대한임상신경생리학회지 7(2):101~106, 2005 ISSN 1229-6414

근위축성측삭경화증의 유전자 이식 마우스 모델에서 비타민 복합요법의 신경보호효과

서울대학교 의과대학 서울대병원 신경과, 서울대학교 의과대학 뇌신경과학교실
서울대학교 보라매병원 신경과†, 서울대학교 분당병원 신경과‡

민주홍 · 박종하 · 조애신 · 김미연 · 홍윤호† · 성정준 · 박경석‡ · 이광우

Neuroprotective Effects of Multi-vitamin Therapy in Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Ju-Hong Min, M.D., Jong-Ha Park, M.D.*, Ae-shin Cho, M.D.*, Mi-Yeon Kim, M.D.*, Yoon-Ho Hong, M.D.†, Jung-Joon Sung, M.D., Kyung-Seok Park, M.D.‡, Kwang-Woo Lee, M.D.

*Department of Neurology, Seoul National University Hospital, Seoul National University Clinical Research Institute of Seoul National University Hospital**
Department of Neurology, Seoul Municipal Boramae Hospital, Seoul National University†
Department of Neurology, Seoul Bundang Hospital, Seoul National University‡

Background: There is no currently effective treatment for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), although this disorder is a progressive neurodegenerative disease resulting in death within several years. Because recent evidence suggests that homocysteine (HC) is highly related to neurodegenerative disorders with aging, we tried to elucidate the effects of multi-vitamin therapy on G93A SOD1 transgenic mice.

Methods: We treated this murine model of ALS with multi-vitamin (folic acid 1.97 mg/day, pyridoxine 0.98 mg/day, cyanocobalamin 0.1 mg/day) from 45 days of age, per oral. We performed the rotarod test from postnatal 10th week, weekly.

Results: We found that multi-vitamin reinforcement significantly prolonged average lifespan and delayed disease onset with improvement of motor performance. However, it did not significantly slow disease progression and statistical differences of weight loss were not observed between in transgenic mice and controls.

Conclusions: These results suggest that multi-vitamin can be a potent therapeutic strategy for familial forms of ALS.

Key Words: ALS, Copper/zinc superoxide dismutase, SOD1, Vitamin, Homocysteine, Transgenic mice

서 론

근위축성측삭경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis, 이하 ALS)은 뇌의 운동피질에 있는 상부 운동 신경원과 뇌간에 위치한 하부 운동 신경원의 선택적인 사멸을 특징으로 하는 신경 퇴행성 질환이다.[1,2] ALS 환자의 90%가 산발적 ALS (sporadic ALS: SALS)이며 나머지 10%의 환자가 가족성 ALS (Familial ALS: FALS)로 알려져 있고, FALS에서 약 20%의 환자들이 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 의 과오 돌연변이(missense mutation)에 의한 독성 기능의 획득(gain of function)을 통해 발생한다고 알려져 있다. 이러한 FALS와 SALS는 임상적 양상이나 신경병리학적 소견 상 유의한 차이가 없어 두 질환 군에는 공통의 병인론적 기전(patho-

Address for correspondence
Kwang-Woo Lee, M.D., PhD.
Department of Neurology, Seoul National University Hospital,
28 Yongon-Dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744
Tel: +82-2-2072-3215 Fax: +82-2-744-1785
E-mail : Kwoo@plaza.snu.ac.kr

Jung-Joon Sung, M.D., Ph.D.
Department of Neurology, Seoul National University Hospital,
28 Yongon-Dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744
Tel: +82-2-2072-2278 Fax: +82-2-744-1785
E-mail : jjsaint@snu.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구(20-PJI-PG3-21304-0004)와 2004년도 서울특별시립보라매병원 임상공동연구비(03-2004-3))의지원에의해이루어졌음 .

genetic mechanism)이 작용하리라 추측하고 있으며 FALS에 대한 유전적 그리고 병태생리학적 규명을 통해 ALS 환자의 대부분을 차지하는 SALS의 병태생리기전을 밝혀 낼 수 있으리라 기대되어 왔다.[3,4] 특히, SOD1 돌연변이와 같은 유전적 요인을 선천적으로 가지고 태어남에도 불구하고 ALS의 질병이 발현되는 시점은 나이가 든 고령이라는 점은 ALS의 병리기전에 노화와 관계된 어떤 요인이 관여할 것이라는 점을 시사해왔다.

