

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Klinický význam natriuretických peptidů
Bakalářská práce

2022

Dominika Vognarová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dominika Vognarová**
Osobní číslo: **C18299**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Klinický význam natriuretických peptidů**
Téma práce anglicky: **The Clinical Significance of Natriuretic Peptides**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Na základě informací z literatury uspořádejte základní informace o natriuretických peptidech.
- 2) Blíže se zaměřte na klinický význam natriuretických peptidů.
- 3) Věnujte pozornost také metodice stanovení jednotlivých natriuretických peptidů v lidském biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Klinický význam natriuretických peptidů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2022

Dominika Vognarová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, užitečné a cenné rady, připomínky, trpělivosti, příjemnou spolupráci a ochotu. Děkuji také své rodině a blízkým za jejich psychickou podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na shrnutí poznatků o natriuretických peptidech, klinickém významu těchto peptidů a vývoji nejvíce využívaných metod k diagnostice.

V první části byla věnována pozornost charakteristice natriuretických peptidů a syntetických natriuretických peptidů, jejich struktuře a funkci. Následně byly popisovány různé choroby související s natriuretickými peptidy.

Druhá část této práce byla věnována popisu metod, které se využívají k diagnostice a dále laboratorním problémům, které stanovení natriuretických peptidů ovlivňují.

KLÍČOVÁ SLOVA

Atriální natriuretický peptid, mozkový natriuretický peptid, natriuretický peptid typu C, biomarker

TITLE

The clinical significance of natriuretic peptides

ANNOTATION

This bachelor thesis is focusing on summarizing the knowledge about natriuretic peptides, the clinical significance of these peptides and the development of the most used methods for diagnosis.

In the first part, attention was paid to the characteristics of natriuretic peptides and synthetic natriuretic peptides, their structure and function. Subsequently, various diseases related to natriuretic peptides have been described.

The second part of this work was devoted to the description of methods used for diagnosis and laboratory problems that affect the determination of natriuretic peptides.

KEY WORDS

Atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, C-type natriuretic peptide, biomarkers

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
ÚVOD.....	12
1. Natriuretické peptidy	13
1.1. Funkce	13
1.2. Historie	13
1.3. Chemická struktura natriuretických peptidů	14
1.4. Povrchové receptory	16
1.5. Distribuce ve tkáních	17
1.6. Termogeneze	17
1.7. Natriuretické peptidy a vliv na glukózu.....	19
1.8. Systém renin-angiotensin-aldosteron.....	20
1.9. Sympatický nervový systém.....	21
1.10. Úloha natriuretického peptidového systému při neurohormonální kontrole kardio- renální funkce.....	21
2. Atriální natriuretický peptid.....	22
3. Urodilatin	23
4. Mozkový natriuretický peptid.....	23
5. Natriuretický peptid typu C.....	24
5.1. Rozdíl mezi ANP, BNP A CNP	24
6. DNP	25
7. Syntetické natriuretické peptidy.....	25
7.1. Carperitid.....	25
7.2. Vasonatrin	26
7.3. Nesiritid.....	26
7.4. Cenderitid	26
7.5. Ularitid	27
7.6. Vosoritid.....	27
8. Klinický význam natriuretických peptidů.....	28
8.1. Srdeční selhání.....	28
8.1.1. Vliv natriuretických peptidů na srdeční selhání.....	28
8.1.2. Biomarkery	28
8.1.3. Diagnostické hodnocení akutního srdečního selhání	29
8.2. Akutní koronární syndrom	29
8.3. Plicní embolie.....	30
8.3.1. Biomarkery	30

8.4.	Akutní onemocnění ledvin	31
8.5.	Chronické onemocnění ledvin	31
8.5.1.	Biomarkery	32
8.6.	Jaterní cirhóza	32
8.7.	Obstrukční spánková apnoe	33
8.8.	Kritická ischemie končetin	34
8.9.	Achondroplázie	35
8.10.	Akromesomelická dysplázie, Maroteauxův typ	36
8.10.1.	Gen NPR-B	36
8.11.	Parkinsonova choroba	36
8.12.	Metabolický syndrom	37
8.12.1.	Obezita	38
8.12.2.	Diabetes mellitus 2. typu	39
8.12.2.1.	Periferní arteriální onemocnění	39
8.12.2.2.	Diabetická periferní neuropatie	40
8.12.2.3.	Kardiovaskulární onemocnění u diabetes mellitus 2. typu	41
8.12.2.4.	Diabetes mellitus a onemocnění ledvin	41
8.12.3.	Onemocnění jater	42
8.12.4.	Rakovina	42
9.	Metody stanovení natriuretických peptidů	43
9.1.	Metody pro stanovení ANP	43
9.2.	Metody pro stanovení BNP	44
9.2.1.	Princip testu BNP Minicare	45
9.2.1.1.	Výběr protilátek	46
9.2.1.2.	Formát testu	46
9.3.	Metody pro stanovení NT-proBNP	47
9.4.	Metody pro stanovení proBNP	48
9.5.	Metody pro stanovení CNP	49
9.5.1.	Fluorescenční detekce pomocí sondy	49
10.	Preanalytická fáze	51
10.1.	Stabilita BNP	51
10.2.	Stabilita ANP	51
10.3.	Stabilita CNP a NT-proCNP	52
ZÁVĚR		53
Použitá literatura		54

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura NP a syntetických NP (upraveno dle Ichiki et al, 2019).....	15
Obrázek 2 Působení NP a receptorů v cílových buňkách k udržení kardiovaskulární homeostázy (upraveno dle Vinnakota and Chen, 2020).....	17
Obrázek 3 Současný model různých metabolických účinků natriuretických peptidů při řízení energetického metabolismu a homeostázy glukózy (upraveno dle Coué and Moro, 2016).....	18
Obrázek 4 Úloha NP v metabolismu tuků a manipulaci s glukózou (upraveno dle Vinnakota and Chen, 2020)	20
Obrázek 5 Úloha natriuretických peptidů ve spojení s dietou a fyzickou aktivitou (upraveno dle Santhekadur et al., 2017)	38
Obrázek 6 Potenciální souvislost mezi NP, obezitou, inzulínovou rezistencí a cukrovkou. (upraveno dle Gruden et al., 2014).....	39
Obrázek 7 Nekompetitivní „sendvičový“ imunotest (upraveno dle Haddad et al., 2019).....	45
Obrázek 8 Platforma testu Minicare I-20 (upraveno dle Reenen at al, 2019).....	47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

NP	Natriuretické peptidy
ANP	Atriální natriuretický peptid
BNP	Mozkový natriuretický peptid
CNP	Natriuretický peptid C-typu
NT-proBNP	N-terminální propeptid BNP
MR-proANP	Midregionální propeptid ANP
NEP	Neprilysin
NPR-A	Natriuretický peptidový receptor A
NPR-B	Natriuretický peptidový receptor B
PDE	Fosfodiesteráza
eGFR	Rychlost glomerulární filtrace
AMDM	Akromesomelická dysplázie typu Maroteaux
GC	Guanylylcykláza
GC-A	Gyanylylcykláza A
GC-B	Gyanylylcykláza B
cGMP	cyklický 3,5-guanosinmonofosfát
UPC-1	Uncoupling „rozprahující“ protein 1
PKG	Proteinkináza G
PKA	Proteinkináza A
PLIN	Perilipin
HSL	Hormon senzitivní lipáza
ATGL	Tuková triglyceridová lipáza
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
P38 MAPK	p38 mitogenem aktivovaná proteinkináza
mRNA	Messengerová RNA
hANP	Rekombinantní α lidský atriální natriuretický peptid
VNP	Vasonatrin
T2DM	Diabetes mellitus 2. typu
RIA	Radioimunoanalýza
mAb	Monoklonální protilátky
HPLC	Kapalinová chromatografie
MIP	Molekulárně potištěný polymer

HIF-1 α	Hypoxií indukovatelný faktor 1 α
TGF β	Transformující růstový faktor
PGC1 α	Peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1 alpha
PPAR γ	Peroxisome proliferator – activated receptor gamma

ÚVOD

Hlavním cílem této práce je uvést základní informace o natriuretických peptidech, jejich klinický význam. Dále se práce věnuje také metodice stanovení jednotlivých natriuretických peptidů v lidském biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

První natriuretický peptid byl objeven roku 1981 ze srdečního síňového extraktu, který způsoboval natriurézu a vazodilataci. Natriuretické peptidy zahrnují rodinu strukturně příbuzných, ale geneticky odlišných peptidových hormonů. Mezi hlavní natriuretické peptidy se řadí atriální natriuretický peptid, mozkový natriuretický peptid, též známý jako natriuretický peptid typu B, dále se do této skupiny řadí natriuretický peptid typu C, urodilatin a nově objevený DNP, což je natriuretický peptid izolovaný z jedu hada *Dendroaspis angusticeps*.

Natriuretické peptidy regulují krevní tlak, ovlivňují natriurézu a diurézu, a dále také ovlivňují například růst kostí a termogenezi. Natriuretické peptidy mají důležitou roli při diagnostice různých onemocnění, a proto se velmi často používají jako diagnostické markery například u srdečního selhání a plicní embolie. Pro stanovení natriuretických peptidů se používají různé imunotesty.

1. Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy (NP) zahrnují rodinu strukturně příbuzných, ale geneticky odlišných peptidových hormonů, včetně atriálního natriuretické peptidu (ANP), natriuretického peptidu typu B známého také pod pojmem mozkový natriuretický peptid (BNP) a natriuretického peptidu typu C (CNP). Jedná se o aktivní peptidy, z nich jsou ANP syntetizovány v síních a BNP jsou převážně syntetizovány v srdečních komorách a uvolňují se do oběhu po roztažení srdeční stěny. Natriuretický peptid typu C je považován za převládající natriuretický peptid v nervovém systému, ale také se může lokálně projevovat v srdci a ve věnčitých tepnách. Koncentrace natriuretického peptidu typu C v plazmě je ve srovnání s ANP a BNP poměrně nízká (Buttgereit *et al.*, 2016). Mezi natriuretické peptidy dále patří například urodilatin, který je syntetizován a vylučován distálním tubulem nefronů a je detekován pouze v moči. Urodilatin se parakrinně integruje senzitivními amiloridovými sodíkovými kanály, aby podpořil diurézu a natriurézu a dále se podílí také na hydro-sodíkové regulaci. V rámci skupiny natriuretických peptidů popisujeme biochemické, fyziologické a patofyziologické charakteristiky nejvíce u ANP a BNP (Lugnier, *et al.*, 2019).

1.1. Funkce

Rodina NP je skupina polypeptidů, která hraje klíčovou roli při udržování tekutinové homeostázy těla regulací intravaskulárního objemu, vaskulární homeostázy a arteriálního tlaku. V poslední době byla také popsána pokročilá role NP v metabolické homeostáze. NP fungují jako ligandy pro soubor transmembránových natriuretických receptorů. (Meems and Burnett Jr., 2016). Objev silných lipolytických účinků natriuretických peptidů v roce 2000 vedl k rozšíření našeho chápání jejich role nad rámec kontroly krevního tlaku a objemu. Natriuretické peptidy regulují mobilizaci mastných kyselin z adipocytů a také metabolismus buněčné energie v adipocytech a kosterních myocytech (Vinnakota and Chen, 2020).

1.2. Historie

Klíčové biologické pozorování buněk, které předpovídalo existenci natriuretických peptidů bylo hlášeno před více než padesáti lety. Kirsch zpočátku zjistil, že síňové (ne komorové) buňky obsahují vysoce vyvinutý Golgiho aparát velmi podobný tomu v sekrečních buňkách. Jamieson a Palade uvedli, že síňové myocyty obsahují sférická, elektronem neprůhledná granula. Fyziologické experimenty prováděné Henrym a jeho kolegy současně odhalily, že balónková distenze síní souvisela s nadměrným močením u psů. Na konci

60. let začali de Bold a jeho kolegové charakterizovat síňová granula a zjistili, že obsah granulí se změnil v reakci na změny v rovnováze elektrolytů a vody. V klíčové studii publikované v roce 1981 de Bold a kolegové elegantně spojili zdánlivě nesourodé studie Kische a Henryho tím, že dokázali, že síňové extrakty obsahují účinnou složku snižující krevní tlak, která působí stimulací renální sekrece sodíku a vody. Byl tedy objeven první natriuretický peptid. Krátce po zveřejnění tohoto významného článku řada skupin uvedla purifikaci a sekvenování atriálních peptidů různých velikostí, které měly natriuretickou, diuretickou a relaxační aktivitu hladkého svalstva. Tomuto peptidu bylo dáno hned několik jmen, například atriální natriuretický faktor, atriopeptin, kardionatrin a tak dále. K popisu toho peptidu se však v současné literatuře nejčastěji používá atriální natriuretický peptid.

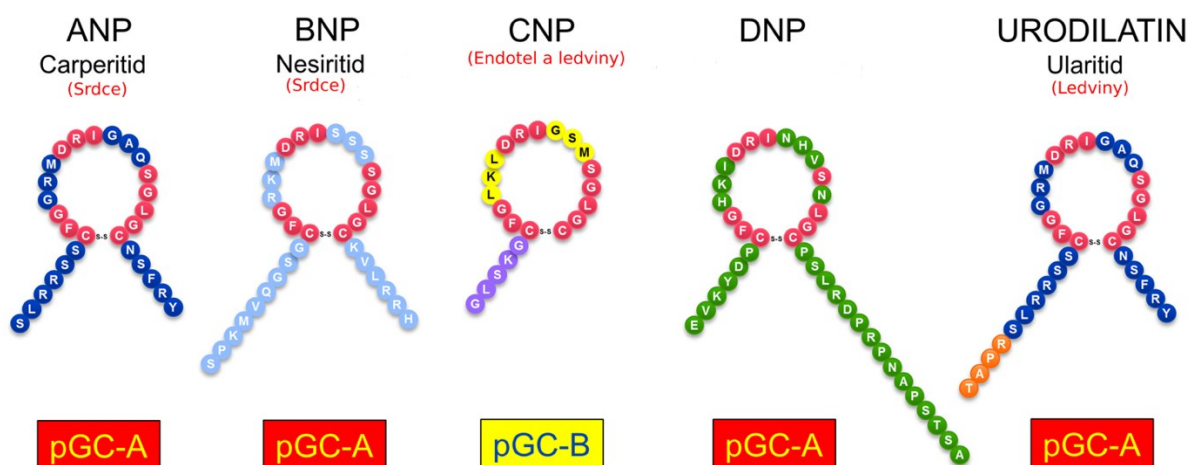
Druhý člen rodiny se jmenuje mozkový natriuretický peptid, neboť byl purifikován a sekvencován z prasečího mozku, následující studie však zjistily, že je více koncentrován v srdečních komorách pacientů se srdečním selháním. Natriuretický peptid typu C byl objeven v roce 1991 z extraktů prasečího mozku na základě jeho schopnosti relaxovat hladký sval (Potter *et al.*, 2016). Nový natriuretický peptid izolovaný z jedu hada *Dendroaspis angusticeps* (zelená mamba) byl pojmenovaný jako DNP. Tento peptid byl detekován pomocí imunologického barvení v lidských síňových myocytech a experimenty na psech prokázaly jeho natriuretickou odpověď (Dzimiri *et al.*, 2002).

1.3. Chemická struktura natriuretických peptidů

Peptidy jsou biomolekuly, které se skládají z monomerů aminokyselin a peptidových vazeb. Aminokyselinové složení těchto biomolekul je variabilní a je považováno za důležitý faktor, který určuje jedinečné chemické a fyzikální vlastnosti. Natriuretické peptidy patří mezi polypeptidy. Struktury všech aktivních forem a jejich vazby na guanylylcyklázu jsou spolu se strukturou hlavních syntetických NP znázorněny na obr. 1. a o obojím bude v textu pojednáno dále (Meems and Burnett Jr., 2016).

Atriální natriuretický peptid je syntetizován jako aminokyselinový preprohormon obsahující 151 aminokyselin a je uložen v síňových myocytech jako 126 aminokyselinový prohormon (pro-ANP). Po buněčné stimulaci jako je například napnutí myokardu, vazokonstrikce endotelinem nebo zvýšená hladina angiotenzinu II, se štěpí pro-ANP serinovou proteázou zvanou korin do formy aktivního ANP obsahujícího 28 aminokyselin viz obr. 1. V normálním zdravém srdci se ANP nachází převážně v síních.

Mozkový natriuretický peptid je syntetizován jako preprohormon o 134 aminokyselinách, který je poté rozdělen na signální peptid a propeptid o 108 aminokyselinách (pro-BNP). Po sekreci z kardiomyocytů je pro-BNP rozdělen do ekvimolárního množství fyziologicky aktivního BNP (32 aminokyselin) a biologicky neaktivního fragmentu NT-pro-BNP skládajícího se z 76 aminokyselin. Aktivní mozkový natriuretický peptid je strukturálně podobný aktivnímu ANP, neboť je tvořen kruhem ze 17 aminokyselin a s dvěma postranními řetězci, z nichž je jeden delší, jak je znázorněno na obr. 1. Aktivní ANP a BNP se vážou na svůj receptor nazývaný se natriuretický peptidový receptor A (NPR-A), který je široce exprimován v těle, včetně ledvin, srdce, plic, mozku, nadledvin, tukové tkáně a cév. Tato vazba aktivuje guanylylcyklázu A (GC-A), zatímco CNP se váže na natriuretický peptidový receptor B (NPR-B) a tato vazba naopak aktivuje guanylylcyklázu B (GC-B) viz obr. 1. Výsledné zvýšení cyklického 3,5-guanosinmonofosfátu (cGMP) zprostředkovává několik ochranných mechanismů v renálním, vaskulárním a srdečním systému viz obr. 2.



Obrázek 1 Struktura NP a syntetických NP a dále je znázorněna vazba ANP, BNP, urodilatínu a DNP na guanylylcyklázu A (GC-A) a CNP váží se na GC-B (upraveno dle Ichiki et al, 2019).

Aktivní peptidy mohou být odstraněny z oběhu natriuretickým peptidovým receptorem C (NPR-C) a degradovány neutrální endopeptidázou (NEP) známou také jako neprilysin, jak je také znázorněno na obr. 2. Na štěpení natriuretického peptidu se podílí také enzym degradující inzulin (S Lee and B Daniels, 2016).

Natriuretický peptid typu C je distribuován v centrálním nervovém systému, ale hlavně je produkován vaskulárním endotelem. Působí jako lokální parakrinní faktor při řízení cévního tonu a zdá se, že tento peptid je slabě natriuretický.

DNP je peptid s 38 aminokyselinami obsahující disulfidovou kruhovou strukturu, kterou tvoří 17 aminokyselin a je podobná struktura ANP, BNP a CNP (Palmer and Clegg, 2015).

