

Fattori di rischio delle malattie cardiovascolari: esiste ancora un ruolo per l'omocisteina?

Maria Grazia Bendini¹, Gaetano Antonio Lanza², Andrea Mazza¹, Andrea Giordano³, Massimo Leggio⁴, Giulio Menichini⁵, Raffaele De Cristofaro¹, Emanuela Moriconi⁵, Laura Cozzari¹, Sergio Maria Farina¹, Giampiero Giordano¹

¹U.O. di Cardiologia, Ospedale S. Maria della Stella, Orvieto (TR), ²Istituto di Cardiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, ³U.O. di Nefrologia, Ospedale S. Maria della Stella, Orvieto (TR), ⁴U.O. di Riabilitazione Cardiovascolare, Ospedale San Filippo Neri, Roma, ⁵Medicina e Chirurgia d'Accettazione e Urgenza, Ospedale S. Maria della Stella, Orvieto (TR)

Key words:
Atherosclerosis;
Cardiovascular diseases;
Homocysteine;
Vitamins.

Cardiovascular diseases are commonly related to classical risk factors, but other risk markers have been identified, including homocysteine. Homocysteine is a sulphurated amino acid which derives from methionine.

The causes of hyperhomocysteinemia are multifactorial, such as genetic defects, pathophysiological conditions, lifestyle and drugs-related. Hyperhomocysteinemia favors atherothrombosis through endothelial dysfunction, enhancement of inflammation and thrombophilic profile.

A number of clinical and laboratory trials exist regarding the association between homocysteine levels and an increased risk of cardiovascular disease. However, the lack of homogeneity in the data, together with the high number of factors capable of influencing homocysteine plasma levels, and the disappointing results of therapeutic trials do not permit us at present to consider homocysteine as an independent and major risk factor for cardiovascular disease.

(G Ital Cardiol 2007; 8 (3): 148-160)

© 2007 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 24 febbraio 2006; nuova stesura l'8 gennaio 2007; accettato il 9 gennaio 2007.

Per la corrispondenza:

Dr.ssa Maria Grazia Bendini

Via Teverina 22,
01020 Celleno (VT)

E-mail:
bendini.mg@tiscalinet.it

Introduzione

I primi concetti sull'origine dell'aterosclerosi risalgono agli inizi del XIX secolo, quando Rokitansky e Virchow descrivono la trombosi murale, il danno infiammatorio all'interno dell'arteria, l'aumento della permeabilità dell'intima al plasma, la degenerazione mucoide della parete arteriosa, la deposizione dei lipidi del plasma nelle placche, la fibrosi e la calcificazione delle placche. Nel 1908 gli studi di Ignatowski attribuiscono l'aterosclerosi ad una "intossicazione da proteine", e negli anni successivi furono fatti anche tentativi per identificare l'aminoacido, o gli aminoacidi, in grado di favorire la formazione di placche aterosclerotiche¹.

A distanza di quasi un secolo, alcune osservazioni cliniche ed epidemiologiche hanno posto nuovamente l'attenzione sulla possibilità che un aminoacido, l'omocisteina, allora sconosciuta, possa svolgere un ruolo nei processi di aterosclerosi e contribuire a spiegare quel 20% circa di malattie vascolari aterosclerotiche in pazienti che non presentano nessuno dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolare noti (familiarietà, diabete, fumo, ipertensione, ecc.)².

Dall'omocistinuria alla cardiopatia ischemica

L'aminoacido solforato omocisteina viene descritto per la prima volta da Butz e du Vigneaud³ nel 1932. Le prime osservazioni riguardo ai possibili effetti negativi dell'omocisteina sul sistema cardiovascolare risalgono agli anni '60, quando si scopre una nuova malattia genetica, l'omocistinuria, che è tipicamente caratterizzata da alta statura, anomalie delle ossa lunghe, dislocazione del cristallino, carnagione vermiglia e lieve ritardo mentale, ma soprattutto da un elevato rischio di morte cardiovascolare prematura (il 50% dei pazienti moriva prima dei 30 anni). L'omocistinuria si verifica per un deficit di un enzima del metabolismo dell'omocisteina, la cistationina β -sintetasi (CBS), che ne compromette la transulfurazione e l'eliminazione, aumentando di conseguenza la concentrazione ematica dell'aminoacido fino a 20 volte il valore normale⁴.

Alla fine degli anni '60 McCully⁵ ipotizza che livelli ematici anche solo moderatamente aumentati di omocisteina potevano facilitare lo sviluppo dell'aterosclerosi, e Wilcken e Wilcken⁶ nel 1976 riportarono come pazienti con malattia coronarica dimostrata an-

geograficamente presentavano concentrazioni ematiche di omocisteina maggiori rispetto a soggetti di controllo sani. Si apre così la strada a tutta una serie di lavori sul possibile ruolo dell'omocisteina come fattore di rischio cardiovascolare in generale e coronarico in particolare.

Un ulteriore impulso allo studio dell'iperomocisteinemia è successivamente venuto dall'evidenza che una mutazione del gene che codifica un altro enzima coinvolto nel metabolismo dell'omocisteina, la metilentetraidrofolato riduttasi (MTHFR), è relativamente comune nella popolazione generale, con una prevalenza popolazione dipendente, che varia dall'1% nelle popolazioni di colore africane e del nord America, fino a percentuali del 20% o anche di più tra gli italiani e gli ispanici del nord America^{7,8}, suggerendo così un potenziale impatto clinico significativo dell'iperomocisteinemia. Questa mutazione consiste nella sostituzione della citosina con la timina in posizione 677 del gene (C677T) e produce una variabile termolabile dell'enzima⁹ che ha un'attività ridotta di circa il 20% rispetto all'enzima normale e conseguente incremento lieve-moderato dell'omocisteinemia¹⁰. Inoltre, un dato risultò subito interessante: gli elevati valori di omocisteina associati a questa mutazione sono influenzati significativamente dall'assunzione di folati nella dieta, evidenziando così da una parte la notevole variabilità delle concentrazioni ematiche di omocisteina nei soggetti portatori della mutazione e dall'altra la possibilità di intervenire con la dieta per ridurre i livelli ematici di questa sostanza.

Biochimica dell'omocisteina e aspetti tecnici della misurazione

L'omocisteina è un aminoacido solforato (con un gruppo solforato libero) che si forma durante il ciclo della

metionina. La metionina è un aminoacido essenziale di cui sono ricche le proteine di origine animale, una volta che è stata introdotta con la dieta, è convertita dalla metionina adenosiltransferasi ad S-adenosilmetionina, che è il maggiore donatore di gruppi metilici richiesti nelle reazioni di transmetilazione, che portano alla formazione di proteine, acidi nucleici, creatinina, fosfolipidi e neurotrasmettitori^{11,12}. Queste reazioni sono catalizzate da svariate metiltransferasi che demetilano S-adenosilmetionina ad S-adenosil omocisteina, che poi viene idrolizzata ad omocisteina ed adenosina, dall'enzima S-adenosilomocisteina idrolasi.

L'omocisteina, una volta che si è formata, può seguire due vie metaboliche: una via di metilazione, attraverso la quale è riconvertita a metionina, e una via di transulfurazione, che porta alla formazione di cistationina e successiva eliminazione renale (Figure 1 e 2).

L'omocisteina è trasformata in metionina attraverso due differenti reazioni di metilazione. La prima richiede la presenza di metionina sintetasi, un enzima vitamina B₁₂-dipendente, che usa come donatori di metili il N⁵-metiltetraidrofolato (MTHF), la cui formazione dipende, a sua volta, dalla presenza di N⁵,N¹⁰-MTHFR; in questo processo è fondamentale anche l'azione della metionina sintetasi riduttasi (MTRR), che rigenera (mediante un processo riduttivo), la vitamina B₁₂, cofattore indispensabile per mantenere la metionina sintetasi in uno stato funzionale attivo.

