

بررسی اثر تخریب نواحی مختلف سیستم مزوکورتیکولیمبیک بر ایجاد ترجیح مکان شرطی شده با مورفین در موش صحرایی نر

دکتر پویا تحصیلی فهادان، دکتر نوشین یحیوی فیروز آبادی، دکتر محمدعلی خشنودی، دکتر روزبه مطیعی لنگرودی، دکتر احمدرضا دهپور

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: در این مطالعه نقش تخریب الکتریکی دوطرفه ناحیه تگمتال قدامی، غلاف هسته اکومبوس، بخشهای مرکزی و قاعده‌ای-طرفی آمیگدال و بخش میانی قشر پیش پیشانی در کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از سولفات مورفین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی از موش‌های صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است. ۷ روز پس از انجام عمل جراحی و تخریب نواحی دوطرفه نواحی با استفاده از عبور دادن جریان الکتریکی مستقیم ترجیح مکان شرطی شده با سولفات مورفین با دوزهای ۰/۵-۷/۵ mg/kg به صورت زیر جلدی به روش Biased ایجاد گردید. تزریق مورفین با دوزهای ۷/۵ و ۲/۵ و باعث ترجیح مکان شرطی شده ((CPP از طریق افزایش معنی دار در زمان سپری شده توسط حیوان در سمت دریافت مورفین گردید.

یافته‌ها: نتایج بررسی نشان می‌دهد که تخریب الکتریکی دوطرفه ناحیه تگمتال قدامی، غلاف هسته اکومبوس و بخش مرکزی آمیگدال ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را در مقایسه با گروه‌های کنترل خود به طور قابل ملاحظه کاهش دادند، در حالی که از بین بردن بخش قاعده‌ای-طرفی آمیگدال و بخش میانی قشر پیش پیشانی در ناحیه پره لیمبیک با استفاده از جریان الکتریکی تأثیر معنی داری در کسب ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین نداشت.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: تصمیم‌گیری در مورد نقش و سازوکار عمل mPFC و بخش قاعده‌ای-طرفی آمیگدال در درک اثرات مشوق مثبت درمان‌های دارویی یا غیر دارویی نیازمند مطالعات بیشتر و بررسی‌های دقیقتر در آینده می‌باشد.

کلمات کلیدی: ناحیه تگمتال قدامی، سولفات مورفین، هسته اکومبوس

درک محرک‌های دارای اثر مشوق مثبت گردید. این ساختارها شامل تکمتال قدامی (VTA)، باندا میانی مغز قدامی (MFB)، هسته اکومبوس، آمیگدال و بخش طرفی هیپوتالاموس می‌باشند. بسیاری از این ساختارهای مغزی جزئی از سیستم دوپامینی مزوکورتیکولیمبیک به شمار می‌روند

مقدمه

مطالعات اولیه انجام شده با استفاده از خود-تحریکی الکتریکی در مغز رت منجر به شناسایی ساختارهای کلیدی در

۴- روز نهم (آزمون نهایی): در این روز مجدداً صفحه کشویی برداشته شده و زمان سپری شده در هر سمت در زمان کل ۲۰ دقیقه ثبت می‌شود. زمان صرف شده در روز دوم از زمان صرف شده توسط حیوان در روز نهم کسر شده و این مقدار تغییر در ترجیح (Change In Preference) خوانده می‌شود که به عنوان شاخص ترجیح یا تنفر مکانی به کار می‌رود.

کمتر ترجیح داده بود (یعنی سمت سفید X به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده می‌شود و در روزهای چهارم و ششم و هشتم به موش سالین تزریق شده و در سمت سیاه قرار داده می‌شود. در تمامی روزهای این مرحله صفحه‌ی کشویی بسته بوده و ارتباط بین دو سمت جعبه وجود ندارد.

