którzy określili stężenie kwasu foliowego u 101 białych mężczyzn poniżej 50 rż. z chorobą wieńcową potwierdzoną angiograficznie i u 108 zdrowych ochotników. Tu również wykazano związek pomiędzy niskim

stężeniem kwasu foliowego a chorobą wieńcową, choć po wprowadzeniu stężenia homocysteiny do modelu analizy wieloczynnikowej, uległ on osłabieniu.

W nielicznych pracach badano również związek pomiędzy niedoborem kwasu foliowego a miażdżycą tętnic obwodowych. W *Framingham Heart Study* wykonano badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych u 1041 osób powyżej 67 rż. [6]. Okazało się, że osoby z niskim stężeniem kwasu foliowego charakteryzowały się 2-krotnie wyższym ryzykiem zwężenia tętnicy szyjnej — zależność ta była znamienna po uwzględnieniu innych czynników ryzyka oraz stężenia homocysteiny. W badaniu chilijskim również zaobserwowano znacznie niższe stężenia kwasu foliowego w podgrupach pacjentów z chorobą naczyń obwodowych, jak również z chorobą wieńcową, niż u osób zdrowych, pomimo braku różnic w stężeniach homocysteiny w badanych grupach [7].

Odmienne rezultaty przyniosło prospektywne badanie *Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC) [8], oceniające m.in. zależności pomiędzy stężeniem homocysteiny i witamin a występowaniem choroby wieńcowej. Po ponad 3-letniej obserwacji wykazano, że to nie hiperhomocysteinemia ani niedobór kwasu foliowego, lecz niskie stężenie witaminy B₆ (pirydoksyny) okazało się silnym i niezależnym czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej.

Obecnie, interpretując wyniki niniejszej i cytowanych prac, trudno jest określić, jaka może być rola kwasu foliowego w zapobieganiu miażdżycy. Niektórzy autorzy sugerują, że homocysteina może być tylko wskaźnikiem niskiego stężenia kwasu foliowego, a on sam jest niezależnym czynnikiem ryzyka miażdżycy [9, 10]. Ponieważ w procesie aterogenezy istotną rolę odgrywa dysfunkcja śródbłonna, wielu autorów przeprowadziło badania dotyczące wpływu kwasu foliowego na czynność śródbłonna, potwierdzając jego korzystne działanie [11–14]. Wykazano, że dotętnicze podanie kwasu 5-metylenotetrahydrofoliowego, jak również doustne leczenie kwasem foliowym może przywrócić prawidłową czynność śródbłonna u osób z hiperlipidemią [15, 16]. Stwierdzono także, że terapia kwasem foliowym poprawia wyniki elektrokardiograficznej próby wysiłkowej u rodzeństwa pacjentów z przedwczesną chorobą wieńcową [17]. W licznych badaniach wykazano, że potencjalny korzystny wpływ kwasu foliowego na funkcję śródbłonna był niezależny od zmian w stężeniu homocysteiny [13, 15, 18, 19].

Obecnie podejmowane są próby wyjaśnienia, na czym polega korzystny wpływ kwasu foliowego na funkcję śródbłonna. W badaniach *in vitro* zaobserwowano m.in., że kwas foliowy posiada właściwo-

ści antyoksydacyjne. Ustalono, że kwas 5-metylenotetrahydrofoliowy może zmniejszać produkcję nadtlenków poprzez wpływ na system oksydazy ksantynowej i śródbłonkowej syntazy tlenu azotu [15]. W jednym z badań kwas 5-metylenotetrahydrofoliowy wpływał na zmniejszenie wytwarzania nadtlenków i stymulował syntezę tlenu azotu [20]. U szczurów karmionych dietą ubogą w kwas foliowy, jego niedobór zwiększał peroksydację lipidów. W badaniu przeprowadzonym na zwierzętach wykazano również, że dieta z niską zawartością kwasu foliowego powoduje większą aktywność agregacyjną płytek krwi oraz wzmożoną aktywność czynnika tkankowego w makrofagach [21].

Sugeruje się więc, że istnieją trzy mechanizmy korzystnego działania kwasu foliowego w procesie aterosogenezy: stymulowanie regeneracji tetrahydrobiopteryny, będącej kluczowym kofaktorem śród-

łonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS), bezpośrednie działanie przeciwutleniające oraz bezpośrednie działanie na eNOS, co powoduje zmniejszenie produkcji nadtlenków i wzmożenie syntezy tlenu azotu [10]. I chociaż coraz większa liczba badań potwierdza korzystny efekt działania kwasu foliowego w procesie aterosogenezy, w wielu przypadkach niezależny od homocysteiny, wymaga on jednak potwierdzenia w trwających właśnie, dużych, randomizowanych, prospektywnych badaniach klinicznych [22].

Wnioski

Niedobór kwasu foliowego wiąże się ze zwiększonym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca, a związek ten może być niezależny od stężenia homocysteiny w osoczu.

