

RESEARCH STUDIES

The extracellular matrix collagen in the coronary in-stent restenosis

S. Costin, L. Ciobanu, I. Popovici, V. Cobet, *M. Popovici

Department of Interventional Cardiology, Institute of Cardiology, Chisinau, the Republic of Moldova

*Corresponding author: popovicim@gmail.com. Manuscript received April 15, 2014; accepted May 16, 2014

Abstract

Background: Extracellular matrix is underlined as an important factor regulating morphofunctional integrity of vascular wall, and is actively involved in vascular remodeling. Although collagen turnover activation is supported in mechanical artery injury, its character remains still unknown in the in-stent restenosis (ISR). The aim of this study is to evaluate the change of collagen type I and type III metabolism and metalloproteinase-2 (MMP2) expression in ISR.

Material and methods: Using the confocal microscopy and immunochemistry techniques, the expression of collagen I and III, the markers of collagen I synthesis and degradation (PICP and CITP), as well as the expression of MMP2 and its tissue inhibitor (TIMMP2) have been assayed in the tissue pattern of ISR taken from 19 died patients. In 24 patients with ISR the markers of collagen I turnover were determined in blood also and compared with markers of 11 healthy persons.

Results: The collagen I degradation is markedly increased in ISR and prevails over its synthesis while the collagen III degradation is enough preserved that led to collagen III/I ratio raising by 4-7 times already in minimal ISR. The CITP value is progressively increasing during restenosis exacerbation that is associated with a similar decline of PICP resulted consequently in a 7-10 fold elevation of the CITP/PICP ratio in muscular media of restenosis. Importantly to note that analogous changes of collagen type I turnover markers are established in blood in patients with ISR: PINP decreasing by 53.32% and CITP rise by 187.6%. The collagen I metabolism modification was accompanied by multiply MMP2 quantity increase and TIMPP2 diminution.

Conclusions: 1. Extracellular matrix reorganization is a hallmark of the in-stent restenosis basically being exhibited by excessive collagen I degradation and preserved collagen III, splitting in conditions of MMP2/TIMMP2 ratio raising proportionally to ISR degree. 2. The shift of the circulating markers of collagen I turnover (PINP and CITP) is near to marker dynamics estimated in restenosis tissue that suggests their diagnostic and predictive role concerning ISR evolution.

Key words: collagen markers, in-stent restenosis.

Colagenul matricei extracelulare în restenoza coronariană intra-stent

Introducere

Datele mai multor studii clinico-experimentale, precum și evidențele noastre anterioare, demonstrează semnificația patogenetică a celulelor musculare netede vasculare (CMNV) în hiperplazia neointimei, substratul morfologic al restenozei intra-stent, care evoluează după angioplastia coronariană cu implantare de stent de regulă la distanța de 5-7 luni [1, 2, 3, 4]. Numărul de miocite cu fenotip secretor acumulate în zona neointimei se corelează concludent cu gradul restenozei intra-stent (RIS), precum și cu numărul de macrofage stocate de origine circulatorie.

Procesul de migrare și proliferare nu este inerent celulelor musculare netede vasculare cu fenotip contractil, patternul căruia este controlat prin mai multe mecanisme, unul din care se atribuie micro-ARN-143/145. Micșorarea în diferite condiții patologice (e.g. excesul de Ang II, stresul oxidativ, răspunsul inflamator nespecific) a expresiei acestuia conduce la creșterea ratei miocitelor cu fenotip secretor (sau sintetic), care devin o sursă de eliberare a substanțelor biologice active și sunt predispușe la proliferare și migrare.

Totodată, migrarea CMNV este înfrântată de lamina elastică externă și dependentă de starea matricei extracelulare

(MEC). Proteinele scheletice de bază ale MEC sunt colagenul de tip I și III (80-95%), restul fiind pe seama lamininei, elastinei, fibronectinei, vimentinei și B-tubulinei. Colagenul de tip IV este componenta structurală principală a laminelor elastice externă și internă. În arterele coronariene, expresia colagenului III în MEC crește odată cu capacitatea vasocontractilă și nivelul stresului mecanic exercitat de miocard. Astfel, colagenul III este, îndeosebi, opulent în arterele coronariene musculare endocardice.

