

Peptidi natriuretici del sistema ANP/BNP: basi biochimiche e metodi di analisi

Erika Zambelli, Elio F De Palo

Sezione di Biochimica Clinica del Dipartimento di Scienze Medico Diagnostiche e Terapia Speciale - Università degli Studi di Padova

ABSTRACT

Natriuretic peptides of the ANP/BNP system: biochemistry and assay methods

The present review describes the recent literature results published on the topic of the family of natriuretic hormone peptides. These hormones are characterised by two main groups, namely ANP and BNP which are strictly related to the heart renal axis and represent an important hormonal function in homeostasis of the haemodynamic and blood pressure. The clinical biochemistry laboratory is interested in an analytical approach and also in the biochemical function of these hormones. It is well known that the peptide/protein hormones are synthesised in the different endocrine glands as precursors namely pro-hormones. BNP and ANP are also synthesised as pro hormones and the metabolism of these precursors originates the known fragments. This review describes these fragments from the molecular point of view. Recent works have described a possible role of these hormonal compounds and this aspect also stimulates the clinical biochemist to investigate and improve the study to recognise their potential role. The analyses of these fragments are fundamental and of great help in understanding the various applications in patho-physiology. The present review describes the main analytical aspects and techniques suitable for the analyses in body fluids (plasma and urine) with and/or without sample treatment.

RIASSUNTO

Questa recensione illustra le più recenti acquisizioni sugli ormoni peptidici della famiglia dei fattori natriuretici. E' ormai chiaro che questi composti, caratterizzati da due sottogruppi, fattori natriuretici ANP e fattori BNP sono in stretta relazione tra loro in quanto rappresentano i peptidi ormonali del cuore "endocrino", che però sono stati anche riscontrati in altri distretti, come ad esempio il rene. Il laboratorio di biochimica clinica che vuole essere partecipe non solo all'aspetto analitico ma anche al significato biochimico, deve a nostro parere essere presente ed in grado di approfondire i vari meccanismi del metabolismo ormonale. E' ormai accettato che l'azione di alcuni ormoni non è unicamente espressa dalla forma molecolare "matura" classicamente nota, ma anche i suoi metaboliti ormonali come frammenti e/o precursori possono dimostrare un'azione ormonale, anche se parziale. Un chiaro esempio è rappresentato dalla famiglia di peptidi e frammenti qui descritti. Studi recenti di biochimica clinica e procedure analitiche applicabili su larga scala hanno permesso di ampliare molto la loro applicazione clinica (particolarmente per il BNP), ma certamente non si devono trascurare i composti strettamente collegati a questi ormoni ANP e BNP. E' quasi certo che le molecole, frammenti o precursori di questi ormoni, non sarebbero solo composti di degradazione o intermedi di sintesi, ma potrebbero essere a tutti gli effetti considerati composti con azione ormonale e per di più potrebbero anche per questo essere utili marker biochimici. Questa recensione quindi, dopo una presentazione e caratterizzazione chimica dei composti, descrive i principali passaggi metabolici di sintesi e secrezione passando dall' ANP ai suoi frammenti fino all'urodilatina, fattore natriuretico di origine renale. Sono descritti anche i recettori per questi ormoni con approfondimenti sulle azioni fisiologiche ed alcuni aspetti collegati all'esercizio fisico. Dopo una breve presentazione sulle prospettive applicazioni cliniche viene dato ampio risalto all'aspetto analitico cercando di presentare similitudini e differenze tra i vari composti. E' infine anche suggerito un possibile potenziale diagnostico, che comunque deve essere verificato e studiato con nuove ricerche sperimentali e con metodi di analisi adatti per sensibilità e specificità.

RICONOSCIMENTO DEI PEPTIDI

Nel 1956, per la prima volta, fu dimostrata l'esistenza di granuli secretori nell'atrio cardiaco [1]. Studi successivi fisiologici dimostrarono la relazione endocrina tra cuore e rene. Si dimostrò che la sintesi e la secrezione in circolo di peptidi dai granuli di queste cellule mioendocrine atriali

era stimolata dalla distensione dell'atrio [2]. Alcuni autori proposero per questi fattori ormonali la denominazione di CARDIODILATINA (CDD), considerate le loro funzioni vasorilassanti sulla muscolatura liscia dei vasi [3][4][5]. Negli stessi anni altri gruppi di ricerca determinarono l'esistenza di un peptide, di origine atriale, con azioni diuretiche e natriuretiche, e lo denominarono CARDIO-

Le figure sono state riprodotte da Forssmann et al. Cardiovascular Research 2001; 51: 450-62, con il consenso dell'Autore e dell'editore Elsevier Science

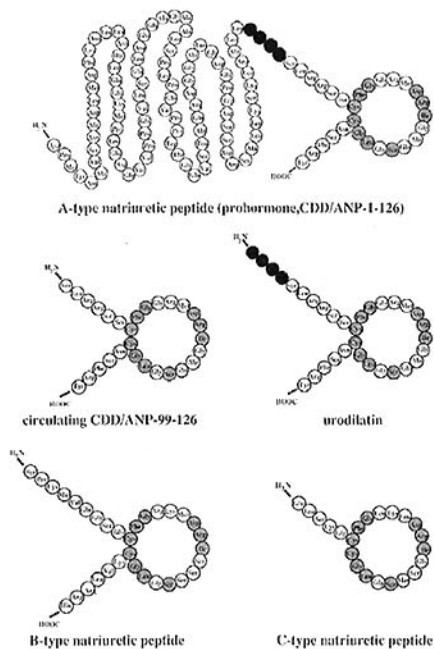


Figura 1
Strutture molecolari dei peptidi natriuretici atriali e del loro pro-ormone [24]

NATRINA [6][7][8]. Fu chiaro solo in seguito che i due peptidi erano omologhi [9][10]. La terminologia odierna ANP (Atrial Natriuretic Peptides) o ANF (Atrial Natriuretic Factors)¹ (Fig.1) evidenzia la caratteristica azione a livello renale, anche se la loro principale funzione è la regolazione cardiovascolare [11]. Nel 1988 BNP [12], CNP [13] furono riconosciuti come omologhi con CDD/ANP (cardio-dilatina/atrial natriuretic peptide) e componenti la famiglia ANF. Anch'essi hanno dimostrato funzioni natriuretiche, diuretiche e di rilassamento della muscolatura dei vasi [14]. Nel 1988 fu isolata l'URODILATINA (URO), l'ANP urinario con azione paracrina natriuretica e diuretica, sintetizzata nel rene a livello dei tubùli distali [9].

Sia atrio che ventricolo, in risposta ad un aumento di pressione intracardiaca, hanno dimostrato capacità di sintetizzare e secernere diversi peptidi natriuretici [15]. Gli ormoni della famiglia ANF sono regolatori dell'omeostasi idrica e salina ed influenzano la pressione sanguigna. CDD/ANP che è l' α ANP o A-type peptide è sintetizzato nel cuore, mentre BNP (brain natriuretic peptide o B-type natriuretic peptide) e CNP (o C-type natriuretic peptide), identificati rispettivamente nel cervello ed in circolo, hanno dimostrato la loro presenza anche in altri distretti [15]. Nel cuore l' α ANP predomina nei granuli atriali mentre il BNP predomina nel ventricolo. Da ciò si potrebbe ipotizzare un dualistico sistema endocrino cardiaco, per cui l'ANP sarebbe secreto in risposta ad un aumento di pressione

atriale mentre il BNP sarebbe prodotto e secreto in risposta ad un sostanziale aumento di pressione intramurale ventricolare [15].

L'URO (peptide natriuretico extra-cardiaco) è presentato come l'ormone maggiormente responsabile della diuresi e della natriuresi, e si ritiene contribuisca in maniera peculiare al controllo del volume dei fluidi corporei [9].

In circolo è stata evidenziata la presenza di numerosi frammenti peptidici di questi ormoni della famiglia ANF [16][17], e si ipotizza provengano dai processi di sintesi e secrezione dell' α ANP. Infatti, come per molti ormoni proteici, la sintesi prevede la formazione di un precursore pro-ormone e passaggi post-trascrizionali che portano alla fine alla specie ormonale attiva. Il pro-ormone dell' α ANP è una struttura di 126 aminoacidi, il proANP(1-126); questo precursore, con la sintesi e secrezione dell'ormone attivo, porta alla formazione del frammento proANP(1-98). Dopo ulteriori frammentazioni di quest'ultimo si formano proANP(1-30) proANP(31-67) e proANP(79-98). La presenza di questi frammenti peptidici derivanti dalle porzioni, ed N-terminali del proANP(1-126), è stata dimostrata in diverse specie animali e nell'uomo [18]. Non è ancora però del tutto chiaro se questi frammenti siano solo cataboliti o ricoprano un ruolo "ormonale". Alcuni Autori hanno dimostrato le loro proprietà natriuretiche, kaliuretiche e/o vasorilassanti [19][11]. Non è però ancora chiaro se queste azioni siano indirette e prevedano un ruolo di "modulazione" con l' α ANP, oppure dirette con azioni ormonali ben distinte e caratterizzanti.

Attualmente la famiglia dei fattori natriuretici è ormai accertato sia costituita dai seguenti ormoni: ANP, BNP, CNP e Urodilatina (URO); a questi sono poi da aggiungere i loro frammenti peptidici. La principale funzione di questi fattori natriuretici è la regolazione dell'omeostasi idrica e salina con azioni a livello cardiovascolare e renale [20].

CLASSIFICAZIONE CHIMICA

ANP e BNP, ormoni cardiaci, sono prodotti rispettivamente da cellule dell'atrio e del ventricolo. Il CNP, neuropeptide o regolatore autocrino/paracrina, sembra sia sintetizzato principalmente nell'endotelio. L'URO, peptide natriuretico e diuretico, è di origine renale.

α ANP: è codificato da un gene del cromosoma 1 (p32.2). La sua presenza nell'atrio cardiaco è rilevante, infatti la quantità di mRNA, codificante ed osservata in questa sede, supera di 40 volte quella codificante il BNP [21]. Nel miocita atriale si forma il pro-ormone proANP(1-126). I frammenti ormonali ANP(99-126) e proANP(1-98) si formano dal pro-ormone 1-126 in risposta ad uno stiramento cardiaco, che è uno stimolo secretorio. L' α ANP o ANP(99-126) rappresenta la porzione C-terminale di 28 aminoacidi del pro-ormone. Questa era considerata, inizialmente, la sola frazione biologicamente attiva dell'ormone ANP. Il secondo frammento è la porzione N-termi-

Nomenclatura utilizzata:

ANF = definizione generale che comprende tutti i componenti della famiglia dei peptidi natriuretici (α ANP, proANP e frammenti, BNP,

nale. Quest'ultimo dopo ulteriore lisi forma altri frammenti [22].

La forma molecolare circolante dell'ormone attivo α ANP umano è caratterizzata da una struttura di 17 aminoacidi ad anello che si forma per la presenza di un ponte disolfuro tra Cys105 e Cys121 che chiude il caratteristico anello. Alla porzione C-terminale mostra 5 residui aminoacidici e all'N-terminale 6. Anche gli altri ormoni BNP, CNP e URO presentano la stessa struttura ad anello e conservano omologie per 11 degli aa dell' α ANP. Variano invece le composizioni nelle porzioni N-terminale e C-terminale delle molecole [21].

FRAMMENTI proANP: inizialmente si ritenne che la funzione biologica degli ANF fosse basata unicamente sulla presenza della struttura ad anello caratteristica della forma molecolare di tutti i membri della famiglia. Winters et al. [16] hanno osservato, invece, che i peptidi derivanti dalla porzione N-terminale del pro-ormone hanno una potente azione vasodilatatoria uguale a quella dell' α ANP ed hanno dimostrato una simile azione anche a livello renale, anche in assenza dell'anello di 17 aa. Sulla reale struttura di questi frammenti si conosce ancora poco, si ritiene comunque che derivino dalla porzione N-terminale proANP(1-98) ottenuta dal processing del proANP(1-126), al momento dell'esocitosi. Il proANP(1-98) subirebbe ulteriore lisi per formare tre peptidi: proANP(1-30), proANP(31-67), proANP(79-98) [22].

URODILATINA (URO): questo ormone è il peptide ANP(95-126). E' un composto non glicosilato costituito da 32 aa ed è considerato un mediatore natriuretico paracrino. E' sintetizzato nei tubuli renali assieme ad altri peptidi appartenenti alla famiglia degli A-type NP. La molecola URO è differente dall' α ANP. La sua maturazione ed elaborazione avviene a livello renale, anche se è codificata dallo stesso gene e deriva dallo stesso precursore proANP(1-126). Mantiene il caratteristico anello di 17 aa chiuso da un ponte disolfuro fra i residui di cisteina (Cys105-Cys121), ma, rispetto all' α ANP, presenta quattro aminoacidi in più nella porzione N-terminale. Nella zona C-terminale mostra, come l' α ANP, 5 residui aminoacidici [23][24].

BNP: questo ormone, originariamente isolato nel cervello di maiale, successivamente si rivelò essere presente in maggiore concentrazione nel cuore e più precisamente nel ventricolo. E' stato ritrovato anche nell'atrio, ma solo in piccola parte (circa il 2% rispetto all' α ANP) [25]. Il BNP deriva da un gene situato sullo stesso cromosoma di quello che codifica per l' α ANP. Il suo precursore è il pre-proBNP, costituito da 134 aa, da cui si forma il pro-ormone, proBNP di 108 aa. A seguito dello stimolo secretorio di stiramento ventricolare, nell'uomo, dal pro-ormone è formata e secreta la porzione C-terminale di 32 aa [12]. Diversamente da quanto accade per l' α ANP, la lisi del pro-BNP avviene già all'interno del tessuto cardiaco, e precede la formazione di granuli, quindi non si forma al momento della secrezione dai miociti. Si deduce che la principale forma di accumulo per il BNP è il BNP stesso e non il pro-ormone come invece è per l' α ANP [25].

