

## Extracellular RNA – a new predictor and a supposable mechanism of 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 December 16, 2013; accepted February 15, 2014

**Background:** The evaluation of new predictors of negative coronary remodeling after angioplasty remains an adequate approach of interventional cardiology in the diagnosis and prognosis of in-stent restenosis (ISR). Previously we have demonstrated on a murine model of atherosclerosis that extracellular RNA (eRNA) increases proportionally to vascular injury progression, and a first activation of the blood RNAase is changed by its steady quantitative decline, a reason that suggests a plausible role of eRNA in coronary neointima hyperplasia.

**Material and methods:** This article is aimed at the study of eRNA amount in a tissue pattern of a stent with restenosis as well as its correlation with such inflammatory predictors as macrophage number and TNF-alpha expression. Using the techniques of confocal microscopy and immunohistochemistry we have first proved that eRNA level significantly increases in the coronary wall of segments with ISR (the specimens have been taken postmortem from 19 patients exposed to angioplasty).

**Results:** The rise in the assay has been closely correlated to restenosis degree, and in muscular media it has been 2-4 times beyond the control range estimated in the adjacent coronary segment without negative vascular remodeling. In the restenosis zone eRNA has risen by about 130% from minimal to severe ISR. Moreover, its level has been found markedly increased earlier also comparatively to the control pattern: by 62% in moderate and 128% in severe ISR. A key disclosed evidence is that eRNA is positively correlated with TNF-alpha level ( $r = +0.88$ ) and the number of macrophages ( $r = +0.84$ ), whereas the last is notably enhanced depending on ISR progression.

**Conclusions:** The obtained outcomes result in 2 opportunities: 1. eRNA may be a feasible predictor of negative coronary remodeling, facilitating the prognosis of ISR risk; 2. eRNA may be singled out as a factor involved in the pathogenesis of neointima formation and hyperplasia due to its relation to the inflammatory process.

**Key words:** extracellular RNA, angioplasty, in-stent restenosis.

## ARN extracelular – un predictor nou și un eventual mecanism al restenozei intrastent

### Introducere

Restenoza intrastent (RIS), care evoluează la pacienții expuși angioplastiei cu implantare de stent, rămâne a fi una din cele mai oportune abordări ale cardiologiei intervenționale (PCI). Incidența relativ înaltă (până la 15-25%) a acestei complicații, care anihilează beneficiile revascularizării mecanice iminente PCI, impune necesitatea tranșării mecanismelor relevante ale remodelării coronariene negative. Evidențierea lor va desemna valori predictive ale diferitor markeri, precum și ținte terapeutice privind prevenirea hiperplaziei neointimei și, respectiv, a reducerii riscului RIS.

Rezultatele studiilor clinico-experimentale, efectuate în acest sens, indică asupra rolului disfuncției endoteliale, stresului oxidativ, inflamației nespecifice și migrării celulare în formarea și hiperplazia neointimei după injurii mecanice ale arterelor coronariene și periferice [1, 2, 3]. Cu toate acestea, mecanismele responsabile de declanșare și susținere a acestor procese patologice sunt elucidate parțial, opiniile de concept sub multe aspecte fiind tratate controversat.

Datele cercetărilor noastre, realizate pe pacienții cu RIS, demonstrează legătura strânsă dintre micșorarea expresiei și cantității micro-ARN-143/145 în media coronariană și severitatea restenozei, iar pe de altă parte, cu aceasta din urmă se corelează autentic și gradul de activare a metaloproteinazelor matricei și degradarea colagenului fibrilar de tip I [4, 5]. Totodată, evoluția RIS este asociată de acumularea macrofagilor în zona neointimei, progresarea căreia se află în raport direct cu numărul de celule musculare netede vasculare cu fenotip secretor, care au migrat din media coronariană.

