

اثر مکمل یاری با اسید فولیک و ویتامین B₁₂ بر هموسیستئین بیماران همودیالیزی

چکیده

نسیم آزادی بخش^{۱*}، راهبه شاکر حسینی^۱، شهناز اتابک^۲، نوید ناطقیان^۳، بنفشه گلستان^۴، آناهیتا هوشیارراد^۵

۱- گروه تغذیه انسانی، دانشکده تغذیه

۲- گروه نفرولوژی و دیالیز بیمارستان مدرس

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- گروه تولید، داروسازی حکیم

۴- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده

بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه

و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید

بهشتی

*نویسنده مسئول، تهران، میدان صنعت، بلوار فرحزادی،

خیابان ارغوان غربی، دانشکده علوم تغذیه، دانشگاه علوم

پزشکی شهید بهشتی، تلفن: ۲۲۳۶۷۲۸۴

email: azadibakhsh@gmail.com

مقدمه

افزایش هموسیستئین تام (tHcy) پلاسما یکی از مهمترین عوارض همودیالیز است. همزمان با کاهش توده فعال کلیه که باعث کاهش تصفیه گلوبولینی می شود، سطح tHcy افزایش می یابد که با شروع همودیالیز مجددا کاهش می یابد ولی به محدوده طبیعی وارد نمی شود.^{۱،۲} از این رو هیپروهوموسیستئینی حداقل در ۸۵ تا ۱۰۰٪ از بیماران تحت همودیالیز دیده می شود.^۳ هیپروهوموسیستئینی یک عامل خطر مستقل برای بیماریهای قلبی - عروقی و خصوصا آترواسکلروز و آتروترومبوز است.^۴ هر ۱ μmol/L افزایش در سطح tHcy، خطر بیماریهای قلبی - عروقی را به میزان یک درصد افزایش می دهد^۵ به همین جهت میزان مرگ و میر ناشی از بیماریهای قلبی -

زمینه و هدف: میزان شیوع هیپروهوموسیستئینی در بیماران همودیالیزی بالاتر از کل جمعیت است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مکمل یاری با دوز بالای اسید فولیک، با و بدون ویتامین B₁₂ بر وضعیت هموسیستئین در بیماران همودیالیزی در بیمارستان امام حسین (ع) تهران است. روش بررسی: در این کارآزمایی بالینی ۳۶ بیمار همودیالیزی که حداقل از سه ماه قبل مکمل اسید فولیک با دوز ۵ mg/d دریافت می کردند انتخاب شدند. این بیماران به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شده و به مدت دو ماه، در گروه اول، ۵ mg/d اسید فولیک همراه با دارونمای ویتامین B₁₂، در گروه دوم، همین مقدار اسید فولیک را همراه با ۱ mg/d ویتامین B₁₂ خوراکی، در گروه سوم، ۱۵ mg/d اسید فولیک همراه با دارونمای ویتامین B₁₂ و در گروه چهارم، همین مقدار اسید فولیک را همراه با ۱ mg/d ویتامین B₁₂ خوراکی دریافت کردند. سطح هموسیستئین تام پلاسما و اسید فولیک و ویتامین B₁₂ سرم در آغاز و پایان مطالعه اندازه گیری شد. میزان دریافت های غذایی بیماران نیز در طول مطالعه، ارزیابی شد. یافته ها: از بیماران همودیالیزی مورد مطالعه که تحت مکمل یاری مداوم با اسید فولیک بوده اند، قبل از شروع مداخله، ۲۷/۸٪ در محدوده طبیعی tHcy و ۷۲/۲٪ در محدوده هیپروهوموسیستئینی قرار داشتند. پس از پایان مداخله، سطح tHcy پلاسما در گروه اول، ۱/۳۵٪ افزایش و در گروه دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۶/۹۹، ۱۴/۵۴ و ۳۰/۰۹ درصد کاهش یافت. تغییرات سطح tHcy پلاسما و ویتامین B₁₂ سرم، فقط در گروه چهارم معنی دار بود و تغییرات سطح اسید فولیک سرم، در هیچ یک از گروه ها معنی دار نبود. نتیجه گیری: بهترین استراتژی درمانی برای مواجهه با هیپروهوموسیستئینی در بیماران همودیالیزی، مکمل یاری با دوز ۱۵ mg/d اسید فولیک همراه با دوز ۱ mg/d ویتامین B₁₂ خوراکی است.

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

عروقی در بیماران همودیالیزی، ۳/۵ برابر سایر جمعیت ها در همان گروه سنی است و این بیماری ها مسئول بیش از ۵۰ درصد مرگ و میر، در بیماران دچار اورمی هستند.^۶ متابولیسم هموسیستئین در دو مسیر، یکی ریمتیلاسیون و دیگری ترانس سولفوراسیون، انجام می گیرد. برای ریمتیلاسیون، فرم فعال اسید فولیک یعنی تتراهیدروفولات و همچنین ویتامین B₁₂، به عنوان کوفاکتور ضروری برای آنزیم متیونین سنتاز، که ۵- متیل تتراهیدروفولات را به تتراهیدروفولات متابولیزه می کند و ویتامین B₂ به عنوان پیش ساز فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) که تبدیل ۱۰-۵- متیل تتراهیدروفولات به ۵- متیل تتراهیدروفولات را تسهیل می کند، مورد نیاز هستند. نقش ویتامین B₆ در مسیر ترانس سولفوراسیون و به

