

Iperomocisteinemia nei pazienti uremici: effetti della supplementazione alternata di acido folico e vitamina B₁₂

S. De Angelis¹, A. Noce¹, M. Dessì², A. Pastore³, F. Scaccia⁴, M. Trombetta⁴, C. Tozzo¹, G. Splendiani¹

¹U.O. Nefrologia e Dialisi Policlinico Universitario "Tor Vergata", Roma

²Medicina di Laboratorio Policlinico Universitario "Tor Vergata", Roma

³Laboratorio di Biochimica Ospedale "Bambino Gesù", Roma

⁴U.O. Nefrologia e Dialisi Ospedale Civile "Umberto I", Frosinone

Hyperhomocysteinemia and alternate vitamin supplementation

Background. Treatment with folic acid and vitamin B₁₂ appears to be effective in lowering total plasma Homocysteine (tHcy) concentration, but whether vitamin B₁₂ alone decreases tHcy in patients with normal vitamin B₁₂ status is still unknown. The aims of the present study were to explore the effect of alternate vitamin supplementation with folic acid or vitamin B₁₂ on tHcy concentrations in haemodialysis (HD) patients, and to compare changes in tHcy concentrations with MTHFR genotype.

Methods: 74 patients, 44 men and 30 women, were recruited and randomized blindly into two groups of 37 subjects each. The first group was initially treated with vitamin B₁₂ for two months, and with folic acid for the following two months; the second group was supplemented in the reverse order. In both groups the treatment was followed by a 2-month washout period. tHcy levels were measured at the beginning of treatment (T0), after two months (T1), four months (T2), and at the end of the washout period (T3). Vitamin B₁₂ and folate were taken at T0 and T3.

Results: The genotype frequency was: C/C 37%, C/T 34%, T/T 29%. tHcy decreased in both groups following the alternate vitamins therapy. This decrease was greater for the T/T genotype ($p < 0.05$) and was more significant when the treatment started with folic acid ($p < 0.01$). Moreover, after the washout period, tHcy increased remarkably without significant differences between diffusive and convective techniques. Folate levels at the end of study appeared to be reduced in haemodialysis patients. Vitamin B₁₂ concentration significantly increased in patients on diffusive haemodialysis, confirming the fundamental role of membrane performance.

Conclusion: The alternate vitamin treatment demonstrated the importance of folate therapy and the secondary contribution of vitamin B₁₂ in lowering tHcy in HD patients. (G Ital Nefrol 2007; 24: 51-5)

KEYWORDS: Folic acid, Haemodiafiltration, Haemodialysis, Hyperhomocysteinemia, MTHFR polymorphism, Vitamin B₁₂

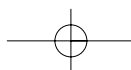
PAROLE CHIAVE: Acido folico, Emodiafiltrazione, Emodialisi, Iperomocisteinemia, Polimorfismo dell'enzima MTHFR, Vitamina B₁₂

Introduzione

La morbilità e la mortalità per cause cardiovascolari sono da dieci a cento volte più elevate nella popolazione uremica rispetto a quella generale (1), e questo fenomeno non trova adeguata spiegazione nella prevalenza dei fattori di rischio convenzionali (fumo, diabete, dislipidemia, ipertensione, età, ecc.).

È stato chiaramente dimostrato il ruolo preminente svolto da agenti aterogeni di recente caratterizzazione come lo stress ossidativo e l'iperomocisteinemia (2).

L'azione aterogena dell'omocisteina deriva dall'interferenza con molte condizioni fisiologiche, come l'attivazione della cascata emocoagulativa, l'inibizione della fibrinolisi, il danneggiamento della funzione endoteliale, l'ossidazione lipoproteica (3).



Numerosi studi confermano che nella quasi totalità dei pazienti uremici vengono osservati valori plasmatici di omocisteina totale (tHcy) particolarmente elevati, non costantemente corretti dalla terapia medica con folati e vitamina B₁₂ e dalla terapia sostitutiva (4).

Infatti, nella maggioranza dei pazienti trattati, non avviene la normalizzazione dei livelli di tHcy; semmai vengono osservati casi di resistenza alla supplementazione vitaminica soprattutto nei pazienti con mutazione genotipica dell'enzima MTHFR (5). Mentre è ben definita in letteratura l'azione dei folati sulla tHcy, non è ancora stata definita l'azione terapeutica della vitamina B12 assunta singolarmente, nei pazienti con concentrazioni sieriche normali di tale vitamina (6).