호모시스테인(homocysteine, HC)은 인간이 외부로부터 끊임 없이 섭취하는 단백질이 체내에서 대사되는 과정에서 생성되는 중간 산물로서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical이나 superoxide 와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 통해 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.[5] 과거에는 HC의 대사에 필수적인 효소의 부족이나 비타민 결핍에 의한 조효소(cofactor)의 부족을 초래하는 유전적인 질병에 의해 HC의 혈청농도가 증가한다고 생각되었으나, 최근에 비타민 결핍과 상관 없이도 노화가 진행됨에 따라서 HC의 혈청농도가 증가하며, 특히 고령에서는 젊은 사람에 비해 HC의 농도가 증가되어 있다는 것이 밝혀진 바 있다.[6] 이와 같은 결과는 신경 퇴행성 질환이 고령에서 발병하는 데에 기여할 것으로 생각되는 노화와 관계된 요인 중의 하나가 HC일 가능성을 제시하는 것이다.

저자는 운동신경에 SOD 1 돌연변이와 같은 유전적인 선행조건이 있는 상태에서, 나이가 듦에 따라 증가하는 HC에 의한 세포독성이 축적되어 ALS의 발병에 기여할 것이라는 점을 토대로, ALS 동물모델에서 HC 농도를 낮추는 것으로 알려져 있는 복합 비타민 요법의 효과를 밝히고자 하였다.

대상과 방법

1. 실험대상

93번 염기서열에서 글라이신(Glycine)이 알라닌(Alanine)으로 치환된 돌연변이 SOD1 G93A 대립유전자를 이식한 마우스(G93A SOD1 transgenic mice)는 Jackson 실험실(Bar Harbor, ME)로부터 받았다. G93A SOD1 유전자 이식 마우스는 B6SJLF1/J 하이브리드 마우스(hybrid females)와 교배 되었고, 인간의 G93A 이식 유전자는 유전자 이식 마우스 자손의 꼬리 조직으로부터 얻어진 DNA의 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 을 통해 확인되었으며, 모든 마우스는 12시간의 빛과 어두움 사이클 (light/dark cycle) 하에서 길러졌다. 이 실험의 모든 과정은 미국국립보건원에서 제시한 실험동물관리지침에 따라 시행되었다. 유전자 이식 마우스의 자손은 무작위로 대조군(동일한 삼투압의 생리식염수 투여군) 9마리, 또는 복합비타민 투여군 9마리로 배정되었다. 생후(postnatal) 45일부터 복합비타민은 엽산(0.176 mg/ml), 피리독신(0.088 mg/ml), 비타민 B12 (cyanocobalamin) (0.0088 mg/ml)를 물에 섞어 자유급식 하였고, 일일 비타민 평균 섭취량은 엽산 1.97 mg, 피리독신 0.98 mg, 비타민 B12 0.1 mg으로 정하였다.

2. 검사

1) 체중 변화와 육안관찰

매일 생존 여부에 대해 관찰하고, 매주 체중을 측정하였다. 생후 10주의 체중과 실험 종료 시기인 생후 19주의 체중을 측정하여 체중 감소 비율을 각 군끼리 비교하였다. G93A 유전자 이식 마우스의 발병 양상은 안정시 진전(resting tremor)을 시작으로, 보행장애와 한쪽 또는 양쪽 다리의 마비(paralysis of one or both hindlimbs)로 진행하며, 질병 말기에는 완전히 마비 상태가 되었다. 발병 시점(onset of disease)은 고빈도(high frequency)의 안정시 진전이나 보행장애, 또는 꼬리를 잡고 들어 올렸을 때 뒷다리(hindlimb)의 신전(extension)이 관찰되지 않을 때로 정의하였다. 생존분석(survival analysis)을 위해서는 한쪽으로 눕힌 채 30초 이내에 바로 서지 못하거나 움직일 수 없을 때, 이 시기를 사망시점으로 기록한 후 희생시켰다(sacrificed).