CNP: isolato per la prima volta nel cervello di maiale, il CNP non è tuttavia presente solo a livello cerebrale, ma il suo mRNA è stato dimostrato essere ampiamente distribuito anche nell'endotelio vascolare [15], nel rene, nell'intestino e nel liquido cerebrospinale. Nel cervello resta comunque il più abbondante tra i fattori appartenenti alla famiglia ANF. Dal gene situato sul cromosoma due, il pro-CNP derivante presenta una sequenza di 103 aa. La catena di aa finale della porzione C-terminale del precursore (CNP) è di 22 aminoacidi. La forma molecolare circolante di CNP condivide con α ANP, BNP e URO la struttura ad anello di 17 aa, chiusa dal ponte di-solfuro intramolecolare. L'estremità C-terminale è tronca rispetto a quella dell' α ANP, ed è rappresentata dal secondo residuo di cisteina che forma il ponte [13].

Le strutture del CNP ed α ANP sono molto conservate anche in specie diverse, mentre il BNP è specie specifico. Anche se il CNP presenta una struttura simile a quelle dell' α ANP e del BNP, esso non sembra possedere funzioni natriuretiche, ma ha dimostrato attività vasorilassante [22].

E' stata ipotizzata l'esistenza in circolo di frammenti N-terminali del proBNP. Hunt et al. [26] hanno identificato, con metodo RIA, nel plasma di pazienti con insufficienza cardiaca congestizia, il frammento proBNP(1-76), porzione N-terminale del pro-ormone. Sono ancora pochi gli studi in letteratura che hanno dimostrato l'esistenza in circolo dei frammenti N-terminali del proCNP (Nt-CNP). In plasma estratto proveniente da pazienti con insufficienza cardiaca congestizia e in estratti da ipofisi ovine Prickett et al. [27] hanno recentemente isolato un frammento denominato Nt-proCNP(1-50) di circa 5 kDa.

Prove sperimentali condotte per studiare la frammentazione dei pro-ormoni BNP e CNP sono ancora incomplete e necessitano approfondimenti per una loro migliore caratterizzazione e significato fisiopatologico.

SINTESI E SECREZIONE

La presenza dei fattori natriuretici α ANP, BNP, CNP è stata evidenziata in molti distretti con attività endocrina, compresi cervello ed altri sistemi. E' stata dimostrata la loro presenza con diverse tecniche di laboratorio, quali l'immunocitochimica, la misura dell'mRNA relativo, l'ibridazione in situ e l'immunoassay su estratti di tessuto [28]. L' α ANP è stato localizzato principalmente nel cuore anche se molti studi hanno rivelato la sua presenza anche in altri distretti come sistema conduttore, medulla renale, rene, cervello, timo e tratto gastro-intestinale [24]. La presenza dell'URO è stata dimostrata invece solo a livello renale (Fig 2).

α ANP: studi biochimici e analisi immunochimiche hanno dimostrato che il proANP(1-126) è accumulato in granuli nei miociti atriali [10]. Le cellule mioendocrine atriali presentano un apparato secretorio con specifici granuli contenenti il peptide, e la densità di questi granuli secretori dipende dallo stato funzionale dell'organismo (es. ipovolemia e ipovolemia) [29].

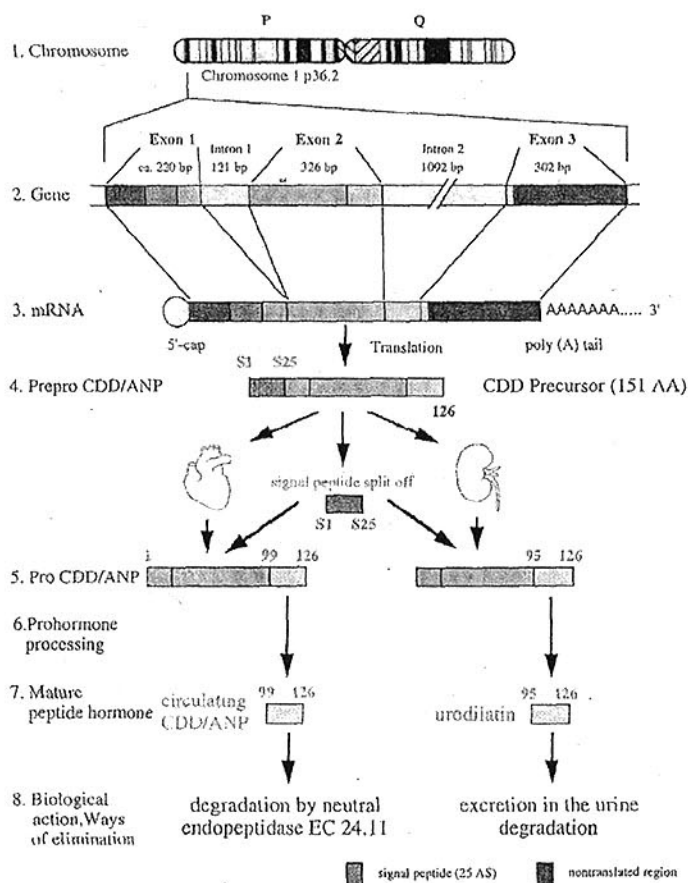


Figura 2

Illustrazione della sintesi di α ANP e URO, dallo stesso gene presente sul cromosoma 1, e secrezione dei peptidi in sedi differenti :cuore e rene [24]

Studi sperimentali hanno permesso di verificare che il gene dell' α ANP, tre esoni e due introni, è localizzato nel cromosoma 1 p36. L'mRNA atriale dell' α ANP codifica per il pre-proANP, un precursore polipeptide specie-specifico di 150-152 aa. A seguito del distacco del frammento peptide segnale N-terminale di 1-25 aa (1-23 aa nel cane), si forma il proANP(1-126) di 15-17 kDa, prodotto primario di traduzione. In specie diverse dall'uomo è prodotto proANP(1-128). Vi è comunque una stretta omologia tra questi pro-ormoni nell'uomo ed in altri mammiferi (86%-74%) [10]. Questo precursore è accumulato in granuli specifici nei miociti atriali, morfologicamente simili a quelli delle cellule secretorie degli ormoni polipeptidici. Lo stimolo fisico per la sintesi e rilascio del pro-ormone è l'estensione delle cellule mioendocrine.

La lisi del proANP(1-126) sembra avvenga per azione di un enzima specifico. Recentemente è stata dimostrata una serina proteasi di membrana, espressa nel cuore (cardiomiociti atriali) e denominata CORINA, ed è stato proposto un suo ruolo nella conversione di proANP nei peptidi circolanti N- e C-terminali [30][31]. Questo "processing" nei granuli secretori non è ancora stato chiarito del tutto. L'enzima, attivato durante l'esocitosi, sembra agisca sul legame Arg98-Ser99. Da questi processi di lisi si ottengono dal pro-ormone: la forma matura circolante e biologicamente attiva C-terminale di 3kDa che è

CDD/ α ANP(99-126), ed il frammento N-terminale, proANP(1-98), cosecreto in quantità equimolari all' α ANP.

URODILATINA (URO): non è stato ancora ben definito dove e come avvenga la sintesi dell'URO. Le ipotesi formulate sono due: 1) l'URO potrebbe derivare da un precursore di origine miocardica e circolante, 2) potrebbe essere sintetizzata nei tubuli renali dal proANP(1-126), cioè dal tipico precursore dell' α ANP. Alcuni ricercatori hanno considerato più probabile la seconda ipotesi, e più precisamente, l'URO sarebbe sintetizzata in cellule tubulari renali distali, che hanno dimostrato immunoreattività per uno specifico antisiero, mentre non è stata osservata la sua presenza in glomeruli, vasi renali o nel tubulo prossimale [32].

Si è dimostrato che la secrezione avviene nel lume tubulare, dove l'ormone esplica un'azione paracrina, legandosi a recettori specifici; la presenza è stata verificata nel lume, a valle e nel dotto collettore della medulla profonda [10]. L'URO deriva dallo stesso gene dell' α ANP costituito da tre esoni e due introni [9][10]. La molecola dell'URO deriva dal precursore proANP(1-126), cioè dallo stesso precursore dell' α ANP. Secondo alcuni Autori, è a livello renale che avviene il taglio proteolitico del proANP(1-126) che porta alla formazione della sequenza (95-126) tipica dell'URO. La proteolisi infatti avviene in zona diversa rispetto a quella riscontrata nell'atrio; la

sintesi della forma matura (CDD/ANP(95-126) o URO) dell'ormone sembra si abbia a livello renale, inoltre la sua presenza sembra sia principalmente a livello urinario [10]. Pochi autori infatti hanno dimostrato l'URO in altri distretti, sembrano comunque bassissime le concentrazioni in circolazione [32].

FRAMMENTI ANP: Saba et al. [33] hanno dimostrato che, dopo l'esocitosi da miociti atriali, il frammento N-terminale proANP(1-98) è ulteriormente tagliato proteoliticamente e nel sangue risultano presenti 3 peptidi: proANP(1-30), proANP(31-67) e proANP(79-98). Gli stessi autori hanno provato inoltre che, sia il proANP(1-98), sia i frammenti da esso derivati, sono in grado di agire a livello renale e/o sono vasorilassanti [34]. Questi peptidi N-terminali sono stati analizzati anche in circolo e nelle urine [35], le concentrazioni misurate sono risultate maggiori rispetto a quelle dell' α ANP. Non è però ancora chiaro un ruolo fisiopatologico, sembra in ogni modo che la loro presenza sia legata alla sintesi dell' α ANP, presente nel sangue a livelli fluttuanti e con un'emivita breve (3-5 minuti) ed inferiore rispetto agli altri frammenti derivanti dal pro-ormone. Da ciò si può ipotizzare una maggiore persistenza in circolo di questi frammenti. La letteratura riporta che il proANP(31-67) o Md-ANP sembra possedere un'azione natriuretica derivante dalla riduzione del riassorbimento del sodio [36].

OSSERVAZIONI SULL'EMIVITA DEI FRAMMENTI PROANP

I frammenti Nt-ANP [proANP(1-30)] e Md-ANP [proANP(31-67)] sono stati riconosciuti e misurati nel plasma di soggetti sani [36], inoltre l'analisi in campioni plasmatici in pazienti con patologie renali ha dimostrato concentrazioni di Md-ANP aumentate di circa 70 volte, mentre l'Nt-ANP si è dimostrato aumentato di circa 20 volte rispetto ai valori misurati in soggetti di riferimento. Questi dati sperimentali hanno suggerito che il primo peptide abbia un'emivita maggiore rispetto al secondo [16]. È stata inoltre dimostrata la presenza di questi frammenti anche nelle urine ed in concentrazioni diverse tra loro, il Md-ANP è risultato 7 volte più concentrato dell'Nt-ANP. Quest'ultima osservazione potrebbe suggerire una clearance renale o un collegamento con l'URO [34]. Questi peptidi sono ormai considerati a tutti gli effetti ormoni in quanto circolano normalmente nell'uomo e sembra agiscano in tessuti bersaglio diversi da quelli da cui sono rilasciati. In conclusione dalla sequenza proANP(1-126) derivano il frammento proANP(1-98) ed i tre ormoni α ANP, proANP(1-30) e proANP(31-67). Questa ipotesi può essere avvalorata dalle analogie con il proormone pro-opiomelanocortina (POMC) (il cui mRNA è principalmente presente a livello ipofisario) dal quale vengono prodotti per taglio proteolitico diversi ormoni (ACTH, β -endorfine, β -MSH, γ -LPH, ecc.).

RECETTORI E METABOLISMO

L'attività ormonale dei peptidi ANP, ed in particolare

dell' α ANP, si esplica attraverso la formazione del mediatore intracellulare il cGMP (cyclic guanosine 3',5'-monophosphate). Sono state identificate, come recettori di peptidi natriuretici (NP), proteine di tipo I di membrana, caratterizzate da un dominio intracellulare con funzione guanilil-ciclasica. Con la tecnica del DNA ricombinante sono stati riconosciuti tre recettori specifici per gli NP e sono stati chiamati NPR (Natriuretic Peptide Receptor) di tipo A, B e C. Solo NPR-A e NPR-B presentano il dominio catalitico intracellulare guanilil-ciclasico [9][24]. I recettori NPR-A ed NPR-B sono anche denominati rispettivamente GC-A e GC-B, in relazione al meccanismo di trasduzione recettoriale cui sono accoppiati. I recettori NPR-C sono invece detti recettori di clearance [10].

Questi NPR recettori sono composti da un dominio extracellulare regolatore, con un sito di legame per l'ormone, da una regione transmembrana a catena singola e da un dominio intracellulare catalitico per la conversione di GTP in cGMP. Il legame del peptide al recettore, nella zona extracellulare, porta a modificazioni allosteriche nella subunità catalitica intracellulare. Questo avviene grazie ad un dominio interposto tra la singola catena transmembrana e la GC, rappresentato da una protein-kinase [13][22]. In animali in cui si è riconosciuta la presenza del recettore, è stato anche dimostrato che la glicosilazione del dominio extracellulare di NPR-A non è coinvolta nel legame con l'ormone, ma sembra che il suo ruolo sia quello di favorire il trasporto verso la superficie cellulare di nuovi NPRs sintetizzati [37]. La distribuzione degli NPRs è molto discussa. Per quanto riguarda il rene, nelle cellule tubulari si osserva correlazione tra il legame dei peptidi natriuretici e l'accumulo di cGMP [10]. L'affinità dei recettori NPR-A per i vari ANF è diversa: molti autori hanno evidenziato che l' α ANP ha una maggiore affinità per il recettore di tipo A, seguito in ordine decrescente dal recettore BNP e CNP, invece l'NPR-B ha dimostrato affinità maggiore con CNP seguito da BNP ed ANP [22].

NPR-A, NPR-B: sono proteine transmembrana con dominio extracellulare molto simile (coincidente per circa il 44%) e porzione intracellulare ripartita in due domini: la parte C-terminale guanilatociclasica catalitica (EC. 4.6.1.2 [38]) e un dominio di 280 aminoacidi appena sotto la membrana detto KHD (kinase homology domain). Si è ipotizzato che quest'ultimo dominio sia regolatore negativo dell'attività guanilatociclasica e che il legame dell'ormone al dominio extracellulare del recettore elimini l'inibizione della sua azione [21].

