

# Importance of hematopoietic stem cells in the pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases: the role of extracellular vesicles in the mechanism of their action

## Význam hematopoetických kmeňových buniek v patogenéze a terapii kardiovaskulárnych ochorení: úloha extracelulárnych vezikul v mechanizme ich účinku

Barteková M<sup>1,2</sup>, Husseinová M<sup>1</sup>, Radošinská J<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

Barteková M, Husseinová M, Radosinska J. **Importance of hematopoietic stem cells in the pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases: the role of extracellular vesicles in mechanism of their action.** Cardiology Lett. 2019;28(4–5):218–226

**Abstract.** Hematopoietic stem cells (HSCs) represent the only source of all blood elements. HSCs are present primarily in the bone marrow, but also in the peripheral blood and umbilical cord blood. As other cell types, HSCs are able to produce extracellular vesicles (EVs). EVs released from the HSCs (or EVs produced by cells derived from HSCs) exert pleiotropic effects in the body: they contribute to the cell-to-cell communication, are proposed to be biomarkers of the condition of the bone marrow, and are also suggested to be potentially used for the prevention and/or treatment of different diseases including cardiovascular. At the same time, these EVs play an important role in various pathological processes and thus may serve as biomarkers of cardiovascular diseases, their prognosis, as well as the efficiency of applied therapy. Therefore, although this educative article is primarily aimed at summarizing the current knowledge about the EVs produced by the HSCs, the potential clinical relevance of HSC-EVs with emphasis on their role as biomarkers, and also regarding their therapeutic potential in cardiovascular diseases, should not be forgotten. Fig. 1, Ref. 89, on-line full text (Free, PDF) [www.cardiologyletters.sk](http://www.cardiologyletters.sk)

**Key words:** hematopoietic stem cells – extracellular vesicles – cardioprotection – biomarkers

Barteková M, Husseinová M, Radošinská J. **Význam hematopoetických kmeňových buniek v patogenéze a terapii kardiovaskulárnych ochorení: úloha extracelulárnych vezikul v mechanizme ich účinku.** Cardiology Lett. 2019;28(4–5):218–226

**Abstrakt.** Hematopoetické kmeňové bunky (HKB) sú jediným zdrojom všetkých krvných elementov. Nachádzajú sa primárne v kostnej dreni, menej v periférnej a pupečníkovej krvi. Podobne ako iné typy buniek, aj HKB sú schopné produkovať extracelulárne vezikuly (EV). EV uvoľnené z HKB, prípadne EV produkované bunkami odvodenými od HKB, vykazujú pleiotropné účinky na organizmus: prispievajú ku komunikácii medzi bunkami, môžu slúžiť ako biomarkery funkčného stavu kostnej drene, a potenciálne sa uvažuje aj o ich využití v prevencii a/alebo liečbe rôznych ochorení, vrátane ochorení kardiovaskulárneho systému (KVS). Súčasne sa však tieto EV spájajú s rôznymi patologickými procesmi. Napriek tomu, že tento článok je primárne edukatívny s cieľom poskytnúť prehľad poznatkov o EV produkovaných HKB, nemožno opomenúť jeho potenciálny klinický význam najmä vzhľadom na možné využitie EV ako biomarkerov ochorení KVS, respektíve ich prognózy a účinnosti ich terapie, ako aj na vlastný terapeutický potenciál EV v liečbe vybraných ochorení KVS. Obr. 1, Lit. 89, on-line full text (Free, PDF) [www.cardiologyletters.sk](http://www.cardiologyletters.sk)

**Kľúčové slová:** hematopoetické kmeňové bunky – extracelulárne vezikuly – kardioprotekcia – biomarkery

Z <sup>1</sup>Fyziologického ústavu, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava a <sup>2</sup>Centra experimentálnej medicíny, Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 23. augusta 2019; prijaté dňa 4. septembra 2019

**Adresa pre korešpondenciu:** doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD., Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: [jana.radosinska@fmed.uniba.sk](mailto:jana.radosinska@fmed.uniba.sk)

Krv a systém, ktorý sa podieľa na jej tvorbe, nazývaný hematopoetický systém, je zložený z mnohých typov buniek so špecializovanými funkciami. Mnohé krvné elementy majú krátku životnosť, a preto je potrebné ich neustále dopĺňať. Ich nepretržitá produkcia priamo závisí od prítomnosti hematopoetických kmeňových buniek (HKB), ktoré sú jediným zdrojom všetkých krvných elementov. HKB sú prítomné primárne v kostnej dreni, ale vyskytujú sa aj v periférnej a pupočníkovej krvi (1). HKB majú mnoho jedinečných vlastností, ktoré sú pre ne charakteristické. Medzi ich základné vlastnosti patrí schopnosť vybrať si medzi cestou vlastnej obnovy (zostávajú kmeňovou bunkou aj po bunkovom delení) a cestou diferenciácie. Podobne ako mnoho iných typov buniek, aj HKB sú schopné produkovať extracelulárne vezikuly (EV), ktoré sa uvoľňujú primárne do kostnej drene, ale môžu následne preniknúť aj do periférnej krvi (2). EV je súhrnné označenie pre častice obalené fosfolipidovou dvojvrstvou, ktoré nesú rôzne proteíny, lipidy a nukleové kyseliny (DNA, mRNA, nekódujúce RNA). EV sa rozdeľujú podľa veľkosti a ich vzniku na tri typy (3): exozómy (najmenšie EV, vznikajúce intracelulárne), mikrovezikuly (tiež označované ektozómy, vznikajúce z plazmatickej membrány) a apoptotické telieska (najväčšie EV, vznikajúce z buniek po apoptóze). EV uvoľnené z HKB vykazujú pleiotropné účinky na organizmus: prispievajú ku komunikácii medzi bunkami, môžu slúžiť ako biomarkery funkčného stavu kostnej drene, a potenciálne sa uvažuje aj o ich využití v prevencii a liečbe rôznych ochorení, vrátane ochorení kardiovaskulárneho systému (KVS). Súčasne sa však tieto EV, prípadne EV produkované bunkami odvodenými od HKB, spájajú s rôznymi patologickými procesmi a môžu preto slúžiť ako biomarkery ochorení KVS, respektíve ich prognózy, ako aj účinnosti terapie.