O nouă direcție de cercetare a factorilor ce pot avea co-

notații patogenetice certe privind RIS este consolidată prin evidența de premieră a implicării eARN-ului (acidul ribonucleic extracelular) în instalarea și exacerbarea leziunilor aterosclerotice experimentale (murine), cât și remodelarea vasculară periferică (e.g. artera carotidă) după alterarea mecanică, obținute de către S. Costin și colab. (2013) pe animale „knockout” vizavi de receptorii LDL și apo-E [6].

ARN extracelular este eliberat de diferite tipuri de celule (e.g. endoteliocele, miocite netede vasculare) în spațiul extracelular (ulterior acesta nimereste în sânge) în condițiile alterării celulare până la necroză. Circa 85% din eARN este pe seama patternului ribosomal, restul fiind distribuit între ARN de transport (10%) și mesager (5%). În circuitul sanguin, eARN este metabolizat prin intermediul enzimei proteolitice specifice (RN-aza), mecanismele de control al activității căreia rămân neelucidate.

Autorii au relatat, în acest context, fenomenul acumulării eARN-ului în placa aterosclerotică a aortei pe măsura progresării procesului aterogen, precum și elevarea nivelului circulant după alterarea mecanică a arterei carotide. Important de menționat, că majorarea cantitativă a eARN-ului, asociată inițial de creșterea activității sanguine a RN-azei, a fost urmată ulterior de micșorarea activității enzimei cu peste 72% ( $12 \pm 2$  vs  $44 \pm 9$  mU/mg proteină). Mai mult decât atât, administrarea RN-azei la șoricelii apo-E-knockout s-a impus prin atenuarea concludentă a formării neointimei, recrutării monocitelor și inflamației vasculare după alterarea mecanică a arterei carotide, fapt care sugerează aportul *per se* al eARN în evoluția acestor procese tratate și drept mecanisme fiabile ale RIS.

De remarcat o noimă semnificativă a relației între răspunsul inflamator și eARN. Autorii au decelat că TNF-alpha (factorul necrozei tumorale alpha), care este un trigger al eliberării eARN din celulele musculare netede vasculare, elevează cantitativ în spațiul extracelular sub acțiunea eARN-ului, proces determinat plauzibil de eliberarea transmembranară a precursorului TNF-alpha [7]. Acțiunea de promovare a inflamației și statutului protrombotic, inerentă eARN-ului, a fost confirmată și prin evidențierea capacității acestuia de a crește expresia citokinelor proinflamatoare (IL-1-beta, IL-6), moleculelor de adeziune intercelulară (ICAM, VEGF, selectinele, CL40) și micșorarea expresiei citokinelor antiinflamatoare (e.g. IL-4, IL-10), adeziunea *in vitro* a monocitelor la celulele musculare netede și la peretele arterei carotide *in vivo*.

Așadar, eARN-ul apare ca un factor de semnalizare a injuriilor celulare, iar odată eliberat în spațiul extracelular, induce efecte proinflamatoare și protrombotice, prin ce se anunță un candidat fiabil privind inducerea și predicția (dată fiind identificarea lui în sânge) remodelării vasculare aterosclerotice și determinate de injuriile mecanice induse (de exemplu, manevra de implantare a stentului).

Prin urmare, studiul eARN poate demarca noi entități privind mecanismele de evoluție a RIS, predictorii remodelării coronariene negative și riscului dezvoltării complicațiilor cardiovasculare majore după PCI.

Sub aspectul acestor considerații studiul dat a avut drept scop: evaluarea cantității eARN în peretele coronarian cu diferite grade de restenoză intrastent, precum și corelarea ei cu expresia TNF-alpha și numărul de macrofage.