NPR-C: questo recettore lega α ANP, BNP e CNP e li sottrae dall'ambiente, per cui è denominato clearance receptor. È meno specifico e riconosce anche forme tronche di peptidi natriuretici NP ed anche quelli con sostituzioni con D-aminoacidi. L'affinità maggiore di questo recettore è per l' α ANP piuttosto che il BNP, e ciò potrebbe spiegare l'emivita più lunga di BNP rispetto ad α ANP rilevata in circolo [22]. È stato anche proposto che l'NPR-C possa inibire l'adenilatociclasa e favorire la fosfolipasi C in molti tessuti. Questo clearance receptor sottrarrebbe CDD/ANP(99-126) (α ANP) dal circolo per poi rilasciarlo

lentamente [10]. Nella membrana cellulare è in forma di omodimero di circa 120 kDa, ed in piccola porzione come monomero 60 kDa. Un largo dominio extracellulare lega con alta affinità gli NPs, un singolo dominio transmembrana e un dominio intracellulare breve di 27 aminoacidi caratterizza questo clearance receptor. NPR-C manca di dominio catalitico intracellulare e non ha attività guanilato-ciclasica. La sua azione quindi consiste nel mediare l'endocitosi dei peptidi-ligando attraverso la produzione di vescicole che formeranno poi endosomi, caratterizzati da un ambiente interno acido. Questo medium intracellulare porta alla distruzione del ligando e allo stesso tempo il recettore riciclato torna nella membrana [13].

L'inattivazione e scomparsa dell' α ANP avviene con due meccanismi: 1) sottrazione dal circolo per legame al recettore di clearance NPR-C; 2) degradazione enzimatica nel polmone, fegato e rene (tubulo prossimale).

L'enzima responsabile della degradazione è una metalloendoproteasi (E.C. 3.4.24.11) che catalizza l'apertura dell'anello di 17 AA dell' α ANP, è in questo modo viene persa l'affinità dell'ormone per il suo recettore [10][24].

URODILATINA: i recettori dell'URO sono del tipo NPR-A, gli stessi dell' α ANP. Le caratteristiche e funzione di questi recettori sono analoghe a quelle sopra descritte per l' α ANP [10][24]. Nel rene gli NPR-A sono localizzati sulla membrana apicale nei tubuli del dotto collettore e nel muscolo liscio di vasi renali. Il loro riconoscimento è stato eseguito con tecniche di biologia molecolare, di immunocitochimica e di autoradiografia (Fig. 3) [10]. Nelle cellule tubulari distali del rene oltre all'NPR-A sono presenti anche i recettori NPR-C. Con tecniche HP-GPC (High Performance Gel Permeation Chromatography) è stata dimostrata nelle urine la presenza di URO in forma intatta come pure in forma di frammenti di 2-5 AA [39]. L'inattivazione dell'Urodilatina sembra avvenga attraverso il legame al recettore NPR-C ed in misura minore per degradazione enzimatica a carico di endopeptidasi neutre: NEP E.C. 3.4.24.11. Da prove sperimentali l'URO è risultata più stabile alla degradazione enzimatica rispetto all' α ANP [9][24]. L'estensione nativa N-terminale di CDD/ANP(95-126) (URO) sembra proteggere questo ormone dall'inattivazione proteolitica che avviene in sede renale. Con tecniche di Northern Blot, Forssmann et al. [10], hanno dimostrato la presenza di mRNA per recettori NPR-A nel rene, zona corticale e della papilla. Gli stessi autori, con tecniche immunocitochimiche hanno più chiaramente osservato gli NPR-A localizzati sulla membrana apicale del dotto collettore. I recettori di tipo A nel dotto collettore riconoscerebbero tutti i peptidi natriuretici espressi nella medulla renale, ma il legame recettoriale dell'URO sarebbe risultato diverso da quello dell' α ANP.

Mentre l' α ANP secreto dal cuore potrebbe interagire con recettori presenti nel sistema vascolare renale, l'URO sembra invece solo un regolatore renale paracrina [10].

FRAMMENTI proANP: i recettori per i frammenti del proANP(1-126), proANP(1-30) e proANP(31-67), non sono stati ancora identificati biochimicamente e non è stato riconosciuto un meccanismo d'azione. Studi recenti

di Dietz et al. [40], con prove sperimentali sul possibile ruolo di questi frammenti, hanno dimostrato un legame competitivo dell'Nt-ANP e del Md-ANP, ma i siti di legame sono risultati specifici e diversi rispetto all' α ANP. I frammenti proANP non sembra leghino i recettori NPR-A e NPR-C [29]. Nella membrana della corteccia renale Vesely et al. [19] hanno osservato Kd per i frammenti simili a quelle per l' α ANP, mentre nella membrana della medulla renale le Kd dei frammenti sono risultati 10 volte maggiori rispetto a quelle dell' α ANP. Secondo questi Autori questi ANP formerebbero un legame molto debole con le cellule dei tubuli prossimali e distali. I peptidi sono stati localizzati nel dotto collettore, a livello del glomerulo e dei vasi sanguigni peritubulari ed interstiziali. Secondo questi Autori nei tubuli prossimali e/o nei tubuli distali del rene vi sarebbe la sintesi e/o cattura del proormone (1-126) o dei suoi peptidi [40]. Per quanto riguarda il meccanismo di eliminazione di questi peptidi, altri autori [19] hanno dimostrato parziale degradazione in circolo delle porzioni N-terminali del proANP(1-98). Inoltre in pazienti con insufficienza renale cronica in emodialisi le concentrazioni plasmatiche di questi peptidi erano aumentate rispetto a quelle dell' α ANP e ciò potrebbe essere in relazione ad un diverso meccanismo di eliminazione.

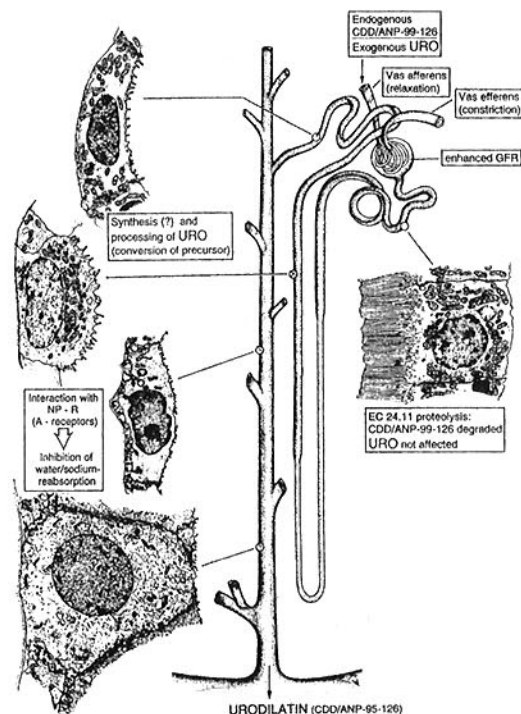


Figura 3
Azioni intrarenali di URO [24].

AZIONI FISIOLOGICHE

URODILATINA: Gli effetti, diuretico e natriuretico, sono sicuramente i principali ruoli fisiologici di questo peptide ormonale. È stato dimostrato che l'Urodilatina gioca anche un ruolo importante nella dilatazione della muscolatura liscia, nell'omeostasi di fluidi ed elettroliti corporei e nella difesa immunitaria [24]. Nel sistema renale l'URO agisce come ormone paracrina rispetto alla parte distale del nefrone. Studi condotti da Carstens et al. [41], hanno suggerito che recettori luminari, accoppiati a guanilato-ciclastasi nel dotto collettore della medulla profonda renale (IMCD), siano i bersagli fisiologici di URO. Questo peptide interagisce con canali sodio sensibili all'Amiloride ed inibisce il riassorbimento di sodio con azione cGMP mediata [42]. Nell'azione renale a livello del glomerulo Herten et al. [43] hanno dimostrato che l'URO, come l' α ANP, induce dilatazione dell'arteriola afferente e costrizione dell'arteriola efferente provocando un incremento nella filtrazione glomerulare e nella frazione di filtrazione (Fig. 4). E' stato proposto che ciò sia conseguenza dell'aumento, a livello dei capillari glomerulari, della pressione idrostatica, forza guida per l'ultrafiltrazione dal punto di vista fisico. Drummer et al [44] nell'uomo hanno dimostrato una correlazione tra escrezione urinaria di URO e di sodio in associazione al ritmo circadiano, inoltre hanno documentato per l'URO un'azione natriuretica più marcata rispetto all' α ANP. Più autori [45][46][47] hanno confermato questi dati sperimentali e dimostrato una significativa correlazione tra escrezione urinaria di URO ed escrezione di sodio dopo ipervolemia per infusione salina e dopo dilatazione dell'atrio destro con palloncino. Queste osservazioni sono in accordo con l'ipotesi che l'URO, sintetizzata in cellule tubulari distali ed escreta nel lume tubulare, a seguito di legame ad NPRs nel dotto collettore della me-

dulla profonda, rappresenti un ormone chiave nella regolazione dell'escrezione renale di sodio ed acqua. E' bene qui sottolineare che la regolazione dell'omeostasi del sodio è influenzata anche da altri ormoni. L'URO in questo complesso sistema svolge non solo una diretta inibizione del trasporto di sodio, ma anche un antagonismo alla secrezione di Renina [48] e di Aldosterone [41][49]. L'URO a livello della muscolatura liscia sembra avere un ruolo nel rilassamento [24]: a seguito di stimolazione di GC (dominio intracellulare guanilil-ciclastico di NPR-A) e produzione di secondo messaggero cGMP, vengono attivate protein-kinasi cGMP dipendenti che agiscono causando una diminuzione della concentrazione di calcio intracellulare che porta a rilassamento del muscolo. Altri autori [50] hanno assegnato all'URO anche un ruolo di modulazione della difesa immunitaria, per l'esistenza di un effetto inibitorio sull'attività dei macrofagi attraverso recettori espressi sugli stessi.

Frammenti proANP: i frammenti circolanti N-terminali del proANP(1-126) da Vesely et al. [51] sono stati chiamati LANH (Long Acting Natriuretic Hormone: Nt-ANP), VDNH (Vessel Dilator Natriuretic Hormone: Md-ANP) e KNH (Kaliuretic Natriuretic Hormone: proANP(79-98)). Il ruolo di questi frammenti nel controllo dell'omeostasi volumetrica è noto già da tempo, in condizioni normali e patologiche [19]. I frammenti LANH e VDNH hanno dimostrato proprietà vasodilatatorie, natriuretiche e diuretiche simili a quelle riscontrate per l' α ANP, la loro azione renale potrebbe essere in relazione all'emodinamica renale ed alla diretta azione tubulare. Meccanismo d'azione e risposta cellulare del LANH non sono stati ancora definiti. A livello urinario sono necessari studi volti a confermare una correlazione tra peptidi e cGMP. In ratti infusi con LANH l'aumento dell'escrezione urinaria di cGMP, espressione ultima di una sua maggiore produzione, è risultata confrontabile

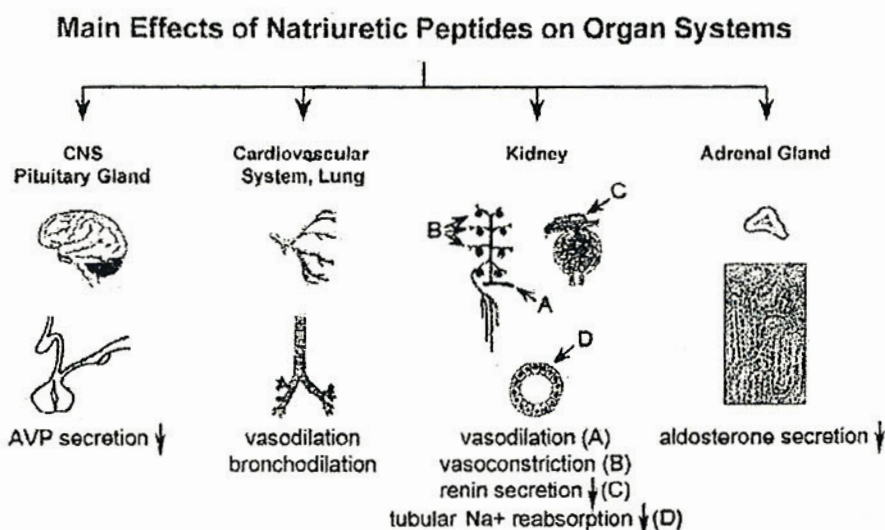


Figura 4
Principali azioni fisiologiche dei peptidi natriuretici in differenti organi e/o sistemi di organi.

con l'aumento osservato nei ratti di controllo [40], per cui sembra manchi il collegamento alla guanilatociclastasi, a differenza di quanto osservato con i recettori per l' α ANP. Il VDNH invece agirebbe a livello tubulare, con inibizione dell'ATPasi Na^+/K^+ basolaterale nel dotto collettore midollare. L'inibizione del trasporto di sodio nel tubulo sembrerebbe essere mediata da un aumento di sintesi di prostaglandina E_2 [42] senza un aumento di cGMP [40]. E' stato suggerito che anche l'LANH possa inibire l'ATPasi Na^+/K^+ , in tessuti corticali di ratto. In conclusione l'LANH nel ratto ha ruolo fisiologico nella regolazione di sodio, potassio, nell'escrezione di acqua e nel controllo della pressione arteriosa. E' stato confermato un ruolo di questi ormoni nella regolazione omeostatica dei fluidi corporei [18]: in pazienti con ipovolemia (insufficienza cardiaca congestizia, insufficienza renale, cirrosi con ascite) è stato osservato un marcato aumento di proANP(1-30) e proANP(31-67) circolanti; l'infusione di questi peptidi ha dimostrato un aumento dell'escrezione renale di sodio e acqua [52]. L'escrezione di sodio sembra sia quindi regolata da un complesso insieme di variabili, importanti tra queste sono la pressione di perfusione renale, forze fisiche intrarenali, attività del nervo renale simpatico, Angiotensina II, Aldosterone e ormoni natriuretici compresi peptidi atriali. Tutte queste variabili possono variare in modo indipendente a seconda delle condizioni fisiologiche. Inoltre, dopo emorragie ed espansione di volume renale, i livelli dovrebbero risultare alterati.

Tutti e tre i frammenti proANP hanno dimostrato proprietà natriuretiche, diuretiche e kaliuretiche, ma l'abilità rispettiva di produrre questi effetti è considerabilmente variabile ed è stata inoltre dimostrata una relazione con le diverse porzioni del rene: prossimale e distale [33].

