

## Omocisteina nei pazienti diabetici tipo 1 e nelle loro famiglie

L. Rossi, S. Mariani\*, E. Matteucci\*, O. Giampietro\*,  
A. Lucchetti, B. Innocenti

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana

\*Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi Pisa

**Premesse:** Nei diabetici di tipo 1 una concentrazione plasmatica elevata di omocisteina è associata con lo sviluppo della nefropatia diabetica. Lo scopo della nostra ricerca era quello di valutare i livelli plasmatici di omocisteina totale in soggetti con diabete mellito tipo 1 e, per la prima volta, nei loro familiari non diabetici.

**Metodi:** Lo studio ha coinvolto una popolazione di 212 soggetti, 79 pazienti con diabete di tipo 1 (età  $39 \pm 13$  anni, 34 senza complicanze conseguenti al diabete, 23 con retinopatia diabetica, 22 con nefropatia diabetica) e 60 soggetti di controllo sani (età da 20 a 75 anni). Sono stati reclutati anche 73 parenti non diabetici di 30 pazienti diabetici di tipo 1 (37 genitori e 36 fratelli). Abbiamo misurato: omocisteina plasmatica totale, HbA1c, fruttosamina, colesterolo totale e HDL, trigliceridi, lipoproteina(a), fibrinogeno, VES, emocromo ed enzimi epatici; glucosio, creatinina, acido urico e albumina in sangue e urine.

**Risultati:** I soggetti sani di sesso femminile mostravano livelli inferiori di omocisteina totale rispetto a quelli di sesso maschile: 10.5 vs 13.7 mmol/L,  $p < 0.001$ . Tra i controlli sani, gli attuali fumatori ( $n=20$ ) e gli ex fumatori ( $n=12$ ) avevano livelli di omocisteina totale più elevati dei giovani non fumatori ( $n=28$ ): 13.2 e 13.2 vs 10.9 mmol/L,  $p < 0.05$ .

Tra i pazienti con diabete di tipo 1 esaminati sono stati riscontrati valori più elevati di omocisteina nel sesso maschile (nelle donne 9.1 vs 11.9 mmol/L negli uomini,  $p < 0.01$ ). I pazienti di tipo 1 senza complicanze diabetiche mostravano alti livelli di glucosio e HbA1c ( $p < 0.001$ ), mentre presentavano ridotta omocisteina plasmatica (9.2 vs 12.2 mmol/L,  $p < 0.05$ ) e acido urico ( $p < 0.05$ ) rispetto ai soggetti sani. I tipi 1 con nefropatia diabetica avevano età, durata di malattia e dose giornaliera d'insulina confrontabili con i pazienti retinopatici. Essi si discostavano per i livelli più elevati di omocisteina plasmatica (13.0 vs 9.0, mmol/L  $p < 0.05$ ), creatinina ( $p < 0.01$ ), acido urico ( $p < 0.01$ ), fibrinogeno ( $p < 0.05$ ), e microalbuminuria ( $p < 0.001$ ) rispetto ai pazienti con retinopatia diabetica. Nessuna differenza nei livelli di omocisteina totale è emersa tra i familiari dei soggetti diabetici di tipo 1 e i soggetti di controllo: 11.9 nei fratelli vs 11.6 mmol/L nei controlli, 13.5 nei genitori vs 12.1 mmol/L nei rispettivi controlli.

**Conclusioni:** Nel gruppo di controllo i livelli circolanti di omocisteina erano positivamente associati con età, sesso e fumo; nel gruppo generale dei pazienti diabetici l'omocisteina plasmatica era significativamente correlata con età, sesso, fumo, creatinina plasmatica e lipoproteina(a).

### L'omocisteina

L'omocisteina, un aminoacido contenente zolfo, è prodotta nella reazione di demetilazione della metionina, un aminoacido essenziale. A sua volta può essere riconvertita a metionina tramite rimetilazione a cisteina tramite transsulfurazione. Un elevato livello ematico di omocisteina è riscontrabile in malattie ereditarie che alterano l'attività enzimatica delle possibili vie metaboliche. In alternativa si possono verificare blocchi nel metabolismo a causa di carenze nutrizionali di vitamine del gruppo B o di folato. Un elevato livello di omocisteina è stato recentemente associato all'insorgenza di trombosi e malattie cardiovascolari, comunque tale ipotesi rimane ancora controversa.

L'iperomocisteinemia può essere classificata secondo l'entità: lieve (15-30  $\mu\text{mol/L}$ ), intermedia (30-100  $\mu\text{mol/L}$ ) o grave ( $>100 \mu\text{mol/L}$ ). L'omocisteina plasmatica totale è costituita per l'80% da una frazione legata a proteine (soprattutto albumina) e una frazione libera. La frazione non legata è sottoposta ad ossidazione a pH fisiologico e può formare dimeri (omocistina), oppure può reagire con altri tioli, soprattutto con cisteina per formare un disulfide misto cisteina-omocisteina. Solo una piccola quota di omocisteina si trova nel plasma nella forma libera ridotta. La concentrazione plasmatica di omocisteina può essere alterata da fattori ereditari o acquisiti (Tabella I). La sua concentrazione totale, nel plasma o siero di soggetti sani a digiuno, varia in rapporto all'età, al sesso,