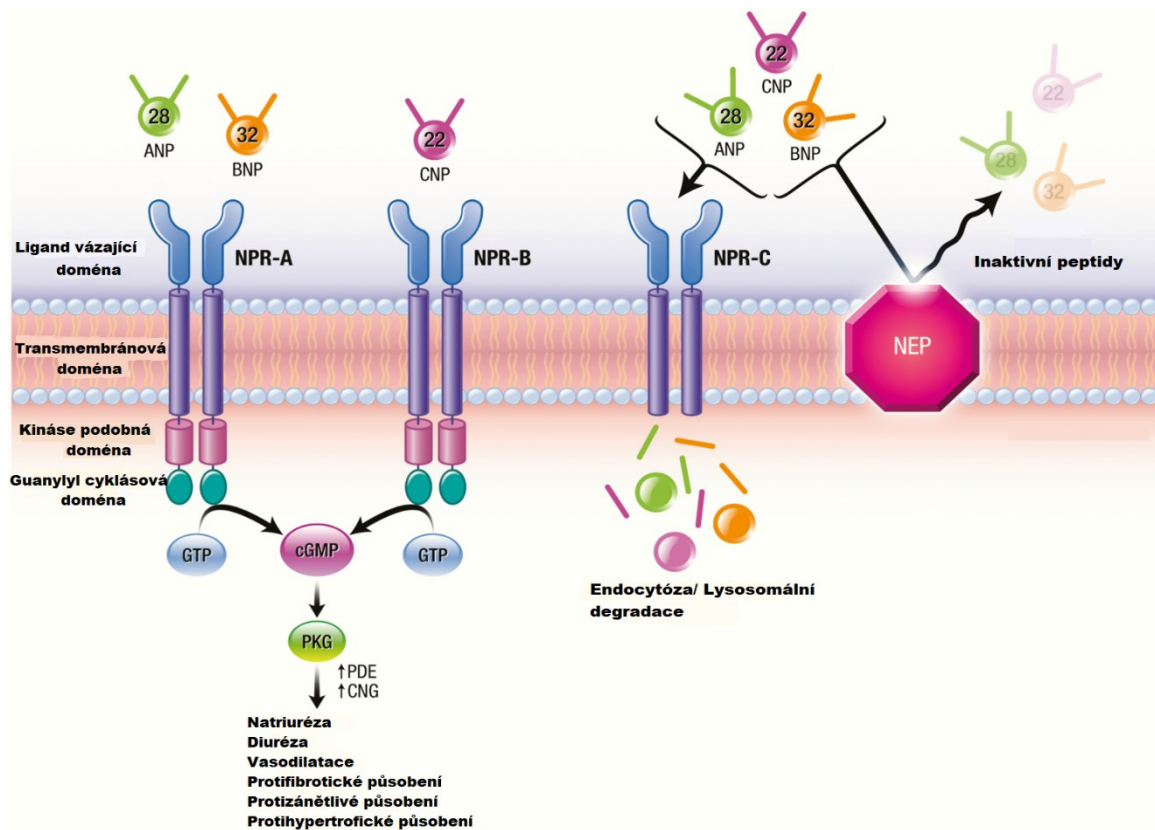
Urodilatin je peptid s 32 aminokyselinami a je odvozen od prekursoru ANP, oproti ANP má ještě navíc další čtyři aminokyseliny na N konci (Packer *et al.*, 2016).

1.4. Povrchové receptory

Jak natriuretický peptidový receptor A (NPR-A), tak i natriuretický peptidový receptor B (NPR-B) obsahují extracelulární doménu vázající ligand, jednu transmembránovou překlenovací oblast, intracelulární doménu skládající se z homologické domény podobné proteinové kináze a katalytickou doménu částicové guanylylcyklázy (GC). Vazba ANP nebo BNP na NPR-A indukuje intracelulární část domény částicové GC ke generování cGMP z guanosintrifosfátu. Jako intracelulární druhý posel cGMP poté aktivuje proteinkinázu G (PKG) a fosfodiesterázu (PDE) pro cílové buňky, aby se projeví účinky. NPR-A a NPR-B se nacházejí v ledvinách, hladkém svalstvu cév, nadledvinách, srdci a mozku. NPR-A má větší afinitu k ANP než BNP a CNP, zatímco NPR-B dává přednost CNP před ANP a BNP, což je znázorněno na obr. 2 (Wong *et al.*, 2017).

NPR-C řídí koncentrace NP prostřednictvím internalizace a degradace zprostředkované receptorem a dále hraje roli poměr NPR-A k NPR-C při regulaci biologické aktivity NP. Kromě své clearance aktivity má NPR-C také vlastní aktivitu regulující endoteliální funkce, přičemž signální dráha CNP/NPR-C hraje zásadní roli v regulaci vaskulárního tonu (Vinnakota and Chen, 2020). Hlavní rozdíl mezi NPR-A, NPR-B a NPR-C spočívá v tom, že NPR-C nemá guanylylcyklázovou aktivitu, zatímco NPR-A a NPR-B mají guanylylcyklázovou doménu a tudíž i guanylylcyklázovou aktivitu.

ANP, BNP a CNP mohou být rychle degradovány neprilysinem viz obr. 2, což je neutrální endopeptidáza, ektoenzym obsahující zinek a vázaný na membránu, který štěpí substráty na aminové straně hydrofobních zbytků (Wong *et al.*, 2017).



Obrázek 2 Působení NP a receptorů v cílových buňkách k udržení kardiovaskulární homeostázy (upraveno dle Vinnakota and Chen, 2020)

1.5. Distribuce ve tkáních

Exprese genu ANP je nejvyšší u dospělého člověka v síních a mnohem nižší v komorách. Síně jsou hlavním místem syntézy ANP, avšak exprese ventrikulárního ANP je výrazně zvýšena u selhávajícího a hypertrofujícího srdce.

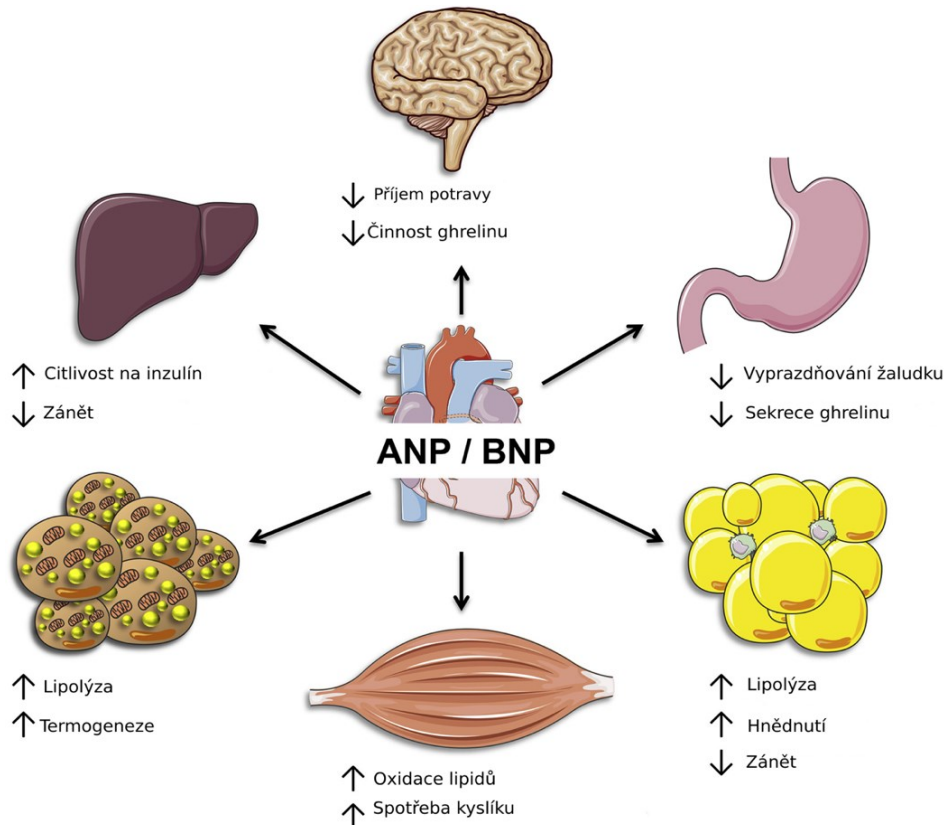
mRNA mozkového natriuretického peptidu byla nalezena v dřeni nadledvin, mozku a amniotických buňkách. BNP je nesprávně pojmenovaný, neboť jeho nejvyšší úroveň exprese je ve ventrikulárním myokardu, a ne v mozku. CNP je distribuován v mozku a dále také v endotelu, nadledvinách, srdci, střevě, brzlíku, děloze a varlatech (Chopra *et al.*, 2013).

1.6. Termogeneze

Kromě klasického působení hemodynamické regulace, o kterém bude podrobněji pojednáno dále, existuje stále více důkazů o tom, že NP také do značné míry koordinují energetickou rovnováhu. Ve skutečnosti nedávné studie ukázaly, že NP stimulují triglyceridovou lipólýzu, podporují „rozpojení“ oxidativní fosforylace skrze „zhnědnutí“ tukové tkáně a aktivují termogenezi viz obr. 3 a 4. Uncoupling „rozpřahující“ protein 1 (UPC-1) je aniontový transportér, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a je

specificky exprimován v hnědé tukové tkáni a umožňuje „rozpojení“ oxidativní fosforylace spíše než produkci adenosintrifosfátu, což umožňuje uvolnění nutriční energie ve formě tepla. Nedávná studie prokázala, že NP ve skutečnosti zvyšují intracelulární teplo v kultivovaných hnědých adipocytech způsobem citlivým na nízkou teplotu prostřednictvím cesty separace UPC-1 proteinu, jak je znázorněno na obr. 3. Kromě toho Bordicchia a spol. uvádí, že hladiny messengerové RNA ANP a BNP v plazmě se u myši vystavených chladnému prostředí zvyšují, což podporuje myšlenku, že NP mohou vyvolat aktivaci termogenního programu tukové tkáně reakcí na chladný podmět. Na základě těchto předchozích zjištění se předpokládá, že NP mají adaptivní termogenní účinek nebo vlastnost zadržující teplo, když klesá tělesná teplota v důsledku nepříznivých hemodynamických podmínek ve stavu srdeční systolické dysfunkce. NP zvyšují intracelulární teplotu v kultivovaných adipocytech (Kang *et al.*, 2021).

PGC1 α (Peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1 alpha) je transkripční koaktivátor, který zprostředkovává mnoho biologických programů souvisejících s energetickým metabolismem. Původně byl popsán jako koaktivátor jaderného receptoru PPAR γ (Peroxisome proliferator – activated receptor gamma). Důsledkem jejich interakce je indukce UCP-1. Také se ukázalo, že řídí mitochondriální biogenezi a oxidativní metabolismus v mnoha typech buněk (Boström *et al.*, 2012).



Obrázek 3 Současný model různých metabolických účinků natriuretických peptidů při řízení energetického metabolismu a homeostázy glukózy (upraveno dle Coué and Moro, 2016).

1.7. Natriuretické peptidy a vliv na glukózu

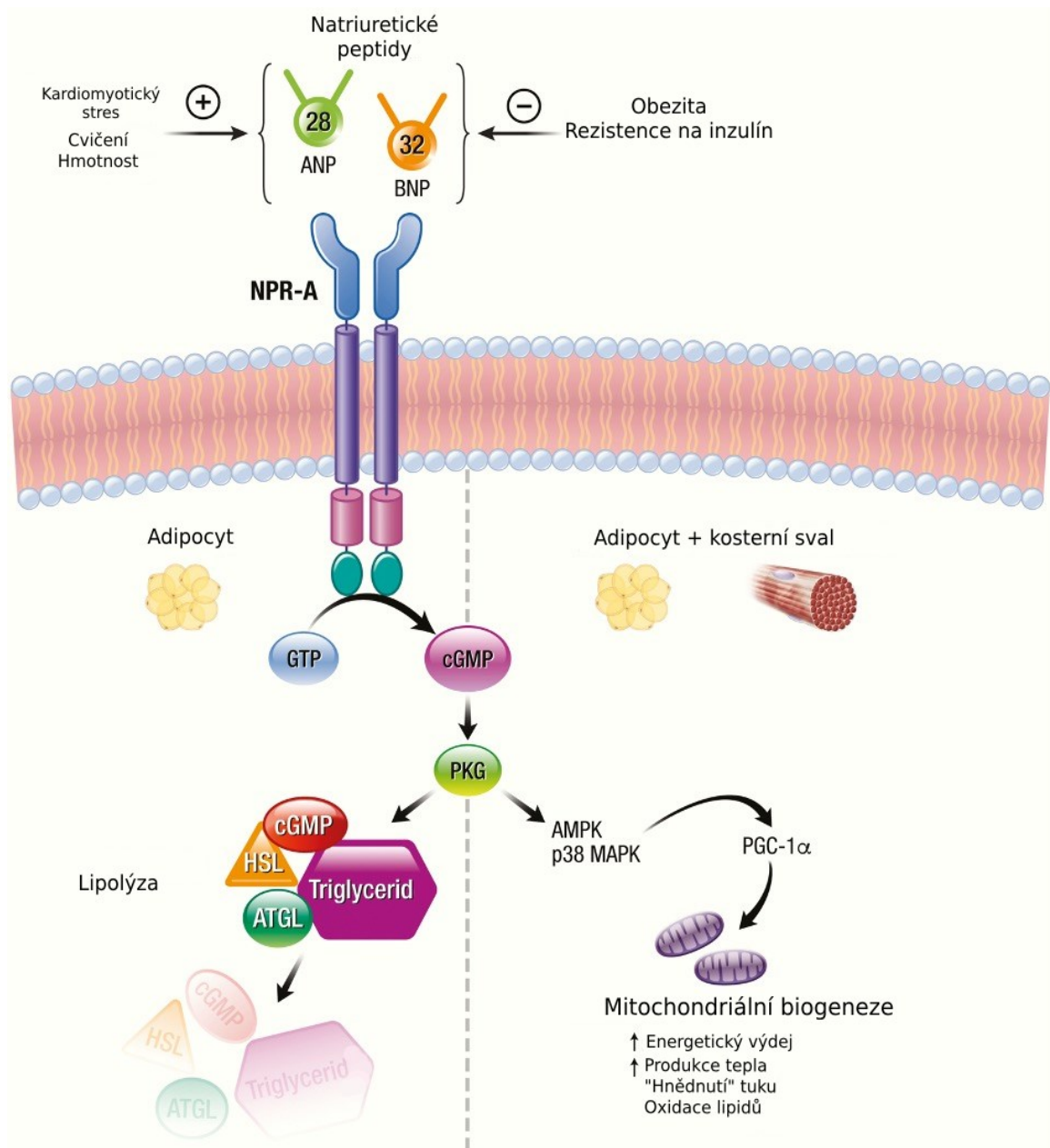
Jak znázorňuje obrázek 3, NPR-A zprostředkovává vzestup cGMP a aktivaci PKG, což vede jednou cestou (znázorněno vlevo) k fosforylaci hormon senzitivní lipázy (HSL) a perilipinu (PLIN) Aktivace HSL a tukové triglyceridové lipázy (ATGL) podporuje lipolýzu, která zvýší uvolňování mastných kyselin pro mitochondriální využití. Mastné kyseliny jsou substráty i aktivátory termogeneze v hnědé tukové tkáni. Tuto fosforylační schopnost má i proteinkináza A (PKA). Protože obrázek 3 se zaměřuje na ilustraci vlivu NP na metabolismus a termogenezi a ten je zprostředkován cGMP (potažmo PKG), není zde PKA znázorněna (Zhang *et al.*, 2021; Vinnakota and Chen, 2020; Moro and Lafontan, 2013).

Perilipin existuje na povrchu lipidových kapiček a může blokovat kontakt mezi lipidovými kapičkami a lipázou, čímž působí jako bariéra pro reakci rozkladu lipidů. PKA nebo PAG fosforylace PLIN odstraňuje tento bariérový efekt, umožňuje lipidovým kapičkám plně kontaktovat ATGL a iniciovat lipohydrolyzu (Zhang *et al.*, 2021).

Druhá cesta (znázorněna vpravo), kterou zprostředkovává PKG, vede přes AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK). Tato kináza je důležitá pro metabolické dráhy lipidů a glukózy, aktivuje katabolické procesy spojené s uvolněním energie (lipolýza, štěpení glukózy). Je běžně fosforylována pomocí PAK. Podle aktuálních literárních údajů má však tuto schopnost také PKG. Následuje aktivace p38 mitogenem aktivované proteinkinázy (p38 MAPK), jejíž fyziologická funkce spočívá mimo jiné v zapojení se do regulace stresové reakce, a transkripčního faktoru 2 (na obrázku 3 neznázorněn). Aktivace p38 MAPK a transkripčního faktoru 2 indukuje UPC1 přes PGC-1 α (Vinnakota and Chen, 2020; Moro and Lafontan, 2013; Ramnanan *et al.*, 2010).

Aby se podpořila hypotéza „spojení střeva a srdce“, indukují receptory glukagonu podobného peptidu-1 v síňovém myokardu, které jsou aktivovány jídlem bohatým na živiny, sekreci ANP, což nepřímo vede k metabolickým a hemodynamickým změnám. Kromě toho CNP také snižuje příjem potravy a tělesnou hmotnost aktivací hypotalamové melanokortinové dráhy (Vinnakota and Chen, 2020).

Coué a kolektiv prokázali, že signalizace NPR-A v kosterních svalech je klíčová pro udržení dlouhodobé citlivosti na inzulín regulací lipidové oxidační kapacity cestou závislou na PGC1 α , ale tento mechanismus je narušen u obezity a diabetu. NPR-A je také negativně spojen s celkovým obsahem tuků a svalů v celkovém nasyceném obsahu ceramidu – oba faktory negativně ovlivňují citlivost na inzulín. Kromě role NPR-A může upregulace v NPR-C také přispět k NP-handicapu ve stavech snížené tolerance glukózy (Vinnakota and Chen, 2020).



Obrázek 4 Úloha NP v metabolismu tuků a manipulaci s glukózou (upraveno dle Vinnakota and Chen, 2020)

1.8. Systém renin-angiotensin-aldosteron

Systém renin-angiotensin-aldosteron v regulaci kardiovaskulárního systému zprostředkovává fyziologické účinky včetně vazokonstrikce a zadržování sodíku spolu s vodou k řízení krevního tlaku a rovnováhu mezi elektrolyty a tekutinami. Pokud je však tento systém aktivován nevhodně, potom se stává významným k rozvoji patofyziologie kardio-renálního onemocnění, částečně kvůli zprostředkování srdeční a vaskulární hypertrofie, fibrózy ledvin, prozánětlivých procesů a oxidačního stresu. Jako předmět intenzivního zájmu a výzkumu po několik desetiletí dosáhl systém renin-angiotensin-aldosteron rostoucí úrovně složitosti díky objevu mnoha dalších komponent a cest. Účinky angiotensinu II a aldosteronu se

však považují za zásadní pro většinu fyziologických a patologických účinků systému a látek určených k inhibici tohoto systému (Volpe, 2014).

1.9. Sympatický nervový systém

I když je sympatický nervový systém méně dobře zdokumentován, než je tomu v případě systému renin-angiotensin-aldosteron, vědecké důkazy naznačují, že zvýšená aktivace sympatického nervového systému je také klíčovým prvkem ve vývoji kardio-renálního onemocnění. Kromě zvýšeného vazomotorického tonusu a srdečního výdeje způsobuje chronická aktivace sympatického nervového systému retenci sodíku a vody, prozánětlivé procesy a remodelaci srdce a cév. V raných stádiích srdečního selhání sympatický nervový systém reaguje na nemocné srdce obnovením srdečního výdeje a zvýšením periferní vazokonstrikce ve snaze udržet homeostázu. Tato počáteční reakce tohoto systému doprovázená podobnou odpovědí systému renin-angiotensin-aldosteron je kompenzační a prospěšná. Dlouhodobá aktivace těchto dvou systémů se však stává škodlivou a přispívá ke zhoršení obrazu patofyziologie srdečního selhání. Chronická aktivace sympatického nervového systému hraje roli při zahájení a udržení hypertenze. Nadměrná sympatická aktivita při hypertenzi vede nejen k patofyziologickým změnám v srdci a ledvinách, ale vaskulatura je také citlivá na škodlivé účinky hyperaktivního sympatického nervového systému. Podpora endoteliální dysfunkce spolu s hypertrofií a proliferací buněk vaskulárního hladkého svalstva je klíčovým faktorem při tuhnutí velkých tepen, což je možným předchůdcem rozvoje hypertenze (Volpe, 2014).