Cieľom tohto článku je poskytnúť prehľad poznatkov o EV produkovaných HKB, ako aj bunkami odvodenými od HKB, so zameraním na ich úlohu a terapeutický potenciál v ochoreniach KVS.

## Terapeutický potenciál EV produkovaných HKB

Všeobecne sa akceptuje názor, že potenciálne terapeutické pôsobenie kmeňových buniek je sprostredkované molekulovými mediátormi prenášanými vnútri EV, ktoré sú nimi produkované, a ktoré sa dostávajú k cieľovým bunkám prevažne parakrinnou cestou (4).

Väčšinu aktívnych zložiek obsiahnutých v EV možno zaradiť do dvoch tried: nukleové kyseliny (predovšetkým rôzne mRNA a miRNA) a proteíny (najmä povrchové receptory na membráne EV a intravezikulárne enzýmy alebo transkripčné faktory) (5). Čo sa týka konkrétne EV produkovaných v HKB, tieto môžu okrem tkanivového faktora (CD142) (6) a rôznych mRNA (2) obsahovať prominín-1 (CD133), ktorý má dôležitú úlohu pri udržiavaní vlastností kmeňových buniek,

ako aj pri zabezpečovaní endo- a exocytózy EV (7). Bunky purifikované z hematopoetických tkanív, ktoré sú pozitívne na CD133 (označované ako CD133<sup>+</sup>) predstavujú potenciálny zdroj kmeňových buniek. Ukázalo sa, že EV produkované týmito bunkami exprimujú mRNA niekoľkých pro-angiopoetických a anti-apoptotických faktorov, ako je napríklad vaskulárny endotelový rastový faktor ("vascular endothelial growth factor", VEGF), inzulinový rastový faktor-1 (IGF-1), fibroblastový rastový faktor-2 ("fibroblast growth factor", FGF-2) a interleukín-8 (IL-8), čo dáva dobrý teoretický základ pre využitie CD133<sup>+</sup> buniek v regeneratívnej medicíne (8). Tieto mRNA vykazujú anti-apoptotické účinky, zvyšujú proliferáciu a prežitie endotelových buniek a tým stimulujú formovanie ciev. Ďalej sa zistilo, že faktor stimulujúci granulocytové kolónie ("granulocyte colony-stimulating factor", G-CSF) podporuje akumuláciu exozómov v kostnej dreni, ktoré obsahujú množstvo mikroRNA-126 (miR-126) (9). Ďalej sa zistilo, že miR-126 dopravená pomocou týchto exozómov znižuje expresiu adhezívnych molekúl VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) na povrchu HKB, ako aj nehematopoetických buniek v kostnej dreni. Toto vedie k mobilizácii HKB z kostnej drene do periférnej krvi. Tento poznatok môže nájsť uplatnenie pri potrebe zvýšiť mobilizáciu HKB z kostnej drene. Je zaujímavé, že miR-126 pôsobí nielen ako vnútorný regulátor bunkovej funkcie, ale tiež sa uvoľňuje a pôsobí ako parakrinný faktor zvyšujúci neovaskularizáciu (10). Tieto zistenia sú v súlade s nižšími hladinami cirkulujúcej miR-126 detegovanými u pacientov s diabetes mellitus alebo ischemickou chorobou srdca, čo môže u týchto pacientov prispievať k zhoršenej neovaskularizácii (11, 12).

V rámci hľadania nových liečebných možností kardiovaskulárnych ochorení prebieha rozsiahly výskum potenciálnych terapeutických postupov založených na využití kmeňových buniek v regenerácii srdca po poškodení, napríklad po infarkte myokardu (13). Prvotne sa v procese regenerácie srdca predpokladal terapeutický potenciál kmeňových buniek prostredníctvom ich diferenciácie na kardiomyocyty po ich podaní do srdca. Neskôr však veľké množstvo údajov preukázalo, že väčšina kmeňových buniek transplantovaných do srdca dlho neprežije a k ich premene na nové kardiomyocyty nedôjde. Následne sa teda ujal koncept parakrinného účinku látok uvoľnených v cieľovom tkanive z injekčne podaných kmeňových buniek, a napriek iba nepriamym dôkazom sa táto teória pôsobenia kmeňových buniek stala populárnou (14, 15). V kontexte tejto teórie vystupuje do popredia možnosť, že niektoré z týchto parakrinných účinkov môžu byť sprostredkované EV (16). Zistenia poukazujúce na to, že zlepšenie funkcie srdca účinkom transplantovaných buniek pôvodom z kostnej drene môže byť okrem *in vitro* modulácie mimobunkového prostredia (17) primárne práve dôsledkom ich parakrinných účinkov (15, 18 – 20), sú v súlade s touto hypotézou. U geneticky upravených myší sa preukázalo, že intramyokardiálna aplikácia buniek pochádzajúcich z kostnej