2) 운동기능검사 (Rotarod)

생후 60일째부터 rotarod 기구를 이용한 운동기능검사(motor function test)를 매주 시행하였는데, 검사를 시작하기 하루 전에 16 rpm의 속도에서 최대 60초까지 연속해서 3번 미리 연습을 하고, 다음날 본격적인 검사를 시행하였다. 검사방법은 가속화 모델의 rotarod를 사용하여 지름 2.2 cm의 가는 봉(rod)에 생쥐를 위치시킨 후, 16 rpm의 속도로 돌아갈 때, rotarod에서 떨어지기까지의 시간을 변수로 측정하며 최대 3분간 시행하였다. 이 검사는 1주일에 한 번 시행하는데, 한번 시행 시 총 3회의 검사를 반복하였고, 3회 중 가장 긴 시간이 기록되었으며, 3회의 rotarod 검사에서 3분 이상 수행하지 못했을 때를 발병시기(disease onset)로 정의하였다.

3. 면역형광염색

조직검사를 위해 유전자 이식 마우스와 대조군에서 pentobarbital (30 mg/kg i.p.)로 마취 후, 0.1M phosphate-buffered saline (PBS)와 4% paraformaldehyde을 10분 동안 심장을 통해 관류시켰다. 척수는 4~10 mm의 긴 분절을 얻기 위해서 박리되었고, 지표로서 확장부위 (enlargement portion)를 사용하여 요추와 경추 부위를 확인하였다. 조직은 4% paraformaldehyde로 8시간동안 후고정되었다(postfixation). 조직 덩어리(block)는 동결방지(cryoprotection)를 위해 30% 자당(sucrose)에서 24시간동안 처리된 후, 드라이아이스(dry ice)로 냉각된 isopentane 용액에 넣어졌다. 냉동된 조직 덩어리는 30 μm의 두께로 요추와 경추에서 얻어졌고, free-floating method (24~72시간, 4℃)를 사용하여 anti-homocystein antibody (1:500 dilution;

Upstate Biotechnology, NY), 또는 monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:500 dilution; Sigma), 중에 한 가지와 함께 배양되었다. 면역반응(immunoreactivity) 신호 증폭 후, diaminobenzidine (DAB Chromogen; Dakocytomation, CA)을 사용하여 확인하였다. 각 절단면은 젤라틴으로 코팅 된 슬라이드에 고정시킨 후, 형광현미경으로 촬영하였다.

4. 통계적 분석

각 실험에 대하여 적어도 한 그룹 당 9마리의 쥐가 포함되었고, 수치는 평균±표준편차로 표현되었다. 생존율과 발병시기의 비교를 위해서 Kaplan-Meier survival analysis (Log-Rank test)가 사용되었다. 체중의 변화와 rotarod 검사의 비교를 위해서는 Mann-Whitney U test 등을 사용하여 분석하였다. 모든 통계적인 분석은 Graphpad Prism for Windows (version 4.0)를 사용하여 시행하였다.

결 과

1. 체중 변화와 육안관찰

복합비타민 투여시기를 고려하여 생후 9주와 19주의 체중감소 정도를 각군에서 비교시, 복합비타민 투여군은 12.9%, 대조군은 15%의 체중 감소율을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$)(Fig. 1). 고빈도의 안정시 진전, 보행장애, 또는 뒷다리의 신전장애 등이 육안적으로 관찰되는 것이 rotarod검사에서 운동장애가 발생하는 것과 관련이 있었으므로, rotarod검사시의 운동장애시기를 발병시기로 간주하였다.

2. 발병 시기, 유병기간과 생존율 분석 (survival assay)

rotarod검사의 분석을 통해서 발병시기를 비교해 보면, 복합비타민군은 평균 나이 111.3±1.7일인데 반해, 대조군은 96.6±2.1일로 이는 통계적으로 유의한 결과를 보였다($p<0.05$)(Fig. 2). 유병기간은 복합 비타민군이 30.3±11.1일이고 대조군은 35±8.6일로 오히려 대조군이 조금 더 길었으나, 통계적인 차이는 없었다($p>0.05$). 생존율 분석시, 평균 마우스 생존율이 복합 비타민 투여에 의해서 125.2±3.2일에서 138.3±2.8일로 유의하게 증가되