1.10. Úloha natriuretického peptidového systému při neurohormonální kontrole kardio-renální funkce

Neurohormonální systémy jako systém renin-angiotensin-aldosteron a sympatický nervový systém hrají důležitou roli při modulaci klíčových parametrů kardiovaskulární homeostázy včetně vaskulárního tonusu, regulace elektrolytů a tekutin a kardiovaskulární remodelace. Systém NP, společně se systémem renin-angiotensin-aldosteron a s sympatickým nervovým systémem, je nyní považován za klíčový neurohormonální systém a předpokládá se, že mezi těmito třemi systémy bude probíhat značná interakce k udržení účinné kardio-renální homeostatické kontroly. Obecně jsou prospěšné fyziologické účinky systému NP kontraregulační vůči účinkům ostatních dvou systémů, zejména systému renin-angiotensin-aldosteron. Systém NP lze skutečně považovat za „přirozeného protivníka“

systemu renin-angiotensin-aldosteron a sympatického nervového systému. Systém NP snižuje sekreci reninu a aldosteronu, což vede k potlačení systému renin-angiotensin-aldosteron, NP navíc interferují s autonomní a baroreflexní kontrolou oběhu, což vede k inhibici účinků sympatického nervového systému a ke zvýšení aktivity parasymptiku. Systém renin-angiotensin-aldosteron a sympatický nervový systém fungují vzájemně spolupracujícím způsobem. Angiotensin II je hlavním efektorovým hormonem systému renin-angiotensin-aldosteron a váže se na receptory angiotensinu typu 1 a zvyšuje tak aktivaci sympatického nervového systému. Zatímco sympatický pohon zvyšuje sekreci reninu v ledvinách, čímž zvyšuje aktivitu systému renin-angiotensin-aldosteron, literární údaje ukazují, že endogenní aktivace sympatického nervového systému může snížit sekreci ANP (Volpe, 2014).

2. Atriální natriuretický peptid

Atriální natriuretický peptid je endokrinní hormon syntetizován v srdečních síních a mozku zejména v neuronech a neuroglíích mozkové kůry, dále také v neuronech a vláknech thalamu, bazálních gangliích, *corpus amygdaloideum* a mořském koníku (řec. *hippocampus*), který je součástí velkého mozku (Hauser *et al.*, 2020).

Atriální natriuretický peptid má hlavní roli v regulaci krevního tlaku. V ledvinách ANP způsobuje natriurézu a diurézu zvýšením rychlosti glomerulární filtrace a inhibicí reabsorpce sodíku a vody. ANP působí jako funkční antagonist systému renin-angiotensin-aldosteron tím, že inhibuje sekreci reninu z ledvin a produkci aldosteronu v nadledvinách. Stimuluje relaxaci buněk hladkého svalstva v cévách, což způsobuje vazorelaxaci a také reguluje intravaskulární objem zvýšením propustnosti endotelu (Hodes and Lichtstein, 2014).

ANP hraje důležitou roli v regulaci mnoha fyziologických a patofyziologických cest. Doposud byla role ANP stanovena při natriuréze, diuréze, vazodilataci a inhibici systému renin-angiotensin-aldosteron a sympatického nervového systému. Vědci popsali úlohu ANP v patogenezi akutní ischemické cévní mozkové příhody, cukrovky, chronickém onemocnění ledvin a plicních onemocněních (zejména pneumonie) (Idzikowska and Zielińska, 2018).

Midregionální propeptid ANP (MR-proANP) je v posledních letech stále častěji využívaný marker s mnohonásobnými biologickými funkcemi, zejména v kardiovaskulárním systému. Koncentraci MR-pro ANP v lidském těle lze analyzovat novými sendvičovými imunotesty rozpoznávajícími midregionální sekvence pro-ANP, konkrétně úsek mezi 53. – 90. aminokyselinou na NT pro-ANP, tzn. když se odštěpí hotové ANP, tak zbývá

N-terminální ANP, které má 98 aminokyselin a tento úsek umožňuje lepší laboratorní diagnostiku. MR-proANP je cennějším biomarkerem, neboť má větší analytickou stabilitu, delší poločas rozpadu a dále také nedostatek proteinových interakcí oproti ANP a jeho prekurzorovým fragmentům. (Idzikowska *et al.*, 2020). MR-proANP je tedy novým biomarkerem úseku myokardu, který slouží k diagnostickému a prognostickému hodnocení pacientů s chronickým onemocněním ledvin a se srdečním selháním. MR-proANP není ovlivněn obezitou a anémií, ale souvisí se zánětem, funkcí ledvin, fibrilací síní atd. Během klinické aplikace je třeba vzít v úvahu související faktory (Han *et al.*, 2020; Khaleghi *et al.*, 2009).

3. Urodilatin

Natriuretický peptid nazývaný se urodilatin patří do skupiny atriálních natriuretických peptidů. Urodilatin a ANP jsou odvozeny od stejného prekurzoru, jak je zmíněno u obr. 1 (Packer *et al.*, 2016).

V ledvinách, na rozdíl od všech ostatní tkání, dochází k rozdílnému zpracování hormonu pro-ANP, kde místo štěpení prohormonu mezi devadesátou osmou a devadesátou devátou aminokyselinou za vzniku ANP a kaliuretického peptidu je štěpeno mezi devadesátou pátou a devadesátou šestou aminokyselinou. Toto štěpení má za následek, že čtyři aminokyseliny z C-konce kaliuretického peptidu (tj. threonin-alanin-prolin-arginin) jsou připojeny k N-konci ANP, přičemž výsledný peptid se nazývá urodilatin. Aminokyseliny v urodilatinu jsou identické se čtyřmi C-koncovými aminokyselinami kaliuretického peptidu a identické se všemi aminokyselinami v ANP (Vesely, 2016).

Urodilatin je syntetizován v tubulárních buňkách ledvin a vylučován lumenálně, aby působil po proudu k regulaci reabsorpce sodíku a vody v distálních tubulech nefronu, tento účinek může být příznivě potencován lokálně uvolňovaným dopaminem. Urodilatin je proto považován za intrarenální parakrinní regulátor homeostázy sodíku a vody. Renální exkrece urodilatinu je zvýšena u pacientů se srdečním selháním, možná jako mechanismus pro potlačení retence sodíku, ale ne u jiných edematózních stavů (Packer *et al.*, 2016).

4. Mozkový natriuretický peptid

Mozkový natriuretický peptid je vylučován hlavně srdcem v reakci na stres myokardu vyvolaný objemovým nebo tlakovým přetížením. Tento srdeční hormon je považován za užitečný hemodynamický marker umožňující přesnější diagnostiku a prognózu pacientů

s chronickým srdečním selháním. Cirkulující BNP se také zvyšuje v případě plicní hypertenze a předpokládá se, že vykazuje dysfunkci pravé komory (Talha, *et al.*, 2017).

5. Natriuretický peptid typu C

Endotel je klíčový při spouštění angiogeneze, vaskulární remodelace a minimalizace funkčního deficitu po ischemii. Natriuretický peptid typu C odvozený z endotelu hraje zásadní roli v regulaci vaskulární homeostázy. CNP řídí lokální průtok krve cévami a systémový krevní tlak, snižuje reaktivitu leukocytů a krevních destiček a dále brání rozvoji aterogeneze a aneurysmatu. Několik aspektů naznačuje, že CNP může hrát ústřední roli v angiogenezi. Například stříhový stres a transformující růstový protein (TGF β) jsou dva z primárních stimulů pro uvolňování CNP z endotelových buněk, oba stimuly jsou dobře validovanými spouštěči pro angiogenezi a arteriogenezi. Kromě toho je hypoxií indukovatelný faktor 1 α (HIF-1 α), základní hnací síla ischemické angiogenní odpovědi, silným zesilovačem exprese natriuretického peptidu, zejména v kardiomyocytech. Peptid zpomaluje neointimální hyperplazii a podporuje reendotelizaci v žilních štěpech, v poškozených krčních tepnách a po balónkové angioplastice. CNP také udržuje hustotu kapilár po infarktu myokardu a ischemii končetin (Bubb *et al.*, 2019).

CNP stimuluje vývoj kostí. K vývoji dlouhých kostí skeletu dochází prostřednictvím endochondrálních osifikačních procesů, při kterých vrstvy chondrocytů vytvářejí růstové ploténky na obou koncích kostních rudimentů a poté jsou expandované části chrupavky postupně nahrazovány trabekulárními („trámčitými“) kostmi působením osteoklastů a osteoblastů. Velikost kosti proto do značné míry závisí na proliferaci chondrocytů růstové ploténky během endochondrálního vývoje. CNP stimuluje vývoj kostí působením na chondrocyty růstové ploténky exprimující CNP-specifický receptor NPR-B (Miyazaki *et al.*, 2022).

5.1. Rozdíl mezi ANP, BNP A CNP

Peptid typu C se liší od příbuzných srdečních hormonů především vlastnostmi, ačkoliv většina charakteristik tohoto peptidu zůstává ne úplně pochopena. Jelikož je CNP vidět v mozku, byl původně považován za neuropeptid, ačkoliv byl poté detekován v ledvinách, kostech, krvi, cévách a pohlavních orgánech, i když v nízkých koncentracích. Současné metody potvrdily přítomnost CNP a jeho mRNA v srdci (síních a komorách). Neakumuluje se jako srdeční peptidy v buňkách v sekrečních granulích, takže regulace jeho syntézy a sekrece

probíhá tedy spíše aktivací nebo inhibicí transkripce. Většina zdrojů v současnosti považuje CNP za autokrinní nebo parakrinní hormon s výraznými vazodilatačními a antimitogenními (antiproliferativními) účinky (Korostyshevskaya et al., 2016).

6. DNP

Jak již bylo zmíněno, tento peptid sdílí strukturální podobnost s ANP, BNP a s CNP, dále vědecké zprávy naznačují, že DNP má biologické vlastnosti, které jsou také podobné ostatním natriuretickým peptidům. DNP vytěsňuje vazbu ANP z natriuretických peptidových receptorů a je zajímavé, že se uvádí, že DNP imunoreaktivita je přítomna v lidské plazmě a síňovém myokardu a dále je zvýšena v plazmě lidí s městnavým srdečním selháním. Napětově a časově závislé pomalé vápníkové kanály (typu L) v srdečních myocytech hrají klíčovou roli v regulaci srdeční funkce a lze je regulovat vnějšími faktory, jako jsou hormony a vnitřními faktory (buněčné pH nebo hladiny ATP). Aktivita vápníkového kanálu typu L2 se zvyšuje aktivací cyklické AMP-dependentní proteinkinázy, zatímco se snižuje aktivací cGMP-dependentní proteinkinázy. DNP zvyšuje tvorbu cGMP, což je druhý posel pro ostatní natriuretické peptidy v aortálních endoteliálních a hladkých svalových buňkách. Vzhledem k tomu by DNP mohl regulovat srdeční funkci inhibicí vápníkových kanálů typu L prostřednictvím aktivace cGMP-dependentní proteinkinázy. Nebyly však provedeny žádné studie týkající se náhodného vztahu mezi DNP, cyklickým GMP nebo PKG a srdečními vápníkovými kanály s trváním srdečního akčního potenciálu (Park *et al.*, 2012).

7. Syntetické natriuretické peptidy

7.1. Carperitid

Rekombinantní α lidský atriální natriuretický peptid (hANP) je syntetický ANP skládající se z 28 aminokyselin viz obr. 1. Tento natriuretický peptid se ukázal jako slibný lék na kardiovaskulární a renální dysfunkce. Na základě příznivých vlastností byl hANP zkoumán jako účinný lék na akutní poškození ledvin v klinických studiích. Zůstává však zatím nejasné, zda může být hANP účinnou léčbou u kritických pacientů s akutním poškozením ledvin a také u pacientů s akutním srdečním selháním v současné klinické praxi, neboť může na začátku léčby způsobit hypotenzi vlivem vazodilatačních vlastností carperitidu. U pacientů nedochází ke zlepšení kvality života, což dále vede ke zvýšení mortality v nemocnicích. Další nevýhodou tohoto léku je jeho vysoká cena, což vede ke zvýšení celkových nákladů na hospitalizaci (Fujii *et al.*, 2019; Nogi *et al.*, 2022).

7.2. Vasonatrin

Vasonatrin (VNP) je uměle syntetizovaná chiméra ANP a CNP u níž se prokázalo, že má větší diuretické, natriuretické a vazorelaxační účinky, než jiné natriuretické peptidy jako jsou právě ANP a CNP. Předchozí studie prokázaly, že VNP chrání diabetické srdce před ischemickým nebo reperfučním poškozením pomocí signální dráhy cGMP-PKG (Chang *et al.*, 2021). VNP se skládá z 22 aminokyselin mající kruhovou strukturu odvozenou od CNP a COOH konec od ANP.

Uvádí se, že VNP má větší potenciál k uvolnění abdominální aorty a *celiac vein*, dále má silnější inhibiční účinek na proliferaci buněk hladkého svalstva plicní arterie oproti již zmíněnému ANP a CNP. Studie *in vitro* a *in vivo* naznačují, že VNP má příznivé účinky na plicní hypertenzi vyvolanou hypoxií a neexistují žádné zprávy o působení jiných natriuretických peptidů proti tomuto problému. Uvádí se, že pouze NPR-A je subtyp funkčního receptoru VNP a na základě podobnosti s ANP, CNP a cenderitidem se předpokládá, že VNP se bude moci vázat na NPR-B (Jiang *et al.*, 2014).

7.3. Nesiritid

Nesiritid je rekombinantní forma lidského natriuretického peptidu typu B a jeho aminokyselinová sekvence je stejná jako u endogenního lidského BNP viz obr. 1. Přípravek je určen k intravenózní léčbě pacientů s akutním dekompenzovaným srdečním selháním, kteří mají dušnost v klidu nebo s minimální aktivitou zejména u pacientů s tekutinovým přetížením (Dorsch and Rodgers, 2012).

7.4. Cenderitid

Cenderitid je chimérická molekula složená z lidského CNP plné délky fúzovaného s patnácti aminokyselinovým karboxyterminálním koncem (C konec) peptidu DNP, který je izolován z jedu zelené mamby a je to endogenní agonista guanylylcyklázy A (Dickey and Potter, 2011). Cenderitid je nový natriuretický peptid, který byl vyvinut se schopností aktivace dvou známých natriuretických receptorů, GC-A (NPR-A) a GC-B (NPR-B). ANP a BNP aktivují receptor GC-A, CNP aktivuje receptor GC-B a tedy cenderitid dokáže aktivovat oba GC receptory a následně aktivovat i druhého posla, což je cyklický 3,5-guanosinmonofosfát (cGMP). Důležité je, že cenderitid aktivuje cGMP ve větší míře v lidských srdečních fibroblastech podobně jako CNP (Martin *et al.*, 2012).

CNP je výhodný, neboť je méně hypotenzní oproti ANP nebo BNP a signální receptor není v selhávajícím srdci regulován směrem dolů. CNP však postrádá diuretické a natriuretické účinky, které jsou rozhodující pro zlepšení stavu pacientů s městnavým srdečním selháním. Protože DNP má natriuretickou i hypotenzní aktivitu je cenderitid navržen tak, aby kombinoval venodilatační a srdeční vlastnosti CNP s prospěšnými renálními vlastnostmi DNP. Studie na zvířatech i lidech naznačují, že cenderitid má lepší klinické vlastnosti oproti nesiritidu (Dickey and Potter, 2011).

7.5. Ularitid

Jedná se peptid obsahující 32 aminokyselin se stejnou strukturou jako atriální natriuretický peptid s 28 aminokyselinami s výjimkou přidání čtyř aminokyselin na N-terminální prodloužení. Ularitid je syntetická forma urodilatinu, lidského natriuretického peptidu, produkovaného diferenciací proatriálního natriuretického peptidu v distálních buňkách renálních tubulů viz obr. 1. Ularitid se váže primárně na NPR-A, který je expimován v srdci, ledvinách, tkáni hladkého svalstva cév a dalších orgánech. Farmakologické účinky ularitidu zahrnují indukci natriurézy, diurézy, vazodilatace, bronchodilatace a inhibice systému renin-angiotensin-aldosteron. Fyziologicky se zdá, že urodilatin ve shodě s jinými hormony (například systém renin-aldosteron) hraje parakrinní roli ve funkci ledvin.

V počátečních klinických studiích se zdravými dobrovolníky způsobila infuze ularitidu na dávce závislé snížení systolického TK a zvýšení rychlosti glomerulární filtrace a filtrace sodíku a chloridu (natriuréza). Pro jeho příznivé účinky (např. právě vazodilatace, diuréza a natriuréza) byl studován při léčbě akutního srdečního selhání. Stejně jako u jiných vazodilatancí se ukázalo, že má příznivé účinky na vaskulární kongesci, ale neprojevují se ve prospěch dlouhodobých výsledků, jako je přežití a opětované použití (Shah *et al.*, 2018).

7.6. Vosoritid

Vosoritid je rekombinantní natriuretický analog peptidu typu C, který byl vyvinut, aby měl delší poločas než jeho endogenní forma a aby se prodloužila farmakologická aktivita. Subkutánní podání vosoritidu jednou denně podporuje růst mladých kostí. Dostupné údaje naznačují, že léčba založená na natriuretickém peptidu typu C může zvýšit endochondrální osifikaci a zlepšit kosterní růst u dětí s achondroplázií o které bude v textu pojednáno dále (Savarirayan *et al.*, 2019).

8. Klinický význam natriuretických peptidů

8.1. Srdeční selhání

Prevalence chronického srdečního selhání je v běžné populaci asi 1,3 % a stále stoupá v důsledku zvyšování podílu starších lidí. U lidí ve věku nad 75 let dosahuje prevalence minimálně 8 % a je jednou z nejčastějších příčin morbidity a mortality v této populaci. V České republice je každý rok diagnostikováno přibližně 40000 nových případů srdečního selhání a více než 40 % z nich zemře v následujících čtyřech letech. To představuje významný problém pro systém zdravotní péče a ekonomiku.

Jedním z nejdůležitějších cílů při léčbě srdečního selhání je včasné stanovení správné diagnózy a co nejrychlejší zahájení vhodné léčby. Příznaky srdečního selhání jsou nicméně nespecifické a typický klinický obraz lze nalézt u méně než 50 % pacientů. Využití dalších diagnostických metod (například u echokardiografie) je často omezené. V důsledku toho existuje rostoucí zájem o nové biochemické markery, které by mohly být použity pro včasnou diagnostiku srdečního selhání, predikci klinických výsledků u pacientů se srdečním selháním, stejně jako měřítko účinku léčby. Biomarkery by měly být také přístupné za rozumnou cenu.