جدول ۱- مشخصات نواحی ایجاد آسیب الکتریکی در مسیر مزوکورتیکولیمبیکال

مختصات محل ایجاد آسیب (mm)		مدت زمان عبور	شدت جریان	محل آسیب
فاصله از سطح کورتکس	فاصله جانبی از برگما	جریان (s)	mA))	
۷/۸	۰/۵	۲۰	۰/۵	ناحیه نکتال قدامی
۷/۹	۱/۲	۱۵	۱	غلاف هسته اکومینس
۷/۵	۴/۵	۲۰	۰/۵	بخش مرکزی آمیگدال
۸/۳	۵/۲	۲۰	۱	بخش قاعده‌ای طرفی آمیگدال
۳/۸	۰/۸	۳۰	۱	بخش پره لیمبیک قشر پیش پیشانی

یافته ها

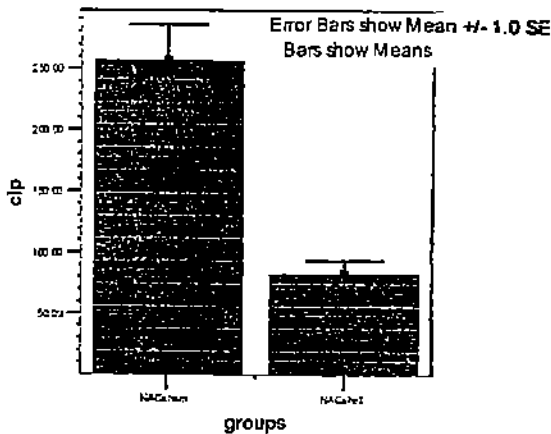
الف) القاء ترجیح مکان شرطی شده توسط سولفات مورفین در موش صحرایی نر: همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تزریق سولفات مورفین به صورت زیر جلدی و با دوزهای ۷/۵ mg/kg و ۵ و ۲/۵ و ۱ باعث ایجاد ترجیح مکان شرطی شده (cpp) از طریق افزایش معنی‌دار در زمان سپری شده توسط حیوان در سمت دریافت مورفین طی مراحل شرطی سازی (سمت سفید) در مقایسه با سمت دریافت سالین (سمت سیاه) می‌گردد ($P < 0.002$) مورفین با دوز ۰/۵mg/kg نتوانست ترجیح مکان شرطی شده معنی‌داری در حیوانات بوجود آورد. با توجه به نتایج حاصل از این بخش دوز ۵mg/kg مورفین به عنوان مؤثرترین دوز انتخاب شده و در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین از آنجا که ممکن است دارو و یا عمل جراحی بر حرکت حیوان تأثیر بگذارد در روز نهم میزان حرکت حیوان در هر سمت سنجیده می‌شود. پس از پایان آزمایشات به طور اتفاقی از هر گروه موش انتخاب شده و مغز آن جهت بررسی بافت شناسی و تأیید محل ایجاد آسیب خارج می‌گردید در تمامی گروهها محل آسیب ایجاد شده با محل مورد نظر همخوانی داشت.

بررسی آماری

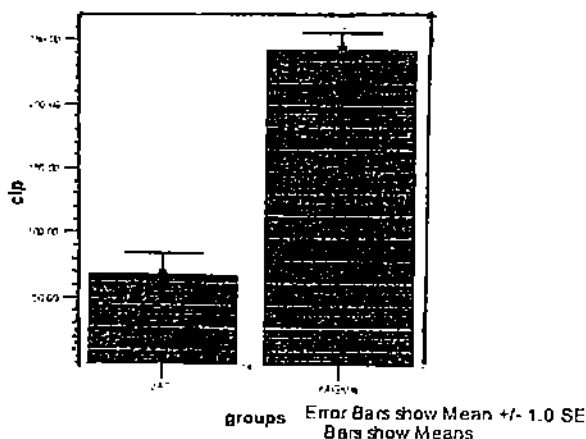
در این آزمون از تغییر در ترجیح (CIP) به عنوان شاخص ارزیابی ترجیح مکانی استفاده شده است. برای ارزیابی آماری از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین به همراه آزمون Student Newman Keuls استفاده گردیده است نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردیده و P کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان مرز معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شده است.