داروهای مداخله کننده با tHcy نیز با مراجعه به پرونده بیماران به دست آمد. اندازه‌گیری قد، بدون کفش و با استفاده از متر پارچه‌ای و طبق دستورالعمل‌های استاندارد انجام گرفت. به منظور حذف خطاهای فردی، تمام اندازه‌گیری‌ها توسط یک نفر انجام شد. کفایت دیالیز با اندازه‌گیری نسبت کاهش سطح اوره خون (URR=Urea Reduction Ratio)، محاسبه شده است. این نسبت حاصل تقسیم سطح اوره خون بعد از دیالیز به سطح اوره خون قبل از دیالیز می‌باشد که اگر کمتر از ۰/۶۵ باشد معرف کفایت دیالیز است.^{۱۴} به منظور تعیین وضعیت شاخص‌های بیوشیمیایی، از هر نمونه ۱۰ ml خون در حالت ناشتا گرفته می‌شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری روی یخ نگهداری شده و ۳ ml از خون گرفته شده حداکثر ظرف مدت یک ساعت در سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ شده و پلاسمای آن برای ارزیابی سطح tHcy به روش rapid, isocratic, High Performance Liquid Chromatography توسط دستگاه HPLC.^{۱۵} جداسازی می‌شد. محدوده طبیعی برای tHcy، ۵-۱۲ μmol/L و محدوده مرزی ۱۶-۱۲ μmol/L است و مقادیر بالاتر از ۱۶ μmol/L به عنوان هیپرهوموسیستئینمی شناخته می‌شوند.^{۱۶} ۴ ml از خون نگهداری شده بر روی یخ، سانتریفوژ و سرم آن جداسازی می‌شد و برای ارزیابی سطح اسید فولیک و ویتامین B۱۲ سرم به روش competitive immunoassay و توسط دستگاه automated chemiluminescence system آنالیز می‌شد.^{۱۷} محدوده طبیعی برای اسید فولیک سرم ۳-۱۶ ng/ml و برای ویتامین B۱۲، ۸۰۰-۱۱۰ pg/ml است.^{۱۸} ۳ ml از خون بیمار نیز برای ارزیابی سطح آلبومین، کراتینین و اوره به ترتیب به روش شیمیایی برم کروزول سبز، روش شیمیایی واکنش با پیکرات قلیایی و روش آنزیمی اوره آز آنالیز می‌شد.^{۱۹} محدوده‌های طبیعی برای بیماران دیالیزی به ترتیب ۵ g/dl-۳/۵، ۱۰-۱۵ mg/dl و ۱۰۰ mg/dl < است.^{۲۰} خون‌گیری از بیماران در روز دیالیز و قبل از اتصال به دستگاه همودیالیز انجام می‌گرفت. به علاوه تمام بیماران، آخرین دوز اسیدفولیک پنج میلی‌گرمی را در فاصله ۲۳ تا ۲۴ ساعت قبل از زمان خون‌گیری مصرف کرده بودند. به منظور بررسی میزان دریافت غذایی انرژی، درشت مغذی‌ها (کربوهیدرات، پروتئین و چربی) و ویتامین‌های گروه B مرتبط با متابولیسم tHcy (اسیدفولیک و ویتامین‌های B۱۲، B۶، B۲)،^{۲۱} از پرسش‌نامه‌های یاد آمد ۲۴ ساعته خوراک استفاده شد. این پرسش

عنوان کوفاکتور آنزیم سیستاتیون β سنتاز است. این آنزیم متابولیسم هوموسیستئین و سرین را به سیستاتیون کاتالیز می‌کند.^{۷-۹} با توجه به مسیرهای متابولیسمی هوموسیستئین، تا به حال مداخلات مختلفی برای طبیعی کردن سطح هوموسیستئین در بیماران همودیالیزی صورت گرفته است. برخی از مداخلات مشتمل بر دوزهای مختلف اسیدفولیک بوده‌اند که البته به ندرت توانسته‌اند سطح هوموسیستئین را در بیماران به محدوده طبیعی برسانند.^{۱۰-۱۲} در برخی دیگر از مداخلات نیز از دوزهای مختلف ویتامین B۱۲ و B۶، فولینیک اسید، بتائین، سرین و تورین استفاده شده و نتایج متناقضی به دست آمده است.^{۱۳} با توجه به این که در کشور ما، برای کنترل هیپرهوموسیستئینمی در بیماران همودیالیزی، صرفاً از مکمل یاری با اسید فولیک با دوز پایین استفاده می‌شود، هدف از این مطالعه بررسی اثر مکمل یاری با دوز بالای اسیدفولیک همراه با ویتامین B۱۲ بر سطح هوموسیستئین در بیماران همودیالیزی است.

روش بررسی

در این کارآزمایی بالینی که از نوع تصادفی، دوسوکور، مقطعی و مشابه‌سازی شده است، ۴۰ بیمار همودیالیزی تحت پوشش بیمارستان امام حسین (ع) و داوطلب همکاری با طرح، در سنین بالای ۱۸ سال، که سابقه دیالیز کمتر از سه ماه، دیالیز کمتر از سه بار در هفته، دریافت مکمل فولات با دوز بالاتر از پنج میلی‌گرم در روز و هرگونه مکمل ویتامین‌های گروه B غیر از فولات در سه ماه گذشته و نیز مصرف داروهای مداخله کننده با tHcy، سوء تغذیه (۲ mg/dl < آلبومین)، رد پیوند در شش ماه گذشته و اختلالات کبدی نداشتند، انتخاب شدند. تعداد نمونه بر اساس مطالعه Koyama و همکاران^۱ و بر اساس رابطه "میزان اثر" (effect size) و جدول مربوط به "نمونه مورد نیاز برای آنالیز واریانس یک طرفه" و با توجه به افزودن ۲۵٪ به حجم نمونه، به دلیل احتمال ریزش نمونه‌ها، به تعداد ۱۰ نفر در هر گروه و مجموعاً ۴۰ نفر در چهار گروه تعیین شد. حدود اطمینان (CI) ۹۵٪ و توان آزمون (B) ۸۰٪ در نظر گرفته شده است. این بیماران برای جمع‌آوری اطلاعات مربوط به سن، کشیدن سیگار، مصرف چای و قهوه و وضعیت یائسگی مورد مصاحبه چهره به چهره قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به سابقه دیالیز، سابقه شناخته شده دیابت، فشار خون و هیپرکلسترولمی و مصرف