8.1.1. Vliv natriuretických peptidů na srdeční selhání

Předpokládá se, že natriuretické peptidy mají důležitou ochrannou roli v patofyziologii srdečního selhání. V případě přetížení objemu těla natriuretické peptidy zvyšují diurézu, udržují rovnováhu tělesné soli a působí proti systému renin-angiotensin-aldosteron a účinkům sympatického nervového systému. Díky těmto schopnostem mohou přispívat k delší asymptomatické fázi systolické dysfunkce levé komory. U pacientů s pokročilým srdečním selháním je nedostatek aktivní formy BNP i rezistence na BNP z důvodu regulace směrem dolů a inaktivace receptorů (Krupicka, *et al.*, 2013).

8.1.2. Biomarkery

Role biomarkerů při srdečním selháním je stále více uznávána. Tyto srdeční markery se používají jako neinvazivní způsob k hodnocení stavu pacienta se srdečním selháním spolu s možností monitorování změn (Spoletini, *et al.*, 2019).

BNP a NT-proBNP jsou biomarkery používané v diagnostice a prognostickém hodnocení pacientů se srdečním selháním. Podle nejnovějších pokynů Evropské kardiologické společnosti pro srdeční selhání se doporučuje měření plazmatických hladin BNP a NT-proBNP u všech pacientů s akutní dušností a podezřením na akutní srdeční selhání (Reinmann and Meyer, 2020).

Multimarkerový přístup zahrnuje simultánní hodnocení několika biomarkerů s cílem identifikovat aktivitu více různých patofyziologických cest a tím poskytnout integrované informace o stavu pacienta. Studie RELAX-AHF ukázala, že vícenásobné skóre složené ze sedmi různých biomarkerů poskytlo spolehlivější prognostickou hodnotu ve srovnání s jakoukoliv jinou strategií jednotlivých biomarkerů. Kombinace biomarkerů tedy může zlepšit schopnost předpovídat výsledky srdečního selhání. Bylo zjištěno, že přístup s více biomarkery založený na NT-proBNP, hs-troponinu a ST2 lépe identifikuje vysoce rizikové pacienty oproti jednotlivým nebo skórovacím systémům založených na dvojitých biomarkerech (Spoletini, *et al.*, 2019).

8.1.3. Diagnostické hodnocení akutního srdečního selhání

Normálně jsou cirkulující hladiny BNP a NT-proBNP poměrně nízké, ale u srdečního selhání jejich koncentrace dramaticky stoupají. Studie prokázala, že hodnoty BNP >100 pg/ml diagnostikovaly akutní srdeční selhání s vysokou přesností a silně předpovídaly srdeční selhání, čímž překonaly klinická kritéria. Podobné nálezy byly pozorovány u NT-proBNP, kde jsou hodnoty ≥ 300 pg/ml a u MR-proANP jsou hodnoty >120pmol/l. Ve studii byly zvýšené koncentrace NT-proBNP nejsilnějším prediktorem srdečního selhání ve srovnání s tradičním hodnocením (Spoletini, *et al.*, 2019).

8.2. Akutní koronární syndrom

Akutní koronární syndrom je termín používaný k popisu řady lékařských případů, které souvisejí se sníženým průtokem krve do srdce. Při destabilizaci aterosklerotických plaků hraje hlavní roli zánět. Akutní infarkt myokardu je způsoben hlavně prasknutím aterosklerotického plaku. Akutní koronární syndrom lze kvalifikovat na infarkt myokardu s elevací ST, infarkt myokardu bez elevace ST a nestabilní angina pectoris.

Účelem identifikace a včasné diagnostiky akutního koronárního syndromu je omezit poškození myokardu, kterého lze dosáhnout pouze rychlým zahájením léčby. Toto je klíčový bod v léčbě pacientů s akutním koronárním syndromem, kterého lze dosáhnout rychlými, citlivými a specifickými biomarkery.

V praxi je akutní koronární syndrom diagnostikován v závislosti na klinické anamnéze bolesti na hrudi, která je potvrzená laboratorními testy zvýšených hladin troponinu T nebo troponinu I (TnT nebo TnI) v krvi. Pro-BNP se uvolňuje v reakci na změny tlaku v srdci, zejména u pacientů s akutním koronárním syndromem, jejichž použití je přínosné jako

indikátor pro hodnocení zdravotních problémů souvisejících právě se srdcem. Znamená to, že když se objeví příznak akutního koronárního syndromu, tak je nutné změřit hladinu tohoto hormonu. Hladina BNP směřuje vzhůru k vrcholu mezi čtrnáctou a čtyřicátou hodinou po ischemické příhodě. Zvýšené koncentrace BNP a NT-proBNP při akutním koronárním syndromu jsou spojeny se špatnou prognózou, včetně zvýšené úmrtnosti, rozvoje městnavého srdečního selhání a opakujících se ischemických příhod. NT-proBNP může být dobrým parametrem pro predikci závažnosti postižení koronárních cév spolu s dalšími diagnostickými nástroji (Radwan et al., 2014).

8.3. Plicní embolie

Plicní tromboembolická nemoc je klinická a patofyziologická porucha plicního oběhu a nastává, když endogenní nebo exogenní vmetek (cizí těleso) blokuje kmen nebo větev plicní tepny. Je spojena s vysokou klinickou úmrtností. (Liang *et al.*, 2021).

Akutní plicní embolie je potenciálně život ohrožující kardiovaskulární onemocnění, které je často pozorováno na pohotovosti. Vzhledem k četnosti a vysoké úmrtnosti hraje klíčovou roli rychlá identifikace a přesná stratifikace rizika pacientů s plicní embolií. Většina pacientů s plicní embolií je normotenzní se stabilní hemodynamikou a dělí se na skupinu se středním rizikem a na skupinu s malým rizikem, zbývající pacienti patří do vysoce rizikové skupiny s nestabilní hemodynamikou, kterou lze snadno odlišit pozorováním sníženého krevního tlaku. K úmrtím souvisejícím právě s plicní embolií v důsledku dysfunkce pravé komory dochází během prvních několika hodin, dokonce i u pacientů se stabilní hemodynamikou.

Bylo prokázáno, že zánět hraje klíčovou roli v závažnosti akutní plicní embolie a změny v počtu neutrofilních granulocytů, leukocytů a krevních destiček odrážejí zánětlivou reakci na akutní plicní embolii. Jakmile trombus cestuje do plicní tepny spouští akutní plicní embolii uvolňováním prokoagulačních faktorů, aktivací přirozených antikoagulačních drah a fibrinolytickou aktivitu, dále trombus spouští uvolňování zánětlivých cytokinů. Tyto děje podporují zánět v periferní krvi, což se odráží změnou počtu neutrofilních granulocytů, leukocytů a krevních destiček (Jia *et al.*, 2018).

8.3.1. Biomarkery

Pro diagnostiku a stratifikaci rizika plicní embolie bylo navrženo několik biomarkerů. BNP je markerem komorové dysfunkce. Tento hormon se uvolňuje v reakci na úsek myocytů,

syntetizuje se jako neaktivní prohormon (proBNP), který se štěpí na aktivní hormon BNP a neaktivní N-terminální fragment (NT-proBNP). Několik prospektivních studií a metaanalýz prokázalo souvislost mezi vysokými koncentracemi BNP nebo NT-proBNP a zhoršením klinického stavu u pacientů s akutní plicní embolií. Bylo navrženo několik různých hraničních koncentrací pro přijetí NT-proBNP (<500, <600 nebo <1000 ng/l) jako predikce lepších klinických průběhů. Podobně byly navrženy dvě mezní hodnoty BNP (<50 nebo <90 ng/l) k identifikaci pacientů s nízkým rizikem, vysoce riziková pacienta mají hodnoty >500 ng/l. Trvalé zvýšení NT-proBNP na hodnoty >7500 ng/l i po 24 hodinách nebo pokles o <50 % naznačuje dysfunkci pravé komory a špatnou prognózu. Pozitivní prediktivní hodnota zvýšených koncentrací natriuretického peptidu je nízká, neboť k takovému zvýšení dochází v mnoha dalších podmínkách, včetně dysfunkce levé komory, vyššího věku, poškození ledvin a chronického plicního onemocnění. Naopak pacienti s normální koncentrací BNP a NT-proBNP mají nízké riziko úmrtí i hemodynamického zhoršení, které má za následek nežádoucí účinky (Giannitsis and Katus, 2017).

8.4. Akutní onemocnění ledvin

Akutní poškození ledvin je jednou z nejčastějších forem poškození orgánů na jednotce intenzivní péče a toto onemocnění je spojeno s vysokou úmrtností.

Atriální natriuretický peptid hraje důležitou roli v regulaci objemu tekutin, krevního tlaku a je již více než 30 let studován jako slibný lék na akutní onemocnění ledvin. ANP ovlivňuje aferentní arterioly glomerulu silněji než eferentní arterioly, což vede ke zvýšené rychlosti glomerulární filtrace. Kromě toho má ANP protizánětlivé účinky tím, že inhibuje aktivaci nukleárního faktoru- κ B a produkci cytokinů. Studie rovněž uvádějí, že ANP může zabránit lipopolysacharidem indukované oligurii aktivací guanylycyklázy A v proximálních tubulech a endotelových buňkách. Díky těmto vlastnostem je ANP atraktivní jako potenciální lék k prevenci nebo léčbě akutního onemocnění ledvin (Saito *et al.*, 2020).

8.5. Chronické onemocnění ledvin

Odhadovaná prevalence lidí s chronickým onemocněním ledvin se v mnoha zemích pohybuje mezi 11 % a 26 %. U pacientů s chronickým onemocněním ledvin se v těle běžně hromadí kreatinin a toxiny, které vyvolávají kardiotoxicitu a také vedou k abnormální aktivaci systému renin-angiotensin-aldosteron, hyperkoagulaci krve, zadržování sodíku a vody, zvýšení krevního tlaku, anémii a podvýživě. Tyto změny způsobují, že pacienti s chronickým

onemocnění ledvin jsou náchylní k poškození myokardu a poté je ovlivněna srdeční systolická a diastolická funkce, což nakonec vede k srdečnímu selhání (Han *et al.*, 2020).

Přítomnost chronického onemocnění ledvin je definované jako odhadovaná rychlost glomerulární filtrace (eGFR) $<60\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2$ a je spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění včetně srdečního selhání, toto riziko se zvyšuje s klesající rychlostí glomerulární filtrace. Riziko výskytu srdečního selhání je trojnásobně vyšší u dospělých osob s eGFR $<60\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2$ oproti těm, kteří mají eGFR $>90\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2$ (Syed, *et al.*, 2018).

8.5.1. Biomarkery

Když se u pacientů s chronickým onemocněním ledvin objeví srdeční selhání, zvýšená retence sodíku a tekutin s vaskulárním napětím povede to ke zvýšenému přepětí srdce. Zvýšený tlak komorové stěny povede k uvolnění NP. Mezi běžně používané markery myokardu patří BNP, NT-proBNP a MR-proANP. NT-proBNP a MR-proANP lze přímo filtrovat a vylučovat pouze ledvinami, a proto je clearance NP u pacientů s chronickým onemocněním ledvin omezena. Koncentrace BNP, NT-proBNP, MR-proANP v krvi se zvyšuje se snížením rychlosti glomerulární filtrace (GFR), zejména u NT-proBNP a MR-proANP. Zvýšení koncentrace NP u pacientů s chronickým onemocněním ledvin však není způsobeno jen překázkou v jejich vylučování ledvinami, ale také zvýšenou sekrecí NP v důsledku zvýšeného srdečního preloadu a afterloadu při vývoji srdečního selhání. Zvýšení plazmatických koncentrací BNP, NT-proBNP a MR-proANP u pacientů s chronickým onemocněním ledvin proto může odrážet přítomnost a závažnost srdečního selhání a může poskytnout prognostické informace, ale mezní hodnotu je třeba upravit podle funkce ledvin. Koordinovaná aplikace BNP a ANP může současně vyhodnotit srdeční preload a afterload, takže hodnocení je komplexnější. U pacientů léčených dialýzou je třeba při hodnocení vzít v úvahu dobu hemodialýzy a typ dialyzační membrány. Bylo potvrzeno, že NP bude odstraněn po hemodialýze (Han *et al.*, 2020).

8.6. Jaterní cirhóza

Nejvýznamnějším hemodynamickým rysem cirhózy je hyperdynamický syndrom, což je stav oběhu charakterizován nízkým arteriálním tlakem, vysokým srdečním výdejem a sníženou periferní vaskulární rezistencí. V důsledku tohoto hemodynamického profilu lze u pacientů s cirhózou nalézt široké spektrum srdečních abnormalit, jako je porucha kontraktility myokardu, porucha diastolické relaxace a elektrofyziologické abnormality při absenci

jakéhokoli jiného zjevného srdečního onemocnění. Hemodynamické i srdeční profily označují patofyziologický scénář známý jako „cirhotická kardiomyopatie“, což je klinický stav, který hraje roli v průběhu cirhózy.

Natriuretické peptidy, které jsou uvolňovány kardiomyocyty v reakci na srdeční objem nebo tlakové přetížení, hrají důležitou roli v diagnostice asymptotické dysfunkce levé komory a mají také roli při srdečním selhání. Nedávné studie dále ukázaly, že zvýšené hladiny NT- proBNP jsou přítomny u pacientů s chronickým onemocněním jater, zejména ascitickou cirhózou, a to i při absenci klinické dysfunkce levé komory (Licata *et al.*, 2013).

8.7. Obstrukční spánková apnoe

Obstrukční spánková apnoe je běžná porucha dýchání způsobená opakovaným kolapsem horních cest dýchacích během spánku, což vede k občasné obstrukci dýchacích cest a absenci proudění vzduchu navzdory dechovým snahám bránice proti uzavřenému hltanu (Maeder *et al.*, 2016).

Obezita je hlavním rizikovým faktorem pro obstrukční spánkovou apnoe, zhoršenou plicní funkci a srdeční selhání. Tukové zásoby zužují horní dýchací cesty, zatímco břišní tuková hmota snižuje tracheální napětí, čímž roste pravděpodobnost kolapsu horních cest dýchacích. Obezita také omezuje pohyb bránice a způsobuje uzávěr alveolárních a dýchacích cest v plicích, což narušuje fyziologii dýchání a krevních plynů. Zvýšené riziko srdečního selhání může být zprostředkováno arteriální hypertenzí spojenou s obezitou, expanzí objemu, dyslipidemií a inzulinovou rezistencí. Přítomnost obstrukční spánkové apnoe a zhoršená funkce plic mohou dále zhoršit kardiovaskulární riziko (Gabrielsen *et al.* 2016).

U pacientů mající obstrukční spánkovou apnoe jsou nejčastěji studovanými srdečními biomarkery BNP a NT-proBNP. Výzkum za poslední desetiletí ukázal, že plazmatické koncentrace BNP a NT-proBNP souvisejí s řadou nekardiálních faktorů, včetně věku, pohlaví, funkce ledvin a indexu tělesné hmotnosti s vyššími plazmatickými koncentracemi BNP u starších pacientů, žen, pacientů s horší funkcí ledvin a pacientů s nižším indexem tělesné hmotnosti. Zůstává však nejasné, zda je to způsobeno přímým dopadem těchto stavů na BNP a NT-proBNP, nebo zda je souvislost se srdečním stresem souvisejícím s těmito stavy. Natriuretické peptidy byly tedy zkoumány u pacientů trpících obstrukční spánkovou apnoe s myšlenkou, že BNP a NT-proBNP mohou odrážet stres myokardu v kontextu s obstrukční spánkovou apnoe. Většina studií jednoduše srovnávala plazmatické koncentrace BNP nebo NT- proBNP u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe a kontrolami anebo zkoumala

korelaci mezi přítomností a závažností obstrukční spánkové apnoe a BNP nebo NT-proBNP. Většina studií však nenalezla významné rozdíly v koncentracích NP u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe bez zjevného srdečního onemocnění a kontrolami a také neexistovala žádná souvislost mezi závažností obstrukční spánkové apnoe a koncentrací NP v plazmě. Koncentrace NP byly u těchto pacientů s obstrukční spánkovou apnoe obecně nízké. V jedné studii však byla nalezena souvislost mezi vyšším BNP a závažnou obstrukční spánkové apnoe. Tato studie od Ljunggren et al. se od jiných studií liší z mnoha důvodů. V této studii byla studována populace žen s normální hmotností a BNP byl měřen přímo po spánku. Zatímco u typicky obézních pacientů majících obstrukční spánkovou apnoe může být účinek srdečního stresu oslaben účinkem obezity a dochází ke snížení hodnoty BNP. Za druhé to byla jedna z největších studií hodnotící souvislost mezi NT-proBNP a závažností obstrukční spánkové apnoe. Autoři zjistili souvislost mezi vyšším BNP (měřeno ráno) a vyšším indexem krátkodobé zástavy dýchání – mělkého povrchové dýchání (apnea-hypopnea index), kde se odhaduje počet zástav dechu a počet mělkého povrchového dýchání, právě pro výpočet tohoto indexu, což zůstalo statisticky významné po úpravě pro věk, index tělesné hmotnosti, systolický krevní tlak a kreatinin (Maeder *et al.*, 2016).

8.8. Kritická ischemie končetin

Expresa CNP a NPR-C je u pacientů s kritickou ischemií končetin snížena. Expresa mRNA VEF-A a VEGF receptoru 2 (VEGFR2) byla významně snížena, zatímco HIF-1 α , X-protein asociovaný s regulátorem apoptózy Bcl-2 (Bax), vaskulární buněčný adhezní protein-1 (VCAM-1), interleukin-6 (IL-6) a C-C chemokinový receptor 2 mRNA byly všechny zvýšeny v biopsiích dvojhlavého svalu lýtkového od pacientů s kritickou ischemií končetin ve srovnání se zdravými kontrolami, což odpovídá kompromitovanému angiogennímu prostředí, které se přetváří. Důkaz, že signalizace CNP/NPR-C může být rozhodující pro proangiogenní, proarteriogenní obrannou odpověď hostitele na ischemii, byl poskytnut paralelním snížením hladiny CNP (mRNA) a NPR-C (mRNA a protein) ve tkáni s kritickou ischemií končetin (expresa mRNA NPR-B byla také snížena). Kromě toho byla ve vzorcích dvojhlavého svalu lýtkového výrazně snížena exprese proteinu NPR-C, která se lokalizovala společně s buněčnou membránou a vaskulárním endotelem kolem svalových vláček a také cév pacientů s kritickou ischemií končetin ve srovnání se zdravými kontrolami.

Obnova průtoku krve po ischemii končetin je narušena ztrátou CNP odvozeného z endotelu, ale lze ji zvrátit zaměřením farmakologicky na NPR-C. Studie potvrzují

proangiogenní a proremodelční funkce CNP odvozeného z endotelu *in vivo* a také ověřují, že aktivace NPR-C je základem tohoto procesu. Navíc je pravděpodobné, že strategie zaměřené na farmakologicky aktivující NPR-C budou u pacientů s kritickou ischemií končetin přínosem (Bubb *et al.*, 2019).

8.9. Achondroplázie

Achondroplázie je genetická porucha, která inhibuje endochondrální osifikaci, což vede k nepřiměřeně nízkému vzrůstu a klinicky významným zdravotním komplikacím. Achondroplázie je nejčastější formou nepřiměřeně malého vzrůstu s prevalencí 1 z 25000 narozených dětí.