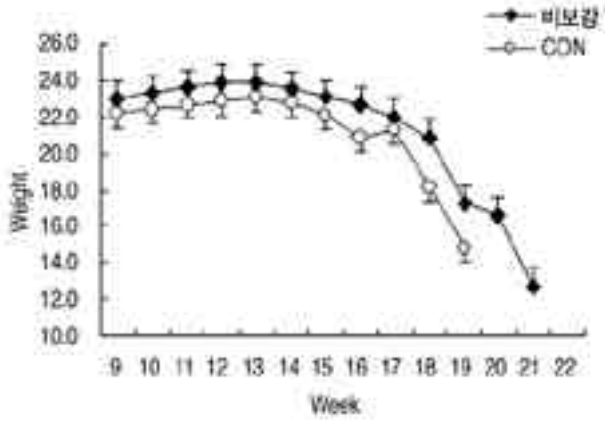

Figure 1. Time course of disease progression in G93A SOD1 mice monitored with Body weight measurement (n=9 per treatment group). Body weight monitored weekly. There is no significant difference both groups in body weight. Body weight of multi-vitamin-treated (closed symbols) and saline-treated mice (open symbols) are shown as mean ± SEM. Statistical analysis (Man-Whitney U test) showed $p>0.05$ for bodyweight.

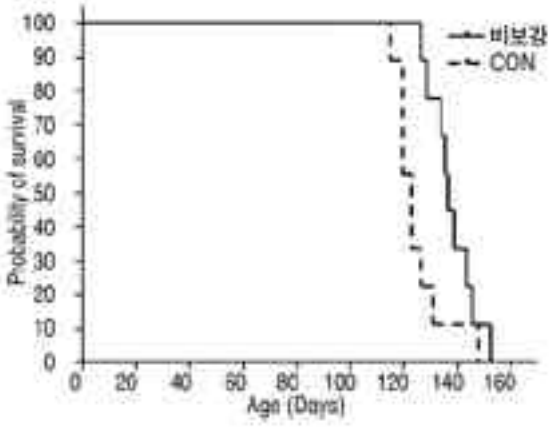

Figure 2. Effects of multi-vitamin treatment on survival of G93A transgenic mice (n=9 per treatment group). The age of death, defined as the time mice were unable to roll over themselves within 30 seconds, was recorded for both groups. Results are shown for G93A transgenic mice receiving saline (dashed line) or multi-vitamin (solid line). The analysis was performed using the Kaplan-Meier method. Statistical analysis using a log-rank test showed $p<0.05$ for survival.

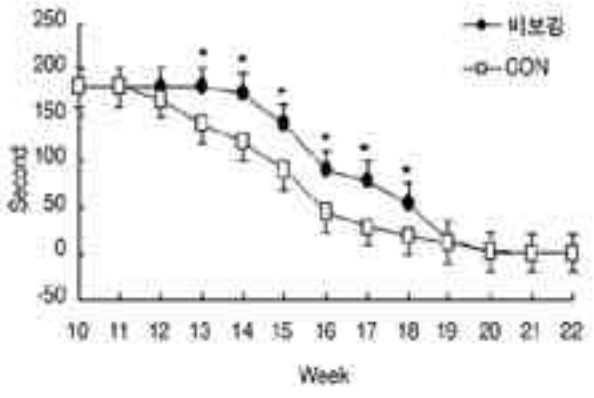

Figure 3. The effect of multi-vitamin treatment on motor function in G93A SOD1 transgenic mice from 70 days of age (n=9 per treatment group). There is an improvement in rotarod test. Rotarod performance of multi-vitamin-treated (closed symbols) and saline-treated mice (open symbols) are shown as mean ± SEM. (*$p<0.05$, Man-Whitney U tests).

었다($p<0.05$).

3. 운동기능검사

균형능력과 운동조화능력을 평가하기 위한 rotarod 검사시, 복합비타민 투여군에서는 대조군에 비해 향상된 운동능력이 관찰되었다($p<0.05$)(Fig. 3).

4. 면역화학검사

G93A SOD1 유전자 이식 마우스의 신경교증에 대한 복합비타민요법의 효과를 확인하기 위해서 120일 되는 날, 면역조직화학염색(immunohistochemistry)통해 GFAP 발현을 확인하였으나, 요추 단면의 염색정도를 비교한 결과, 대조군에 비해 복합비타민 투여군에서 뚜렷한 GFAP 면역반응이 감소하지는 않았다(Fig. 4). 그러나, 복합비타민 투여가 ALS 마우스에서 HC농도를 감소시키는가를 확인하기 위해서 각 실험군의 요추 단면에서 HC 항체에 대한 면역반응을 확인한 결과, 대조군에 비해 복합비타민 투여군에서 HC에 대한 면역반응이 매우 낮은 정도로 감소해 있는 것을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

이번 연구는 복합비타민 요법이 G93A SOD1 이식 마우스에서 ALS의 발병을 지연시키고 질병의 진행중 운동기능의 향상을 가져오고 생명을 연장시킨다는 결과를 얻었다. 이는 신경교증(gliosis)에 대한 신경보호효과와 직접적인 관련은 없었으나, 복합비타민에 의한 HC의 농도 감소와 밀접한 관련이 있었다.