Una via alternativa di rimetilazione utilizza la betaina come donatore di metili ed è mediata dall'enzima betaina-omocisteina metiltransferasi.

Nella via di transulfurazione l'omocisteina reagisce con la serina per formare cistationina, in una reazione irreversibile catalizzata dall'enzima CBS, che contiene il piridossal-5'-fosfato (vitamina B₆). La cistationina

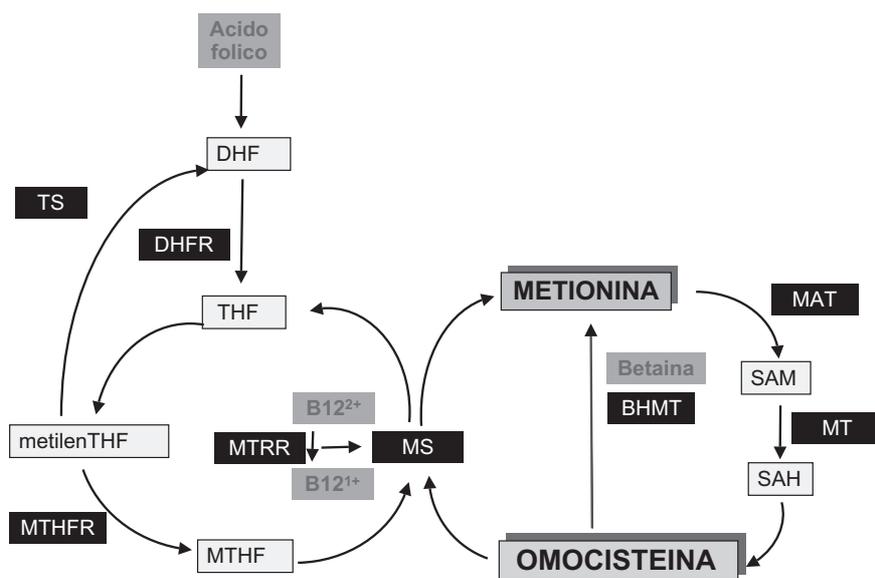


Figura 1. Ciclo dei folati e della metionina. BHMT = betaina-omocisteinametiltransferasi; DHF = diidrofolato; DHFR = diidrofolato-reduttasi; MAT = metionina adenosiltransferasi; MS = metionina sintetasi; MTHF = N⁵-metiltetraidrofolato; MTHFR = N⁵, N¹⁰-metilentetraidrofolato riduttasi; MT = metiltransferasi; MTRR = metionina sintetasi riduttasi; SAH = S-adenosilomocisteina; SAM = S-adenosilmetionina; THF = tetraidrofolato; TS = timidilato sintetasi.

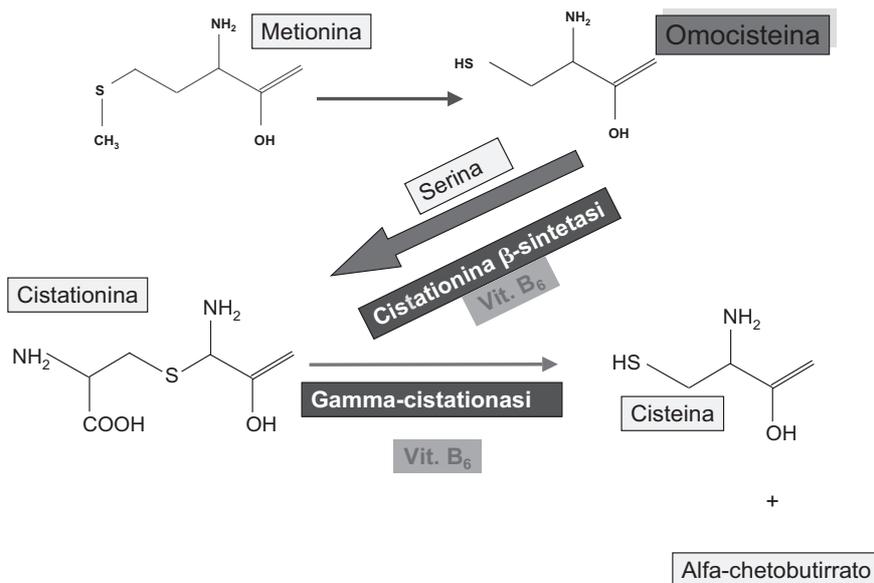


Figura 2. Via di transulfurazione dell'omocisteina.

viene idrolizzata da un secondo enzima contenente piridossal-5'-fosfato, la γ -cistationasi, per formare cisteina ed α -chetobutirrato; l'eccesso di cisteina viene poi ossidato a taurina e solfati organici o eliminato nelle urine¹³.

In condizioni normali c'è uno stretto bilancio tra formazione ed eliminazione di omocisteina e di solito circa il 50% è metilato a metionina; se le proteine o l'introduzione di metionina sono in eccesso, una maggiore quantità è catalizzata dalla via di transulfurazione. Se nelle cellule c'è una formazione di omocisteina superiore al suo consumo, essa viene rilasciata in circolo determinando così un aumento del livello di omocisteina nel plasma/siero o nelle urine.

L'omocisteina esiste in varie forme; è presente solo in tracce (circa l'1%) in forma ridotta, mentre la maggior parte è ossidata ed esiste in circolo in varie molecole disolfidi¹⁴. Il disulfide simmetrico dell'omocisteina, in particolare, è chiamato omocistina e il termine omocistinuria ne denota la presenza nelle urine. Il 70% circa dell'omocisteina, inoltre, è legato all'albumina (attraverso un legame disulfide), mentre il restante 30% è presente come disulfide libero, prevalentemente come disulfide misto omocisteina-cisteina¹⁵.

Il termine omocisteina totale indica l'insieme delle varie forme (libera, legata, ridotta e ossidata) che si trovano nel sangue¹¹. Le concentrazioni plasmatiche di omocisteina possono variare entro un ampio range, mentre quelle intracellulari sono di solito mantenute in un range ristretto¹⁶.

I livelli plasmatici di omocisteina possono variare significativamente in popolazioni diverse e anche in gruppi diversi di soggetti nella stessa popolazione, soprattutto in virtù di differenti abitudini alimentari. Così, in una popolazione che assume alimenti ricchi o arricchiti con acido folico, il limite superiore di riferimento, come va-

lore normale, è in genere del 20-25% più basso rispetto a quello di una popolazione che assume bassi livelli di acido folico¹⁷. In linea di massima, comunque, i livelli normali sono considerati tra 5 e 15 $\mu\text{mol/l}$ e l'iperomocisteinemia viene considerata lieve per valori tra 15 e 30 $\mu\text{mol/l}$, intermedia per valori tra 30 e 100 $\mu\text{mol/l}$ e grave per valori >100 $\mu\text{mol/l}$ ¹⁸.

Il valore di omocisteina totale nel sangue va misurato la mattina, a digiuno. In soggetti normali l'influenza dell'introduzione di cibo è, in effetti, limitata, ma un pasto ricco di proteine può aumentarne il livello del 10-15%, con un picco che viene raggiunto 6-8 h dopo il pasto¹⁹⁻²².

Una dose orale di metionina (100 mg/kg di metionina) può essere somministrata in persone con normali valori di omocisteina a digiuno nelle quali ci sia il sospetto di iperomocisteinemia. Questo test (test alla metionina) può svelare una forma latente di iperomocisteinemia ed è considerato positivo quando induce incrementi plasmatici dell'omocisteina di oltre 2 DS dalla media di soggetti normali di riferimento²³.

Cause di iperomocisteinemia

Le cause di iperomocisteinemia sono multifattoriali e vanno dai difetti genetici alle differenti abitudini di vita e nutrizionali. Esse, inoltre, variano in rapporto ad alcune condizioni fisiopatologiche e all'uso di alcuni farmaci.