بررسی همبستگی متغیر tHcy پلاسما با متغیرهای مداخله‌گر کمی، از آزمون همبستگی پیرسون و برای مقایسه متوسط سطح این متغیر در سطوح مختلف متغیرهای مداخله‌گر کیفی، از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری (p) در تمام آزمون‌ها ۰/۰۵ می‌باشد.

یافته‌ها

از ۴۰ بیمار شرکت‌کننده در مطالعه، دو نفر فوت شدند و یک نفر به دلیل تزریق خون و یک نفر به دلیل تزریق ویتامین B12، از مطالعه خارج شدند. از ۳۶ بیمار مورد مطالعه، ۱۳ نفر (۳۶/۱۱٪) زن و ۲۳ نفر (۶۳/۸۹٪) مرد بودند. میانگین و انحراف معیار سن افراد شرکت‌کننده ۴۸/۵۸±۱۷/۱۶ سال و دامنه آن ۱۹-۷۵ سال بود. ۱۰ نفر (۲۷/۸٪) در محدوده طبیعی tHcy و ۲۶ نفر (۷۲/۲٪) در محدوده هیپروموسیتینمی قرار داشتند. اطلاعات مربوط به متغیرهای مداخله‌گر کیفی و کمی، در جدول ۱ آمده است. نتایج آزمون t - مستقل نشان داد که متوسط سطح tHcy پلاسما در سطوح مختلف متغیر جنسیت دارای اختلاف معنی‌داری است و در زنان بیشتر از مردان می‌باشد (۲۶/۰۸±۹/۳۹ $\mu\text{mol/L}$ و ۱۹/۵۸±۷/۷۴ $\mu\text{mol/L}$ و $p=0/032$). متوسط این شاخص در سطوح مختلف سایر متغیرهای مداخله‌گر کیفی، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. نتایج آزمون همبستگی پیرسون، حاکی از نوعی همبستگی معنی‌دار و معکوس بین سطح اولیه tHcy پلاسما با سطح اولیه اسیدفولیک سرم ($r=-0/331$) و $r=-0/35$)، قد ($r=0/048$)، $p=0/036$) و سطح کراتینین ($r=-0/351$) و $r=0/036$) است. همبستگی با سایر متغیرهای مداخله‌گر کمی معنی‌دار نبود. سطح شاخص‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه، شامل tHcy پلاسما و اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم، قبل و بعد از مداخله، در جدول ۲ گزارش شده است. تغییرات سطح tHcy پلاسما در طول مدت مداخله در گروه اول $\mu\text{mol/L}$ ۰/۳۸۸±۶/۴۲ -، در گروه دوم $\mu\text{mol/L}$ ۳/۱۴±۷/۶۷ -، در گروه سوم $\mu\text{mol/L}$ ۵/۱۹±۹/۶۸ -، در گروه چهارم $\mu\text{mol/L}$ ۶/۲۸±۵/۴۷ - و $(-30/09 \pm 22/55)$ بود. تغییرات سطح اسیدفولیک سرم در همین گروه‌ها به ترتیب ۲۶/۷۷±۵/۰۸ ng/ml ($116/43 \pm 196/54$)، ۶۲/۸۹±۱۲۸/۱۷۶ ng/ml ($40/15 \pm 96/83$)، ۱/۹۸±۶۷/۶۳ ng/ml ($236/52 \pm 430/46$) و ۱۶۴/۹۷±۲۲۰ ng/ml ($307/41 \pm 434/54$)

نامه‌ها قبل از مداخله برای سه روز متوالی، در هفته چهارم مداخله برای دو روز متوالی و بعد از مداخله برای سه روز متوالی پر شدند. به منظور حذف خطاهای فردی، تمام پرسش‌نامه‌ها توسط یک نفر پر شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل پرسش‌نامه‌های یاد آمد ۲۴ ساعته خوراک از نرم‌افزار تغذیه‌ای Food Processor (FP) استفاده شد. بیماران به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند و در هر گروه بر مبنای چهار متغیر مداخله‌گر جنسیت و سطح اولیه tHcy پلاسما و اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم مشابه‌سازی شدند. گروه اول مکمل اسیدفولیک با دوز پنج میلی‌گرم در روز همراه با دارونمای ویتامین B12، گروه دوم همین مقدار اسیدفولیک را همراه با دوز یک میلی‌گرم در روز ویتامین B12 خوراکی، گروه سوم مکمل اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با دارونمای ویتامین B12 و گروه چهارم همین مقدار اسیدفولیک را همراه با دوز یک میلی‌گرم در روز ویتامین B12 خوراکی، دریافت کردند. مدت مداخله در تمام گروه‌ها دو ماه (هشت هفته) بود و پس از گذشت این مدت مجدداً از بیماران خون‌گیری به عمل آمد و برای تعیین سطح tHcy پلاسما و اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم مورد ارزیابی قرار گرفت. مکمل‌های اسید فولیک ساخت شرکت داروسازی روزدارو و مکمل‌های ویتامین B12 ساخت شرکت داروسازی حکیم بودند. اطلاعات به دست آمده از بیماران توسط نرم افزار آماری SPSS ویراست ۱۱/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری، ابتدا، کلیه متغیرهای تحقیق با استفاده از آزمون one sample Kolmogorov-Smirnov از نظر نرمال بودن مورد ارزیابی قرار گرفتند و پس از اطمینان از نرمال بودن، آزمون شدند. برای مقایسه سطح متغیرهای tHcy پلاسما و اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم، در داخل هر گروه، قبل و بعد از مداخله، از آزمون t زوجی (paired samples t-test) و برای مقایسه تغییرات این سه شاخص در بین گروه‌ها، از آزمون رگرسیون خطی استفاده شد. به منظور پایش میزان دریافت مواد مغذی در حین مطالعه، آزمون ANOVA برای اندازه‌گیری‌های تکراری (ANOVA for repeated measurement) مورد استفاده قرار گرفت. در صورت معنی‌دار بودن تغییرات دریافت مواد مغذی در حین مطالعه، آزمون رگرسیون خطی، برای بررسی ارتباط تغییرات سطح tHcy پلاسما و تغییرات دریافت مواد مغذی، مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. به منظور

