

CZU: 616.12-092-07

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2024.1-78.17>

MICROVEZICULELE DERIVATE DIN TROMBOCITE ÎN BOLILE CARDIOVASCULARE

¹Tatiana CARAGEA, doctorand, cercetător științific;¹Mihaela IVANOV, dr.șt.med.;¹Lucia CIOBANU, dr.hab.șt.med.,conf.cercetător;¹Valeriu COBEȚ, dr.hab.șt.med., prof.univ.,^{1,2}Mihail POPOVICI, dr.hab.șt.med.,prof.univ.,academician al AȘM;¹Olga DICUSAR, doctorand, cercetător științific;¹Dumitru TĂRÎȚĂ, cercetător științific.¹IMSP Institutul de Cardiologie

Laboratorul științific de cardiologie intervențională

²Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”e-mail: t.bindiu@gmail.com

Rezumat.

Veziurile extracelulare (EV) sunt o familie de particule/vezicule prezente în sânge și fluide corporale, delimitate de un strat dublu lipidic și care nu se pot replica, adică nu conțin un nucleu funcțional. Acestea poartă o varietate de molecule importante în medierea comunicării celulare, modulând astfel procese celulare cruciale, cum ar fi homeostazia, inducerea/atenuarea inflamației și promovarea reparației. [1]

Existența lor, suspectată inițial în 1946 și confirmată în 1967, a determinat o creștere bruscă a numărului de publicații științifice, a interesului pentru EV și aplicațiile lor potențiale în înțelegerea mecanismelor care stau la baza diferitelor boli, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, metabolice, neurologice și infecțioase, printre altele, care au dezvăluit un rol pentru EV ca biomarkeri candidați promițători pentru diagnostic, prognostic și chiar instrumente terapeutice, în bolile cardiovasculare (CV) și alte boli [2].

Populația veziculelor derivate din trombocite (pEV) este cea mai mare printre alte tipuri de EV din circulație.

Caracteristicile fizice ale membranei celulare și încărcătura biologică definesc rolul pivot al veziculelor derivate din trombocite în patogeneza bolilor cardiovasculare (CV).

pEV-urile sunt, așadar, jucători cheie în medierea reacțiilor inflamatorii și de coagulare care implică endoteliul, trombocitele, celulele musculare netede și celulele inflamatorii și contribuie astfel la dezvoltarea aterosclerozei și angiogenezei, dereglării microcirculației coronariene în contiguitate cu disfuncția endotelială [3]. În plus, EV joacă un rol esențial în repararea țesuturilor, angiogeneză și neovascularizare prin cascade de semnalizare intracelulară. De fapt, EV-urile mediază semnale autocrine și paracrine care sunt capabile să reconstruiască micro-mediul homeostatic din inimă și vase [4].

Această revizuire își propune să ofere o scurtă privire de ansamblu asupra biogenezei, caracteristicilor microparticulelor plachetare cu un accent special pe implicarea lor în bolile cardiovasculare, dar, mai ales, pe legătura dintre tromboză, disfuncție endotelială și inflamație. Tot aici trecem în revistă experimentele timpurii, rezumăm constatările cheie care au propulsat domeniul, descriem creșterea unei comunități organizate de EV și discutăm starea actuală a domeniului.

Cuvinte cheie: vezicule extracelulare derivate din trombocite, disfuncție endotelială, inflamație, tromboză.

Summary. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases.

Extracellular vesicles (EVs) are a family of particles/vesicles present in blood and body fluids, bounded by a lipid dual-layer and non-replicable. They do not contain a functional core and carry a variety of molecules important in mediating cellular communication, thereby modulating crucial cellular processes such as homeostasis, induction/attenuation of inflammation, and support of cellular repair.

Their existence, initially suspected in 1946 and confirmed in 1967, led to a sudden increase in the number of scientific publications, given their potential significance in understanding the mechanisms underlying various diseases, such as cancer, cardiovascular, metabolic, neurological diseases and infectious. These researches revealed a role for EVs as promising candidate biomarkers for diagnosis, prognosis, and even therapeutic purposes.

The population of platelet-derived vesicles (pEVs) is the largest among other types of circulating EVs.

Cell membrane physical characteristics and biological burden define the pivotal role of platelet-derived vesicles in the pathogenesis of cardiovascular (CV) diseases.

Platelet-derived EVs are, therefore, key players in mediating inflammatory and coagulation reactions involving endotheliocytes, platelets, smooth muscle cells and inflammatory cells and thus contribute to the development of

atherosclerosis and angiogenesis, dysregulation of the coronary microcirculation in contiguity with endothelial dysfunction. In addition, EVs play an essential role in tissue repair, angiogenesis, and neovascularization through intracellular signaling cascades. In fact, EVs mediate autocrine and paracrine signals that are able to rebuild the homeostatic microenvironment in the heart and vessels.

This review aims to provide a brief overview of the biogenesis, characteristics of platelet micro-particles with a special focus on their involvement in cardiovascular disease, but especially on the link between thrombosis, endothelial dysfunction and inflammation.

In addition, here we review early experiments, summarize key findings that propelled the field, describe the growth of an organized EV community, and discuss the current state of the field.

Key words: platelet-derived extracellular vesicles, endothelial dysfunction, inflammation, thrombosis.

Резюме. Тромбоцитные микровезикулы при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой семейство частиц/везикул, присутствующих в крови и жидкостях организма, ограниченных липидным бислоем и нереплицируемых, т. е. они не содержат функционального ядра, неся множество молекул, важных для обеспечения клеточной коммуникации, тем самым модулируя важнейших клеточных процессов, таких как гомеостаз, индукция/ослабление воспаления и содействие восстановлению [1].

Их существование, первоначально заподозренное в 1946 году и подтвержденное в 1967 году, привело к внезапному увеличению количества научных публикаций, учитывая их потенциальную значимость для понимания механизмов, лежащих в основе различных заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые, метаболические, неврологические заболевания и инфекционные заболевания, в том числе другие, которые показали роль ЭВ как многообещающих биомаркеров-кандидатов для диагностики, прогноза и даже терапевтических инструментов [2].

Популяция везикул тромбоцитарного происхождения (ПЭВ) является самой большой среди других типов циркулирующих ВВ.

Физические характеристики клеточных мембран и биологическая нагрузка определяют ключевую роль тромбоцитарных везикул в патогенезе сердечно-сосудистых (СС) заболеваний.

Таким образом, ПЭВ являются ключевыми игроками в опосредовании воспалительных и коагуляционных реакций с участием эндотелиоцитов, тромбоцитов, гладкомышечных клеток и воспалительных клеток и, таким образом, способствуют развитию атеросклероза и ангиогенеза, нарушению регуляции коронарной микроциркуляции в сочетании с эндотелиальной дисфункцией. [3]. Кроме того, ЭВ играют важную роль в восстановлении тканей, ангиогенезе и неоваскуляризации посредством внутриклеточных сигнальных каскадов. Фактически, ЭВ передают аутокринные и паракринные сигналы, которые способны восстанавливать гомеостатическую микросреду в сердце и сосудах [4].

Целью этого обзора является предоставление краткого обзора биогенеза, характеристик микрочастиц тромбоцитов с особым акцентом на их участие в сердечно-сосудистых заболеваниях, но особенно на связи между тромбозом, эндотелиальной дисфункцией и воспалением. Также здесь мы рассматриваем ранние эксперименты, суммируем ключевые результаты, которые способствовали развитию этой области, описываем рост организованного сообщества электромобилей и обсуждаем текущее состояние этой области.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы тромбоцитарного происхождения, эндотелиальная дисфункция, воспаление, тромбоз.

Constatări istorice privind rolul veziculelor extracelulare

Alimentat de importanța lor biologică potențială, vehiculele electrice au fost de un interes din ce în ce mai mare pentru cercetători de peste 50 de ani.[5] Cea mai timpurie observație menită să documenteze activitatea atribuită mai târziu PEV-urilor a fost de către Erwin Chargaff și Randolph West, care au demonstrat că plasma fără trombocite (PFP) era încă capabilă de coagulare [6]. Mai târziu, un studiu realizat de Sinauridze și colaboratorii au arătat o activitate coagulantă superioară trombocitelor în ser, identificată printr-un test de generare a trombinei, dar care nu a fost încă asociată PEV-urilor. Prima observație a particulelor mici care se potrivesc cu descrierea

actuală a EV-urilor a fost făcută de Peter Wolf, în 1967 [6]. El a arătat prin microscopie electronică că această fracțiune este alcătuită din particule derivate din trombocite activate, bogate în fosfolipide, pe care le-a numit „praf de trombocite”. Crawford a arătat, de asemenea, că acestea conțineau lipide și transportau încărcătură, inclusiv ATP și proteine contractile. [7] Respectiv, aceste experimente de pionierat cu trombocite au fost primele care au descris prezența și structura grosieră a unor astfel de componente fără celule și au sugerat repere patogenetice posibile.

