

Biochimica dei markers di funzione cardiaca

Antonio Fortunato

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia
Ospedale "San Bortolo" - Vicenza

Riassunto

I peptidi natriuretici sono ormoni vaso-attivi che intervengono nella regolazione della diuresi e della natriuresi ed esercitano un'azione antagonista degli effetti vasoconstrictori del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Le varie famiglie di peptidi natriuretici presentano tutte la stessa conformazione strutturale, una catena peptidica chiusa da un ponte cisteinico, la cui sequenza aminoacidica è molto conservata, anche tra le diverse specie animali. È proprio questa porzione della molecola (anello) che si lega ai recettori specifici (NPR-A, NPR-B e NPR-C), mentre le residue porzioni delle catene peptidiche si differenziano notevolmente tra le varie famiglie di peptidi ormonali sia per la lunghezza che per la tipologia di aminoacidi contenuti.

La clearance di questi ormoni segue due vie principali: una degradazione enzimatica ad opera di un'endopeptidasi oppure un processo di endocitosi, ad opera del recettore di tipo C, seguita dalla lisi da parte degli enzimi lisosomiali.

I peptidi natriuretici svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi cardiovascolare che, attraverso azioni complementari delle varie famiglie di peptidi, intervengono nella regolazione del tono della muscolatura liscia dei vasi, nel bilancio elettrolitico e sulla morfologia del miocardio.

Gli studi che recentemente hanno portato alla scoperta delle funzioni secretorie dei miocardiociti hanno rivoluzionato le conoscenze di fisiopatologia cardiaca e la determinazione degli ormoni cardiaci è stata proposta come un valido strumento nella diagnosi e nella valutazione prognostica dello scompenso cardiaco.

Summary

Natriuretic peptides are vaso-active hormones that play important roles in diuresis and natriuresis regulation and to counter-balance the effects of vasoconstrictor neurohormones released by renin-angiotensin-aldosterone system. All natriuretic peptides have a characteristic peptidic ring structure formed by an intra molecular disulfide bridge between two cysteine residues, its amino-acidic sequence is well conserved through different species, this part of the molecule (ring) is the ligand for specific cell surface receptors (NPR-A, NPR-B and NPR-C). The amino and carboxyl terminal tails varies between the different peptides both for length and amino-acid residue content. Natriuretic peptides clearance involves two main pathways: enzymatic degradation by neutral endopeptidase or a receptor-mediated endocytosis followed by lysosomal degradation via the natriuretic peptide receptor type C. Natriuretic peptides play important roles in the cardiovascular homeostasis regulation and the combined complementary actions of different peptides regulate vascular smooth muscle tone, electrolyte balance and cardiac morphology. Natriuretic peptides plasma concentration is proposed as a valid tool in diagnosis and prognostic evaluation of chronic heart failure since recent studies demonstrated myocardiocyte secretory function and cardiac physiopathology knowledge were changed.

Introduzione

Già dagli anni cinquanta erano stati descritti dei granuli di secrezione nelle cellule atriali dei mammiferi^{1,2} e successivamente altri autori³ hanno dimostrato che la presenza di questi granuli può essere modificata dal bilancio elettrolitico. Nel 1981 de Bold e collaboratori⁴ hanno osservato che l'infusione di estratti di tessuto atriale nei ratti provoca una rapida e consistente diuresi e natriuresi.

Dopo questa importante dimostrazione sono stati svolti numerosi studi che hanno portato rapidamente all'isolamento, la purificazione e l'identificazione di una famiglia di peptidi, denominata *Atrial Natriuretic Peptides* (ANP), mediatori dell'azione natriuretica e vasorilassante. Più recentemente è stato dimostrato che non solo il tessuto atriale ma anche i cardiomiociti ventricolari sono in grado di produrre dei peptidi con attività natriuretica: il *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) che prende questo nome in quanto inizialmente è stato isolato dal tessuto cerebrale di suino⁵⁻¹⁰.