La procedura dialitica utilizzata è un altro fattore in grado di influenzare i livelli plasmatici di Hcy.

Le metodiche diffusive *standard* inducono una perdita ridotta di tossine uremiche e micronutrienti compresi nel *range* delle medie molecole, mentre le metodiche convettive ad alta efficienza inducono una maggiore perdita di sostanze con elevato peso molecolare, compresi elementi nutrizionali come aminoacidi, lipidi complessi, vitamina B₁₂, ecc. (7, 8).

Scopo del presente studio è stato verificare in una popolazione di pazienti emodializzati l'efficacia della supplementazione alternata di acido folico e vitamina B₁₂ nell'abbassare le concentrazioni plasmatiche di Hcy e correlare i livelli di Hcy con il genotipo per l'MTHFR. Inoltre è stato valutato l'impatto delle metodiche dialitiche diffusive e convettive sui livelli sierici dei folati e della vitamina B₁₂.

Pazienti e Metodi

Sono stati arruolati nello studio 74 pazienti non selezionati, 44 uomini e 30 donne, in trattamento dialitico presso i Centri dialisi del Policlinico Tor Vergata di Roma e l'Ospedale Umberto I di Frosinone. L'età media degli uomini era di 69 anni (*range* 40-84 anni) e di 73 anni delle donne (*range* 21-92 anni); l'età dialitica media era di 59 mesi (*range* 6-204).

I pazienti erano in trattamento dialitico da almeno 3 mesi, con frequenza trisettimanale per la durata di 4 ore. La patologia renale di base comprendeva: glomerulonefrite cronica (pz n. 9 = 12%), nefrite interstiziale e pielonefrite (pz n. 6 = 8%), rene policistico (pz n. 9 = 12%), nefropatia diabetica (pz n. 11 = 15%), nefroangiosclerosi (pz n. 18 = 24.5%), patologie di incerta diagnosi (pz n. 21 = 28.5%). Per quanto concerne le procedure dialitiche 57 pazienti (77%) venivano trattati con l'emodialisi *standard* mentre 17 (23%) con l'emodiafiltrazione (di questi 7 pz con Biofiltrazione acetato-free [AFB] e 10 pz con HFR-*on-line*).

L'efficacia del trattamento dialitico veniva valutata mediante il Kt/V; il valore medio era 1.25 (*range* 1.18 - 1.35).

I pazienti sono stati quindi suddivisi in due gruppi di 37 soggetti, ciascuno in modo casuale.

Poiché le concentrazioni di omocisteina correlano con il genotipo dell'MTHFR, abbiamo suddiviso i pazienti di ciascun gruppo in 3 sottogruppi, in base al rispettivo genotipo: CC o *wild-type*, CT o eterozigoti e TT o omozigoti mutati.

Il protocollo dello studio era basato sulle seguenti fasi:

- Il primo gruppo è stato trattato nei primi 2 mesi con vitamina B₁₂, 1250 µg la settimana endovena, e nei successivi 2 mesi con acido folico (calcio levofolinato pentaidrato: *Lederfolin*), 25 mg la settimana in bolo endovena a fine dialisi.

- Il secondo gruppo è stato trattato con folati nei primi 2 mesi e con vitamina B₁₂ nei successivi 2 mesi, col medesimo dosaggio.

- Al termine dei primi 4 mesi dello studio veniva sospesa la supplementazione vitaminica in entrambi i gruppi per 2 mesi.

- La concentrazione della tHcy è stata misurata prima della seduta dialitica, all'inizio dello studio (T0), dopo i primi 2 mesi di supplementazione (T1), al termine dei successivi 2 mesi di supplementazione (T2), e dopo i 2 mesi di *wash out* (T3).

- I valori plasmatici della tHcy all'inizio dello studio (T0) ed al termine delle successive fasi (T1-T2-T3) sono stati correlati ai genotipi MTHFR.

- I livelli sierici dei folati e della vitamina B₁₂ sono stati misurati rispettivamente al tempo T0 ed al termine dello studio T3.

Per la determinazione del genotipo MTHFR di ciascun paziente è stato prelevato un campione di sangue periferico con provetta contenente K₃EDTA.

La caratterizzazione del genotipo C677T è stata eseguita su campioni di DNA, estratto da sangue intero, utilizzando l'estrattore *MagNA Pure LC* (Roche), mentre la successiva amplificazione tramite PCR (reazione a catena della polimerasi) è stata eseguita usando un *Thermal cycler Gene Amp-Pcr System 2400*. La successiva digestione enzimatica è stata eseguita seguendo il metodo di Frosst (9).