all'area geografica ed a fattori genetici. I valori sono solitamente inferiori nella donna che nell'uomo; tuttavia, le donne in postmenopausa mostrano valori aumentati di omocisteina totale. Il range dei valori normali (maschi e femmine adulti) riportato nella maggior parte dei riferimenti bibliografici è compreso tra 5 e 15  $\mu\text{mol/L}$  (1). Aumentano normalmente con l'età, con valori di riferimento accettati per i soggetti più anziani (>60 anni) tra 5 e 20  $\mu\text{mol/L}$  (3). Molti autori considerano come normale un limite superiore più basso: da 10 a 12  $\mu\text{mol/L}$  (2). L'omocisteina totale in plasma o siero aumenta quando è ritardata la separazione della parte corpuscolata del sangue (2,4,5). Entro un'ora dal prelievo la concentrazione di omocisteina nel sangue intero a temperatura ambiente aumenta fino al 10%. Si può arrivare ad un incremento del 35% e del 75% lasciando il campione in condizioni ambientali per 4 e 24 ore, rispettivamente. L'aumento è dovuto presumibilmente alla continuo rilascio di omocisteina da parte degli eritrociti. Tale alterazione si evita tenendo il sangue intero in ghiaccio dopo il prelievo, oppure separando il plasma o il siero dalla parte corpuscolata entro un'ora (5).

## Applicazioni

Il dosaggio dell'omocisteina viene richiesto per il follow-up di carenza di cobalamina o di folato, condizioni in cui si osserva un'alterazione nel metabolismo di alcuni aminoacidi, tra i quali l'omocisteina (2). Una condizione particolarmente rara di applicazione di tale dosaggio è l'omocistinuria, gruppo di

malattie ereditarie caratterizzate da eccessiva escrezione di omocisteina nelle urine e di elevata concentrazione di omocisteina nel sangue (6). Più recentemente si è rivelato importante il monitoraggio dell'omocisteina nei pazienti affetti da malattie cardiovascolari precoci, per i quali l'iperomocisteinemia rappresenta un fattore di rischio indipendente per l'infarto del miocardio. L'elenco dei fattori di rischio prevenibili e correggibili, per quanto riguarda le malattie cardiovascolari, è in continua crescita. Di questi sono stati ormai bene individuati: il fumo di sigaretta, l'ipertensione, la sedentarietà, l'ipercolesterolemia, il diabete mellito, l'eccesso ponderale, il sesso maschile e l'età. Dal momento in cui McCully (1969) formulò l'ipotesi che l'elevata concentrazione plasmatica di omocisteina potesse essere causa di aterosclerosi (6), molte prove, raccolte con accurati protocolli di ricerca, hanno confermato questa correlazione (Tabella II). Parallelamente, altri studi prospettici, non hanno dimostrato correlazione tra l'omocisteina e il rischio di infarto (Tabella II). Una parte del lavoro compiuto negli ultimi 10 anni è riassunto nella tabella II. I primi studi epidemiologici e prospettici, pubblicati a partire dal 1992, dimostrano che l'omocisteina è un importante fattore di rischio indipendente per l'infarto (7,8). Altri autori hanno cercato di quantificare la prevalenza dell'iperomocisteinemia nei soggetti affetti da malattie vascolari precoci e a rapido decorso. I risultati rivelano che la popolazione a rischio è più facilmente individuabile tramite test da carico con metionina, piuttosto che con il semplice dosaggio dei valori plasmatici di omocisteina (11,12); inoltre è stato dimostrato

**Tabella I.** Fattori che influenzano i livelli di omocisteina plasmatica.

### **EREDITARI**

- **Carenza di cistationina-b-sintetasi**
- **Carenza e/o termolabilità di 5,10-metiltetraidrofolato reduttasi**
- **Carenza di metionina sintetasi**

### **ACQUISITI**

#### **Età e sesso**

Età avanzata  
Sesso maschile  
Menopausa

#### **Alimentazione e stile di vita**

Carenza di acido folico  
Carenza di vitamine B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub>  
Fumo di sigaretta  
Consumo di caffè  
Attività fisica  
Consumo di alcool

#### **Patologie**

Insufficienza renale  
Diabete  
Tumori  
Psoriasi  
Patologie autoimmunitarie  
Ipotiroidismo

#### **Ormoni** (ridotta attività cistationina $\beta$ sintetasi)

#### **Farmaci**

Livelli aumentati  
Colestiramina, colestipol e metformin  
Metotrexato  
Anticonvulsivanti  
L-Dopa

Niacina e teofillina  
Androgeni  
Ciclosporina  
Derivati dell'acido fibrico

Livelli diminuiti  
Penicillamina e N-acetilcisteina  
Betaina

**Tabella II.** Studi prospettici sulla relazione tra omocisteina e incidenza di malattie delle arterie coronariche, patologie vascolari periferiche e infarto. (IM: infarto del miocardio; MCV: malattie cardiovascolari; SLE: lupus eritematoso sistemico; MAC: malattie delle arterie coronariche).<sup>2</sup>