همچنین تخریب الکتریکی غلاف هسته ای اکومبنس به صورت دو طرفه کاهش معنی داری در ترجیح مکان شرطی شده (CPP ناشی از مورفین در مقایسه با گروه کنترل مربوط به خود ایجاد می کند ($P=0/005$) (شکل ۳).

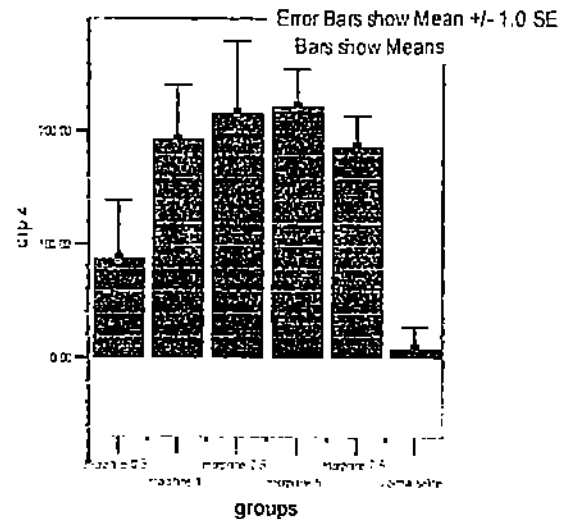


شکل ۳- نقش تخریب دو طرفه غلاف هسته ای اکومبنس بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین. نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردیده است.

شکل ۴ نشان می دهد که کسب ترجیح مکان شرطی شده با مورفین پس از تخریب دو طرفه بخش مرکزی هسته آمیگدال کاهش قابل ملاحظه ای در مقایسه با گروه کنترل خود پیدا می کند ($P=0/001$). در حالی که تخریب الکتریکی دو طرفه بخش قاعده ای- طرفی آمیگدال نتوانست تفاوت معنی داری در کسب ترجیح مکان شرطی شده با دوز مورفین در گروه تخریب در قیاس با گروه کنترل ایجاد نماید ($P=0/346$) (شکل ۵).



شکل ۴- نقش تخریب دو طرفه بخش مرکزی هسته آمیگدال بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین. نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردیده است.

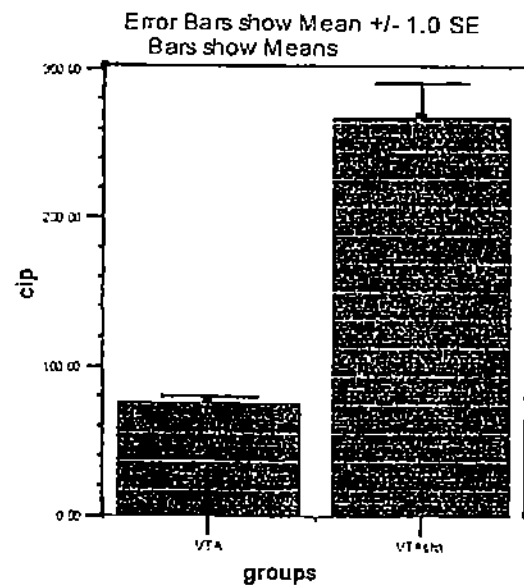


شکل ۱- نمودار ترجیح مکان شرطی شده با مورفین. داده ها به

صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردیده است.