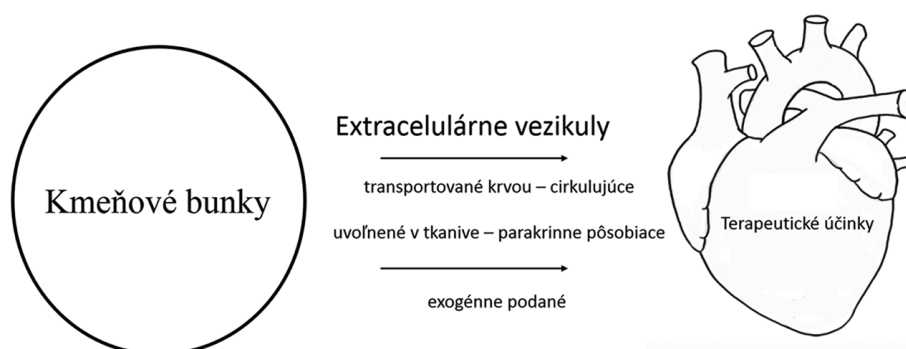
drene zlepšuje funkciu komôr srdca po infarkte myokardu. Autori sa domnievajú, že tento ochranný účinok nie je spôsobený priamou transdiferenciáciou injekčne podaných buniek na kardiomyocyty, ale aktiváciou endogénnych progenitorov, ktorá môže závisieť práve od parakrinnej komunikácie medzi bunkami darcu a príjemcu (15). Konkrétne molekuly vylučované z injekčne podaných buniek, zodpovedné za benefičné účinky pre srdcovú činnosť, však ešte bude potrebné identifikovať. Vzhľadom na skutočnosť, že EV sú schopné vyplaviť sa z bunky a následne byť prijaté inými bunkami, sú kandidátmi na nosiče kardioprotektívnych mediátorov zodpovedných za priaznivé účinky injektovaných kmeňových buniek do srdca. Mechanizmus, ktorým sa EV podieľajú na kardioprotekcii, nie je doposiaľ úplne objasnený. Avšak vzhľadom na to, že kardioprotekcia bola pozorovaná za *in vitro* aj *in vivo* podmienok, sa zdá, že tento mechanizmus zahŕňa priamu interakciu EV s bunkami v srdci, a nie so zložkami krvi (16). V niektorých špecifických prípadoch sa preukázalo, že EV sú schopné priameho prenosu RNA (21 – 23) alebo proteínov (24). Je možné, že existuje špecifická kombinácia viacerých faktorov pre konkrétnu definovanú populáciu buniek, a bolo by veľmi motivujúce tento parakrinný „koktail“ identifikovať. S príchodom nových metód na zlepšenie prežívania buniek je však stále ťažšie rozlíšiť medzi nezávislými účinkami buniek a ich parakrinným pôsobením.

Na charakterizáciu EV pochádzajúcich z ľudských HKB sa použili rôzne markery, ako napríklad CD34, CD71 alebo CD235a (25). Spomedzi nich sa CD34 považuje za hlavný marker HKB. Ukázalo sa, že exozómy pochádzajúce z CD34<sup>+</sup> buniek dokázali zlepšiť neovaskularizáciu po ischémii (26). Nedávna štúdia dokázala, že miR-126 je významne zastúpená v mikrovезikulách pochádzajúcich z CD34<sup>+</sup> buniek v porovnaní s inými typmi buniek, a prispieva k pro-angiogénnej aktivite supernatantov z týchto buniek (27).

V kontrolovanej randomizovanej klinickej štúdii BOOST (28) sa sledovali účinky intrakoronárneho autológneho

prenosu buniek kostnej drene u 30 pacientov po infarkte myokardu, a rovnaký počet pacientov bez transferu buniek kostnej drene slúžil ako kontrolná skupina, pričom všetci pacienti v rámci štúdie dostávali optimálne lekárske ošetrovanie. Výsledky ukázali, že intrakoronárny transfer autológnych buniek kostnej drene zlepšil systolickú funkciu ľavej komory u pacientov po akútnom infarkte myokardu. Napriek tomu, že štúdia nebola zameraná na molekulárne mechanizmy, je zrejme, že za priaznivé účinky HKB nemôže zodpovedať transdiferenciácia HKB z kostnej drene na kardiomyocyty (29, 30). Nedávne štúdie poukázali na potenciál buniek kostnej drene vykazovať parakrinné účinky v ischemických tkanivách, ktoré môžu zahŕňať aj uvoľňovanie EV, a tiež naznačili, že parakrinná signalizácia podporuje skôr funkčné zotavenie ako inkorporáciu buniek do tkaniva (31 – 34) (**obrázok 1**).

Zistilo sa, že po infarkte myokardu býva prítomná mobilizácia kmeňových buniek kostnej drene, čo následne zvyšuje hladiny cirkulujúcich endotelových progenitorových buniek (EPB), HKB, CD34<sup>+</sup> kmeňových buniek, ako aj mononukleárných buniek. Tieto bunky exprimujú skoré srdcové a endotelové markery, pričom mechanizmy signalizujúce poškodenie srdca mobilizujú a priťahujú tieto reparatívne bunky a podporujú ich migráciu do cieľového tkaniva. Najpravdepodobnejšími kandidátmi na mediátorov reparačných procesov v srdci sú kmeňové bunky kostnej drene, heterogénna populácia buniek, ktorá môže byť rozdelená na HKB, EPB a mezenchymálne kmeňové bunky (35 – 38). Ischemický preconditioning ako endogénny adaptačný mechanizmus chrániaci srdce pred ischemicko-reperfúznym poškodením, vyvoláva rýchle zníženie počtu mezenchymálnych kmeňových buniek v cirkulácii. Veľký počet prijatých buniek sa našiel najmä v hraničnom pásme infarktu, ale aj v infarktovej oblasti, čo naznačuje rýchle smerovanie mezenchymálnych kmeňových buniek do ischemického srdca, pričom toto vychytávanie kmeňových buniek nie je vyvážené ich mobilizáciou z kostnej drene, ktorá je pomalšia. Na



**Obrázok 1** Extracelulárne vezikuly produkované kmeňovými bunkami majú terapeutický účinok pri ochoreniach kardiovaskulárneho systému