În cultură de CMNV preparată cu factori ce stimulează proliferarea și creșterea celulară, s-a constatat majorarea expresiei nivelului RNA din matricea extracelulară ce controlează sinteza colagenului de tip I, fibronectinei și, în special, a colagenului de tip III [5].

Prin urmare, matricea extracelulară poate fi activ supusă unei reorganizări în contextul ultrajului CMNV spre proliferare și, deci, spre migrare. Mai mult decât atât, colagenul fibrilar inhibă *per se* proliferarea celulelor musculare netede din artere, proces mediat prin intermediul ciclinelor A și E, iar reducerea indicelui de proliferare a CMNV în cadrul alterării aterosclerotice sau injuriei mecanice a vaselor este asociată de modificări structurabile notabile ale matricei

extracelulare, manifestate prin augmentarea sintezei și/sau degradării colagenului fibrilar.

Rolul CMNV în remodelarea vasculară are destule doze, iar activarea sau inhibiția metaloproteinazelor MMP se anunță un mecanism oportun.

Activarea MMP este potențată de mai mulți factori (citokinele proinflamatoare, radicalii liberi de oxigen, triptaze și chimaze etc.), iar mastocitele eliberează diferite familii de enzime (e.g. MMP2 și MMP9) în variate paterne de condiționare, care asociază leziunea vasculară, inflamația și disfuncția endotelială. Degranularea mastocitelor impune, de asemenea, eliberarea TNF- α (factorul de necroză a tumorii alpha), care pe lângă capacitatea de a declanșa un răspuns inflamator mediază expresia și activarea MMP2 (colagenaza 4 sau gelatinaza 2).

În prezent nu sunt evidențe certe privind caracterul modificării MEC în restenoza intra-stent, al *turnover*-lui proteinelor scheletice principale: colagenului de tip I și III, precum și ale expresiei metaloproteinazelor matricei. Această abordare poate traduce noi aspecte conceptuale ale remodelării coronariene negative, predictorii ai restenozei, precum și ținte terapeutice în vederea prevenirii farmacologice a evoluției RIS.

Scopul studiului: evaluarea modificărilor metabolismului colagenului de tip I și III în restenoza coronariană intra-stent, precum și a rolului metaloproteinazei-2.

Obiective

1. Aprecierea expresiei colagenului fibrilar și degradat de tip I și III în peretele arterei coronariene cu RIS.
2. Estimarea ratei de sinteză și degradare a colagenului de tip I prin cuantificarea markerilor specifici în peretele arterei coronariene cu RIS, cât și sângele pacienților care au dezvoltat RIS după angioplastie.
3. Determinarea expresiei și cantității MMP2, precum și a inhibitorului ei tisular specific (TIMMP2) în peretele arterei coronariene cu RIS.

Material și metode

Utilizând tehnici de microscopie confocală și imunohistochimie, expresia și cantitatea colagenului fibrilar și degradat de tip I și III, precum și MMP2 și TIMMP2 s-a evaluat în patternul tisular al segmentelor coronariene cu RIS preluate de la 19 pacienți decedați. De asemenea, au fost determinate valorile cantitative ale markerilor specifici ai *turnover*-ului colagenului de tip I:

- PICP (propeptidul C-terminal), markerul sintezei.
- CITP (telopectidul C-terminal), markerul degradării.

Drept indicii de referință au fost consemnate evidențele decelate în segmentele coronariene adiacente fără semne de remodelare vasculară negativă.

Markerii de sinteză (PINP – propeptidul N-terminal) și degradare (CITP) al colagenului de tip I au fost determinați și în sânge la 24 de pacienți cu RIS. Markerii respectivi determinați la 11 persoane sănătoase (lotul martor) au servit drept indici de referință.

Materialul cifric a fost analizat statistic, semnificația discrepantei fiind evaluată conform criteriului t-Student. Marja de eroare < 5% a fost considerată statistic semnificativă.

Rezultate

Datele microscopiei confocale demonstrează, că pentru restenoza intra-stent este caracteristică prevalența degradării colagenului de tip I asupra ratei de sinteză *de novo* atât în media vasului, cât și în zona restenozei (fig. 1).

Panourile: A sus – vas normal (lotul de referință); A jos – RIS de grad minimal; B sus – RIS moderată; B jos – RIS severă.