L'iperomocisteinemia ha una differente prevalenza razziale²⁴, che solo in parte può essere spiegata dalle diverse abitudini nutrizionali. Infatti, essa spesso è legata a difetti genetici della trascrizione degli enzimi deputati al metabolismo dell'omocisteina. Per questo motivo le differenze quantitative e qualitative dell'attività degli

enzimi e delle molecole coinvolte nella regolazione del metabolismo dell'omocisteina sono state oggetto di grande attenzione^{25,26}, e lo sono tuttora, nonostante siano state al momento identificate almeno 70 varianti di geni codificanti proteine coinvolte nel ciclo della metionina. La Tabella 1 elenca una parte di questi enzimi con la loro funzione e localizzazione cromosomica, mentre la Tabella 2 ne mostra i tipi di polimorfismo genetico.

Il più studiato di questi è stato il polimorfismo genetico dell'MTHFR. Insieme al polimorfismo C677T anche quelli A1298C e il G1793A di questo enzima sono stati associati ad un incremento di omocisteina. Per quanto riguarda, invece la CBS le mutazioni genetiche che portano ad iperomocisteina comprendono i polimorfismi G919A e T833C, mentre l'inserzione di 68 bp nel gene della CBS produce un minor incremento dei livelli di omocisteina dopo carico di metionina²⁷. La variazione A2756G della metiotina sintetasi si associa a ridotti livelli plasmatici di omocisteina a digiuno²⁸.

L'iperomocisteinemia ha anche, comunque, numerose altre cause oltre a quelle genetiche (Tabella 3), potendo essere legata soprattutto a carenze di natura nutrizionali di qualcuno dei cofattori che intervengono nel metabolismo dell'omocisteina, come l'acido folico, la vitamina B₆, la vitamina B₁₂ e la betaina. Va poi tenuto presente che l'omocisteina aumenta con l'età, in entrambi i sessi e che i soggetti di sesso maschile presentano concentrazioni ematiche di omocisteina superiori rispetto a quelle delle donne, nelle quali, peraltro, si osserva un incremento dell'omocisteinemia dopo la menopausa.

Tabella 3. Cause di iperomocisteinemia.

Cause genetiche
Carenze nutrizionali
Folato
Vitamina B ₁₂
Vitamina B ₆
Patologie
Insufficienza renale
Ipotiroidismo
Anemia perniciosa
Neoplasie (LLA, ovaio, mammella, pancreas)
Psoriasi grave
Malattie infiammatorie intestino
Trapianto di organo
Farmaci
Antagonisti di folati (fenitoina, metotrexate, carbamazepina)
Antagonisti di vitamina B ₁₂ (teofillina, estrogeni)
Altro
Sesso maschile
Età
Menopausa
Fumo
Caffè
Alcol
Dieta vegetariana
Vita sedentaria

LLA = leucemia linfatica acuta.

La gravidanza è accompagnata da una riduzione dei livelli plasmatici di omocisteina²⁹, che risultano tuttavia aumentati in caso di gravidanze complicate da aborto spontaneo o nel distacco di placenta^{30,31}. Anche diverse abitudini possono aumentare i livelli ematici di omocisteina, tra cui il fumo di sigaretta, un alto consumo di caffeina e una vita sedentaria³²⁻³⁴.

Tabella 1. Principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina, loro funzione e localizzazione cromosomica.

Enzima	Funzione	Localizzazione cromosomica
Metilentetraidrofolato reductasi	Converte il 5,10 metilen-tetraidrofolato a 5-metil tetraidrofolato	1p36
Cistationina beta-sintetasi	Condensa l'omocisteina e la serina per formare cistationina	21q22
Metionina sintetasi	Rimetila l'omocisteina a metionina	1q43
Metionina sintetasi reductasi	Rigenera mediante un processo di riduzione la vitamina B ₁₂ , richiesta per mantenere la metionina sintetasi in uno stato funzionale	5p15
Metionina adenosiltransferasi IA	Converte la metionina a S-adenosilmetionina	10q22

Tabella 2. Polimorfismo dei geni dei principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina.

Enzima	Polimorfismo genetico	Livello di omocisteina
Metilentetraidrofolato reductasi	C677T	Aumentato
	A1298C	Aumentato
	G1793A	Aumentato (trovata un'associazione borderline in presenza di alte concentrazioni di folati)
Cistationina beta-sintetasi	G919A	Aumentato
	T833C	Aumentato
	848INS68	Ridotto
Metionina sintetasi	A2756G	Ridotto
Metionina sintetasi reductasi	A66G	Aumentato
Metionina adenosiltransferasi IA	G791A	Non varia, ma c'è una riduzione dell'attività dell'enzima

Un moderato uso di alcol si associa ad una riduzione dell'omocisteina, mentre un elevato consumo cronico si associa ad iperomocisteinemia³⁵⁻³⁷, verosimilmente per una compromissione dell'assunzione di folati e di vitamina B₆³⁷⁻⁴⁰.

Infine, diverse condizioni patologiche e diversi farmaci sono in grado di influenzare i livelli ematici di omocisteina, che aumentano, ad esempio, nell'insufficienza renale avanzata dove possono raggiungere valori pari a 2-3 volte i limiti superiori abituali^{41,42}, in diversi tipi di neoplasie maligne⁴³, nell'ipotiroidismo⁴⁴ e nelle malattie infiammatorie dell'intestino^{45,46}.

Numerosi farmaci, inoltre, possono incrementare il livello di omocisteina, compromettendo l'assorbimento e/o la corretta utilizzazione di acido folico, vitamina B₆ e vitamina B₁₂. Tra i più importanti vanno ricordati il metotrexato, la carbamazepina⁴⁷, i nitrati⁴⁸, la metformina⁴⁹, la colestiramina⁵⁰, la niacina e la teofillina^{51,52}. L-dopa viene metilata dall'adenosilmetionina e quindi può aumentare i livelli di produzione di omocisteina^{53,54}. Molte terapie ormonali possono influenzare il livello di omocisteina; nelle donne la somministrazione di ormoni androgeni⁵⁵ incrementa il livello di omocisteina, mentre una terapia ormonale sostitutiva⁵⁶⁻⁵⁸, l'uso di contraccettivi orali⁵⁹⁻⁶¹ e del tamoxifene^{62,63} li riduce. Negli uomini la somministrazione di estrogeni e antiandrogeni riduce i livelli di omocisteina⁵⁵.

Anche la penicillamina^{64,65} e l'acetilcisteina sembrano ridurre i livelli di omocisteinemia, probabilmente aumentando la clearance renale⁶⁶.

Effetti cardiovascolari dell'omocisteina

Sono diversi i meccanismi attraverso cui l'omocisteina può causare danni nel sistema cardiovascolare e favorire l'aterogenesi e le sue complicanze (Figura 3).

