

Adrenomedullina e peptidi correlati: dalla fisiologia alla diagnostica

Riccardo Albertini, Lorenzo Cerutti, Nicodemo Sessa, Giovanni Palladini

Laboratorio di Biotecnologie, Medicina di Laboratorio, Analisi Chimico-Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, e Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia

ABSTRACT

Adrenomedullin and related peptides: from physiology to diagnostics. Adrenomedullin (ADM) and related peptides have important physiologic effects on cardiovascular system, including a potent and powerful hypotensive activity caused by dilatation of resistance vessels. Other roles are played in endocrine and nervous systems. The plasma concentrations of ADM are increased in several cardiac diseases, raising the possibility of a role as a biomarker of heart failure. The actions of ADM are generally protective and beneficial to organs and tissues (e.g., vasodilation, natriuresis and anti-inflammation) and suggest that increased ADM expression or activity could act as a compensatory response to end-organ injury. The investigations on the possible applications of ADM in clinical studies have increased since the introduction of an assay measuring mid-regional proadrenomedullin (MR-proADM), a peptide derived from proadrenomedullin characterized by a high stability in plasma. Recent studies suggest that MR-proADM could be a marker of adverse prognostic effects after myocardial infarction or during acute cardiac dyspnea. Recently, our group showed that MR-proADM is a powerful prognostic marker in AL (light-chain) amyloidosis, which may not only reflect cardiac dysfunction, but also widespread systemic disease, and can be combined with cardiac troponin for detecting patients at risk of early death. However, further studies are required in order to recommend the assay of MR-proADM in the clinical laboratory; in particular, there is a lack of information about: 1) kinetics of MR-proADM release after acute events and 2) the specific contribution given by MR-proADM assay in addition to the well-established determination of natriuretic peptides.

INTRODUZIONE

L'adrenomedullina (ADM) è un peptide con potente effetto vasodilatatore, che fu isolato e caratterizzato nel 1993 da tessuto di feocromocitoma (1). Studi successivi hanno messo in luce la presenza di ADM anche in altri tessuti, come ghiandole surrenali, cuore, rene, apparato gastro-intestinale e vasi arteriosi (2); concentrazioni significative sono state rinvenute anche nel siero. Su queste premesse, negli anni compresi tra 1994 e 1999 sono stati condotti i primi studi che hanno documentato elevate concentrazioni di ADM nell'ipertensione arteriosa, nello scompenso cardiaco, nell'insufficienza renale e nella sepsi (3, 4).

In aggiunta alle proprietà di vasodilatatore, ADM ha vari effetti fisiologici (autocrini e paracrini) sui sistemi cardiovascolare, respiratorio, renale, immunitario e neuroendocrino; questi sono, in generale, protettivi e di aiuto alla corretta funzione di questi organi e, per questo, suggeriscono che l'aumentata espressione e attività dell'ADM potrebbe essere una risposta di difesa al danno e alla disfunzione d'organo.

ASPETTI BIOCHIMICI

Il gene della ADM è localizzato sull'estremità distale del braccio corto del cromosoma 11; esso è composto di 4 esoni separati da 3 introni. La sequenza nucleotidica corrispondente ai 52 amminoacidi dell'ADM matura è codificata dal quarto esone, mentre la sequenza PAMP (peptide N-terminale della proadrenomedullina) è codificata da porzioni del secondo e del terzo introne (5).