Altri peptidi appartenenti a questa famiglia sono stati descritti in seguito: il *C-type Natriuretic Peptide* (CNP), l'urodilattina ed il *Dendroaspis Natriuretic Peptide* (DNP)¹¹. Il CNP è prodotto e secreto prevalentemente dalle cellule endoteliali ed a livello del sistema nervoso centrale; l'urodilattina è sintetizzata e secreta a livello del rene e si trova solo nelle urine; il DNP è stato isolato da veleno di rettile ma non è stata ancora chiarita la sua origine e la sua funzione fisiopatologica.

Nell'ultimo decennio è stato evidenziato il ruolo dei peptidi natriuretici che vengono attivati e secreti in circolo nei pazienti con insufficienza cardiaca.

La funzione del miocardio deve essere quindi rivista considerando anche le interazioni con altri organi ed apparati attraverso la trasmissione di segnali di tipo ormonale, paracrino e autocrino^{5,6}.

Struttura chimica

La struttura chimica di tutti i peptidi natriuretici è caratterizzata da un anello, formato da 17 residui aminoacidici, chiuso da un ponte disolfuro intramolecolare tra due residui di cistina¹². La lunghezza delle estremità amino- e carbossi- terminali variano tra le differenti classi di peptidi: ANP 28 aminoacidi, BNP 32, CNP 22 (o 53) e DNP 38¹³. Tutte le forme esistono

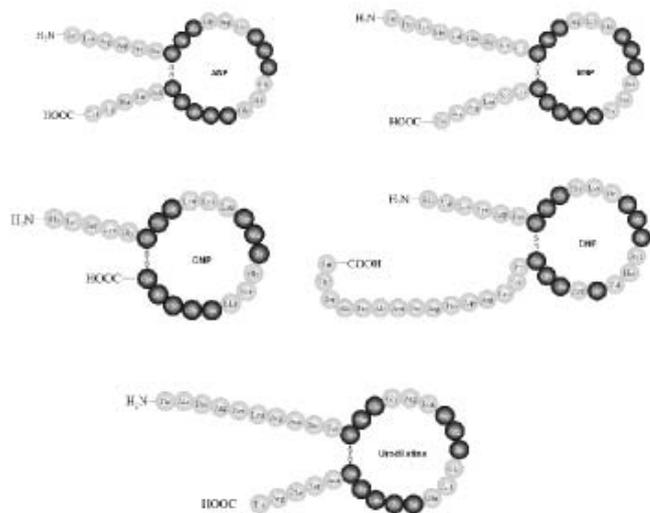


Figura 1. Sequenza aminoacidica e conformazione dei peptidi natriuretici. Gli aminoacidi più scuri rappresentano la sequenza conservata nei vari iso-ormoni

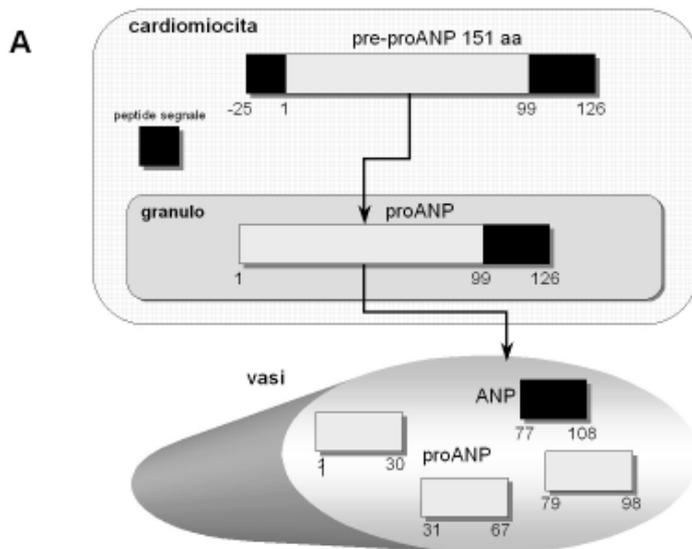


Figura 2A. Sintesi e secrezione dell'ANP. Da un precursore pre-proANP viene eliminata una sequenza segnale di 25 aminoacidi e la molecola di proANP che ne deriva si accumula in granuli di secrezione. In conseguenza alla stimolazione la molecola di proANP è scissa in un frammento carbossi-terminale (ANP, molecola attiva) ed una porzione aminoterminale (Nt-proANP) che successivamente viene ulteriormente degradata

sotto forma di un pre-oromone di peso molecolare relativamente elevato che viene scisso prima di essere immesso in circolo^{14,15}.