În ceea ce privește începutul expansiunii masive a cercetării EV, în articolele care reflectau înțelegerea naturii fundamentale a EV, forma părea să vină înaintea funcției.

Apoi, în anii 1980 și 1990, mai multe articole au raportat cuantificarea EV-urilor, demonstrând modificări cantitative ale EV în diverse patologii. [8]. Fenomenul a început în jurul anului 1993 cu o lucrare despre microparticulele crescute în ischemia cerebrală tranzitorie și alte infarctele [9], dar continuă să fie explorat în boli precum angina pectorală [10] și boala Crohn [11]. Au început să apară, de asemenea, lucrări care descriu caracteristicile fizice și biochimice ale vehiculelor electrice. Vezicularea membranei s-a dovedit a fi un mecanism potențial de protecție pentru a preveni liza celulară [12] și o modalitate de expunere specifică a fosfatidilserinei pentru a îmbunătăți coagularea. De asemenea, a fost dezvăluit că alte enzime active ar putea exista în EV [13]. În afara domeniului biologiei trombocitelor, s-a descoperit că EV din celulele imune sunt capabile să prezinte antigen [14]. Luate împreună, aceste idei conform cărora VE-urile ar putea avea roluri fiziologice, că ar putea fi utilizate ca biomarkeri și că ar putea avea aplicații terapeutice, au condus la explozia interesului pentru EV la începutul secolului XXI.

Astfel, în deceniul următor anului 2000 au început să fie publicate primele recenzii în domeniul biologiei EV. Comunitatea din ce în ce mai mare de cercetători a început să exploreze natura EV-urilor în profunzime, investigând proteomul EV-urilor din diferite tipuri de celule [15], precum și lipidomul. [16]. S-a demonstrat că citokinele sunt eliminate prin intermediul EV-urilor, contribuind astfel la funcționarea sistemului imunitar. [17] Interesul crescut pentru EV-uri derivate din tumori, combinat cu noile cunoștințe despre rolul EV-urilor în sistemul imunitar, a pus lumina asupra potențialului lor rol ca terapie antitumorală. [18]. Pe măsură ce deceniul se sfârșește, a început expansiunea reală a cercetării EV în vivo. A fost demonstrat transferul funcțional al acizilor nucleici și a fost publicat, de asemenea, un raport conform căruia celulele vegetale pot folosi EV-urile ca mijloc de comunicare [19]. Interesul crescut pentru terapia bazată pe EV a fost îmbinat cu interesul în creștere pentru celulele stem ca terapie, iar 2009 a văzut apariția unei multitudini de lucrări despre veziculele derivate din celulele stem mezenchimale (MSC) [20], crescând și mai mult oportunitățile terapeutice oferite de EV [8].

Din 2010 până astăzi, extinderea domeniului a fost enormă. S-a demonstrat că EV-urile sunt implicate în numeroase procese biologice la nivelul multor specii și contribuie la o multitudine de boli atunci când sunt dereglate. La începutul anilor 2000 au avut loc și primele întâlniri tematice organizate, iar întâlnirile regulate ale Societății Internaționale pentru Vezicule Extracelulare (ISEV) înființată în

2011, au acum mii de participanți care lucrează într-o multitudine de discipline din întreaga lume. Acestea au jucat un rol important în a ajuta la colectarea și concentrarea eforturilor din domeniu. Acest lucru este probabil cel mai bine exemplificat de publicarea ghidurilor „Minimal Information for Studies of EVs” (MISEV) în 2014, care a fost revizuită mai recent, în 2018 [8] [21].

Ajunși în acest punct, cercetarile recente ale veziculelor extracelulare (EV) au condus la o reimaginare a ideii unui semnal secretat. Înțelegerea noastră despre comunicarea dintre celule, țesuturi și organe se schimbă radical datorită posibilității ca microveziculele, care sunt mici vezicule extracelulare eliberate de celule, să livreze ARN, proteine, lipide și organite.

Tipul veziculelor extracelulare

În acord cu orientările privind informații minime pentru studiile veziculelor extracelulare (“MISEV”) propuse în 2018 de către Societatea Internațională pentru Vezicule Extracelulare (ISEV), „veziculă extracelulară” (EV) este recunoscut ca termen generic pentru particulele eliberate în mod natural din celulă care sunt delimitate de un strat dublu lipidic și nu se pot replica, adică nu conțin un nucleu funcțional [21].

Prin urmare, EV-urile sunt vezicule submicronice (dimensiuni între 10 nm și 1 μm) eliberate în mediul extracelular (plasmă, urină, salivă, lichid cefalorahidian) de majoritatea tipurilor de celule [22]. Există mai multe subtipuri de vehicule electrice și pot fi clasificate în funcție de origine, dimensiune, conținut și biogeneza. Detaliind, au fost identificate patru subtipuri majore de EV: exozomi (30-150 nm); ectozomi (100-1000 nm); corpuri apoptotice (50-5000 nm) și microveziculele mediate de proteina 1 care conțin domeniul Arrestin (ARRDC1, 40-100 nm) [23] [24]. O descriere detaliată a ectozomilor, corpurilor apoptotice și ARRDC1 depășește domeniul de aplicare al acestui articol [22] [25].

Deoarece nu a apărut încă un consens asupra markerilor specifici ai subtipurilor de EV, cum ar fi „exozomii” de origine endozomală și „ectozomii” derivați de membrana plasmatică (microparticule/microvezicule), alocarea unui EV unei anumite căi de biogeneza rămâne extraordinar de dificilă, cu excepția cazului în care, EV-ul este surprins în actul eliberării prin tehnici de imagistică în direct. Prin urmare, cu excepția cazului în care autorii pot stabili markeri specifici de origine subcelulară, autorii sunt îndemnați să ia în considerare utilizarea termenilor operaționali pentru subtipurile de VE care se referă la caracteristicile fizice ale VE, cum ar fi dimensiunea (mica cu intervale definite, de exemplu, < 100 nm sau

< 200 nm sau mari și/sau mediu cu interval > 200 nm) sau densitate (scăzut, mediu, ridicat), compoziție biochimică (EV-uri CD63+/CD81+/-, EV-uri colorate cu anexină A5 etc.); sau descrieri ale condițiilor sau ale celulei de origine (EV-uri podocite, EV-uri hipoxice, oncozomi mari, corpi apoptotici) în locul termenilor precum exozom și microveziculă care sunt împovărați istoric atât de definiții multiple, contradictorii, cât și de date inexacte asupra biogenezei [21].

În cele din urmă, exozomii sunt cel mai mic tip de EV, formarea lor necesită o înmugurire a membranei plasmatică în interior, rezultând vezicule intraluminal care se acumulează în corpuri multiveziculare care pot fi fie degradate de lizozom, fie fuzionează cu membrana plasmatică fiind secretate ulterior în spațiul extracelular prin exocitoză. Exozomii au o morfologie asemănătoare cupei și afișează markeri specifici, inclusiv LAMP, Alix, CD81, CD9 și CD63 (tetraspanine). [25]. EV-urile pot proveni din celule diferite în timpul transformării celulare fiziologice, ca răspuns la stres, leziune, activare celulară sau apoptoză. În funcție de celula din care provin, EV-urile au compoziții antigenice diferite, deoarece rețin markerii de suprafață ai celulei parentale și, prin urmare, EV-urile circulante pot fi identificate ca vezicule extracelulare plachetare (pEV), vezicule extracelulare endoteliale (eEV), vezicule extracelulare leucocitare (LeuEV) și vezicule extracelulare eritrocitare (ErEV). [26].

Baza biogenezei EV-urilor este translocarea exoplasmatica a membranei citoplasmatică (PM). Cele două prospecte ale PM au o compoziție diferită, fosfatidiletanolamină și fosfatidilserina (PS) (fosfolipide anionice) de preferință pe prospectul interior și fosfatidilcolină și sfingomielină (fosfolipide neîncărcate) pe prospectul extern [27]. Distribuția asimetrică a fosfolipidelor este menținută de transportoare de fosfolipide dependente de ATP. În timpul activării sau leziunii celulare, calciul intracelular crește, acumularea de calciu activează enzimele citosolice și induce dezasamblarea și degradarea citoscheletului cu pierderea asimetriei membranei ulterioare, provocând externalizarea PS încărcat negativ din stratul interior care conduce la întreruperea membranei și eliminarea EV-urilor [28].