Autore, Anno	n° di soggetti	Popolazione	End Point	Follow-up (anni)	Correlazione
Stampfer et al, 1992	14916	Medici USA	IM/ morte	5	Positiva
Alftan et al, 1994	7424	Comunità	IM/ MCV	9	Negativa
Verhoef et al, 1994	14916	Medici USA	Infarto	5	Negativa
Arnesen et al, 1995	21826	Comunità	IM	3-4	Positiva
Perry et al, 1995	5661	Comunità	Infarto	13	Positiva
Chasan-Taber et al, 1996	14916	Medici USA	IM/ morte	7.5	Negativa
Petri et al, 1996	337	Pazienti con SLE	Infarto/ MCV	4.8	Positiva
Evans et al, 1997	712	Comunità	IM/ morte	20	Negativa
Verhoef et al, 1997	14916	Medici USA	Angina/ Bypass Coronarico	9	Negativa
Ridker et al, 1997	14916	Medici USA	Trombosi venosa profonda	10	Positiva
Folsom et al, 1998	15792	Comunità	MAC/ morte	3.3	Negativa
Moustapha et al, 1998	167	Soggetti con malattie renali stadio terminale	MCV/ morte	1.5	Positiva
Bostom et al, 1999	1933	Popolazione di Framingham	MCV/ morte	10	Positiva
Nahalawi et al, 1999	160	Trapiantati cardiaci	MCV/ morte	2.4	Negativa
Taylor et al, 1999	351	Soggetti con malattie vascolari periferiche	MCV/ morte	3	Positiva
Bots et al, 1999	7983	Comunità	Infarto/ IM	4	Positiva
Voutilainen et al, 2000	3235	Popolazione finlandese	MAC/ gene MTHFR	8-9	Negativa

come l'iperomocisteinemia abbia un effetto moltiplicativo del rischio nei fumatori e nei soggetti con ipertensione (13). Sebbene non tutti gli autori abbiano dimostrato una correlazione tra omocisteina e malattie coronariche tutti concordano sull'importanza dei livelli di vitamina nei soggetti studiati (7,10), senza dimenticare anche i vari fattori di rischio cardiovascolare, soprattutto il sesso. Inoltre i livelli di omocisteina potrebbero essere influenzati dal tempo trascorso tra l'evento vascolare occlusivo e il prelievo di sangue (14). Un elevato livello di omocisteina plasmatica è stato recentemente riconosciuto come un importante fattore di rischio indipendente nell'insorgenza di trombosi arteriose, venose e nell'aterosclerosi; l'espressione di fattore tissutale sui monociti circolanti può risultare plausibile nell'induzione di fenomeni trombotici in presenza di iperomocisteinemia (15). Studi recenti hanno dimostrato il reale coinvolgimento di questo aminoacido nell'insorgenza di patologie aterotrombotiche, con la presenza in circolo di varianti genetiche di alcuni enzimi coinvolti nel suo metabolismo, quali la MTHFR (metilentetraidrofolatoriduttasi) (16). Notevole interesse sembra ricoprire il ruolo dell'associazione tra elevati valori di omocisteina e Lp(a). Queste due sostanze, è ormai noto, rappresentano fattori di rischio indipendenti per le patologie a carico delle arterie coronariche; non sembra che questa associazione rappresenti un rischio ulteriore all'insorgenza di fenomeni trombotici o vascolari, nonostante gli studi effettuati fino ad oggi abbiano riscontrato difficoltà di individuare un campione della popolazione con un'intervallo anagrafico sicuramente più ampio (17). L'iperomocisteinemia è stata inoltre identifica-

**Tabella III.** Confronto tra diabetici tipo 1 senza complicanze con un gruppo di soggetti di controllo sani. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs controlli. ^50° percentile (10°-90° percentile)

	Diabetici senza complicanze	Controlli
N (F/M)	34 (20/14)	24 (11/13)
Fumo (SI/NO/Ex fumatori)	19/13/2	16/7/1
Età (anni)	31±12	34±9
Indice di massa corporea (kg/m)	24±4	25±4
Pressione sanguigna media (mmHg)	87±10	91±11
Creatininemia (mg/dl)	^0.92 (0.70-1.12)	^1.01 (0.88-1.17)
Uricemia (mmol/L)	0.2±0.1*	0.3±0.1
Glicemia (mmol/L)	^11.6 (6.5-22.2)***	^5.0 (4.2-5.7)
HbA1c (%)	8.0±1.6***	5.3±0.4
Colesterolo totale (mmol/L)	5.1±1.5	4.8±1.0
HDL (mmol/L)	1.5±0.4	1.4±0.4
Trigliceridi (mmol/L)	^0.9 (0.5-1.6)	^0.9 (0.5-2.6)
Lipoproteina(a) (mg/dl)	^11 (10-49.2)	^10 (10-23.5)
Fibrinogeno (mg/dl)	298±80	270±68
Microalbuminuria (mg/min)	^5.8 (2.2-16.8)	^6.2 (2.8-21.4)
Omocisteina totale (mmol/L)	^8.7 (6.6-13.6)**	^10.9 (8.6-19.7)

ta come fattore di rischio nelle malattie cerebrovascolari. Una meta-analisi ha messo a confronto 21 studi che valutavano l'omocisteina, l'omocistina e le patologie cerebrovascolari effettuati dal 1966 al 1999. In 17 studi i dati forniti sulla popolazione analizzata erano compatibili (18). Gli studi pubblicati negli ultimi anni hanno ulteriormente evidenziato il ruolo patogenetico che questo aminoacido può assu-

**Tabella IV.** Confronto tra diabetici tipo 1, con retinopatia diabetica e nefropatia diabetica, e soggetti di controllo sani. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 DN vs DR; °p<0.05, °°p<0.01, °°°p<0.001 pazienti con diabete vs soggetti di controllo. ^50° percentile (10°-90° percentile)