La struttura proteica dei peptidi natriuretici è molto ben conservata nel corso dell'evoluzione, soprattutto la porzione all'interno dell'anello cisteinico presenta in tutti gli iso-ormoni un'omologia di sequenza di 11 aminoacidi su 17; solo nel DNP l'omologia riguarda 10 aminoacidi su 17 (Figura 1). La struttura ad anello risulta fondamentale nel mantenimento della funzione biologica e tale attività è più sensibile a modificazioni a carico dell'estremità amino-terminale rispetto a quelle dell'estremità carbossi-terminale della molecola^{16,17}.

I peptidi natriuretici potrebbero derivare tutti da un gene comune ancestrale, che era molto più simile al CNP che all'ANP ed al BNP. Il fatto che i peptidi natriuretici siano stati conservati nel corso dell'evoluzione e che il gene codificante si sia duplicato più volte, generando una famiglia di iso-ormoni correlati dal punto di vista conformazionale, indica che essi sono necessari per la vita ed anche che possano svolgere (od abbiano svolto) differenti funzioni^{18,19}. È stata dimostrata la presenza di alcuni peptidi natriuretici non solo negli organismi eucarioti sia del regno animale che vegetale, ma anche in alcuni organismi unicellulari²⁷.

Per quanto riguarda il genoma umano e del topo, è conosciuta la localizzazione dei geni che codificano i precursori dell'ANP e del BNP (cromosoma 1) e del CNP (cromosoma 2)²¹, mentre non è ancora stato clonato il gene che codifica il precursore del DNP²².

Dalla trascrizione del gene codificante l'ANP origina una molecola di RNA messaggero della dimensione di 1 chilobasi, su cui viene sintetizzato un peptide precursore (pro-ANP) costituito da 126 aminoacidi. Nell'uomo il pro-peptide subisce una scissione proteolitica in due frammenti: uno, aminoterminale, di 98 aminoacidi ed un frammento carbossi-terminale di 28 aminoacidi che rappresenta la molecola biologicamente attiva^{15,23} (Figura 2A).

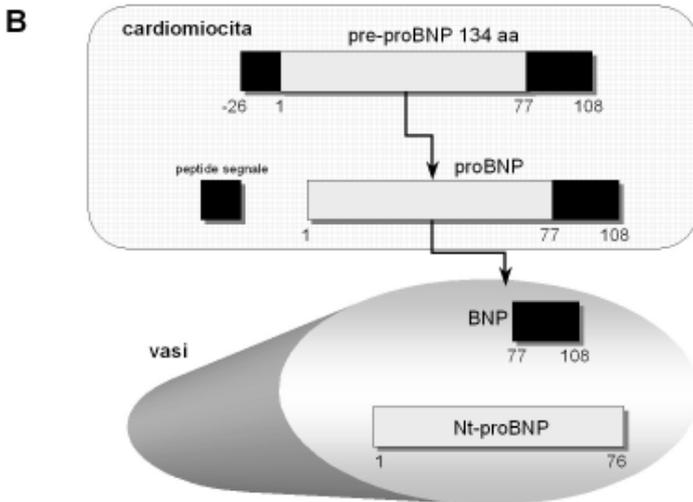


Figura 2B. Sintesi e secrezione del BNP. Da un precursore pre-proBNP viene eliminata una sequenza segnale di 26 aminoacidi. In conseguenza alla stimolazione la molecola di proBNP è scissa in un frammento carbossi-terminale (BNP, molecola attiva) ed una porzione aminoterminale (Nt-proBNP)

Il BNP è immagazzinato come pro-ormone con una catena di 108 aminoacidi (pro-BNP) che al momento del rilascio è scisso enzimaticamente in un frammento inattivo amino-terminale di 76 aminoacidi e nella forma attiva, peptide carbossi-terminale, di 32 aminoacidi (Figura 2B) ⁹.