### Material și metode

Evaluarea eARN, expresiei TNF-alpha și a numărului de macrofage s-a efectuat în patternul tisular al stenturilor cu restenoză, preluate postmortem de la 19 pacienți expuși PCI.

eARN s-a vizualizat prin microscopie confocală cu imuno-fluorescență, colorând patternul tisular cu SYTO® RNASelect™ dye (Invitrogen) și cuantificat (UA/μm<sup>2</sup>, unități arbitrare) prin PCI-real time. Pentru determinarea cantitativă a TNF-alpha (UA/μm<sup>2</sup>) s-au utilizat kiturile eBioscience (Germania). Anticorpii la SD68 s-au aplicat în cadrul estimării numerice a macrofagelor (n/nm<sup>2</sup>).

### Rezultate

Cantitatea eARN determinată în peretele arterei coronariene este majorată în RIS, creșterea fiind în raport direct cu gradul de severitate a restenozei (fig. 1).

Cea mai considerabilă majorare se decelează în media vasculară (fig. 1C). Deja în RIS de grad minim se atestă un spor semnificativ, care în gradul moderat este mai mult ca dublu. În RIS de grad sever, cantitatea eARN depășește în medie de 4 ori indicele control (segmentul arterei coronariene adiacent restenozei). Important de menționat, că cantitatea eARN în RIS moderată este semnificativ superioară valorii estimate în RIS minimală și, la rândul său, eARN în RIS severă este semnificativ peste valoarea indicelui în RIS moderată.

Un raport similar privind cantitatea eARN în funcție de gradul RIS se constată și în zona restenozei (fig. 1D). Can-

titatea eARN în RIS moderată este de circa 1,6 ori mai mare decât în RIS minimală, iar în RIS severă – de circa 1,5 ori superioară valorii iminente RIS moderate. Astfel, decalajul dintre eARN în RIS minimală și RIS severă este mai mult ca dublu (230 vs 110 UA/μm<sup>2</sup>).

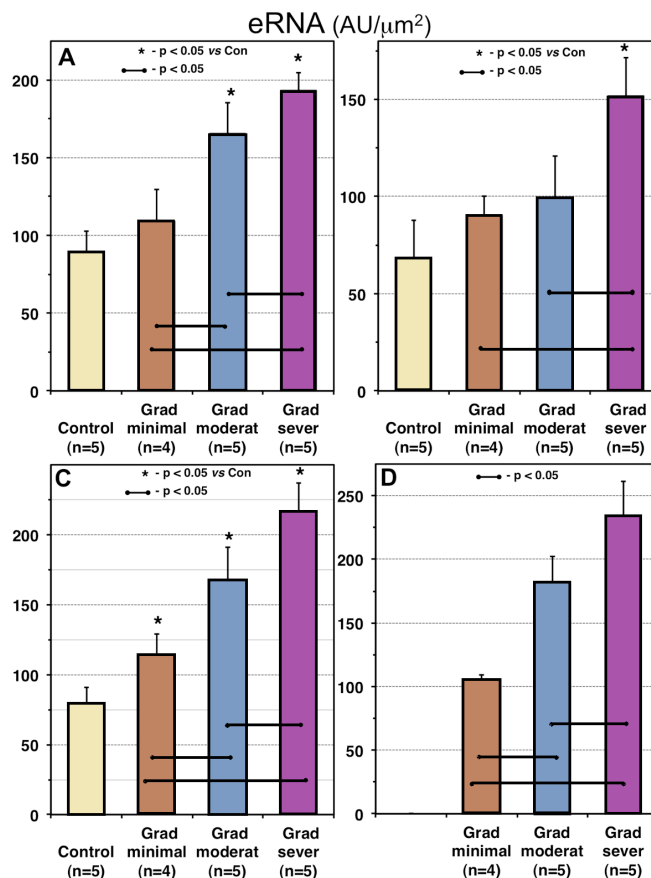


Fig. 1. Rezultatele cantitative ale eARN: A – peretele coronarian integral; B – adventice; C – medie; D – zona restenozei.

Chiar și în adventice cantitatea eARN din patternele cu RIS este peste valoarea control, în RIS de grad sever discrepanța fiind semnificativă, atingând cote în medie de 110% (fig. 1B). Totodată, între nivelul cantitativ al eARN în RIS severă și RIS moderată există o diferență semnificativă.