**Figure 1** Extracellular vesicles produced by stem cells exert therapeutic effect in cardiovascular diseases

druhej strane, začiatková fáza ischemického preconditioningu viedla k zvýšenej mobilizácii HKB do krvného obehu v porovnaní s infarktom myokardu bez preventívneho zásahu (39). Okrem toho, počet vychytených kmeňových buniek (hematopoetických aj mezenchymálnych) významne súvisel s veľkosťou infarktovej, ako aj hraničnej oblasti v srdciach. V štúdiu na pacientoch, ktorí podstúpili primárnu perkutánnu koronárnu angioplastiku a pacientoch po infarkte myokardu s eleváciou ST segmentu (post-STEMI), sa pozorovalo zvýšenie HKB a zníženie cirkulujúcich mezenchymálnych kmeňových buniek po akútnom infarkte myokardu, paralelne so zvýšením plazmatických hladín VEGF a chemoatraktantu SDF-1 (40). Rozpor medzi výsledkami experimentálnej štúdie (39) a klinickými údajmi týkajúcimi sa zmien v cirkulujúcich mobilizačných faktoroch (40) by bolo možné vysvetliť relatívne krátkou (120-minútovou) postinfarktovou reperfúziou aplikovanou v experimentálnej štúdiu.

Predklinické a klinické štúdie zdokumentovali priaznivé účinky ľudských kmeňových CD34<sup>+</sup> buniek z kostnej drene pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení vrátane refraktérnej angíny pectoris (41, 42) a akútneho infarktu myokardu (43). Identifikovaný bol terapeutický parakrinný mechanizmus CD34<sup>+</sup> buniek, ktorý pravdepodobne aspoň čiastočne sprostredkúva sekrécia EV, najmä exozómov (26). Predchádzajúce štúdie zdokumentovali, že použitie CD34<sup>+</sup> buniek ako stratégie na zlepšenie perfúzie srdca a srdcovej funkcie (44 – 46) následne zlepši kvalitu života pacientov. Avšak rôznorodosť pacientov vzhľadom na ich vek, štádium ochorenia, ako aj environmentálne faktory môže ovplyvniť terapeutickú účinnosť izolovaných CD34<sup>+</sup> buniek (47 – 49). Z tohto hľadiska bola zaujímavá štúdia zameraná na terapeutickú účinnosť modifikovaných CD34<sup>+</sup> buniek, ktoré exprimovali zavedený angiogénny proteín sonic hedgehog (Shh), čo malo za cieľ obísť pokles funkcie CD34<sup>+</sup> buniek vo vzťahu k veku a kardiovaskulárnemu zdraviu (24). Zistilo sa, že takto modifikované bunky, ktoré boli injikované do hraničnej oblasti srdca po infarkte myokardu u myši, znížili rozsah infarktu myokardu, chránili pred dilatáciou komory a poklesom funkcie srdca v porovnaní s kontrolnými bunkami. Výsledky tejto štúdie poskytujú nový pohľad na problematiku, vrátane zistení, že: a) modifikácia buniek pomocou Shh zlepšuje krátkodobú retenciu CD34<sup>+</sup> buniek; b) CD34<sup>Shh</sup> ukladajú úmerne väčšie množstvo Shh do exozómov v porovnaní s inými Shh-modifikovanými bunkovými typmi; c) Shh-obsahujúce exozómy z CD34<sup>Shh</sup> buniek sú schopné prenášať Shh na iné typy buniek; a že d) exozómy obsahujúce Shh aktivujú Shh-signalizačné dráhy v iných typoch buniek (24). Z klinického hľadiska poukazujú uvedené zistenia na výhody uplatnenia konceptu EV ako terapeutického nástroja na liečbu poškodenia myokardu najmä pre: schopnosť EV prenášať a poskytovať špecifický obsah cieľovým tkanivám, možnosť ich tvorby za *in vitro* podmienok, ako aj pre možnosť obísť nevýhodu v zmysle krátkej životnosti kmeňových buniek

produkujúcich EV po ich transplantácii. Potenciál geneticky upravených EV zvýšiť aktivitu kmeňových buniek môže byť kľúčovým nástrojom na vývoj nových terapeutických stratégií pre zlepšenie remodelácie a funkcie srdca, a tým pre zlepšenie prognózy pacientov po infarkte myokardu. Potrebný je však ďalší výskum na objasnenie komplexných molekulárnych interakcií EV s cieľovým tkanivom, ktorý umožní identifikáciu zodpovedných mechanizmov ich účinku, ich prepojenia, a zistenie možností modulácie týchto mechanizmov, čo otvorí reálne možnosti pre rozvoj spoľahlivých terapií pomocou EV z kmeňových buniek (50).