Charakteristickými klinickými rysy jsou nízký vzrůst s rhizomelickým zkrácením končetin (zkrácení proximálních částí končetin, kde jsou postiženy hlavně klouby horních a dolních končetin) a makrocefalií. Mezi zdravotní komplikace patří hydrocefalus, hypotonie, bolesti zad a nohou, vodivá ztráta sluchu a zpoždění řeči. Relativní hypertrofie mandlí může vést k obstrukční spánkové apnoe a respirační nedostatečnosti. Stenóza velkého týlního otvoru a cervikomedulární komprese mohou vést k centrální apnoe, což vede ke zvýšenému riziku náhlé smrti v kojeneckém věku. (Savarirayan *et al.*, 2019).

Achondroplázie je způsobena mutací genu pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3 (FGFR-3). Jedna mutace (G380R) představuje více než 98 % všech hlášených případů achondroplázie a je mutací zesílení funkce. V růstové ploténce FGFR-3 aktivuje řadu signálních kaskád, z nichž nejdůležitější se jeví signální převodníky a aktivátory transkripční (STAT1) dráhy, která inhibuje množení chondrocytů a MAPK kináza (MEK) / ERK MAPK dráha, která inhibuje chondrocytární diferenciaci a zvyšuje degradaci matrixu (Olney, *et al.*, 2015).

Bylo prokázáno, že nadměrná exprese CNP zvyšuje endochondrální osifikaci v chondrocytech u transgenních myší. Přírodní natriuretický peptid typu C má krátký poločas 2–3 minuty, protože je rychle degradován neutrální endopeptidázou. Z tohoto důvodu je jeho efektivní použití při léčbě achondroplázie téměř nemožné a byly provedeny pokusy o použití jiných forem této látky. Jak ukazují klinické studie, vosoritid je rezistentní na přirozenou neuroendopeptidázu a je slibnou léčbou achondroplázie. Vosoritid působí na NPR-B receptor a je schopen volně difundovat do růstové ploténky (Wrobel *et al.*, 2021).

8.10. Akromesomelická dysplázie, Maroteauxův typ

Akromesomelická dysplázie typu Maroteaux (AMDM) je vzácná autozomálně recesivní skeletální dysplázie, která patří do skupiny akromesomelických dysplázií. AMDM je charakterizována silným nanismem s nepřiměřeným zkrácením končetin a páteře, postihující převážně střední (předloktí) a distální (ruce a nohy) segmenty končetin. Porod a rentgenové snímky jsou u novorozenců trpící AMDM normální, ale růst kostry je po narození zpomalen v důsledku abnormální endochondrální osifikace a má za následek extrémně nízký vzrůst. U pacientů s AMDM nejsou ovlivněny žádné orgánové systémy kromě kosterního systému (Wang *et al.*, 2015). Tato porucha je způsobena bialelickou mutací genu NPR2 (Amano *et al.*, 2014).

8.10.1. Gen NPR-B

Gen NPR-B je lokalizován na chromozomu 9p21-p12 a kóduje natriuretický peptidový receptor B, což je receptor pro natriuretický peptid typu C. V chondrocytech růstové ploténky vazba CNP na NPR-B stimuluje diferenciaci chondrocytů a hypertrofii a dále syntézu matrixu. Tato interakce hraje důležitou roli v endochondrální osifikaci na úrovni růstové ploténky, což je důležitá součást růstu podélných kostí (Jacob *et al.*, 2018). CNP se váže na dva receptory na povrchu buněk (NPR-B a NPR-C), které jsou exprimovány v osteoblastech i v chondrocytech. Účinky CNP jsou zprostředkovány prostřednictvím NPR-B, který má aktivitu guanylycyklázy (GC) a vede k syntéze guanosin-3,5- monofosfátu (cGMP). Delece NPR-B napodobuje kostní vady spojené se ztrátou CNP a vadný NPR-B je zodpovědný za nanismus u pacientů s AMDM (Peake *et al.*, 2014).

8.11. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je komplexní neurodegenerativní porucha, jejíž postup i nástup se nepochybně týká neurozánětlivého procesu charakterizovaného aktivací mikroglíí v mozku. Kromě toho existují zprávy prokazující nárůst prozánětlivých a protizánětlivých faktorů v mozku, míšní tekutině a periferní krvi u pacientů s Parkinsonovou chorobou. U pacientů s Parkinsonovou chorobou byly nalezeny výrazně zvýšené protizánětlivé cytokiny: TNF- α , interleukiny 1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-6 ve ventrikulárním a bederním mozkomíšním moku. Cytokiny produkované v mozku mohou difundovat přes hematoencefalickou bariéru do periferní tkáně nebo mohou být periferně produkovány obecným zánětem (Koziorowski *et al.*, 2012).

Neúmyslný úbytek hmotnosti je u Parkinsonovy choroby velmi častý, někdy předchází diagnóze a často se projevuje v průběhu nemoci. Důležité je, že úbytek hmotnosti je spojen s negativními výsledky, včetně horší kvality života, osteoporózy a zlomenin, dekubitů, demence a smrti. Přispívající faktory zahrnují gastrointestinální dysfunkci (např. nevolnost, anorexie a dysfagie), hyposmii (oslabené či snížené vnímání čichových podnětů), deprese, psychózy, kognitivní poruchy, ztráta funkčních schopností (např. příprava jídla nebo schopnost samostatně se najíst), zvýšený výdej energie v důsledku svalové ztuhlosti nebo nedobrovolné pohyby a bolest (Yong *et al.*, 2020).

CNP je exprimován v mnoha tkáních, kde jeho převážně parakrinní účinky zprostředkované receptorem NPR-B regulují růst a zrání buněk. Signální dráhy CNP byly identifikovány v celém mozku a míše a jsou obohaceny o bazální ganglia, limbický systém a hypotalamus. Aktivita dráhy CNP je zvláště prominentní v regulaci perinatálních stádií maturace mozku a podporuje růst neuronů a synaptickou plasticitu v tkáních mořského koníka (řec. *hippocampus*). Nedávno se ukázalo, že natriuretické peptidy účinně inhibují presynaptické uvolňování glutamátu v myších epithalamických a subkortikálních jádrech. Souhrnně tyto důkazy zvyšují možnost, že ztráta aktivity CNP může také ovlivnit průběh neurodegenerativních poruch u lidí (Espiner *et al.*, 2014).

Amino-terminální proCNP (NTproCNP) a CNP je snížen v mozkomíšním moku odebraném od neléčených pacientů s Parkinsonovou chorobou, časem klesá a vykazuje shodné zvýšení s klinickou odpovědí na léčbu inhibitory monoaminoxidázy (Woodward *et al.*, 2017).

8.12. Metabolický syndrom

Termín metabolický syndrom je v posledních letech často slyšet s rychle se rozvíjejícími změnami globálních a ekonomických scénářů a technologicky vyspělých životních stylů. Od posledních tří desetiletí je populace vyspělých a rozvojových zemí náchylnější k metabolickému syndromu kvůli jejímu sedavému životnímu stylu.

Metabolický syndrom je shluk chorobných stavů, které zvyšují riziko vzniku diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. Dříve Dr. Reaven na základě svých klinických pozorování vytvořil termín „syndrom X“, aby definoval a označil tyto komplexní shluky patologických chorob.

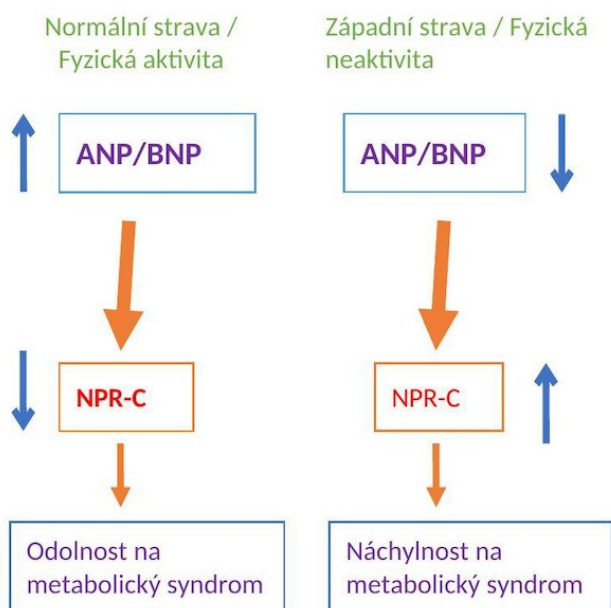
Hlavními charakteristickými znaky a klinickými příznaky metabolického syndromu jsou snížený HDL-cholesterol, zvýšené triacylyceridy, vysoký krevní tlak a zvýšená hladina glukózy v plazmě nalačno, což vše přímo souvisí se zvýšenou adipogenezí a přírůstkem

hmotnosti, konkrétně s intraabdominální nebo ektopickou akumulací tuku a velkým obvodem v pasu.

Hlavní příčiny metabolického syndromu jsou vysoký kalorický příjem potravy nebo nadměrná výživa a nedostatek pohybu nebo fyzické nečinnosti spolu s některými genetickými, epigenetickými a environmentálními faktory. Bylo také prokázáno, že metabolický syndrom je spojen s menším množstvím srdečních hormonů, jako jsou natriuretické peptidy (ANP, BNP a CNP), a se změnou exprese v jejich receptorech.

8.12.1. Obezita

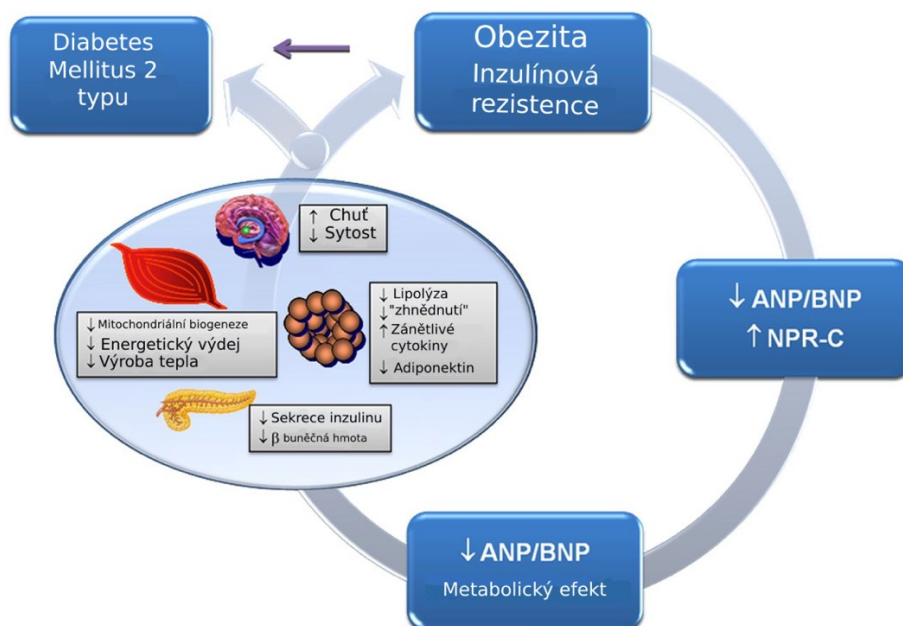
Existuje mnoho zpráv, které ukazují nízkou hladinu cirkulujícího natriuretického peptidu u obézních jedinců viz obr 4, což může nepřímo přispět k jejich náchylnosti k hypertenzi a kardiovaskulárním poruchám souvisejícím poruchám související s hypertenzí. Bylo prokázáno, že fyzické cvičení má obrovský dopad a rychle zvyšuje uvolňování ANP u obézních pacientů. Normální strava (nízkokalorická) a pravidelná fyzická aktivita mají za následek zvýšení hladin ANP a BNP v důsledku snížené exprese NPR-C. Zatímco zvýšená exprese NPR-C u obézních lidí se sníženou fyzickou aktivitou vede ke sníženým hladinám ANP a BNP. V adipocytech obézních jedinců dochází ke zvýšené expresi NPR-C (clearance všech tří natriuretických peptidů), což vede k obezitě, cukrovce, hypertenzi a nealkoholickému ztučnění jater, což je znázorněno na obr. 5. Je také známo, že zvýšená exprese NPR-C vede k potlačení lipolýzy zprostředkované ANP.



Obrázek 5 Úloha natriuretických peptidů ve spojení s dietou a fyzickou aktivitou (upraveno dle Santhekadur et al., 2017)

8.12.2. Diabetes mellitus 2. typu

Role těchto srdečních peptidů při cukrovce má příznivé účinky a jakýkoliv pokles těchto peptidů má přímou souvislost s inzulínovou rezistencí a sníženou tolerancí glukózy. Uvádí se, že nízké plazmatické hladiny atriálního natriuretického peptidu předpovídají rozvoj diabetu viz obr. 6. Existuje také studie, která ukazuje, že u pacientů s chronickým selháním ledvin a cukrovkou jsou hladiny BNP v plazmě zvýšené, ale mechanismus není zcela znám. Je známo, že ANP zvyšuje cirkulující inzulín a inhibuje sekreci glukagonu v izolovaných ostrůvcích pankreatu. Rovněž bylo prokázáno, že pacienti s onemocněním mitrální chlopně mají zvýšenou intoleranci glukózy a inzulínovou rezistenci, které jsou spojeny s vyššími hladinami ANP a volných mastných kyselin, zatímco operace mitrální chlopně (nahrazení nebo oprava) tyto metabolické změny zlepšuje (Santhekadur *et al.* 2017).



Obrázek 6 Potenciální souvislost mezi NP, obezitou, inzulínovou rezistencí a cukrovkou. Obezita a inzulínová rezistence jsou spojeny jak se sníženým uvolňováním srdce ANP, tak BNP a s nadměrnou expresí clearance NPR-C, což vede ke snížení příznivých účinků zprostředkovaných NP na cílové orgány metabolismu (tuková tkáň, kosterní sval, beta buňky pankreatu, centrální nervový systém). To má za následek další přibývání na váze a zhoršení inzulínové rezistence a také podporuje rozvoj diabetu (upraveno dle Gruden *et al.*, 2014)

8.12.2.1. Periferní arteriální onemocnění

Onemocnění periferních tepen se projevuje jako přerušovaná klaudikace (=bolesti svalů, zvláště dolních končetin), ale často přechází do kritické ischemie končetin charakterizované bolestí, ulcerací a gangrénou, mnoho pacientů čelí amputaci a předčasné smrti. Patologii vyvolávají aterosklerotické vaskulární okluze a je podpořena nedostatečnou angiogenní a arteriogenní odpovědí, což jsou kompenzační a doplňkové mechanismy použité k obnovení přívodu krve do ischemické tkáně (Bubb *et al.*, 2019).

Periferní arteriální onemocnění je subklinickým měřítkem aterosklerotického vaskulárního onemocnění a silným nezávislým rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění a úmrtnost. T2DM je spojen se zrychlenou aterosklerózou a zvýšeným rizikem periferního arteriálního onemocnění. Výskyt periferního arteriálního onemocnění u pacientů s T2DM je vysoký. Pacienti s T2DM mají čtyřnásobně zvýšené riziko periferního arteriálního onemocnění a prevalence je vyšší u diabetické populace než u nediabetické populace.

Je zajímavé, že stále více důkazů ukazuje, že BNP je užitečným markerem nejen pro srdeční funkce, ale také pro další vaskulopatie. Zvýšené koncentrace BNP byly spojeny s aterosklerózou a ukázalo se, že jejich hladiny jsou zvýšené u obecné populace s periferním arteriálním onemocněním. Vývoj periferního arteriálního onemocnění je spojen s několika rizikovými faktory a více biomarkerů představuje různé etiologické cesty aterosklerózy. Nedávné poznatky naznačují úzký vztah mezi metabolismem glukózy a hladinami BNP. Bylo zjištěno, že hladiny BNP jsou vyšší u pacientů s T2DM a nepřímo spojeny s rizikem T2DM, ačkoliv mechanismus není také zcela znám. Tato pozorování naznačují potenciální roli BNP ve vývoji T2DM s periferním arteriálním onemocněním (Jin *et al.*, 2014).

8.12.2.2. Diabetická periferní neuropatie

Diabetická periferní neuropatie je nejčastější formou neuropatie u diabetických pacientů se složitými multifaktoriálními patogenetickými mechanismy, které vedou k dysfunkci periferních nervů doprovázené typickými charakteristikami bolesti a necitlivosti. Diabetická periferní neuropatie byla považována za hlavní rizikový faktor pro infekci nohou, vředy a následné amputace, které vedou k velké ekonomické zátěži a stávají se alarmujícím globálním zdravotním problémem. V současné době, kromě intenzivní kontroly glukózy, neexistuje schválená terapie k prevenci nebo léčbě diabetické periferní neuropatie. Je proto velmi klinicky důležité, že identifikace nových rizikových faktorů pro diabetickou periferní neuropatii může pomoci při vývoji vhodných strategií pro prevenci a léčbu diabetické periferní neuropatie u pacientů s T2DM.

BNP odráží systolickou a diastolickou dysfunkci levé komory, zatímco subklinická dysfunkce levé komory souvisí s dysfunkcí adrenergní srdeční inervace a podílí se na vývoji kardiovaskulární autonomní neuropatie, jedné z hlavních typů diabetické neuropatie, což nepřímo naznačuje, že BNP může být spojen s patogenezí diabetické periferní neuropatie. Existuje stále více důkazů o tom, že BNP může zprostředkovat periferní vazodilataci a vyvolat antifibrózu, protizánětlivé a antioxidační účinky a že změněné hladiny cirkulujícího BNP byly hlášeny a přispívají k další diabetické mikroangiopatii, jako je diabetická nefropatie, diabetická

retinopatie a kardiovaskulární autonomní neuropatie. Tyto výsledky proto naznačují, že může existovat potenciální asociace mezi cirkulujícím BNP a vývojem diabetické periferní neuropatie. Studie provedené Juradem a spol. a Hamanem a spol. uvádějí významný pozitivní vztah mezi hladinami NT-proBNP, biologicky neaktivního fragmentu BNP a přítomností diabetické periferní neuropatie, nezávislé na předchozích kardiovaskulárních onemocněních nebo kardiovaskulárních rizikových faktorech, jako je BMI a glykovaný hemoglobin A1C u pacientů s T2DM. V autorům dostupné literatuře zatím žádná studie neprozkoumala, zda hladiny BNP mohou sloužit jako rizikový marker pro diabetickou periferní neuropatii a do jaké míry je spojena s diabetickou periferní neuropatií. (Yan *et al.*, 2020).

8.12.2.3. Kardiovaskulární onemocnění u diabetes mellitus 2. typu

Kardiovaskulární onemocnění zůstává hlavní příčinou morbidit a mortality u lidí s T2DM. Jedním z potenciálních prostředků k dalšímu zlepšování predikce a identifikace osob s vyšším rizikem je využití biomarkerů v kombinaci se zavedenými klinickými rizikovými faktory. Mezi biomarkery, u nichž se ukázalo, že nejvíce predikují kardiovaskulární onemocnění u T2DM jsou NT-proBNP a vysoce citlivý troponin T. Nedávná data také podporují potenciál apoproteinu CIII jako prediktivního biomarkeru v souvislosti s vyššími triglyceridy, ačkoliv není jasné, zda apoprotein CIII předpovídá kardiovaskulární onemocnění nezávisle na triglyceridech u diabetu.

