

## بررسی سطح هموسیستئین پلاسما در بیماران همودیالیزی شهر کرمان در سال ۱۳۸۴

دکتر سیده مجتبی سهروردی<sup>۱\*</sup>، دکتر جلال آزمندیان<sup>۲</sup>، دکتر فریدون دریایی<sup>۳</sup>، دکتر امیر هوشنگ محمدپور<sup>۴</sup> و دکتر میترا مهربانی<sup>۵</sup>

### خلاصه

مقدمه: هموسیستئین اسید آمینه‌ای است که در مسیر متابولیسم متیونین به سیستئین تشکیل می‌شود. محدوده طبیعی هموسیستئین پلاسما در انسان  $5-15 \mu\text{mol/L}$  است. افزایش غلظت هموسیستئین به میزان  $5 \mu\text{mol/L}$  بیش از حد طبیعی، سبب افزایش خطر بیماری‌های قلبی - عروقی، آترواسکلروز و ترومبوز می‌شود. از طرف دیگر در بیماران همودیالیزی بنابه دلایلی چون اورمی، فاکتورهای ژنتیکی، عوامل وابسته به دیالیز و کاهش ویتامین‌های گروه B، سطح پلاسمایی هموسیستئین بالا می‌رود. این مطالعه به منظور بررسی سطح پلاسمایی هموسیستئین، ویتامین B12 و اسید فولیک در بیماران همودیالیزی شهر کرمان و مقایسه آن با افراد سالم انجام شد.

روش: از ۲۵ بیمار همودیالیزی مراجعه کننده به ۲ مرکز دیالیز شهر کرمان و ۲۵ فرد سالم نمونه پلاسمایی جهت تعیین مقدار هموسیستئین، ویتامین B12 و اسید فولیک گرفته شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. آنالیز هموسیستئین با دستگاه گاز- کروماتوگرافی و آنالیز ویتامین‌ها به روش رادیوایمنواسی انجام شد. یافته‌ها: در گروه بیماران با میانگین سنی  $53/3 \pm 13/5$ ، میانگین مقدار هموسیستئین برابر  $19/7 \pm 8/8$  بود که با میانگین هموسیستئین افراد سالم ( $15/3 \pm 3$ ) تفاوت معنی دار داشت ( $P=0/024$ ). مدت زمانی که از شروع دیالیز بیمار می‌گذشت و نیز سن بیماران تأثیری در مقدار هموسیستئین آنها نداشت. سطح سرمی ویتامین B12 و فولیک اسید در گروه بیمار به ترتیب عبارت بودند از:  $4672 \pm 2379 \text{ pmol/L}$  و  $47 \pm 17 \text{ nmol/L}$ . این مقادیر در جمعیت سالم به ترتیب برابر  $959 \pm 409 \text{ pmol/L}$  و  $14 \pm 12 \text{ nmol/L}$  بودند.

نتیجه‌گیری: هرچند میانگین هموسیستئین در بیماران دیالیزی نسبت به افراد سالم بالاتر بود ولی به مقدار فاحشی در مقایسه با میانگین سطح هموسیستئین در بیماران همودیالیزی جوامع دیگر کمتر بود. به نظر می‌رسد که این اختلاف به عوامل مختلفی از جمله مصرف آمپول‌های ویتامین B12 و B Complex بعد از هر بار دیالیز به صورت وریدی و تجویز اسید فولیک خوراکی در این بیماران بستگی داشته باشد. بنابراین توصیه می‌شود این روند ادامه یابد.

واژه‌های کلیدی: هموسیستئین، همودیالیز، ویتامین B12، اسید فولیک

۱- استادیار گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- استادیار گروه نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۳- استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۵- استادیار گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

\* نویسنده مسؤول: گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: smsohrevardi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۱/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۲

## مقدمه

هموسیستین اسید آمینه‌ای است که در مسیر متابولیسم متیونین به سیستین تشکیل می‌شود. غلظت نرمال هموسیستین در انسان  $5-15 \mu\text{mol/L}$  است. افزایش غلظت هموسیستین به میزان  $5 \mu\text{mol/L}$  سبب افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی به میزان  $1/5-1/6$  برابر شده است (۱۶). ۵۰٪ از کل موارد مرگ و میر در بیماران End-stage Renal disease (ESRD) به علت بیماری‌های قلبی - عروقی ناشی از آترواسکلروز می‌باشد. از آنجا که در بیماران دیالیزی فاکتورهای کلاسیک و آترواسکلروز هر دو قابل پیشگیری و بعضی از آنها تعدیل پذیر می‌باشند (۱۰)، اهمیت مطالعات انجام شده در این راستا بیشتر مشخص می‌شود.