Estimările cantitative efectuate în întreg peretele arterei coronariene atestă valori semnificativ crescute ale eARN în RIS moderată (cu circa 62%) și RIS severă (cu circa 128%) față de indicele control.

Deci, evoluția și progresarea RIS este asociată de creșterea în manieră proporțională a cantității eARN în peretele arterei coronariene abordate, aceasta fiind, îndeosebi, accentuată în media vasculară.

În contextul relației eARN cu răspunsul inflamator nespecific este oportună evidența creșterii expresiei TNF-alpha și acumulării macrofagelor în neointima peretelui arterei coronariene cu un stent restenozat (fig. 2).

Deja într-un grad minimal de RIS sunt decelate modificări notabile: 1) diminuarea expresiei SM-actinei; 2) creșterea numărului macrofagelor care se corelează cu expresia mărită a TNF-alpha. În vasul normal, macrofagele, care expresează

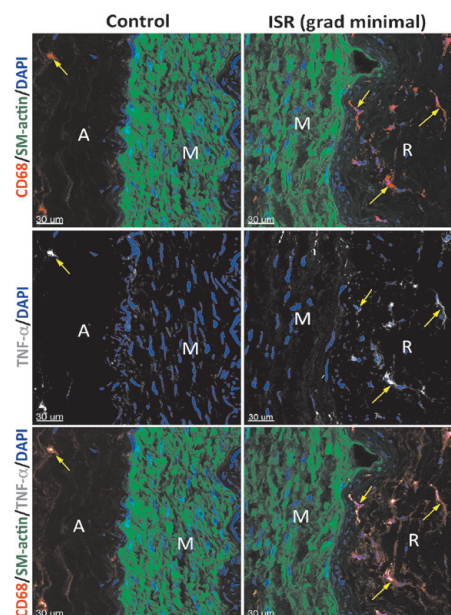


Fig. 2. Cantitatea macrofagelor CD68- pozitive (săgeți) și expresia TNF-alpha și a SM-actinei în adventice (A), medie (M) și zona de restenoză (R) în vas normal (panourile din stânga) și într-un stent cu restenoză de grad minimal (panourile din dreapta).

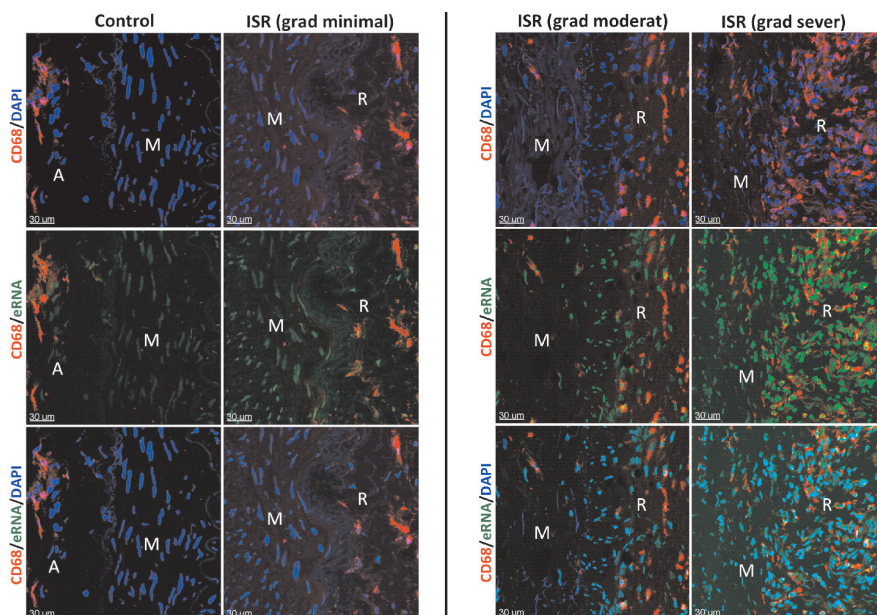


Fig. 3. Cantitatea macrofagelor CD68- pozitive și expresia eRNA detectat prin SYTO® RNASelect™ în adventice (A), medie (M) și zona restenozei (R) în vas normal (control), într-un stent cu restenoză de grad minimal, moderat și sever.