Veseley et al. [51] hanno riportato che anche nell'ipotalamo è presente mRNA del proANP(1-126), inoltre hanno osservato la capacità dei frammenti proANP di inibire l'asse CRH-ACTH-Cortisolo. E' stata ipotizzata una regolazione positiva del Cortisolo nell'espressione del gene per i peptidi natriuretici, CRH e ACTH che stimolano invece la secrezione degli stessi.

COMPORAMENTO DEI FRAMMENTI DI PRO-ANP IN ATLETI

Freund et al. [53] hanno studiato gli effetti stimolatori dell'esercizio sulla sintesi e secrezione dell' α ANP e dei frammenti proANP, ed hanno ipotizzato che la tachicardia, l'aumento delle catecolamine, lo stress, i cambiamenti della pressione sanguigna fossero causa del loro aumento in circolo. Hanno dimostrato l'influenza dell'intensità dell'esercizio fisico sulle risposte renali: con attività fisica a bassa intensità sono risultate aumentate diuresi, natriuresi con un corrispondente incremento dei peptidi natriuretici circolanti. L'aumento dell'intensità dello sforzo è stata messa in relazione ad una diminuzione della filtrazione glomerulare, aumento di ADH, Renina, Aldosterone. In individui sani non allenati l'esercizio ha causato un aumento dei livelli circolanti di frammenti N-terminali del proANP

ed è stata riscontrata una proporzionalità con l'intensità dell'esercizio, inoltre questi valori sono risultati in correlazione con pressione sanguigna, carico cardiaco, VO_2 max e quoziente respiratorio; dopo l'esercizio, nella fase di recupero, i livelli di questi peptidi sono rimasti elevati [54][55]. Nielsen et al. hanno ipotizzato un aumento dei proANPs nella fase di recupero dopo esercizio intenso [56], hanno inoltre ipotizzato un effetto globale anti-diuretico dell'esercizio acuto derivante da un'induzione nella secrezione di Renina che, attraverso il sistema RAAS (Renin Angiotensin Aldosterone System), influenzerebbe il riassorbimento renale tubulare di sodio. Nello studio è stata anche proposta una risposta all'esercizio acuto più evidente per il frammento Nt-ANP rispetto al Md-ANP. In condizioni basali, in atleti allenati i livelli circolanti di Md-ANP sono risultati più alti rispetto ai controlli. Ambedue queste osservazioni sembrano indicare una relazione con l'emivita e quindi con il tempo di degradazione.

REGOLAZIONI E SISTEMI ORMONALI CORRELATI

URODILATINA: il meccanismo di regolazione dell'escrezione dell'URO non è ancora noto. Variazioni nel carico di sodio plasmatico ed anche la natriuresi osmo-stimolata dipendente dal bilancio del sodio, hanno dimostrato un'influenza sull'escrezione renale di URO [47][57]. L'URO ha dimostrato la capacità di influenzare anche la pressione di perfusione renale suggerendo una possibile sua interazione con il Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS). Forssman et al. [9] hanno posto l'attenzione sul fatto che il carico di sodio cerebrale potrebbe indurre la sintesi di URO, ma hanno escluso un meccanismo neurale (la secrezione dell'ormone si è dimostrata anche in animali denervati) ed hanno ipotizzato una regolazione da parte dei fattori umorali indotti. Altri stimoli, extracellulari o intracellulari, potrebbero essere in grado di regolare il processing renale dell'URO, tra questi l'attivazione di adenilato-ciclastasi, di protein-kinase e l'aumento di calcio intracellulare [58]. Seeger et al. [59] con somministrazioni transdermali di Estradiolo, vasodilatatore indiretto, hanno studiato l'aumento dell'escrezione urinaria di URO in donne in post-menopausa. L' α ANP stessa sembra in grado di influenzare la produzione di URO, ed i suoi livelli plasmatici, normalmente estremamente bassi (9-12 pg/mL), sono risultati aumentati di 135 volte dopo somministrazione di α ANP [10]. I frammenti proANPs non sembra fossero invece in grado di influenzare la produzione di URO. Uno studio recente su topi ha suggerito l'esistenza di relazioni tra Urodilatina e sistema RAAS [60]. La relazione tra i due sistemi (URO e RAAS) non è univoca, infatti è provato che l'Urodilatina, come pure l' α ANP, ha un'azione natriuretica, in parte, grazie all'antagonismo con l'Angiotensina II (AII), sulla permeabilità glomerulare e il riassorbimento di sodio dal tubulo prossimale, in parte con l'inibizione della secrezione di Aldosterone nel tubulo distale. E' da notare, comunque, che sia Urodilatina che AII hanno dimostrato un effetto sulla contrazione delle arte-

riole efferenti renali; questo potrebbe rappresentare un meccanismo atto a preservare le pressioni intraglomerulare e di filtrazione. Per quanto riguarda l'influenza sulla pressione sanguigna, l'URO agisce direttamente con effetto vasodilatatorio o indirettamente attraverso l'inibizione della secrezione di Renina e Aldosterone [61][62][24]. L'URO sembra inoltre in grado di influenzare la secrezione di AVP (Arginina- Vasopressina) [63], probabilmente come conseguenza di ipovolemia e cambiamenti nella pressione sanguigna anche con somministrazioni di URO ad alte dosi.

Frammenti ANP: lo stimolo per la secrezione dei frammenti N-terminali del proANP(1-126), come per l' α ANP, è lo stress della parete atriale, cioè lo stiramento della stessa [64]. Stimolo alla secrezione che si è dimostrato anche in condizioni fisiologiche e/o parafisiologiche come l'immersione in acqua a testa emersa, in gravidanza, durante l'ipervolemia [52][17]. Vesely et al. [51] hanno riportato che il Cortisolo, per up-regolazione dell'espressione genica, causa l'aumento della sintesi dei frammenti (1-30), (31-67), (79-98,) come pure dell' α ANP. Se questi peptidi in circolo potenziano l'espressione genica attuata dal cortisolo, la risposta è una diminuzione nella quota del Cortisolo circolante, e ciò completa un meccanismo di feedback negativo che tra l'altro vede un possibile coinvolgimento del CRH (corticotropin releasing hormone). Quest'ultimo infatti aumenta la secrezione atriale di α ANP da cardiomiociti isolati, quindi è possibile un analogo effetto sui frammenti N-terminali. L' α ANP, in topi, ha inibito il rilascio di ACTH in vivo e vitro, nell'uomo, invece, è stata dimostrata l'inibizione nel rilascio di CRH, stimolante la secrezione di ACTH dall'adenipofisi.

Vesely et al. [65] hanno osservato un feedback negativo dei frammenti proANPs e dell' α ANP sul rilascio di sé stessi e, gli uni sugli altri. Nell'uomo è stata dimostrata l'effettiva influenza reciproca dei frammenti, fino ad un picco di riduzione nel rilascio dell'89% da parte del proANP(1-30) verso l' α ANP. Nelle urine è stato osservato un comportamento simile. Relativamente agli effetti diuretici e natriuretici dei peptidi N-terminali del proormone, Villarreal et al. [66], dopo infusioni intrarenali di proANP(31-67) in cani anestetizzati, hanno dimostrato una diminuzione della secrezione di Renina (-66%) associata ad un aumento nella clearance di creatinina, del flusso sanguigno renale, dell'escrezione di sodio e del flusso urinario. I frammenti hanno dimostrato comportamenti contrastanti per il sistema RAAS. I tre frammenti, assieme all' α ANP, concorrono all'inibizione della secrezione di Aldosterone [67]. In soggetti sani l'infusione di proANP(79-98) ha causato una marcata diminuzione della concentrazione plasmatica di Aldosterone, il proANP(1-30) ha mostrato analogo significativo effetto, mentre il proANP(31-67) non sembra influenzare la secrezione dell'ormone. Questo comportamento si è osservato anche nelle urine. Dal confronto con l' α ANP, sembra che i frammenti inibiscano più a lungo la secrezione di Aldosterone, forse in relazione alla loro maggiore emivita.

APPLICAZIONI CLINICHE ED AZIONI FARMACOLOGICHE

Urodilatina

Insufficienza renale e/o trapianto d'organo

Inizialmente è stato dimostrato che il preparato sintetico URO (INN: Ularitide) poteva essere un farmaco proposto in situazioni di insufficienza renale acuta, con finalità di terapia e profilassi.

L'insufficienza renale acuta (ARF: acute renal failure), dopo gli interventi chirurgici maggiori, è una frequente complicanza post-operatoria per alterazioni dell'emodinamica, per ischemia o vasocostrizione [24]. L'effetto vasocostrittivo farmacologico della Ciclosporina sulla circolazione arteriosa può essere la causa dell'ARF in fase post-operatoria dopo il trapianto d'organo [68]. L'URO è stata proposta per l'azione vasorilassante sulla muscolatura liscia vascolare nel rene ed è stata usata per la prevenzione e la terapia di ARF [28] dopo trapianto d'organo e di midollo osseo [69]. Saxenhofer et al. [70] hanno studiato l'efficacia del farmaco a livello renale ed hanno dimostrato, dopo iniezioni di URO in bolus in soggetti sani, induzione della diuresi e natriuresi due volte maggiore, se confrontata con quella seguente la somministrazione esogena di α ANP in dosi equimolari. Per produrre un effetto ipotensivo con URO sono invece necessarie dosi maggiori rispetto a quelle dell' α ANP. Carstens et al. [63] hanno studiato le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche dell'infusione intravenosa di URO in soggetti sani ed hanno dimostrato un aumento significativo della GFR, del flusso plasmatico renale, e del flusso urinario. Gli effetti dell'URO sono stati studiati in relazione al sodio della dieta ed è stata dimostrata induzione della diuresi e natriuresi, in modo dose-dipendente dal carico di sodio [47][49]. L'uso di URO in pazienti sottoposti a HTx (heart transplantation) ha dimostrato una riduzione significativa di ARF (Hummel et al. [71]). Cedidi et al. [72] hanno studiato l'azione farmacologica dell'Urodilatina in pazienti ARF sottoposti a LTx (liver transplantation) ed hanno confermato effetti benefici in terapia e profilassi con basse dosi di infusione di URO.

Cardiopatie

L'uso dei peptidi natriuretici in disturbi cardiovascolari e specialmente nell'insufficienza cardiaca (HF: heart failure) è stato proposto da più Autori. In pazienti con HF congestizia appartenenti alle classi NYHA III-IV (classificazione delle cardiopatie secondo la New York Heart Association) la somministrazione intravenosa di URO ha dimostrato un aumento dell'indice cardiaco e della frequenza cardiaca, con diminuzione della pressione arteriosa polmonare, della resistenza vascolare polmonare e sistemica [73][74][75]. Uno studio di Elsner et al. [76] ha confermato che le infusioni di URO diminuiscono significativamente la pressione sistolica e la pressione venosa

centrale, inoltre si è osservato un significativo aumento di flusso urinario ed escrezione di sodio. Questi effetti sono risultati accompagnati da un incremento nella concentrazione plasmatica ed urinaria di cGMP [24].

Broncocostrizione ed asma acuta

L'attività broncodilatatoria dell'Urodilatina è considerata una via alternativa all'utilizzo di farmaci β_2 agonisti, come l'Albuterolo (che agiscono attraverso la produzione di cAMP) [24]. Benefici effetti sono stati dimostrati in ratti [48]. Flüge et al. [77] hanno dimostrato, in soggetti asmatici stabili, un miglioramento significativo nella terapia di broncodilatazione, con l'attivazione combinata di vie mediate da cGMP e cAMP, a seguito di infusioni intravenose di URO in combinazione con Albuterolo. In pazienti con asma acuta, la simultanea applicazione di Salbutamolo inalato e URO intravenosa a basse dosi, ha dimostrato marcata broncodilatazione, maggiore rispetto agli effetti ottenuti con monoterapia con altri farmaci [78]. Urodilatina ha dimostrato dilatazione delle vie aeree centrali e dei bronchioli periferici, il massimo effetto di somministrazioni intravenose si è confermato clinicamente confrontabile con 1.25 ng di Salbutamolo [78].

Frammenti proANP

Insufficienza renale e/o trapianto d'organo

Franz et al. [18] hanno dimostrato un chiaro aumento di proANP(31-67) urinario come pure di proANP(1-30) in pazienti con insufficienza renale, è stato osservato un aumento dei livelli fino a tre/quattro volte quelli dei soggetti sani. Le concentrazioni plasmatiche e urinarie erano influenzate da insufficienza renale, ma non dalla proteinuria di per sé. L'ipertensione, il trattamento immunosoppressivo, ma anche l'età, possono essere causa di alte concentrazioni plasmatiche e urinarie di frammenti N-terminali del proANP. Gli stessi Autori in pazienti sottoposti a trapianto di rene (Rtx ortotopico) hanno dimostrato concentrazioni dei frammenti proANP(1-30) e proANP(31-67) sia nel plasma che nelle urine significativamente più alte rispetto ai valori misurati in soggetti di controllo. Ciò potrebbe essere posto anche in relazione al fatto che i trapiantati continuavano il trattamento con glucocorticoidi (prednisone) o ciclosporina, e ciò poteva essere una causa dell'aumento dei livelli dei peptidi in circolo. Le concentrazioni urinarie del frammento proANP(31-67) sono risultate significativamente più elevate (di 5.5 volte in Rtx, 2 rispetto ai controlli) rispetto a quelle del peptide N-terminale (Nt-ANP).