Sia l'ANP che il BNP sono sintetizzati prevalentemente a livello dei cardiomiociti, il primo in prevalenza a livello degli atri ed il secondo a livello dei ventricoli; questa caratteristica permette di attribuire ai livelli di concentrazione plasmatici di questi parametri una significativa cardiospecificità.

Il CNP è espresso prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale e del tessuto vascolare, risulta praticamente non espresso nel tessuto cardiaco ²⁴. Il pro-CNP è costituito da 126 residui aminoacidici e può dare origine a due differenti peptidi con attività biologica rispettivamente di 22 e 53 aminoacidi. La forma costituita da 53 aminoacidi tuttavia risulta molto poco diffusa e, dove espressa, è molto limitata dal punto di vista quantitativo e dimostra una inferiore attività biologica.

A differenza dell'ANP e del BNP, che hanno una funzione di tipo endocrino, il CNP potrebbe avere essenzialmente una funzione di neurotrasmettitore del sistema paracrino ^{25,26}.

Il DNP, isolato recentemente da veleno di rettile ²⁷, non è ancora stato definitivamente classificato nella famiglia dei peptidi natriuretici cardiaci dei mammiferi, o perlomeno dei peptidi endogeni della specie umana, anche se dimostra delle notevoli similitudini strutturali con ANP e BNP ed affinità per gli stessi recettori ¹¹.

L'urodilattina è costituita da una molecola di ANP alla cui estremità amino-terminale sono aggiunti quattro aminoacidi e, sia l'ANP che l'urodilattina, derivano dallo stesso precursore costituito da 126 aminoacidi. Questo peptide è sintetizzato nelle cellule tubulari del rene e viene secreto direttamente nel lume, infatti l'urodilattina è riscontrabile solo nelle urine e non risulta presente in circolo ²⁸.

Regolazione della produzione e secrezione dei peptidi natriuretici

I peptidi ANP e BNP sono entrambi sintetizzati e secreti sia a

livello dell'atrio che del ventricolo anche se in modo quantitativo differente: l'ANP prevale a livello dell'atrio mentre il BNP nel ventricolo. Considerando la differenza di massa tra atrio e ventricolo è facilmente comprensibile la ragione per cui, in risposta ad uno stimolo, la quantità di molecole di BNP immesse in circolo è molto superiore a quelle di ANP ^{6,29}. Nella secrezione di ANP e BNP è stata riscontrata una differenza sostanziale in quanto per l'ANP la secrezione sembra essere collegata al rilascio del pro-ormone da granuli di accumulo, evidenziabili con la microscopia elettronica a livello dei miocardiociti atriali, mentre per il BNP la regolazione sembra localizzata a livello dell'espressione genica ³⁰.

Il principale stimolo che provoca la secrezione dei peptidi natriuretici è la distensione delle pareti, quindi situazioni in cui vi è un aumento del ritorno venoso, per esempio l'attività fisica o le variazioni di postura che determinano un incremento del volume striale, determinano una secrezione prevalente di ANP. Al contrario, l'ipertrofia e la fibrosi, che provocano uno stiramento delle pareti ventricolari, stimolano la sintesi e la secrezione del BNP ³¹⁻³³.

Sia il sistema neuro-ormonale che il sistema immunitario intervengono, attraverso un complesso meccanismo di interazioni, nella regolazione della sintesi e rilascio dei peptidi natriuretici. I principali fattori (Tabella I) che agiscono sul sistema dei peptidi natriuretici cardiaci come stimolatori sono: la noradrenalina, l'endotelina, l'angiotensina II, i glucorticoidi, gli estrogeni, gli ormoni tiroidei, alcuni fattori di crescita, ed anche alcune citochine (come il α Tumor Necrosis Factor, l'interleuchina 1 e l'interleuchina 6) ^{6,29,34-43}.

