# ABSTRACT

**Name:** Nahla Abd El Fatah Mostafa

**Title of thesis:** Biochemical Studies of Homocysteinemia as affected by Some Vitamins

**Degree ( Ph.D) thesis, Faculty of Science, Cairo University**

**Objective:** This Work has been carried out to investigate whether supplementation or fortification with folic acid, with or without vitamins $B_{12}$ and $B_6$ will improve the hyperhomocysteinemia in expermental animals ( rat ) .

**Background:** Hyperhomocysteinemia is a risky factor for the development of cardiovascular diseases. Deficiencies of some B-vitamins particularly folate, vitamin $B_{12}$ and $B_6$ represent one of the important factors that cause hyperhomocysteinemia.

**Methods:** Experiment (I ) included sixty albino rats (western strain), 54 rats were undergone to protocol of folate depletion for six weeks and six rats were fed basal diet along the experiment that represent (-ve control). After the depletion period, the fifty four rats were divided into nine subgroups. One of them continued feeding on basal diet free of folic acid that represented (+ ve control).While the remaining eight subgroups were fed supplemented diets with variable doses of B-vitamins for six weeks. Experiment (II) included 36 albino rats , all were undergone to protocol of folate depletion period (6weeks). After that, the rats were divided into six subgroups, one of them continued feeding on basal diet free of folic acid . While the remainin five groups were fed pan bread, either unfortified (control group) (group 1)or fortified with variable concentrations with B-vitamins ( groups 2-5 ). The repletion period was continued for 6 weeks. After that, blood samples were undertaken to investigate the biochemical parameters. In addition, aorta and heart tissue specimens were subjected to histiopathological examination.

**Conclusion:** In the emphasis of the present results, it is concluded that folate deficiency induced hyperhomocysteinemia in rats as well as severe alterations in heart and aortic tissues . Although the lowest plasma homocysteine levels were yeilded as a result of three vitamins (folate, $B_{12}$ and $B_6$) supplementation, this was not significantly different when compared with folic acid supplementation alone. This indicates that folic acid is a powerful factor for reducing hyperhomocysteinemia. Moreover, fortification of pan bread with folic acid proved to be a useful agent in raising the bioavailbility of folate and subsequently reducing hyperhomocysteinemia.

**Key words:** 1-homocysteine 2-folic acid 3- vitamin $B_{12}$ 4-vitamin $B_6$ .
5-cardiovascular diseases 6- fortification 7- pan bread.

**Supervisors:**

Prof. Dr. Sanaa Osman Abd-Allah Sanaa O. Abdallah

Prof. Dr. Emam Abd El-Mobdy

Prof. Dr. Hanaa Abd El-Ghany Dr. Hanaa Abd El-Ghany

Prof. Dr. Sanaa Osman Abd-Allah
Sanaa O. Abdallah
Head of Chemistry Department
Faculty of science,CairoUniversity

# مستخلص

**الطالبة:** نهلة عبد الفتاح مصطفي

**عنوان الرسالة:** دراسات كيميائية حيوية على الهموسيستينميا المتأثرة بنقص بعض الفيتامينات.

**الدرجة:** دكتوراه الفلسفة فى العلوم (كيمياء حيوية).

**ملخص البحث:**

يعتبر زيادة حمض الهوموسستايين فى الدم عامل خطر ومسبب لامراض القلب والاوعية الدموية. ومن أهم اسباب ارتفاع هذا الحمض فى الدم هو نقص بعض فيتامينات ب المركبة خصوصا حمض الفوليك ، فيتامين ب٦ ، فيتامين ب ١٢ ولذلك كان الهدف من هذا البحث هو دارسة العلاقة بين نقص حمض الفوليك ومستوي حمض الهوموسستايين فى دم فئران التجارب. ودراسة نتيجة التزويد او التدعيم بفيتامينات ب لتحسين متسوي الهوموسستايين فى الدم. وقسمت الدراسة الى تجربتين:

تجربة (١): استخدم فى هذه التجربة ٦٠ فأر البينو كامل النضج يزن من ١٠٠-١٢٠ جم قسموا الى مجموعتين مجموعة صغري تحتوي علي ٦ فيران تناولت العليقة الاساسية طوال فترة التجربة وسميت بالمجموعة الضابطة الطبيعية ، مجموعة كبري اشتملت على ٥٤ فأر خضعوا الى مرحلة حرمان من حمض الفوليك لمدة ٦ أسابيع. بعد هذه المرحلة. قسمت هذه المجموعة الى ٩ مجاميع فرعية (اشتملت كل واحدة منهم على ٦ فيران) ، مجموعة منهم استمر تغذيتها على العليقة الاساسية الخالية من حمض الفوليك وسميت بالمجموعة الضابطة والثماني مجموعات المتبقية خضعوا الي مرحلة التعويض بحمض الفوليك بالاضافة الى فيتامين ب ٦ ، فيتامين ب ١٢ بنسب مختلفة لمدة (٦) اسابيع.

تجربة (٢): هذه التجربة اشتملت على ٣٦ فأر تم تغذيتها على عليقة اساسية بدون حمض الفوليك حتى ليصبحوا مصابين بنقص فى هذا الحمض استغرقت مدة الحرمان ٦ أسابيع بعد ذلك قسموا الى ٦ مجاميع فرعية كل مجموعة احتوت على ٦ فئران، مجموعة منهم استخدمت كمجموعة ضابطة استمرت على تناول الغذاء الخالى من حمض الفوليك أما الخمس مجاميع الاخري قسموا الى: مجموعة (١) غذيت على عليقة تحتوي على عيش فينوغير مدعم (المجموعة الضابطة) ، اربع مجاميع (٢-٥) تناولوا عليقة تحتوي على عيش فينو مدعم بفيتامينات ب بنسبة مختلفة كما هو موضح بجدول (٥). واستمرت مرحلة التدعيم ٦ اسابيع اخري بعدها سحب الدم من جميع الفئران لعمل التحليلات البيوكيميائية.

وقد اسفرت النتائج ان نقص حمض الفوليك سبب زيادة ملحوظة فى مستوي الهوموسستايين فى دم الفئران كما تسبب في بعض التغيرات الحادة فى عينات عضلة القلب والاورطي. كما ان الامداد بحمض الفوليك لوحده اعطي نفس النتيجة تقريبا التى حصلنا عليها عند الامداد بحمض الفوليك + فيتامين ب ٦ + فيتامين ب ١٢ فى انخفاض مستوي الحمض الهوموسستايين فى الدم وهذا يشير الي ان حمض الفوليك اكثر الفيتامينات له علاقة بهذا الحمض وخفض مستواه فى الدم. كما ايضا اسفرت النتائج على ان تدعيم العيش الفينو بفيتامينات ب لها تأثير نافع على انخفاض حمض الهوموسستايين فى الدم وبالتالي انخفاض حدوث امراض القلب والاوعية الدموية.

**توقيع السادة المشرفون:**

(١) (٢) (٣)

**يعتمد ،،،**

**أ.د/ سناء عثمان عبد الله**

**رئيس قسم الكيمياء**

# Contents


Page

- Introduction ..... 1
- Aim of the Work ..... 4
- Review of literature ..... 5

I. Structure of Homocysteine ..... 5

II. Cellular metabolism of Homocysteine ..... 5

III. Pathogenesis of Hyperhomocysteinemia ..... 9

IV. Mechanisms by which hyperhomocysteinemia might predispose to Atherosclerosis and Thrombosis ..... 13

V. Relationship between Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis ..... 18

VI. Hyperhomocysteinemia in other pathologic conditions .... 22

VII. Treatment of hyperhomocysteinemia ..... 22

VIII. Folate: ..... 24

1. Structure ..... 24
2. Dietary sources ..... 24
3. Effects of food processing and storage ..... 26
4. Metabolism ..... 26
5. Bioavailability ..... 27
6. Folate status ..... 29
7. Folic acid supplementation and fortification ..... 30