HC은 외부로부터 섭취한 단백질이 대사되는 과정 중 메티오닌(methionine)에 의해 생성되는 중간 산물로서 여러 기전을 통해 세포독성을 나타낸다. 가장 잘 알려져 있는 것은, 치올(thiol)기의 자가산화(autoxidation)를 통해 수퍼옥사이드(superoxide)나 과산화수소(hydrogen peroxide)와 같은 reactive oxygen species (ROS)가 생성되는 과정으로, 이때 생성된 수퍼옥사이드는 단백질, 지질, DNA를 손상시킬 뿐만 아니라 질소산화물(nitrogen oxide, NO)과 결합하여 퍼록시나이트라이트(peroxynitrite, $ONOO^-$)를 발생시키고 세포독성에 기여한다.[5] 또한, 메티오닌 (methionine)에 여러 대사과정에서 메틸기를 제공하면 HC이 생성되는데, 이때 생성된 HC이 MTHFR, cytathionine β-synthase (CBS), methionine synthase (MS) 등의 효소들에 의해서 다시 적절히 대사 되지 않으면, 부족한 메틸기의 보충이 일어나지 않게 된다. DNA 생성과정과 같은 생체내 중요한 대사과정에서 메틸기의 보충이 부적절할 경우, 손상된 DNA의 복구가 불가능해지고 결국 가중된 DNA의 손상이 세포 손상을 초래하게 되는 것이다.[6] 그 외에도 HC은 NMDA 수용체를 포함한 글루타메이트(glutamate) 수용