Většina studií zaměřených na biomarkery se obvykle zaměřuje na hodnocení jednotlivých biomarkerů, zatímco společné hodnocení panelů s biomarkery je relativně neobvyklé. V předchozí studii o biomarkerech v pěti kohortách s diabetem, které hodnotily 42 biomarkerů, byla identifikována podmnožina biomarkerů, která společně zlepšila predikci incidentů kardiovaskulárního onemocnění u T2DM. Mezi biomarkery patřily NT-proBNP, vysoce citlivý troponin T, interleukin-6 a interleukin-15. Tyto biomarkery byly pozitivně spojeny právě s kardiovaskulárním onemocněním (Colombo *et al.*, 2018).

8.12.2.4. Diabetes mellitus a onemocnění ledvin

Ukazuje se, že u pacientů s T2DM je snížena bazální koncentrace ANP v plazmě, která nepřímou souvisí s funkcí ledvin. Na rozdíl od normálních (nediabetických) kontrol ANP u T2DM nestoupá v reakci na stravování, což jasně ukazuje význam natriuretických peptidových signálních kaskád v renální patofyziologii. BNP a pro-BNP hrají důležitou roli ve funkci ledvin, která ovlivňuje plazmatické hladiny těchto natriuretických peptidů, což může omezit jejich použitelnost jako hemodynamických biomarkerů při selhání ledvin. Studie

tedy dokazují význam natriuretických peptidů a ukazují, že existuje přímé spojení ve funkci mezi srdečním a ledvinovým systémem (Santhekadur *et al.* 2017).

8.12.3. Onemocnění jater

Existují studie, které ukazují možné zapojení natriuretických peptidů do onemocnění jater jako je nealkoholické ztučnění jater a cirhóza. Nealkoholické ztučnění jater je definováno jako akumulace tuku v jaterním parenchymu (steatóza) se zánětem nebo bez něj. Není divu, že obezita, inzulinová rezistence, T2DM a metabolický syndrom jsou průřezově a prospektivně spojeny s nealkoholickým ztučněním jater. Proto hromadění tuku v játrech, vývoj inzulinové rezistence a T2DM mohou sdílet společné rizikové faktory.

Natriuretické peptidy jsou nepřímo spojeny s procentem tělesného tuku, hladinou glukózy v krvi nalačno a triglyceridy. Dále se ukázalo, že natriuretické peptidy jsou nepřímo spojeny s výskytem cukrovky. Tato pozorování mohou pramenit z metabolických účinků natriuretických peptidů na lipoproteiny, lipolýzy, mitochondriální hustotu a oxidaci tuků. Vzhledem k běžným patofyziologickým mechanismům nealkoholického ztučnění jater s diabetem a jinými metabolickými poruchami je možné, že natriuretické peptidy mají vliv na jaterní tuk. Na podporu tohoto předpokladu Lazo a spol. použitím jaterních enzymů jako náhradních markerů jaterního tuku prokázali spojení mezi gama-glutamyltransferázou a NT-proBNP (Sanchez *et al.*, 2016).

8.12.4. Rakovina

Bylo publikováno mnoho zpráv o protizánětlivé a protirakovinné aktivitě natriuretických peptidů. Uvádí se, že NPR-A je exprimován u různých typů rakoviny, jako je rakovina plic, vaječníků, žaludku a prostaty. Další studie ukazuje účast NPR-A na expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a angiogenezi vyvolané rakovinou plic. Kromě toho je také známo, že NPR-A se podílí na náboru kmenových buněk, angiogenezi a zánětu spolu s regulací samoobnovy a pluripotence embryonálních kmenových buněk. Studie ukázaly, že vhodná exprese BNP a její množství jsou nezbytné pro udržení embryonálních kmenových buněk, čímž se stanoví role BNP jako nového endogenního regulátoru proliferace embryonálních kmenových buněk, a může také aktivovat NPR-A, který pomáhá při obnově a pluripotenci embryonálních kmenových buněk. ANP je také znám pro svou protinádorovou aktivitu inhibicí syntézy DNA. Existuje silná potenciální interakce mezi ANP a specifickými receptory (NPR-A, NPR-B a NPR-C) exprimovanými na různých úrovních v různých nádorových buňkách a které jsou také specifické pro tkáň a orgány. V posledních letech také

existuje velká souvislost mezi metabolickým syndromem a různými typy rakoviny (Santhekadur *et al.*, 2017).

9. Metody stanovení natriuretických peptidů

9.1. Metody pro stanovení ANP

Dřívější studie kombinovaly použití chromatografie a imunotestů a poskytly poznatky o molekulárních formách ANP za různých patofyziologických podmínek. Tyto studie navíc naznačují důležitost monitorování hladin β – ANP a proANP ve tkáních a plazmě u srdečních chorob. Klinický význam jednotlivých forem ANP jako biomarkerů však nebyl plně prozkoumán, zejména kvůli nedostatku kvantifikačních metod, které jsou vysoce specifické pro každou formu ANP a které by umožňovaly vysoce výkonné měření.

Doposud několik vědeckých skupin zkoušelo zavést destičkové imunotesty pro individuální měření forem ANP. ProANP-specifické detekce lze snadno dosáhnout použitím sendvičových imunotestů se dvěma protilátkami proti N-koncovým a C-koncovým oblastem proANP. Naproti tomu se β – ANP-specifická imunodetekce jeví jako náročná, protože β – ANP je homodimer α – ANP, a proto má dvě aminokyselinové sekvence identické s α – ANP. Proběhla studie pro specifickou detekci β – ANP pomocí sendvičového imunotestu s jednou protilátkou proti střední oblasti α – ANP jako zachytávací a detekční protilátka. Tento test ukázal preferenci pro β – ANP, ale nemohl zcela vyloučit detekci α – ANP přítomného ve vzorcích. Další strategií pro specifickou detekci β – ANP je použití protilátky, která je schopna rozlišit rozdíl mezi třemi rozměrovými strukturami α – ANP a β – ANP. α – ANP má peptidový řetězec s kruhovou strukturou tvořenou intramolekulární disulfidickou vazbou, zatímco β – ANP má dva peptidové řetězce vázané dvěma intermolekulárními disulfidickými vazbami, což umožňuje pružnější a prodlouženou strukturu. Použitím necyklické rozšířené formy ANP jako antigenu, který byl produkován redukcí a konjugací na maleimidem aktivovaný nosný protein byla připravena monoklonální protilátka, která vykazuje 100krát vyšší afinitu k β – ANP než k α – ANP. Kromě toho byla vyvinuta protilátka proti α – ANP a této β – ANP specifické protilátce, což je specifická sendvičová imunuanalýza. Důležité je, že přítomnost až 1 nmol/IM α – ANP neovlivnila detekci β – ANP.

Protože cirkulující hladiny β – ANP a proANP jsou u zdravých jedinců mnohem nižší než α – ANP, je u imunotestů pro tyto peptidy vyžadována vysoká senzitivita i specifita. K dosažení tohoto cíle byla PEGylace (tj. kovalentní přidání polyethylenglykolových řetězců) imobilizovaných protilátek aplikována na sendvičový imunotest, aby se minimalizovaly signály

řetězce, a byla prokázána její účinnost. V kroku PEGylace byly provedeny chemiluminiscenční enzymové imunotesty pro celkový ANP, β – ANP a proANP vykazující přibližně 0,2 pmol/l meze kvantifikace. Tyto testy úspěšně stanovily koncentrace β – ANP a proANP v normální plazmě přibližně jako 1 pmol/l, což představuje přibližně 2 % celkového ANP (Nagai-Okatani *et al.*, 2017).

BNP je více používán jako biomarker oproti ANP a v důsledku toho se v současné době nejvíce využívá komerčně dostupný imunotest specifický pro peptid související s ANP, který detekuje MR-proANP. Tento test vyrábí společnost Thermo Fisher Scientific. Využívá polyklonální ovčí protilátky specifické pro fragment 50-72 proANP jako plášťové protilátky spolu s monoklonálními krysími protilátkami specifický pro fragment 73-90 proANP (Semenov and Katrukha, 2016).

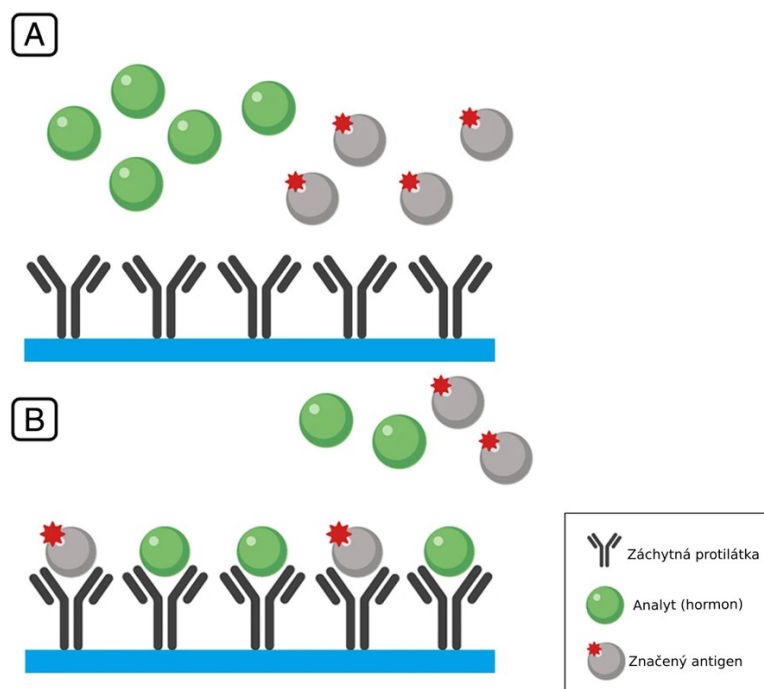
9.2. Metody pro stanovení BNP

Prvními imunotesty, které byly vyvinuty pro stanovení BNP, se nazývají kompetitivní radioimunoanalýzy (RIA) (tzn. značený antigen soupeří o vazebná místa na protilátce s neznačeným antigenem). Tato metoda pomohla posunout výzkum NP vpřed, ale měla několik nevýhod spojených s omezenými komponentami radioaktivního indikátoru, krátkou životností činidla a problémy s likvidací. Tato omezení zabránila širokému použití této metody v diagnostice a byla nahrazena sendvičovými imunotesty, což je nejčastější metoda pro měření BNP. Sendvičový imunotest využívá dvě protilátky, které mohou současně vázat dva odlišné epitopy antigenu. Tento přístup má vysokou specifitu pro analyt a je tedy široce používán pro návrh imunotestu viz obr. 7. Známé sendvičové imunotesty specifické pro BNP obsahují jednu protilátku specifickou pro kruhovou strukturu peptidu a další specifickou buď pro N- koncovou část BNP (jako v testech produkovaných Alere Triage a Beckman) nebo pro C-konec peptidu (testy vytvořené Shionogi, Abbotem a Siemensem). Hlavní výzvou tohoto přístupu je známá citlivost BNP na proteolytické štěpení: peptid je v oběhu přítomen jako směs zkrácených forem na N-konci a C-konci. Jakýkoliv výše uvedený dostupný sendvičový BNP imunotest je tedy schopen detekovat pouze subfrakci cirkulujícího peptidu.

Dalším problémem detekce BNP v plazmě je, že hlavní část imunoreaktivity BNP v oběhu představuje proBNP. Neboť je známo, že tento peptid je O-glykosylovaný a vykazuje heterogenitu přisuzovanou glykosylaci. Interakce BNP imunotestů založených na protilátkách s odlišnou epitopovou specificitou s proBNP se mění, což způsobuje nesrovnalosti a relativně velké variace mezi testy. Možným důvodem, proč jsou různé formy proBNP odlišně

rozpoznávají BNP imunotesty, je to, že rozsah glykosylace a struktura připojených glykosidových zbytků pravděpodobně interferuje s rozpoznáváním proBNP protilátkami používanými v imunotestech, kvůli sterické překážce glykosidovými zbytky.

Společnost HyTest vyvinula nový typ BNP imunoanalýzy s cílem vyhnout se dříve diskutovaným problémům a implementovala ji na platformě ET Healthcare. Test nazvaný Single Epitope Sandwich (SES)-BNPTM využívá dvě monoklonální protilátky (mAb): záchytnou mAb 24C5, která váže epítopy v kruhové struktuře molekuly BNP (epítopy 11–17), a detekční mAb Ab-BNP2, která rozpoznává imunitní komplex mAb 24C5 s BNP (proBNP) a nikoli samotný antigen. V tomto případě proteolytické štěpení, ke kterému dochází v N- koncových a C-koncových oblastech BNP, neovlivňuje interakci protilátek s antigenem; nutnost pouze jediného neporušeného epítopy v molekule BNP spíše, než dvou odlišných epítopy podporuje nezávislost SES – BNPTM na zkrácení BNP v oběhu. Dále bylo prokázáno, že na rozdíl od jiných testů, BNP SES – BNPTM stejně rozpoznává samotný BNP i neglykosylovaný nebo glykosylovaný proBNP (Semenov and Feygina, 2018).



Obrázek 7 Za (A) v nekompetitivním „sendvičovém“ imunotestu jsou záchytné protilátky ukotveny k pevné fázi ve zkumavce. Po té se přidá vzorek obsahující studovaný hormon a signální protilátky. Za (B) Hormon se váže na záchytnou protilátku z jednoho konce a na signální protilátku z druhého konce a vytváří „sendvič“ protilátka-hormon-protilátka (upraveno dle Haddad et al., 2019)

9.2.1. Princip testu BNP Minicare

Minicare BNP je *in vivo* diagnostický POC test („poin of care“), který je určen jako pomůcka při diagnostice srdečního selhání. Největší výhodou toho POC testu je krátká doba zpracování NP vzorku, kromě toho mají tyto POC testy potenciál poskytnout

poskytovatelům primární péče (např. praktický lékař) přístup k pokročilým diagnostickým nástrojům, výkonnost tohoto testu je blízká laboratorní kvalitě a tento je test je snadno použitelný. Využívá jediné testovací analyzátorové zařízení (analyzátor Minicare I-20) a plastovou jednorázovou kazetu obsahující specifické reagenty pro stanovení BNP. Výsledky testu se generují do 10 minut po aplikaci vzorku na kazetu. Testy Minicare I-20 jsou založeny na patentované technologii biosenzoru Magnotech. Stručně řečeno, testy Minicare I-20 jsou založeny na přesném řízeném pohybu magnetických nanočástic funkcionalizovaných protilátkami specifickými pro analyt v malém reakčním objemu uvnitř každé kazety. Stejně magnetické částice sloužící jako štítky, které jsou detekovány pomocí zobrazení frustrovaného celkového vnitřního odrazu (FTIR). Systém byl navržen bez pohyblivých částí, aby vytvořil robustní a stabilní ruční platformu.

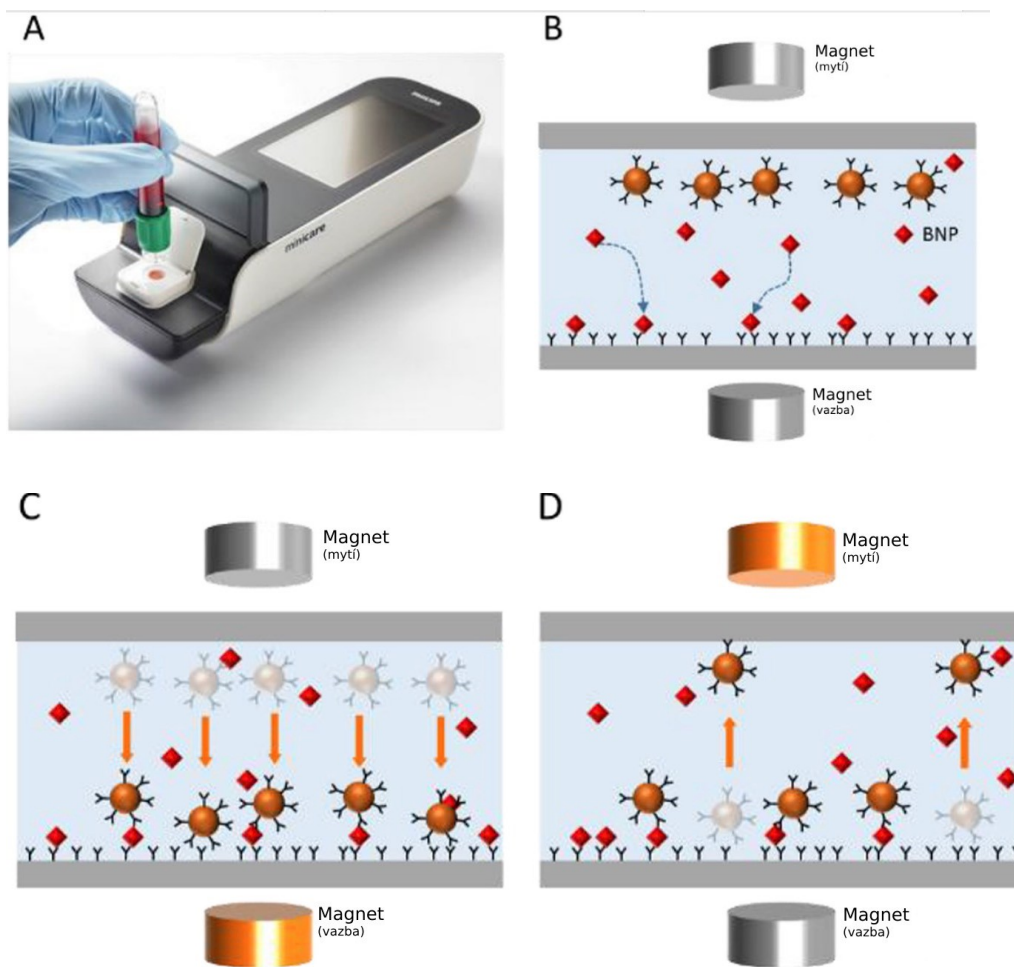
Kromě kvantifikace BNP ze vzorků venózní plné krve / plazmy přijímá Minicare BNP také vzorky kapilární plné krve z vpichu prstu.

9.2.1.1. Výběr protilátek

Test Minicare BNP používá patentované „Single Epitope Sandwich“ („SES“) BNP protilátky, které rozpoznávají jediný epitop v kruhové struktuře BNP (1-32). Proto jsou testy SES – BNP méně ovlivňovány proteolytickou degradací.

9.2.1.2. Formát testu

Po aplikaci vzorku krve na kazetu s filmem se krevní buňky zachytí v semipermeabilní filtrační membráně, zatímco plazma obsahující BNP vstupuje do mikrofluidního systému a je transportována do reakčních komor kapilárními silami. V reakčních komorách se provádí první krok testu SES, když se anti-BNP zachytné protilátky vytištěné na optický zobrazovací povrch váží na molekuly analytu; viz obr. 8b. Současně se sušené magnetické částice v reakční komoře rozptýlí do objemu vzorku. Magnetické částice jsou přitahovány k zobrazovacímu povrchu a váží se na komplex molekul BNP a anti-BNP-protilátky pomocí aplikace magnetických polí za účelem vytvoření gradientu magnetického pole směrem k zobrazovacímu povrchu; viz obr. 8c. Tento druhý krok je účinně druhým krokem testu SES, tj. tvorbou celého komplexu. Po omezeném čase k vytvoření komplexu se nenavázané nebo slabě (nespecificky) navázané částice promyjí z detekčního povrchu pomocí gradientu magnetického pole v opačném směru. To ponechává částice, které specificky vytvořily komplex s BNP na detekčním povrchu, aby byly opticky detekovány pomocí FTIR; viz obr. 8d (Reenen *et al.*, 2019).