جدول ۱- توزیع فراوانی بیماران در سطوح مختلف متغیرهای مداخله گر کیفی و میانگین و انحراف معیار متغیرهای مداخله گر کمی (n= ۳۶)

شاخص	میانگین ± انحراف معیار	تعداد (درصد)
سن (سال)	۴۸/۵۸ ± ۱۷/۱۶	-
قد (سانتی متر)	۱۶۰/۳۰ ± ۹/۶۸	-
سابقه دیالیز (ماه)	۵۱/۴۴ ± ۳۸/۶۳	-
مصرف چای (ml/d)	۴۵۶/۲۵ ± ۲۷۷/۶۸	-
کفایت دیالیز	۰/۴۱ ± ۰/۱	-
آلبومین (g/dl)	۴/۶ ± ۰/۶۵	-
کراتینین (mg/dl)	۷/۱۶ ± ۱/۴۹	-
اوره (mg/dl)	۱۰۲/۱۴ ± ۱۹/۲۱	-
سطح اولیه tHcy پلاسما (μmol/L)	۲۱/۹۳ ± ۸/۸۳	-
سطح اولیه اسیدفولیک سرم (ng/ml)	۱۱۴/۳۳ ± ۸۲/۹۵	-
سطح اولیه ویتامین B12 سرم (pg/ml)	۹۹۱/۱۵ ± ۵۵۶/۷۳	-
جنس	-	۲۳ (۶۳/۸۹) مرد ۱۳ (۳۶/۱۱) زن
داروهای مداخله کننده با Hcy	-	۱۲ (۳۳/۳۳) بله ۲۴ (۶۶/۶۷) خیر
وضعیت یائسگی	-	۶ (۱۶/۱۵) بله ۷ (۵۳/۸۵) خیر
مصرف سیگار	-	۵ (۱۳/۸۹) بله ۳۱ (۸۶/۱۱) خیر
سابقه شناخته شده دیابت	-	۶ (۱۶/۶۷) بله ۳۰ (۸۳/۳۳) خیر
سابقه شناخته شده فشار خون	-	۲۳ (۶۳/۸۹) بله ۱۳ (۳۶/۱۱) خیر
سابقه شناخته شده چربی خون	-	۳ (۸/۳۳) بله ۳۳ (۹۱/۶۷) خیر

و تغییرات سطح ویتامین B12 سرم در این گروه‌ها به ترتیب pg/ml ۵۳۴/۷۷ ± ۱۵۱۹/۹۱ g/ml، (-۱/۸۴ ± ۵۸/۶۳) - ۱۶۴/۴۴ ± ۷۴۲/۰۸ (۱۲۱/۵ ± ۱۹۶)، ۹۰۴/۳۸ ± ۱۳۲۵/۶۳ pg/ml (۹۵/۱۵ ± ۱۰۵/۸۲) و ۲۱۵۰/۶۵ ± ۱۵۳۹/۳۴ pg/ml (۲۸۶/۴۸ ± ۲۴۵/۴۶) برآورد شد. paired samples t-test نشان داد که تغییرات سطح tHcy پلاسما (p=۰/۰۱۴) و ویتامین B12 سرم (p=۰/۰۰۶) در گروه دریافت کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی گرم در روز همراه با ویتامین B12 معنی دار بوده است، در حالی که این تغییرات در سایر گروه‌ها و در مورد سطح اسیدفولیک سرم، معنی دار نبود. آنالیز رگرسیون خطی در مورد متغیرهای مورد مطالعه نشان داد که با فرض ثابت بودن سطح اولیه tHcy پلاسما، سطح ثانویه این شاخص در بیماران گروه چهارم (در مقایسه با گروه مبنا یعنی گروه اول)، به طور متوسط ۵/۲۷ μmol/L کاهش می یابد (SE(β)=۲/۲۸ و β=-۵/۲۷ و p=۰/۰۲۷). افزایش سطح اسیدفولیک سرم نیز با فرض ثابت بودن سطح اولیه این شاخص، در بیماران گروه چهارم (در مقایسه با گروه مبنا)، به طور متوسط ۵/۲۷ ng/ml خواهد بود (SE(β)=۵۰/۹۵ و β=۱۳۰/۷۷ و p=۰/۰۱۵). سطح ویتامین B12 سرم بعد از مداخله، در گروه چهارم (در مقایسه با گروه مبنا)، به طور متوسط ۱۶۴۲/۱۷ pg/ml افزایش می یابد (SE(β)=۵۰۵/۶۶ و β=۱۶۴۲/۱۷ و p=۰/۰۰۳). میزان دریافت انرژی بر حسب کیلوکالری در روز، میزان دریافت کربوهیدرات، پروتئین و چربی بر حسب گرم در روز، میزان دریافت اسید فولیک و ویتامین B12 بر حسب میکروگرم در روز و میزان دریافت ویتامین های B6 و B12 بر حسب میلی گرم در روز در جدول ۳ گزارش شده است. این مقادیر با استفاده از آنالیز داده های ثبت شده در پرسش نامه های یاد