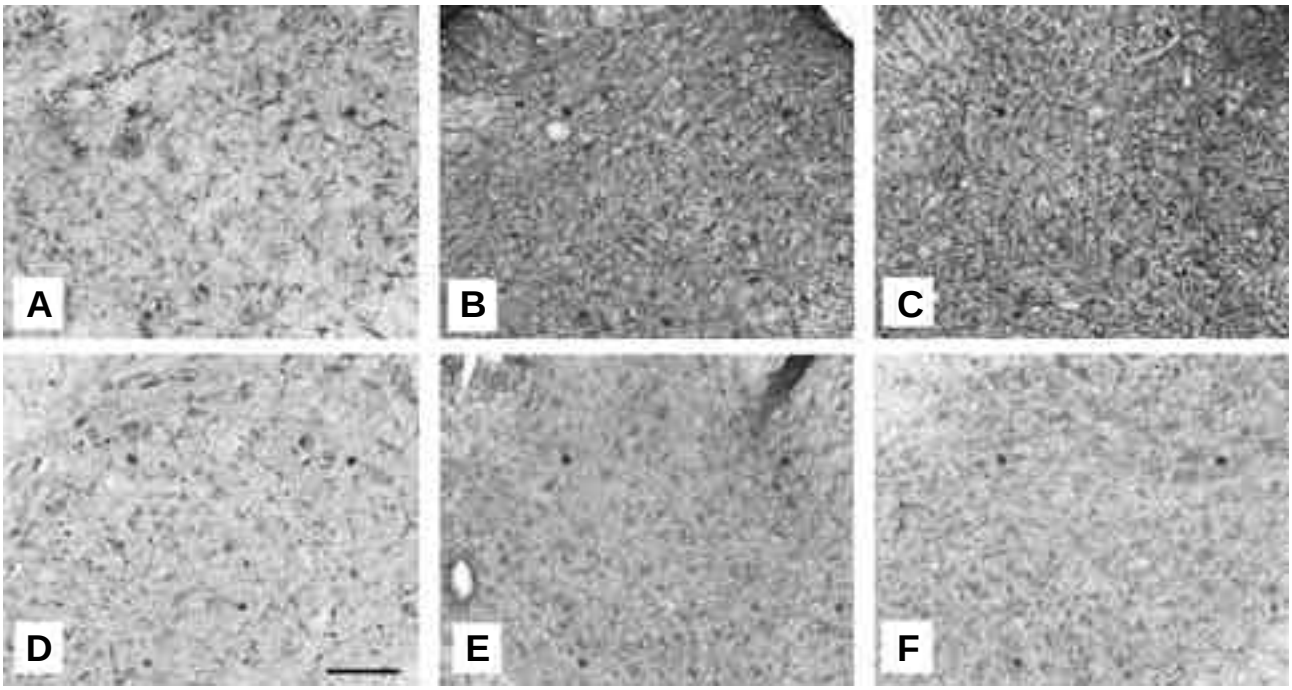

Figure 4. Effects of multi-vitamin treatment in G93A SOD1 transgenic mice. Immunostaining was performed in the spinal cords of G93A transgenic mice and wild-type mice (non-transgenic littermate) at 120 days of age. Sections of lumbar spinal cords were immunostained with GFAP (**A**, **B**, **C**) and anti-homocysteine antibody (**D**, **E**, **F**). Multi-vitamin-treatment did not reduce GFAP (marker of astrocytosis) (**C**) in the ventral horn of the lumbar spinal cord of G93A transgenic mice at 120 days of age, compared with wild-type (**A**) and Saline-treated G93A SOD1 transgenic mice (**B**). However, multi-vitamin attenuated immunoreactivity for anti-homocysteine antibody (**F**) in the ventral horn of the lumbar spinal cord of G93A transgenic mice at 120 days of age, compared with wild-type (**D**) and Saline-treated G93A SOD1 transgenic mice (**E**). Scale bar = 100 μm.

체에 대한 효현제(agonist) 로 작용함으로서 세포의 흥분독성에 기여한다고 알려져 있다.[7]

이러한 HC의 증가는 다른 신경퇴행성 질환들과 밀접한 관계가 있어, 고호모시스틴혈증 (hyperhomocysteinemia)은 동맥경화증 (atherosclerosis)과 관련이 있고 심지어 중등도의 HC의 증가 (15~20 mmol/l)조차도 혈관질환의 중요한 위험인자 일 뿐 아니라, 파킨슨씨 병이나 알츠하이머병을 비롯한 다른 치매 질환들도 고호모시스틴혈증과 관련되어 있음이 이미 밝혀진 바 있다.[6-9] 이렇게 증가되어 있는 HC의 혈장농도는 엽산의 섭취에 의해서 약 30% 정도 낮출 수 있다고 알려져 있을 뿐 아니라, HC의 혈장농도 자체가 엽산이나 인산피리독살(Pyridoxal phosphate), 비타민 B12의 농도와 역의 관계를 보이므로 이들의 섭취부족을 반영하는 민감한 지표로 사용된다.[10-12] 인산피리독살은 비타민 B6 (피리독신)의 활성 조효소로서, HC을 시스타티오닌 (cystathionine)으로 바꾸거나 시스타시오닌을 시스테인 (cysteine)으로 바꾸는 것과 같은 생물학적 아미노산교환반응 (transamination)에 관여하며, 엽산과 비타민 B12는 HC이 메티오닌으로 메틸화되는데 관여한다.[8]