TNF-alpha, se observă numai în adventice și sunt absente în medie.

Numărul de macrofage crește odată cu avansarea severității restenozei, pe palierul căreia se constată și majorarea expresiei eARN (fig. 3).

Chiar în restenoza de grad minimal, expresia ARN-ului extracelular și numărul macrofagelor este mărit comparativ cu vasul neafectat (prezența macrofagelor preponderent în adventice). Este însemnată acumularea opulentă a macrofagelor în zona restenozei moderate și, îndeosebi, severe, asociată de elevarea expresiei în manieră proporțională a eARN.

Sub acest aspect, este conceptual importantă prezența unei corelări de intensitate înaltă între cantitatea eARN, pe

de o parte, și nivelul de expresie al TNF-alpha, numărul de macrofage pe unitate de suprafață a neointimei, pe de altă parte (fig. 4). Coeficientul de corelare este +0,08375 ( $p < 0,001$ ) și, respectiv, +0,08838 ( $p < 0,001$ ).

Un coeficient de corelare între eARN și numărul de macrofage practic identic cu cel apreciat între eARN și TNF-alpha indică, totodată, și asupra unor relații strânse între expresia citokinei proinflamatoare și procesul de acumulare a macrofagilor, unele celule surse ale TNF-alpha.

Trebuie remarcată valoarea absolută a numărului de macrofage în raport direct cu gradul de restenoză (fig. 5). Această elevare este semnificativă deja în gradul minimal al restenozei, atingând o valoare medie de 13-15 celule/1 mm<sup>2</sup>, care de circa

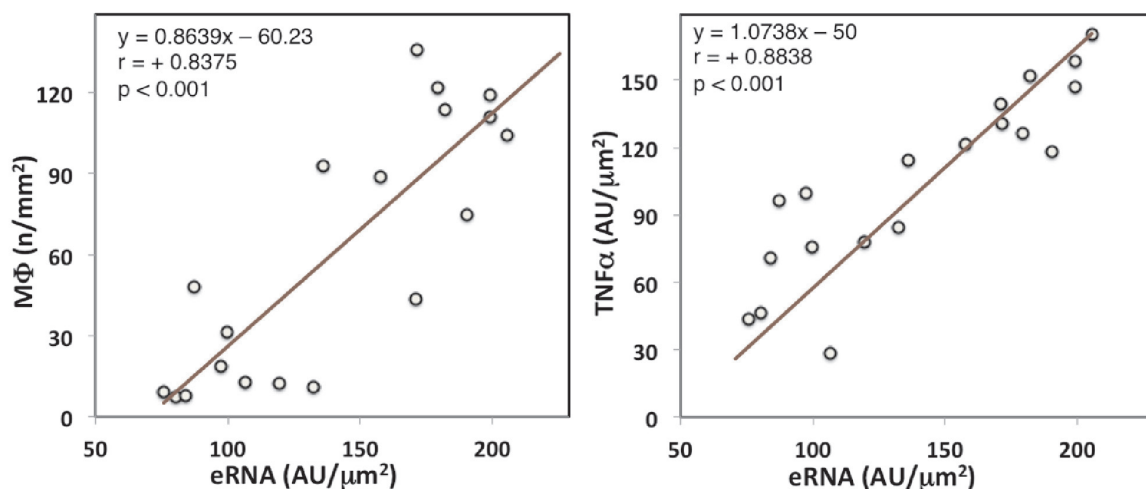


Fig. 4. Corelarea între cantitatea eARN și numărul de macrofage, precum și cantitatea TNF-alpha în patternul de restenoză a arterei coronariene.