Imaginile suprapuse (panourile din dreapta) demonstrează prevalența semnificativă a colagenului degradat asupra colagenului sintetizat *de novo* preponderent în media vasului și în zonele de restenoză.

Important de menționat, că degradarea colagenului I progresa odată cu avansarea gradului de restenoză, iar atenuarea sintezei *de novo* a colagenului I, dimpotrivă, devine mai accentuată. Prin urmare, evoluția RIS se manifestă prin periclitarea matricei extracelulare, iar acumularea colagenului denaturat în zona neointimei determină gradul de proliferare a acesteia și, deci, severitatea restenozei. Cuantificarea markerilor de sinteză și degradare a colagenului I facilitează estimarea dimensiunii acestui proces (fig. 2).

Rata de sinteză a colagenului nu este modificată semnificativ în RIS de grad minimal, dar se reduce brusc deja în restenoza moderată. Valoarea markerului PICP se estimează micșorată de 3-3,5 ori față de indicii de referință în media musculară și peretele integral al segmentului coronarian. Avansarea RIS la grad sever determină micșorarea încă cu 7-12% a markerului de sinteză a colagenului I, fapt ce extinde reculul vs markerul de referință peste o diferență de 5 ori. În zona de restenoză, declinul PICP în gradele moderat și sever față de gradul minimal este considerabil și atinge în medie cote de 11-20%.

Pe acest fundal, se urmărește augmentarea notabilă a degradării colagenului de tip I. Markerul specific, CITP demonstrează o elevare concludentă deja în RIS de grad moderat cu circa 250 și 420% peste indicii de referință în peretele integral și, respectiv, media musculară. În adventicea segmentului coronarian cu RIS moderată CITP depășește cu aproximativ 50% indicii de referință, iar în RIS severă – cu peste 80% ($p < 0,05$). În paternele restenozei de grad moderat și sever CITP excelează prin valori semnificativ elevate față de RIS minimal de 3-3,3 ori.

Modificările iminente ale PICP și CITP decelate în RIS au condus la creșterea marcată a raportului CITP/PICP față de indicii de referință, care în RIS moderată-severă atinge cote de 4-6 ori în peretele integral și 7-10 ori în media musculară.

De remarcat, că modificări similare ale markerului de sinteză și degradare a colagenului de tip I au fost stabilite și în serul pacienților cu restenoză intra-stent comparativ cu indicii de referință (tab. 1).

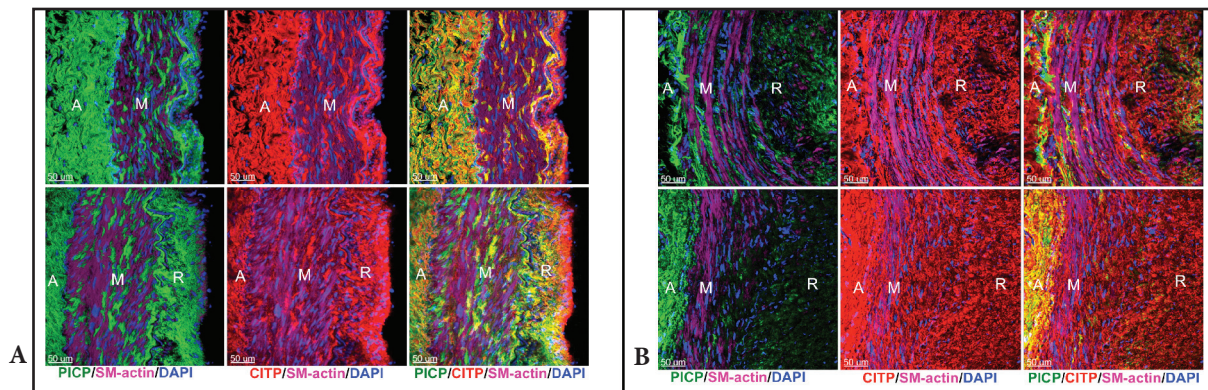


Fig. 1. Imagini confocale ale arterei coronariene colorate prin imunohistochimie triplă cu anticorpi către colagenul I *de novo* sintetizat (PICP), colagenul I degradat (CITP) și SM-actină. Nucleele sunt colorate în albastru cu DAPI.