Obrázek 8 (A) Platforma testu Minicare I-20 skládající se z analyzátoru Minicare I-20 a jednorázové plastové kazety. (B-D) Schematické znázornění sendvičového testu s jedním epitopem Magnotech. Nejprve (B) se analyt, tj. BNP, váže na funkcionalizovaný optický detekční povrch. Následně (C) jsou magnetické částice přitahovány k povrchu a váží komplexy. Nakonec (D) nevázané částice jsou odstraněny z povrchu, aby se umožnila detekce komplexů částic vázaných na BNP pomocí FTIR (upraveno dle Reenen et al, 2019)

9.3. Metody pro stanovení NT-proBNP

Na rozdíl od testů BNP jsou všechny komerčně dostupné testy NT-proBNP navrženy podobným způsobem. Důvodem je to, že protilátky a kalibrátory vyráběné společností Roche byly prvními, které vstoupily na trh a zůstaly jediným zdrojem pro komerčně dostupné platformy imunotestů schválené Food and Drug Administration (FDA) pro detekci NT-proBNP.

Testy Roche NT-proBNP využívají mAb specifické pro centrální oblast molekuly, epitop 27–31 a epitop 42–46. Jedna z mAb je specifická pro částečně glykosylovanou oblast NT-proBNP, tj. Epitop 42–46, který obsahuje Ser44 a je modifikován glykosidovými zbytky. Vzhledem k tomu může test Roche NT-proBNP detekovat pouze subfrakci endogenního NT-proBNP (směs NT-proBNP a proBNP, protože obě formy jsou přítomny v oběhu), který není v této oblasti glykosylován, a nikoli „celkem“ NT-proBNP (NT-proBNP + proBNP).

Tyto testy tedy nerozpoznávají všechny cirkulující glykosylované formy NT-proBNP nebo proBNP, a nakonec by mohly podcenit množství NT-proBNP nebo proBNP v jednotlivých vzorcích.

Navzdory své specificitě pro určitý zlomek NT-proBNP / proBNP tento test prokazuje dobrý klinický výkon a je uznáván jako dobře zavedená technika pro měření NT-proBNP. Lze navrhnout, že použitím imunotestů založených na protilátkách zaměřených na oblasti NT-proBNP bez O-glykosylace může být pro detekci NT-proBNP výhodné, zejména u určitých skupin pacientů se srdečním selháním.

Vzhledem k možnému negativnímu dopadu glykosylace NT-proBNP / proBNP na klinickou účinnost imunoanalýz NT-proBNP byl navržen a popsán alternativní typ imunoanalýzy, který se jmenuje HyTest. Tento test využívá dvě mAb specifické pro neglykosylované části molekuly NT-proBNP (epitopy 13–20 a 63–71), a proto měří skutečné hladiny NT-proBNP / proBNP v oběhu. Údaje ze srovnávací studie naznačují, že tento nový imunotest má pro diagnostiku srdečního selhání alespoň stejnou klinickou hodnotu jako Roche NT-proBNP test, který je specifický pouze pro subfrakci endogenního NT-proBNP / proBNP (Semenov and Feygina, 2018).

9.4. Metody pro stanovení proBNP

Vzhledem k přítomnosti NT-proBNP a BNP-části v sekvenci proBNP by měly být zjevně navrženy proBNP-specifické testy bez zkřížené reaktivity s BNP s jednou protilátkou specifickou pro N-koncovou část (oblast NT-proBNP) a druhý do C-terminální části (BNP oblast) proBNP. Podle toho popsali Seferian a kol. test proBNP založený na záchytné mAb specifické pro oblast 26–32 molekuly BNP (102–108 proBNP) a detekční protilátku specifickou pro fragment 13–20 proBNP. Ukázalo se, že tento test není ovlivněn glykosylací proBNP molekul, protože epitopy použitých protilátek neobsahují O-glykany.

Giuliani a kol. vyvinuli proBNP-specifický test založený na mAb, který rozpoznává pantovou oblast molekuly proBNP (75–80 aar). Automatizovaná verze této metody byla provedena na systému BioPlex 2200 Analyzer Multiplex System (Bio-Rad). S ohledem na glykosylaci proBNP lze očekávat, že O-glykany na Thr71 mohou ovlivnit interakci pantově specifických protilátek s endogenním proBNP, a v důsledku toho může tento test podcenit množství proBNP ve vzorcích plazmy pacientů se srdečním selháním.

Lam a kol. uvádí test proBNP specifický pro N-terminálně zkrácenou formu prekurzoru BNP, proBNP 3–108, na základě polyklonálních protilátek proti BNP z BioSite a mAb specifických pro intaktní N-konec proBNP 3–108.

Zejména se zatím ukázalo, že specifické testy proBNP jsou ekvivalentní, ale ne lepší než testy BNP nebo NT-proBNP (Semenov and Feygina, 2018).

9.5. Metody pro stanovení CNP

Rozpoznávání a detekce plazmatických hladin CNP má tedy velký význam. V minulých letech bylo kromě imunoanalýz vyvinuto několik metod pro měření CNP v biofluidech. Kvůli extrémně nízké koncentraci CNP a současné interferenci v biologických vzorcích vyžaduje metoda imunotestu často komplexní předúpravu vzorku, což vede k několika nevýhodám, jako je například komplikovaný proces, vysoké náklady a dlouhá doba analýzy. Proto je nezbytné využít jednoduchou, citlivou a efektivní metodu pro sledování koncentrace CNP ve složitých maticích (He et al., 2020).

Přesné a spolehlivé měření produktů CNP v plazmě je důležité z několika důvodů. Nejprve mohou odhalit postavení, které CNP hraje při udržování homeostázy *in vivo*, dále validovaná měření by mohla mít klinické aplikace v diagnostice a monitorování progresu onemocnění a v neposlední řadě, když se měří bioaktivní a neaktivní produkty společně, tak změny v jejich molárních poměrech poskytují index diferenciálního metabolismu. Identita proCNP, CNP53, CNP22 a NTproCNP v plazmě byla potvrzena u několika druhů a charakterizována pomocí technik RIA v kombinaci s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Je však pravděpodobné, že se jejich přítomnost a proporce v plazmě u jednotlivých druhů liší podle zdravotního stavu. Druhá generace ELISA je přímým testem (není nutná extrakce) s použitím 40 μ l plazmy a má detekční limit 0,7 pmol / l. Přítomnost autentických zpracovaných forem jiných než NTproCNP – jako je proCNP 51–82 (NT-CNP53) a dalších domnělých produktů uváděných v lidské plazmě vyžaduje validaci metody, jako je HPLC – RIA (Prickett and Espiner, 2020).

9.5.1. Fluorescenční detekce pomocí sondy

Fluorescence se stala slibnou metodou v analytické oblasti díky své jednoduchosti, rychlosti a dobré citlivosti. Nicméně, když jsou pro analýzu použity fluorescenční materiály, většina metod je založena na změně intenzity fluorescence jediného citlivého signálu, které jsou často ovlivněny koncentrací vzorku, instrumentálními podmínkami nebo prostředím

detekčního roztoku. Naštěstí je generování poměrového měření užitečné k vyřešení výše uvedených problémů pomocí autokalibrace dvou různých pásem. Jelikož využívá poměru dvou fluorescenčních píků, jeden je odpovědní signální jednotkou pro cílový analyt, zatímco druhý je konstantní jako referenční signál. Vzhledem k významně zvýšeným citlivostem detekce byla pro detekci cílových analytů ze složitých vzorků široce používána řada poměr metrických fluorescenčních materiálů.

Molekulárně potišťený polymer (MIP) je efektivní volbou pro zlepšení selektivity fluorescenční detekce díky jeho dobré stabilitě, nízkým nákladům, opětovnému použití a vysoké selektivitě. MIP je tvořen kopolymerací funkčního monomeru a síťovadla v přítomnosti templátové molekuly. Jakmile je šablona odstraněna elucí, vytvoří se dutiny pro rozpoznávání doplňkově k tvaru, velikosti a funkčnosti šablony. Výsledný MIP je schopen se konkrétně znovu svázat s šablonou silným a selektivním způsobem. Díky integrovaným výhodám vysoké selektivity MIP a silné citlivosti fluorescenční detekce byly pro detekci různých stopových analytů stále více vyvíjeny fluorescenční sondy založené na MIP. Byly nejen dostatečně citlivé na detekci a kvantifikaci cílových analytů, ale také jako účinný nástroj k oddělení a obohacení cílových analytů od komplexních vzorků. Obecně byla většina sond navržena na základě strategie vypínání fluorescence, při které byly fluorescenční signály sníženy, když se cílové analyty znovu spojily se sondami. Bylo však všeobecně přijímaným faktem, že zapínací fluorescenční strategie dokázala získat spodní detekční hranici zesílením fluorescenčního signálu. Obecným průzkumem, ať už vypínací nebo zapínací strategií pro výrobu poměrově metrické fluorescenční sondy založené na MIP, byl proces přípravy často spojen se dvěma kroky. Jeden druh fluoroforu použitého jako referenční signál byl signalizován v jádrech a druhý druh fluoroforu použitého jako detekční signál byl zkonstruován na povrchu sondy.

Nová molekulárně potišťená poměr metrická fluorescenční sonda pro selektivní a citlivé stanovení CNP syntetizována jednoduchým postupem sol-gel, přičemž jako zdroj citlivého signálu byl použit nitrobenzoxadiazol (NBD) a jako reference byly použity uhlíkové tečky (CD). Jak poměr metrické fluorescenční materiály, tak potišťená místa byla umístěna na povrchu oxidu křemičitého a fluorescenční snímání CNP bylo založeno na fotoindukovaném přenosu elektronů (PET). Získaná sonda ($\text{SiO}_2@\text{CDs}$ a $\text{NBD}@\text{MIP}$) byla dobře charakterizována a její analytické vlastnosti byly důkladně studovány. Zejména byly $\text{SiO}_2@\text{CD}$ & $\text{NBD}@\text{MIP}$ připraveny bez zabudovaného fluoroforu, což zlepšilo citlivost, a detekční limit byl až na pikogram na mililitr. Nakonec byla nanoprobe použita ke stanovení stopového CNP ve vzorcích lidského séra a ukázala uspokojivé výsledky (He *et al.*, 2020).

10. Preanalytická fáze

10.1. Stabilita BNP

Důvod, proč se různé testy mohou od sebe lišit souvisí s preanalytickými problémy. Proteolytická degradace molekuly BNP se objevuje okamžitě po odběru krve. Stabilita vzorku závisí na metodě s různými stabilitami epitopů cílených specifickým testem. BNP je nestabilní, pokud se shromažďuje ve skleněných zkumavkách kvůli aktivaci kalikreinů a tato degradace může záviset na specifičnosti protilátek použitých v metodě měření. Doporučuje se odebírat vzorky krve BNP pouze v plastových zkumavkách. Pro testy BNP je jediným doporučeným vzorkem plazma EDTA. Pro stanovení Elecsys NT-proBNP je doporučeným vzorkem sérum. Mezi koncentracemi NP v séru a plazmě měřenými různými detekčními platformami existují podstatné rozdíly. Důležitý je také typ použitého antikoagulantia. BNP může být skladován při pokojové teplotě po dobu 24 hodin nebo při 30 ° C po dobu 12 hodin. V EDTA jsou celkové hodnoty BNP v plazmě stabilní při 20 ° C po dobu 1 měsíce, ale formy se mohou časem měnit. Přidáním inhibitoru proteázy aprotininu se prodlouží doba skladování vzorků BNP. Stanovení NT-proBNP je relativně stabilní během skladování v séru, heparinizované plazmě nebo EDTA plazmě, pokud je skladováno při pokojové teplotě nebo 4 ° C po dobu alespoň 72 hodin nebo po dobu až 1 roku při skladování při -80 ° C. Kromě toho je třeba u testů BNP i NT-proBNP provést ověření účinku cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu (Vasile and Jaffe, 2017).

10.2. Stabilita ANP

Výsledky studie od Zolty a spol. ukazují, že ANP je poměrně stabilní během skladování v plazmě při - 80 ° C a eluuje při - 20 ° C. Skladování při - 80 ° C nezměnilo imunoreaktivitu ANP v plazmě a při - 20 ° C v eluci ani u normálních kontrol, ani u pacientů s chronickým srdečním selháním.

Výsledky pozorované metodou RIA ukázaly, že ANP zůstává stabilní přesčas, když je zmrazený na - 80 ° C. Zdá se tedy, že není důvod se domnívat, že ANP je během skladování vysoce nestabilní, a zpochybňovat spolehlivost rozsáhlé literatury o koncentracích lidského ANP, pokud budou poskytnuty podrobnosti o manipulaci se vzorkem a skladování. Rovněž se zdá, že pokud plazma není skladována při - 80 ° C, může být měření ANP v plazmě nespolehlivé. Proto je pro rutinní stanovení ANP v plazmě pomocí imunotestu zapotřebí dobře

standardizovaný protokol, protože odběr a skladování vzorků může výrazně ovlivnit koncentrace ANP v plazmě (Zolty *et al.*, 2008).

10.3. Stabilita CNP a NT-proCNP

Studie od Kuehnlina a spol. odhalila, že CNP a NT-proCNP jsou stabilní v séru a ve vzorcích plné krve po dobu nejméně dvou hodin při pokojové teplotě. V důsledku toho stabilita peptidu CNP není s největší pravděpodobností ovlivněna žádným zpožděním ve zpracování vzorku po dobu nejméně dvou hodin. O ProCNP již bylo hlášeno, že je stabilní po dobu nejméně 2,5 hodiny. Experimenty tedy potvrdily stabilitu NT-proCNP i při pokojové teplotě. Koncentrace NT-proCNP ve všech typech vzorků zůstala konstantní během časového průběhu po dobu až 2 hodin, což naznačuje dlouhodobou stabilitu tohoto proteinu.

Na rozdíl od NT-proCNP byla koncentrace CNP ve vzorcích plazmy významně vyšší ve srovnání se vzorky séra a plné krve. Dále byly porovnány vzorky plné krve a plazmy. Inhibitorem srážení byl citrát sodný ve skupině plazmy a EDTA ve skupině plné krve. Vzorky plné krve odhalily srovnatelné výsledky se vzorky séra ($p = 0,98$). Je proto velmi pravděpodobné, že citrát sodný může významně ovlivnit naměřenou koncentraci CNP v plazmě (Kuehnl *et al.*, 2013)

ZÁVĚR

Natriuretické peptidy jsou polypeptidy skládající se z aminokyselin uspořádaných do kruhové struktury spojených pomocí disulfidického můstku. Struktura je variabilní a je považována za důležitý faktor, který určuje jejich jedinečné chemické a fyzikální vlastnosti.

Natriuretické peptidy vznikají jako prepronatriuretické peptidy, které se po odštěpení signálního peptidu mění na propeptidy (např. proANP, proBNP) a před sekrecí do krevního oběhu podléhají dalšímu štěpení na neaktivní N-terminální peptidy a na aktivní hormon. Tyto natriuretické peptidy jsou nejčastěji degradovány neutrální endopeptidázou známou také jako neprilysin.

Regulaci cirkulujícího objemu krve zajišťují zásahem do renální eliminace vody a sodného kationtu, podílí se na regulaci krevního tlaku a dále je jejich účinek zprostředkován přímo zásahem do systému renin-angiotensin-aldosteron s výsledným ovlivněním cévního tonu. Také mají význam pro pochopení patofyziologie řady chorob, lze je využít pro diagnostiku, monitorování a terapii. Nejvýznamnější je stanovení hladiny cirkulujícího BNP a NT-proBNP využívajících se hlavně u všech pacientů s akutní dušností a podezřením na akutní srdeční selhání a dále jsou využívány v prognostickém hodnocení pacientů se srdečním selháním.

V posledních letech se čím dál tím častěji používá termín metabolický syndrom, což je soubor chorobných stavů zvyšujících riziko vzniku diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. Jeho prevalence souvisí zejména se sedavým způsobem života, vysokokalorickou stravou a celosvětovým zvýšeným výskytem obezity. Tento syndrom je spojen se sníženou hladinou natriuretických peptidů a jejich změněnou expresí v receptorech.

V nynější době se začínají využívat také syntetické natriuretické peptidy, což jsou syntetizované chiméry natriuretických peptidů nebo jejich rekombinantní formy. Klinické studie ukazují široké použití syntetických natriuretických peptidů. K léčbě srdečního selhání se například používá cenderitid, nesritid a také vasonatrin. K podpoře růstu mladých kostí se využívá vosoritid, který se jeví jako slibný lék k léčbě achondroplazie.

Použitá literatura

1. **Amano N., Mukai T., Ito Y., Narumi S., et al. [2014].** Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 99, Issue 4, Pages E713-E718, DOI: 10.1210/jc.2013-3525.
2. **Bi W., Liang S., He Z., Jin Y., et al. [2021].** The prognostic value of the serum levels of brain natriuretic peptide, troponin I, and D-Dimer, in addition to the neutrophil-to-lymphocyte ratio, for the disease evaluation of patients with acute pulmonary embolism. *International Journal of General Medicine*. Volume 14, Pages 303-308, DOI:10.2147/IJGM.S288975.
3. **Boström P., Wu J., Jendrychowski M. P., Korde A. [2012].** A PGC1 α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. Volume 481, Issue 7382, Pages 463-468, DOI: 10.1038/nature10777.
4. **Bubb K. J., Aubdool A. A., Moyes A. J., Lewis S. [2018].** Endothelial C-type natriuretic peptide is a critical regulator of angiogenesis and vascular remodeling. *Circulation*. Volume 139, Issue 13, Pages 1612-1628, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036344.
5. **Buttgereit J., Shanks J., Li D., Hao G., et al. [2002].** C-type natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor B signalling inhibits cardiac sympathetic neurotransmission and autonomic function. *Cardiovascular Research*. Volume 112, Issue 3, Pages 637-644, DOI: 10.1093/cvr/cvw184
6. **Cemin R. and Massimo D. [2015].** Pre-analytic variability in cardiovascular biomarker testing. *Journal of Thoracic Disease*. Volume 7, Issue 10, Pages E395-E401, DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.03.
7. **Colombo M., Looker H. C., Farran B., Agakov F., et al. [2018].** Apolipoprotein CIII and N-terminal prohormone b-type natriuretic peptide as independent predictors for

cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. Volume 274, Pages 182-190, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.014.