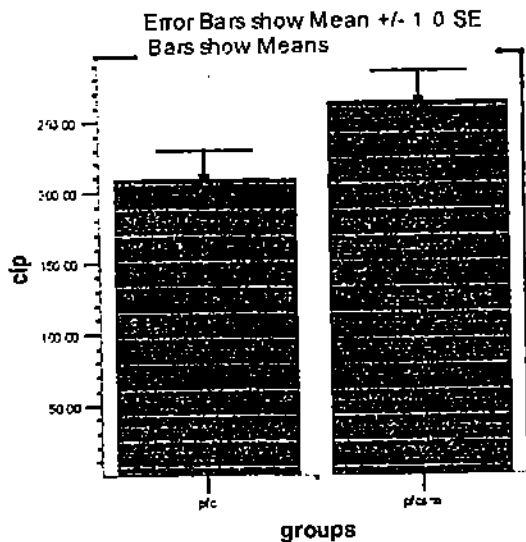
(ب) نقش تخریب الکتریکی دو طرفه ناحیه تگمنتال قدامی، غلاف هسته ای اکومبنس، بخشهای مرکزی و قاعده ای- طرفی آمیگدال و بخش میانی قشر پیش پیشانی کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از سولفات مورفین:

شکل های ۲-۶ نشان دهنده نتایج حاصل از تخریب نواحی مختلف مسیر مزوکورتیکوکیمیال در کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین می باشد همانگونه که در شکل ۲ پیداست تخریب دوز (5 mg/kg, S.C.) نسبت به گروه کنترل خود می گردد ($P=0/001$).



شکل ۲- نقش تخریب دو طرفه ناحیه تگمنتال قدامی بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین. نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردیده است.

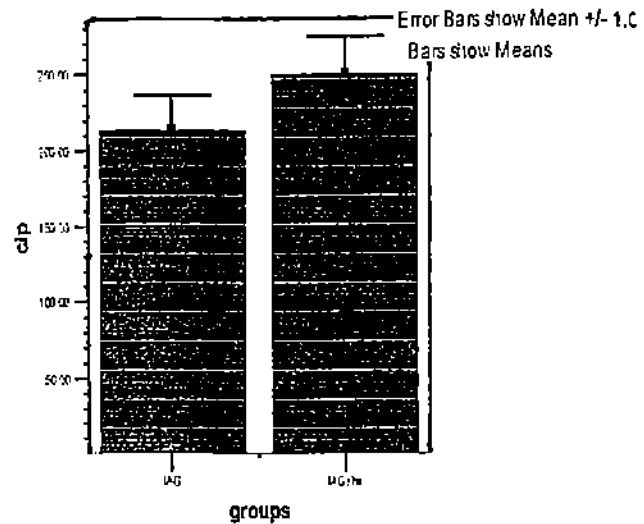
این نتیجه با نتایج بدست آمده از مطالعات دیگر همخوانی دارد (۱۱).



شکل ۶- نقش تخریب دوطرفه بخش میانی قشر پیشانی (mPFC) در ناحیه پره لیمبیک بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه گردیده است.

اعتقاد بر این است که مورفین و داروهای اپیوئیدی دیگر با تأثیر بر مسیر اصلی پاداش در مغز، یعنی مسیر مزوکورتیکولیمبیال، و افزایش فعالیت دوپامینرژیک در مناطق مختلف این مسیر سبب به وجود آمدن اثرات مشوق مثبت می‌گردند. وجود گیرنده‌های اپیوئیدی مو که مورفین نیز از طریق آنها اعمال اثر می‌کند در ناحیه‌ی تگمتال قدامی - و عمدتاً بر روی نورون‌های غیر دوپامینی - تأیید شده است (۲). و مورفین و دیگر آگونیست‌های گیرنده مو به طور مستقیم به داخل VTA و هسته اپیوئیدها باعث مهار نورون‌های دوپا مینرژیک واقع در VTA شده و این مسأله به نوبه خود رها شدن دوپامین به داخل هسته اکومبیس را افزایش می‌دهد. این فرضیه توسط مطالعات زیادی مورد تأیید قرار گرفته است (۲،۱).