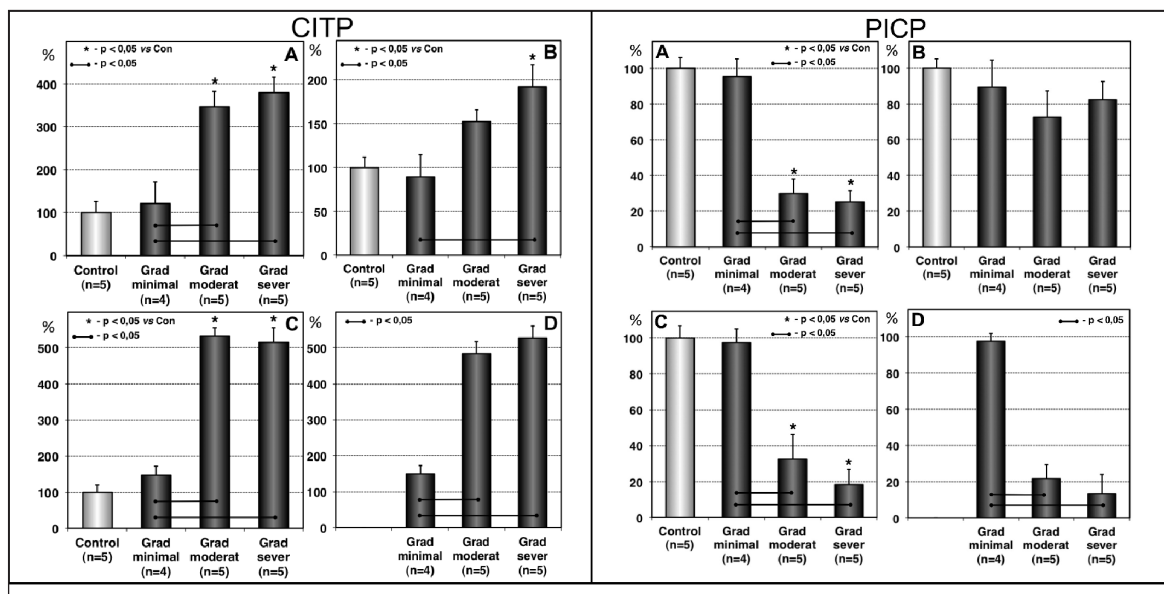


Fig. 2. Devierile cantitative ale CITP și PICP, precum și raportul lor în patternul tisular al RIS: A – peretele integral; B – adventice; C – media musculară; D – zona restenozei.

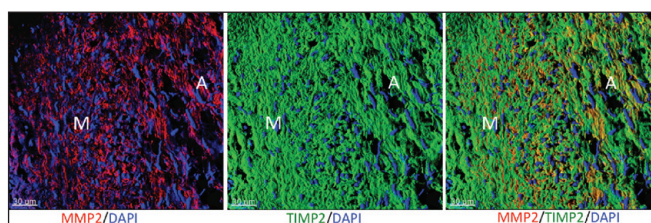


Fig. 3. Imunocolorație de MMP2 și TIMP2 în control (panoul din stânga) sau în restenoză de grad minimal (panourile din dreapta).

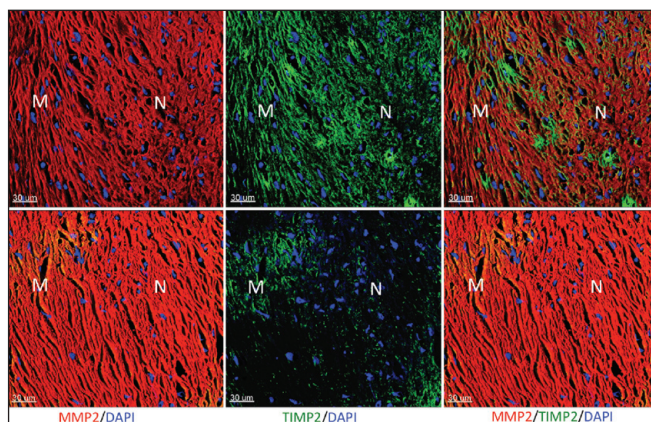


Fig. 4. MMP2 și TIMP2 în RIS de grad moderat (panourile de sus) și RIS grad sever (panourile de jos).