La misurazione dei folati e della B₁₂ è stata effettuata su siero, conservato al buio ed a -20 °C.

Il dosaggio della vitamina B₁₂ e dei folati è stato effettuato su un sistema automatizzato di chemiluminescenza "*Centaur*" (Bayer).

Per le determinazioni della omocisteina, i campioni di sangue erano raccolti in provette contenenti K₃EDTA, messi in ghiaccio ed immediatamente centrifugati e conservati a -20 °C.

I livelli di tHcy sono stati determinati utilizzando un metodo automatico in HPLC che sfrutta la separazione su singola colonna in fase inversa e la determinazione in fluorescenza (10).

L'indagine statistica è stata eseguita mediante TEST ANOVA non parametrici (Dunnnett).

Il valore di $p < 0.05$ era considerato statisticamente significativo.

Risultati

La frequenza genotipica ottenuta è stata la seguente: 37% CC, 34% CT e 29% TT (Tab. I).

All'inizio dello studio (T0) i valori medi dei livelli di omocisteina plasmatica nei tre genotipi erano: 66.7 $\mu\text{mol/L}$ (CC), 109.8 $\mu\text{mol/L}$ (CT) e 303.4 $\mu\text{mol/L}$ (TT).

Nel corso della supplementazione vitaminica le concentrazioni di tHcy diminuivano in entrambi i gruppi, e la diminuzione era genotipo-dipendente come riportato nella Figura 1 (A e B).

Nei pazienti con genotipo TT la riduzione dei livelli di Hcy era più accentuata, in particolare nel secondo gruppo che aveva iniziato la supplementazione con i folati:

- CC da 71.2 $\mu\text{mol/L}$ (T0) a 29 $\mu\text{mol/L}$ (T2);
- CT da 133.5 $\mu\text{mol/L}$ (T0) a 40 $\mu\text{mol/L}$ (T2);
- TT da 296.8 $\mu\text{mol/L}$ (T0) a 84.5 $\mu\text{mol/L}$ (T2).

Al termine del periodo di *wash out* (T3) i valori della tHcy aumentavano rispetto a quelli iniziali (T0) ad eccezione dei pazienti con genotipo CC del primo gruppo, nel quale i valori finali risultavano diminuiti rispetto a quelli iniziali.

Nella Tabella II sono riportati i valori di tHcy, folati e vitamina B₁₂ nei vari tempi dello studio, in relazione alla metodica dialitica utilizzata.

Discussione

Numerosi studi indicano che la supplementazione vitaminica con acido folico e vitamina B₁₂ è attualmente la terapia più utilizzata per correggere l'iperomocisteinemia nei pazienti uremici (11, 12). Come supplementazione vitaminica per i folati, abbiamo utilizzato il calcio levofolinato, in quanto il metiltetraidrofolato bypassa il blocco metabolico nei soggetti con polimorfismo per l'enzima MTHFR. Födinger et al. hanno dimostrato una correlazione diretta tra il genotipo dell'MTHFR ed i livelli di tHcy (5). L'aumento dei valori di tHcy correla infatti con l'entità

TABELLA I - FREQUENZA DEI TRE GENOTIPI (CC, CT E TT) DELL'ENZIMA MTHFR E VALORI BASALI DI OMOCISTEINA RISPETTO AL GENOTIPO NEI PAZIENTI STUDIATI

	GENOTIPO		
	CC	CT	TT
Frequenza	37%	34%	29%
tHcy (T0)	66.7 $\mu\text{mol/L}$	109 $\mu\text{mol/L}$	303.4 $\mu\text{mol/L}$

della riduzione di attività dell'enzima MTHFR, che risulta essere normale nei genotipi CC (*wild-type*), ridotta del 30% negli eterozigoti CT e del 60% negli omozigoti mutati TT.

In relazione alla verifica dell'effetto terapeutico attribuibile alla sola somministrazione di folati, della sola vitamina B₁₂ o di entrambe le vitamine, i nostri risultati confermano i dati della letteratura circa il ruolo primario dei folati ed il contributo secondario della vitamina B₁₂. Infatti, come riportato nella Figura 1 (A e B), la riduzione della tHcy nei pazienti con genotipo CC del primo gruppo (trattato inizialmente con vitamina B₁₂) non è risultata statisticamente significativa nel corso di entrambe le fasi della supplementazione. Invece i pazienti col medesimo genotipo CC del secondo gruppo (trattato inizialmente con i folati) mostrano una risposta significativa al trattamento con vitamina B₁₂.