Nielen samotné HKB, ale aj bunky odvodené od HKB, ako sú dendritové bunky alebo EPB, sú schopné produkovať a uvoľňovať EV so sľubným terapeutickým potenciálom pre liečbu ochorení KVS, vrátane ischemickej choroby srdca a infarktu myokardu. Dendritové bunky (DB) sú antigén-prezentujúce bunky (tiež známe ako doplnkové bunky) imunitného systému cicavcov (51). Ich hlavnou funkciou je spracovanie antigénov a ich umiestnenie na povrch T-buniek imunitného systému. Nedávne štúdie ukázali, že exozómy sekrétované z DB, ktoré exprimujú imunostimulačné molekuly, dopravujú antigén-sPECIFICké signály, pričom ich cieľom sú T-bunky, ktoré tým aktivujú (52 – 54). Okrem schopnosti DB modulovať imunitné odpovede sa zistilo, že injekcia exozómov z DB darcovskej kostnej drene moduluje reakciu na transplantáciu srdca (55). Navyše sa ukázalo, že exozómy odvodené z DB zlepšili funkciu srdca po infarkte myokardu prostredníctvom aktivácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov (56), čo je v súlade so zistením, že aktivácia CD4<sup>+</sup> T-buniek má kľúčovú úlohu pri zlepšovaní hojenia myokardu po infarkte (57). Predpokladá sa, že väčšina EPB pochádza z kostnej drene. Hematopoetické a vaskulárne systémy sa vyvíjajú paralelne, ale nezávisle od seba počas embryogenézy. Nie je isté ako je to u dospelých, existuje však úzke fyzické prepojenie medzi EPB a HKB v postnatálnom štádiu v kostnej dreni (58). Keďže vaskulárne endotelové a hematopoetické bunkové typy majú mnoho spoločných bunkových povrchových markerov (59), nie je prekvapujúce, že niekoľko identifikovaných populácií EPB vykazuje hematopoetické charakteristiky, hoci boli identifikované aj prípady ne-hematopoetických zdrojov EPB (60). EPB sa nachádzajú v kostnej dreni a sú mobilizované do obehu špecifickými stimulmi, ako sú určité lieky, ischemia či cvičenie. Hoci molekulárne dráhy vedúce k mobilizácii EPB z kostnej drene nie sú úplne objasnené, ukazuje sa, že jednou z najúčinnnejších spúšťačích molekúl uvoľňovania EPB je VEGF (61). Expresia VEGF je významne stimulovaná hypoxiou, ktorá je významným regulátorom vaskulogenézy u dospelých. Ďalším faktorom ovplyvňujúcim mobilizáciu EPB je erytropoetín (62). Zistilo sa, že množstvo a funkcia EPB sú významne znížené pri ochoreniach KVS, pričom množstvo cirkulujúcich EPB predikuje incidencia kardiovaskulárnych príhod a úmrtí. Nedávno sa prospešný účinok aplikácie EPB

pri liečbe ochorení KVS preukázal v niekoľkých pokusoch na zvieratách, a neskôr sa tieto bunky použili tiež pri liečbe ľudí trpiacich rôznymi typmi ochorení KVS (63). Čo sa týka terapeutického potenciálu EV z EPB pri liečbe ochorení KVS, štúdia Ratajczaka et al. (8), ako aj štúdia Deregibus et al. (64) naznačili perspektívy využívania EV na prenos informácií na základe RNA z kmeňových buniek/prekurzorov na ciele diferencované bunky. Najmä neskoršia štúdia ukázala, že mikrovezikuly z EPB môžu aktivovať angiogénny program v endotelových bunkách. Okrem toho sa ukázalo, že EV, najmä exozómy, sú aktívnou zložkou parakrinnej sekrécie z ľudských EPB, a tiež, že môžu podporovať vaskulárnu regeneráciu v potkaních modeloch cievneho poškodenia prostredníctvom zlepšenia funkcie endotelových buniek (65). Zistilo sa tiež, že exozómy z EPB, podané do ischemického myokardu prostredníctvom injikovateľného hydrogél, zvýšili peri-infarktovú angiogénzu a hemodynamiku myokardu v experimentálnom modeli infarktu myokardu u potkana. Použitie gélu pritom výrazne zvýšilo terapeutickú účinnosť exozómami sprostredkovanej ochrany myokardu (66).

Úspešné experimentálne snahy o reparáciu srdca po ischemických príhodách prostredníctvom neovaskularizácie indukovanej využitím EPB naznačili, že EPB terapia môže viesť k zlepšeniu vaskulárnej perfúzie a môže tak ponúknuť aj klinické benefity. Treba však uviesť, že napriek pozorovanému funkčnému zlepšeniu v dôsledku terapie založenej na EPB, nedochádza k dlhodobému zabudovaniu EPB do novovzniknutých ciev, čo vyvoláva kontroverziu týkajúcu sa mechanizmu ich účinku. Predpokladalo sa, že EPB indukujú neovaskularizáciu po ischemickom poškodení prostredníctvom sekrécie cytokínov a rastových faktorov, ktoré pôsobia parakrinným spôsobom a indukujú angiogénzu. Zistenie, že ľudské EPB vylučujú parakrinne signály, ktoré indukujú neovaskularizáciu, tak ponúka veľký terapeutický potenciál (67). Keďže EV sa ukázali byť aktívnou zložkou parakrinnej sekrécie ľudských EPB, jestvuje možnosť, že aspoň niektoré z parakrinných účinkov EPB môžu byť sprostredkované EV, a tiež, že exozómy a/alebo mikrovezikuly pôsobia ako nosiče proangiogénnych (a potenciálne kardioprotektívnych) látok uvoľňovaných z EPB.

## Úloha EV produkovaných HKB v patogeneze ochorení KVS

EV produkované HKB vykazujú hemostatické vlastnosti, sprostredkovávajú agregáciu krvných buniek vrátane krvných doštičiek, podporujú koaguláciu, stabilizujú vaskulaturu, udržiavajú integritu endotelovej bunkovej bariéry a zúčastňujú sa na formovaní aterosklerotického plaku, remodelácii srdca a dysfunkcii obličiek. Môžu vykazovať proaterogénnu, prozápalovú, imunomodulačnú a anti-, respektíve pro-koagulačnú aktivitu v závislosti od ich spúšťačov (ischémia, hypoxia,

anémia, zápal, stres, krvné turbulencie), ktoré indukujú ich uvoľňovanie a expresiu určitých molekúl na svojom povrchu (68 – 71).

Doterajšie štúdie poskytujú dôkazy o predikčnej hodnote zmenených hladín cirkulujúcich EV pri chorobách KVS, vrátane arytmií (72, 73). Najčastejšia srdcová arytmia je predsieňová fibrilácia (PF). Častým faktorom prispievajúcim ku koagulácii a tromboembólii u pacientov s PF je práve vezikulácia krvných doštičiek. V klinických štúdiách sa zistili zvýšené koncentrácie EV v periférnej krvi pacientov s PF a anamnézou PF v porovnaní so zdravými dobrovoľníkmi (74 – 76). U pacientov s permanentnou PF sa v periférnej krvi zistili zvýšené koncentrácie EV obsahujúcich fosfatidylserín. Pacienti s perzistentnou PF mali zvýšené hladiny EV s pro-koagulačnou kapacitou, ale nižšie v porovnaní s pacientmi s permanentnou PF (76, 77).