Tabelul 1

Valorile cantitative serice ale PINP, CITP și raportul lor

Indice	Martor (n = 11)	Restenoză intra-stent (n = 24)
PINP, µg/L	86,94 ± 5,84	40,58 ± 1,17 -53,32%; p < 0,01
CITP, µg/L	4,36 ± 0,21	12,54 ± 1,32 +187,6%; p < 0,001
CITP/PINP	0,05	0,31 +520%; p < 0,001

Nivelul circulant al PINP este cu 53,32% sub nivelul martor, iar CITP eleează cu 187,6% peste indicele de referință. Drept urmare raportul CITP/PINP s-a majorat cu 520%.

Prin urmare, caracterul modificării markerilor circulanți PICP și CITP reflectă pertinent patternul metabolismului colagenului de tip I în segmentele coronariene cu RIS după abordarea lor prin angioplastie. Creșterea raportului sanguin CITP/PINP la pacienții expuși corecției leziunilor coronariene prin implantare de stent ar fi un predictor plauzibil al intensității scindării colagenului I, acumulării colagenului degradat în zona neointimei și, corespunzător, al riscului evoluției restenozei intra-stent.

Evaluările cantitative ale MMP2 și TIMMP2 în patternul

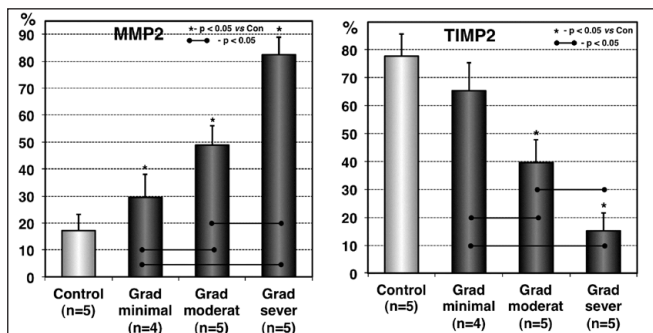


Fig. 5. Valorile cantitative ale MMP2 și TIMMP2 în restenoza intra-stent.

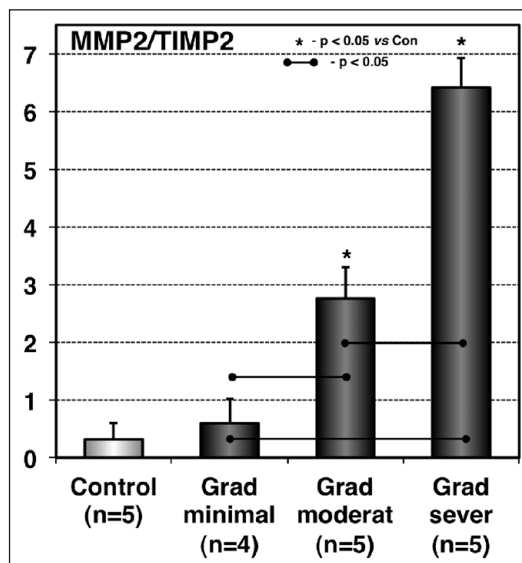


Fig. 6. Raportul MMP2/NIMMP2 în diferite grade de RIS.

tisular al segmentului coronarian cu RIS aduce la apel un factor causal important al degradării manifeste a colagenului (fig. 3).

Rezultatele cantitative indică creșterea semnificativă aproape dublă a MMP2 (colagenazei IV) deja în gradul minim de RIS. Elevation atinge o rată triplă în gradul moderat de RIS, iar restenoza severă se impune prin majorarea cantitativă a MMP2 de 5 ori. Indicele cantitativ al inhibitorului tisular specific (TIMMP2) se înjumătățește în gradul moderat de RIS (p < 0,05), iar în restenoza severă descrește la o rată de peste 5 ori.

Ca urmare raportul MMP2/TIMMP2 crește progresiv pe palierul evoluției restenozei, incrementul fiind statistic concludent deja în gradul moderat al RIS (fig. 4).

Valoarea acestuia crește de circa 6 ori în restenoza moderată și peste 30 de ori în restenoză severă.

Așadar, creșterea valorii CITP în restenoză intra-stent, ca un indicator al gradului de scindare a colagenului I, se corelează autentic cu creșterea MMP2 și a raportului MMP2/TIMMP2, fapt ce indică semnificația patogenetică a factorilor ceea ce determină mărirea expresiei metaloproteinazelor și degradarea proteinei principale a matricei extracelulare (fig. 6).