Per la decisiva interferenza del polimorfismo MTHFR, sia gli eterozigoti (CT) che gli omozigoti mutati (TT) del primo gruppo mostrano una risposta significativa solo al trattamento con folati (T2). I medesimi genotipi del secondo gruppo presentano invece una risposta significativa sia al trattamento con folati (T1) sia alla supplementazione con vitamina B₁₂ (T2), se confrontati con i valori basali. È pertanto evidente che nel corso della supplementazione alternata, la vitamina B₁₂ è risultata efficace solo nella fase di supplementazione successiva ai folati.

Per quanto concerne l'influenza della dialisi, tutte le tecniche utilizzate nel nostro studio riducono i livelli di tHcy nel corso della supplementazione vitaminica, senza differenze significative tra le metodiche convettive e diffusive.

TABELLA II - DISTRIBUZIONE DEI VALORI DI OMOCISTEINA, FOLATI E VITAMINA B₁₂ NEI VARI TEMPI DELLO STUDIO IN RELAZIONE ALLE DIVERSE METODICHE DIALITICHE UTILIZZATE

Tecniche Dialitiche	Omocisteina			Acido Folico		Vitamina B ₁₂	
	T0	T2	T3	Start	End	Start	End
HDS	183 ± 147	48.2 ± 38.8	210 ± 175	15 ± 30	4.14 ± 3.29	518 ± 247	1042 ± 853
AFB	78 ± 52	48.2 ± 38.8	210 ± 175	15 ± 30	4.14 ± 3.29	518 ± 247	1042 ± 853
HFR <i>on-line</i>	424 ± 235	134 ± 77	399 ± 225	4.3 ± 0.94	5.57 ± 2.58	491 ± 120	819 ± 310

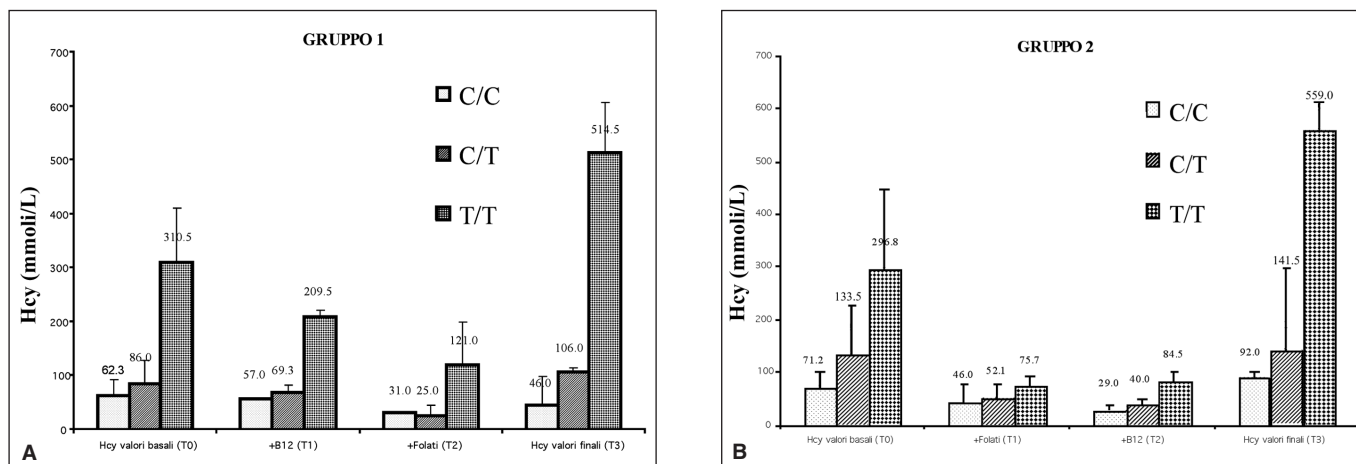


Fig. 1 - Andamento della mediana dei valori di omocisteina nelle varie fasi dello studio, nei 3 diversi genotipi e rispettiva significatività statistica. A: Gruppo 1; B: Gruppo 2

Dopo il *wash out* di entrambe le vitamine, i livelli di tHcy aumentano nuovamente in tutti i pazienti, a prescindere dalla tecnica dialitica utilizzata.