La ADM umana consiste di 52 amminoacidi e contiene un anello di 6 amminoacidi, generato da un ponte disolfuro tra le cisteine 16 e 21. Il peptide precursore della ADM umana consiste di 185 amminoacidi e include una sequenza segnale di 21 amminoacidi. In aggiunta, è presente un segmento di 20 amminoacidi localizzato tra l'estremità N-terminale del precursore dell'ADM e l'ADM matura, PAMP, che è rimosso da una modificazione post-traduzionale (Figura 1) (1). Il PAMP ha una sua attività fisiologica, poiché produce vasodilatazione e inibisce il sistema nervoso simpatico e la secrezione di aldosterone. Il peptide interposto nella struttura primaria tra PAMP e adrenomedullina (amminoacidi 45-92) è importante ai fini

Corrispondenza a: Riccardo Albertini, Medicina di Laboratorio, Analisi Chimico-Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Viale Golgi 19, 27100 Pavia. Tel. 0382503760, Fax 0382503517, E-mail r.albertini@smatteo.pv.it

Ricevuto: 09.11.2012

Revisionato: 20.12.2012

Accettato: 02.01.2013

diagnostici perché particolarmente stabile nel siero ed è denominato “midregional proadrenomedullin” (MR-proADM).

EFFETTI FISIOLGICI

Gli effetti fisiologici dell’ADM e del PAMP sono riassunti nella Tabella 1.

Sistema vascolare

La ADM induce vasodilatazione e aumento del flusso sanguigno in vari distretti vascolari, in particolare in quelli cerebrale, coronarico, polmonare e renale (6, 7). Nell’uomo, l’infusione di ADM induce una riduzione dose-dipendente della pressione arteriosa, accompagnata da una diminuzione delle resistenze periferiche (8). Questo effetto ipotensivo si ha a concentrazioni fisiologiche ed è associato a una risposta riflessa minima del sistema simpatico e di quello renina-angiotensina-aldosterone, suggerendo che la ADM

possa inibire questi sistemi neuroendocrini.

Il recettore della ADM è accoppiato all’adeniciclastasi e l’azione di vasodilatazione è principalmente mediata dal cAMP; ADM può stimolare la ossido nitrico-sintetasi e l’aumento di ossido nitrico potrebbe essere il vero principale mediatore della vasodilatazione.

Cuore

La somministrazione di ADM aumenta la gettata cardiaca, con simultaneo abbassamento della pressione arteriosa, come indicato precedentemente, sia in soggetti sani che in pazienti con scompenso cardiaco (8).

Rene

Studi di localizzazione del m-RNA e di immunoistochimica hanno dimostrato la presenza dell’ADM sia nella corteccia che nella midollare del rene, suggerendone un ruolo fisiologico (9). In effetti, la sua somministrazione in animali da esperimento induce un

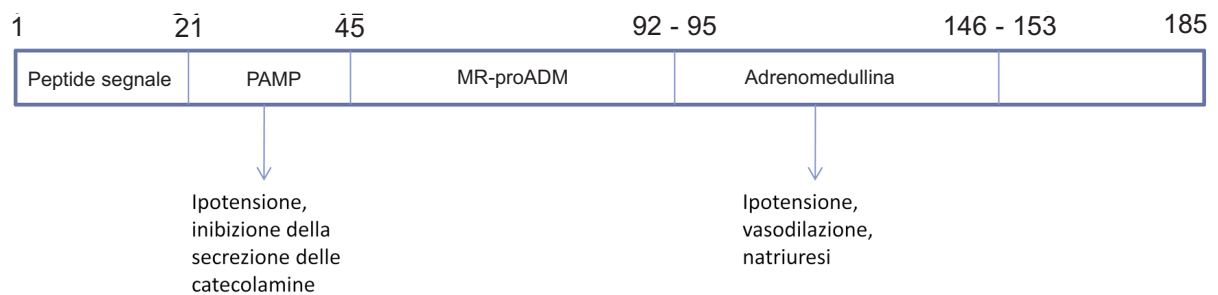


Figura 1
Adrenomedullina e peptidi derivati.
PAMP, peptide amminoterminale della proadrenomedullina; MR-proADM, peptide intermedio della proadrenomedullina.