Vizavi de eliberarea EV-urilor, acesta este un proces extrem de reglementat condus de diferiți stimuli, cum ar fi citokine inflamatorii, agenți infecțioși, lipoproteine, stres oxidativ, mediatori de coagulare, hipoxie sau stres de forfecare [25] [29]. EV-urile sunt „încărcate” cu biomarkerii lor specifici de suprafață parentală care conferă proprietăți biologice distincte și pot fi utilizați pentru caracterizarea lor. Încărcătura lor luminală conține proteine și acizi

nucleici sub formă de microARN (miARN), care s-ar putea transfera în cele din urmă la celulele primitoare, funcționând ca vehicule de transport pentru livrarea macromoleculilor. În plus, miARN-urile pot regla expresia unor gene specifice. EV-urile sunt implicate în multiple procese biologice, cum ar fi coagularea, inflamația, metastazarea, modularea răspunsului imun, stimularea angiogenezei, creșterea tonusului vascular, reglarea relaxării vasculare și formarea radicalilor liberi. S-a sugerat că efectele biologice ale EV pot fi determinate de fracțiile lor lipidice sau proteice prin activarea receptorilor liganzi specifici, stimularea directă a celulelor sau transferul receptorilor de suprafață sau moleculelor bioactive (lipide, acid arahidonic) conducând la modularea răspunsurilor biologice. Nivelurile vehiculelor electrice nu depind doar de formarea lor, ci și de clearance. Au fost propuse diverse mecanisme de preluare și internalizare a vehiculelor electrice, cea mai acceptată până în prezent fiind fagocitoza. Aceste mecanisme au o relevanță deosebită în medierea comunicării celulă-celulă și în livrarea mărfurilor [30].

În altă ordine de idei, revenind la aspectele practice, purificarea absolută sau izolarea completă a EV-urilor de alte entități este considerat un obiectiv nerealist. În mod obișnuit, o activitate asociată EV este explorată prin: separarea și concentrarea EV-urilor dintr-un mediu de cultură biofluid sau celulară, aplicarea EV-urilor la o celulă sau un organism receptor și observarea unui fenotip de citire. La sfârșitul anului 2015, conform unui sondaj ISEV la nivel mondial, ultracentrifugarea diferențială a fost cea mai utilizată tehnică primară de separare și concentrare a EV, cu diverse alte tehnici, cum ar fi precipitarea, filtrarea, cromatografia și imunoizolarea [21].

Vezicule extracelulare plachetare (pEV)

Veziculele derivate din trombocite sunt cea mai abundentă fracțiune de EV în sânge și reprezintă ~70-90% din toate EV-urile circulante. Specialiștii se pun de acord ca pEV-urile ar putea juca un rol crucial în tromboză și coagulare și în alte procese fiziologice, cum ar fi în imunitate și inflamație, prin legarea și activarea leucocitelor, sau prin comunicare intercelulară (prin livrarea de molecule bioactive și interacțiunea celulă la celulă). Eliberarea lor poate fi promovată prin coagulare, agregarea cronică a trombocitelor, mediatori proinflamatori (complexul de atac al membranei C5b-9, ligand CD40 solubil, lipopolizaharidă și citokine), stresul de forfecare și hipoxie [28].

pEV-urile au o capacitate procoagulantă puternică, ne demonstrează, un studiu timpuriu, care

a raportat o activitate procoagulantă de 50-100 de ori mai mare atribuită EV-urilor decât trombocitelor activate [31]. Această proprietate se datorează, vom observa, densității de suprafață mai mari a integrinei B (CD61) și P-selectinei și externalizării fosfatidilserinei (PS) care permite legarea acestora cu proteinele și enzimele de coagulare, facilitând formarea complexului de coagulare și promovând activarea factorului tisular (TF) [32]. PEV-urile susțin, de asemenea, generarea de trombina, acestea afișează TF, (receptori pentru factorii de coagulare VIII și Va) și fosfolipidele anionice pe suprafața lor, care funcționează ca procoagulante.

Mai mult ca atât, pEV-urile pot facilita aterogeneza, îmbunătăți expresia moleculelor de adeziune celulară, promova proliferarea celulelor musculare netede, stimula inflamația (prin activarea celulelor endoteliale și îmbunătățirea răspunsului la citokine), determina, de asemenea recrutarea trombocitelor în subendoteliul lezat, recrutarea leucocitelor, modularea interacțiunii monocite-endoteliu, se atașează de neutrofile cu activarea ulterioară și declanșarea aderenței acestora la peretele endotelial [33] [34]. În ultimele decenii, căutarea de noi biomarkeri biologici care să reflecte în mod obiectiv procesele fiziologice și patologice a fost o țintă majoră de cercetare. Recent, interesul major s-a concentrat asupra rolului potențial al veziculelor extracelulare, în acest sens. Există tot mai multe dovezi care sugerează o asociere între EV și boala cardiovasculară. Creșterea EV circulante a fost legată de diferite afecțiuni clinice care influențează integritatea vasculară, funcția endotelială, inflamația și tromboza, cum ar fi hipertensiunea arterială, ateroscleroza, insuficiența cardiacă și altele [35] [29]. O înțelegere suplimentară a utilizării și manipulării pEV va duce la un diagnostic și prognostic îmbunătățit al bolilor CV.

Implicarea microveziculele derivate din trombocite în ateroscleroză și aterotromboză

Ateroscleroza este o boală inflamatorie sistemică care poate avea o progresie asimptomatică lentă timp de câteva decenii. Leziunile endoteliale și inflamația peretelui vascular joacă un rol important în progresia aterosclerozei și a bolii coronariene (CAD) [36] [37].

Mai multe studii, cu diferite obiective clinice, au subliniat asocierea nivelurilor circulante crescute atât ale eEV-urilor cât și ale pEV-urilor cu boala coronariană, ceea ce ne pune în lumină relația dintre afectarea endotelială, activarea trombocitelor și hipercoagulabilitatea prezente în această afecțiune [38]. Se crede că EV-urile participă pe tot parcursul procesului aterogen, deoarece veziculele au fost găsite atât în plăcile în curs de dezvoltare, cât și în

cele avansate. În contextul aterosclerozei, stresul de forfecare hemodinamic crescut din cauza stenozei luminale asociate plăcii, precum și acumularea de lipoproteine oxidate de densitate joasă pot activa trombocitele și pot stimula generarea de pEV proinflamatorii.

pEV-urile, împreună cu microveziculele endoteliale, cresc permeabilitatea endotelială, influențând astfel disfuncția endotelială vasculară, un pas timpuriu în dezvoltarea aterosclerozei. Prezența P-selectinei exprimată de pEV le permite să interacționeze cu leucocitele prin intermediul ligandului GP-1 de P-selectină, facilitând astfel acumularea leucocitelor la locul leziunii endoteliale și sporind infiltrarea acestora în intimă. În plus, veziculele derivate din trombocite pot determina eliberarea citokinelor inflamatorii leucocitare, cum ar fi interleukina (IL)-1 β , IL-6, IL-17, interferon-gamma, factorul de necroză tumorală (TNF)-alfa, proteina chemoattractantă a monocitelor-1 și metaloproteinaza matriceală (MMP)-6, MMP-9, care promovează inflamația endotelială, lezarea integrității vasculare și disfuncția endotelială [39]. Există date care clarifică faptul că veziculele derivate din trombocite pot sprijini diferențierea celulelor T cu fenotip reglator în celule T cu fenotip proinflamator. Mai mult, PEV-urile încapsulează caspaza-3 activă care poate induce apoptoza macrofagelor. Ca o consecință, în ateroscleroză, lipidele derivate din macrofagele moarte se pot acumula și pot contribui la formarea miezului necrotic. În plus, s-a demonstrat că PEV-urile stimulează celulele musculare netede, ducând la migrarea mușchilor netezi din medii în intima, sporind astfel progresia leziunii.

Trebuie avută în vedere că creșterea numărului de microvezicule trombocitare se corelează cu mai mulți parametri, inclusiv grosimea intima medie a arterei carotide, plăcile aterosclerotice bogate în lipide și încărcatura plăcii [40]. Se pare că nivelurile și subtipurile de EV eliberate în CAD depind și de prezentarea clinică și angiografică (leziune cu risc mare sau scăzut, prezența trombozei, artera coronară afectată). Aceste modele pot reflecta mecanismele fiziopatologice care apar în timpul diferitelor tipuri de sindroame coronariene (infarct miocardic, angină instabilă sau angină stabilă) în ceea ce privește afectarea endotelială și trombocitară, sugerând că EV-urile pot fi utile pentru a discrimina ischemia acută de alte forme [4]. Luând în considerare compoziția și stabilitatea plăcii, gradul de hipoxie, inflamație și tromboză, Cui et al. a găsit o corelație statistică între IL-6, proteina C reactivă, pEV-uri și eEV-uri la pacienții cu CAD, subliniind importanța inflamației în acest cadru clinic [41] [39].

Cel mai important, nivelurile circulante ale EV au fost, de asemenea, corelate cu rezultate clinice mai proaste. Pacienții care s-au prezentat ulterior cu un eveniment advers cardiovascular major au avut niveluri circulante mai mari de eEV la momentul inițial decât pacienții fără eveniment [36] [42].