	Retinopatia	Nefropatia	Controlli
N (F/M)	23 (17/6)	22 (11/11)	22 (11/11)
Fumo (SI/NO/Ex fumatori)	16/5/2	11/4/7	9/9/4
Età (anni)	47±10	44±12	46±16
Indice di massa corporea (kg/m)	23±7	25±8	-
P sanguigna media (mmHg)	25±3	26±7	24±2
Creatininemia (mg/dl)	^0.90 (0.69-1.23)°	^1.09 (0.83-2.08)*	^0.98 (0.87-1.20)
Uricemia (mmol/L)	0.2±0.1°	0.3±0.1**	0.3±0.1
Glicemia (mmol/L)	^15.1 (7.1-20.3)°°°	^14.6 (9.4-24.7)°°°	^5.1 (4.4-5.7)
HbA1c (%)	9.1±1.5°°°	9.3±2.1°°°	5.5±0.3
Colesterolo totale (mmol/L)	5.5±1.1	5.3±0.7	5.3±1.0
HDL (mmol/L)	1.4±0.5	1.4±0.4	1.4±0.3
Trigliceridi (mmol/L)	^0.9 (0.6-1.5)	^1.0 (0.6-2.3)	^0.9 (0.6-1.9)
Lipoproteina(a) (mg/dl)	^11 (9.8-54)	^21 (10-121.2)°°°	^10.5 (10-36.9)
Fibrinogeno (mg/dl)	299±70	373±105*°°	299±69
Microalbuminuria (mg/min)	^6.9 (2.2-13.9)	^41.6 (5.0-652.8)***°°°	^5.5 (3.5-16)
Omocisteina totale (mmol/L)	^9.1 (6.6-12.6)°°	^11.2 (6.7-42.8)*	^11.2 (8.5-16.7)

mere sia in termini di patogeno cardiovascolare arterioso e venoso, sia come concausa degli incidenti ostetrici; attenti studi di meta-analisi, accuratamente analizzati in lavori incentrati su patologie correlate alla variazione dei valori circolanti di omocisteina, hanno permesso di evidenziare la sua reale patogenicità (19,20,21). Prove sperimentali suggeriscono che la tendenza all'aterogenesi associata all'iperomocisteinemia, deriva da lesioni e disfunzioni endoteliali, seguite da attivazione piastrinica e formazione di trombi. Studi sull'uomo e su animali, dimostrano che l'aterosclerosi omocisteina-indotta è caratterizzata da sostanziale accumulo di piastrine e formazione di trombi in aree di lesione endoteliale (22). Le alterazioni vascolari hanno origine multifattoriale, possono scaturire dall'endotelio, dalle piastrine, dalla cascata coagulativa oppure dalle pareti delle arterie. L'attivazione della cascata coagulativa da parte dell'omocisteina può ugualmente contribuire al rischio vascolare, attivando il Fattore XII e inducendo l'attivazione endoteliale del Fattore V. Alte concentrazioni di omocisteina possono inoltre inibire la trombomodulina; dal momento che il legame tra trombina e trombomodulina favorisce la formazione di proteina C e inibisce l'attivazione trombinica del fibrinogeno, un difetto di trombomodulina favorisce la formazione di fibrina (7). Tutti questi eventi modificano l'equilibrio tra meccanismo coagulativo e anticoagulativo, aumentando così il rischio di trombotosi. Le piastrine di pazienti con iperomocisteinemia hanno maggiore adesività, presumibilmente dovuta ad alterazioni del metabolismo dell'acido arachidonico da parte dell'omocisteina. Quest'alterazione comporta un maggiore rilascio di trombassano A<sub>2</sub>, che ha funzione aggregante (7).

### Omocisteina e Diabete Mellito

La più frequente complicanza cronica del Diabete Mellito tipo 1 è la retinopatia, che colpisce quasi tutti i pazienti affetti da questa patologia dopo 14 anni di malattia. La nefropatia diabetica, che pure è considerata una complicanza microangiopatica, mostra un andamento dissimile: il picco di incidenza è nella seconda decade di malattia e declina successivamente; inoltre colpisce solo 1/3 della popolazione diabetica di tipo 1 tanto da far supporre l'esistenza di una suscettibilità individuale geneticamente determinata (23). Le malattie cardiovascolari sono altamente frequenti in pazienti con diabete mellito di tipo 2 e in essi progrediscono molto più rapidamente, rispetto a soggetti senza diabete. Sebbene i tradizionali fattori di rischio cardiovascolari, come ad esempio l'ipertensione e la dislipidemia, siano ben presenti nella popolazione di diabetici di tipo 2, ciò non è sufficiente per spiegare questa rapida progressione delle patologie cardiovascolari. Studi recenti suggeriscono che l'omocisteina può essere un ulteriore fattore di rischio per le malattie cardiovascolari in questi pazienti (24). L'associazione tra iperomocisteinemia e malattia diabetica è attualmente molto controversa. Alcuni autori hanno dimostrato un aumento dei livelli di omocisteina nei diabetici di tipo 2, sia a digiuno sia dopo test di carico con metionina, mentre riscontravano valori nella norma in pazienti con diabete di tipo 1 (24). Altri studi dimostrano che l'associazione tra iperomocisteinemia e malattie cardiovascolari è molto più evidente nei diabetici piuttosto che nei non diabetici, ciò dipende dal fatto che entrambe le patologie sono legate allo stress ossidativo (22). Studi sui diabetici di tipo 1 hanno confermato che i livelli plasmatici di omoci-