جدول ۲- سطح شاخص های مورد بررسی در گروه های مورد مطالعه، قبل و بعد از مداخله (n=۳۶)

شاخص های مورد بررسی	اسیدفولیک +۵ دارونمای ویتامین B12 (n=۹)	اسیدفولیک +۵ ویتامین B12 (n=۹)	اسیدفولیک +۱۵ دارونمای ویتامین B12 (n=۱۰)	اسیدفولیک +۱۵ ویتامین B12 (n=۸)
سطح tHcy پلاسما (قبل) (μmol/L)	۲۱/۸۱ ± ۸/۹۸	۲۲/۴۳ ± ۸/۲۸	۲۳/۶۸ ± ۱۱/۶۷	۱۹/۳۱ ± ۵/۶۳
سطح tHcy پلاسما (بعد) (μmol/L)	۲۱/۴۲ ± ۹/۶۹	۱۹/۲۸ ± ۳/۵۸	۱۸/۴۹ ± ۶/۹۵	۱۳/۰۲ ± ۴/۸۳
سطح اسیدفولیک سرم (قبل) (ng/ml)	۷۸/۵۵ ± ۶۹/۹۴	۱۲۴/۹۸ ± ۷۸/۲۷	۱۴۳/۴۱ ± ۱۰۲/۷۷	۱۰۶/۲۷ ± ۷۱/۸۲
سطح اسیدفولیک سرم (بعد) (ng/ml)	۱۰۵/۳۳ ± ۹۹/۱۰	۱۲۳ ± ۷۲/۰۶	۲۰۶/۳ ± ۱۲۵/۱۲	۲۷۱/۲۵ ± ۲۱۱/۰۶
سطح ویتامین B12 سرم (قبل) (pg/ml)	۱۱۱۹/۴۴ ± ۴۸۷/۷۷	۱۱۴۸/۹۶ ± ۸۶۶/۲۵	۷۷۵/۰۲ ± ۳۳۰/۲۳	۹۳۹/۴۷ ± ۳۹۶/۳
سطح ویتامین B12 سرم (بعد) (pg/ml)	۹۵۵ ± ۶۴۲	۱۶۸۳/۷۴ ± ۱۱۲۷/۴۱	۱۶۷۹/۴ ± ۱۵۶۵/۲۴	۳۰۹۰/۱۲ ± ۱۴۸۱/۱۱

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار میزان دریافت انرژی، درشت مغذی‌ها و ویتامین‌های گروه مرتبط با متابولیسم tHcy در مراحل مختلف مطالعه (n=۳۶)

مراحل مطالعه انرژی و مواد مغذی دریافتی	قبل از مداخله	هفته چهارم مداخله	بعد از مداخله
انرژی X±SD (kcal/d)	۱۷۹۹/۷۸±۷۹۷/۴۴	۲۰۳۴/۹۳±۸۷۷/۴۴	۱۹۴۸/۸۶±۷۹۰/۳
کربوهیدرات X±SD (g/d)	۲۵۹/۷±۱۲۵/۸۶	۲۸۴/۳۵±۳۹/۶۶	۲۸۳/۰۳±۱۲۴/۲۹
پروتئین X±SD (g/d)	۵۸/۴۶±۲۸/۱۴	۷۱/۵۰±۳۲/۸۱	۶۸/۹۵±۳۱/۹۷
چربی X±SD (g/d)	۵۴/۹۲±۲۸/۱۶	۶۸/۶۷±۳۸/۲۷	۶۱/۳۷±۳۰/۸۸
اسیدفولیک X±SD (μg/d)	۱۴۱/۱۷±۱۰۷/۸۳	۱۲۷/۹۱±۷۴/۶۴	۱۳۶/۰۳±۸۶/۴۵
ویتامین B12 X±SD (μg/d)	۲/۴۸±۲/۱۳	۳/۵۴±۷/۲۹	۲/۶۳±۱/۷۶
ویتامین B6 X±SD (mg/d)	۰/۹۵±۰/۴۴	۰/۹۸±۰/۴۴	۱/۱۲±۰/۶۶
ویتامین B2 X±SD (mg/d)	۰/۹۶±۰/۴۹	۱/۱۵±۰/۸۸	۱/۰۴±۰/۵