Cu toate acestea, degradarea colagenului de tip III a fost notabil mai limitată, comparativ cu cea a colagenului de tip I, fenomen iminent al restenozei intra-stent, care a determinat creșterea considerabilă a raportului colagen III/colagen I (fig. 5).

Atât în peretele integral, cât și media musculară, raportul

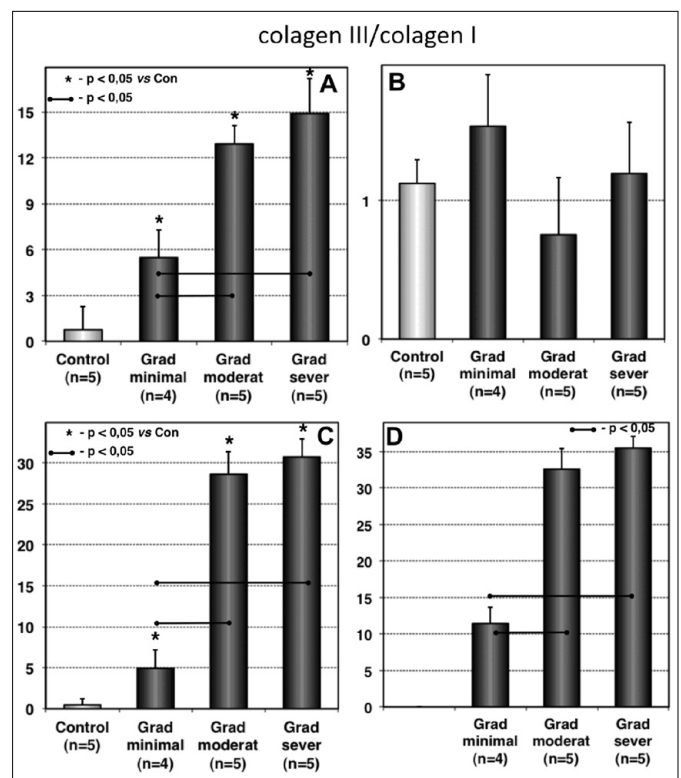


Fig. 7. Raportul colagen III/colagen I în restenoza intra-stent: A - peretele integral; B - adventice; C - media musculară; D - zona restenozei.

colagen III/I a crescut semnificativ deja în restenoza minimă, de 4-7 ori. Sporul raportului devine categoric în restenoza moderată și severă, atingând valori ale incrementului cuprinse între 20-30 de ori.

În adventice variațiile raportului nu sunt semnificative.

Estimările inerente zonei restenozei indică un raport al colagenului III/I în RIS moderată-severă majorat statistic de 2,5-3 ori față de indicele restenozei minimale (fig. 7).

Discuții

Cercetarea noastră a fost proiectată asupra matricei extracelulare a segmentului coronarian cu restenoză intra-stent după angioplastie în vederea stabilirii particularităților metabolismului proteinelor scheletice principale, colagenului I și III. Pentru cuantificarea ratei de sinteză și degradare a colagenului I au fost determinați markerii specifici în patternul tisular al RIS (PICP și CITP), precum și în sânge la pacienții care au dezvoltat restenoză intra-stent (PINP și CITP).

Evidențele obținute indică fenomenul degradării sporite a colagenului I, în timp ce rata de sinteză a acestuia este diminuată. Valoarea CITP crește progresiv odată cu gradul de restenoză în media musculară și peretele integral al segmentului coronarian abordat, comparativ cu indicii de referință, iar în RIS moderată și severă, incrementul este multiplu. Rata de sinteză a colagenului I, de asemenea, descrește în proporție cu gradul RIS, fapt ce a rezultat în mărirea concludentă a raportului CITP/PINP.

Ambii markeri ai *turnover*-ului colagenului I se află în relații stoichiometrice cu moleculele de colagen sintetizate sau degradate, raportul fiind de 1:1, procolagenul I sintetizat de fibroblaste conținând propeptide C-terminale și N-terminale [6].

Degradarea intracelulară a colagenului este dependentă de acțiunea catepsinelor și proteazelor serinice, iar în spațiul extracelular de metaloproteinaze.