Doterajšie štúdie poskytli mnoho dôkazov o kľúčovej úlohe EV produkovaných bunkami odvodenými od HKB v patogeneze ochorení KVS (78 – 80). Doštičky, ktoré sú aktivované a agregované, obohatené o fosfolipidy a glykoproteíny, sa na vezikuláciu pripravujú formovaním priestoru, a exocytózou uvoľňujú vezikuly do obehu. Regulácia vezikulácie krvných doštičiek je zabezpečená prostredníctvom intracelulárnej koncentrácie  $Ca^{2+}$  a s tým súvisiacou fosforyláciou proteínu Rap1 (81).

EV produkované bunkami odvodenými od HKB, obohatené fosfolipidmi, ktoré exprimujú anexín V, predstavujú proaterogénne a prokoagulačné častice. Naopak, vezikuly negatívne na anexín V sa javia skôr ako antikoagulačné častice. Okrem toho, EV produkované trombocytnými dodávajú cieľovým bunkám (napríklad endotelovým) oxidované lipidy, P-selektín/P-selektínový glykoproteínový ligand 1 (PSGL-1), CD40 ligand (CD154) a indukujú syntézu B-buniek a sekréciu antigén-špecifického imunoglobulínu G a potencujú adaptívnu imunitnú reakciu prostredníctvom  $CD4^{+}$  buniek (82). Po aktivácii trombocytov a ich následnej vezikulácii a uvoľnení trombínu sa spojenia endotelových buniek obnovia a vaskulárna integrita, rovnováha medzi koaguláciou a zmierňovaním endotelovej dysfunkcie a vaskulárnej permeability, sa posúva v prospech aktivácie trombocytov a prokoagulačnej aktivity. Tento účinok je pre väčšinu pacientov s ochoreniami KVS negatívny. Z klinických štúdií vyplýva, že zníženie množstva apoptických a lipidových EV produkovaných HKB po obnovení sínusového rytmu u pacientov s PF by malo obnoviť hemostázu a znížiť riziko mozgovej príhody a tromboembólie. Existujú dôkazy, že aktivácia krvných doštičiek a ich schopnosť uvoľňovať prokoagulačné vezikuly bohaté na P-selektín/fosfatidylcholín u pacientov s PF je skôr výsledkom základných ochorení KVS ako samotnej PF (72, 73, 77).

Merania hladín cirkulujúcich EV produkovaných HKB sú užitočné pri zatriedovaní pacientov s PF na základe rizika tromboembolických komplikácií. Existujú dôkazy týkajúce sa

ich prediktívnej hodnoty, avšak vyžadujú ďalšie skúmanie vo väčších klinických štúdiách (81).

V ostatných rokoch sa venuje zvýšená pozornosť úlohe exozómov pri ochoreniach KVS. Exozómy sú široko distribuované v telesných tekutinách a obsahujú množstvo biomolekúl, ktoré odrážajú molekulárnu architektúru materských buniek. Interakcie medzi rôznymi bunkami, sprostredkované exozómami, majú vplyv aj na vývoj aterosklerózy. Hlavnými zložkami exozómov sú proteíny a RNA, ktoré účinne regulujú génovú expresiu a fyziologický stav cieľových buniek, čo môže byť kľúčovým faktorom pri chorobách KVS. Nedávne dôkazy naznačujú regulačnú úlohu exozomálnych miR v patogenéze ochorení KVS a tiež sa ukázalo, že rozdielna expresia exozomálnych miR v ochoreniach KVS z nich robí sľubné biomarkery včasnej detekcie týchto ochorení (83 – 85).

Exozomálne miR navyše zohrávajú kľúčovú úlohu vo vývoji a progresii kardiomyopatií podporou komunikácie medzi rôznymi typmi srdcových buniek (86). Na základe existujúcich štúdií môžeme tvrdiť, že exozomálne miR môžu slúžiť ako potenciálne ciele liečby ochorení KVS, ako aj vhodné biomarkery na včasnú diagnostiku týchto ochorení. Je však potrebný ďalší výskum na objasnenie presných mechanizmov exozomálnych miR v patogenéze ochorení KVS (84, 87).

Hoci sú exozómy kontinuálne exportované z buniek, EV sa uvoľňujú v reakcii na aktiváciu buniek alebo poškodenie. Vo všeobecnosti z toho vyplýva, že hladiny cirkulujúcich EV sú detekovateľné v plazme zdravých jedincov len v nízkej koncentrácii, ale zvýšené u pacientov s ochoreniami KVS. Počas formovania sú EV z materských buniek vybavené povrchovými molekulami, ako aj vybraným obsahom ich cytozolov. Charakterizácia nukleových kyselín viazaných na cirkulujúce vezikuly predstavuje cenný nástroj na diagnostiku a monitorovanie ochorení KVS, ako aj onkologických chorôb (87).

EV majú prirodzene odlišné biologické funkcie v závislosti od rôznych faktorov, čo môže vysvetľovať nezrovnalosti v zistených biologických účinkoch EV v rámci rôznych oblastí, ako aj rôznych ochorení KVS. Keďže vnútorná aktivita a imunomodulačné vlastnosti EV im umožňujú pôsobiť aj ako terapeutické látky (endogénne, alebo vo forme nosičov exogénnych liečiv), na naplnenie ich klinického potenciálu je potrebné identifikovať a využiť tých kandidátov, ktorí majú skôr prospešné než škodlivé účinky (3, 88).