steina sono normali nelle fasi precoci della malattia per poi aumentare in condizioni di nefropatia o di elevata creatinina plasmatica (25). Gli stessi autori hanno recentemente dimostrato l'associazione tra scarso controllo metabolico, insorgenza precoce e carenza di folati nei diabetici di tipo 1 (26). In un lavoro più recente è stato riscontrato come i livelli plasmatici di omocisteina, sia a digiuno sia dopo carico con metionina, fossero elevati in diabetici di tipo 1 con microalbuminuria (27); questi stessi pazienti mostravano elevati valori di trombomodulina plasmatica e avevano una più alta prevalenza di complicanze tardive del diabete comprese le malattie cardiovascolari. Secondo altri autori esiste un'influenza del glucosio e dell'insulina sulla concentrazione dell'omocisteina. È ben noto l'effetto dell'insulina sul metabolismo di proteine e aminoacidi, tra i quali vi è anche la metionina. In pazienti sani la concentrazione plasmatica di aminoacido diminuisce significativamente dopo un carico orale di glucosio e aumenta nella fase successiva di rilascio dell'insulina endogena. Nei diabetici, questo calo non si osserva, a dimostrazione di una possibile resistenza verso gli effetti dell'insulina sugli aminoacidi (28). La diminuzione della concentrazione plasmatica di metionina indotta dall'insulina può essere mediata attraverso l'aumento dell'assorbimento tissutale di metionina, oppure attraverso la via di transsulfurazione, che dà origine ad un aumento di omocisteina. I livelli plasmatici e intracellulari di omocisteina tendono così ad aumentare, specialmente in presenza di bassa attività dell'enzima cistationina  $\beta$ -sintetasi.

Lo scopo del nostro studio era determinare i livelli ematici di omocisteina nei diabetici di tipo 1, con o senza complicanze diabetiche, nei loro parenti di primo grado non diabetici e in soggetti di controllo.

## Materiali e metodi

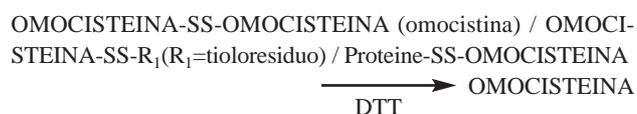
Il nostro studio ha coinvolto una popolazione di 212 soggetti, 79 pazienti con diabete di tipo 1 (48F/31M, età  $39 \pm 13$ , durata media  $17 \pm 10$  anni) e 60 soggetti di controllo sani (31F/29M, età da 20 a 75 anni). Sono stati reclutati anche i parenti non diabetici normotesi di 30 pazienti diabetici di tipo 1: 37 genitori (20F/17M, età  $58 \pm 9$  anni) e 36 fratelli (23F/13M, età  $39 \pm 13$  anni). Nessuno dei parenti aveva evidenza clinica di malattia e non stava assumendo farmaci. Tra i pazienti diabetici, 34 non avevano complicanze conseguenti al diabete (20F/14M, età  $31 \pm 12$ , durata  $9 \pm 8$  anni), 23 avevano retinopatia diabetica (17F/6M, età  $47 \pm 10$ , durata  $23 \pm 7$  anni), 22 con nefropatia diabetica (11F/11M, età  $44 \pm 12$ , durata  $25 \pm 8$  anni). Tutti i pazienti diabetici sono stati trattati dal momento della diagnosi con almeno due iniezioni giornaliere di insulina. Nessuno di loro ha ricevuto trattamenti medici ad eccezione dell'insulina ( $0.7 \pm 0.2$  U/kg) e di possibili antiipertensivi o farmaci per il controllo lipidico. La presenza di retinopatia è stata determinata con angiografia a fluorescenza o tramite precedenti interventi

di laser-terapia per la retinopatia diabetica. La presenza di nefropatia è stata stabilita nei casi con albuminuria persistente maggiore di  $20 \mu\text{g}/\text{min}$ , e/o livelli di creatinina sierica maggiori di  $1.5 \text{ mg}/\text{dl}$  in pazienti con retinopatia. Su sangue venoso e raccolta di urine delle 24 ore sono stati dosati glucosio (aminofenazone fenolo), creatinina (Jaffe con picrato), acido urico (uricasi) e albumina (verde di bromocresolo). Abbiamo inoltre dosato HbA1c (HPLC), fruttosamina (ble di nitrotetrazolio), colesterolo totale (Trinder) e HDL (PEG e a ciclodestrina), trigliceridi (Trinder), lipoproteina(a) (immunoturbidimetrico), fibrinogeno (Claus), VES (automatizzato ad 1 ora), emocromo (contaglobuli automatico) ed enzimi epatici ALP: dietanolamina; AST: Karmen; ALT: Wroblewski e LaDue; GGT: Szasz). Tutti i dati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$  dalla media. L'albumina urinaria, l'omocisteina plasmatica totale, la creatinina, il glucosio, i trigliceridi e la lipoproteina(a) sono stati rappresentati come 50° percentile ( $10^\circ$ - $90^\circ$  percentile). La concentrazione plasmatica di omocisteina totale a digiuno è stata determinata tramite dosaggio immunologico enzimatico su analizzatore automatico a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA, IMX Sistem, Abbott Diagnostics, Roma). I campioni di plasma, separati entro 1 ora dal prelievo, sono stato conservati alla temperatura di  $-20^\circ \text{C}$ . Tutti i pazienti reclutati hanno dato il consenso allo studio.