Studi eseguiti da Jakubowski et al.^{67,68} suggeriscono che gli effetti sfavorevoli dell'omocisteina possono essere mediati da un suo metabolita, l'omocisteina tiolata. Questo composto è un tioestere ciclico con un gruppo carbossilico esterificato altamente reattivo con i gruppi ε-NH₂ dei residui lisinici delle proteine. La conseguente omocisteinilazione delle proteine ne cambia le proprietà fisiche e chimiche con compromissione delle loro caratteristiche strutturali e funzionali⁶⁹. Tra gli effetti vascolari negativi meglio documentati dell'iperomocisteinemia vi è l'alterazione della funzione endoteliale, che compromette le normali proprietà dell'endotelio vascolare che garantiscono l'integrità della parete vasale e regolano il tono vascolare, l'emostasi e l'infiammazione⁷⁰. Diversi studi, sia su modelli animali sia nell'uomo, hanno dimostrato come un aumento dell'omocisteina possa indurre una disfunzione dell'endotelio^{71,72} di grado simile a quella causata da altri noti fattori di rischio cardiovascolare, come l'ipercolesterolemia, il fumo e l'ipertensione⁷¹. La disfunzione endoteliale compromette, in primo luogo, la sua funzione vasodilatatrice mediata dalla produzione di ossido nitrico (NO)^{70,71}. Il meccanismo attraverso cui l'omocisteina inibisce la sintesi di NO da parte dell'endotelio non è ancora del tutto noto. Tuttavia, alcuni studi hanno riportato come l'iperomocisteinemia riduce l'espressione dell'isoforma endoteliale dell'NO sintetasi (eNOS, localizzata nell'endotelio, ma anche in piastrine e miocardiociti), aumenta l'espressione della caveolina-1 (una proteina della membrana plasmatica che lega e inattiva l'eNOS)^{72,73}, e riduce il trasportatore cationico di aminoacidi (CAT1), che rende disponibile l'arginina per la sintesi dell'NO da parte dell'eNOS⁷⁴. Altri studi, d'altro canto, hanno riportato un aumento ematico di dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno dell'eNOS, nei pazienti con iperomocisteinemia. L'incremento dell'ADMA può essere causato da un suo ri-

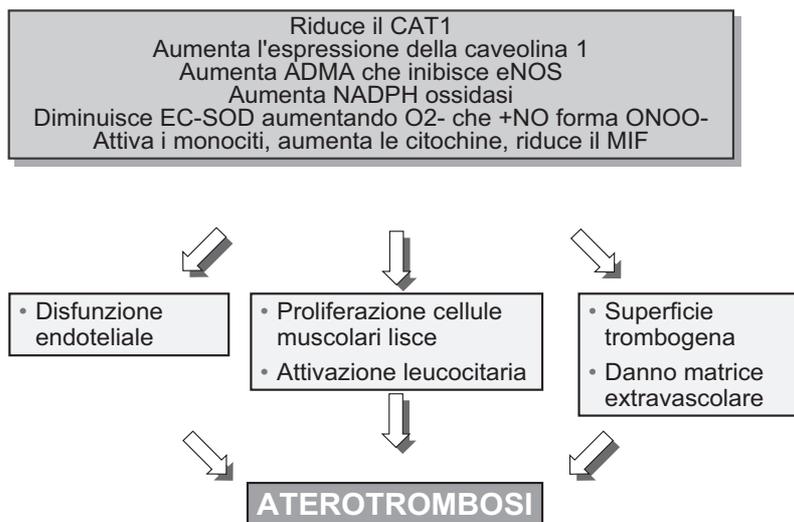


Figura 3. Meccanismi aterogenetici dell'omocisteina. ADMA = dimetilarginina asimmetrica; CAT1 = trasportatore di aminoacidi cationici, trasportatore dell'arginina substrato per l'eNOS; EC-SOD = superossido dismutasi extracellulare; eNOS = isoforma endoteliale della sintetasi dell'ossido nitrico; MIF = fattore inibente la migrazione dei macrofagi; NADPH = nicotinamide adenina dinucleotide fosfato.

dotto catabolismo da parte della dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH), che idrolizza l'ADMA a citrullina e metilamina^{75,76}.

L'iperomocisteinemia, inoltre, può causare una disfunzione endoteliale determinando un aumento dello stress ossidativo; il suo gruppo sulfidrilico, infatti, è facilmente ossidato a formare specie reattive dell'ossigeno, causando anche un aumento dei livelli ematici di anione superossido (O_2^-), sia attivando la nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ossidasi, sia inibendo l'espressione e la funzione di importanti enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi extracellulare^{77,78}. L' O_2^- reagisce con estrema facilità con l'NO formando perossinitrito, una molecola nitrogena fortemente reattiva e con una potente attività ossidante, che può compromettere ulteriormente la funzione endoteliale ossidando la tetraidrobiopterina, un'altra molecola importante per la produzione di NO⁷⁹.

L'incremento dell'omocisteina plasmatica, peraltro, non sembra alterare la risposta dilatatrice endotelio-indipendente a livello vascolare; infatti, la risposta vasodilatatrice al nitroprussiato e alla nitroglicerina sembra nella norma in soggetti con iperomocisteinemia, suggerendo che la sensibilità delle cellule muscolari vasali all'NO è sostanzialmente conservata⁸⁰.

Un altro effetto mediante il quale l'omocisteina può facilitare l'aterosclerosi e le sue complicanze è la promozione di fenomeni infiammatori, che negli ultimi anni hanno assunto un ruolo sempre più importante nella patogenesi dell'aterosclerosi⁸¹. L'omocisteina, infatti, favorisce l'attivazione di un fattore di trascrizione (il fattore nucleare κB), che aumenta l'espressione endoteliale della proteina chemiotattica per i monociti MCP-1⁸²⁻⁸⁴ e dell'interleuchina-8⁸². L'omocisteina, inoltre, sembra favorire la proliferazione dei monociti e la loro attivazione, determinando una maggiore produzione di citochine infiammatorie, e, a dosi maggiori, sembra ridurre anche l'espressione del fattore inibente la migrazione dei macrofagi⁸⁵.

L'omocisteina possiede, infine, anche un profilo trombofilico. Essa, infatti, facilita l'attivazione del fattore XII⁸⁶ e del fattore V⁸⁷ della coagulazione e deprime l'attivazione della proteina C⁸⁸; inibisce, inoltre, l'espressione della trombomodulina⁸⁹ e sopprime l'espressione dell'eparansolfato da parte dell'endotelio⁹⁰, mentre induce l'espressione di fattore tissutale⁹¹. Inoltre, sembrerebbe compromettere la fibrinolisi mediante una riduzione dell'attività dell'attivatore tissutale del plasminogeno e un incremento dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno⁹². Tutti questi effetti facilitano la formazione di trombina e determinano uno stato pro-trombotico.

Omocisteina e malattie cardiovascolari

Numerosi studi retrospettivi⁹³⁻¹⁰¹, alcuni dei quali sono riportati nella Figura 4, hanno riportato una correlazione tra incremento di omocisteina e malattie cardiovascolari.

Robinson et al.⁹⁶, confrontando 304 pazienti con patologia coronarica e 231 soggetti di controllo, hanno riscontrato che una concentrazione plasmatica di omocisteina pari a 14 $\mu\text{mol/l}$ si associava ad un rischio aumentato di patologia coronarica (rischio relativo [RR] 4.8; intervallo di confidenza [IC] 95% 2.6-8.9; $p < 0.001$), e che incrementi di omocisteinemia di 5 $\mu\text{mol/l}$ comportavano un maggior rischio di malattie cardiovascolari in genere (RR 2.4; IC 95% 1.7-3.5; $p < 0.001$).

Dati dello European Concerted Action Project⁹⁷, uno studio che comprendeva 99 centri in 9 paesi europei, in cui l'omocisteina è stata misurata in 750 pazienti con malattie vascolari aterosclerotiche (cardiache, cerebrali e periferiche) e 800 controlli, hanno evidenziato un rischio di malattie cardiovascolari, dopo aggiustamento per i fattori di rischio convenzionali, di 1.35 (IC 95% 1.2-1.69) negli uomini e di 1.42 (IC 95% 0.99-2.05) nelle donne per incrementi di 5 $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina a digiuno.

I risultati degli studi retrospettivi che hanno valutato la relazione tra omocisteinemia e malattie cardiovascolari, sono stati affiancati anche da numerosi studi prospettici¹⁰²⁻¹⁰⁴ (Figure 5 e 6).