Cardiopatie

In pazienti affetti da cardiopatia a vari livelli di classi NYHA, Winters et al. hanno proposto le variate concentrazioni di Md-ANP come marker per riconoscere soggetti cardiopatici appartenenti alla classe NYHA I dai soggetti sani [17]. Secondo questi Autori le concentrazioni plasma-

tiche circolanti del Md-ANP più alte sarebbero in relazione all'emivita maggiore del frammento in circolo rispetto a quella dell' α ANP. Da queste premesse queste analisi sarebbero da raccomandare in quanto questi indicatori biochimici sembrano più attendibili specialmente durante il trattamento dell'insufficienza cardiaca. Queste misure possono essere inoltre consigliate nella diagnosi dell'insufficienza cardiaca (la classe NYHA I è comunque di difficile definizione) poiché i pazienti NYHA I, appartenenti a questa classe, sembrano dimostrare concentrazioni plasmatiche significativamente elevate del frammento Md-ANP. Hunter et al. [79] hanno provato, in pazienti cardiopatici, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di Md-ANP e proANP(79-98) nel confronto con soggetti sani. La misura dei due frammenti sembra permetta di distinguere pazienti NYHA II-IV dai soggetti sani; ma, a differenza dagli Autori precedenti, il solo frammento proANP(79-98) distingue pazienti con lievi cardiopatie (NYHA I). Anche altri gruppi di ricerca, hanno studiato le cardiopatie ricercando il frammento che meglio predicesse l'appartenenza ad una classe NYHA. Smith et al. [80] hanno misurato le concentrazioni plasmatiche del frammento proANP(1-98) ed hanno osservato nei cardiopatici una relazione con la severità della patologia. Hanno proposto la misura di questo peptide come metodo per la diagnosi di cardiopatia nella pratica generale. Anche Lerman et al. [81] e Dickstein et al. [82] hanno confermato il proANP(1-98) come utile marker diagnostico nella definizione di appartenenza alla classe NYHA I. Rispetto ad altri ormoni, questo frammento è stato proposto come miglior marker di laboratorio per la previsione della sopravvivenza, in pazienti con insufficienza ventricolare sinistra (LVEF), sia prima che dopo infarto al miocardio [83]. Altri autori [84] hanno pure proposto la misura del proANP(1-98) per neonati con ischemia coronarica [85]. Azizi et al. [86] invece hanno suggerito il Md-ANP come migliore marker biochimico per la diagnostica dell'insufficienza cardiaca congestizia.

Il problema rimane ancora irrisolto, si può comunque concludere che tutti i frammenti N-terminali proANP(1-30), proANP(31-67) e lo stesso proANP(1-98) possano occupare un ruolo importante come indicatori biochimici di disfunzioni cardiache.

Danno al mioscheletro

In pazienti con danno al mioscheletro Onoua et al. [87][88] hanno dimostrato un aumento dei livelli plasmatici di Nt-ANP, mentre non hanno osservato variazioni dell' α -ANP; il rapporto molare Nt-ANP α ANP è risultato circa 10. Questi Autori hanno proposto come causa del fenomeno osservato lo stress in associazione al trauma.

Ipotiroidismo

In pazienti ipotiroidici gravi Bernstein et al. [89] hanno dimostrato una diminuita concentrazione plasmatica di proANP(1-98). I livelli si sono normalizzati dopo la terapia

di tiroxina (T4) e ciò non sembra dipendere dall'emodinamica cardiaca dell'ipotiroidismo. E' da chiarire se sia la deficienza dell'ormone tiroideo la causa primaria o se il fenomeno sia secondario a cambiamenti nell'emodinamica. E' stato comunque suggerito che gli ormoni tiroidei in sé siano responsabili dell'aumento e ciò sia da porre in relazione ad un aumento della sintesi piuttosto che del rilascio di ormoni natriuretici atriali.

METODI DI MISURA

I metodi di analisi comunemente usati per la misura della concentrazione dei peptidi natriuretici atriali (pNA) nei fluidi biologici sono immunometrici di tipo competitivo (RIA) o non competitivo (IRMA). Queste misure possono richiedere una procedura di arricchimento del campione biologico quando la sensibilità analitica non permette l'uso diretto del campione di siero e/o urine. Inoltre talvolta è la stessa matrice biologica, per le sue caratteristiche intrinseche (ad esempio l'urina), che non è utilizzabile direttamente per l'analisi. Questo aspetto si deve perciò tenere presente nella scelta del metodo analitico. Nel caso dei pNA sono presenti in letteratura metodi che richiedono un preliminare trattamento del campione (ad esempio estrazione in fase solida SPE) ma sono stati anche proposti metodi con l'uso di campione biologico senza alcun trattamento. In letteratura si evidenzia che, quando è richiesta la procedura di estrazione dei pNA con tecnica SPE, il campione in genere impiegato è di almeno 1 mL di plasma ed è molto importante in queste procedure considerare i recuperi [90]. Con i metodi che non richiedono estrazione sono sufficienti minori quantità di campione di plasma (ad esempio = 0.1 mL). Per l'analisi di frammenti N-terminali del pro-ormone degli pNA sono stati proposti interessanti metodi immunoenzimatici competitivi (EIA) o a sandwich (IEMA) che hanno la positiva caratteristica di non richiedere preventiva estrazione del campione biologico. L'analisi di frammenti N-terminali di pNA richiede un'attenta valutazione delle caratteristiche dell'anticorpo, infatti, specialmente se policlonale, si potrebbe dimostrare cross-reattività tra molecole della stessa famiglia. Mentre i metodi che richiedono una fase di estrazione del campione biologico, oltre a permettere l'eliminazione di interferenze, danno la possibilità di meglio verificare l'esistenza di cross-reattività tra ormone attivo e frammenti.

FRAMMENTI ANP

Di seguito sono descritti i metodi di analisi per i vari frammenti della famiglia, derivati dal precursore pro-ormone proANP(1-126): proANP(1-98), proANP(1-30), proANP(31-67) e proANP(79-98).

α ANP (ANP 99-126)

In letteratura sono presenti diversi metodi RIA per la misura del peptide α ANP plasmatico. Il gruppo di Marumo F. et al. [91] ha proposto una analisi senza pre-trattamento del campione di plasma. Il metodo utilizza anticorpi di coniglio anti- α ANP(1-28) ed il tracciante [125 I] α ANP. Le

frazioni libera/legata sono separate per aggiunta nel medium di reazione di γ -globulina di capra (anti-IgG di coniglio) e polietilenglicole (PEG 5%).

Un metodo RIA analogo è stato proposto da Yandle TG. et al. [92] e, a differenza del precedente, il campione di plasma è estratto in fase solida (SPE). Le colonnine impiegate sono Sep-Pak C-18, attivate con metanolo ed acido acetico 4%. L' α ANP trattenuto in colonna è eluito con etanolo-acqua-acido acetico (80-20-4), si aggiunge Triton X-100 (1%) alla frazione estratta prima di procedere all'essiccazione. E' utilizzato anticorpo anti- α ANP(1-28) di coniglio e [125 I] diiodotirosil- α ANP come tracciante radioattivo. L' α ANP libero e legato sono separati per centrifugazione e precipitazione dopo aggiunta di una soluzione di siero di coniglio ed antisiero di capra anti-coniglio; è misurata la radioattività del precipitato con un γ -counter.

Anche Rosmalen FMA. et al. [93] propongono un metodo che utilizza l'estrazione con Sep-Pak C-18: la frazione è estratta con miscela di acido acetico (96%) ed etanolo (86%) nel rapporto 4:96 (vol/vol). L'anticorpo anti- α ANP proviene da pecore ed il tracciante è [125 I] monoiodotirosil- α ANP. La separazione libero/legato avviene per formazione di un complesso precipitante costituito da siero di pecora, siero di cavallo anti-pecora e PEG-6000 in tampone borato.

Anche Polesi C. et al. [94] hanno proposto un metodo radioimmunologico in cui 2 mL di campione di plasma sono estratti con colonnine Superclean LC18. L' α ANP è eluito con metanolo ed acido trifluoroacetico (0.5%) ed è aggiunto Triton X-100 prima dell'essiccazione. Il campione essiccato è disciolto con il tampone di reazione prima dell'analisi. Sono utilizzati anticorpi anti- α ANP di coniglio, e la separazione libero/legato si ottiene dopo aggiunta di antisiero di pecora anti-IgG di coniglio e PEG (80 mL/L).

Lindberg BF. et al. [95] estraggono il campione di plasma con Sep-Pak C-18 ed eluiscono con acetonitrile TFA 0.1% (80/20). Sono impiegati anticorpi di coniglio e la separazione libero-legato si ottiene con carbone attivo -destrano.

Per la determinazione di α ANP nel plasma sono stati proposti anche metodi di tipo immunoradiometrico non competitivo (IRMA two site). I gruppi di Lewis HM. et al. [96] e Tattersall JE. et al. [97] hanno messo a punto metodi di analisi senza alcun trattamento del campione ed utilizzano anticorpi di coniglio anti-ANP(99-126) marcati con iodio radioattivo ed adesi a micro-piastre. Tattersall JE. et al. [97] hanno dimostrato che la sensibilità del metodo permette di evidenziare un decremento posturale del peptide α ANP nel passaggio dalla posizione supina a quella eretta. Nella tabella 1 sono riportati i valori misurati in soggetti in posizione supina.

ProANP(1-98)

Alcuni autori hanno proposto un metodo immunometrico non competitivo in fase eterogenea (IRMA two site) [98][99] con l'uso di due anticorpi monoclonali, specifici diretti verso due diversi epitopi stericamente distanti del pro-ormone. Questi anticorpi riconoscono le zone pro-ANP(1-25) e proANP(43-66) per cui il metodo non misura

Tabella 1

Metodi, medie e/o intervalli di riferimento delle misure dei peptidi NP presenti in letteratura

Frammento	Metodo	Autori (anno)	Soggetti sani studiati	Media \pm DS (SEM) / (range) plasma/urina
α ANP	RIA	Marumo P (1986)	124	32 \pm 12 pg/mL plasma (10-60)
		Yandle TG (1986)	19	14 \pm (1) pmol/L plasma (5-24)
		Rosmalen FMA (1987)	25	26 \pm 15 pg/mL plasma
		Polesi C. (1989)	32	33 \pm (4) pg/mL plasma (9-70)
		Lindberg BF (1992)	19	7.4 \pm 1.3 pmol/L plasma (1.9-22.6)
	IRMA	Lewis HM (1989)	10	66 \pm (1) pmol/L (SEM) plasma (2.7-17.3)
		Tattersall JE (1998)		9 pmol/L (SEM) plasma (5.4-18.6)
proANP (1-98)	IRMA	Numata Y (1998)	33	188 \pm 71 pmol/L plasma
	ELISA	Missbichler A (2001)	336	<1945 pmol/L plasma
		*	76	939 \pm 521 pmol/L plasma
proANP (1-30)	RIA	Sundsford JA (1988)	34	420 \pm 157 pmol/L plasma
		Buckley MG (1989)	25	235 \pm 19.2 pg/mL plasma
	EIA	Hartter E (2000)	115	(0.11-0.47 nmol/L) plasma
		Hartter E (2000)	115	(<0.03-1.1 nmol/L) urina
		*	76	334 \pm 159 pmol/L plasma
		*	39	83 \pm 42 pmol/L urine
proANP (31-67)	EIA	Hartter E (2000)	115	(0.18-0.79 nmol/L) plasma
		Hartter E (2000)	115	(0.1-1.7 nmol/L) urina
		*	76	457 \pm 324 pmol/L plasma
		*	39	414 \pm 256 pmol/L urina
	RIA	Buckley MG (1994)	36	547 \pm 33 pg/mL plasma
URO	RIA	Solc J (1991)	10	9.5 \pm 4.8 pg/mL urina
		Meyer M e al. (1998)	8	110 \pm 81 ng/L urina
BNP	RIA	Mukoyama M. (1991)	11	0.9 \pm 0.1 fmol/mL plasma
		Jensen KT (1997)	124	1.8 \pm 1.0 pmol/L plasma
	IRMA	Clerico A (1997)	56	8.6 \pm 8.2 ng/mL plasma (0.5-38 ng/L)
proBNP (1-76)	RIA	Hunt PJ (1997)	26	10.8 \pm 1.3 pmol/L plasma

* = dati ottenuti dal nostro laboratorio con metodo ELISA (E F De Palo 2000)

i singoli frammenti proANP(1-30) o proANP(31-67) derivanti da un ulteriore taglio proteolitico del proANP(1-98). La separazione dell'antigene libero/legato avviene per precipitazione con centrifugazione. Il metodo non prevede pre-trattamento del campione.

E' stato proposto recentemente un kit (Biomedica-Austria) per l'analisi ELISA [100] su micro-piastre pre-adese con un anticorpo [capture-antibody (C-Ab)] in grado di riconoscere specificamente la sequenza proANP(16-23). Il campione o lo standard è aggiunto nel pozzetto simultaneamente ad un secondo anticorpo [detection-antibody (D-Ab)], specifico per la sequenza proANP(80-88) e legato a biotina. Il proANP(1-98) del campione (o standard) si legherà al primo (C-Ab) ed al secondo (D-Ab) anticorpo formando un sandwich. Per la rivelazione, dopo opportuno lavaggio del pozzetto, l'aggiunta di streptavidina-perossidasi porta alla formazione del sandwich che, in presenza del substrato tetrametilbenzidina (TMB) e di acqua ossigenata forma l'addotto evidenziabile a 405 nm. Il test è proposto per l'analisi del peptide presente sia nel plasma

che nel siero umano, nel nostro laboratorio sono in corso prove per la misura anche nelle urine.

ProANP(1-30) [Nt-ANP]

In letteratura sono descritti metodi RIA che impiegano plasma estratto in fase solida (SPE solid phase extraction) [101][102]. L'estrazione avviene con colonnine pre-impaccate con resina C18, e l'eluato, ottenuto con 4.5 ml di etanolo acidificato (4% acido acetico /80% etanolo in acqua), è essiccato e successivamente rigenerato per l'analisi in tampone di reazione (RIA buffer). Sono stati impiegati anticorpi Ab policlonali di coniglio, specifici per la regione N-terminale del proANP(1-126). Analoghe procedure sperimentali sono proposte per preparare il proANP(1-30) marcato con ¹²⁵I. La separazione dell'antigene libero/legato è ottenuta per precipitazione del complesso antigene-anticorpo per formazione di una macromolecola ottenuta con un secondo Ab di capra, anti-Fc di IgG di coniglio. La precipitazione per centrifugazione e separazione finale del trimero (complesso 1^anticorpo-antigene--2^anticorpo) si è ottenuta dopo aggiunta di PEG8000

o di PEG6000 e γ -globulina.