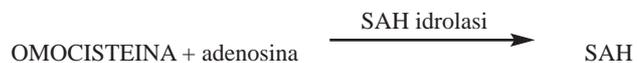
## Principio del metodo

L'omocisteina legata (forma ossidata) viene ridotta ad omocisteina libera, la quale viene convertita enzimaticamente a S-adenosil-L-omocisteina (SAH) nel modo seguente:

-Riduzione: l'omocisteina e le forme di omocisteina legate a disulfide misto e proteine, presenti nel campione, vengono ridotte con l'impiego di ditiotreitolo (DTT) ad omocisteina libera.



-Conversione enzimatica: l'omocisteina libera totale viene convertita in S-adenosil-L-omocisteina (SAH) con l'impiego di SAH idrolasi e con l'adenosina in eccesso.



-Misurazione: la SAH così formata ed il tracciante marcato con fluoresceina competono per i siti sulla molecola degli anticorpi monoclonali. L'intensità della luce fluorescente polarizzata viene misurata con il sistema ottico FPIA. Se si considerano la grande produttività e la bassa imprecisione, il metodo FPIA-IMx risulta il più adatto alle esigenze di un laboratorio di routine.

## Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati utilizzando l'analisi univoca della varianza per i confronti multipli, e il t-test per dati non appaiati (con doppia coda) per i confronti singoli, quando i dati seguivano una distribuzione gaussiana. Negli altri casi è stata usata la somma dei ranghi di Mann Whitney o il test di Kruskal Wallis. Il test Chi-quadrato è stato usato per confrontare le prevalenze tra i gruppi. Le correlazioni sono state evidenziate tramite il coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman, allo stesso scopo è stata utilizzata l'analisi di regressione stepwise e la regressione lineare multipla, seguita dalla trasformazione logaritmica dei dati non uniformemente distribuiti. La significatività statistica è stata definita come  $p < 0.05$ .

## Risultati dello studio

Nell'intero gruppo di soggetti sani di controllo, l'omocisteina circolante totale è risultata di  $12.0 \mu\text{mol/L}$  ( $7.0-33.5 \mu\text{mol/L}$ ). I soggetti sani di sesso femminile mostravano livelli inferiori di omocisteina totale rispetto a quelli di sesso maschile:  $10.5$  ( $7.0-32.0$ ) vs  $13.7$  ( $8.8-33.5 \mu\text{mol/L}$ ),  $p < 0.001$ . Gli attuali vecchi fumatori ( $n=20$ , età  $45 \pm 12$  anni) e gli ex fumatori ( $n=12$ , età  $59 \pm 13$  anni) avevano livelli di omocisteina totale più elevati dei giovani non fumatori ( $n=28$ , età  $39 \pm 15$  anni,  $p < 0.01$ ):  $13.2$  ( $8.7-33.5$ ) e  $13.2$  ( $7.0-19.1$ ) vs  $10.9$  ( $7.5-32.0 \mu\text{mol/L}$ ),  $p < 0.05$ . Tra i pazienti con diabete di tipo 1 coinvolti nello studio elevati livelli di omocisteina erano anche associati con il sesso maschile:  $9.1$  nelle donne ( $4.3-65.4$ ) vs  $11.9$  ( $6.3-100.6 \mu\text{mol/L}$ ),  $p < 0.01$ . In confronto con 50 controlli sani confrontati per sesso, età e fumo, i diabetici di tipo 1 si discostavano per i livelli di omocisteina totale [ $10.1$  ( $4.3-100.6$ ) vs  $11.8$  ( $7.0-33.5 \mu\text{mol/L}$ ),  $p < 0.01$ ], glucosio [ $13.0$  ( $3.0-33.7$ ) vs  $5.0$  ( $3.8-6.0 \text{ mmol/L}$ ),  $p < 0.001$ ], HbA1c ( $8.7 \pm 1.8$  vs  $5.4 \pm 0.4$  %,  $p < 0.001$ ), lipoproteina(a) [ $18$  ( $5-153$ ) vs  $12$  ( $10-46 \text{ mg/dl}$ ),  $p < 0.001$ ], fibrinogeno ( $320 \pm 91$  vs  $281 \pm 63 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.01$ ), albumina plasmatica ( $42.1 \pm 5.6$  vs  $45.1 \pm 4.6 \text{ g/L}$ ,  $p < 0.01$ ), microalbuminuria [ $12$  ( $1-741$ ) vs  $6$  ( $1-31 \mu\text{g/min}$ ),  $p < 0.05$ ]. I pazienti di tipo 1 senza complicanze diabetiche (giovani, con breve durata di malattia, e migliore controllo metabolico rispetto ai pazienti con evidenti complicanze), sono stati confrontati con un gruppo di controllo composto da individui giovani. Insieme ad alti livelli di glucosio e HbA1c, i diabetici mostravano ridotta omocisteina plasmatica e acido urico (Tabella III). I diabetici di tipo 1 con nefropatia diabetica avevano età, durata di malattia, e dose giornaliera d'insulina, confrontabili con i pazienti retinopatici. Essi si discostavano per i livelli più elevati di omocisteina plasmatica, creatinina, acido urico, fibrinogeno, e microalbuminuria rispetto ai pazienti con retinopatia diabetica; essi differivano