در مطالعه Massy شیوع هیپره‌موسیستینمی در بیماران همودیالیزی ۸۰ درصد (۱۱) و در مطالعه دیگری برابر با ۹۷ درصد (۵) بوده است. در اغلب مطالعاتی که در این مورد بر روی بیماران دیالیزی انجام شده افزایش سطح هموسیستین پلاسما گزارش شده است. برای مثال در دو مطالعه سطح هموسیستین پلاسما در بیماران دیالیزی  $32/7 \pm 8/6$  و  $50/5 \pm 6/1$  میکرومول در لیتر گزارش شده است (۶، ۱۸). ولی در یک مطالعه که بر روی ۹ کودک همودیالیزی و ۱۲ کودک با دیالیز صفاقی انجام شده میانگین غلظت پلاسمایی هموسیستین برابر  $20 \mu\text{mol/L}$  بوده است (۲۰). متابولیسم هموسیستین وابسته به سه کوفاکتور ویتامین  $B_6$  و  $B_{12}$  و اسید فولیک است که سبب تبدیل هموسیستین و یا ری-متیلاسیون آن و تبدیل به متیونین می‌شوند (۱۷). در مورد میزان تأثیر دوزاژ فارماکولوژیکی این دارو بر پایین آوردن سطح هموسیستین پلاسما در بیماران دیالیزی مطالعات انجام شده محدود بوده است.

به طور کلی علت افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی به خوبی شناخته نشده است، ولی به نظر می‌رسد کاهش کلیرانس پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی و افزایش سطح پلاسمایی آن به علل اورمی، فاکتورهای ژنتیکی، عوامل وابسته به دیالیز (۱۱) و نیز

کاهش ویتامین‌های اسید فولیک و ویتامین  $B_{12}$  باشد (۲۴). به طوری که سطح هموسیستین در افراد دیالیزی حدود سه برابر افراد سالم است (۱).

به نظر می‌رسد افزایش سطح هموسیستین یک عامل خطر جدی برای بروز استئوپروز و شکستگی‌های استخوانی متعاقب آن مخصوصاً در افراد مسن و افراد مبتلا به اختلالات بینایی و سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (۲۰). همچنین مطالعات زیادی به بررسی ارتباط بین بالا بودن سطح هموسیستین و اختلالات قلبی-عروقی پرداخته‌اند. افزایش هموسیستین زمینه‌ساز ترومبوز و بیماری‌های عروق کرونر می‌باشد (۲۱). از طرف دیگر هیپره‌موسیستینمی یکی از عوامل خطر ساز آترواسکلروز محسوب می‌شود (۴). در مطالعه دیگری افزایش هموسیستین پلاسما به عنوان یک عامل مهم پیش‌بینی کننده برای فشار نبض و سفتی شریانی (Arterial stiffness) مطرح شده است (۲۲).

از آنجا که هیپره‌موسیستینمی به عنوان یک عامل خطر ساز مهم برای بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی مطرح شده است و افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی نیز به وسیله چندین پژوهش گر مورد تأیید قرار گرفته است (۱۴)، درمان این عارضه در بیماران دیالیزی باید مورد توجه قرار گیرد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که درمان با ویتامین باعث کاهش غلظت پلاسمایی هموسیستین می‌شود و در واقع نقص عملکرد اندوتلیال ناشی از هیپره‌موسیستینمی را کاهش می‌دهد و می‌تواند از حوادث قلبی - عروقی جلوگیری کند (۷). همچنین بسیاری از مطالعات نشان داده است که رژیم‌های غذایی حاوی فولیک اسید غلظت پلاسمایی هموسیستین ناشتا را پایین می‌آورند (۲۱).

به طور کلی ویتامین‌های  $B_6$ ،  $B_{12}$  و اسید فولیک نقش مهمی را هم به عنوان کوآنزیم و هم سوستر در متابولیسم هموسیستین بازی می‌کنند. از بین این سه، به نظر می‌رسد فولات نقش بیشتری در کاهش غلظت هموسیستین دارد (۱۳).

هم‌زمان با روش رادیوایمنواسی انجام شد. اطلاعات به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ مورد آنالیز قرار گرفتند.