مکمل یاری توام با اسیدفولیک و ویتامین B12 در بیمارانی انجام شده است که قبل از آن به مدت دو ماه، تحت مکمل یاری با دوز ۱۵ mg در روز اسیدفولیک قرار داشته و دارای سطوح tHcy پلاسما نزدیک به محدوده طبیعی بوده‌اند. این در حالی است که مطالعات نشان داده‌اند که هر چه سطح tHcy پلاسما به حد طبیعی نزدیک‌تر باشد، پاسخ به مکمل یاری با ویتامین‌های گروه B، کمتر و آهسته‌تر است و بهترین نتایج در بیماران دارای سطوح بالای tHcy پلاسما دیده می‌شود.^{۲۳،۲۴} این یافته در مطالعه حاضر هم تایید شده است. در مطالعه Trimarchi نیز، مکمل یاری با ویتامین B12 به صورت توام با دوز ۱۰ میلی‌گرم در روز اسیدفولیک انجام گرفته است که احتمالاً به دلیل پایین‌تر بودن دوز اسیدفولیک، اثر مضاعف ویتامین B12 مشاهده نشده است. این وضعیت مشابه نتیجه‌ای است که در مطالعه حاضر در گروه دریافت‌کننده دوز پنج میلی‌گرم در روز اسیدفولیک همراه با ویتامین B12 دیده شده است. در این گروه با وجود کاهش سطح tHcy پلاسما، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه مبنای مشاهده نشد. مسئله قابل توجه دیگر، درصد افرادی است که به محدوده طبیعی tHcy پلاسما وارد شده‌اند. برخی محققین پیشنهاد کرده‌اند که به جای بررسی تغییرات سطح tHcy پلاسما، که با سطح اولیه tHcy پلاسما همبستگی شدید دارد، درصد بیمارانی که در اثر مداخله به محدوده طبیعی وارد شده‌اند، مورد ارزیابی قرار گیرد. براین اساس، باز هم بهترین اثر در گروه دریافت‌کننده دوز پنج میلی‌گرم در روز اسیدفولیک همراه با ویتامین B12، به دست آمده است. در این گروه، متوسط سطح tHcy پلاسما نیز به محدوده طبیعی وارد شده است. در هشت پرسش‌نامه یاد آمد ۲۴ ساعته خوراک که قبل، در هفته چهارم

آمد ۲۴ ساعته خوراک در برنامه food processor به دست آمده است. تغییرات میزان دریافت انرژی و درشت مغذی‌ها در طی مطالعه، که با استفاده از آزمون آنالیز واریانس برای اندازه‌گیری‌های تکراری ارزیابی شد، در مورد انرژی (p=۰/۰۵)، پروتئین (p=۰/۰۱) و چربی (p=۰/۰۳۱) معنی‌دار بود. آنالیز رگرسیون خطی، ارتباطی را بین تغییرات سطح tHcy پلاسما و تغییرات دریافت انرژی، پروتئین و چربی، در گروه‌ها نشان نداد. تغییرات میزان دریافت ویتامین‌های گروه B مرتبط با متابولیسم tHcy، با آزمون آنالیز واریانس برای اندازه‌گیری‌های تکراری معنی‌دار نبود.

بحث

یافته‌های مطالعه بیانگر این است که در مقایسه با گروه مبنای (گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز پنج میلی‌گرم در روز همراه با دارونمای ویتامین B12)، فقط در گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با ویتامین B12، تغییرات معنی‌داری در سطح شاخص‌های مورد مطالعه (tHcy پلاسما و اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم) مشاهده می‌شود. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، متعاقب مکمل یاری با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز اسیدفولیک همراه با ویتامین B12، کاهش معنی‌دار ۳۰ درصدی در سطح tHcy پلاسما، در بیماران مورد بررسی رخ داد. به علاوه تغییرات سطح tHcy پلاسما، در مقایسه با گروه مبنای، فقط در این گروه معنی‌دار بود که این نتیجه با فرض ثابت بودن سطح tHcy اولیه پلاسما به دست آمد. این یافته با نتایج مطالعه Koyama و Manns^{۱۱،۱۲} همسو بود اما با نتایج مطالعات طراحی شده توسط Billion و Trimarchi^{۲۳،۲۴} تفاوت داشت. تفاوت در نتایج احتمالاً به این دلیل بروز کرده است که در مطالعه Billion،

سرم قبل از مداخله مرتبط است به طوری که هر قدر سطح اسید فولیک بالاتر باشد، میزان کاهش شدیدتر است.^{۲۶ و ۲۷} این کاهش در گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با ویتامین B۱۲ مشاهده نشده است زیرا احتمالاً در این گروه سطح اسید فولیک درون سلولی به حدی بالا رفته است که پاسخگوی نیاز درون سلولی باشد و وابستگی مسیر متیلاسیون Hcy به اسیدفولیک سرمی کمتر بوده است. یافته‌ها حاکی از آنند که تغییرات سطح ویتامین B۱۲ سرم، قبل و بعد از مداخله، فقط در گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با ویتامین B۱۲ معنی‌دار بوده است. تغییرات سطح ویتامین B۱۲ سرم، در مقایسه بین گروه مبنای سایر گروه‌ها، تنها در گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با ویتامین B۱۲ معنی‌دار بوده است که مستقل از سطح ویتامین B۱۲ سرم قبل از مداخله می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعه Elian همسو است.^{۱۳} به نظر می‌رسد که تغییرات سطح ویتامین B۱۲ سرم در گروه‌های مورد مطالعه، بیش از هر چیز، حاکی از نوعی ارتباط تنگاتنگ بین متابولیسم اسیدفولیک و ویتامین B۱۲ می‌باشد. مقایسه مقادیر موجود در جدول ۲ مشخص می‌کند که با افزایش میزان دریافت اسیدفولیک، مصرف ویتامین B۱۲ کاهش می‌یابد. در واقع مصرف دوزهای پایین اسیدفولیک باعث می‌شود که ویتامین B۱۲ در برخی مسیرهای متابولیکی، جایگزین اسیدفولیک شود ولی با افزایش دریافت اسیدفولیک و اصلاح این مسیرهای متابولیکی، مصرف ویتامین B۱۲ کاهش یافته و از کاهش سطح سرمی این ویتامین جلوگیری می‌شود.^{۲۵} به همین دلیل است که در گروه‌های دریافت‌کننده دارونمای ویتامین B۱۲، با افزایش میزان دریافت اسیدفولیک، از کاهش سطح ویتامین B۱۲ سرم جلوگیری شده و افزایش مختصری در سطح این شاخص به وجود آمده است. در گروه‌های دریافت‌کننده ویتامین B۱۲ نیز، افزایش میزان دریافت اسیدفولیک، باعث افزایش معنی‌داری در سطح این ویتامین شده، در حالی که در گروه دریافت‌کننده دوز پایین اسیدفولیک این افزایش معنی‌دار نیست. بهترین استراتژی درمانی برای مواجهه با هیپروموسیسستینمی در بیماران همودیالیزی، مکمل‌یاری با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز اسیدفولیک همراه با دوز یک میلی‌گرم در روز ویتامین B۱۲ خوراکی است. این نوع مکمل‌یاری بر روی سطح اسیدفولیک و ویتامین B۱۲ سرم نیز اثر مناسبی دارد.