در این مطالعه هم‌چنین نشان داده شده است که تخریب الکتریکی دو طرفه ناحیه تگمتال قدامی منجر به کاهش ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین می‌گردد. این امر نشان



شکل ۵- نقش تخریب دوطرفه بخش قاعده‌ای - طرفی آمیگدال بر کسب نتایج مکان شرطی شده ناشی از دوز مؤثر مورفین. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه گردیده است.

با توجه به شکل ۶ از بین بردن بخش میانی قشر پیشانی (mPFC) در ناحیه پره لیمبیک به صورت دو طرفه در حیوان تغییر قابل ملاحظه و معنی‌داری در کسب ترجیح مکان شرطی شده با دوز ۵ mg/kg مورفین در مقایسه با گروه کنترل مربوطه بوجود نیاورد ($P = 0/145$).

به طور خلاصه، تخریب الکتریکی دو طرفه ناحیه تگمتال قدامی، غلاف هسته‌ی اکومبیس و بخش مرکزی آمیگدال ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را در مقایسه به گروه‌های کنترل خود به طور قابل ملاحظه کاهش دادند، در حالی که از بین بردن دو طرفه بخش قاعده‌ای - طرفی آمیگدال و بخش میانی قشر پیشانی در ناحیه پره لیمبیک با استفاده از جریان الکتریکی تأثیر معنی‌دار در کسب ترجیح مکان شرطی شده با مورفین نداشت.

بحث

در مطالعه انجام شده، تجویز زیر جلدی مورفین ترجیح مکان شرطی شده معنی‌داری را در موش‌های صحرایی نر به صورت وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل به وجود آورد که

آنکه بر CPP بوجود آمده با مورفین و آمفتامین بی‌اثر بوده است (۱۳). یافته‌های مطالعه حاضر در خصوص بخش پره لیمبیک mPFC بر CPP ناشی از مورفین به این ترتیب با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. لیکن نشان داده شده است که از میان بردن بخش اینفرالیمبیک mPFC ترجیح مکان شرطی شده با مورفین را به طرز معنی‌داری کاهش می‌دهد بی‌آنکه اثری بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از کوکائین یا آمفتامین داشته باشد (۱۰). در یک بررسی دیگر تخریب mPFC با اسپیراسیون برخلاف نتایج ذکر شده منجر به ایجاد تنفر مکانی شرطی شده ((CPA) ناشی از کوکائین شده است (۲۰). همانطور که ملاحظه می‌شود mPFC بخش‌های گوناگون آن نقش دوگانه‌ای را در قبال داروهای مختلف دارای اثر مشوق مثبت ایفا می‌کند و هم چنین در بررسی‌های انجام شده گاه نتایج متناقض به چشم می‌خورد.

در پایان با توجه به نتایج این بررسی و مطالعات قبلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که VTA و غلاف هسته اکومبسن در درک اثرات مشوق مثبت مورفین و ایجاد ترجیح مکان شرطی شده با آن نقش اساسی داشته و تخریب این نواحی هم‌چنین بخش مرکزی آمیگدال منجر به از بین رفتن یا کاهش این ترجیح مکانی می‌شود. به‌علاوه باید اظهار داشت که تصمیم‌گیری در مورد نقش و سازوکار عمل mPFC و بخش قاعده‌ای- طرفی آمیگدال در درک اثرات مشوق مثبت درمان‌های دارویی یا غیر دارویی نیازمند مطالعات بیشتر و بررسی‌های دقیقتر در آینده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کانون اندیشه‌های پویا انجام گرفته است که بدین‌وسیله از زحمات این عزیزان قدردانی می‌شود.

همچنین از گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس خصوصاً جناب آقای دکتر فیروز قادری پاکدل در زمینه انجام جراحی‌ها و اجرای طرح و در اختیار قرار دادن امکانات و دکتر هدایت صحرایی از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... بخاطر راهنمایی‌های ارزنده ایشان در مراحل مختلف انجام طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

دهنده نقش اساسی این ناحیه در بوجود آمدن اثرات مشوق مثبت مورفین می‌باشد.