Vedem de asemenea, un număr crescut de pEV raportat și în rândul pacienților cu boală arterială periferică și corelat cu severitatea acesteia, evidențiind asocierea EV cu boala arterială [43]. O proporție substanțială de pacienți cu CAD va dezvolta ulterior insuficiență cardiacă (IC) [44]. Aceste studii sugerează că ar putea exista o oportunitate ca EV-urile să contribuie la o stratificare mai precisă a riscului la pacienții cu boală arterială.

Luate împreună, aceste date sugerează că PEV-urile detectate la pacienții cu CAD pot de asemenea să acționeze ca reporteri ai inflamației vasculare, obstrucției microvasculare și leziunilor miocardice în bolile cardiovasculare.

Sindromul coronarian acut (SCA) și microveziculele derivate din trombocite

Niveluri circulante elevate ale pEV-urilor au fost decelate la pacienții cu SCA, acestea fiind în raport direct cu nivelul enzimelor de leziune a cardiomiocitelor (ex. troponine, MB- creatinkinaza), precum și cu conținutul seric al markerilor inflamației, cum ar fi IL-6, TNF- α și CRP [45] [46] [47]. Remarcabil, pEV corelează cu suprafața zonei de infarct a miocardului la pacienții cu STEMI, rămânând majorate în plasmă și la distanța de 4 ani în asociere cu markerii disfuncției hemostazei și inflamației, demonstrând astfel aportul lor patogenetic și în procesele de remodelare post-infarct a miocardului și evoluției IC [48]. Este întemeiată coroborarea opiniei privind rolul pEV în patogenia leziunii inflamatorii și disfuncției endoteliale, dat fiind faptul că conțin monomeri de CRP care declanșează și susțin dereglarea microcirculației coronariene în baza interfeței ce angrenează inflamația și statusul pro-trombotic activat [49]. Totodată, pEV sunt implicate ca factor trigger al instalării fenotipului inflamator al arterelor coronare în primele 48 ore de la debutul IMA, efect ce se datorează transferului de mediatori ai inflamației și stresului oxidativ endotelocitelor care expresează sub acțiunea citokienilor inflamatoare selectina P ca ligand pentru selectina P a plachetelor [50]. Q.Leng et al (2022) menționează în acest context că pEV sunt cariere fezabile ai diferitor genuri de micro-RNA (eg, mRNA-208,143,145), care au impact negativ asupra endotelului coronarian, reactivității coronariene, inflamației endoteliale și a miocardului care determină un risc notabil al SCA [51].

Microparticulele plachetare sunt analizate la pacienții cu SCA în paralel cu microparticulele endoteliale pentru a determina care este interrelația lor patogenetică, precum și valoarea prognostică. Mai multe studii realizate în acest sens evidențiază o corelație directă între acești markeri, dar microparticulele endoteliale elevează în sânge mai concludent după revascularizare, spre deosebire de pEV care au un nivel ridicat constant periprocedural [52] [53]. Angioplastia coronariană percutană (PCI), vizată în contextul impactului ei traumatic asupra endotelului coronarian conduce la leziunea endotelocitelor, fapt ce lămurește elevarea microparticulelor endoteliale după PCI. Pe de altă parte se poate concluziona că injuria endotelială nu ar fi un mecanism notabil de creștere a nivelului circulant al pEV, deși ambii factori acționează sinergic și în manieră de potențare reciprocă asupra disfuncției endoteliale și evoluției SCA. Prin urmare impactul pro-trombotic al pEV este augmentat de leziunea endotelială accentuată după angioplastie, fapt ce poate explica o rată înaltă, dar relativ similară, a complicațiilor cardiace (re-infarctul, decesul cardiac) la pacienții cu STEMI și NSTEMI la distanța de 1 an. Mai mult, nivelurile circulante ale pEV nu diferă semnificativ la pacienții cu STEMI și NSTEMI, fapt ce justifică, totodată, și rolul lor patogenetic în evoluția post-infarct, în primul rând, privind riscul MACE [54] [55] [56]. În acest aspect este inteligibilă necesitatea evaluării pEV cu scop de predicție a prognozei MACE și corectare a tratamentului post-infarct la pacienții cu STEMI și NSTEMI.

K. Supriami et. al (2022) indică o corelare strânsă între nivelul LDL și conținutul plasmatic al pEV la pacienții cu IMA, fapt ce evidențiază o fațetă patogenetică deosebită a rolului LDL în patogenia SCA [57]. Autorii sugerează importanța estimării pEV-urilor la persoanele cu valori elevate ale LDL în vederea predicției riscului de evoluție a SCA.

În plan patogenetic excesul de pEV este apreciat drept un factor de potențare a adeziunii și agregării plachetelor pe fundalul leziunii endoteliale în contextul formării trombilor coronarieni, de declanșare a răspunsului inflamator, inclusiv prin adeziunea lor la leucocite ce rezultă în eliberarea de citokine pro-inflamatoare și radicali liberi de oxigen cu riscul de destabilizare a plăcii aterogene și declanșarea SCA [58], [59]. Aportul lor patogenetic vizavi de SCA trebuie să fie apreciat în context cu excesul de LDL, microparticulele endoteliale, ca un marker al leziunii endoteliale, precum și cu markerii inflamației.

La pacienții cu angină pectorală stabilă nivelul plasmatic al pEV este semnificativ majorat față de

markerul control, dar, totuși, subiacent nivelului constatat la pacienții cu STEMI și NSTEMI. Aportul lor patogenetic este mult mai puțin elucidat, în special la pacienții cu boala coronariană cronică non-obstructivă.

Microveziculele derivate din trombocite în boala coronariană cronică non-obstructivă

Lipsa dovezilor disponibile în sprijinul implicării PEV în boala coronariană cronică non-obstructivă nu ar trebui să subestimeze utilitatea studierii lor, având în vedere rolul microveziculelor derivate din trombocite în patogeniza bolii CV.

Disfuncția microvasculară coronariană (CMD) este una dintre principalele cauze de ischemie cu boală coronariană neobstructivă (INOCA) [60]. Se știe că un spectru larg de agenți și factori de risc cardiovascular, cum ar fi bolile cronice, diabetul, sindromul metabolic, fumatul și forțele hemodinamice pot perturba homeostazia celulelor endoteliale și astfel pot determina CMD [60] [61]. Mai cu seamă, disfuncția endotelială se bazează pe patru piloni principali: inflamația, activarea trombocitelor, forțele hemodinamice și disfuncția autonomă.

Conștientizarea rolului EV derivate din trombocite drept o cale majoră de transducție a semnalului în condiții patologice, inclusiv inflamație, ateroscleroză și angiogeneză, pare necesară în sublinierea importanței acestora ca contribuitori suplimentari la dezvoltarea atât a aterosclerozei, cât și a disfuncției endoteliale. Mecanismele care dezvăluie implicarea EV-urilor derivate din trombocite în patogeniza disfuncției endoteliale includ acțiunea inflamatorie prin secreția citokinelor proinflamatorii și efectul procoagulant.

CMD este cel mai frecvent evaluat prin măsurarea rezervei de flux coronarian CFR, un raport dintre fluxul hiperemic maxim prin circulația coronariană și fluxul de repaus. În acest sens, studiul PROFLOW care a investigat legătura dintre rezerva de flux coronarian (CFR), un parametru clinic de prognostic care reflectă fluxul sanguin în inimă, cu nivelurile de EV și încărcătura acestora, în plasma pacienților cu boli cardiovasculare. Dovezile au arătat o corelație negativă între concentrația EV și nivelurile mai multor biomarkeri proteomici și valorile CFR. Nivelurile plachetare și endoteliale EV au fost semnificativ crescute în plasmă din grupul CFR scăzut [62].

Mai multe studii in vitro și in vivo sugerează că EV-urile, dincolo de rolul lor ca biomarkeri ai funcției endoteliale afectate, pot interacționa direct cu endoteliul și pot juca un rol central în promovarea disfuncției celulare. În ciuda heterogenității semnificative atât în condițiile de tratament celular,

cât și în protocoalele de izolare, s-a demonstrat în mod constant prin studii in vitro că, în condiții patologice, EV afectează vasorelaxarea prin reducerea biodisponibilității NO, inhibarea eNOS (NO-sintaza endotelială) și activarea semnalizării ERK (kinaza reglată de semnal extracelular) [63]. Concentrația ridicată de glucoză și AngII cresc în mod semnificativ efectul dăunător al EV-urilor derivate din endoteliu și trombocite asupra funcției endoteliale, iar stimulii lor combinați au demonstrat un efect sinergic asupra celulelor endoteliale primare. În mod similar, factorii de stres al reticulului endoplasmatic (care imită efectul rezistenței la insulină și al glucozei ridicate asupra reticulului endoplasmatic) stimulează eliberarea de EV plachetare și endoteliale, care reduc producția de NO în celulele receptoare endoteliale [64]. De asemenea, studiile care investighează efectele EV circulante umane asupra funcției endoteliale au subliniat importanța comorbidităților în determinarea proprietăților EV in vitro. Conform datelor, eliberarea EV de la pacienții cu sindrom metabolic reduce biodisponibilitatea NO prin fosforilarea eNOS în celulele endoteliale. În mod similar, la pacienții cu boală renală cronică (CKD) EV circulante reduc vasorelaxarea mediata de acetilcolină [64].