inoltre per maggiori concentrazioni di glucosio, HbA1c, fibrinogeno e microalbuminuria rispetto ai soggetti sani (Tabella IV). Al contrario, i pazienti con retinopatia diabetica avevano livelli più bassi di omocisteina totale e acido urico rispetto ai controlli sani, in più presentavano un peggiore controllo metabolico. Non si sono riscontrate differenze nell'omocisteina plasmatica tra i parenti di primo grado dei diabetici di tipo 1 e soggetti di controllo correlati per sesso e età:  $11.9$  ( $4.9-142.5 \mu\text{mol/L}$ ) nei fratelli vs  $11.6$  ( $7.0-33.5 \mu\text{mol/L}$ ) nei loro controlli,  $13.5$  ( $6.7-70.1 \mu\text{mol/L}$ ) nei parenti vs  $12.1 \mu\text{mol/L}$  ( $7.0-20.9 \mu\text{mol/L}$ ) nei rispettivi controlli. Nessuna differenza è emersa tra i parenti associati secondo la presenza e il tipo di complicanze dei soggetti diabetici. Nel gruppo di controllo, i livelli circolanti di omocisteina erano positivamente associati con età, sesso e fumo (multiplo R  $0.5$ ,  $p < 0.01$ ; parziale F  $0.3$ ,  $9.8$ , e  $3.0$ , rispettivamente). Nel gruppo generale dei pazienti diabetici, l'omocisteina plasmatica era significativamente correlata con età, sesso, fumo, creatinina plasmatica e lipoproteina(a) ( $r$   $0.6$ ,  $p < 0.001$ ; parziale F  $1.0$ ,  $0.1$ ,  $2.3$ ,  $19.7$ ,  $1.6$ , rispettivamente). La correlazione semplice con creatinina plasmatica, clearance della creatinina e albumina urinaria è risultata:  $r$   $0.6$  ( $p < 0.001$ ),  $0.5$  ( $p < 0.001$ ), e  $0.4$  ( $p < 0.01$ ), rispettivamente.

## Discussione

Abbiamo esaminato le concentrazioni plasmatiche di omocisteina nei pazienti diabetici di tipo 1, con o senza complicanze, e per la prima volta, nei loro parenti di primo grado non diabetici. L'omocisteina circolante totale, nel gruppo dei soggetti sani di controllo, è risultata di  $12.0 \mu\text{mol/L}$ , una concentrazione leggermente più elevata nei confronti della concentrazione rispettiva in HPLC. Recentemente sono state eseguite valutazioni sistematiche di confronto tra i metodi tradizionali (HPLC) e quelli di nuova introduzione (FPIA) per la determinazione dell'omocisteina. Alcuni autori (29) hanno confrontato il metodo FPIA, adattato all'analizzatore IMX, con l'HPLC (derivatizzazione pre-colonna con OPA) ed hanno osservato che il primo metodo è meno impreciso e leggermente più sensibile del secondo. Confronti precedenti avevano dimostrato una divergenza nei risultati, in particolare una sovrastima dei valori (da  $3.5$  a  $20.7\%$ ) da parte del sistema FPIA-IMx in confronto a quelli misurati con HPLC (monobromobimano). Secondo un lavoro più recente (30) questa differenza sembra essere esigua se si confronta il metodo immunologico con quello HPLC a derivatizzazione pre-colonna con SBD-F. Recentemente studi multicentrici hanno analizzato le caratteristiche e le performance delle metodiche presenti in commercio, valutando la concordanza dei risultati tra diversi laboratori e verificando l'influenza degli standard su questi risultati (31).

I polimorfismi genici che influenzano l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina sono stati riscontrati in presenza di nefropatia diabetica (32), così come di retinopatia (33,34). Le prove dell'associazione tra i livelli plasmatici di omocisteina e la microangiopatia diabetica restano però ancora discordanti (35,36). Abbiamo osservato che la concentrazione ematica di omocisteina risulta significativamente diminuita nelle prime fasi della malattia, ciò potrebbe dipendere dall'iperfiltrazione glomerulare che si osserva nei pazienti in questo stadio. Tuttavia, l'omocisteina plasmatica circolante resta bassa anche in presenza di retinopatia e di lunga durata di malattia, ciò suggerisce la presenza di una combinazione di cause oltre all'iperfiltrazione. Un fattore aggiuntivo potrebbe essere l'aumento d'attività degli enzimi di transsulfurazione epatica (cistationina  $\beta$ -sintetasi e cistationina  $\gamma$ -liasi), come è stato osservato nel diabete sperimentale (37). La ridotta estrazione epatica dell'insulina, conseguente alla somministrazione sottocutanea dell'ormone, contribuisce a mantenere ridotta l'omocisteina plasmatica nei pazienti insulino-trattati prima della comparsa di interessamento renale. La persistenza di basse concentrazioni di omocisteina plasmatica nella retinopatia diabetica sembra inoltre in contrasto con l'ipotesi genetica (32,33). A conferma di ciò, i livelli di omocisteina sono apparentemente normali nei familiari, ciò esclude la presenza di mutazioni ereditarie nel gene della metiletetraidrofolato reduttasi o in altri siti, nei partecipanti al nostro studio. Tuttavia, la selezione dei familiari è stata determinata da precisi criteri di esclusione (normale pressione sanguigna e tolleranza al glucosio, apparenti buone condizioni di salute, nessuna assunzione di farmaci), è possibile quindi che il campione non sia rappresentativo di tutta la popolazione. Livelli aumentati di omocisteina plasmatica totale sono caratteristici dei pazienti con nefropatia, probabilmente a causa della ridotta filtrazione glomerulare. Infatti, l'elevata concentrazione di omocisteina totale risultava significativamente associata all'aumento di creatinina plasmatica. L'osservazione di elevati livelli di omocisteina totale concorda con i risultati ottenuti da studi precedenti (23,27,36), anche se l'associazione con l'albuminuria è risultata meno significativa di quella con la creatinina plasmatica. Recentemente Agardh et al (36) hanno confermato elevati livelli di omocisteina plasmatica totale solo in presenza di ridotta funzione renale e livelli di creatinina maggiori di 100  $\mu\text{mol/L}$ . Il nostro studio conferma, inoltre, i noti determinanti dell'omocisteina plasmatica: età, sesso maschile e fumo (7,13,38). L'associazione osservata tra omocisteina e lipoproteina(a) nei nostri pazienti diabetici era imprevista. Prove di legami biochimici tra omocisteina (e altri composti sulfidrilici), lipoproteina(a) e metabolismo delle lipoproteine stanno emergendo da alcuni studi recenti, ma una speculazione risulta prematura.