IX. Vitamin $B_{12}$: ..... 33

1. Structure ..... 33
2. Dietary sources ..... 33

Cont.


| | | Page |
|---|---|---|
| | 3. Deficiency of vitamin $B_{12}$..... | 35 |
| | 4. Cobalamin supplementation and fortification ..... | 36 |
| X. | Vitamin $B_6$: ..... | 37 |
| | 1. Structure ..... | 37 |
| | 2. Bioavailability ..... | 38 |
| | 3. Vitamin $B_6$ deficiency ..... | 40 |
| - | Materials and Methods ..... | 41 |
| | I. Materials ..... | 41 |
| | II. Methods ..... | 41 |
| | 1. Preparation of pan bread ..... | 41 |
| | 2. Chemical analyses of ban bread ..... | 42 |
| | 3. Biological assay ..... | 42 |
| | 1. Experimental design ..... | 42 |
| | 2. Blood samples collection ..... | 48 |
| | 4. Hematological method: ..... | 50 |
| | 5. Biochemical methods ..... | 50 |
| | 1. Estimation of serum total cholesterol ..... | 50 |
| | 2. Estimation of serum HDL-cholesterol ..... | 51 |
| | 3. Estimation of serum LDL-cholesterol ..... | 52 |
| | 4. Estimation of serum Triglycerides ..... | 54 |
| | 5. Estimation of serum lipid peroxide ..... | 56 |
| | 6. Estimation of plasma t-Hcy ..... | 59 |
| | 7. Estimation of plasma folic acid/vitamin $B_{12}$. | 63 |

Cont.


| | | Page |
|---|---|---|
| 6. | Histopathological method: ..... | 65 |
| 7. | Statistical analyses ..... | 66 |
| - | Experimental Results ..... | 67 |
| - | Experiment I ..... | 68 |
| | I. Body weight and growth ..... | 68 |
| | II. Hematological changes ..... | 72 |
| | III. Biochemical changes ..... | 77 |
| | 1. Changes in plasma t-Hcy ..... | 77 |
| | 2. Changes in plasma folic acid and vit. $B_{12}$ ... | 77 |
| | 3. Changes in serum lipid peroxide ..... | 78 |
| | 4. Changes in lipid pattern ..... | 83 |
| | IV. Histological changes ..... | 88 |
| - | Experiment II ..... | 101 |
| | I. Chemical composition of pan bread ..... | 101 |
| | II. Body weight and growth ..... | 101 |
| | III. Hematological changes ..... | 107 |
| | IV. Biochemical changes ..... | 112 |
| | 1. Changes in plasma t-Hcy, folic acid, vitamin $B_{12}$ and serum lipid peroxide ..... | 112 |
| | 2. Lipid parameters changes ..... | 118 |
| - | Discussion ..... | 122 |
| - | Conclusions & Recommendations ..... | 138 |
| - | Summary ..... | 140 |
| - | References ..... | 145 |
| - | Arabic Summary. | |

# List of Abbreviations

| | | |
|---|---|---|
| SA M | : | S. Adenosyl Methionine |
| Hcy | : | Homocysteine |
| t-Hcy | : | Total homocysteine |
| Hyper-Hcy | : | Hyperhomocysteinemia |
| MTHFR | : | Methyl tetrahydrofolate reductase |
| CBS | : | Cystathionine Beta Synthase |
| FDA | : | Food and Drug Administration |
| PHS | : | Public Health Services |
| T.C | : | Total cholesterol |
| HDL-C | : | High density lipoprotein cholesterol |
| LDL-C | : | Low density lipoprotein cholesterol |
| TG | : | Triglycerides |
| RDA | : | Recommended Daily Allowance |
| CDC | : | Centers for Disease Control |
| VS | : | Versus |
| PGA | : | pteroyl monoglutamic acid |