Dincolo de utilitatea diagnostică a EV-urilor demonstrate in vitro, prin promovarea stresului oxidativ, cu un rol critic în disfuncția endotelială, au fost studiate pe larg și efectele EV-urilor derivate din trombocite asupra diferitelor etape ale inflamației vasculare. EV-urile circulante eliberate din diferite tipuri de celule, inclusiv trombocite pot modula interacțiunea leucocite-endoteliu și pot participa activ la răspunsul inflamator vascular, prin mecanisme diverse și cu mai multe fațete, inclusiv transferul miARN, proteinelor sau fosfolipidelor către celulele țintă. Cele mai multe dintre rapoartele științifice disponibile se concentrează pe EV eliberate de monocite, neutrofile și trombocite care par să acționeze ca mediatori ai inflamației vasculare la diferite niveluri, inclusiv activarea endotelială, aderența leucocitelor și diapedeză [65].

În concluzie, mai mulți stimuli proinflamatori și factori destres pot modifica încărcăturile și proprietățile biologice ale vehiculelor electrice care acționează în mod autocrin, paracrin și endocrin, reglând etapele multiple ale inflamației vasculare. Deși efectele EV eliberate de diferite tipuri de celule au fost investigate în studii de cultură celulară multiple, studiile cu EV umane sunt în prezent limitate. Cercetările viitoare ar trebui să exploreze efectele unor condiții patologice și boli specifice în modelele animale pentru a înțelege mai bine potențialul diagnostic și terapeutic al descoperirilor in vitro.

Implicarea veziculelor plachetare în hipertensiunea arterială

Hipertensiunea arterială (HTA) este considerată o afecțiune multifactorială, în mod tradițional caracterizată printr-o combinație de inflamație cronică și stres de forfecare care promovează o stare pro-trombotică, așa cum o relevă riscul crescut de complicații trombotice majore, cum ar fi accidentul vascular cerebral, infarctul miocardic și decesul cardiovascular [66]. În general, disfuncția endotelială și rigidizarea arterială joacă un rol important în patogeneza hipertensiunii arteriale, reprezintă semnele distinctive ale leziunii vasculare hipertensive și constituie un factor de risc independent pentru evenimente vasculare [67].

Degajând mecanismele fiziopatologice, microveziculele endoteliale (eEV) și derivate din trombocite (pEV) au fost relațate ca regulatori potenți ai comunicării intercelulare cu efecte biologice semnificative în homeostazia vasculară [68]. Mai mult decât atât, activarea trombocitelor este obișnuită pentru hipertensiunea arterială și este asociată cu creșterea numărului circulant al veziculelor plachetare cu o expresie îmbogățită a fosfatidilserinei, care indică o activitate pro-coagulantă. S-a postulat, mai cu seamă, că activarea trombocitelor la pacienții cu hipertensiune arterială necontrolată este în principal rezultatul forței de forfecare crescute, inflamației sistemice de grad scăzut și activării simpatice [69].

În concordanță cu elementele patogenetice sugerate, mai multe studii au investigat modul în care eliberarea veziculelor extracelulare în circulație este legată de hipertensiunea arterială și disfuncția endotelială. Datele obținute de Wang și colab. au aratat că eEV-urile și pEV-urile au fost semnificativ mai mari în cazul pacienților hipertensivi necontrolați, comparativ cu subiecții hipertensivi bine controlați și martorii sănătoși. În plus față de asta, aceștia au relatat că valorile vitezei unde pulsului gleznă-braț sunt corelate cu nivelurile circulante ale eEV, susținând astfel o potențială asociere între rigiditatea arterială și funcția endotelială. Similar, un alt studiu realizat de Preston et al. a raportat că atât eEV-urile, cât și pEV-urile au fost semnificativ crescute la pacienții cu hipertensiune arterială severă, comparativ cu hipertensiune arterială ușoară și martorii sănătoși și că atât eEV-urile, cât și pEV-urile s-au corelat cu nivelul tensiunii arteriale sistolice și diastolice.

Există dovezi că preeclampsia/eclampsia are un impact negativ asupra circulației cerebrale și că acest efect este asociat cu activarea trombocitelor și eliberarea veziculelor derivate din trombocite. [70] Cu toate acestea, femeile care nu sunt însărcinate, în schimb cu factori de risc prezenți pentru preeclampsie/

eclampsie (exces de greutate/obezitate, diabet zaharat, boală reumatică, vasculită sistemică, dislipidemie, anemie) precum și persoanele cu hipertensiune arterială au fost identificate ca având și ele niveluri crescute de EV-uri derivate din trombocite [71] [67].

Deși există o puternică interrelație între disfuncția endotelială în hipertensiune arterială și generarea spontană de vezicule derivate din trombocite, nu este pe deplin înțeles dacă un control strict al tensiunii arteriale se va traduce printr-o scădere semnificativă a agregării trombocitelor și reducerea a numărului de vezicule pro-coagulante provenite din trombocite [72]. Totuși, diminuarea activității pro-coagulante a veziculelor circulante derivate din trombocite a putut fi obținută în timpul terapiei antihipertensive eficiente. [73]. S-a observat că o gamă largă de medicamente antihipertensive, cum ar fi blocanții canalelor de calciu, antagoniștii receptorilor angiotensinei II, inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei, sunt capabile să împiedice procesul de microveziculare și, prin urmare, să reducă numărul circulant de vezicule derivate din trombocite [74] [73].

Totodată, denervarea renală care a reușit să reducă suficient activitatea simpatică la pacienții cu hipertensiune arterială rezistentă a dus la o reducere a activării trombocitelor, o scădere a numărului circulant de vezicule trombocitare în relație apropiată cu nivelurile scăzute ale mai multor markeri inflamatori, cum ar fi factorul de necroză tumorală-alfa, interleukina-1beta și interleukina-12 [69].

Aceste rezultate sugerează importanța evaluării endoteliale întrucât progresia hipertensiunii arteriale implică disfuncția endotelială și remodelarea vasculară, promovând o stare protrombotică, prin urmare. Per total, dovezile științifice susțin faptul că generarea EV derivate din trombocite ar putea reflecta modificări ale stării hemodinamice și ale stresului de forfecare, și poate fi considerat biomarker al disfuncției endoteliale și al activității pro-coagulante, cu rol predictiv în apariția complicațiilor CV, cum ar fi evenimentele aterotrombotice și insuficiența cardiacă. Cu toate acestea, caracteristicile și rolul diagnostic și predictiv al acestui biomarker în hipertensiune arterială nu sunt încă pe deplin înțelese și necesită a fi investigate în studii clinice mari în viitor.

Vezicule derivate din trombocite în fibrilația atrială

La fel ca alte multe patologii, unele dintre care explicate în capitolele anterioare, fibrilația atrială (FA), pare să fie în stransă legătură cu o stare protrombotică asociată cu eliminarea EV de multiple tipuri de celule activate și apoptotice, ca răspuns la stresul de forfecare scăzut sau oscilator, întindere,

frecvența cardiacă ventriculară ridicată, inflamație sistemică de grad scăzut și stresul oxidativ, hemoliză și remodelare cardiacă adversă.

Pornind de la aceasta premisă, nivelul EV-urilor plachetare au fost studiate la pacienții cu FA non-valvulară de către mai mulți cercetători. Siwaponanan, P. și colab. (2019) [75] au raportat că pacienții cu FA non-valvulară au avut niveluri crescute de EV totale cât și niveluri crescute de EV-uri derivate din trombocite și endoteliale în comparație cu martorii sănătoși, chiar și după ajustarea pentru potențiali cofactori. Un element important, prezența FA s-a dovedit a fi un predictor solid al nivelului anexinei V(+) MV, care pare a fi un marker pentru hipercoagulare și un risc crescut atât de tromboză atrială, cât și de tromboembolism sistemic. Totodată, există dovezi pentru faptul că cantitatea de EV derivate din trombocite a fost corelată pozitiv cu diametrul trombului la pacienții cu FA non-valvulară. [75]. Într-un alt studiu, Wang, H. et al. (2020) [76] au stabilit că nivelurile de EV derivate din trombocite la pacienții cu AVC cu risc ridicat conform scorului CHADS2 au fost semnificativ mai mari în comparație cu pacienții cu FA cu risc scăzut până la moderat. În cele din urmă, datele pacienților care au fost incluși în registrul de embolia pulmonară (PERT) au arătat că EV-urile pot fi un indicator predictiv promițător pentru episoadele de tromboembolism pulmonar acut la pacienții non-valvulari cu FA [77], dar semnificația clinică a acestor constatările necesită elucidare în studiile clinice la scară largă.