Nel Physicians' Health Study¹⁰² è stato eseguito un prelievo di sangue in 14 916 medici di sesso maschile senza precedenti di infarto miocardico o ictus. Ad un follow-up di 5 anni è stata dosata l'omocisteina nei pa-

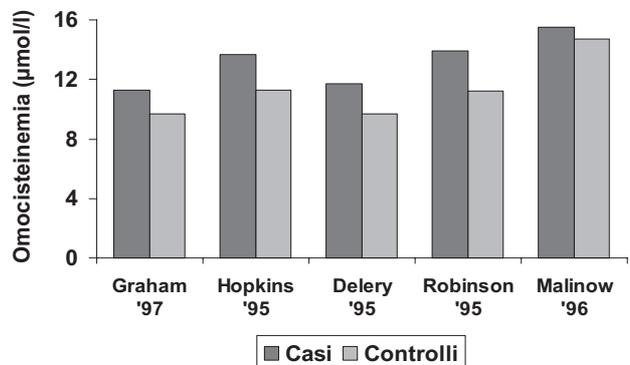


Figura 4. Correlazione omocisteina-malattie cardiovascolari (studi retrospettivi).

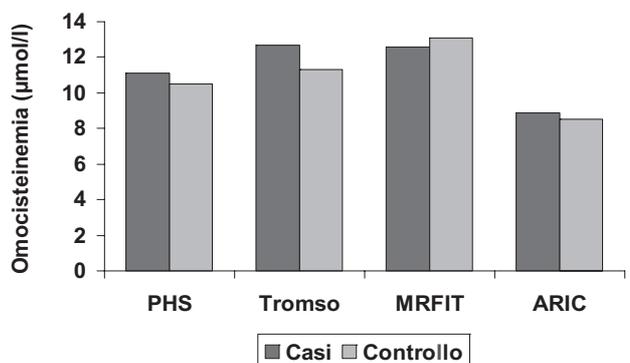


Figura 5. Studi prospettici su omocisteina e infarto miocardico acuto fatale/non fatale.

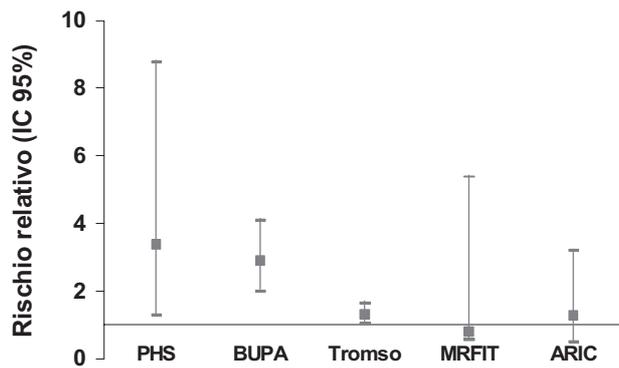


Figura 6. Studi prospettici su omocisteina e infarto miocardico acuto fatale/non fatale.

zienti colpiti da un infarto miocardico. Il livello di omocisteina era più elevato in questi pazienti rispetto ai controlli (11.4 ± 4.0 vs 10.5 ± 2.8 nmol/ml; $p = 0.03$), l'RR associato ai livelli più elevati di omocisteina era 3.4 (IC 95% 1.3-8.8; $p = 0.001$), indipendentemente dagli altri fattori di rischio coronarici.

Nell'Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study un'associazione tra valori elevati di omocisteina e malattie cardiovascolari (infarto miocardico, morte per cardiopatia ischemica e rivascolarizzazione miocardica) poteva essere dimostrata nelle donne (RR 2.53; IC 95% 0.9-7.5; $p = 0.04$), ma non negli uomini¹⁰⁶.

La metanalisi dell'Homocysteine Studies Collaboration¹⁰⁷, d'altro canto, ha preso in considerazione 12 studi prospettici e 18 retrospettivi, evidenziando come riduzioni del 25% dei livelli di omocisteinemia (corrispondenti a riduzioni di circa 3 $\mu\text{mol/l}$) erano associati ad una riduzione significativa del rischio di cardiopatia ischemica (RR 0.89; IC 95% 0.83-0.96).

La metanalisi di Wald et al.¹⁰⁸, che ha valutato in 16 studi prospettici l'iperomocisteinemia e il rischio cardiovascolare, per un totale di 3820 partecipanti, ha evidenziato come incrementi di 5 $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina si associavano ad un incremento del 32% di rischio di cardiopatia ischemica (RR 1.32; IC 95% 1.19-1.45) e del 59% del rischio di ictus (RR 1.59; IC 95% 1.29-1.96).

Dati contrastanti sono stati invece ottenuti dai lavori che hanno valutato l'associazione tra iperomocisteina e decorso clinico dopo angioplastica coronarica (PTCA). Nello studio di Schnyder et al.¹⁰⁹, in 205 pazienti sottoposti a PTCA di almeno un vaso coronarico, l'omocisteina era un fattore predittivo di restenosi a 6 mesi, specialmente quando si consideravano vasi di diametro <3 mm. Al contrario, in una recente metanalisi, De Luca et al.¹¹⁰ non sono stati in grado di dimostrare alcuna relazione tra livelli plasmatici di omocisteina e restenosi intrastent.

Studi genetici

Nella metanalisi di Brattstrom et al.¹⁰ sono stati combinati i risultati di 23 studi caso controllo (comprendenti

5869 pazienti con malattie cardiovascolari e 6644 soggetti di controllo) che avevano valutato il rischio di malattie cardiovascolari in relazione alle concentrazioni dell'omocisteina plasmatica e al genotipo dell'enzima MTHFR; la mutazione TT dell'MTHFR era associata ad una concentrazione di omocisteina superiore del 25% rispetto al genotipo CC, ma questa differenza non si accompagnava ad un incremento del rischio di eventi cardiovascolari.

Infatti, non c'era differenza tra pazienti e controlli nella frequenza degli alleli mutanti (T) (34.3 vs 33.8%) e del genotipo TT (11.9 vs 11.7%) e, inoltre, il rischio di malattie cardiovascolari associato al genotipo TT non era significativo (RR 1.12; IC 95% 0.92-1.37).

Viceversa, la metanalisi di Klerk et al.¹¹¹, che comprendeva 40 studi osservazionali, per un totale di 11 162 pazienti con cardiopatia ischemica documentata e 12 758 soggetti di controllo, ha evidenziato come il genotipo TT della MTHFR risultava associato ad un rischio di cardiopatia ischemica >16% (RR 1.16; IC 95% 1.05-1.28), rispetto al genotipo CC, sebbene si evidenziasse un'eterogeneità dei risultati, con dati che apparivano statisticamente significativi nei paesi europei (RR 1.14; IC 95% 1.01-1.28), ma non in quelli del nord America (RR 0.87; IC 95% 0.73-1.05).

Infine, una metanalisi di Wald et al.¹⁰⁸, di 72 studi genetici, dove la prevalenza della mutazione del gene per MTHFR è stata determinata in 16 849 persone e controlli, ha mostrato come l'incremento di 5 $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina ematica si associava ad un incremento del 42% del rischio di cardiopatia ischemica (RR 1.42; IC 95% 1.11-1.84) e ad un 65% del rischio di ictus (RR 1.65; IC 95% 0.66-4.13).

Interventi terapeutici

Gli studi hanno concordemente dimostrato che la somministrazione di folati o di terapia multivitaminica riduce significativamente i livelli di omocisteina¹¹²⁻¹¹⁵.

Si è cercato di valutare, quindi, se questo effetto si accompagnasse anche ad un miglioramento dell'accentuato profilo aterogeno associato all'iperomocisteinemia e, cosa più importante, ad una riduzione degli eventi cardiovascolari nel follow-up.

Studi fisiopatologici

Alcuni dati sugli effetti del trattamento vitaminico sulla funzione endoteliale hanno confermato la possibilità di ottenere benefici clinici dalla riduzione dell'omocisteina.

Dopo che studi sperimentali nell'animale avevano evidenziato, infatti, come il semplice trattamento dietetico o con preparati vitaminici dell'iperomocisteinemia si associava ad un miglioramento della funzione endoteliale¹¹⁷, risultati analoghi sono stati ottenuti anche nell'uomo.