Tabella 1
Effetti fisiologici di adrenomedullina (ADM) e peptide amminoterminale della proadrenomedullina (PAMP)

Sistema/organo	Azione della ADM	Azione del PAMP
Sistema vascolare	Ipotensione, inibizione della mitosi	Ipotensione, inibizione del tono simpatico
Cuore	Effetto inotropo e cronotropo positivo, aumento del flusso coronarico, aumento della trascrizione del gene del peptide natriuretico di tipo A	
Polmone	Vasodilatazione, broncodilatazione, azione antiinfiammatoria	Broncodilatazione
Ghiandole surrenali	Inibizione della secrezione di aldosterone	Inibizione della secrezione di aldosterone e del rilascio di catecolamine indotto da stimolo nicotinico
Rene	Aumento del flusso renale, della diuresi e della natriuresi, inibizione della proliferazione del mesangio	
Cervello	Riduzione della sete, del gusto per il sale, inibizione dello svuotamento gastrico, inibizione della secrezione del peptide arginina-vasopressina, aumento del flusso ematico	

aumento della diuresi e della natriuresi attraverso la dilatazione delle arterie renali e l'aumento del flusso ematico renale (10).

Polmone

Nel polmone sono stati riscontrati elevati livelli di mRNA e recettori per ADM (11). La somministrazione di ADM induce vasodilatazione nelle arterie e nelle vene polmonari, ma la riduzione della pressione arteriosa è più pronunciata nella circolazione generale che nel distretto polmonare (6).

Sistema nervoso centrale

ADM e i suoi recettori sono ampiamente distribuiti nella corteccia cerebrale e nell'ipotalamo (12, 13). La somministrazione di ADM in sede intraventricolare, negli animali da esperimento, causa soppressione della sete e della fame, suggerendo che questo ormone possa partecipare alla regolazione della omeostasi dell'acqua e degli elettroliti (14).

Sistema endocrino

ADM produce un'ampia varietà di effetti sul sistema neuroendocrino, in particolare, sulle funzioni cardiovascolari endocrine. Diversi studi dimostrano l'inibizione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, dell'azione dell'endotelina e del rilascio di noradrenalina dalle terminazioni adrenergiche.

Sempre a livello endocrino, ADM interviene nel metabolismo glucidico, modulando il rilascio di insulina, riducendone la secrezione e ritardandola dopo un carico orale di glucosio, anche se il meccanismo non risulta ancora chiaro (15).

Mitosi e apoptosi

ADM inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce di derivazione vascolare, dei fibroblasti cardiaci e delle cellule mesangiali (16, 17); d'altro canto, essa ha una azione mitogenica su cheratinociti orali umani e su alcuni tipi di cellule tumorali. Gli effetti dell'ADM sono multipli e dipendono dal tipo cellulare e dallo stadio del ciclo cellulare.

ADM inibisce l'apoptosi di cellule endoteliali aortiche di ratto attraverso l'aumento della eterodimerizzazione di Max/c-myc (18). Questi effetti sono stati evidenziati anche su altri tipi di cellule, come i cardiomiociti, le cellule tumorali dell'endometrio e le cellule della corteccia surrenalica (19).

IMPLICAZIONI CLINICHE

Iperensione arteriosa

La concentrazione plasmatica di ADM risulta elevata in pazienti affetti da ipertensione arteriosa, soprattutto se accompagnata da ipertrofia ventricolare sinistra. Un'ipotesi è che ADM abbia la funzione di limitare ulteriori aumenti della pressione arteriosa, come

apparirebbe dal fatto che la sua somministrazione la riduce negli stessi pazienti (20, 21).