و بعد از مداخله تکمیل می‌شد، مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات میزان دریافت غذایی کربوهیدرات و ویتامین‌های گروه B مرتبط با متابولیسم Hcy، در طی مطالعه معنی‌دار نبود. در مورد انرژی، پروتئین و چربی، تغییرات معنی‌داری در میزان دریافت غذایی مشاهده شد اما این تغییرات هیچ اثری بر روی تغییرات سطح tHcy پلاسما در بیماران مورد مطالعه نداشت نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه سطح اسید فولیک سرم، قبل و بعد از مداخله، تغییر معنی‌داری در هیچ یک از گروه‌ها دیده نشده است.

اما مقایسه تغییرات سطح اسیدفولیک سرم در گروه‌ها نشان می‌دهد که با فرض ثابت بودن سطح اولیه اسیدفولیک سرم، این تغییرات، در مقایسه با گروه مبنای آنها در گروه دریافت‌کننده اسیدفولیک با دوز ۱۵ میلی‌گرم در روز همراه با ویتامین B۱۲ معنی‌دار بوده است. عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح اسید فولیک سرم قبل و بعد از مداخله نشان می‌دهد که با مصرف دوز پنج میلی‌گرم در روز اسید فولیک، سطح اسید فولیک درون سلولی به مرحله اشباع نمی‌رسد. همین امر باعث می‌شود که افزایش میزان دریافت اسید فولیک، تنها منجر به افزایش سطح اسیدفولیک سلولی شده و تغییر معنی‌داری در سطح اسیدفولیک سرمی به وجود نیابد. این یافته با نتایج مطالعه Arnadottir و Manns، که سطح فولات گویچه‌ای را نیز اندازه‌گیری کرده‌اند مطابقت دارد.^{۱۱ و ۲۰} یافته دیگر این مطالعه، کاهش سطح اسیدفولیک سرمی متعاقب مصرف دوز پنج میلی‌گرم در روز اسیدفولیک همراه با ویتامین B۱۲، بوده است. در حالی که در سایر گروه‌ها، سطح اسیدفولیک سرم افزایش یافته است. این یافته مشابه نتایج مطالعه Dierkes است.^{۲۵} مکانیسم این کاهش با میزان مصرف سلولی اسیدفولیک در ارتباط است. به این ترتیب که، ۵- متیل تتراهیدروفولات برای متیلاسیون Hcy تحت تاثیر آنزیم متیونین سنتاز که به ویتامین B۱۲ وابسته است، ضروری است. مکمل‌یاری با ویتامین B۱۲ باعث افزایش نیاز درون سلولی به ۵- متیل تتراهیدروفولات می‌شود. افزایش مصرف سلولی ۵- متیل تتراهیدروفولات (فرم غالب فولات سرمی)، باعث کاهش سطح اسیدفولیک سرم می‌شود. از آنجا که فولات سرمی فقط یک تا دو درصد از فولات خارج سلولی را تشکیل می‌دهد، تغییرات توزیع اسیدفولیک درون سلولی و برون سلولی، اثر شدیدی بر اسیدفولیک سرمی باقی می‌گذارد. مقدار این کاهش، به شدت با سطح اسیدفولیک