D'altra parte il sistema dei peptidi natriuretici cardiaci svolge un'azione inibitrice sul sistema neuroendocrino ed immunitario. Molti autori hanno dimostrato che il sistema dei peptidi natriuretici cardiaci, oltre a svolgere una potente azione diuretica, natriuretica, vasodilatatrice e controregolatrice nei confronti del sistema neuro-ormonale, possiede anche un'azione che contrasta i fenomeni del rimodellamento ventricolare e vascolare, compresa la ri-stenosi post-angioplastica. L'azione dei peptidi natriuretici cardiaci si contrappone alla disfunzione endoteliale a livello del microcircolo, infatti l'endotelio produce il CNP che svolge soprattutto un'azione paracrina a livello vasale ⁴⁴⁻⁵³.

Nella Figura 3 è riassunto il sistema di relazioni che intercorrono tra il sistema neuro-endocrino ed i peptidi natriuretici che quindi hanno un ruolo fondamentale non solo nel regolare l'omeostasi cardiovascolare (ANP e BNP) ma, associati all'azione paracrina del CNP e dell'urodilattina, concorrono

Tabella I. Sostanze che inducono sintesi e/o secrezione dei peptidi natriuretici

Angiotensina II
Endoteline
Simpaticomimetici (alfa-adrenergici)
Citochine (IL-1, IL-6, TNF)
Fattori di crescita e/o della coagulazione
Insulina
Ormoni tiroidei
Corticosteroidi
Estrogeni

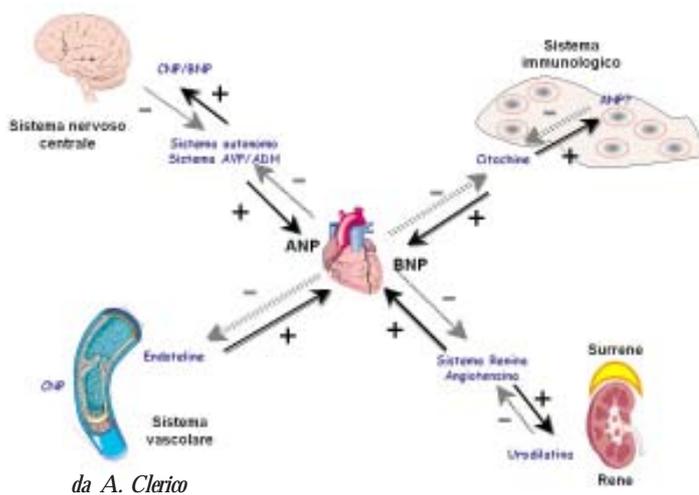


Figura 3. Interazione tra sistema neuro-endocrino e peptidi natriuretici

nella regolazione del tono della muscolatura liscia dei vasi, del bilancio elettrolitico e della morfologia del miocardio.

Meccanismo d'azione dei peptidi natriuretici

L'attività biologica dei peptidi natriuretici è mediata da specifici recettori di membrana: NPR-A e NPR-B che sono attivati selettivamente da ANP e BNP il primo e dal CNP il secondo^{54,55}. I recettori di tipo A e B hanno una struttura molto simile, si riscontra circa il 44% di omologia nel dominio di legame extracellulare⁵⁵⁻⁵⁷, entrambi sono presenti nelle cellule renali e del surrene ma il recettore di tipo A si riscontra prevalentemente nei grossi vasi mentre il recettore di tipo B è più diffuso a livello del sistema nervoso centrale^{13,58}. Le funzioni biologiche innescate da questi recettori sono mediate da un sistema di trasmissione del segnale a cascata che coinvolge molecole di guanil-monofosfato ciclico (cGMP)²⁵ (Figura 4). Entrambi i recettori, in seguito al legame con i peptidi natriuretici con il loro dominio extracellulare, sono rapidamente inattivati attraverso un processo di defosforilazione⁵⁹. Il recettore di tipo C non presenta attività legata alla guanil ciclasi ma, nel suo dominio citoplasmatico di 37 aminoacidi, contiene una sequenza di attivazione della proteina G²⁵. Sono i recettori di peptidi natriuretici maggiormente diffusi e sono presenti in molti tessuti tra cui l'endotelio vascolare, la muscolatura liscia, il cuore, il surrene ed il rene.