În cazul pacienților tratați cu ACO, studiile au descoperit că administrarea de rivaroxaban a fost asociată cu o creștere a numărului circulant de pEV, concentrația plasmatică de vârf a medicamentului fiind corelată cu cantitatea de pEV. În confirmarea acestor constatări, Lenart-Migdalska, A. et al. (2020) [78] [79] au raportat că administrarea de dabigatran a fost asociată cu creșterea nivelurilor circulante de EV-uri derivate din trombocite (CD42b) la pacienții cu FA. Similar, studiul lui Duarte, R. et al. (2021) [80] a arătat că pacienții cu FA non-valvulară supuși tratamentului cu warfarină sau rivaroxaban au avut niveluri mai mari de EV derivate din trombocite, fara nicio diferență în nivelurile de EV derivate din celule endoteliale între grupuri. Un alt studiu realizat de Weiss et al. a demonstrat că pacienții cu FA non-valvulară sub tratament cu rivaroxaban au avut un profil proteomic semnificativ modificat al EV în comparație cu cei tratați cu warfarină, proteinele proinflamatorii și factorii de complement au fost scăzuți, în timp ce regulatorii negativi ai căilor inflamatorii au fost ridicați la pacienții tratați cu rivaroxaban [81].

Astfel, îmbunătățirea ulterioară în acest domeniu poate duce la individualizarea tratamentului și stratificarea riscului de complicații tromboembolice în timpul terapiei anticoagulante, EV-urile fiind potențiali predictorii ai răspunsului la tratament la pacienții cu FA.

Datele privind modificările pEV în istoria naturală a valvulopatiilor la pacienții cu FA, sunt limitate. H. și Zagloul M (2009) [82] au raportat nivelurile de EV circulante derivate din trombocite, etichetate ca particule CD41(+), semnificativ crescute la pacienții cu stenoză mitrală reumatică și orice formă de FA comparativ cu voluntarii sănătoși. În plus, autorii au observat o corelație semnificativă statistic între severitatea stenozei mitrale și nivelurile circulante ale EV derivate din trombocite.

Ablația cu cateter este acum abordarea intervențională bine stabilită pentru tratamentul FA simptomatice, tehnică care a lasat loc de cercetare, ținând cont de studiile care nu au întârziat să apară, în acest sens. Herrera-Siklódy și colab. au studiat diferențele dintre pacienții cu FA supuși crioablației și ablației cu radiofrecvență (RF) în ceea ce privește EV-urile ca markeri de deteriorare celulară. În ambele grupuri de pacienți, aceștia au observat o creștere a EV-urilor derivate din trombocite și leucocite (nu și a celor derivate din endotelialocite) după procedura de ablație. Cu toate acestea, nu au existat diferențe semnificative între grupuri. [83]. Jesel și colab. [84] au comparat concentrațiile de EV între atriul drept și cel stâng la pacienții cu FA supuși ablației. Ei au investigat EV-urile procoagulante derivate din trombocite, leucocite și celule endoteliale. Interesant este că doar EV-urile derivate din endotelialocite au prezentat diferențe specifice atriale, fiind crescute în atriul drept [84]. Pourtau et al. au demonstrat activitatea procoagulantă dependentă de factor tisular a EV atât la pacienții cu FA paroxistică, cât și la cei cu FA persistentă supuși ablației, comparativ cu martorii sănătoși, cu toate acestea, numai pacienții cu FA paroxistică au prezentat o activitate fibrinolitice scăzută a EV în comparație cu martorii. Zhang, XZ și colab. (2018) [85] au evaluat, și ei, impactul ablației cu radiofrecvență asupra microveziculelor plachetare. Aceștia au demonstrat că starea de hipercoagulare după ablația cu cateter cu radiofrecvență a fost semnificativ crescută și a prezentat o corelație pozitivă cu numărul total de EV CD62P derivate din trombocite. Mai mult, au dezvăluit că nivelurile de EV derivate din trombocite (CD62P) la șapte zile după ablația cu radiofrecvență au fost semnificativ mai mari în comparație cu valorile obținute imediat după procedura.

Este esențial de remarcat descoperirile care susțin implicarea EV-urilor în complicațiile trombotice la pacienții cu diferite forme de FA. Nivelul EV-urilor circulante care sunt derivate în principal din celule apoptotice și trombocite activate și celule endoteliale s-a dovedit a fi un predictor promițător al potențialelor complicații tromboembolice, cum ar fi tromboza cardiacă, accidentul vascular cerebral și tromboembolismul sistemic. Înafara de necesitatea elicidării în studii clinice mari a impactului diferitelor anticoagulante asupra dinamicii acestor biomarkeri, implimentarea pe scară largă a ablației prin cateter, impune utilizarea noilor instrumente diagnostice în reevaluarea potențialului risc tromboembolic la aceasta categorie de pacienți. În cele din urmă, dacă măsurarea nivelurilor circulante ale veziculelor derivate din trombocite este utilă pentru a determina un risc ridicat în rândul pacienților cu FA nu este pe deplin înțeles și necesar a fi elucidat în studii clinice mari.

Concluzie.

Există tot mai multe dovezi care sugerează că microveziculele plachetare ar putea servi ca un biomarker nou care poate lega tromboza, inflamația și disfuncția endotelială. S-a propus că profilul pEV-urilor poate oferi o mai bună înțelegere a bolii cardiovasculare și reflecta progresia acesteia. Poate, mai mult decât atât, pEV-urile ar asigura, de asemenea, discriminarea pacienților care ar putea să beneficieze cel mai mult de modularea mecanismelor specifice subiacente (de exemplu, inflamație, disfuncție endotelială și tromboză) sau care ar putea necesita terapii mai agresive.

Ar fi de un interes deosebit să se determine corelația dintre modelele specifice ale subtipurilor de pEV și nivelul acestora în progresia bolii cardiovasculare, predicția rezultatului și modularea acestuia prin terapia medicală pe termen scurt, mediu sau lung. Confirmarea ipotezei ar putea îmbunătăți performanța modelelor de predicție dincolo de cele furnizate numai de factorii de risc stabiliți.

Sunt însă necesare investigații ulterioare și studii longitudinale mai mari dedicate pentru a înțelege modul în care utilizarea pEV-urilor poate fi transpusă în practica clinică reală.

Bibliografie.

[1] E. Bazzan *et al.*, “Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles’ Knowledge: From 1946 to Today,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 12, Jun. 2021, doi: 10.3390/IJMS22126417.

[2] M. Mabrouk, F. Guessous, A. Naya, Y. Merhi, and Y. Zaid, “The Pathophysiological Role of Platelet-Derived Extracellular Vesicles,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol.

49, no. 3, pp. 279–283, Apr. 2023, doi: 10.1055/S-0042-1756705/ID/JR03047-14/BIB.

[3] S. Fu, Y. Zhang, Y. Li, L. Luo, Y. Zhao, and Y. Yao, “Extracellular vesicles in cardiovascular diseases,” *Cell Death Discov.* 2020 61, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41420-020-00305-y.

[4] A. Hafiane and S. S. Daskalopoulou, “Extracellular vesicles characteristics and emerging roles in atherosclerotic cardiovascular disease,” *Metabolism*, vol. 85, pp. 213–222, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.METABOL.2018.04.008.

[5] S. Palazzolo, V. Canzonieri, and F. Rizzolio, “The history of small extracellular vesicles and their implication in cancer drug resistance,” *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 948843, Aug. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.948843/BIBTEX.

[6] P. Wolf, “The nature and significance of platelet products in human plasma,” *Br. J. Haematol.*, vol. 13, no. 3, pp. 269–288, 1967, doi: 10.1111/J.1365-2141.1967.TB08741.X.

[7] S. Saheera, V. P. Jani, K. W. Witwer, and S. Kuty, “Extracellular vesicle interplay in cardiovascular pathophysiology,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 320, no. 5, pp. H1749–H1761, May 2021, doi: 10.1152/AJPHEART.00925.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPHEART.00925.2020_F003.JPEG.

[8] Y. Couch *et al.*, “A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 10, no. 14, Dec. 2021, doi: 10.1002/JEV2.12144.

[9] Y. J. Lee *et al.*, “Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias,” *Thromb. Res.*, vol. 72, no. 4, pp. 295–304, Nov. 1993, doi: 10.1016/0049-3848(93)90138-E.

[10] “Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8542543/> (accessed Apr. 07, 2024).

[11] J. J. Powell, R. S. J. Harvey, and R. P. H. Thompson, “Microparticles in Crohn’s disease—has the dust settled?,” *Gut*, vol. 39, no. 2, p. 340, 1996, doi: 10.1136/GUT.39.2.340.

[12] “Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1918984/> (accessed Apr. 07, 2024).

[13] O. Fourcade *et al.*, “Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells,” *Cell*, vol. 80, no. 6, pp. 919–927, Mar. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90295-3.