## Conclusioni

In conclusione, abbiamo osservato che:

- 1) nei soggetti sani, età, sesso maschile e fumo, sono associati ad alti livelli di omocisteina plasmatica.
- 2) La concentrazione di omocisteina plasmatica è ridotta nei diabetici di tipo 1 con funzione renale normale in confronto con soggetti sani (iperfiltrazione glomerulare e accelerata transsulfurazione epatica?).
- 3) Elevati livelli di omocisteina plasmatica sono associati soltanto alla nefropatia diabetica e sono fortemente correlati alla creatinina plasmatica.
- 4) I familiari di primo grado non diabetici dei pazienti con diabete mellito tipo 1 presentano concentrazioni normali di omocisteina plasmatica.

## Bibliografia

1. Ueland M, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39:1764-79.
2. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease. *Med Clin N Am* 2000; 84:215-37.
3. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 1998; 49:31-63.
4. Stabler S, Marcell PD, Padell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Biochem* 1987; 162:185-96.
5. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993; 39:263-71.
6. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implication for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
7. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268:877-81.
8. Perry IJ, Refsum H, Morris RW et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346:1395-98.
9. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implication for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev* 1999; 20:738-59.
10. Verhoef P, Hennekens CH, Allen RH, et al. Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol* 1997; 79:799-801.
11. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and

- all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999; 159:1077-80.
12. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313:709-15.
  13. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. The European Concerted Action Project. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997; 277:1775-81.
  14. Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, et al. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Intern Med* 1995; 237:381-88.
  15. Khajuria A, Houston DS. Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. *Blood* 2000; 96:966-72.
  16. Luijtmans LA, Whitehead AS. Methylene-tetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease; evidence that all three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *European Heart Journal* 2001; 22:294-9.
  17. Foody JM, Milberg JA, Robinson K, Pearce GL, Jacobsen DW, Sprecher DL. Homocysteine and Lipoprotein (a) interact to increase CAD risk in young men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:493-9.
  18. Moller J, Nielsen GM, Tvedegaard KC, Andersen NT, Jorgensen PE. A meta-analysis of cerebrovascular disease and hyperhomocysteinemia. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60:491-9.
  19. Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:874-7.
  20. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, Den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 74:1196-9.
  21. Cleophas TJ, Hornstra N, Van Hoogstraten B, Van der Meulen J. Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol* 2000; 86:1005-9.
  22. Welch GN, Loscalzo J: Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-50.
  23. Kroleski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1987; 26: 1390-97.
  24. Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 1996; 45:133-5.
  25. Hultberg B, Agardh E, Andersson A, et al. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51:277-82.
  26. Hultberg B, Agardh CD, Agardh E, et al. Poor metabolic control, early age at onset, and marginal folate deficiency are associated with increasing levels of plasma homocysteine in insulin-dependent diabetes mellitus. A five-year follow-up study. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57:595-600.
  27. Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, et al. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1998; 21:841-8.
  28. Zinneman HH, Nuttal FQ, Goetz FC. Effect of endogenous insulin on human amino acid metabolism. *Diabetes* 1996; 15:5-8.
  29. Blanco-Vaca F, Arcelus R, Gonzales-Sastre F, et al. Comparison of the abbot IMX and a high-performance liquid chromatography method for measuring total plasma homocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:327-9.
  30. Pfeiffer CM, Twite D, Shith J, et al. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbot IMx analyzer and a high-performance liquid chromatography assay. *Clin Chem* 1999; 45:152-3.
  31. Tripodi A, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Multicenter study of homocysteine measurement-Performance characteristics of different methods, influence of standards on interlaboratory agreement of results. *Thromb Haemost* 2001; 85:291-5.
  32. Shecherbak NS, Shutskaya ZV, Sheidina AM, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms as a risk factor for diabetic nephropathy in IDDM patients. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 375-8.
  33. Neugebauer S, Baba T, Kurokawa K, et al. Defective homocysteine metabolism as a risk factor for diabetic retinopathy. *Lancet* 1997; 349:473-4.
  34. Vaccaro O, Ingrassio D, Rivellese A, et al. Moderate hyperhomocysteinemia and retinopathy in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1997; 349:1102-3.
  35. Agardh CD, Agardh E, Andersson A, et al. Lack of association between plasma homocysteine levels and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54:637-41.
  36. Agardh E, Hultberg B, Agardh CD. Severe retinopathy in type 1 diabetic patients is not related to the level of plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60:169-74.
  37. Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, et al. Effects of streptozocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 1998; 47:1967-70.
  38. Nigard O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Int Med* 1999; 246:425-54.