Circa la perdita nel dialisato di micronutrienti, nei pazienti trattati con l'emodialisi diffusiva condotta con membrane cellulose, la concentrazione sierica di acido folico risulta alla fine dello studio significativamente ridotta rispetto ai valori iniziali, nel contempo la concentrazione di vitamina B₁₂ aumenta significativamente. Questa differenza dei livelli ematici può essere messa in relazione alla diversa struttura molecolare delle due vitamine. Infatti, l'acido folico è una piccola molecola (PM 511.5 D) che diffonde facilmente attraverso la membrana dialitica, ed ha una capacità di accumulo nell'organismo minore rispetto a quella della vitamina B₁₂. Ciò potrebbe spiegare l'accelerata deplezione dei folati che si osserva dopo la sospensione terapeutica (T3) nonché l'effetto *rebound* dei livelli di tHcy osservato in particolare nei pazienti con polimorfismo MTHFR. Così le maggiori dimensioni della molecola della vitamina B₁₂ (PM 1355 D) ne condizionano una minore perdita attraverso le membrane cellulose e quindi l'aumento significativo della sua concentrazione ematica nella rilevazione finale dello studio.

Questo apparente paradosso dell'impatto della metodica di dialisi diffusiva sulla perdita dei folati rispetto alle metodiche convettive, ritenute più efficienti nella rimozione di soluti di piccolo e medio peso molecolare, può essere spiegata dallo studio di Dierkes et al. (13).

Secondo questi Autori la supplementazione con vitamina B₁₂ agirebbe non solo sui livelli plasmatici di tHcy e di acido metilmalonico, ma anche sulle concentrazioni sieriche dei folati che subiscono una riduzione. La supplementazione di vitamina B₁₂ induce, infatti, un aumento dell'attività dell'enzima metionina-sintasi, agendo da suo cofattore nella reazione di rimetilazione dell'Hcy a metionina. Conseguentemente aumenta la richiesta intracellula-

re di 5-metilen-tetraidrofolato, in quanto agisce da donatore di gruppi metilici. Questa richiesta viene soddisfatta utilizzando il 5-metilen-tetraidrofolato sierico, che rappresenta la forma predominante dei folati sierici ("Trappola dei folati").

Dal momento che nei nostri pazienti trattati con emodialisi diffusiva, la concentrazione di vitamina B₁₂ dopo il *wash out* risulta al di sopra dei valori normali (*range* 240-900 pg/mL) sarebbe pertanto ipotizzabile un'azione diretta della vitamina B₁₂ sulla riduzione dei folati sierici.

Lasseur et al. ritengono che l'iperomocistemia può essere efficacemente trattata con le metodiche convettive associate alla supplementazione con i folati (14). In un nostro precedente studio è stato invece dimostrato che la tecnica HFR *on-line* (emodiafiltrazione con doppia camera e reinfusione dell'ultrafiltrato rigenerato) può ridurre i livelli plasmatici dell'omocisteina mediante la rimozione delle tossine uremiche e l'adsorbimento di Hcy all'interno della cartuccia, operata dal carbone e dalla resina (7, 8).

Le concentrazioni di tHcy al termine della supplementazione alternata risultano pressoché invariate nei pazienti trattati con metodiche convettive e lievemente aumentate nei pazienti in emodialisi diffusiva, ma senza alcuna significatività statistica. Tale differenza può essere attribuita ai diversi tempi di osservazione (pre e post dialisi nei precedenti lavori, solo in pre dialisi nell'attuale osservazione).

Conclusioni

Il nostro studio conferma la correlazione tra il genotipo MTHFR ed i valori di omocisteina. Inoltre è stato evidenziato un effetto *rebound* dei livelli di omocisteina dopo la sospensione dei folati e della vitamina B₁₂ e tale incremento risulta condizionato dal genotipo dell'enzima MTHFR. Viene inoltre dimostrata la necessità prioritaria della sup-

plementazione a base di folati ed il contributo secondario della vit. B₁₂ in particolare nei pazienti in emodialisi *standard* rispetto a quelli trattati con metodiche convettive.