Insufficienza cardiaca congestizia

Dopo la prima osservazione sulle elevate concentrazioni plasmatiche di ADM nello scompenso cardiaco, diversi gruppi hanno dimostrato che la concentrazione di questo marcatore è tanto più elevata quanto maggiore è la gravità della malattia secondo la classificazione NYHA ("New York Heart Association") (22, 23). Inoltre, esiste una correlazione positiva con la pressione capillare polmonare e negativa con la frazione di eiezione ventricolare. La concentrazione di ADM è, inoltre, in correlazione con catecolamine plasmatiche, peptidi natriuretici e renina; essa si riduce dopo trattamento dello scompenso cardiaco (23). Misure dell'ADM su campioni prelevati da pazienti, dall'aorta e dalla vena interventricolare anteriore evidenziano un gradiente di concentrazione, che indica una secrezione da parte del cuore scompensato come responsabile degli incrementi di ADM in circolo (24).

Lo studio LAMP ("Leicester acute myocardial infarction peptide") ha affrontato il ruolo della MR-proADM come fattore prognostico dopo infarto del miocardio (25). In 983 pazienti le concentrazioni di MR-proADM e NT-proBNP (frammento amminotermiale del peptide natriuretico di tipo B) erano misurate nel siero a 3-5 giorni dall'insorgenza del dolore toracico. La MR-proADM era più elevata nei pazienti che in seguito morivano o sviluppavano scompenso cardiaco. In questo studio, il ruolo prognostico della MR-proADM era indipendente da creatininemia, età, genere e pregressa storia di infarto. In seguito, lo studio multicentrico e prospettico BACH ("Biomarkers in acute heart failure"), che ha riguardato 1641 individui valutati nel dipartimento di emergenza per dispnea acuta, ha dimostrato che la MR-proADM ha una capacità superiore rispetto a peptidi natriuretici e troponina nella previsione del rischio di mortalità a 90 giorni (26). La MR-proADM è utile nella valutazione prognostica non solo nello scompenso cardiaco, ma anche nell'infarto del miocardio (con o senza slivellamento del tratto ST all'elettrocardiogramma), nelle infezioni delle basse vie respiratorie e nella polmonite contratta in comunità (26).

Più recentemente, è stata studiata la capacità della MR-proADM di prevedere eventi cardiovascolari in pazienti con malattia coronarica (27). La MR-proADM ha mostrato una correlazione abbastanza debole con NT-proBNP e troponina cardiaca I. La concentrazione di MR-proADM era significativamente più elevata nei soggetti che in seguito andavano incontro a un evento cardiovascolare e questo analita si è dimostrato un marcatore prognostico paragonabile al NT-proBNP. È interessante notare che l'uso combinato dei due marcatori non apportava un aumento significativo nella capacità di prevedere gli eventi cardiovascolari.

Il nostro gruppo ha studiato il ruolo di MR-proADM nell'amiloidosi AL da catene leggere immunoglobuliniche (28). MR-proADM era associata alla funzione diastolica