HC와 ALS의 관련성을 살펴 보면, ALS 세포모델에서 HC에 의한 세포독성이 관찰되었고, 특히 A4V SOD1 유전자 이식 운동신경세포에서는 세포독성이 HC의 용량에 비례하는 소견을 보였다.[13] 또한, HC의 세포독성은 이식된 SOD1 유전자의 종류에 따라 다르게 나타나며, 항산화물질(antioxidant)와 구리 킬레이터 화합물(copper chelator)에 의해서 막을 수 있는 데 반해, 글루타메이트 수용체 차단제(blocker)나 NOS 억제제(inhibitor) 또는 NO dependent Guanylyl cyclase에 의해서는 막을 수 없다는 게 밝혀졌다.[12] 즉, 이러한 일련의 결과들은 HC의 세포독성이 SOD1 돌연변이에 의한 기능의 소실(loss of function) 만으로는 설명될 수 없는 것일 뿐 아니라, 글루타메이트를 통한 흥분독성에 의해서가 아니라는 것을 의미하며, 이는 ALS의 병리 기전과 HC에 의한 세포 독성 기전이 공통점을 갖고 있음을 제시하는 것이다. 또한, 비타민 결핍이나 유전적인 질환과 상관 없이 나이가 들수록 HC의 혈청농도가 증가된다는 최근의 보고는 ALS와 같은 신경퇴행성질환이 태생적으로 세포손상에 민감한 선행조건을 갖고 있음에도 불구하고 나이가 들어서 발병하는 기전에 HC이 관여하고 있다는 가능성을 시사한다. 우리는 이번 연구를 통해 ALS의 발병기전과 HC의 관련성을 확인하였고, 복합비타민 요법이 ALS 유전자 이식 마우스에서 혈중 HC의 농도를 낮출 뿐 아니라, 발병시기를 늦추고 운동능력의 향상을 가져옴과 동시에 생존률을 증가시킨다는 것을 밝혔다. 이는 향후 ALS의 보조적인 치료제로서 복합비타민 요법의 가능성을 제시했다는 점에서 가장 큰 의의가 있다. 현재까지 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 항산화제의 사용이 ALS환자의 질병에 뚜렷한 효과가 없다고 보고되어 왔으나, 이러한 연구들이 대부분 디자인이나 질병 관찰 기간에 결함이 발견되었다고 지적된 바 있다.[14] 또한, 일부 보고에서는 10년 이상 비타민 E를 정기적으로 복용한 환자가 그렇지 않은 환자에 비해서 ALS의 발병율이 낮다는 것을 보여주었으며 이외에도 몇몇의 연구에서 ALS에 대한 비타민의 긍정적인 평가를 밝힌 바 있어, 특별히 금기 사항이 없는 ALS환자에서는 비타민 B12, C, E 등이 추천되고 있는 실정이다.[15] 이러한 점을 감안한다면 이번 연구 결과는 임상시험 단계는 아니나, 적어도 in vitro뿐이 아닌 in vivo 실험에서도 복합비타민 요법이 신경보호효과를 가져 온다는 것을 제시함으로써, 향후 ALS환자에서의 복합비타민 요법의 가능성을 보여준 것이라고 할 수 있다.

단, 복합비타민 요법에 의해서 ALS 마우스의 요추에서 HC의 농도가 감소하는 것이 관찰된 반면, GFAP의 발현이 감소하지는 않아서 이러한 기전이 신경교증의 감소와 직접적인 연관성을 확인할 수는 없었다. 따라서, HC의 농도를 낮추는 것과 동시에 ALS 유전자 이식 마우스에서 관찰된 복합비타민 요법의 신경보호효과 기전을 밝히기 위해서는 고사(apoptosis)나 항산화효과 등에 대한 면역반응 검사 등이 더 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Al-Chalabi A, Leigh PN. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2000;13(4):397-405.
2. Appel SH. A unifying hypothesis for the course of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism and Alzheimer disease. *Ann Neurol* 1981;10(6): 499-505.
3. Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol* 1986;36(4):511-517.
4. Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1999;8(2):157-164.
5. Zhang F, Slungaard A, Vercellotti GM, Iadecola C. Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol* 1998;274(6):1704-1711.
6. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol* 2000;57(10):1422-1427.
7. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(11):5923-5928.
8. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55(11):1449-1455.
9. Mayer FL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis, *J Am Coll Cardiol* 1996;27(3): 517-527.
10. Selhub J, Robinson K, Tan KS, et al. Vitamin status and primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:1346-1350.

11. Joosten E, van den Berg A, Reizler R, et al. More evidence that deficiencies of Vitamin B-12 (cobalamin), Folate and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:468-476.
12. Chasen-Taber l, Selhub J, Rosenberg IH, et al. A prospective study of folate and vitamin B6 and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr* 1996;15(2): 136-143.
13. Sung JJ, Kim HJ, Choi-Kwon S, Lee J, Kim M, Lee KW. Homocysteine induces oxidative cytotoxicity in Cu,Zn-superoxide dismutase mutant motor neuronal cell. *Neuroreport* 2002;13(4):377-381.
14. Orrell RW, Lane RJ, Ross M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;25(1):CD002829.
15. Ascherio A, Weisskopf MG, O'reilly EJ, et al. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005;57(1):104-110.