تخریب غلاف هسته اکومبسن در بررسی حاضر باعث کاهش معنی‌داری در ترجیح مکانی ایجاد شده با مورفین گردید. این یافته با نتایج بدست‌آمده از تخریب شیمیایی این ناحیه با به کار بردن ۶ هیدروکسی دوپامین و هم‌چنین اسید ایبوتنیک، اسید کابیتیک و یا اسید کینولینیک همخوانی دارد (۱۵،۱۲،۹). به‌علاوه تخریب الکترونیکی NAS در یک آزمایش نتایج مشابهی بر روی ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین داشته است (۱۶). تخریب کامل آمیگدال در یک بررسی منجر به از بین رفتن CPP ناشی از کوکائین گردیده است (۱۷). حال آنکه از بین بردن هسته طرفی آمیگدال با وجودیکه CPP ناشی از آمفتامین را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد لیکن بر روی CPP ناشی از مورفین اثری نداشته است (۱۲). از بین بردن بخش قاعده‌ای- طرفی آمیگدال بر روی CPP ایجاد شده با آمفتامین تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشته است با وجودی که تخریب بخش میانی- خلفی این هسته تنفر مکانی ایجاد شده توسط نالترکسون را کاهش داده است (۱۸،۱۹). در مطالعه حاضر نیز تخریب بخش قاعده‌ای- طرفی آمیگدال

نقش معنی‌داری را در کسب ترجیح مکان شرطی شده با مورفین ایفا نمی‌کند. اما از بین بردن الکتریکی دو طرفه بخش مرکزی آمیگدال به طور قابل ملاحظه‌ای CPP ناشی از مورفین را کاهش داده است. این نتایج علاوه بر تأیید نقش کلیدی هسته مرکزی آمیگدال در درک اثرات مشوق مورفین، تأیید دوباره‌ای بر نقش آمیگدال توسعه یافته به عنوان یک واحد عملکردی می‌باشد. درک مکانیسم عمل و وظیفه‌ی معین سایر نواحی آمیگدال از جمله بخش قاعده‌ای- طرفی بر درک اثرات مشوق دارویی و ارتباط این بخش با بخش مرکزی آمیگدال بررسی‌های بیشتری احتیاج دارد.

تخریب mPFC با استفاده از ۶- هیدروکسی دوپامین در یک بررسی تأثیری بر CPP ناشی از مورفین نداشته است (۹). در مطالعه دیگری تخریب بخش پره لیمبیک mPFC ، CPP ناشی از کوکائین را به طرز معنی‌داری کاهش داده است حال

ویتامین در سرم بیماران تجمع یابد و در نهایت به افزایش سطح متیل مالونیک اسید (MMA) و tHcy بیانجامد.

یافته قابل تأمل دیگری که در این مطالعه به دست آمده است، کاهش سطح ویتامین B₁₂ سرم، پس از مداخله با این ویتامین می‌باشد. این مسئله احتمالاً به دلیل افزایش نیاز سلولی به فرم فعال این ویتامین روی داده است، به طوری که دریافت مکمل ویتامین B₁₂ منجر به افزایش سطح سرمی این ویتامین نشده و توسط سلول‌ها برداشت شده است. این کاهش ممکن است نشان دهنده تنظیم معکوس فاکتور داخلی (IF) و محدودیت جذب ویتامین B₁₂ در بیماران تحت بازسازی ذخایر ویتامین B₁₂ نیز باشد (۵).