Alcuni autori hanno proposto un metodo EIA immunoenzimatico in fase eterogenea. La competizione tra l'antigene standard o incognito nel campione e quantità costanti di antigene biotinilato non prevede con questo metodo un pre-trattamento del campione [36]. Il kit commerciale usa micropiastre con adesivo un anticorpo anti-Fc. Viene aggiunto un secondo anticorpo specifico per il proANP(1-30) o proANP(31-67). La competizione per i siti anticorpali avviene tra l'antigene libero e l'antigene contenente il gruppo biotina. La biotina reagirà con la streptavidina contenente l'enzima perossidasi ed il composto formato presente alla fine nel pozzetto, dopo aggiunta del substrato TMB e cofattore H_2O_2 porterà alla formazione del prodotto di reazione evidenziabile spettrofotometricamente. Il test è proposto per analizzare il peptide nel plasma, siero ed urine.

ProANP(31-67) [Md-ANP]

Buckley et al. [103] hanno descritto un metodo RIA con estrazione SPE (SepPack C18) del campione di plasma (2.0 ml) prima dell'analisi. Gli estratti dal plasma sono rigenerati in tampone di reazione (RIA buffer) prima dell'analisi. Gli anticorpi utilizzati sono stati Ab policlonali specifici per la regione N-terminale del proANP(1-126), ottenuti da conigli. E' stata misurata la cross-reazione con proANP(1-30) e con l' α ANP ed i risultati hanno confermato una trascurabile cross-reazione. Il metodo RIA ha impiegato proANP(31-67) marcato con ^{125}I e la separazione dell'antigene libero da quello legato è ottenuta per aggiunta di γ -globulina (10 g/l) e PEG6000 e decantazione dopo centrifugazione del precipitato.

URODILATINA

Per l'analisi quantitativa di URO in campioni biologici sono stati proposti metodi differenti ed in genere la letteratura riporta un pre-trattamento del campione. Solc et al. [104] hanno utilizzato tecniche cromatografiche per eliminare le interferenze e la cross-reattività tra URO ed ormone attivo ANP(99-126). La frazione cromatografica corrispondente alla zona di eluizione dell'ormone URO standard era analizzata con un metodo RIA con l'uso di un anticorpo diretto contro la regione C-terminale della molecola. L'analisi era eseguita su campioni di urine, acide per aggiunta di HCl 2M, sottoposte ad estrazione SPE con cartucce SepPack C18. L'eluato ottenuto dall'estrazione è essiccato e liofilizzato. Al momento dell'analisi l'essiccato è rigenerato in tampone di reazione.

La tecnica RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) è impiegata per separare la frazione contenente l'URO dall'ANP(99-126) nel metodo RIA proposto da Drummer et al. [45] che ha utilizzato Ab policlonale di coniglio ed ha dimostrato bassa cross-reattività con l'ormone ANP(99-126). La separazione libero/legato avviene per precipitazione con soluzione di NaCl 0.9% e centrifugazione. Le urine per l'analisi, estratte in etanolo assoluto (1:3), erano sottoposte a centrifugazione e liofilizzazione del super-natante. Anche il plasma era acidificato e successivamente sottoposto ad estrazione SPE. L'eluato contenente il peptide ormonale era essiccato e conservato a $-20^\circ C$ fino all'analisi. Prima dell'analisi il

campione essiccato era rigenerato in tampone di reazione.

Carstens et al. [41] hanno proposto la cromatografia di affinità per purificare l'anticorpo policlonale di coniglio (affinity purified Ab). L'analisi prevede una prima incubazione dell'anticorpo con il campione standard/incognito cui era poi aggiunta di una soluzione contenente l'Ag*. La separazione della frazione di antigene libero da quello legato all'anticorpo ha impiegato un secondo anticorpo di maiale anti-Fc di coniglio. La soluzione con le frazioni libere è decantata dopo centrifugazione e precipitazione del macro-complesso trimerico eterogeneo e ciò era favorito per aggiunta di poli-etilen-glicole (PEG). Il campione di urine sottoposto all'analisi era estratto in etanolo assoluto (1:1.5), ed il super-natante, dopo centrifugazione, era liofilizzato. La risospensione del precipitato in tampone di reazione rappresentava il campione da sottoporre all'analisi.

Un interessante metodo è stato messo a punto da Meyer et al [105] che hanno studiato più antisieri e propongono l'uso di un antisiero policlonale di pecora, definito S70/94, che oltre a dimostrare il titolo più alto (1:240000) tra quelli saggiati, aveva dimostrato anche assenza di cross-reattività (<0.01%) con ANP(99-126). La separazione libero/legato si è ottenuta per centrifugazione e separazione di un macrocomplesso (Ag-Ab₁-Ab₂) che si forma per reazione con un secondo Ab di scimmia, anti-Fc di pecora e dopo aggiunta di PEG. Il campione di urina impiegato per l'analisi era diluito in tampone di reazione (1:2, 1:4) immediatamente prima del test. Il campione di plasma era invece utilizzato senza alcun trattamento. Lo stesso anticorpo (S70/94) è stato anche studiato nel nostro laboratorio per verificare la sua capacità di essere impiegato in un metodo immunoenzimatico competitivo (EIA) per l'analisi dell'URO ed il campione di urine non richiedeva alcuna preparazione. Le piastre utilizzate sono state pre-adesive con anticorpo di asino anti-pecora. Il tracciante è peptide sintetico contenente la biotina. La reazione per ottenere un segnale analitico si ha con l'utilizzo di streptavidina perossidasi che riconosce e lega la biotina del tracciante e tramite successiva aggiunta del substrato TMB. La procedura analitica è ancora in fase di studio.

Frammenti BNP

BNP

Per lo studio di questo peptide sono stati proposti metodi di analisi RIA ed IRMA. Mukoyama M et al. [106] propongono un RIA con estrazione del campione in colonnine Sep-Pak C-18 ed uso di anticorpi di topo BALB/c che riconoscono il frammento BNP(83-108). La separazione libero/legato avviene con l'aggiunta di charcoal - destrano.

Jensen KT. et al.[107] hanno ripreso lo stesso metodo RIA, ma gli anticorpi sono di coniglio e la separazione libero/legato si ha per aggiunta di gammaglobuline di maiale (1.5%) e PEG (+ Tween 20 0.5%).

Uno specifico test immunoradiometrico non competitivo (IRMA) è stato invece proposto da Clerico A et al. [108],

questo metodo IRMA non richiede una preliminare estrazione o purificazione del campione plasmatico. La procedura con la formazione di un sandwich in fase eterogenea (fase solida) ha utilizzato due anticorpi monoclonali preparati contro due differenti epitopi del peptide .

proBNP(1-76)

Hunt PJ et al [109] hanno messo a punto un metodo immunometrico RIA per la determinazione di proBNP(1-76) in plasma umano con l'impiego di un antisiero di coniglio, anti-proBNP(1-13) umano. Il frammento proBNP(1-13) marcato con ^{125}I era incubato a concentrazione costante con soluzioni standard di proBNP(1-21). L'analisi di campioni incogniti di plasma prevedeva l'estrazione SPE, la liofilizzazione e successiva risolubilizzazione con tampone del test prima dell'analisi. Per la separazione della frazione contenente l'ormone libero da quello legato è stato impiegato un secondo anticorpo di asino anti-Fc di IgG di coniglio.

Karl J et al. (1999) [110] hanno proposto un metodo SANDWICH EIA senza pre-trattamento del campione. La fase solida (micropietra) con adesa streptavidina è posta ad incubare con due differenti anticorpi che sono aggiunti assieme al campione o allo standard. Il primo anticorpo è specifico per riconoscere la zona proBNP(1-21) e contiene la biotina, l'altro è specifico per la zona proBNP(30-38) ed è legato alla digoxigen. L'immunocomplesso che si viene a formare si lega alla fase solida attraverso l'anticorpo-biotinilato e la sua misura quantitativa si ha per l'aggiunta di anti-Dig-coniugato a POD e del substrato ABTS. Il test è proposto per l'analisi del peptide nel plasma.

Recentemente è stato introdotto in commercio un kit per l'analisi del peptide che utilizza un metodo EIA [111] per il quale le micropiastre sono pre-adese con anticorpi purificati specifici per il proBNP(8-29). La competizione avviene tra peptide del campione (o dello standard) e peptide contenente perossidasi di rafano (tracciante) per i siti anticorpali. La soluzione del substrato TMB per la reazione enzimatica è quindi impiegata per la misura quantitativa del peptide plasmatico.

La tabella 1 riporta schematicamente i metodi di letteratura qui descritti con l'indicazione dei valori medi (range o deviazione standard) misurati dai singoli Autori. Sono anche riportati i valori misurati nel nostro laboratorio. La tabella 2 riporta, per i metodi proposti, anche le variabilità ed i limiti di sensibilità.

Modalità di raccolta, conservazione e trattamento dei campioni biologici per l'analisi dei composti pNA

Tipi di campione (plasma siero e urine) e loro conservazione

Il campione utilizzato per l'analisi può essere plasma, siero o urina. Il sangue venoso viene in genere raccolto in provette contenenti EDTA e/o aprotinina e centrifugato immediatamente, quindi viene prelevato il plasma che viene conservato in aliquote a -20°C . L'urina viene raccolta, aliquotata e conservata a -20°C , in genere il campione

di l'urina è scongelato e centrifugato prima dell'analisi.

La vita media degli ormoni della famiglia dei peptidi natriuretici, in urina o sangue, è differente e dipende dall'affinità di questi frammenti per i recettori di clearance. Anche la presenza di proteasi nel liquido biologico dovrebbe essere analizzata. Il BNP dimostra emivita biologica di circa 20 minuti, un tempo 7 volte maggiore rispetto a quello dell' αANP che è di circa 3-4 minuti, questo è dovuto soprattutto alla bassa affinità del BNP per gli NPR-C e per l'enzima NEP (neutral endopeptidase). L'emivita dei Nt-proANP è di circa 1 ora in circolo, mentre l'Nt-proBNP ha dimostrato un'emivita di circa 2 ore [90].

La stabilità dell' αANP , nel campione raccolto in provette contenenti EDTA e aprotinina (inibitore di proteasi plasmatiche) e conservato a temperatura ambiente, è solo di 2 ore. Nt-proANP presenta una stabilità per tempi più lunghi rispetto a quella di tutti gli altri pNA. Questo ormone può essere misurato in un campione plasmatico con EDTA, conservato a temperatura ambiente, fino a 4 giorni dal prelievo. Il BNP è stabile in sangue con EDTA per 24 ore, ma l'aggiunta di aprotinina porta la stabilità a 3 giorni a temperatura ambiente. Nt-proBNP è stabile nel plasma per EDTA per 6 ore a temperatura ambiente, ma questo tempo può essere prolungato a 48 ore con l'aggiunta di aprotinina [112][90].

Condizione del paziente/soggetto per il prelievo raccolto

È importante questo aspetto perché il dato possa essere più significativo, per questo è richiesto che il paziente, al momento della raccolta del campione di sangue da analizzare, sia in posizione supina o seduto, inoltre deve essere in questa posizione da almeno 15-20 minuti. È anche importante che il soggetto sia a riposo infatti l'esercizio è in grado di influenzare significativamente i livelli di questi ormoni. Per diminuire l'effetto delle fluttuazioni diurne, il campione di sangue deve sempre essere prelevato nello stesso momento del giorno per tutte le misure che si vogliono eseguire. Se il paziente fosse sottoposto ad una terapia farmacologica per l'HF, considerato che alcuni farmaci (glucocorticoidi, ormone tiroideo, diuretici, etc.) possono influenzare i livelli plasmatici degli pNA, è importante che il prelievo avvenga in tempi lontani dall'assunzione di farmaci e sarebbe opportuno che la raccolta del sangue avvenisse prima dell'inizio della terapia scelta per l'insufficienza cardiaca [90].

Questi nostri suggerimenti nascono da esperienze personali, ma anche da dati di letteratura che hanno dimostrato gli effetti della postura del paziente al momento del prelievo. Boomsma F et al [113] hanno studiato la variazione della concentrazione di peptidi natriuretici in relazione a diverse condizioni di raccolta del sangue: direttamente dopo 30 min. di riposo a sedere, dopo 30 min. di riposo distesi a letto, dopo 30 min. in piedi o di cammino. I risultati suggeriscono che le modalità del prelievo avvengano dopo un sufficiente periodo di riposo a sedere o a letto (circa 30 minuti). Invece la misura del BNP e Nt-proANP non sembrano variare allo stesso modo, per cui la raccolta può essere anche al momento dell'arrivo del paziente in ambulatorio.