References

- 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: 19-24.
- 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: 266-8.
- Billion S, Tribut B, Cadet E, Queinnec C, Rochette J, Wheatley P, et al. Hyperhomocysteinemia, folate and vitamin B12 in unsupplemented haemodialysis patients: effect of oral therapy with folic acid and vitamin B12. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 455-61.
- Friedman AN. Pharmacologic B-vitamin therapy for hyperhomocysteinemia in dialysis patients: has the time come? *Nutr Clin Care* 2002; 5: 20-4.
- Gonin JM, Nguyen H, Gonin R, Sarna A, Michels A, Masri-Imad F, et al. Controlled trials of very high dose folic acid, vitamins B12 and B6, intravenous folic acid and serine for treatment of hyperhomocysteinemia in ESRD. *J Nephrol* 2003; 16: 522-34.
- Tolkoff-Rubin N, Goes N. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia: WB Saunders; 2004.
- Finkelsteine JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 40-4.
- Skoupy S, Fodinger M, Veitl M, Perschl A, Puttinger H, Rohrer C, et al. Riboflavin is a determinant of total homocysteine plasma concentrations in end-stage renal disease patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1331-7.
- Toborek M, Hennig B. Dietary methionine imbalance, endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Nut Res* 1996; 16: 1251-66.
- Koyama K, Usami T, Takeuchi O, Morozumi K, Kimura G. Efficacy of methylcobalamin on lowering total homocysteine plasma concentrations in haemodialysis patients receiving high-dose folic acid supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 916-22.
- Manns B, Hyndman E, Burgess E, Parsons H, Schaefer J, Snyder F, et al. Oral vitamin B(12) and high-dose folic acid in hemodialysis patients with hyper-homocyst(e)inemia. *Kidney Int* 2001; 59: 1103-9.
- Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, Hume AL, Yoburn D, Nadeau MR, Bendich A, et al. High dose-B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-52.
- Elian KM, Hoffer LJ. Hydroxocobalamin reduces hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease. *Metabolism* 2002; 51: 881-6.
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine. In: Singh, AK, Brenner BM. Dialysis in the treatment of renal failure. 16th ed. Philadelphia: McGraw-Hill; 2005. p. 1564.
- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical Chemistry. In: Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999; p. 1696-7.
- Anderson SC, Cockayne S. Clinical Chemistry: Concepts and Applications. In: Miller SM, Mears E. Nutritional status assessments. New York, NY: McGraw-Hill; 2003; p. 593-6.
- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical Chemistry. In: Johnson AM, Rohlf's EM, Silverman LM. Proteins. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999; p. 529-30.
- Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's Food, Nutrition, and Diet Therapy. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical Chemistry. In: Newman DJ, Price CP. Renal function and nitrogen metabolites. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999; p. 1240-4.
- Arnadottir M, Gudnason V, Hultberg B. Treatment with different doses of folic acid in haemodialysis patients: effects on folate distribution and aminothioliol concentrations. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 524-8.
- Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 845-59.
- 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.
- Sunder-Plassmann G, Fodinger M, Buchmayer H, Papagiannopoulos M, Wojcik J, Kletzmayer J, et al. Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1106-16.
- Campo A, Goia F, Cottino R, Musso M, Viglino G. Homocysteine, folate therapy and outcome in hemodialysis: results from a prospective study. *G Ital Nefrol* 2003; 20: 484-9.
- Dierkes J, Domrose U, Ambrosch A, Schneede J, Guttormsen AB, Neumann KH, et al. Supplementation with vitamin B12 decreases homocysteine and methylmalonic acid but also serum folate in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 1999; 48: 631-5.
- Mansoor MA, Kristensen O, Hervig T, Drablos PA, Stakkestad JA, Woie L, et al. Low concentrations of folate in serum and erythrocytes of smokers: methionine loading decreases folate concentrations in serum of smokers and nonsmokers. *Clin Chem* 1997; 43: 2192-4.
- Loehrer FM, Haefeli WE, Angst CP, Browne G, Frick G, Fowler B. Effect of methionine loading on 5-methyltetrahydrofolate, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma of healthy humans. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91: 79-86.

The effect of folate and vitamin B12 supplementation on homocysteine concentrations: a study in hemodialysis patients

Azadibakhsh N.^{*1}, Shaker Hosseini R.¹, Atabak SH.², Nateghiyan N.³, Golestan B.⁴, Houshiar Rad A.⁵

1- Department of human nutrition, National Nutrition and food Technology Research Institute.

2- Department of Nephrology, School of medicine

Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran.

3- Department of manufacturing, Hakim pharmaceutical company, Tehran, Iran.

4- Department of epidemiology and biostatistics, School of public health, Tehran University of medical sciences, Tehran, Iran.

5- Department of nutrition research, National nutrition and food technology research institute, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Faculty of Nutrition, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Sna'at Sq., Farahzadi Blvd., West Arghavan St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22367484
email: azadibakhsh@gmail.com

Abstract

Background: Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular diseases. The frequency of hyperhomocysteinemia is higher in hemodialysis (HD) patients than the general population. The objective of this study is to assess the efficacy of high-dose folic acid supplementation with and without vitamin B12 on lowering plasma total homocysteine (tHcy) concentrations in HD patients.

Methods: Thirty-six HD patients at Imam Hossein Hospital, Tehran, Iran, who had been given folic acid supplements (5 mg/d) for at least 3 months before, were enrolled in this clinical trial. Subjects were also checked for other inclusion and exclusion criteria. The subjects were divided randomly into four groups and underwent two months of supplementation as follows: 5 mg/d oral folic acid + placebo in group one, 5 mg/d oral folic acid + vitamin B12 (1 mg/d orally) in group two, 15 mg/d oral folic acid + placebo in group three and 15 mg/d oral folic acid + vitamin B12 (1 mg/d orally) in group four. Concentrations of plasma tHcy and serum folic acid and vitamin B12 were measured at baseline and after the supplementation period. Dietary intake of patients was also determined during the supplementation period.

Results: Of the folic acid supplemented patients, 27.8% had normal levels of tHcy at baseline and 72.2% had hyperhomocysteinemia. After the supplementation period, plasma tHcy increased by 1.35% in group one and decreased by 6.99%, 14.54% and 30.09% in groups two, three and four respectively. Changes in plasma tHcy and serum vitamin B12 were only significant in group four; however, no significant changes were seen for serum folic acid. The percentage of subjects reaching normal levels of plasma tHcy was 5.6 fold higher in group four than in the reference group.

Conclusions: Supplementation with 15 mg/d folic acid together with 1 mg/d oral vitamin B12 is more effective in reducing tHcy levels in HD patients.

Keywords: Homocysteine, folic acid, vitamin B12, hemodialysis