Woo et al.¹¹⁸, ad esempio, hanno riportato, insieme alla riduzione dei livelli plasmatici di omocisteina (da 9.0 ± 1.7 a 7.9 ± 2.0 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0.001$) un significativo miglioramento della dilatazione flusso-mediata nell'arteria brachiale (da $7.4 \pm 2.0\%$ a $8.9 \pm 1.5\%$; $p < 0.0001$) in adulti sani con iperomocisteinemia, dopo somministrazione per 1 anno di alte dosi di acido folico (10 mg/die). Doshi et al.¹¹⁹ d'altro canto, in uno studio randomizzato e controllato con placebo, hanno mostrato un miglioramento della funzione endotelio-dipendente flusso-mediata in acuto e a 6 settimane dalla somministrazione di acido folico (5 mg/die), anche se l'effetto del trattamento sembrava, almeno in parte, indipendente dalle variazioni dei livelli plasmatici di omocisteina.

Pochi e discordanti dati, infine, sono stati ottenuti nella valutazione degli effetti del trattamento vitaminico e della riduzione dell'omocisteinemia sugli indici di infiammazione e sui parametri emocoagulativi¹²⁰.

Effetti favorevoli del trattamento, comunque, sono stati riportati sulle alterazioni ischemiche indotte dal test da sforzo in pazienti con cardiopatia ischemica¹²¹ e sullo sviluppo di aterosclerosi carotidea^{122,123}.

Studi di follow-up

Diversi studi hanno valutato se la terapia multivitaminica mirata a ridurre i livelli plasmatici di omocisteina si associ ad una riduzione degli eventi cardiovascolari a lungo termine.

Liem et al.¹²⁴ hanno randomizzato 593 pazienti con cardiopatia ischemica stabile ad acido folico (0.5 mg/die) o a terapia convenzionale. Ad un follow-up di 2 anni il livello plasmatico di omocisteina era ridotto del 18% nei pazienti trattati con acido folico, mentre rimaneva invariato nel gruppo controllo ($p < 0.001$ tra i gruppi). Tuttavia, non vi era alcuna differenza tra i due gruppi nell'endpoint primario combinato di mortalità globale, infarto miocardico, accidenti cerebrovascolari e procedure di rivascolarizzazione (10.3% nel gruppo dell'acido folico vs 9% nel gruppo controllo; RR 1.05; IC 95% 0.63-1.75).

Risultati analoghi sono stati riscontrati nello studio Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP)¹²⁵, nel quale 3680 pazienti di nord America e Scozia con recente ictus ischemico non cardiaco e non invalidante, ed evidenza di iperomocisteinemia, sono stati randomizzati a ricevere in doppio cieco alte dosi (acido folico 2.5 mg, vitamina B₆ 25 mg e vitamina B₁₂ 0.4 mg/die) o basse dosi (acido folico 20 μg , vitamina B₆ 200 μg e vitamina B₁₂ 6 μg /die) di vitamine. Ad un follow-up medio di circa 20 mesi, non sono state trovate differenze significative tra i due gruppi nell'incidenza di infarto cerebrale (9.2 vs 8.8%; $p = \text{NS}$), eventi cardiaci (7.0 vs 7.4%; $p = \text{NS}$), morte (5.9 vs 6.9%; $p = \text{NS}$), e nell'endpoint combinato (18.0 vs 18.6%; $p = \text{NS}$). Una possibile spiegazione del risultato negativo di

questo studio può risiedere nella politica di fortificazione obbligatoria del grano e dei cereali con acido folico (140 μg ogni 100 g di farina), iniziata dalla Food and Drug Administration negli Stati Uniti nel 1996¹²⁶, e successivamente adottata anche dal Canada, con lo scopo di ridurre i difetti del tubo neurale.

Ciò può avere contribuito ad avere arruolato pazienti con omocisteinemia più bassa di quanto programmato dai ricercatori (il limite di arruolamento dovette, infatti, essere abbassato dai previsti 10.5 $\mu\text{mol/l}$ a 9.5 $\mu\text{mol/l}$ per gli uomini e a 8.5 $\mu\text{mol/l}$ per le donne), oltre ad avere pazienti nel gruppo "bassa dose" inconsapevolmente trattati con maggiori dosi di acido folico¹²⁷, con conseguente riduzione della potenza dello studio.

Bonaa et al.¹²⁸ hanno recentemente pubblicato i dati dello studio NORVIT, nel quale 3749 pazienti con un recente (<7 giorni) infarto miocardico acuto sono stati randomizzati a quattro tipi di trattamento: 1) acido folico 0.8 mg, vitamina B₁₂ 0.4 mg e vitamina B₆ 40 mg; 2) acido folico 0.8 mg e vitamina B₁₂ 0.4 mg; 3) vitamina B₆ 40 mg; 4) placebo. Ad un follow-up mediano di 40 mesi i livelli di omocisteina totale erano ridotti del 27% nei pazienti trattati con acido folico e vitamina B₁₂. L'endpoint primario combinato di infarto miocardico ricorrente, ictus e morte improvvisa coronarica, tuttavia, non era significativamente ridotto dal trattamento (RR 1.08; IC 95% 0.93-1.25; $p = \text{NS}$). Peraltro, vi era un trend verso un aumento del rischio nei pazienti trattati con il triplice complesso vitaminico (RR 1.22; IC 95% 1.00-1.50; $p = 0.05$).

Due studi hanno anche valutato l'impatto della terapia multivitaminica sulla restenosi dopo interventi di rivascolarizzazione coronarica percutanea. Schnyder et al.¹²⁹ hanno randomizzato 205 pazienti sottoposti a PTCA (il 56% con impianto di stent) a somministrazione giornaliera di acido folico (1 mg), vitamina B₁₂ (400 μg) e vitamina B₆ (10 mg) o placebo. Si verificava una riduzione significativa dei valori di omocisteina nel gruppo trattato (11.1 ± 4.3 vs 7.2 ± 2.4 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0.001$). Una restenosi a 6 mesi si osservava rispettivamente nel 19.6% e nel 37.6% ($p = 0.01$). Vi era una certa riduzione della restenosi nel gruppo di pazienti trattato con sola PTCA (10.3 vs 41.9%; $p < 0.001$), mentre non si osservavano differenze significative nei pazienti trattati con stent (20.6 vs 29.9%; $p = \text{NS}$).

In uno studio più ampio, Lange et al.¹³⁰ hanno randomizzato 623 pazienti sottoposti a PTCA con stenting a terapia vitaminica (bolo endovena di acido folico 1.0 mg, vitamina B₆ 5.0 mg e vitamina B₁₂ 1.0 mg), seguiti da somministrazione giornaliera *per os* di acido folico 1.2 mg, vitamina B₆ 48 mg e vitamina B₁₂ 60 μg o placebo per 6 mesi. Una restenosi è stata osservata nel 34.5% del gruppo trattato e nel 26.5% del gruppo placebo ($p = 0.05$).

Infine, nello studio HOPE-2¹³¹ 5522 pazienti di età ≥ 55 anni, con evidenza di malattia vascolare o diabete, sono stati assegnati a ricevere random terapia con aci-

do folico 2.5 mg, vitamina B₆ 50 mg e vitamina B₁₂ 1 mg o placebo per una media di 5 anni. Al follow-up i livelli plasmatici di omocisteina erano ridotti di 2.4 μmol/l nel gruppo trattato e aumentati di 0.8 μmol/l nel gruppo placebo. L'endpoint primario di morte da cause cardiovascolari, infarto miocardico e ictus, tuttavia, non risultava significativamente ridotto nel gruppo trattato (18.8 vs 19.8%; RR 0.95; IC 95% 0.84-1.07; p = 0.41). Non vi era una riduzione nel gruppo trattato negli endpoint di morte da cause cardiovascolari (RR 0.96; IC 95% 0.81-1.13) e infarto miocardico (RR 0.98; IC 95% 0.85-1.14). Tuttavia, meno pazienti nel gruppo trattato presentavano ictus (RR 0.75; IC 95% 0.59-0.97), ma si verificava una maggiore incidenza di ricoveri per angina instabile (RR 1.24; IC 95% 1.04-1.49).