[14] G. Raposo *et al.*, “B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles,” *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 3, pp. 1161–1172, Mar. 1996, doi: 10.1084/JEM.183.3.1161.

[15] R. Wubbolts *et al.*, “Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 13, pp. 10963–10972, Mar. 2003, doi: 10.1074/JBC.M207550200.

[16] C. Subra, K. Laulagnier, B. Perret, and M. Record, “Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of

multivesicular bodies,” *Biochimie*, vol. 89, no. 2, pp. 205–212, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2006.10.014.

[17] G. Van Niel *et al.*, “Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice,” *Gut*, vol. 52, no. 12, pp. 1690–1697, Dec. 2003, doi: 10.1136/GUT.52.12.1690.

[18] N. Chaput, N. E. C. Scharz, F. Andre, and L. Zitvogel, “Exosomes for immunotherapy of cancer,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 532, pp. 215–221, 2003, doi: 10.1007/978-1-4615-0081-0_17.

[19] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, Jun. 2007, doi: 10.1038/NCB1596.

[20] S. Bruno *et al.*, “Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1053–1067, May 2009, doi: 10.1681/ASN.2008070798.

[21] C. Théry *et al.*, “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, p. 1535750, Dec. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

[22] S. I. Ohno, G. P. C. Drummen, and M. Kuroda, “Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems,” *Int. J. Mol. Sci. 2016, Vol. 17, Page 172*, vol. 17, no. 2, p. 172, Feb. 2016, doi: 10.3390/IJMS17020172.

[23] J. F. Nabhan, R. Hu, R. S. Oh, S. N. Cohen, and Q. Lu, “Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 11, pp. 4146–4151, Mar. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1200448109.

[24] Q. Wang, J. Yu, T. Kadungure, J. Beyene, H. Zhang, and Q. Lu, “ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macromolecules,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41467-018-03390-X.

[25] D. Burger, S. Schock, C. S. Thompson, A. C. Montezano, A. M. Hakim, and R. M. Touyz, “Microparticles: biomarkers and beyond,” *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 124, no. 7, pp. 423–441, Apr. 2013, doi: 10.1042/CS20120309.

[26] D. K. Jeppesen *et al.*, “Reassessment of Exosome Composition,” *Cell*, vol. 177, no. 2, pp. 428–445.e18, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.CELL.2019.02.029.

[27] E. Petrovčíková, K. Vičíková, and V. Leksa, “Extracellular vesicles – biogenesis, composition, function, uptake and therapeutic applications,” *Biol. 2018 734*, vol. 73, no. 4, pp. 437–448, May 2018, doi: 10.2478/S11756-018-0047-0.

[28] L. Badimon, R. Suades, E. Fuentes, I. Palomo, and T. Padró, “Role of Platelet-Derived Microvesicles As Crosstalk Mediators in Atherothrombosis and Future Pharmacology Targets: A Link between Inflammation, Atherosclerosis, and Thrombosis,” *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. AUG, Aug. 2016, doi: 10.3389/FPHAR.2016.00293.

[29] L. M. Lugo-Gavidia *et al.*, “Role of Microparticles in Cardiovascular Disease: Implications for Endothelial Dysfunction, Thrombosis, and Inflammation,” *Hypertension*, vol. 77, no. 6, pp. 1825–1844, Jun. 2021, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.16975.

[30] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, and D. R. F. Carter, “Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake,” *J. Extracell. vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.3402/JEV.V3.24641.

[31] S. Nomura and M. Shimizu, “Clinical significance of procoagulant microparticles,” *J. Intensive Care*, vol. 3, no. 1, Jan. 2015, doi: 10.1186/S40560-014-0066-Z.

[32] B. Chyrchel, A. Drożdż, D. Długosz, E. Stępień, and A. Surdacki, “Platelet Reactivity And Circulating Platelet-Derived Microvesicles Are Differently Affected By P2Y12 Receptor Antagonists,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 264–275, 2019, doi: 10.7150/IJMS.28580.

[33] A. Blann, E. Shantsila, and A. Shantsila, “Microparticles and arterial disease,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 35, no. 5, pp. 488–496, 2009, doi: 10.1055/S-0029-1234144.

[34] J. D. Allbritton-King and G. García-Cardena, “Endothelial cell dysfunction in cardiac disease: driver or consequence?,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/FCELL.2023.1278166.

[35] A. E. Berezin and A. A. Berezin, “Extracellular Endothelial Cell-Derived Vesicles: Emerging Role in Cardiac and Vascular Remodeling in Heart Failure,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, p. 519297, Apr. 2020, doi: 10.3389/FCVM.2020.00047/BIBTEX.

[36] L. Bernal-Mizrachi *et al.*, “Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 97, no. 3, pp. 439–446, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.ijcard.2003.10.029.

[37] D. J. Medina-Leyte, O. Zepeda-García, M. Domínguez-Pérez, A. González-Garrido, T. Villarreal-Molina, and L. Jacobo-Albavera, “Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches,” *Int. J. Mol. Sci. 2021, Vol. 22, Page 3850*, vol. 22, no. 8, p. 3850, Apr. 2021, doi: 10.3390/IJMS22083850.

[38] J. D. Allbritton-King and G. García-Cardena, “Endothelial cell dysfunction in cardiac disease: driver or consequence?,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/FCELL.2023.1278166.

[39] Y. Cui *et al.*, “Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, no. 11, pp. 6437–6442, Nov. 2013, doi: 10.1007/S11033-013-2758-1.

[40] L. M. Lugo-Gavidia *et al.*, “Association of Circulating Platelet Extracellular Vesicles and Pulse Wave Velocity with Cardiovascular Risk Estimation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 18, p. 10524, Sep. 2022, doi: 10.3390/IJMS231810524/S1.

[41] D. J. Medina-Leyte, O. Zepeda-García, M. Domínguez-Pérez, A. González-Garrido, T. Villarreal-Molina, and L. Jacobo-Albavera, “Endothelial Dysfunction,

Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches,” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 3850, vol. 22, no. 8, p. 3850, Apr. 2021, doi: 10.3390/IJMS22083850.

[42] C. Christersson, Å. Thulin, and A. Siegbahn, “Microparticles during long-term follow-up after acute myocardial infarction,” *Thromb. Haemost.*, vol. 117, no. 08, pp. 1571–1581, 2017, doi: 10.1160/th16-11-0837.

[43] F. Zeiger, S. Stephan, G. Hoheisel, D. Pfeiffer, C. Ruehlmann, and M. Kokschi, “P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease,” *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 11, no. 8, pp. 723–728, 2000, doi: 10.1097/00001721-200012000-00005.

[44] T. Nozaki *et al.*, “Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure,” *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 12, no. 11, pp. 1223–1228, Nov. 2010, doi: 10.1093/EURJHF/HFQ145.

[45] R. R. Koenen *et al.*, “Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases,” vol. 4, 2017, doi: 10.3389/fcvm.2017.00074.

[46] J. Mörtberg, K. Lundwall, F. Mobarrez, H. Wallén, S. H. Jacobson, and J. Spaak, “Increased concentrations of platelet- and endothelial-derived microparticles in patients with myocardial infarction and reduced renal function- a descriptive study,” *BMC Nephrol.*, vol. 20, no. 1, Mar. 2019, doi: 10.1186/S12882-019-1261-X.

[47] E. Zacharia *et al.*, “Cell-Derived Microparticles and Acute Coronary Syndromes: Is there a Predictive Role for Microparticles?,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 27, no. 27, pp. 4440–4468, Dec. 2020, doi: 10.2174/0929867327666191213104841.

[48] C. Jung, P. Sörensson, N. Saleh, H. Arheden, L. Rydén, and J. Pernow, “Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with ST-elevation myocardial infarction,” *Atherosclerosis*, vol. 221, no. 1, pp. 226–231, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2011.12.025.

[49] D. Braig *et al.*, “Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites,” *Nat. Commun.*, vol. 8, Jan. 2017, doi: 10.1038/NCOMMS14188.

[50] M. Brambilla *et al.*, “Different Contribution of Monocyte- and Platelet-Derived Microvesicles to Endothelial Behavior,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 9, May 2022, doi: 10.3390/IJMS23094811.

[51] Q. Leng *et al.*, “Insights Into Platelet-Derived MicroRNAs in Cardiovascular and Oncologic Diseases: Potential Predictor and Therapeutic Target,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 9, p. 879351, Jun. 2022, doi: 10.3389/FCVM.2022.879351/BIBTEX.

[52] C. A. Mavroudis *et al.*, “Microparticles in acute coronary syndrome,” *Thromb. Res.*, vol. 156, pp. 109–116, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.THROMRES.2017.06.003.

[53] S. Koganti, D. Eleftheriou, R. Gurung, Y. Hong, P. Brogan, and R. D. Rakhit, “Persistent circulating platelet and endothelial derived microparticle signature may explain on-going pro-thrombogenicity after acute coronary

syndrome,” *Thromb. Res.*, vol. 206, pp. 60–65, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.THROMRES.2021.07.018.