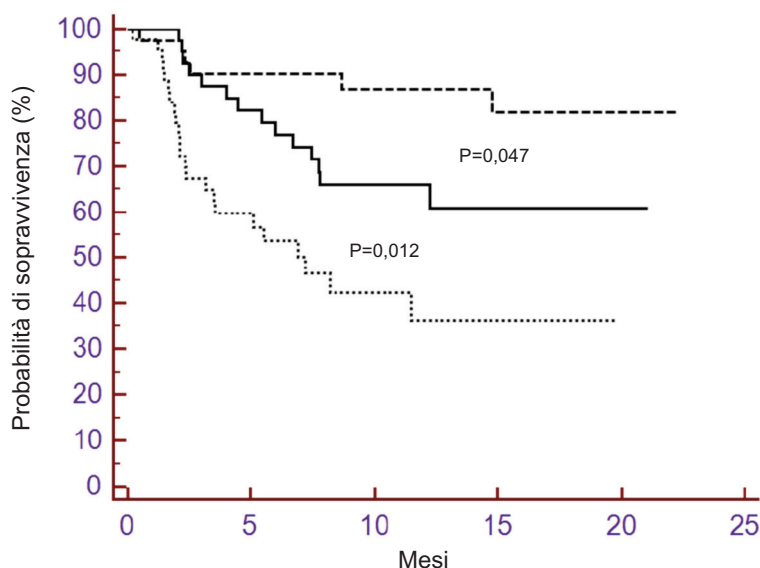


Figura 2

Sopravvivenza di 130 pazienti con amiloidosi AL stratificati secondo i terzili della concentrazione del peptide intermedio della proadrenomedullina (MR-proADM). Dall'alto verso il basso: primo terzile, MR-proADM <0,66 nmol/L; secondo terzile, MR-proADM >0,66 nmol/L <1,01 nmol/L; terzo terzile, MR-proADM >1,01 nmol/L. Adattata da rif. 28.

e sistolica, ma anche a marcatori non soltanto cardiaci di malattia avanzata, come l'interessamento epatico e del sistema nervoso autonomo, suggerendo che questo analita potrebbe rappresentare un indice di diffusione della malattia. Un'elevata concentrazione di MR-proADM si associa a una sopravvivenza più breve anche nell'amiloidosi AL (Figura 2) e, in combinazione con la troponina I, MR-proADM si è dimostrata capace di discriminare più accuratamente del NT-proBNP pazienti a rischio basso e intermedio.

Un limite della MR-proADM è costituito dal fatto che è un biomarcatore di impatto diagnostico limitato rispetto ai peptidi natriuretici e alla troponina cardiaca, largamente applicati nello scompenso cardiaco e nell'infarto, rispettivamente; d'altro canto, le informazioni prognostiche associate alla MR-proADM possono aiutare nella selezione dei pazienti a maggior rischio che potrebbero beneficiare di trattamenti più aggressivi.

ASPETTI ANALITICI

La misurazione dell'ADM, l'ormone fisiologicamente attivo, è resa difficile da diversi fattori, quali il rapido legame ai recettori fisiologici e la presenza di proteine leganti nel siero, che ne causano una breve emivita, e dalla complessità della procedura radioimmunometrica (29). Per questi motivi la determinazione di ADM per un certo tempo è parsa riservata a un limitato numero di laboratori e centri clinici di riferimento. Questi problemi sono stati superati dalla quantificazione della MR-proADM, stabile e secreta in quantità equimolare rispetto all'ADM. La MR-proADM è stata determinata con saggio immunometrico a "sandwich", utilizzando due anticorpi policlonali rivolti verso gli amminoacidi 45-92 (27). Le metodiche proposte sono basate sulla chemiluminescenza (30), più recentemente adattate a

un analizzatore automatizzato (31).

Al momento, MR-proADM è molto usata negli studi clinici per due motivi: 1) MR-proADM è stabile nel plasma-EDTA e 2) la sua misurazione è automatizzabile. L'intervallo di riferimento (definito dal 2,5° al 97,5° percentile della distribuzione dei valori nella popolazione) è stato stabilito analizzando plasma-EDTA di 144 soggetti sani (87 maschi, 57 femmine) di età compresa tra 21 e 51 anni; esso è risultato compreso tra 0,21 e 0,55 nmol/L (31). Non sono state trovate differenze significative tra maschi e femmine (31).