Quando ANP, BNP e CNP si legano a questo recettore sono internalizzati e degradati enzimaticamente, quindi il recettore torna sulla superficie cellulare¹³. Oltre a questo meccanismo la rimozione dei peptidi natriuretici dal circolo è ottenuta tramite una degradazione enzimatica ad opera di una endopeptidasi neutra (una zinco metallo peptidasi) che è molto diffusa sulla membrana delle cellule di molti tessuti^{23,25}.

Azioni dei peptidi natriuretici

Poiché agiscono tramite gli stessi recettori, ANP e BNP producono effetti biologici simili: provocano natriuresi, diuresi, vasodilatazione, inibizione della sintesi dell'aldosterone ed hanno un effetto anti-mitogenico sulle cellule dell'endotelio e della muscolatura liscia.

L'effetto ipotensivo di questi peptidi è dovuta anche ad un'azione a livello centrale dove inibiscono la secrezione di ADH e ACTH ed hanno un effetto simpatolitico^{60,61}.

L'azione del CNP sui vasi differisce da quella di ANP e BNP, oltre per la differente distribuzione dei recettori di tipo B rispetto a quelli di tipo A, anche perché agisce come mediatore paracrino e non è presente in circolo: il suo effetto è prevalentemente miorelaxante e anti-mitogenico, non ha un effetto rilevante sull'escrezione di sali ed acqua^{58,62-64}.

I peptidi natriuretici svolgono un'importante azione cardioprotettiva intervenendo nel controllo della crescita delle cellule endoteliali e della muscolatura liscia dei vasi, quindi hanno un ruolo rilevante nel moderare la mitogenesi fisiologicamente e limitare l'ipertrofia ed il rimodellamento del miocardio negli stati di ipertensione cronica⁵⁸.

La concentrazione dei peptidi natriuretici aumenta costantemente con l'età, in modo particolare dopo i 50 anni sia nelle donne che negli uomini. Questa tendenza all'aumento potrebbe rispecchiare un adattamento conseguente alle modifiche che si riscontrano, anche in soggetti non portatori di patologie, nel muscolo cardiaco e nell'emodinamica cardiovascolare con l'aumentare dell'età⁶⁵.

Conclusioni

La sintesi e la secrezione dei peptidi cardiaci sono stimulate sia da fattori emodinamici che da meccanismi neuro-ormonali. La valutazione della concentrazione delle molecole ad azione ormonale ed i relativi pro-ormoni può essere di notevole utilità nella valutazione clinica della funzione cardiaca⁶⁶⁻⁷⁴: l'ANP riflette maggiormente le patologie cardiache che inducono lo stiramento della parete striale, mentre il BNP, o il peptide NT-proBNP, evidenzia le alterazioni delle pareti ventricolari⁷⁴. I peptidi natriuretici possono essere quindi considerati degli indicatori della funzionalità cardiaca e possono contribuire nella formulazione della diagnosi ma anche nella valutazione dell'efficacia dei trattamenti terapeutici.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento al Dott. Aldo Clerico per il cortese supporto.

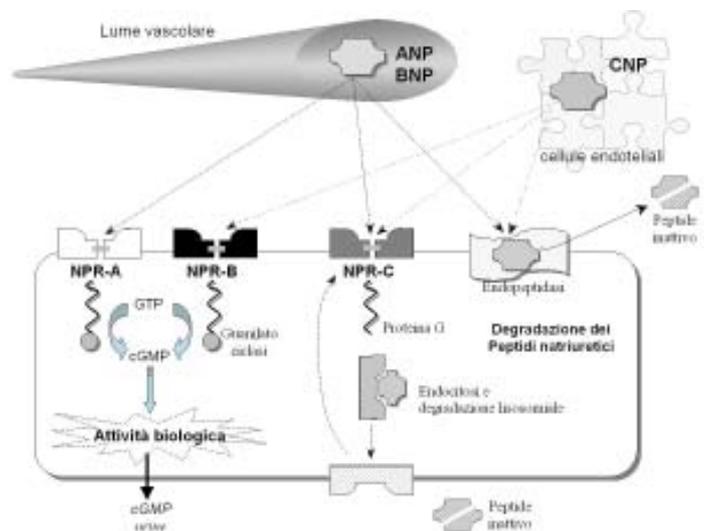


Figura 4. Rappresentazione schematica dei legami con i recettori di membrana, del meccanismo d'azione e delle vie di degradazione dei peptidi natriuretici