4-4,5 ori depășește indicele control (stentul fără restenoză). În gradul moderat de restenoză numărul de macrofage se notează la cote de circa 80 celule/1 mm<sup>2</sup> care, practic, se dublează în cadrul restenozei severe.

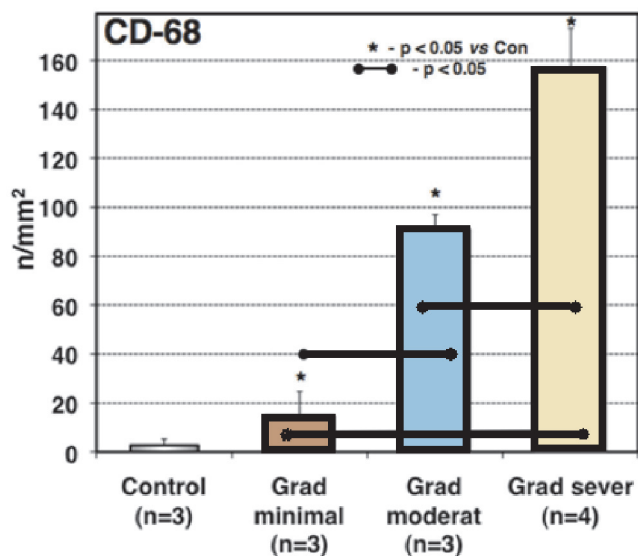


Fig. 5. Numărul de macrofage/1mm<sup>2</sup> în diferite grade de restenoză intrastent.

Așadar, potrivit datelor obținute, evoluția restenozei intrastent impune 3 semnificații pertinente în plan conceptual:

- progresarea RIS este asociată cu creșterea în manieră proporțională a expresiei eARN, în special, în media coronariană;
- majorarea eARN se corelează autentic cu majorarea numărului de macrofage și a expresiei TNF-alpha;
- elevarea numerică a macrofagelor este în raport direct cu gradul RIS.

### Discuții

Studiul realizat reprezintă o premieră în ceea ce privește evaluarea cantității eARN în patternul tisular al stentului restenozat, preluat de la pacienții expuși angioplastiei. Pentru prima dată s-a demonstrat că eARN are conotații patogenetice privind evoluția RIS, întrucât creșterea valorii lui cantitative se produce în raport cu progresarea restenozei. Elevarea superioară a eARN în media coronariană ar indica că miocitul neted vascular este o sursă de eliberare în matricea extracelulară a acidului ribonucleic, mai ales că activarea celulei musculare pe fundalul periclitării sistemului de control al echilibrului fenotipului contractil/secretor este vizată drept o condiție oportună a migrării miocitului și hiperplaziei neointimei. Elevarea marcată a eARN în zona restenozei severe poate sugera și celula endotelială drept o sursă a acumulării eARN.

Apanajul patogenetic al RIS are mai multe dovezi privind rolul impactului traumatic al manevrei de implantare a stentului asupra remodelării coronariene după PCI, realizat prin denudarea endoteliului vascular, activarea stresului oxidativ și răspunsului inflamator nespecific [8, 9, 10]. Leziunea celulelor endoteliului și mediei musculare poate fi importantă în vederea eliberării în spațiul extracelular al acidului ribonucleic. Creșterea expresiei TNF-alpha care asociază activarea

răspunsului inflamator nespecific stimulează acest proces. La rândul său, acumularea eARN acționează ca un factor trigger asupra majorării expresiei și cantității TNF-alpha, deci ca un factor proinflamator. Se admite că eARN poate duce la creșterea TNF-alpha prin activarea enzimei de conversie a acestei citokine [11]. În acest context, sunt importante și evidențele de activare de către eARN a expresiei ICAM (moleculii de adeziune intercelulară), astfel augmentându-se recrutarea și adeziunea celulelor mono- și polimorfonucleare [7].