### نتایج

از ۲۵ نفر بیمار گروه مورد ۹ نفر (۳۶ درصد) مرد و ۱۶ نفر (۴۶ درصد) زن بودند. محدوده سنی بیماران ۲۵ تا ۷۲ سال، با میانگین  $53/2 \pm 2/5$  سال بود.

بیماران بر اساس مدت زمانی که از شروع دیالیز شدن آنها می‌گذشت و نیز بر اساس سن در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند (جدول ۱ و ۲). در هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر سطح هموسیستین پلاسما دیده نشد.

همچنین بین سطح هموسیستین و سن بیماران رابطه معنی‌داری وجود نداشت ( $t=0/188$ ,  $P=0/369$ ).

جدول ۱: میزان غلظت هموسیستین پلاسما در بیماران بر اساس

مدت زمانی که از شروع دیالیز بیمار می‌گذرد

نتیجه آماری	میانگین $\pm$ انحراف معیار	تعداد بیماران	غلظت هموسیستین ( $\mu\text{mol/L}$ ) مدت (سال)
F=۱/۸	۱۶/۸ $\pm$ ۶/۶	۱۳	۱-۳
Df=۲	۲۳/۹ $\pm$ ۱۱/۹	۷	۳-۵
P=۰/۱۸۸	۲۱/۶ $\pm$ ۷/۲	۵	۵ <

جدول ۲: میزان غلظت هموسیستین پلاسما در بیماران بر اساس سن

نتیجه آماری	میانگین $\pm$ انحراف معیار	تعداد بیماران	غلظت هموسیستین ( $\mu\text{mol/L}$ ) سن (سال)
F=۰/۹	۲۰/۳ $\pm$ ۸/۷	۶	۲۰-۴۰
Df=۲	۱۶/۳ $\pm$ ۴/۳	۸	۴۰-۶۰
P=۰/۴۱۹	۲۱/۸ $\pm$ ۱۰/۹	۱۱	۶۰ <

با توجه به تعداد زیاد بیماران دیالیزی در سطح کشور و این که تاکنون سطح هموسیستین پلاسما در این افراد بررسی نشده، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی غلظت پلاسمایی هموسیستین به عنوان یکی از عوامل خطر ساز مهم و مقایسه آن با غلظت هموسیستین افراد سالم در شهر کرمان در سال ۱۳۸۴ انجام شد.

### روش بررسی

در این مطالعه مقطعی بیماران گروه مورد را ۲۵ بیمار همودیالیزی مراجعه کننده به دو مرکز دیالیز شهر کرمان (بیمارستان شفا و ثامن الحجج) تشکیل می‌دادند. این بیماران روزانه ۱ عدد قرص اسید فولیک ۱mg به صورت خوراکی و یک آمپول ویتامین B12 و B Complex پس از هر بار دیالیز به صورت تزریقی وریدی دریافت می‌کردند. به بیماران توصیه شد از ویتامین‌های دیگر و یا ویتامین‌های ذکر شده بیش از مقدار متداول حداقل از ۱/۵ ماه قبل از نمونه‌گیری خودداری نمایند. بسته به زمان نوبت دیالیز به بیماران توصیه می‌شد که شب قبل شام سبکی مصرف کنند و صبح روز بعد، قبل از انجام دیالیز، نمونه خون وریدی جهت تعیین مقدار هموسیستین گرفته می‌شد و برای تعیین مقدار هموسیستین پلاسما در لوله‌های آزمایش مخصوص حاوی KEDTA ریخته شده و سریعاً سانتریفیوژ می‌شد. سپس پلاسمای بیماران تا زمان آنالیز در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. آنالیز هموسیستین با دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC-16A Shimadzu) انجام شد (۸).

در گروه کنترل نیز از ۲۵ دانشجوی پزشکی و داروسازی که سالم بوده، سابقه بیماری قلبی-عروقی یا کلیوی نداشته و از داروهای ذکر شده که احتمال تغییر در سطح هموسیستین می‌دهند استفاده نکرده بودند، نمونه‌گیری به صورت ناشتا برای تعیین مقدار پلاسمایی هموسیستین به صورت ذکر شده به عمل آمد. از هر دو گروه، یک نمونه خون وریدی برای تعیین مقدار اسید فولیک و سطح ویتامین B12 سرم نیز گرفته شد. تعیین مقدار این دو ویتامین توسط کیت اختصاصی آن (DRG Diagnostics Germany) و به طور

بر اساس مطالعات انجام شده، سطح هموسیستین در بیماران دیالیزی مستقل از سن است (۳). در مطالعه حاضر نیز تفاوتی بین غلظت هموسیستین بیماران در گروه‌های سنی مختلف و نیز در دو جنس دیده نشد. هم‌چنین مدت زمانی که از دیالیزی شدن بیمار می‌گذشت تأثیری بر سطح هموسیستین نداشت. این یافته در مطالعه Boston و همکاران تأیید شده است (۲).