Riassunto

Premesse. Il trattamento con acido folico e vitamina B₁₂ sembra essere efficace nel ridurre la concentrazione totale dell'omocisteina plasmatica (tHcy), tuttavia non è noto l'effetto indotto dalla sola vitamina B₁₂ sui livelli di tHcy in pazienti aventi una normale concentrazione sierica della vitamina. Scopo dello studio è stato verificare l'efficacia della supplementazione alternata di acido folico e vitamina B₁₂ nella iperomocisteinemia dei pazienti emodializzati e di correlare le variazioni della concentrazione dell'omocisteina plasmatica totale con il genotipo dell'enzima metilente-traidrofolato-reduttasi (MTHFR).

Metodi. 74 pazienti emodializzati, 44 uomini e 30 donne, sono stati suddivisi in 2 gruppi di 37 soggetti ciascuno. Il 1° gruppo è stato supplementato nei primi due mesi con vitamina B₁₂ e nei due mesi successivi con acido folico, il 2° gruppo è stato supplementato inizialmente con acido folico e successivamente con vitamina B₁₂. Al termine della seconda supplementazione vitaminica, in entrambi i gruppi è stato interrotto il trattamento per due mesi. I livelli di tHcy sono stati misurati all'inizio del trattamento (T0), dopo due mesi (T1), dopo quattro mesi (T2) ed alla fine del

periodo di *wash-out* (T3). Il dosaggio della vitamina B₁₂ e dei folati è stato effettuato all'inizio ed alla fine dello studio (T0 e T3).

Risultati. La frequenza dei genotipi era: CC 37%, CT 34%, TT 29%. I livelli di omocisteina si riducevano nei due gruppi a seguito della supplementazione vitaminica alternata. Questa diminuzione era maggiore per il genotipo TT ($p < 0.05$) ed era più significativa quando il trattamento iniziava con la somministrazione di acido folico ($p < 0.01$). Tuttavia dopo il *wash out* i valori di tHcy tornavano ad aumentare senza differenze significative tra le tecniche dialitiche diffusive o convettive. Nei pazienti in emodialisi diffusiva i folati risultavano ridotti al termine dello studio rispetto ai valori iniziali, mentre i valori di vitamina B₁₂ risultavano aumentati.

Conclusioni. La supplementazione vitaminica alternata dimostra l'importanza della terapia a base di folati ed il secondario contributo della vitamina B₁₂ nel diminuire i livelli di tHcy nei pazienti in emodialisi.

Indirizzo degli Autori
Dr. Sandro De Angelis
Policlinico Universitario "Tor Vergata"
Viale Oxford, 81
00133 Roma
e-mail: annalisa.noce@fastwebnet.it

Bibliografia

1. Campo A, Goia F, Cottino R, Musso M, Viglino G. Omocisteina, terapia con folati e prognosi in emodialisi: domande e risposte da uno studio prospettico monocentrico. *GIN* 2003; 5: 484-9.
2. Foley RN, Parfery PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl.): S112-9.
3. Perna AF, Ingrosso D, Lombardi C, et al. Possible mechanisms of homocysteine toxicity. *Kidney Int* 2003; 63 (Suppl. 84): S137-40.
4. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: Prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney International* 1997; 52: 10-20.
5. Föding M, Mannhalter C, Wöfl G, et al. Mutation (677 C to T) in the methylenetetrahydrofolate reductase gene aggravates hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney International* 1997; 52: 517-23.
6. Manns B, Hyndeman E, Burgess E, et al. Oral Vitamin B12 and high-dose folic acid in hemodialysis patients with hyperhomocyst(e)inemia. *Kidney International* 2001; 59: 1103-9.
7. Splendiani G, De Angelis S, Tullio T, et al. Selective adsorption of homocysteine using an HFR-ON LINE technique. *Artificial Organs* 2004; 28 (6): 592-5.
8. De Angelis S, Tullio T, Ferranini M, et al. Estrazione di omocisteina in corso di HFR on-line. *G Ital Nefrol* 2004; (Suppl. 30): S106-10.
9. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
10. Pastore A, Massoud R, Motti C, et al. Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopyruvonylglycine in plasma and urine. *Clin Chem* 1998; 44 (4): 825-32.
11. Bostom AG, Shemin D, Bagley P, et al. Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 2000; 101: 2829-32.
12. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, et al. High dose B vitamin treatment of hyperomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-52.
13. Dierkes J, Domrose U, Ambrosch A, Scneede J, Guttormsen AB, Neumann KH. 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.
14. Lasseur C, Parrot F, Delmas Y, et al. Impact of high-flux/high-efficiency dialysis on folate and homocysteine metabolism. *J Nephrol* 2001; 14: 32-5.