Bibliografia

1. Kirsh B. Electronmicroscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956; 14:99-112.
2. Jamieson JD, Palade GE. Specific granules in atrial muscle cell. *J Cell Biol* 1964; 23:151-62.
3. Marie JP, Guillemont H, Hatt PY. Le degré de granulation des cardiocytes auriculaires. Etude planimétriques au cours de différents apports d'eau et de sodium chez le rat. *Pathol Biol* 1976; 24:549-54.
4. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and important natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981; 28:89-94.
5. De Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovas Res* 1996; 31:7-18.
6. De Bold AJ, Bruneau BG. Natriuretic peptides. In: Fray JCS ed: *Handbook of Physiology, Section 7, Volume III: Endocrine regulation of water and electrolyte balance*. Oxford: Univesrity Press; 2000. p. 377-409.
7. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: is their assay merely a marker of cardiac disease? *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:752-60.
8. Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev* 2003; 24:341-56.
9. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362:316-22.
10. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:726-32.
11. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholis MG, Cameron AV, Yandle TG. *Dendroaspis* natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002; 359:5-6.
12. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992; 10:1111-4.
13. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339:321-8.
14. Valli N, Gobinet A, Bordenave L. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. *J Lab Clin Med* 1999; 134:437-44.
15. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:261-268.
16. Katzung BJ. *Vasoactive peptides. Basic and Clinical Pharmacology* 6th edn. Connecticut: Appleton & Lange; 1995.
17. Sahai A, Ganguly PK. Atrial natriuretic peptide: pathophysiological considerations. *Ind J Physiol Pharm* 1992; 36:3-14.
18. Loretz CA, Pollina C. Natriuretic peptides in fish physiology. *Comp Biochem Physiol Part A* 2000; 125:169-87.
19. Takei Y. Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol Part B* 2001; 129:559-73.
20. Vesely DL, Giordano AT. Atrial natriuretic factor-like peptide and its pro-hormone within single cell organism. *Peptides* 1992; 13:177-82.
21. Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Itoh H, Saito Y, Nakao K. Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1811-5.
22. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholis MG, Cameron AV, Yandle TG. *Dendroaspis* natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002; 359:5-6.
23. Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholis MG. Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24:481-509.
24. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168:863-70.
25. Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001; 51:429-41.
26. Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides* 1996; 17:1243-51.
27. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the Green Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267:13928-32.
28. Forssmann K, Meyer M, Forssmann WG. Urodilatin. *Prog Respir Res* 2001; 31:81-4.
29. de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001; 79:705-14.
30. Onuoha GN, Nicholis DP, Patterson A, Beringer T. Neuropeptide secretion in exercise. *Neuropeptides* 1998; 32:319-25.
31. Walther T, Klostermann K, Hering-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Stepan H. Fibrosis rather than blood pressure determines cardiac BNP expression in mice. *Regul Pept* 2003; 116:95-100.
32. Sakata Y, Yamamoto K, Masuyama T, Mano T, Nishikawa N, Kuzuya T *et al*. Ventricular production of natriuretic peptides and ventricular structural remodeling in hypertensive heart failure. *J Hypertens* 2001; 19:1905-12.
33. De Lemos JA, Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation* 2002; 106:2868-70.
34. Tateishi J, Masutani M, Ohyanagi M, Iwasaki T. Transient increase in plasma brain (B-type) natriuretic peptide after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 2000; 23:776-80.
35. Kuroski de Bold ML. Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1999; 41:524-31.
36. Maffei S, Del Ry S, Prontera C, Clerico A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci* 2001; 101:447-53.
37. Tanaka T, Kanda T, Takahashi T, Saegusa S, Moriya J, Kurabayashi M. Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes. *J Int Med Res*. 2004; 32:57-61.

38. Witthaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, *et al.* Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med* 2003; 29:1696-702.
39. Hiraoka E, Kawashima S, Takahashi T, Rikitake Y, Hirase T, Yokoyama M. PI 3-kinase-Akt-p70 S6 kinase in hypertrophic responses to leukaemia inhibitory factor in cardiac myocytes. *Kobe J Med Sci* 2003; 49:25-37.
40. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res.* 2002; 55:329-40.
41. Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, Magaribuchi T, Kamitani S, Kuwahara K, *et al.* Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H388-96.
42. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Kishimoto I, Ogawa Y *et al.* Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. *Hypertens Res* 2003; 26: 847-53.
43. Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by proinflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:505-13.
44. Tsukagoshi H, Shimizu Y, Kawata T, Hisada T, Shimizu Y, Iwamae S, *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits tumor necrosis factor- α production by interferon- γ -activated macrophages via suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B activation. *Reg Pept* 2001; 99:21-9.
45. Kiemer AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1 atrial natriuretic peptide reduces TNF- α -induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res* 2002; 90:874-81.
46. Kiemer AK, Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 2002; 143:846-52.
47. Weber NC, Blumenthal SB, Hartung T, Vollmar AM, Kiemer AK. ANP inhibits TNF- α -induced endothelial MCP-1 expression-involvement of p38 MAPK and MKP-1. *J Leukoc Biol* 2003; 74:932-41.
48. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, *et al.* B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor- β in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblasts conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 2004; 94:453-61.
49. Chen HH, Burnett JC Jr. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:S22-8.
50. Morishige K, Shimokawa H, Yamawaki T, Miyata K, Eto Y, Kandabashi T, *et al.* Local adenovirus-mediated transfer of C-type natriuretic peptide suppresses vascular remodeling in porcine coronary arteries in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1040-7.
51. Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, Oshita A, Shinomiya K, Yu Y, *et al.* Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 58:231-8.
52. Yasuda S, Kanna M, Sakuragi S, Kojima S, Nakayama Y, Miyazaki S, *et al.* Local delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39:784-8.
53. Qian JY, Haruno A, Asada Y, Nishida T, Saito Y, Matsuda T, *et al.* Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress-induced thrombosis, and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries. *Circ Res* 2002; 91:1063-9.
54. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86:1081-8.
55. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, *et al.* Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991; 252:120-3.
56. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:796-803.
57. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86:1081-8.
58. Ahluwalia A, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Vascular actions of natriuretic peptides. Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Res Cardiol* 2004; 99:83-99.
59. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation essential for activation of the A-type of the kinase homology domain is natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2164-2.
60. Burrell LM, Lambert HJ, Baylis PH. Effect of atrial natriuretic peptide on thirst and arginine vasopressin release in humans. *Am J Physiol* 1991; 260:R475-9.
61. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2001; 51:489-94.
62. Furuya M, Yoshida M, Hayashi Y, Ohnuma N, Minamino N, Kangawa K, *et al.* C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177:927-31.
63. Wei CM, Aarhus LL, Miller VM, Burnett JC Jr. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1993; 264: H71-3.
64. Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC Jr. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:765-71.
65. Clerico A. I peptide natriuretici cardiaci: loro importanza nelle malattie cardiovascolari. *Ligand Assay* 2003; 8:24-30.
66. Sagnella GA. Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Clin Sci* 1998; 95:519-29.
67. Clerico A, Iervasi G, Mariani G. Clinical relevance of the

- measurement of cardiac natriuretic peptide hormones in humans. *Horm Metab Res* 1999; 31:487-98.
68. Boomsma F, Van den Meiracker AH. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. *Cardiovasc Res* 2001; 51:442-9.
69. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2001; 51:489-94.
70. Mair J, Hammerer-Lercher A, Puchendorf B. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:571-88.
71. Maisel A. B-type natriuretic peptide levels: a potential novel "white count" for congestive heart failure. *J Cardiac Failure* 2001; 7:183-93.
72. Chen HH, Burnett JC Jr. Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure. *Cur Cardiol Rep* 2000; 2:198-205.
73. Struthers AD. Introducing a new role for BNP: as a general indicator of cardiac structural disease rather than a specific indicator of systolic dysfunction only. *Heart* 2002; 87:97-8.
74. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: Is their assay merely a marker of cardiac disease? *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:762-70.