بهترین استراتژی درمانی در بیماران همودیالیزی مبتلا به هیپروموسیستینمی، هنوز در پرده‌ای از ابهام است. اما به دلایل زیر، اسید فولیک و ویتامین B₁₂ باید در ترکیب مکمل‌های این بیماران گنجانده شوند: این بیماران به دلیل محدودیت دریافت رژیم اسید فولیک، از دست رفتن آن در مایع دیالیز و درمان با اریتروپویتین که باعث افزایش نیاز به اسید فولیک می‌شود، باید تحت مکمل یاری با اسید فولیک قرار گیرند (۳). در کنار اسید فولیک، مکمل یاری با فرم فعال ویتامین B₁₂ نیز ضرورت دارد زیرا اول اینکه برای جلوگیری از مخفی شدن علائم نورولوژیک آنمی مگالوبلاست، مکمل یاری با اسید فولیک باید توأم با ویتامین B₁₂ باشد. دوم اینکه با وجود طبیعی بودن سطح ویتامین B₁₂ سرم، غلظت‌های بالای MMA، که حاکی از کمبود فرم فعال این ویتامین است، در اغلب بیماران دیده می‌شود. سوم اینکه درمان با اریتروپویتین، بیماران دیالیزی را در معرض خطر کمبود فرم فعال ویتامین B₁₂ قرار می‌دهد. و چهارم اینکه کمبود فرم فعال ویتامین B₁₂ باعث پدیده "به دام افتادن فولات" (folate trapping) می‌شود و در این شرایط دوز‌های بالاتر اسیدفولیک برای طبیعی کردن سطح tHcy پلاسما مورد نیاز است (۳، ۲۴).

در آخر باید گفت که افزایش سطح tHcy در بیماران همودیالیزی، معلول عوامل مختلف نظیر اثر ویتامین‌ها، وضعیت تغذیه‌ای، ژنتیک، درجه نارسایی کلیه، وضعیت متابولیسم سلولی و بسیاری عوامل دیگر است (۲۱).

اینکه، گیرنده‌های حمل اسیدفولیک به داخل سلول در این بیماران اشباع می‌شود (۹).

یکی دیگر از علل عدم پاسخ دهی سطح بالای tHcy به مداخله با اسیدفولیک در بیماران اورمیک، تجمع سیستین سولفونیک اسید در پلاسما است. این تجمع ناشی از توقف دکربوکسیلاسیون این ماده است که به هیپروموسیستینمی منجر می‌شود (۲۲).

مجموع این عوامل باعث کاهش مصرف سلولی اسید فولیک در بیماران همودیالیزی می‌شود، که از یک سو منجر به افزایش غیر طبیعی سطح این ویتامین در سرم و از سوی دیگر، عدم مصرف آن در چرخه متابولیسم Hcy می‌شود و متعاقباً بیماران را به محدوده هیپروموسیستینمی وارد می‌کند. به عبارت دیگر، بیماران همودیالیزی با کمبود فیزیولوژیک اسید فولیک مواجه هستند.

عدم تأثیر ویتامین B₁₂ در کاهش سطح tHcy در بیماران همودیالیزی احتمالاً به این دلیل است که این ویتامین از طریق نوعی مکانیسم فارماکولژیک که آنالوگ مکانیسم اثر اسیدفولیک با دوز بالا، در کاهش سطح tHcy پلاسما در بیماران همودیالیزی فاقد کمبود اسیدفولیک است عمل می‌کند. به نظر می‌رسد که این مکانیسم فارماکولژیک در تجویز دوز ۱ میلی‌گرم در روز ویتامین B₁₂ خوراکی، در این بیماران ایجاد نمی‌شود (۳).