Così, il complesso degli studi sulla possibilità di ridurre gli eventi cardiovascolari ha fornito, purtroppo, risultati consistentemente deludenti in diversi gruppi di pazienti. Le cause di questo insuccesso non sono chiare. Tuttavia, poiché l'effetto proaterogeno dell'omocisteina sembra sufficientemente documentato, è stato suggerito che una possibile spiegazione dell'insuccesso dei trial terapeutici potrebbe trovarsi nella presenza di effetti negativi diretti a livello vascolare della terapia multivitaminica che bilancerebbero il beneficio legato alla riduzione dell'omocisteina.

Alcuni dati, infatti, indicano che l'acido folico altera la funzione endoteliale e la formazione della matrice della parete vasale¹³²⁻¹³⁵. Sia l'acido folico sia la vitamina B₁₂, inoltre, mediante processi di metilazione dell'omocisteina a metionina (che a sua volta viene trasformata in S-adenosilmetionina), promuovrebbero i processi di proliferazione cellulare, che hanno un ruolo importante nello sviluppo e nelle complicanze della placca aterosclerotica⁸¹. Analogamente, la vitamina B₆ è coinvolta nei meccanismi di crescita cellulare e ad alte dosi inibisce l'angiogenesi¹³⁶.

Sulla base di queste considerazioni non possiamo ritenere, quindi, definitivamente bocciata l'ipotesi di poter trasformare la riduzione dei livelli ematici di omocisteina in una riduzione delle patologie cardiovascolari. Solo l'uso di presidi terapeutici in grado di ridurre l'omocisteinemia senza comportare parallelamente potenziali effetti negativi sulla funzione cardiovascolare potrà dare una risposta definitiva a questo cruciale quesito.

Conclusioni

Esistono diverse evidenze di un'associazione tra livelli plasmatici di omocisteina e aumento del rischio di malattie cardiovascolari. La mancanza di omogeneità dei dati, tuttavia, unitamente alla notevole molteplicità di fattori in grado di influenzare i livelli ematici dell'aminoacido, nonché i deludenti risultati dei trial terapeutici, non ci consentono di poter ritenere l'omocisteina un

fattore di rischio maggiore e indipendente di malattie cardiovascolari in generale e di malattia arteriosa coronarica in particolare.

Riassunto

L'omocisteina è un aminoacido solforato che deriva dalla metionina. Le cause di iperomocisteinemia sono multifattoriali, correlate a difetti genetici, condizioni fisiopatologiche, abitudini di vita e farmaci.

L'iperomocisteinemia favorisce processi aterotrombotici mediante la disfunzione dell'endotelio, la promozione della flogosi e un profilo trombofilico. Esistono numerose evidenze cliniche e di laboratorio circa l'associazione tra i livelli plasmatici di omocisteina e un aumentato rischio di malattie cardiovascolari. La mancanza di omogeneità dei dati, tuttavia, unitamente alla molteplicità dei fattori in grado di influenzare i livelli di omocisteina, nonché i deludenti risultati dei trial terapeutici, non ci consentono attualmente di poter considerare l'omocisteina un fattore di rischio maggiore ed indipendente di malattie cardiovascolari.

Parole chiave: Aterosclerosi; Malattie cardiovascolari; Omocisteina; Vitamine.

Bibliografia

1. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 980-6.
2. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003; 290: 898-904.
3. Butz LW, du Vigneaud V. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem* 1932; 99: 135-42.
4. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 493-6.
5. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
6. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-82.
7. Botto LD, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
8. Kalita J, Srivastava R, Bansal V, Agarwal S, Misra UK. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Indian stroke patients. *Neurol India* 2006; 54: 260-3.
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. Brattstrom L, Wilcken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520-6.
11. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354:407-13.
12. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90: 1-11.
13. De Vecchi AF, Bamonti Catena F. L'omocisteina in dialisi peritoneale. *Giornale Italiano di Nefrologia* 1999; 6: 654-63.

14. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.
15. Mudd SH, Levy HL, et al. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 1st ed. Vol 1. New York, NY: McGraw-Hill, 1995: 1279-327.
16. Moat SJ, Lang D, McDowell IF, et al. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 64-79.
17. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32.
18. Kang SS, Wang PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-98.
19. Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A, et al. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 119-28.
20. Candito M, Aubin-Brunet V, Bealieu F, et al. Increased postprandial homocysteinemia in a group of depressed patients. *Amino Acids* 1997; 12: 315-21.
21. Fermo I, De Vecchi E, D'Angelo SV, et al. Total plasma homocysteine: influence of some common physiological variables. *Amino Acids* 1993; 5: 17-21.
22. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols are related to food intake in healthy subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934-41.
23. Dudman NP, Wilckn DE, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence, cofactor therapy and enzymology. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1253-60.
24. Andria G, Sebastio G, De Franchis R and al. Anomalie genetiche del metabolismo dell'omocisteina. In: Salviolo G, ed. *L'iperomocisteinemia, aspetti biochimici, clinici e terapeutici*. Firenze: Scientific Press, 1996: 27-35.
25. Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis* 2006; 5: 1-19.
26. Kullo IJ, Ding K, Boerwinkle E, et al. Novel genomic loci influencing plasma homocysteine levels. *Stroke* 2006; 37: 1703-9.
27. Leo A, Kluijtmans J, Young IA, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101: 2483-8.
28. Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000; 149: 131-7.
29. Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 377-9.
30. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992; 339: 1122-3.
31. Wouters MG, Boers GH, Blom H, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60: 820-5.
32. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
33. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 263-70.
34. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, et al. Coffee consumption and total plasma homocysteine: the Hordland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-43.
35. Vollset SE, Nygard O, Kvale G, et al. The Hordland Homocysteine Study: lifestyle and total plasma homocysteine in Western Norway. In: Graham I, Refsum H, Rosemberg IH, Ueland P, eds. *Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 1997: 117-82.
36. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 687-9.
37. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, et al. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 220-4.
38. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Betaine, ethanol, and the liver. A review. *Alcohol* 1996; 13: 395-8.
39. Hidirogrou N, Camilo ME, Beckenhauer HC, et al. Effect of chronic alcohol ingestion on hepatic folate distribution in the rat. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1561-6.
40. Gloria L, Cravo M, Camilo ME, et al. Nutritional deficiencies in chronic alcoholics: relation to dietary intake and alcohol consumption. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 485-9.
41. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20.
42. Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, et al. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2554-8.
43. Singal R, Ferdinand L, Das PM, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and prostate cancer risk. *Int J Oncol* 2004; 25: 1465-71.
44. Sengul E, Cetinarslan B, Tarku I, Canturk Z, Turemen E. Homocysteine concentrations in subclinical hypothyroidism. *Endocr Res* 2004; 3: 351-9.
45. Papa A, De Stefano V, Danese S, et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2677-82.
46. Cattaneo M, Vecchi M, Zighett M et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease. (abstr) *Neth Med J* 1998; 52: S35.
47. Carl GF, Hudson FZ, Mcguire BS Jr. Phenytoin-induced depletion of folate in rats originates in liver and involves a mechanism that does not discriminate folate form. *J Nutr* 1997; 127: 2231-8.
48. Refsum H, Ueland PM. Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 411-6.
49. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD. Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin-dependent diabetes mellitus? *J Intern Med* 1997; 242: 389-94.
50. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevated plasma homocysteine levels. *Coron Art Dis* 1991; 2: 357-60.
51. Basu TK, Mann S. Vitamin B6 normalizes the altered sulfur amino acid status of rats fed diets containing pharmacological levels of niacin without reducing niacin's hypolipidemic effects. *J Nutr* 1997; 127: 117-21.
52. Ubbink JB, van der Merve A, Delpont R, et al. The effect of a subnormal vitamin B6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996; 98: 177-84.
53. Daly D, Miller JW, Nadeau MR, et al. The effect of L-dopa administration and folate deficiency on plasma homocysteine concentrations in rats. *J Nutr Biochem* 1997; 8: 634-40.
54. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau

- MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol* 1997; 20: 55-66.
55. Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JM, Gooren LJ, Asscheman H, Stehouwer CD. Effect of sex steroids on plasma total homocysteine level: a study in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 550-3.
56. van der Mooren MJ, Wouters MG, Blom HJ, Schellekens LA, Eskes TK, Rolland R. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 733-6.
57. van der Mooren MJ, Demacker PN, Blom HJ, de Rijke YB, Rolland R. The effect of sequential three-monthly hormone replacement therapy on several cardiovascular risk estimators in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1997; 67: 67-73.
58. Mijatovic V, Kenemans P, Jakobs C, van Baal WM, Peters-Muller ER, van der Mooren MJ. A randomized controlled study of the effects of 17beta-estradiol-dydrogesterone on plasma homocysteine postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 432-6.
59. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Steegers EA, Trijbels FJ, Thomas CM, Eskes TK. Effect of sub-50 oral contraceptives on homocysteine metabolism: a preliminary study. *Contraception* 1992; 45: 129-39.
60. Wong PW, Kang SS. Accelerated atherosclerosis. *Am J Med* 1988; 84: 1093-4.
61. Brattstrom L, Israelsson B, Olsson A, Andersson A, Hultberg B. Plasma homocysteine in women on oral oestrogen-containing contraceptives and in men with oestrogen-treated prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 283-7.
62. Anker G, Lonning PE, Ueland PM, Refsum H, Lien EA. Plasma level of the atherogenic amino acid homocysteine in postmenopausal women with breast cancer treated with tamoxifen. *Int J Cancer* 1995; 60: 365-8.
63. Lien EA, Anker G, Lonning PE, et al. Effects of hormones on the plasma levels of atherogenic amino acid homocysteine. *Biochem Soc Trans* 1997; 46: 247-9.
64. Kang SS, Wong PW, Curley K. The effect of D-penicillamine on protein-bound homocysteine in homocystinurics. *Pediatr Res* 1982; 16: 370-2.
65. Kang SS, Wong PW, Glickman PB, et al. Protein-bound homocysteine in patients with rheumatoid arthritis undergoing D-penicillamine treatment. *J Clin Pharmacol* 1986; 26: 712-5.
66. Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B. N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 1996; 119: 99-106.
67. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguez A, et al. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells. Implications for atherosclerosis. *Circ Res* 2000; 87: 45-51.
68. Jakubowski J. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 2000; 130: 377S-381S.
69. Beltowski J. Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 392-404.
70. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-4.
71. Lentz SR. Homocysteine and cardiovascular physiology. In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
72. Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HW. There is NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16510-2.
73. Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Gologorsky MS. Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? *Circulation* 2002; 105: 1037-43.
74. Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, et al. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. *Med Sci Monit* 2001; 7: 585-91.
75. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569-75.
76. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1557-64.
77. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y et al. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 2001; 104: 1165-70.
78. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000; 486: 159-62.
79. Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-8.
80. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 2000; 106: 483-91.
81. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
82. Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001; 103: 2717-23.
83. Wang G, O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem J* 2001; 357: 233-40.
84. Wang G, Siow YL, O K. Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappa B in THP-1 macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2840-H2847.
85. Su SJ, Huang LW, Pai LS, et al. Homocysteine at pathophysiological concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutrition* 2005; 21: 994-1002.
86. Ratnof OD. Activation of Hageman factor by L-homocysteine. *Science* 1968; 162: 1007-9.
87. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-16.
88. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
89. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-14.
90. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1381-6.
91. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vasculare disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-33.

92. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Tromb Haemost* 2005; 94: 907-15.
93. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
94. Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, et al. Plasma homocysteine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996; 126: 27-34.
95. Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, Latour Y, Genest J Jr. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate, and folate. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-11.
96. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-30.
97. Graham IM, Daly LE, Refsum HM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-81.
98. Hopkins PN, Wu LL, Wu J, et al. Higher plasma homocysteine and increased susceptibility to adverse effects of low folate in early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1314-20.
99. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988; 71: 227-33.
100. Genest JJ Jr, McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR. Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 1114-9.
101. Wu LL, Wu J, Hunt SC, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem* 1994; 40: 552-61.
102. Stampfer MJ, Malinow W, Willet WC, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-81.
103. Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 862-7.
104. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-9.
105. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1947-53.
106. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 98: 204-10.
107. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. A meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2015-22.
108. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202.
109. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Association of plasma homocysteine with restenosis after percutaneous coronary angioplasty. *Eur Heart J* 2002; 23: 726-33.
110. De Luca G, Suryapranata H, Gregorio G, et al. Homocysteine and its effects on in-stent restenosis. *Circulation* 2005; 112: e307-e311.
111. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Schouten EG, for the MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677CT polymorphism and risk of coronary heart disease. A meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-31.
112. Graham IM, O'Callaghan P. Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drug Ther* 2002; 16: 383-9.
113. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia: a randomized placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 335-8.
114. Malinow MR, Duell PB, Hell DL, et al. Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1009-15.
115. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340: 1449-54.
116. Qunilivan EP, McPartlin J, McNulty H, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of cardiovascular disease. *Lancet* 2002; 359: 227-8.
117. Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168: 255-62.
118. Woo KS, Chook P, Chan LL, et al. Long-term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation. *Am J Med* 2002; 112: 535-9.
119. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, et al. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 2002; 105: 22-6.
120. Scherthaner GH, Plank C, Minar E, et al. No effect of homocysteine-lowering therapy on vascular inflammation and haemostasis in peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 333-9.
121. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355: 517-22.
122. Peterson JC, Spence JD. Vitamins and progression of atherosclerosis in hyper-homocysteinemia. *Lancet* 1998; 351: 263.
123. Hackam DG, Peterson JC, Spence JD. What level of plasma homocysteine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocysteine levels above 14 $\mu\text{mol/l}$. *Am J Hypertens* 2000; 13: 105-10.
124. Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW, van Veldhuisen DJ. Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2105-13.
125. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 565-75.
126. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register* 1996; 61: 8781-97.
127. Malinow MR, Chambless LE, Howard VJ, et al. Screening of plasma homocysteine levels in stroke patients for the the Vitamin Intervention in Stroke Prevention (VISP) clinical trial. *The VISP Investigators*. (abstr) *Stroke* 1999; 30: 258.
128. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, et al, for the NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578-88.
129. Schnyder G, Roffi M, Pin R, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345: 1593-1600.
130. Lange H, Suryapranata H, De Luca G, et al. Folate therapy

- and in-stent restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 2004; 350: 2673-81.
131. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1567-77.
132. Scott J, Weir D. The methyl folate trap: a physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981; 2: 337-40.
133. Flynn S, Albanes D. Folate and cancer: a review of the literature. *Nutr Cancer* 1994; 22: 103-19.
134. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinemia in patients with uraemia. *Lancet* 2003; 36: 1693-9.
135. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, et al. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997; 272: 25380-5.
136. Matsubara K, Mori M, Akagi R, Kato N. Anti-angiogenic effect of pyridoxal 5'-phosphate, pyridoxal and pyridoxamine on embryoid bodies derived from mouse embryoid stem cells. *Int J Mol Med* 2004; 14: 819-23.