[54] A. H. Bryk-Wiązania and A. Undas, “Hypofibrinolysis in type 2 diabetes and its clinical implications: from mechanisms to pharmacological modulation,” *Cardiovasc. Diabetol.* 2021 201, vol. 20, no. 1, pp. 1–16, Sep. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01372-W.

[55] A. B. Hartopo, I. Puspitawati, P. P. R. Gharini, and B. Y. Setianto, “Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction,” *Arch. Med. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 529–537, 2016, doi: 10.5114/AOMS.2016.59926.

[56] C. Sun, W. B. Zhao, Y. Chen, and H. Y. Hu, “Higher Plasma Concentrations of Platelet Microparticles in Patients With Acute Coronary Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis,” *Can. J. Cardiol.*, vol. 32, no. 11, p. 1325.e1, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.CJCA.2016.02.052.

[57] K. Supriami, I. Puspitawati, D. S. Mayasari, and A. B. Hartopo, “Increased Platelet-derived Microparticles Counts is Correlated with Elevated Blood LDL Cholesterol in Acute Myocardial Infarction,” *Indones. Biomed. J.*, vol. 14, no. 3, pp. 261–8, Sep. 2022, doi: 10.18585/INABJ.V14I3.1892.

[58] E. Zacharia *et al.*, “Plasma signature of apoptotic microvesicles is associated with endothelial dysfunction and plaque rupture in acute coronary syndromes,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 138, pp. 110–114, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.YJMCC.2019.11.153.

[59] A. Awad, I. Ahmed, M. Abdul-Fattah, I. Shalaby, M. Abd El-Hameed, and M. S. Mohamed, “MICROPARTICLES AS A PREDICTIVE BIOMARKER IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION,” *Al-Azhar Med. J.*, vol. 50, no. 3, pp. 2185–2200, Jul. 2021, doi: 10.21608/AMJ.2021.178680.

[60] S. Godo and H. Shimokawa, “Endothelial Functions,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 37, no. 9, pp. e108–e114, Sep. 2017, doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309813.

[61] P. Collins, A. Maas, M. Prasad, L. Schierbeck, and A. Lerman, “Endothelial Vascular Function as a Surrogate of Vascular Risk and Aging in Women,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 95, no. 3, pp. 541–553, 2020, doi: 10.1016/j.mayocp.2019.07.001.

[62] T. Toya *et al.*, “Prognostic impact and clinical outcomes of coronary flow reserve and hyperaemic microvascular resistance: CFR, HMR, and MACE,” *EuroIntervention*, vol. 17, no. 7, p. 569, Sep. 2021, doi: 10.4244/EIJ-D-20-00853.

[63] K. Taguchi, M. Hida, H. Narimatsu, T. Matsumoto, and T. Kobayashi, “Glucose and angiotensin II-derived endothelial extracellular vesicles regulate endothelial dysfunction via ERK1/2 activation,” *Pflugers Arch.*, vol. 469, no. 2, pp. 293–302, Feb. 2017, doi: 10.1007/S00424-016-1926-2.

[64] A. Osman *et al.*, “Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Generated Extracellular Vesicles (Microparticles) Self-Perpetuate ER Stress and Mediate Endothelial Cell Dysfunction Independently of Cell Survival,” *Front.*

Cardiovasc. Med., vol. 7, Dec. 2020, doi: 10.3389/FCVM.2020.584791.

[65] F. Buffolo, S. Monticone, G. Camussi, and E. Aikawa, "Role of Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Vascular Damage," *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 79, no. 5, p. 863, May 2022, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17957.

[66] C. M. Boulanger, "Microparticles, vascular function and hypertension," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 19, no. 2, pp. 177–180, Mar. 2010, doi: 10.1097/MNH.0B013E32833640FD.

[67] R. A. Preston *et al.*, "Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles," *Hypertension*, vol. 41, no. 2, pp. 211–217, Feb. 2003, doi: 10.1161/01.HYP.0000049760.15764.2D.

[68] T. Helbing, C. Olivier, C. Bode, M. Moser, and P. Diehl, "Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension," *World J. Cardiol.*, vol. 6, no. 11, p. 1135, Nov. 2014, doi: 10.4330/WJC.V6.I11.1135.

[69] M. T. K. Zaldivia *et al.*, "Successful renal denervation decreases the platelet activation status in hypertensive patients," *Cardiovasc. Res.*, vol. 116, no. 1, pp. 202–210, Jan. 2020, doi: 10.1093/CVR/CVZ033.

[70] J. N. Barnes *et al.*, "Cerebrovascular Reactivity and Vascular Activation in Postmenopausal Women With Histories of Preeclampsia," *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 71, no. 1, pp. 110–117, Jan. 2018, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10248.

[71] S. I. Gilani, T. L. Weissgerber, V. D. Garovic, and M. Jayachandran, "Preeclampsia and Extracellular Vesicles," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 18, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.1007/S11906-016-0678-X.

[72] N. C. Bacha *et al.*, "Treprostinil treatment decreases circulating platelet microvesicles and their procoagulant activity in pediatric pulmonary hypertension," *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 54, no. 1, pp. 66–72, Jan. 2019, doi: 10.1002/PPUL.24190.

[73] J. Rosińska, M. Łukasik, and W. Kozubski, "The Impact of Vascular Disease Treatment on Platelet-Derived Microvesicles," *Cardiovasc. drugs Ther.*, vol. 31, no. 5–6, pp. 627–644, Dec. 2017, doi: 10.1007/S10557-017-6757-7.

[74] F. Santilli, M. Marchisio, P. Lanuti, A. Boccatonda, S. Miscia, and G. Davl, "Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond," *Thromb. Haemost.*, vol. 116, no. 2, pp. 220–234, Aug. 2016, doi: 10.1160/TH16-03-0176.

[75] A. Extracellular Vesicles, T. in Atrial, A. E. Berezin, and A. A. Berezin, "Extracellular Vesicles and Thrombogenicity in Atrial Fibrillation," *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, Page 1774, vol. 23, no. 3, p. 1774, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJMS23031774.

[76] H. Wang *et al.*, "The microvesicle/CD36 complex triggers a prothrombotic phenotype in patients with non-valvular atrial fibrillation," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 13, p. 7331, Jul. 2020, doi: 10.1111/JCMM.15311.

[77] D. Patel *et al.*, "Biomarkers of Thrombo-Inflammatory Responses in Pulmonary Embolism Patients With Pre-Existing Versus New-Onset Atrial Fibrillation," *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, vol. 27, 2021, doi: 10.1177/10760296211014964.

[78] B. Ibanez *et al.*, "2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)," *Eur. Heart J.*, vol. 39, no. 2, pp. 119–177, Jan. 2018, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHX393.

[79] A. Lenart-Migdalska, L. Drabik, M. Kaźnica-Wiatr, L. Tomkiewicz-Pająk, P. Podolec, and M. Olszowska, "Flow Cytometric Assessment of Endothelial and Platelet Microparticles in Patients With Atrial Fibrillation Treated With Dabigatran," *Clin. Appl. Thromb.*, vol. 26, Nov. 2020, doi: 10.1177/1076029620972467/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1076029620972467-FIG2.JPEG.

[80] R. C. F. Duarte *et al.*, "Thrombin Generation and other hemostatic parameters in patients with atrial fibrillation in use of warfarin or rivaroxaban," *J. Thromb. Thrombolysis*, vol. 51, no. 1, pp. 47–57, Jan. 2021, doi: 10.1007/S11239-020-02126-3/METRICS.

[81] L. Weiss *et al.*, "Nonvalvular atrial fibrillation patients anticoagulated with rivaroxaban compared with warfarin exhibit reduced circulating extracellular vesicles with attenuated pro-inflammatory protein signatures," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 19, no. 10, pp. 2583–2595, Oct. 2021, doi: 10.1111/JTH.15434.

[82] H. Azzam and M. Zagloul, "Elevated platelet microparticle levels in valvular atrial fibrillation," *Hematology*, vol. 14, no. 6, pp. 357–360, Dec. 2009, doi: 10.1179/102453309X12473408860460.

[83] C. Herrera Siklidy *et al.*, "Cellular damage, platelet activation, and inflammatory response after pulmonary vein isolation: A randomized study comparing radiofrequency ablation with cryoablation," *Heart Rhythm*, vol. 9, no. 2, pp. 189–196, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.HRTHM.2011.09.017.

[84] L. Jesel *et al.*, "Do Atrial Differences in Endothelial Damage, Leukocyte and Platelet Activation, or Tissue Factor Activity Contribute to Chamber-Specific Thrombogenic Status in Patients with Atrial Fibrillation?," *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, vol. 25, no. 3, pp. 266–270, Mar. 2014, doi: 10.1111/JCE.12312.

[85] X.-Z. Zhang *et al.*, "CD62P and GP IIb/IIIa in hypercoagulation after RFCA," 2016.