Streszczenie

Niedobór kwasu foliowego a choroba wieńcowa

Wstęp: *Celem pracy była ocena relacji między stężeniem homocysteiny, kwasu foliowego i witaminy B₁₂ a ryzykiem występowania choroby niedokrwiennej serca.*

Materiał i metody: *W badaniu wzięło udział 120 kolejnych pacjentów (78% mężczyzn w wieku 59,2 ± 9 lat) z chorobą wieńcową potwierdzoną angiograficznie i 106 zdrowych ochotników (76% mężczyzn w wieku 47,4 ± 6 lat) bez klinicznych objawów choroby wieńcowej. Stężenie kwasu foliowego i witaminy B₁₂ w osoczu oznaczono metodą chemiluminescencji. Stężenie całkowitej homocysteiny w osoczu oznaczono metodą HPLC. Hiperhomocysteinemię zdefiniowano jako stężenie ≥ 90 percentyla rozkładu w grupie kontrolnej, czyli ≥ 12,4 μmol/l. Niedobór kwasu foliowego zdefiniowano jako poziom ≤ 20 percentyla grupy kontrolnej, czyli stężenie ≤ 6,2 ng/l.*

Wyniki: *Stężenie homocysteiny w osoczu było wyższe u pacjentów niż u osób zdrowych (12,8 ± ± 5,1 μmol/l vs. 10,0 ± 5,0 μmol/l; p < 0,001), zaś stężenie witaminy B₁₂ było podobne w obu grupach (299 ± 134 pg/l vs. 313 ± 115 pg/l). W analizie wieloczynnikowej iloraz szans wystąpienia choroby wieńcowej u osób z hiperhomocysteinemią wyniósł 2,7 (95% przedział ufności 1–7,2; p < 0,05 po uwzględnieniu wpływu wieku, nadciśnienia tętniczego, hiperlipidemii i obciążającego wywiadu rodzinnego). Pacjenci charakteryzowali się znacznie niższym stężeniem kwasu foliowego w porównaniu z grupą kontrolną (7,7 ± 3,4 ng/l vs. 9,2 ± 4,2 ng/l; p < 0,005); zależność ta była istotna również po uwzględnieniu różnic w wieku pomiędzy badanymi grupami (p < 0,05). Niedobór kwasu foliowego zaobserwowano u 38% pacjentów i u 18% osób z grupy kontrolnej (p = 0,001). Iloraz szans wystąpienia choroby wieńcowej u osób z niedoborem kwasu foliowego wyniósł 2,7 (95% przedział ufności 1,5–5,1; p < 0,005). Wzrost stężenia kwasu foliowego o 4 ng/l wiązał się z 40-procentową redukcją ryzyka choroby wieńcowej (iloraz szans 0,63; 95% przedział ufności 0,46–0,85; p < 0,01). W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu stężenia homocysteiny, wieku, hiperlipidemii, nadciśnienia tętniczego i obciążającego wywiadu rodzinnego, niedobór kwasu foliowego pozostał niezależnym czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej (iloraz szans 2,6; 95% przedział ufności 1,1–6,5; p < 0,05).*

Wnioski: *Niedobór kwasu foliowego może być niezależnym od homocysteiny czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca.* (Folia Cardiol. 2003; 10: 619–624)

kwas foliowy, homocysteina, choroba niedokrwienne serca, miażdżycza

Piśmiennictwo

1. Finkelstein J.D. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* 1990; 1: 228.
2. Morrison H.I., Schaubel D., Desmeules M., Wigle D.T. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996; 275: 1893–1896.
3. Robinson K., Arheart K., Refsum H. i wsp. Low circulating folate and vitamin B₆ concentrations. Risk factors for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97: 437–443.
4. Verhoef P., Meleady R., Daly L.E. i wsp. Homocysteine, vitamins status and risk of vascular disease. *Eur. Heart J.* 1999; 20: 1234–1244.
5. Pancharuniti N., Lewis C.A., Sauberrlich H.E. i wsp. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 59: 940–948.
6. Selhub J., Jacques P.F., Bostom A.G. i wsp. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid artery stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 286–291.
7. Bubout D., Petermann M., Hirsch S. i wsp. Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition* 2000; 16: 434–438.
8. Folsom A.R., Nieto J., McGovern P.G., Tsai M.G., Malinow R., Eckfeldt J.H. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism and B vitamins. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1998; 98: 204–210.
9. Rimm E.B., Willett W.C., Hu F.B., Sampson L., Colditz G.A., Manson J.A.E. Folate and vitamin B₆ from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279: 359–364.
10. Verhaar M.C., Stroes E., Rabelink T.J. Foliates and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 6–13.
11. Title L.M., Cummings P.M., Giddens K., Genest J.J. Jr, Nassar B.A. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 758–765.
12. Chambers J.C., Ueland P.M., Obeid O.A., Wrigley J., Refsum H., Kooner J.S. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentration of free plasma homocysteine. *Circulation* 2000; 102: 2479–2483.
13. Doshi S.N., McDowell I.F., Moat S.J. i wsp. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1196–1202.
14. Wilink H.W., Stroes E.S., Erkelens W.D. i wsp. Influence of folic acid on postprandial endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 185–188.
15. Verhaar M.C., Wever R.M.F., Kastelein J.J.P., Van Dam T., Koomans H.A., Reblink T.J. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, improves endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 237–241.
16. Verhaar M.C., Wever R.M.F., Kastelein J.J.P. i wsp. Effect of folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia: a randomised placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 335–338.
17. Vermeulen E.G., Stehouwer C.D., Twisk J.W. i wsp. Effect of homocysteine — lowering treatment with folic acid plus vitamin B₆ on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355: 517–522.
18. Usui M., Matsuoka H., Miyazaki H., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocysteinemia: restoration by folic acid. *Clin. Sci.* 1999; 96: 235–239.
19. Doshi S.N., McDowell I.F., Moat S.J., Payne N., Durrant H.J., Lewis M.J. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 2002; 105: 22–26.
20. Stroes E.S.G., Van Faassen E.E., Yo M. i wsp. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 2000; 86: 1129–1134.
21. Durand P., Prost M., Blache D. Prothrombotic effects of folic acid deficient diet in rats platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1996; 121: 231–243.
22. Hankey G.J., Eikelboom J.W. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407–413.