Tabella 2*Metodi e prestazioni presenti in letteratura per l'analisi di peptidi della famiglia ANP/BNP*

Peptide	CV intra-assay	CV inter-assay	Limite di sensibilità	(1)
αANP				
RIA (Marumo P et al. 1986)	7% (n=10) 13.7 pg/mL	6.2% (N=10) 13.7 pg/mL	0.3 pg/tube	-
RIA (Yandle TG et al. 1986)	10.1% (n=6) 19.2 pmol/L	13.8% (n=11) 21 pmol/L	0.6 fmol/tube	+
RIA (Rosmalen FMA et al. 1987)	9% (n=7) 12.6 pg/mL	12% (n=6) 21.7 pg/mL	0.8 pg/tube	+
RIA (Polesi C et al. 1989)	6% (n=12) 140 ng/L	11% (n=10) 140 ng/L	5 ng/L	+
RIA (Lindberg BF et al. 1992)	9% (n=13) 7.5 pmol/L	15.4% (n=13) 7.5 pmol/L	0.19 fmol/tube	+
IRMA (Lewis HM et al. 1989)	7% (n=25) 7.9 pmol/L	9% (n=30) 20.5 pmol/L	2 pmol/L	-
IRMA (Tattersall JE et al. 1998)	5% (n=11) 84 pmol/L	10.2% (n=11) 84 pmol/L	0.96 pmol/L	-
ProANP (1-98)				
IRMA (Numata Y et al. 1998)	<2.9% (n=5)	<5.1% (n=10)	15 pmol/L	-
IRMA (Clerico A et al. 1999)	<15%	<15%	0.65 pmol/L	-
ELISA (Missbichler A et al. 2001)	6% (n=20)	7% (n=5)	50 fmol/ml	-
proANP (1-30)				
RIA (Buckley MG et al. 1989)	12% (n=9)	15.6% (n=10)	78.1 pg/tube	+
RIA (Sundsford S et al.)	<12% (n=15)	<12% (n=15)		+
EIA (Hartter E et al. 2000)	5% (n=10)	9% (n=6)	2.5 pmol/L	-
proANP (31-67)				
RIA (Buckley MG et al. 1994)	11.9% (n=10)	18.9% (n=9)	39.1 pg/tube	+
EIA (Hartter E et al. 2000)	6% (n=12)	9% (n=6)	10 pmol/L	-
Urodilatina				
RIA (Solc J et al. 1991)	6.2% (5.96 pg/tube)	15.4% (8.34 pg/tube)	1.9 pg/tube	+
RIA (Drummer C et al. 1993)	12% (urine)	8% (urine)	7 pmol/L	+
RIA (Carstens J et al. 1997)	6.7% (200 pmol/L)	14.1% (200 pmol/L)	0.5 fmol/tube	+
RIA (Meyer M et al. 1998)	8.2% (n=24) (269 ng/L)	9.7% (n=12) (239 ng/L)	10.5 ng/L	+
BNP				
RIA (Mukoyama M et al. 1991)	8.4% (n=8)	6.4% (n=8)	0.3 fmol/mL	+
RIA (Jensen KT et al. 1997)	8.0% (n=24) (1.2 pmol/L)	12.9% (n=24) (1.2 pmol/L)	0.55 pmol/L	+
IRMA (Clerico A et al. 1997)	8.0% (n=16)	11.4% (n=14)	2 ng/mL	-
proBNP (1-76)				
RIA (Hunt PJ et al. 1997)	13% (n=10) (283 pmol/L)	11% (20 pmol/L)	6 pmol/L	+
ELISA (Karl J et al. 1999)	5.7% (50 pmol/L)	15.8% (n=10) (15 pmol/L)	2.7 pmol/L	-
EIA (Missbichler A et al. 1999)	6.5% (n=26) (320 fmol/ml)	4.4% (n=3) (320 fmol/ml)	5 fmol/ml	-

(1): Estrazione del campione

Considerati gli aspetti emodinamici, alcune ricerche hanno verificato effetti sui livelli di α ANP e Nt-proANP dopo immersione in acqua a testa emersa [114] o del tilt-test a testa in basso [55]. Anche l'esercizio fisico è in grado di influenzare questi livelli [53-54-56] ed anche per questo è importante standardizzare la raccolta per diminuire la variabilità del dato.

Tipo di conservante (e suo significato) utilizzato

Gli ormoni natriuretici sembrano degradati sia in vivo che in vitro per azioni di proteasi plasmatiche. EDTA (anticoagulante) e inibitori di proteasi come l'aprotinina sono generalmente aggiunti ai campioni di sangue integri per inibire questa degradazione. I campioni di plasma sono in genere congelati e conservati a -20°C fino all'analisi. Dati recenti sembrano suggerire che l'utilizzo di inibitori di proteasi non sia così indispensabile, ad ogni modo sono necessarie ulteriori indagini in questo campo per un'affermazione definitiva [115].

CONCLUSIONI

Gli ormoni natriuretici sono una complessa famiglia di peptidi e polipeptidi ormonali che dalla sintesi alla secrezione formano frammenti ormonali, che dimostrano tra loro differenze sia nelle concentrazioni plasmatiche che nell'emivita. In passato la misura biochimico clinica era unicamente rivolta agli ormoni "attivi", cioè BNP e talvolta ANP, e la misura era eseguita per approfondimenti in pazienti con insufficienza cardiaca. Di recente è stato ampliato lo spettro delle molecole studiate ed è stato anche proposto lo screening, e l'analisi con finalità diagnostiche e nella valutazione dell'efficacia terapeutica e prognosi con attenzione sia alla morbilità che alla mortalità. Le misure delle concentrazioni di questi peptidi NP, comunemente usate come "surrogate endpoints" nel monitoraggio del decorso clinico o della reazione alla terapia, possono forse essere ulteriormente ampliate anche se sono necessarie, a nostro parere, ulteriori indagini sia nel laboratorio clinico che nella sperimentazione clinica.

Questa recensione presenta anche i diversi metodi di analisi presenti in letteratura per la misura delle concentrazioni di pNA in fluidi biologici. E' certamente fondamentale per una maggiore completezza verificare, tra i peptidi presentati, quale possa essere il più idoneo per le singole patologie. In particolare l'insufficienza cardiaca ha avuto maggiori ricerche nel settore, ma anche altri disturbi pressori e dell'emodinamica saranno certamente in futuro un settore di sviluppo. Ad esempio la classificazione nelle prime classi NYHA sarebbe certamente più significativa se fosse disponibile una misura di markers biochimici dell'insufficienza cardiaca con sufficiente sensibilità e specificità [116].

Già vari gruppi di ricerca hanno proposto ora uno ora l'altro frammento pNA come marker capace di identificare dal punto di vista biochimico la classificazione delle prime classi NYHA, ma i risultati sono spesso conflittuali, forse per la natura eterogenea dei peptidi studiati, compresa anche la probabile diversa performance analitica per i

singoli peptidi ormonali [115]. Sembra comunque che tra i peptidi natriuretici di tipo-A, i frammenti derivanti dalla porzione N-terminale del pro-ormone proANP(1-126) possano meglio distinguere le prime classi delle cardiopatie secondo la catalogazione della New York Heart Association (NYHA) e possano quindi essere proposti nella diagnostica delle disfunzioni cardiache asintomatiche [81] o nella prognosi di CHF o dopo infarto miocardico acuto [83]. Per quanto riguarda l'"ormone attivo", classicamente noto, il BNP è certamente un marker preferibile all' α ANP per l'applicazione diagnostica delle disfunzioni cardiache [106-117-118]. Per il peptide [proBNP(1-76)] sembra possa esistere una analogia col sistema ormonale ANP, ed in particolare con i frammenti del proANP(1-126): proANP(1-98), proANP(1-30), proANP(31-67) e proANP(79-98). Questi ultimi sembrano indicatori biochimici migliori dell' α ANP. E' anche stato proposto che il proBNP(1-76) possa essere un marker biochimico della insufficienza al ventricolo destro forse migliore rispetto al BNP stesso [109], ed inoltre sembra vi sia relazione con lo scompenso cardiaco.

Lista delle abbreviazioni meno comuni usate nel testo: (in ordine alfabetico)

ANF: atrial natriuretic factor; ANP: atrial natriuretic peptide; ARF: acute renal failure; AVP: arginina vasopressina; BNP: brain natriuretic peptide; C-Ab: capture antibody; CDD: cardiodilatina; CNP: C type natriuretic peptide; CRH: corticotropin releasing hormone; D-Ab: detection antibody; GRF: glomerular filtration rate; HF: heart failure; HTx: heart transplantation; IEMA: metodi immunoenzimatici a sandwich; IMCD: dotto collettore della medulla profonda renale; KNH: kaliuretic natriuretic hormone; LANH: long acting natriuretic hormone; LEVEF: insufficienza ventricolare sinistra; LTx: liver transplantation; Md: zona o frammento intermedio del peptide; NEP: endopeptidasi neutra; NP: frammenti e peptidi natriuretici; NPR: natriuretic peptide receptor; NPR-A: recettore di tipo A per peptidi natriuretici; NPR-B: recettore di tipo B per peptidi natriuretici; NPR-C: recettore di tipo C per peptidi natriuretici; Nt.: zona o frammento N-terminale del peptide; NYHA: New York Heart Association; pNA: peptidi natriuretici; POD: enzima perossidasi; POMC: pro-opio-melanocortina; proANP: precursore o frammento del proormone ANP; proBNP: precursore o frammento del proormone BNP; RAAS: sistema renina angiotensina aldosterone; RTx: renal transplantation; SPE: estrazione in fase solida; TMB: tetrametilbenzidina (substrato dell'enzima streptavidina-perossidasi); URO: Urodilatina; VDNH: vessel dilator natriuretic peptide

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Federica Lancerin per il valido contributo nella stesura delle tabelle e nella revisione del testo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956;14:99-112
2. Henry PJ, Geuer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 1956;4:85-90
3. Deth RC, Wong K, Fukozawa S, Rocco R et al. Inhibition of rat aorta contractile response by natriuresis-inducing extract of rat atrium. *Fed Proc* 1982;41:983
4. Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylan JG et al. Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 1983;221:71-73
5. Forssmann WG, Birr C, Calquist M, Christmann M et al. The auricular myocardiocytes of the heart constitute an endocrine organ. Characterization of a porcine cardiac peptide hormone, cardiodilatin-126. *Cell Tissue Res* 1984;238:425-430
6. DeBold AJ, Borenstein Hb, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial extracts in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94
7. Sonnenberg H, Cupples WA, DeBold AJ, Veress AT. Intrarenal localization of the natriuretic effect of cardiac atrial extract. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1149-1152
8. Borenstein HB, Cupples WA, Sonnenberg H, Veress AT. The effect of a natriuretic atrial extract on renal haemodynamics and urinary excretion in anaesthetized rats. *J Physiol (Lond)* 1983;334:133-140
9. Forssmann WG. Urodilatin (Ularitide, INN): a renal natriuretic peptide. *Nephron* 1995;69:211-222
10. Forssmann WG, Richter R, Meyer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* 1998;110:335-57
11. Franz M, Woloszczuk W, Hörl WH. N-Terminal fragments of the proatrial natriuretic peptide in plasma and urine of kidney graft recipients. *Transplantation* 2001;72:89-94
12. Sudoh T., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81
13. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Hisayaki M. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;155:726-732
14. Goetz KL. Physiology and pathophysiology of the atrial peptides. *Am J Physiol* 1988;254:E1-E15
15. Espiner EA. Physiology of natriuretic peptides. *J Int Med* 1994;235:527-541
16. Winters CJ, Sallman AL, Meadows J, Rico DM, Vesely DL. Two new hormones: prohormone atrial natriuretic peptides 1-30 and 31-67 circulate in man. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;150:231-236
17. Winters CJ, Sallman AL, Baker BJ, Meadows J et al. The N-terminus and a 4,000-MW peptide from the midportion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation* 1989;80:438-449
18. Martin DR, Pevahouse JB, Trigg DJ, Vesely DL, Buerkert JE. Three peptides from the ANF prohormone NH₂-terminus are natriuretic and/or kaliuretic. *Am J Physiol* 1990;258:F1401-F1408
19. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, Gower WR et al. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans. *Circulation* 1994;90:1129-1140
20. Ogawa Y, Itoh H, Nakao K. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin Exp Pharmacol and Physiol* 1995;22:49-53
21. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptor. *Circulation* 1992;86(4):1081-1088
22. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic peptide family. *Lancet* 1997;349:1307-1310
23. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D et al.. Isolation and structural analysis of "urodilatin" a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)- family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 1998;66:752-759
24. Forssmann WG, Meyer M, Forssmann K. The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovasc Res* 2000;51:450-462
25. Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat BNP. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;159:1420-1426
26. Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM, Espiner EA. The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;214(3):1175-1183
27. Prickett TCR, Yandle TG, Nicholls MG, Espiner EA, Richards AM. Identification of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in human plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;286(3):513-517
28. Meyer M, Richter R, Forssmann WG. Urodilatin, a natriuretic peptide with clinical implications. *Eur J Med Res* 1998;3:103-110
29. Maack T, Nikonova LN, Friedman O, Cohen D. Functional properties and dynamics of natriuretic peptide receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213(2):109-116
30. Yan W, Wu F, Morser J, Wu O. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(15):8525-8529
31. Hooper JD, Scarman AL, Clarke BE, Normale JF, Antalis TM. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. *Eur J Biochem* 2000;267(239):6913-6937
32. Herten M, Lenz W, Gerzer R, Drummer C. The renal natriuretic peptide urodilatin is present in human kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2529-2535
33. Saba SR, Ramirez G, Vesely DL. Immunocytochemical localization of proANF 1-30, proANF 31-67, atrial natriuretic factor and urodilatin in the human kidney. *Ann J Nephrol* 1993;13:85-93
34. Vesely DL, Noris JS, Walter JM, Jespersen RR, Baeyens DA. Atrial natriuretic prohormone peptides 1-30, 31-67 and 69-98 vasodilate the aorta. *Biochem Biophys Res Comm* 1987;148:1540-1548
35. De Palo EF, Woloszczuk W, Meneghetti M, De Palo CB et al. Circulating immunoreactive proANP(1-30) and proANP(31-67) in sedentary subjects and athletes. *Clin Chem* 2000;46(6):843-847
36. Hartter E, Khalafpour S, Mißbichler A, Hawa G, Woloszczuk W. Enzyme immunoassay for fragments (epitopes) of human proatrial natriuretic peptides. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(1):27-32
37. Miyagi M, Zhang X, Misono K. Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor oligosaccharide structures are not required for hormone binding. *Eur J Biochem* 2000;267(68):5758-5768
38. Vesely DL, Bayliss JM, Sallman AL. Human prepro atrial natriuretic factor 26-55, 56-92 and 104-123 increase renal GC activity. *Biochem Biophys Res Com* 1987;143:186-193
39. Vesely DL, Overton RM, Blankenship M, McCormick MT, Schocken DD. Atrial natriuretic peptide increases Urodilatin in the circulation. *Am J Nephrol* 1998;18:204-213