CONCLUSIONI

L'interesse per la misura dell'ADM nel laboratorio clinico ha in questi anni mostrato un evidente incremento. Le possibilità di applicazioni cliniche si sono molto semplificate con la messa a punto di una metodica in automazione che misura un peptide stabile, la MR-proADM, che ha il pregio di essere resistente alla degradazione nel plasma. Al momento, tuttavia, mancano alcune importanti informazioni per raccomandare la misura della MR-proADM nella pratica clinica e ulteriori studi appaiono necessari, in quanto la cinetica di rilascio dopo eventi acuti è al momento conosciuta in modo approssimativo e il contributo aggiuntivo conferito dalla misura della MR-proADM rispetto ai peptidi natriuretici non è chiaramente dimostrato (i dati disponibili riguardano casistiche relative a pochi tipi di patologie); infine, è necessario chiarire in modo più stringente il significato di marcatore con ruolo prognostico, soprattutto in termini di eventuali decisioni cliniche da prendere nei confronti del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:553-60.
2. Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, et al. Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J Clin Invest* 1994;94:2158-61.
3. Ishimitsu T, Minami J, Nishikimi T, et al. Changes in plasma adrenomedullin in physiological and pathological conditions in human subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(suppl 4):S47-51.
4. Hirata Y, Mitaka C, Sato K, et al. Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1449-53.
5. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:720-5.
6. Lipton H, Chang JK, Hao Q, et al. Adrenomedullin dilates the pulmonary vascular bed in vivo. *J Appl Physiol* 1994;76:2154-6.
7. Lang MG, Paterno R, Faraci FM, et al. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke* 1997;28:181-5.
8. Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, et al. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1016-20.
9. Yoshihara F, Nishikimi T, Okano I, et al. Alterations of intrarenal adrenomedullin and its receptor system in heart failure rats. *Hypertension* 2001;37:216-22.
10. Ebara T, Miura K, Okumura M, et al. Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur J Pharmacol* 1994;263:69-73.
11. Owji AA, Smith DM, Coppock HA, et al. An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995;136:2127-34.
12. Hay DL, Smith DM. Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides* 2001;22:1753-63.
13. Satoh F, Takahashi K, Murakami O, et al. Immunocytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci Lett* 1996;203:207-10.
14. Murphy TC, Samson WK. The novel vasoactive hormone, adrenomedullin, inhibits water drinking in the rat. *Endocrinology* 1995;136:2459-63.
15. Shimosawa T, Ito Y, Ando K, et al. Proadrenomedullin NH(2)-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits norepinephrine overflow from nerve endings. *J Clin Invest* 1995;96:1672-6.
16. Chini EN, Chini CC, Bolliger C, et al. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int* 1997;52:917-25.
17. Kano H, Kohno M, Yasunari K, et al. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1996;14:209-13.
18. Shichiri M, Kato H, Doi M, et al. Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis. *Mol Endocrinol* 1999;13:1353-63.
19. Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension* 2004;43:109-16.
20. Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, et al. Hemodynamic, hormone, and urinary effects of adrenomedullin infusion in essential hypertension. *Hypertension* 2000;36:588-93.
21. Kohno M, Hanehira T, Kano H, et al. Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 1996;27:102-7.
22. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1424-31.
23. Kobayashi K, Kitamura K, Etoh T, et al. Increased plasma adrenomedullin levels in chronic congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:994-8.
24. Jougasaki M, Rodeheffer RJ, Redfield MM, et al. Cardiac secretion of adrenomedullin in human heart failure. *J Clin Invest* 1996;97:2370-6.
25. Khan SQ, O'Brien RJ, Struck J, et al. Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction. The LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1525-32.
26. Maisel A, Mueller C, Nowak RM, et al. Midregion prohormone adrenomedullin and prognosis in patients presenting with acute dyspnea: results from the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:1057-67.
27. Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, et al. Midregional proadrenomedullin for prediction of cardiovascular events in coronary artery disease: results from the AtheroGene study. *Clin Chem* 2012;58:1226-36.
28. Palladini G, Barassi A, Perlini S, et al. Midregional proadrenomedullin (MR-proADM) is a powerful predictor of early death in AL amyloidosis. *Amyloid* 2011;18:216-21.
29. Lewis LK, Smith MW, Yandle TG, et al. Adrenomedullin(1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage. *Clin Chem* 1998;44:571-7.
30. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005;51:1823-9.
31. Caruhel P, Mazier C, Kunde J, et al. Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay for the measurement of midregional proadrenomedullin in plasma on the fully automated system B.R.A.H.M.S. Kryptor®. *Clin Biochem* 2009;42:725-8.