Noi am depistat majorarea expresiei metaloproteinazei 2 (colagenazei IV sau gelatinazei 2) în raport direct cu gradul RIS, inhibitorul ei tisular specific (TIMP2) fiind în declin comensurabil. Astfel, se poate admite că activarea MMP2 și/sau reducerea TIMP2 este o cauză a degradării excesive a colagenului I.

În acest context, G. Jones și colab. (2009) au relatat că evoluția RIS la pacienții expuși angioplastiei este asociată de niveluri plasmatiche crescute și ale altor metaloproteinaze, cum ar fi MMP3 și MMP9 [7].

M. Katsaros și colab. (2010) au demonstrat legătura strânsă dintre nivelurile ridicate ale MMP2 și MMP9 la pacienții cu risc înalt al RIS chiar și după implantarea stenturilor farmacologic active [8].

Citokinele proinflamatoare se anunță printre factorii care activează MMP, iar pe de altă parte, produsele degradării colagenului exacerbează răspunsul inflamator nespecific și facilitează motilitatea CMNV. Rolul inflamației și impactului citokinelor în evoluția RIS și complicațiilor cardiovasculare majore după angioplastie este decelat de noi și relatat de mai mulți autori [9, 10, 11].

Colagenul fibrilar inhibă proliferarea celulelor musculare netede vasculare, micșorează capacitatea lor de migrare și expresia receptorilor MEC. Prin urmare, reducerea cantitativă a acestuia grație micșorării sintezei *de novo* (*i.e.* declinul PICP) sau activării degradării (*i.e.* elevarea CITP) se anunță drept un factor important de facilitare și susținere a migrării și proliferării CMNV.

În plus, activarea MMP2 contribuie la scindarea colagenului IV din structura laminei elastice externe, fapt care înlesnește procesul de migrare a celulelor musculare netede cu fenotip secretor spre neointimă.

Deci, activarea metaloproteinazelor are cel puțin 2 semnificații patogenetice vizavi de dezvoltarea RIS: (1) acumularea moleculelor de colagen degradat în zona neointimei, care în asociere cu celulele musculare netede cu fenotip secretor constituie componentele de bază (moleculară și celulară) a fenomenului de hiperplazie a neointimei.

Cu toate acestea, degradarea colagenului III este mult mai limitată *versus* colagenul I, iar sinteza lui majorată, inerență care a condus la creșterea raportului colagen III/colagen I în media musculară și peretele integral al segmentului coronarian cu RIS. Posibil, colagenul III este mai rezistent la acțiunea MMP2.

Este semnificativ, că date similare au fost publicate recent de către C. Manhenke și colab. (2014), care au stabilit creșterea nivelului circulant al markerului degradării colagenului de tip I și al markerului de sinteză a colagenului III la pacienții expuși angioplastiei în contextul corecției infarctului miocardic cu elevarea segmentului ST [12]. Autorii au urmărit elevarea acestor niveluri pe o perioadă postprocedurală de 12 luni.

Elevarea sanguină a markerului de sinteză a colagenului III (PIIINP sau PIIICP) este un factor cu valoare predictivă asupra evoluției clinice și funcționale la pacienții cu insuficiență cardiacă congestivă [13].

Colagenul de tip III al MEC este cantitativ inferior față de colagenul de tip I, dar proprietățile lui elastice sunt mult mai joase, respectiv creșterea ratei lui în structura matricei extracelulare afectează complianța vasculară și reactivitatea coronariană.

Studiul EPHEBUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) a demonstrat valoarea predictivă a markerilor degradării colagenului I și sintezei colagenului III, estimați în sângele pacienților cu infarct miocardic suportat asupra evoluției insuficienței cardiace și supraviețuirii [14].

În studiul nostru, modificările markerilor circulanți ai sintezei și degradării colagenului de tip I la pacienții cu RIS, confirmată angiocoronarografic, au fost analoage markerilor determinați în patternul tisular al restenozei. Deci, utilizarea markerilor circulanți ai sintezei și degradării colagenului de tip I, precum și colagenului de tip III poate fi o posibilitate fiabilă de evaluare a matricei extracelulare și a riscului RIS la pacienții expuși angioplastiei.