سطوح بالای ویتامین B₁₂ سرمی که قبل از مداخله و بدون هیچگونه سابقه مکمل یاری در بیماران دیده شده است به سه دلیل عمده بروز کرده است. اول اینکه، ویتامین B₁₂ به شدت متصل به پروتئین است و در جریان عمل دیالیز از دست نمی‌رود، به همین جهت کمبود آن به ندرت مشاهده می‌شود (۳). دوم اینکه اتصال ویتامین B₁₂ به ترانس کویلامین II که برای انتقال این ویتامین به بافت‌ها ضروری است در بیماران همودیالیزی دچار اختلال می‌شود (۹). و سوم اینکه در نارسایی کلیه، تبدیل ویتامین B₁₂ به فرم فعال آن، در محل اصلی تبدیل یعنی کلیه‌ها دچار اختلال است (۹، ۲۳). این سه عامل موجب می‌شوند که بیماران همودیالیزی با کمبود فیزیولوژیک ویتامین B₁₂ مواجه باشند و در نتیجه این

منابع

1. Righetti M, Ferrerio GM, Milani S, et al. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *Med Sci Monit* 2003; 9(4): 137-42.
2. Wang HT, Peng YM, Liu H. Alteration of homocysteine before and after hemodialysis in chronic hemodialysis patients. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2003; 28(3): 266-8.
3. Billion S, Tribout B, Cadet E, et al. Hyperhomocysteinemia, folate and vitamin B12 in supplemented haemodialysis patients: effects of oral therapy with folic acid and vitamin B12. *Nephron Dial Transplant* 2002; 17: 455-61.
4. Friedman AN. Pharmacologic B-vitamin therapy for hyperhomocysteinemia in dialysis patients: has the time come? *Nutr Clin Care* 2002; 5(1): 20-4.
5. Gonin JM, Nguyen H, Gonin R, et al. Controlled trials of very high dose folic acid, vitamins B12 and B6, intravenous folinic acid and serine for treatment of hyperhomocysteinemia in ESRD. *J Nephrol* 2003; 16: 522-34.
6. Tolkoff-Rubin N, Goes N. Cecil textbook of medicine. W.B. Saunders company 2004. p.405.
7. Finkelsteine JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157: s40-4.
8. Koyama K, Usami T, Takeuchi O, et al. Efficacy of methylcobalamin on lowering total homocysteine plasma concentrations in haemodialysis patients receiving high-dose folic acid supplementation. *Nephron Dial Transplant* 2002; 17: 916-22.
9. Manns B, Hyndman E, Burgess E, et al. Oral vitamin B12 and high-dose folic acid in hemodialysis patients with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 2001; 59: 1103-9.
10. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, et al. High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-52.
11. Elian KM, Hoffer J. Hydroxocobalamin reduces hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease. *Metabolism* 2002; 51: 881-6.
12. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics. The Bare essentials. Mosby 2001. p.71,250
13. Jelliffe DB, Jelliffe EEP. Community nutrition assessment. Oxford University Press 1989. p.56-110.
14. Singh, AK., Brenner, BM. Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill 2005. p. 1564.
15. Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, et al. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott IMx analyzer and an HPLC assay with internal standardization. *Clin Chem* 1999; 45: 152-3.
16. Kopple JD, Massry SG. Nutritional management of renal disease. 2nd edition. Lippincot Williams & Wilkins 2004. p. 118.
17. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical Chemistry. W.B. Saunders company 1999. p. 529-30, 1240-4, 1696-7.
18. Miller SM, Mears E. Clinical chemistry, concepts and applications. Mc Graw-Hill companies 2003. p. 593,596.
19. Wilkens KG. Krause's food, nutrition and diet therapy. Saunders company 2000. p. 851-3.
20. Arnadottir M, Gudnason V, Hultberg B. Treatment with different doses of folic acid in hemodialysis patients: effects on folate distribution and aminothiols concentrations. *Nephron Dial Transplant* 2000; 15: 524-8.
21. Karpati I, Balla J, Szoke, et al. Frequency of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients with folic acid supplementation. *Orv Hetil* 2002; 43(27): 1635-40.
22. Suliman ME, Filho JCD, Barany P, Anderson B, Lidholm B, Bergstrom J. Effects of high dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulfure amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1287-96.
23. Trimarchi H, Schiel A, Freixas E, Diaz M. Randomized trial of methylcobalamin and folate effects on homocysteine in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 91: 58-63.