8. **Coué M. and Moro C. [2016]**. Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie*. Volume 124, Pages 84-91, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.05.017.
9. **Dickey D. M. and Potter L. R. [2011]**. Dendroaspis natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Volume 51, Issue 1, Pages 67-71, DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.03.013.
10. **Dorsch M. P. and Rodgers J. E. [2012]**. Nesiritide: harmful or harmless? *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. Volume 26, Issue 10, Pages 1465-1478, DOI: 10.1592/phco.26.10.1465.
11. **Dzimiri N., Moorji A., Afrane B., Al-Halees Z. [2002]**. Differential regulation of atrial and brain natriuretic peptides and its implications for the management of left ventricular volume overload. *European Journal of Clinical Investigation*. Volume 32, Issue 8, Pages 563-569, DOI: 10.1046/j.1365-2362.2002.01035.x.
12. **Espiner E. A., Dalrymple-Alford J. C., Prickett T. C. R., Alamri Y., et al. [2014]**. C-type natriuretic peptide in Parkinson's disease: reduced secretion and response to deprenyl. *Journal of Neural Transmission*. Volume 121, Pages 371-378, DOI: 10.1007/s00702-013-1123-9.
13. **Fujii T., Sato T., Uchino S., Doi K., et al. [2019]**. Human atrial natriuretic peptide for acute kidney injury in adult critically ill patients: a multicenter prospective observational study. *Journal of Critical Care*. Volume 51, Pages 229-235, DOI: 10.1016/j.crc.2018.11.035.
14. **Gabrielsen A., Omland T., Brokner M., Fredheim J. M., et al. [2016]**. The effect of surgical and non-surgical weight loss on N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and

its relation to obstructive sleep apnea and pulmonary function. *BMC Research Notes*. Volume 9, Issue 1, Pages 440, DOI: 10.1186/s13104-016-2241-x.

15. **Giannitsis E. and Katus A. H. [2017]**. Biomarkers for clinical decision-making in the management of pulmonary embolism. *Clinical chemistry*. Volume 63, Issue 1, Pages 91-100, DOI: 10.1373/clinchem.2016.255240.
16. **Gruden G., Landi A., Bruno G. [2014]**. Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes Care*. Volume 37, Issue 11, Pages 2899-2908, DOI: 10.2337/dc14-0669.
17. **Haddad R. A., Giacherio D., Barkan A. L. [2019]**. Interpretation of common endocrine laboratory tests: technical pitfalls, their mechanisms and practical considerations. *Clinical diabetes and endocrinology*. Volume 5, DOI: 10.1186/s40842-019-0086-7.
18. **Han X., Zhang S., Chen Z, Adhikari B. K, et al. [2020]**. Cardiac biomarkers of heart failure in chronic kidney disease. *Clinica Chimica Acta*. Volume 510, Pages 298-310, DOI: 10.1016/j.cca.2020.07.040.
19. **Hauser S. R., Waeiss R. A., Molosh A. I., Deehan G. A., et al. [2020]**. Atrial natriuretic peptide (ANP): A novel mechanism for reducing ethanol consumption and seeking behaviors in female alcohol preferring (P) rats. *Peptides*. Volume 134, Pages 170403, DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170403.
20. **He H., Cao M., Hu J., Zhu L., et al. [2020]**. Fluorescent turn-on assay of C-type natriuretic peptide using a molecularly imprinted ratiometric fluorescent probe with high selectivity and sensitivity. *Microchimica Acta*. Volume 187, DOI: 10.1007/s00604-020-04583-2.
21. **Hodes A. and Lichtstein D. [2014]**. Natriuretic hormones in brain function. *Frontiers in Endocrinology*. Volume 5, Pages 201, DOI: 10.3389/fendo.2014.00201.

22. **Chang P., Zhang X., Chen W., Zhang J., et al. [2021].** Vasonatrin peptide, a synthetic natriuretic peptide, attenuates myocardial injury and oxidative stress in isoprenaline-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Peptides*. Volume 137, Pages 170474, DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170474.
23. **CHopra S., Cherian D., Verghese P. P. [2013].** Physiology and clinical significance of natriuretic hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. Volume 17, Issue 1, Pages 83-90, DOI: 10.4103/2230-8210.107869.
24. **Idzikowska K. and Zielińska M. [2018].** Midregional pro-atrial natriuretic peptide, an important member of the natriuretic peptide family: potential role in diagnosis and prognosis of cardiovascular. *The Journal of International Medical Research*. Volume 46, Issue 8, Pages 3017-3029, DOI: 10.1177/0300060518786907.
25. **Idzikowska K., Kacprzak M., Zielińska M. [2020].** MR-proANP level predicts new onset atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. *Biomarkers*. Volume 25, Issue 7, Pages 573-577, DOI: 10.1080/1354750X.2020.1814414.
26. **Ichiki T., Dzhoyashvili N., Burnett J. C. [2019].** Natriuretic peptide based therapeutics for heart failure: Cenderitide: a novel first-in-class designer natriuretic peptide. *International Journal of Cardiology*. Volume 281, Pages 166-171, DOI: 10.1016/j.card.2018.06.002.
27. **Jacob M., Menon S., Botti Ch., Marshall I. [2018].** Heterozygous NPR2 mutation in two family members with short stature and skeletal dysplasia. *Case Reports in Endocrinology*. Volume 2018, Pages 1-4, DOI: 10.1155/2018/7658496.
28. **Jia D., Liu F., Zhang Q., Zeng G., et al. [2018].** Rapid on-site evaluation of routine biochemical parameters to predict right ventricular dysfunction in and the prognosis of patients with acute pulmonary embolism upon admission to the emergency room. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Volume 32, Issue 4, Pages 22362, DOI: 10.1002/jcla.22362.

29. **Jiang Y. S., Lei J. Y., Chen Y., Jin J. [2014].** Vasonatin peptide stimulates both of the natriuretic peptide receptors, NPRA and NPRB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 446, Issue 4, Pages 1276-1280, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.110.
30. **Jin Q., Ye W., Chen H., He X., et al. [2014].** Levels of brain natriuretic peptide are associated with peripheral arterial disease in subjects with type-2 diabetes mellitus. *BMC Endocrine Disorders*. Volume 14, Issue 1, DOI: 10.1186/1472-6823-14-27.
31. **Kang R., Nagoshi T., Kimura H., Tanaka T. D. [2021].** Possible association between body temperature and B-type natriuretic peptide in patients with cardiovascular diseases. *Journal of Cardiac Failure*. Volume 27, Issue 1, Pages 75-82, DOI: 10.1016/j.cardfail.2020.08.012.
32. **Khaleghi M., Saleem U., Morgenthaler N. M., Turner S. T., et al. [2020].** Plasma midregional Pro-Atrial natriuretic peptide is associated with blood pressure indices and hypertension severity in adults with hypertension. *American Journal of Hypertension*. Volume 22, Issue 4, Pages 425-431, DOI: 10.1038/ajh.2009.8.
33. **Kom H. N. and Januzzi J. L. [2011].** Natriuretic peptide testing in heart failure. *Circulation*. Volume 123, Issue 18, Pages 2015-2019, DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.979500.
34. **Korostyshevskaya I. M., Maksimov V. F., Rudenko N. S. [2016].** C-type natriuretic peptide: What, Where and Why? *Neuroscience and Behavioral Physiology*. Volume 46, Pages 888-894, DOI: 10.1007/s11055-016-0328-4.
35. **Koziorowski D., Tomasiuk R., Szlufik S., Friedman A. [2012].** Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients. *Cytokine*. Volume 60, Issue 3, Pages 762-766, DOI: 10.1016/j.cyto.2012.07.030.
36. **Krupicka J., Janota T., Hradec J. [2013].** Natriuretic peptides in heart failure. *Cor et Vasa*. Volume 55, Issue 4, Pages e370-e376, DOI: 10.1016/j.crvasa.2013.03.010.

37. **Kuehnl A., Pelisek J., Bruckmeier M, Safi W., et al. [2013].** Comparative measurement of CNP and NT-proCNP in human blood samples: a methodological evaluation. *Journal of Negative Results in BioMedicine*. Volume 12, Issue 1, DOI: 10.1186/1477-5751-12-7.
38. **Lee N. S. and Daniels L. B. [2016].** Current Understanding of the Compensatory Actions of Cardiac Natriuretic Peptides in Cardiac Failure: A Clinical Perspective. *Cardic Failure Review*. Volume 2, Issue 1, Pages 14-19, DOI: 10.15420/cfr.2016:4:2.
39. **Licata A., Corrao S., Petta S., Genco Ch., et al. [2013].** NT pro BNP plasma level and atrial volume are linked to the severity of liver cirrhosis. *PLOS ONE*. Volume 8, Issue 8 e68364, DOI: 10.1371/journal.pone.0068364.
40. **Liu J., Zhang G., Cong X., Wen Ch. [2018].** Black garlic improves heart function in patients with coronary heart disease by improving circulating antioxidant levels. *Frontiers in Physiology*. Volume 9, DOI: 10.3389/fphys.2018.01435.
41. **Lugnier C., Meyer A., Charloux A., Gény B., et al. [2019].** The Endocrine Function of the Heart: Physiology and Involvements of Natriuretic Peptides and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Heart Failure. *Journal of Clinical Medicine*. Volume 8, Issue 10, DOI: 10.3390/jcm8101746.
42. **Maeder M. T., Mueller Ch., Schoch O. D., Ammann P., et al. [2016].** Biomarkers of cardiovascular stress in obstructive sleep apnea. *Clinica Chimica Acta*. Volume 460, Pages 152-163, DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.046.
43. **Martin F. L., Sangaralingham S. J., Huntley B. K., McKie P. M., et al. [2012].** CD-NP: novel engineered dual guanylyl cyclase activator with anti-fibrotic actions in the heart. *PLOS ONE*. Volume 7, Issue 12, DOI: 10.1371/journal.pone.0052422.
44. **Meems M. G. L. and Burnett J. C. Jr. [2016].** Innovative Therapeutics: Designer Natriuretic Peptides. *JACC: Basic to Translational Science*. Volume 1, Issue 7, Pages 557-567, DOI: 10.1016/j.jacbts.2016.10.001.

45. **Miyazaki Y., Ichimura At., Kitayama R., Okamoto N., et al. [2022].** C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca^{2+} entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth. *eLife*. Volume 11, Pages e71931, DOI: 10.7554/eLife.71931.
46. **Moro C. and Lafontan M. [2013].** Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. Volume 304, Issue 2, Pages H358-H368, DOI: 10.1152/ajpheart.00704.2012.
47. **Nagai-Okatani Ch., Kangawa K., Minamino N. [2017].** Three molecular forms of atrial natriuretic peptides: quantitative analysis and biological characterization. *Journal of Peptide Science*. Volume 23, Issue 7-8, Pages 486-495, DOI: 10.1002/psc.2969.
48. **Nogi K., Ueda T., Matsue Y., Nogi M. [2022].** Effect of carperitide on the 1 year prognosis of patients with acute decompensated heart failure. *ESC Heart Failure*. Volume 9, Issue 2, Pages 1061-1070, DOI: 10.1002/ehf2.13770.
49. **Olney R. C., Prickett T. C. R., Espiner E. A., Mackenzie W. G., et al. [2015].** C-type natriuretic peptide plasma levels are elevated in subjects with achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dysplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 100, Issue 2, Pages E355-E359, DOI: 10.1210/jc.2014-2814.
50. **Packer M., Holcomb R., Abraham W. T., Anker S., et al. [2016].** Rationale for and design of the TRUE-AHF trial: the effects of ularitide on the short-term clinical course and long-term mortality of patients with acute heart failure. *European Journal of Heart Failure*. Volume 19, Issue 5, Pages 673-681, DOI: 10.1002/ejhf.698.
51. **Palmer B. F. and Clegg D. J. [2015].** An Emerging Role of Natriuretic Peptides igniting the fat furnace to fuel and warm the heart. *Mayo Clinic Proceedings*. Volume 90, Issue 12, Pages 1666-1678, DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.08.006.
52. **Park S., Kim T., Han M., Ha K., et al. [2012].** Dendroaspis natriuretic peptide regulates the cardiac L type Ca^{2+} channel activity by the phosphorylation of α_{1c} proteins. *Experimental & Molecular Medicine*. Volume 44, Issue 6, Pages 363-368, DOI: 10.3858/emm.2012.44.6.041.

53. **Peake N. J., Hobbs A. J., Pinguan-Murphy B., Salter D. M., et al. [2014].** Role of C-type natriuretic peptide signalling in maintaining cartilage and bone function. *Osteoarthritis and Cartilage*. Volume 22, Issue 11, Pages 1800-1807, DOI: 10.1016/j.joca.2014.07.018.
54. **Potter L. R., Yoder A. R., Flora D. R., Antos L. K., et al. [2016].** Natriuretic peptide: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Volume 2009, Issue 191, Pages 341-366, DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_15.
55. **Prickett T. CR and Espiner E. A. [2020].** Circulating products of C-type natriuretic peptide and links with organ function in health and disease. *Peptides*. Volume 132, DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170363.
56. **Radwan H., Selem A., Ghazal K. [2014].** Value of N-terminal pro brain natriuretic peptide in predicting prognosis and severity of coronary artery disease in acute coronary syndrome. *Journal of the Saudi Heart Association*. Volume 26, Issue 4, Pages 192-198, DOI: 10.1016/j.jsha.2014.04.004.
57. **Ramnanan CH. J., McMullen D. C., Groom A. G., Storey K. B. [2010].** The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Volume 335, Pages 91-105, DOI: 10.1007/s11010-009-0246-7.
58. **Reenen A., Berger M., Moreau E., Bekx E. [2019].** Analytical performance of a single epitope B-type natriuretic peptide sandwich immunoassay on the Minicare platform for point-of-care diagnostics. *Practical Laboratory Medicine*. Volume 15, Pages e00119, DOI: 10.1016/j.plabm.2019.e00119.
59. **Reinmann M. and Meyer P. [2020].** B-type natriuretic peptide and obesity in heart failure: a mysterious but important association in clinical practice. *Cardiovascular Medicine*. Volume 23, DOI: 10.4414/cvm.2020.02095.

60. **Saito K., Uchino S., Fujii T., Saito S., et al. [2020].** Effect of low-dose atrial natriuretic peptide in critically ill patients with acute kidney injury: a retrospective, single-center study with propensity-score matching. *BMC Nephrology*. Volume 21, Issue 1, Pages 31, DOI: 10.1186/s12882-020-1701-7.
61. **Sanchez O. A., Lazo-Elizondo M., Zeb I., Tracy R. P., et al. [2016].** Computerized tomography measured liver fat is associated with low levels of N-terminal pro-brain natriuretic protein (NT-proBNP). Multi-ethnic study of atherosclerosis. *Metabolism*. Volume 65, Issue 5, Pages 728-735, DOI: 10.1016/j.metabol.2016.02.001.
62. **Santhekadur P. K., Kumar D. P., Seneshaw M., Mirshahi F., et al. [2017].** The multifaceted role of natriuretic peptides in metabolic syndrome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 92, Pages 826-835, DOI: 10.1016/j.biopha.2017.05.136.
63. **Santos-Araújo C., Leite-Moreira A., Pestana M. [2015].** Clinical value of natriuretic peptides in chronic kidney disease. *Nefrologia*. Volume 35, Issue 3, Pages 227-233.
64. **Savarirayan R., Irving M., Bacino C. A., Bostwick B., et al. [2019].** C-type natriuretic peptide analogue therapy in children with achondroplasia. *The New England Journal of Medicine*. Volume 381, Issue 1, Pages 25-35, DOI: 10.1056/NEJMoa1813446.
65. **Semenov A. G. and Feygina E. E. [2018].** Chapter one-standardization of BNP and NT-proBNP immunoassays in light of the diverse and complex nature of circulating BNP-related peptides. *Advances in Clinical Chemistry*. Volume 85, Pages 1-30, DOI: 10.1016/bs.acc.2018.02.001.
66. **Semenov A. G. and Katrukha A. G. [2016].** Analytical Issues with Natriuretic Peptides-has this been overly simplified? *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Volume 27, Issue 3, Pages 189-207.
67. **Shah T., Kampangkaew J., Przybylowicz R., Deswal A. [2018].** Ularitide in acute heart failure. *Current Emergency and Hospital Medicine Reports*. Volume 6, Pages 17-23, DOI: 10.1007/s40138-018-0150-0.

68. **Spoletini I., Coats A. J. S., Senni M., Rosano G. M. C. [2019].** Monitoring of biomarkers in heart failure. *European Heart Journal Supplements: Journal of the European Society of Cardiology*. Volume 21, Pages M5-M8, DOI: 10.1093/eurheartj/suz215.
69. **Syed D., Peshenko S., Liu K., Durazo-Arvizu R., et al. [2018].** Association between N-terminal Pro-Brain natriuretic peptide levels, glomerular filtration rate, and heart failure in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Journal of integrative cardiology*. Volume 4, Issue 3, DOI: 10.15761/JIC.1000246
70. **Talha S., Charloux A., Piquard F., Geny B. [2017].** Brain natriuretic peptide and right heart transplantation. *Clinical Transplantation*. Volume 31, Issue 6, Pages e12969, DOI: 10.1111/ctr.12969.
71. **Vasile V. C. and Jaffe A. S. [2017].** Natriuretic peptides and analytical barriers. *Clinical Chemistry*. Volume 63, Issue 1, Pages 50-58, DOI: 10.1373/clinchem.2016.254714.
72. **Vesely D. L. [2016].** Heart peptide hormones: adjunct and primary treatments of cancer. *Anticancer Research*. Volume 36, Issue 11, Pages 5693-5700, DOI: 10.21873/anticancer.11152.
73. **Vinnakota S. and Chen H. H. [2020].** The importance of natriuretic peptides in cardiometabolic diseases. *Journal of the Endocrine Society*. Volume 4, Issue 6, Pages 1-11, DOI: 10.1210/jendso/bvaa052.
74. **Volpe M. [2014].** Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International Journal of Cardiology*. Volume 176, Issue 3, Pages 630-639, DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.08.032.
75. **Wang W., Song M. H., Miura K., Fujiwara M., et al. [2015].** Acromesomelic dysplasia, type maroteaux caused by novel loss-of-function mutations of the NPR2 gene: three case reports. *American Journal of Medical Genetics Part A*. Volume 170, Issue 2, Pages 426-434, DOI: 10.1002/ajmg.a.37463.

76. **Wong P. Ch. Y., Guo J., Zhang A. [2017].** The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptide. *Advances in Physiology Education*. Volume 41, Issue 2, Pages 179-185, DOI: 10.1152/advan.00177.2016.
77. **Woodward Z., Prickett T. C. R., Espiner E. A., Anderson T. J. [2017].** Central and systemic C-type Natriuretic peptide are both reduced in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. Volume 43, Pages 15-19, DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.06.019.
78. **Wrobel W., Pach E., Ben – Skowronek I. [2021].** Advantages and disadvantages of different treatment methods in achondroplasia: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 22, Issue 11, DOI: 10.3390/ijms22115573.
79. **Yan P., Wan Q., Zhang Z., Xu Y, et al. [2020].** Association between circulating B-type natriuretic peptide and diabetes peripheral neuropathy: a cross-sectional study of a chinese type 2 diabetic population. *Journal of Diabetes Research*. Volume 2020, Pages 10, DOI: 10.1155/2020/3436549.
80. **Yong V. W., Tan Y. J., Ng Y., Choo X. Y., et al. [2020].** Progressive and accelerated weight and body fat loss in Parkinson's disease: a three.-year prospective longitudinal study. *Parkinsonism & Related Disorders*, Volume 77, Pages 28-35, DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.06.015.
81. **Zhang Z., Yang D., Xiang J., Zhou J., et al. [2021].** Non-shivering thermogenesis signalling regulation and potential therapeutic applications of brown adipose tissue. *International Journal of Biological Sciences*. Volume 17, Issue 11, Pages 2853-2870, DOI: 10.7150/ijbs.60354.
82. **Zolty R., Bauer C., Allen P., Garrity M., et al. [2008].** Atrial natriuretic peptide stability. *Clinical Biochemistry*. Volume 41, Issues 14-15, Pages 1255-1258, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.05.008.