تأثیر درمان با ویتامین بر سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران همودیالیزی تا حدودی متناقض می‌باشد. به طور مثال براساس مطالعات Naruszewicz و همکاران تجویز ۱۵mg در روز اسید فولیک و ۱۵۰mg در روز ویتامین B<sub>6</sub> و ۱ mg در هفته ویتامین B<sub>12</sub> به مدت یک ماه در بیماران همودیالیزی، سبب کاهش هموسیستین پلازما به میزان ۳۳/۶٪ شده است. در این بیماران هموسیستین پایه حدود ۱۰۰٪ از هموسیستین نرمال، بالاتر بوده است (۱۵). ولی در مطالعه دیگری که توسط Hyndman و همکاران انجام شده، تأثیر اسید فولیک در این مورد بسیار کم بوده و تجویز ویتامین B<sub>12</sub> نیز نتوانسته هموسیستین را به سطح طبیعی برگرداند (۹).

سطح هموسیستین پایه در بیماران ما هرچند از میزان آن در گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بوده ولی در مقایسه با سایر مطالعات مشابه که در بیماران دیالیزی و بدون ویتامین درمانی و به صورت مقطعی بررسی شده، به مقدار کاملاً فاحشی کمتر بود. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Righetti و همکاران در بیماران همودیالیزی یکی از شهرهای ایتالیا انجام شد متوسط غلظت هموسیستین در بیماران همودیالیزی ۵۹ μmol/L گزارش شده است در حالی که سطح سرمی ویتامین B<sub>12</sub> برابر ۴۰۱ ± ۳۲ pg/ml و سطح اسید فولیک برابر ۳۹ ± ۶ ng/ml بوده است (۱۸). در مطالعه Ducloux نیز که در سه گروه ۲۰ نفره از بیماران دیالیزی انجام شد سطح متوسط هموسیستین پلازما برابر ۳۲/۷ ± ۸/۶ μmol/L و مقادیر ویتامین B<sub>12</sub> و اسید فولیک به ترتیب برابر ۳۸۲ ± ۱۰۸ pg/ml و ۴/۲ ± ۱/۴ ng/ml بوده است.

میانگین هموسیستین پلازما در مردان ۲۰/۱ ± ۱۱/۷ μmol/L و در زنان ۱۹/۴ ± ۷ μmol/L بود که از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین این دو گروه وجود نداشت (P=۰/۵).

میانگین هموسیستین پلازما در بیماران ۱۹/۷ ± ۸/۸ μmol/L و در گروه شاهد ۱۵/۳ ± ۳ μmol/L بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار بود (P=۰/۰۲۴) لازم به ذکر است متغیر سن در دو گروه به عنوان عامل مخدوش‌کننده از مطالعه حذف شد. سطح سرمی ویتامین B<sub>12</sub> و اسید فولیک نیز در دو گروه اندازه‌گیری شد که با هم تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه غلظت هموسیستین، فولیک اسید و ویتامین B<sub>12</sub>

در دو گروه بیمار و شاهد

متغیر	گروه	بیمار	شاهد	P Value
سن (سال)	۵۳/۳ ± ۱۳/۵	۲۳/۲ ± ۱/۳		
هموسیستین (μmol/l)	۱۹/۷ ± ۸/۸	۱۵/۳ ± ۳		۰/۰۲۴
ویتامین B <sub>12</sub> (pg/ml)	۴۶۷ ± ۲۳۷۹	۹۵۹ ± ۴۰۹		<۰/۰۰۱
اسید فولیک (ng/ml)	۳۷ ± ۱۷	۱۴ ± ۱۲		<۰/۰۰۱

### بحث

مکانیسم‌هایی که در اثر افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین، سبب تسریع آترواسکلروز می‌شوند شامل: افزایش ساخته شدن آب اکسیژنه، استرس اکسیداتیو، اختلالات اندوتلیال، افزایش اکسیداسیون LDL، تغییر در لیپوپروتئین a و افزایش احتمال تشکیل لخته در خون است. بر اساس مطالعات بسیاری درمان با ویتامین سبب بهبود اختلالات عروقی می‌شود (۱۹). از طرفی در بیماران دیالیزی سطح سرمی هموسیستین بالا بوده و این بیماران معرض مشکلات قلبی-عروقی و آترواسکلروز زودرس هستند (۱۲).