40. Dietz JR, Scott DY, Landon CS, Nazian SJ. Evidence supporting a physiological role for proANP (1-30) in the regulation of renal excretion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001;280:R1510-R1517
41. Carstens J, Jensen KT, Pedersen EB. Effect of urodilatin infusion on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones. *Clin Sci* 1997;92:397-407
42. Zeidel ML. Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *Am J Physiol* 1993;265(34):159-173
43. Herten M, Lenz W, Gerzer R, Drummer C. The renal natriuretic peptide urodilatin is present in human kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2529-2535
44. Drummer C, Fiedler F, König A, Gerzer R. Urodilatin, a kidney-derived natriuretic factor, is excreted with a circadian rhythm and stimulated by saline infusion in man. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:1109-1113
45. Drummer C, Gerzer R, Heer M, Molz B et al. Effects of an acute saline infusion on fluid and alactolyte metabolism in humans. *Am J Physiol* 1993;262:744-754
46. Goetz KL. Is urodilatin (rather than atriopeptin) the primary natriuretic peptide of the ANP family? *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(2):84-85
47. Meyer M, Flüge T, Kruhoffer M, Forssmann WG. Basic aspects of vasorelaxant and bronchodilating peptides in clinical use: urodilatin (INN: Ularitide), VIP, and PACAP. *Ann N J Acad-Sci* 1996;26:461-463.
48. Flüge T, Hollmann HJ, Holfer J, Heinrich U et al. Type A natriuretic peptides exhibit different bronchoprotective effects in rats. *Eur J Pharmacol* 1994;271(2-3):395-402.
49. Bestle MH, Olsen NV, Christensen P, Jensen BV, Bie P. Cardiovascular, endocrine, and renal effects of urodilatin in normal humans. *Am J Physiol* 1999;276:684-695
50. Kiemer AK, Vollmar AM. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1998;273(22):13444-13451
51. Vesely DL, San Miguel GI, Hassan I, Schocken DD. Atrial natriuretic hormone, vessel dilator, long-acting natriuretic hormone, and kaliuretic hormone decrease the circulating concentrations of CRH, corticotropin, and cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4244-4249
52. Franz M, Woloszczuk W and Hörl WH. Plasma concentration and urinary excretion of N-terminal proatrial natriuretic peptides in patients with kidney diseases. *Kidney Int* 2001;59:1928-1934
53. Freund BJ, Wade CE, Claybaugh JR. Effects of exercise on atrial natriuretic factor. *Sports Med* 1988;6:364-376.
54. Baker BJ, Wu WCL, Winters CJ, Dinh H et al. Exercise increases the circulating concentration of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone in normal individuals. *Am Heart J* 1991;122:1395-1402
55. Arjamaa O, Karlqvist K, Vainionpää, Leppäluoto J, Vuolteenaho O. Atrial plasma ANP and NH₂-terminal proANP during right atrial pressure increase in humans. *Acta Physiol Scand* 1996;157:481-485
56. Nielsen HB, De Palo EF, Meneghetti M, Madsen PL et al. Circulating immunoreactive proANP(1-30) and proANP(31-67) responses to acute exercise. *Regul Pept* 2001;99:203-207
57. Andersen LJ, Norsk P, Johansen LB, Christensen P et al. Osmoregulatory control of renal sodium excretion after sodium loading in humans. *Am J Physiol* 1998;275:1833-1842
58. Lenz W, Herten M, Gerzer R, Drummer C. Regulation of natriuretic peptide (Urodilatin) release in a human kidney cell line. *Kidney Int* 1999;55:91-99
59. Seeger H, Armbruster FP, Mueck AO, Lippert TH. *Arch Gynecol Obstet* 1998;262:65-68
60. Heringlake M, Bahlmann L, Klaus S, Wagner K et al. Effects of angiotensin II and the AT1 receptor antagonist Losartan on the renal excretion of urodilatin. *Kidney & Blood Press Res* 2001;24:79-83
61. Richards AM. The renin-angiotensin-aldosterone system and the cardiac natriuretic peptides. *Heart* 1996;76(3):36-44
62. Haloui m, Messika-Zeitoun D, Louedec L, Philippe M, Michel JB. Potentiation of urinary atrial natriuretic peptide interferes with macula densa function. *Cardiovasc Res* 2000;51:542-552
63. Carstens j, Jensen KT, Pedersen EB. Metabolism and action of urodilatin infusion in healthy volunteers. *Clin Pharmacol & Therapeutics* 1998;64(1):73-86
64. Hall C, Rouleau JL, Moyè L, de Champlain J et al. N-terminal proatrial natriuretic factor an independent predictor of long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1994;89:1934-1942
65. Vesely DL, Chiou S, Duoglass MA, McCormick MT et al. Negative feedback of atrial natriuretic peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(5):1128-1134.
66. Villareal D, Freeman RH, Taraben A, Reams GP. Modulation of renin secretion by atrial natriuretic factor prohormone fragment 31-67. *Am J Med Sci* 1999;318(5):30-335.
67. Vesely DL, Chiou S, Douglass MA, McCormick MT et al. Kaliuretic peptide and long acting natriuretic peptide as well as atrial natriuretic peptide inhibit aldosterone secretion. *J Endocrinol* 1995;146:373-380
68. Mason J. The pathophysiology of Sandimmune (cyclosporine) in man and animals. *Pediatr Nephrol* 1990;4(6):686-704
69. Laws HJ, Kropp S, Meyer M, Forssmann WG, Burdach S. Treatment of acute renal failure with urodilatin after unrelated bone marrow transplantation in a 18-month-old boy. *Bone-Marrow-Transplant* 1995;16(2):307-310
70. Saxenhofer H, Raselli A, Weidmann P, Forssmann WG et al. Urodilatin, a natriuretic factor from kidneys, can modify renal and cardiovascular function in men. *Am J Physiol* 1990;259(5):832-838.
71. Hummel M, Kuhn M, Bub A, Bittner H et al. Urodilatin: a new peptide with beneficial effects in the postoperative therapy of cardiac transplant recipients. *Clin Invest* 1992;70:674-382
72. Cedidi C, Meyer M, Kuse ER, Schulz-Knappe P et al. Urodilatin: a new approach for the treatment of therapy-resistant acute renal failure after liver transplantation. *Eur J Clin Invest* 1994;24:632-639
73. Kentsch M, Ludwig D, Drummer C, Gerzer R, Muller-Esch G. Hemodynamic and renal effects of urodilatin bolus injections in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Invest* 1992;22:662-669
74. Yasue H, Yoshimura M. Natriuretic peptides in the treatment of heart failure. *J Card Fail* 1996;2(4):277-285.
75. Riegger GA, Elsner D, Forssmann WG, Kromer EP. Effects of ANP-(95-126) in dogs before and after induction of heart failure. *Am J Physiol* 1990;259(6):1643-1648.
76. Elsner D, Muders F, Muntze A, Kromer E et al. Efficacy of prolonged infusion of urodilatin [ANP-(95-126)] in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1995;129:766-773
77. Flüge T, Forssmann WG, Kunkel G, Schneider B et al. Bronchodilation using combined urodilatin-albuterol administration in asthma: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Med Res* 1999;4(10):411-415.
78. Flüge T, Fabel H, Schneider B, Forssmann WG. Bronchodilating effects of natriuretic and vasorelaxant peptides compared to salbutamol in asthmatics. *Reg Pep* 1995;59(3):357-370.
79. Hunter EFM, Kelly PA, Prowse C, Woods RJ and Lowry PJ. Analysis of peptides derived from pro atrial natriuretic peptide

- de that circulate in man and increase in heart disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1998;58:205-216
80. Smith JA, Bruunsgaard D, Bodd E, Hall C. Relations between medical history, clinical findings and plasma N-terminal proatrial natriuretic peptide in patients in primary health care. *Eur J Heart Failure* 2001;3:307-313
 81. Lerman A, Gibbons RJ, Rodeheffer RJ, Bailey KR et al. Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide as marker for symptomless left-ventricular dysfunction. *Lancet*. 1993;341(8853):1105-1109.
 82. Dickstein K, Larsen AI, Bonarjee V, Thoresen M et al. Plasma proatrial natriuretic factor is predictive of clinical status in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1995;76(10):679-683.
 83. Hall C, Rouleau JL, Moyè L, de Champlain J et al. N-terminal proatrial natriuretic factor. An independent predictor of long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1994;89:1934-1942
 84. Mathisen P, Hall C, Simonsen S. Comparative study of atrial peptides ANF(1-98) and ANF(99-126) as diagnostic markers of atrial distension in patients with cardiac disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:41-49
 85. Holmstrom H, Thaulow E, Stokke O, Linberg H, Hall C. Serum N-terminal proatrial natriuretic factor in children with congenital heart disease. *Eur Heart J* 1996;17:1737-1746
 86. Azizi C, Maistre G, Kalotka H, Isnard R et al. Plasma levels and molecular forms of proatrial natriuretic peptides in healthy subjects and in patients with congestive heart failure. *J Endocrinol* 1996;148(1):51-57.
 87. Onuoha GN, Alpar EK. Plasma circulating levels of natriuretic peptides in patients with bone and soft tissue injuries. *Peptides* 2000;21:617-621
 88. Onuoha GN, Alpar EK. Plasma levels of N-terminal of pro-atrial natriuretic peptides in myoskeletal injuries. *Regul Pept* 2001;99:17-20
 89. Bernstein R, Midtbo K, Urdal P, Morkrid L et al. Serum N-terminal pro-atrial natriuretic factor 1-98 before and during thyroxine replacement therapy in severe hypothyroidism. *Thyroid* 1997;7(3):415-419.
 90. Hammer-Lercher A, Puschendorf B, Mair J. Cardiac natriuretic peptides: new laboratory parameters in heart failure patients. *Clin Lab* 2001;47:265-277
 91. Marumo F, Sakamoto H, Ando K, Ishigami T, Kawakami M. A highly sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide (ANP) in human plasma and urine. *Biochem Biophys Res Comm* 1986;137(1):231-236
 92. Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Duff H. Radioimmunoassay and characterization of atrial natriuretic peptide in human plasma. *J Clin Endocr Metab* 1986;63:72-79
 93. Rosmalen FMA, Tan ACITL, Tan HS, Benraad TJ. A sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide in human plasma, using a tracer with an immobilized glycouril agent. *Clin Chim Acta* 1987;165:331-340
 94. Polesi C, Rodella A, Mantero G, Cannella G, Ferrari R, Albertini A. Improved radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide in plasma. *Clin Chem* 1989;35:1431-1434
 95. Lindberg BF, Nilsson LG, Bergquist S, Andersson KE. Radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide (ANP) and characterization of ANP immunoreactivity in human plasma and atrial tissue. *Scand J Lab Invest* 1992;52:447-456
 96. Lewis HM, Ratcliffe WA, Stott RAW, Wilkins MR, Baylis PH. Development and validation of a two-site immunoradiometric assay for human atrial natriuretic factor in unextracted plasma. *Clin Chem* 1989;35:953-957
 97. Tattersal JE, Dawnay A, Mc Lean C, Cattel WR. Immunoradiometric assay of atrial natriuretic peptide in unextracted plasma. *Clin Chem* 1990;36:855-859
 98. Numata Y, Dohi K, Furukawa A, Kikuoka S et al. Immunoradiometric assay for the N-terminal fragment of proatrial natriuretic peptide in the human plasma. *Clin Chem* 1998;44(5):1008-1013
 99. Clerico A, Iervasi G, Del Ry S, Giannesi D. Immunoassay methods for the measurement of natriuretic cardiac hormones-ANP, BNP, and related peptides- in humans. *J Clin Ligand Assay* 1999;22(2):194-204.
 100. Missbichler A, Hawa G, Schmal N, Woloszczuk W. Sandwich ELISA for proANP 1-98 facilitates investigation of left ventricular dysfunction. *Eur J Med Res* 2001;6:105-111
 101. Sundsfjord JA, Thibault G, Larochelle P, Cantin M. Identification and plasma concentration of the N-terminal fragments of proatrial natriuretic factor in man. *J Clin Endocr Metab* 1988;3:605-610
 102. Buckley MG, Sagnella A, Markandu ND, Singer DRJ, MacGregor GA. Immunoreactive N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in human plasma: plasma levels and comparison with a-human atrial natriuretic peptide in normal subjects, patients with essential hypertension, cardiac transplant and chronic renal failure. *Clin Sci* 1989;77:573-579.
 103. Buckley MG, Markandu ND, Sagnella GA, Mac Gregor GA. N-terminal atrial natriuretic peptide an atrial natriuretic peptide in human plasma: investigation of plasma levels and molecular circulating form(s) using Radioimmunoassay for pro-atrial natriuretic peptide (31-67), proatrial natriuretic peptide (1-30) and atrial natriuretic peptide (99-126). *Clin Sci (Colch)* 1994;87:311-317
 104. Solc J, Bauer K, Timnik A, Scolcova A et al. Combination of high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay for the measurement of urodilatin and a-hANP in the urine of healthy males. *Life Sci* 1991;48:2451-2456.
 105. Meyer M, Armbruster FP, Maier I, Scwing J et al. Urinary and plasma urodilatin measured by a direct RIA using a highly specific antiserum. *Clin Chem* 1998;44:2524-2529.
 106. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest* 1991;87:1402-1412
 107. Jensen KT, Carstens J, Ivarsen P, Pedersen EB. A new, fast and reliable radioimmunoassay of brain natriuretic peptide in human plasma. Reference values in healthy subjects and in patients with different diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:529-540
 108. Clerico A, Iervasi G, Del Chicca MG, Emdin M et al. Circulating levels of cardiac natriuretic peptide (ANP and BNP) measured by highly sensitive and specific immunoradiometric assays in normal subjects and in patients with different degrees of heart failure. *J Endocrinol Invest* 1998;21:170-178
 109. Hunt PJ, Pichards AM, Nicholls MG, Yandle TG et al. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-BNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol* 1997;47:287-296
 110. Karl J, Borgya A, Gallusser A, Huber E et al. Development of a novel, N-terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(230):177-181
 111. Missbichler A, Hawa G, Woloszczuk W, Schmal N, Harter E. Enzymemimmunoassays für proBNP fragmente (8-29) und (32-57). *J Lab Med* 1999;23:2441-2444
 112. Buckley MG, Marcus NJ, Yacoub MH. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin Sci* 1999;97:689-695
 113. Boomsma F, Deinum J, van den Meiracker AH. *Clin Chem* 2001;5:963-965
 114. Nakamitsu S, Sagawa S, Miki K, Wada F et al. Effect of water temperature on diuresis-natriuresis: AVP, ANP, and

- urodilatin during immersion in men. *J Appl Physiol* 1994;77(4):1919-1925
115. Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. Measurement of cardiac natriuretic hormones atrial natriuretic peptide brain natriuretic peptide and related peptides in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods. *Clin Chem* 2000;46(10):1529-1534
116. Dickstein K. Natriuretic peptides in detection of heart failure. *Lancet* 1998;351:4
117. Choy AJ, Darber D, Lang C, Pringle TH et al. Detection of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction; comparison of clinical, echocardiographic, and neurohormonal methods. *British Heart J* 1994;72:16-22
118. Davis M, Espiner E, Richards G, Billings J et al. Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea. *Lancet* 1994;343: 40-444