Conexiunea eARN la VEGF (factorul endotelial de creștere) poate de asemenea influența permeabilitatea vasculară și expansiunea leziunilor subendoteliale, procese propice formării neointimei [12].

Prin urmare, eARN se include ca o verigă importantă în sistemul de cascadă (activare reciprocă) a mediatorilor celulari, care se află la baza evenimentelor consecvente leziunii peretelui vascular, contribuind la remodelarea vasculară, în general, și la RIS, în particular.

În circuitul sanguin, eARN este degradat prin acțiunea RN-azei. Totodată, în unele patologii (tumori, fibroză pulmonară, sepsis) nivelul circulant al eARN elevează, fapt interpretat de unii autori drept o repercusiune a legăturii eARN cu proteinele, fosfolipidele sanguine sau microparticulele circulante sau exosomi, care atenuează procesul de metabolizare [13, 14].

Nivelul plasmatic și activitatea RN-azei se anunță inteligibil ca un factor oportun nu numai de influențare a acumulării eARN, dar și a efectelor lui proinflamatoare, proaterogene și protrombotice. Creșterea eARN se asociază cu deprecierea RN-azei, iar administrarea acesteia din urmă s-a manifestat prin teșirea efectelor lui [6].

Prin urmare, dacă eARN se consemnează drept un mecanism de promovare a hiperplaziei neointimei grație, în primul rând, acțiunii lui proinflamatoare, atunci nivelul tisular și/sau circulant pledează la valoare de predictor privind riscul dezvoltării RIS. Pe de altă parte, RN-aza circulantă poate deveni o țintă terapeutică relevantă, modularea ei și, respectiv, a procesului de degradare a eARN, oferind beneficii vizavi de prevenirea complicațiilor cardiovasculare majore după PCI. Tromboza, una din complicații, ar fi de asemenea în conexiune cu eARN la tangența acțiunii acestuia ca un cofactor al activării enzimatice de cascadă a factorilor de coagulare ai fazei de contact a hemostazei [15, 16]. M. Walberer și colab. (2009) au relatat în acest context, că terapia prin RN-ază reduce edemul cerebral și zona de infarct după un *stroke* acut [17].

Acțiunile proaterogenă, protrombotică și proinflamatoare ale eARN nu sunt mediate prin TOL-receptori. Cel puțin TOL-2, TOL-3 și TOL-4 nu sunt implicați în controlul expresiei eARN și promovarea efectelor lui [6, 18]. TOL-receptorii fac parte din familia receptorilor de tip *scavenger* și sunt implicați în patogenia leziunilor inflamatorii și aterosclerotice vasculare prin proprietatea lor de formare a legăturilor cu diferite molecule proinflamatoare (e.g. oxilDL, heat-shock-protein-60, lipopolisaharide ce activează macrofagele etc.).

Datele obținute în acest studiu indică, de asemenea, aderența TNF-alpha la evenimentele ce promovează hiperplazia neointimei, iar corelarea acestei citokine cu eARN sugerează

acțiunea stimulatorie a eARN asupra macrofagelor în vederea augmentării eliberării de TNF- $\alpha$ . Numărul de macrofage sunt într-un raport corelațional cu eARN ( $r = +0,86$ ) practic identic cu coeficientul de corelare ( $r = +0,88$ ) decelat între eARN și TNF- $\alpha$ . Plauzibil de admis, că acumularea macrofagelor în intima pe măsura avansării restenozei se produce în asociere cu creșterea migrării și numărului micocitelor secretoare în zona neointimei, care pot în condițiile disfuncției endoteliale, stresului oxidativ și inflamației, deveni o sursă de eliberare a eARN. Acesta din urmă susține injuriile vasculare și remodelarea coronariană negativă prin activarea macrofagelor ce rezultă în formarea excesivă a citokinelor proinflamatoare. Rolul TNF- $\alpha$  în dezvoltarea restenozei intrastent după angioplastie este coroborat și de alți autori [19, 20]. Reducerea eARN prin administrarea RN-azei poate fi o abordare terapeutică a atenuării răspunsului inflamator și a riscului restenozei intrastent.