متیلن تتراهیدوفولات، مصرف مداوم ویتامین‌های B12، B Complex و اسیدفولیک، رژیم غذایی و سایر عوامل نسبت داد. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حداقل در بیماران ما تجویز ویتامین‌ها به صورت ذکر شده و با دوز اندک احتمالاً توانسته مانع از افزایش قابل ملاحظه در غلظت هموسیستین پلاسما شود و حتی اگر نخواهیم ویتامین درمانی با دوز بالا را اجرا کنیم، ادامه روند فعلی می‌تواند به نفع بیماران باشد و پیشنهاد می‌شود روند فعلی تجویز ویتامین ادامه یابد.

در مقایسه با این اعداد و با توجه به نتایج اندازه‌گیری اسید فولیک و ویتامین B12 که در جدول ۳ آمده در می‌یابیم که سطح سرمی ویتامین‌های ذکر شده در بیماران دیالیزی مطالعه حاضر گاهی به چندین برابر مقادیر آنها در مطالعات ذکر شده می‌رسد. هم‌چنین به علت مصرف مداوم داروهای ذکر شده به صورت روزمره، این مقادیر از میزان آن در جمعیت سالم ما نیز بسیار بالاتر بوده است. پایین بودن سطح هموسیستین در بیماران ما نسبت به مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر را می‌توان به عوامل مختلفی از قبیل تغییرات ژنتیکی در آنزیم‌های احیاء کننده

## Summary

### Plasma Homocysteine Concentration in Hemodialysis Patients of Kerman/Iran in 2005

Sohrvardi S.M., Ph.D.<sup>1</sup>, Azmandian J., MD.<sup>2</sup>, Daryae F., Ph.D.<sup>3</sup>, Mohammadpoor A.H., Ph.D.<sup>4</sup>, Mehrabani M., Ph.D.<sup>5</sup>

1. Assistant Professor of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy and Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. Assistant Professor of Nephrology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 3. Assistant Professor of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 4. Assistant Professor of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 5. Assistant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

**Introduction:** Homocysteine is an aminoacid yielded from methionin to cysteine metabolism. Normal plasma concentration of homocysteine in human is between 5-15  $\mu\text{mol/l}$  and an increase more than 5  $\mu\text{mol/l}$  can increase the risk of cardiovascular diseases, atherosclerosis and thrombosis. On the other hand in dialysis patients due to some reasons such as uremia, genetic factors, dialysis related factors and vitamin B group deficiency, the plasma level of homocysteine increases. This study was done to evaluate Plasma vitamin B12, Folic acid and homocysteine levels in kerman hemodialysis patients in comparison to healthy persons.

**Methods:** In this cross-sectional study performed in two hemodialysis units of kerman-Iran, 25 hemodialysis patients and 25 healthy persons were studied. Blood samples were drawn prior to the dialysis session. The samples were centrifuged and the plasma was kept frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Homocysteine level was determined by Gas-Chromatography and vitamin levels analysis were determined by radio assay method.

**Results:** Mean homocysteine level in hemodialysis patients ( $19.7 \pm 8.8 \mu\text{mol/l}$ ) showed significant difference ( $P=0.024$ ) with healthy persons' homocysteine level ( $15.3 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ ). There were no relationship between the time passed since the first dialysis ( $p=0.188$ ) and patients' age ( $p=0.419$ ) with homocysteine levels. Plasma vitmin B12 and folic acid levels in hemodialysis patients were  $4672 \pm 2379 \text{ pg/ml}$  and  $47 \pm 17 \text{ ng/ml}$  respectively. These values were much more than those in healthy persons ( $959 \pm 409 \text{ Pmol/L}$  and  $14 \pm 12 \text{ nmol/L}$  respectively).

**Conclusion:** Although homocysteine level in our patients was more than healthy persons, but it was lower than that of hemodialysis patients in other countries. This difference may be related to some factors such as

genetic factors and administration of daily oral folic acid and Intravenous injection of B12 and B Complex after each dialysis session. Therefore this procedure is recommended in hemodialysis patients.