Data fiind implicarea patogenetică a matricei extracelulare în restenoza intra-stent și remodelarea coronariană ne-

gativă, modularea sintezei și degradării colagenului I și III poate fi o țintă oportună a manevrelor terapeutice direcționate spre prevenirea RIS și complicațiilor cardiovasculare majore (infarctul miocardic acut, angina pectorală instabilă etc.) după angioplastie.

La această conotație sunt relevante efectele antagoniștilor nespecifici (spiro lacton) și specifici (eplerenon) ai receptorilor aldosteronului sau ale inhibitorilor formării Ang II.

Statinele și acizii grași Omega-3, de asemenea, sunt vizate drept remedii cu capacitate de inhibiție a activității și expresiei metaloproteinazelor matricei extracelulare, și pot fi, deci, angrenate în prevenirea și corecția restenozei intra-stent.

Concluzii

1. Reorganizarea matricei extracelulare este un pattern structural iminent al restenozei intra-stent, care se manifestă prin creșterea degradării colagenului de tip I și reducerea sintezei lui, precum și prin creșterea ratei colagenului de tip III.

2. Modificările markerilor sintezei și degradării colagenului I atestate în sângele pacienților cu restenoză intra-stent (PINP și CITP) sunt analoage celor depistate în patternul tisular al segmentului coronarian cu RIS, iar markerii circulanți pot fi, astfel, predictorii ai periclitării MEC și riscului evoluției RIS.

3. Creșterea expresiei MMP2 și micșorarea cantitativă a inhibitorului ei tisular specific (TIMMP2) reprezintă un factor notabil al periclitării matricei extracelulare și metabolismului colagenului de tip I. Colagenaza IV poate fi o țintă a manevrelor farmacologice direcționate spre corecția și prevenirea RIS.

References

1. Goel S, Guo LW, Kent K. Mechanisms of post-interventional remodeling. *Cardiovasc. Res.* 2012;96(3):363-371.
2. Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ. J.* 2009;73:615-621.
3. Habara M, Terashima M, Nasu K, et al. Morphological differences of tis-

sue characteristics between early, late, and very late restenosis lesions after first generation drug-eluting stent implantation: an optical coherence tomography study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging.* 2013;14:276-284.

4. Popovici M, Popovici I, Kostin S, et al. Predictors of neointima hyperplasia in in-stent restenosis. ESC Congress, 2012; abstr. 26864.
5. Liao G, Chan LM. Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J. Biol. Chem.* 1989;264(17):10315-10320.
6. Barasch E, Gottdiener JS, Aurigemma G, et al. The relationship between serum markers of collagen turnover and cardiovascular outcome in the elderly/clinical perspective. *Circ. Heart Fail.* 2011;4:733-739.
7. Jones G, Tarr G, Phillips L, et al. Active matrix metalloproteinases 3 and 9 are independently associated with coronary artery in-stent restenosis. *Atherosclerosis.* 2009;207:603-607.
8. Katsaros M, Kastl S, Zorn G, et al. Increased restenosis rate after implantation of drug-eluting stents in patients with elevated activity of matrix metalloproteinase -2 and -9. *J. Am. Coll. Cardiol. Int.* 2010;3(1):90-97.
9. Cobeț V, Ciobanu L, Panfile E, et al. Factors influencing coronary remodeling after stenting. ESC Congress, Frontiers in Cardiovascular Biology, 2014; abstr. 75335.
10. Shuichi Y, Shichiro A, Tomoaki K, et al. Late-phase inflammatory response as a feature of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation. *Coronary Artery Disease.* 2013;24(5):368-373.
11. Niccoli G, Dato I, Imaeva A, et al. Association between inflammatory biomarkers and in-stent restenosis tissue features: an Optical Coherence Tomography Study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging.* 2014; doi:10.1093/ehjci/jeu035.
12. Manhenke C, Ueland T, Jugdutt B, et al. The relationship between markers of extracellular cardiac matrix turnover: infarct healing and left ventricular remodeling following primary PCI in patients with first-time STEMI. *Eur. Heart J.* 2014;35(6):395-402.
13. Sugimoto M, Masutani S, Seki M, et al. High serum levels of procollagen type III N-terminal amino peptide in patients with congenital heart disease. *Heart.* 2009;95:2023-2028.
14. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study. *Circulation.* 2009;119:2471-2479.