### Concluzii

1. La pacienții cu restenoză intrastent după PCI s-a constatat în premieră majorarea cantității eARN în peretele arterei coronariene, creșterea acesteia, îndeosebi marcată în media musculară, fiind în corelare strânsă cu gradul restenozei.

2. Aportul patogenetic al eARN privind evoluția RIS este sugerat prin prezența unei corelări directe de intensitate înaltă ( $r > +0,88$ ) între eARN și, pe de altă parte, cantitatea de TNF- $\alpha$  și numărul macrofagelor în neointimă, acesta din urmă elevând în proporție directă cu severitatea RIS.

3. Valoarea cantitativă majorată a eARN, inclusiv nivelul lui circulant, poate fi un predictor al riscului RIS, iar administrarea RN-azei rezultantă în activarea degradării eARN poate fi sugerată drept un mijloc de prevenire a restenozei intrastent. Necesitatea studiilor în acest sens este inteligibilă.

### References

1. Bennett MR. In-stent restenosis: pathology and implication for the development of drug eluting stents. *Heart*. 2003;89(2):218-224.
2. Kibos A, Campeanu A, Tintoi I. Pathophysiology of coronary artery in-stent restenosis. *Acute Card. Care*. 2007;9(2):111-119.
3. Chang C, Ong E. Coronary restenosis. *Acta Cardiol. Sin*. 2005;21:177-189.
4. Popovici I. The role of micro-RNA 143/145 in the in-stent restenosis evolution. *Cardiologia [Cardiology]*. 2011;9:17-21.

5. Popovici I, Popovici M, Costin S, et al. Predictors of neointima hyperplasia in in-stent restenosis. ESC Congress of Cardiology. 2012;abstr.68732.
6. Kostin S, Meiler S, Simsekylmaz S, et al. The role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation*. 2013. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002562.
7. Fischer S, Grantzow T, Pagel JI, et al. Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thromb Haemost*. 2012;108:730-741.
8. Kern MJ. Persistent endothelial dysfunction after drug-eluting stents. *J. Am. Coll. Cardiol. Interv*. 2008;1:72-73.
9. Dosh K, Berger P, Marso S, et al. Relationship between baseline inflammatory markers, antiplatelet therapy, and adverse cardiac events after percutaneous coronary intervention: an analysis from the clopidogrel for the reduction of events during the observation trial. *Circ. Cardiovasc. Interv*. 2009;2:503-521.
10. Gomes E, Buffolo E. Coronary stenting and inflammation: implications for further surgical and medical treatment. *Ann. Thoracic Surgery*. 2006;81(5):1918-1925.
11. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002;106:1523-1529.
12. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood*. 2007;110:2457-2465.
13. Manka DR, Wiegman P, Din S, et al. Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res*. 1999;36:372-378.
14. Lucerna M, Zerneck A, de Nooijer R, et al. Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in apoE knock-out mice by promoting *de novo* leukocyte recruitment. *Blood*. 2007;109:122-129.
15. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2007;104:6388-6393.
16. Fischer S, Preissner KT. Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system. *Mediators of defence and disease. Hamostaseology*. 2013;33:37-42.
17. Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, et al. RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Curr. Neurovasc. Res*. 2009;6:12-19.
18. Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, et al. Characterization of mRNA and micro RNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *J. Extracell Vesicles*. 2012;1-12.
19. Monraats P, Pires N, Schepers A, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  plays an important role in restenosis development. *FASEB*. 2005;19(14):1998-2004.
20. Pesarini G, Amoroso A, Ferrero V, et al. Cytokines release inhibition from activated monocytes and reduction of in-stent neointimal growth in humans. *Atherosclerosis*. 2010;211(1):242-248.