**Key Words:** Homocysteine, Hemodialysis, Vitamin B12, Acid folic

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 117-123

## References

1. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstorm B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1380-4.
2. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, Tume AL, Yoburn D, Nadea U, *et al.* High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49(1): 147-52.
3. Caliskan S, Kuralay F, Onvural B. Effect of anticoagulants on plasma homocysteine determination. *Clin Chim Acta* 2001; 309(1): 53-6.
4. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828): 1111-15.
5. De vecchi AF, Bamonti-Finazzi S, campo J, Taioli E, Novemberino C, Colucci P, *et al.* Homocysteine, Vitamin B12 and serum erythrocyte folate in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Perit Dial Int* 2000; 20(3): 169-73.
6. Ducloux D, Aboubakr A, Motte G, Toubin G, Fournier V, Chalopin JM, *et al.* Hyperhomocysteinemia therapy in haemodialysis patients: Folinic versus folic acid in combination with B6 and B12. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(5): 865-70
7. Hackam DG, Peterson JC, Spence JD. What level of plasma homocyst(e)ine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocysteine levels above and below 14 mmol/L. *Am J Hypertensi* 2000; 13(1 pt 1): 105-10.
8. Husek P, Matucha P, Vrankova A, Simek P. Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic aminoacid. *J Chromatogr Anal B Technol Biomed Life Sci* 2003; 789(2): 311-22.
9. Hyndman ME, Manns BJ, Snyder FF, Bridge PJ, Scott-Douglas NW, Fung E, *et al.* Vitamin B<sub>12</sub> decreases, but dose not normalize homocysteine and methylmalonic acid in ESRD. *Metabolism* 2003; 52(2): 168-72.
10. Kennedy R, Case C, Fathi R, Johnson D, Isbel N, Marwick TH, *et al.* Dose renal failure cause an atherosclerotic milieu in patients with end-stage renal disease? *Am J Med* 2001; 110(3): 198-204.
11. Massy ZA. Importance of homocysteine, lipoprotein(a) and non-classical cardiovascular risk factors (fibrinogen and advanced glycation end-products) for atherogenesis in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 suppl 5: 81-91.
12. Miyao MK, Hosoi T, Shiraki M, *et al.* Possible involvement of increasing plasma homocysteine level in the age dependent bone loss. *J Bone Minerres* 2000; 15: 459-473.
13. Moson JB, Miller JW. The effect of vitamins B12, B6 and folate on blood homocysteine levels. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 197-203.
14. Moustapha A, Naso A, Nahlawi M, Gupta A, Arheart KL, Jacobsen DW, *et al.* Prospective

- study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* 1998; 97(2): 138-141.
15. Naruszewicz M, Klinke M, Dziewanowski K, Staniewicz A, Bukowska H. Homocysteine, fibrinogen and lipoprotein(a) levels are simultaneously reduced in patients with chronic renal failure treated with folic acid, pyridoxine and cyanocobalamin. *Metabolism* 2001; 50(2): 131-4.
  16. Nekrassova O, Lawrence NS, Compton RG. Analytical determination of homocysteine. A review, *Talanta* 2003; 60: 1085-1095.
  17. Pietrzik K, Bronstrup A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatric* 1998; 157 suppl 2: 135-138.
  18. Righetti M, Ferrario GM, Milani S, Serbelloni P, La Rosa L, Uccellini M, et al. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *Med Sci Monit* 2003; 9(4): P119-24.
  19. Schnyder G, Roffi ME, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345(22): 1593-600.
  20. Schroder CH, de Boer AW, Giesen AM, Monnens LA, Blom H. Treatment of hyperhomocysteinemia in children on dialysis by folic acid. *Pediatr Nephrol* 1999; 13(7): 583-5.
  21. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 2003; 133(5): 1291-5.
  22. Tsai JC, Kuo HT, Chiu YW, Hwang SJ, Chuang HY, Chang JM, et al. Correlation of plasma homocysteine level with arterial stiffness and pulse pressure in hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 2005; 182(1): 121-7.
  23. Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, Van der klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350(20): 2033-41.
  24. Vychytil A, Fodinger M, Papagiannopoulos M, Wolf G, Horl WH, Sunder Plassmann G. Peritoneal elimination of homocysteine moieties in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55(5): 2054-61.