Niektoré miR a exozómy majú úlohu aj v diabetickej kardiomyopatii a následnom srdcovom zlyhávaní. Hyperglykémia a zvýšené hladiny voľných mastných kyselín navyše spôsobujú, že niektoré transkripčné faktory vyvolávajú fibrózu srdca epigenetickými zmenami v acetylácii histónov a/alebo profile miR. Diabetická kardiomyopatia je podmienená zmenami vo funkcii mitochondrií súvisiacimi s miR, zvýšenou produkciou reaktívnych foriem kyslíka, zmenami v metabolizme  $\text{Ca}^{2+}$ , apoptózou, autofágiou a fibrózou myokardu. V dôsledku následnej redukcie biodostupnosti NO a inhibície angioge-

nézy dochádza k diabetickej kardiomyopatii, a podobným mechanizmom aj k mnohým iným ochoreniam KVS (84). Exozómy produkované kardiomyocytmi diabetickej myši, ktoré boli fyzicky aktívne, exprimovali vysoké hladiny miR-29b a miR-455 v porovnaní s myšami bez väčšej fyzickej aktivity, ktoré mali schopnosť znižovať fibrózu znižovaním aktivity a hladiny MMP-9 v diabetickej srdci (89).

S pokrokom v molekulárnych technológiách bolo zavedených niekoľko analytických postupov na stanovenie koncentrácie EV v rôznych telesných tekutinách, a tiež na zistenie ich obsahu čo sa týka kvality, ako aj kvantity jeho jednotlivých zložiek. Na identifikáciu rôznych druhov lipidov a proteínov prítomných v EV sa používa hmotnostná spektrometria (MS). Lipidomické a proteomické analýzy sa tiež spájajú s metódami založenými na MS (plynová chromatografia, kvapalinová chromatografia), pre komplexné a kvantitatívne hodnotenia množstva lipidových a proteínových druhov v EV (3).

## Záver

Zistilo sa, že HKB, ako aj progenitorové bunky odvodené od HKB, vykazujú pozitívne účinky pri prevencii/liečbe niektorých kardiovaskulárnych ochorení vrátane ischemickej choroby srdca a akútneho infarktu myokardu. Keďže kardioprotektívny účinok injikovaných kmeňových/progenitorových buniek nemožno vysvetliť ich priamou transdiferenciáciou na kardiomyocyty, predpokladá sa, že ich účinok je sprostredkovaný prostredníctvom parakrinnej komunikácie medzi bunkami darcu a príjemcu. Keďže bolo dokázané, že HKB uvoľňujú do okolitého prostredia EV, vrátane exozómov a mikrovezikúl, a tieto môžu putovať a následne byť prijaté inými (akceptorovými) bunkami, predpokladá sa, že aspoň niektoré z parakrinných účinkov HKB môžu byť sprostredkované EV. Medzi molekuly prenášané vezikulami z HKB patrí niekoľko miR, najmä miR-126, a tiež viaceré pro-angiogénne a anti-apoptotické proteíny, a práve tieto sa pravdepodobne podieľajú na regenerácii srdca, a sú teda pravdepodobnými mediátormi kardioprotektívnych účinkov HKB, väčšinou prostredníctvom neovaskularizácie. Avšak priamy dôkaz kardioprotektívnych účinkov exozómov a mikrovezikúl z HKB v literatúre stále chýba, a teória ich kardioprotektívneho účinku je založená prevažne na nepriamych dôkazoch parakrinného pôsobenia HKB. Na druhej strane, v prípade EV produkovaných v bunkách odvodených od HKB, konkrétne v DB a EPB, sa dokázali ich priame kardioprotektívne účinky v ochorení KVS. Nevyhnutné budú ešte ďalšie štúdie na relevantné posúdenie terapeutického potenciálu HKB-EV pre prevenciu/liečbu KVO.

## Podakovanie

*Práca bola podporená grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR VEGA 2/0061/16.*

## Literatúra

- Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 2002;3:314–317.
- Aoki J, Ohashi K, Mitsuhashi M, et al. Posttransplantation bone marrow assessment by quantifying hematopoietic cell-derived mRNAs in plasma exosomes/microvesicles. *ClinChem* 2014;60:675–82.
- Chong SY, Lee CK, Huang C, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular diseases: alternative biomarker sources, therapeutic agents, and drug delivery carriers. *Int J Mol Sci* 2019;20:E3272.
- Han C, Sun X, Liu L, et al. Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7653489.
- Riazifar M, Pone EJ, Lotvall J, et al. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017;57:125–154.
- Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, et al. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004;104:3190–3197.
- Bauer N, Wilsch-Brauninger M, Karbanova J, et al. Haematopoietic stem cell differentiation promo test here lease of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles—a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol Med* 2011;3:398–409.
- Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, et al. Paracrine pro angiopoietic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells—implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells Dev* 2013;22:422–430.
- Salvucci O, Jiang K, Gasperini P, et al. MicroRNA 126 contributes to granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor cell mobilization by reducing the expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Haematologica* 2012;97:818–826.
- Seeger FH, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNAs in stem cell function and regenerative therapy of the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1739–1746.
- Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *CircRes* 2010;107:810–817.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010;107:677–684.
- Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013;1:689–698.
- Govaert JA, Swijnenburg RJ, Schrepfer S, et al. Poor functional recovery after transplantation of diabetic bone marrow stem cells in ischemic myocardium. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:1158–1165.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, et al. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 2011;8:389–398.
- Yellon DM, Davidson SM. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *irc Res* 2014;114:325–332.
- Baffour R, Pakala R, Hellinga D, et al. Bone marrow-derived stem cell interactions with adult cardiomyocytes and skeletal myoblasts in vitro. *Cardiovasc Revasc Med* 2006;222–230.
- Gnecchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11:367–368.
- Iso Y, Spees JL, Serrano C. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:700–706.
- Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011;109:923–940.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–659.
- Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 2012;14:249–256.
- Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between moused endritic cells via exosomes. *Blood* 2012;119:756–766.
- Mackie AR, Klyachko E, Thorne T, et al. Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ Res* 2012;111:312–321.
- Macri S, Pavesi E, Crescitelli R, et al. Immunophenotypic profiling of erythroid progenitor-derived extracellular vesicles in diamond-blackfan anaemia: a new diagnostic strategy. *PLoSOne* 2015;10:e0138200.
- Sahoo S, Klychko E, Thorne T, et al. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 2011;109:724–728.
- Mocharla P, Briand S, Giannotti G, et al. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMcs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood* 2013;121:226–236.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrowcell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–148.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;42:664–668.
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–673.
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001;104:1046–1052.
- Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230–238.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678–685.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, et al. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004;94:573–574.

35. Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199–206.
36. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:3213–3220.
37. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 2005;26:1196–1204.
38. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45:321–325.
39. Gyongyosi M, Posa A, Pavo N, et al. Differential effect of ischaemic preconditioning on mobilisation and recruitment of haematopoietic and mesenchymal stem cells in porcine myocardial ischaemia-reperfusion. *Thromb Haemost* 2010;104:376–384.
40. Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2006;92:768–774.
41. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/II adouble-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007;115:3165–3172.
42. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 2011;109:428–436.
43. Quyyumi AA, Waller EK, Murrow J, et al. CD34(+) cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am Heart J* 2011;161:98–105.
44. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:461–468.
45. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 2006;114:2163–2169.
46. Shintani S, Kusano K, Li M, et al. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34+ cells and VEGF2 gene therapy after MI. *Nat Clin Pract Cardiovasc* 2006; Med 3(Suppl 1):S123–S128.
47. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2011;89:E1–E7.
48. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;10:2885–2890.
49. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:1209–1212.
50. Liehn EA, Bucur O, Weber C. Role of microparticles as messengers enhancing stem cell activity after genetic engineering. *Circ Res* 2012;111:265–267.
51. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 2010;234:45–54.
52. Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Mittelbrun M, et al. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev* 2013;251:125–142.
53. Pitt JM, Charrier M, Viaud S, et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol* 2014;193:1006–1011.
54. Naslund TI, Gehrman U, Qazi KR, et al. Dendritic cell-derived exosomes need to activate both T and B cells to induce antitumor immunity. *J Immunol* 2013;190:2712–2719.
55. Pêche H, Heslan M, Usal C, et al. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 2003;76:1503–1510.
56. Liu H, Gao W, Yuan J, et al. Exosomes derived from dendritic cells improve cardiac function via activation of CD4(+) T lymphocytes after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2016;91:123–133.
57. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 2012;125:1652–1663.
58. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008;132:598–611.
59. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395–1402.
60. Chao H, Hirschi KK. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc Res* 2010;79:169–173.
61. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005;56:79–101.
62. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340–1346.
63. Mobius-Winkler S, Holtriegel R, Schuler G, et al. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A* 2009;75:25–37.
64. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110:2440–2448.
65. Li X, Chen C, Wei L, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Cytotherapy* 2016;18:253–262.
66. Chen CW, Venkataraman CM, Wang LL, et al. Sustained release of endothelial progenitor cell derived exosomes from shear-thinning hydrogel improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction. *American Heart Association* 2016;A19338.
67. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med* 2009;15:180–189.
68. Barnes JN, Harvey RE, Miller KB, et al. Cerebrovascular reactivity and vascular activation in postmenopausal women with histories of preeclampsia. *Hypertension*. 2018;71:110–117.

69. Van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, et al. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003;59:277–287.
70. Nawaz M, Shah N, Zanetti BR, et al. Extracellular vesicles and matrix remodeling enzymes: the emerging roles in extracellular matrix remodeling, progression of diseases and tissue repair. *Cells.* 2018;7.
71. La Marca V, Fierabracci A. Insights into the diagnostic potential of extracellular vesicles and their mirna signature from liquid biopsy as early biomarkers of diabetic micro/macrovacular complications. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
72. Berezin AE, Kremzer AA, Cammarota G, et al. Circulating endothelial derived apoptotic microparticles and insulin resistance in non-diabetic patients with chronic heart failure. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:1259–1267.
73. Berezin AE. Microparticles in chronic heart failure. *Adv Clin Chem.* 2017;81:1–41.
74. Siwaponanan P, Keawvichit R, Udompunturak S, et al. Altered profile of circulating microparticles in nonvalvular atrial fibrillation. *Clin Cardiol.* 2019;42:425–431.
75. Jesel L, Abbas M, Toti F, et al. Microparticles in atrial fibrillation: a link between cell activation or apoptosis, tissue remodelling and thrombogenicity. *Int J Cardiol.* 2013;168:660–669.
76. Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, et al. Potential roles of cell derived microparticles in ischemic brain disease. *Neurol Res.* 2009;31:799–806.
77. Choudhury A, Chung I, Blann AD, et al. Elevated platelet microparticle levels in nonvalvular atrial fibrillation: relationship to p-selectin and antithrombotic therapy. *Chest.* 2007;131:809–815.
78. Tao SC, Guo SC, Zhang CQ. Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach. *Int J BiolSci.* 2017;13:828–834.
79. Zaldivia MT, Rivera J, Hering D, et al. Renal denervation reduces monocyte activation and monocyte-platelet aggregate formation: an anti-inflammatory effect relevant for cardiovascular risk. *Hypertension.* 2017;69:323–331.
80. Zaldivia MTK, Hering D, Marusic P, et al. Successful renal denervation decreases the platelet activation status in hypertensive patients. *Cardiovasc Res.* 2019;cvz033.
81. Berezin AE, Berezin AA. Circulating platelet-derived vesicle in atrial fibrillation. *Ann Clin Hypertens.* 2019;3:031–038.
82. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, et al. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2006;580:5313–5320.
83. Wang Y, Xie Y, Zhang A, et al. Exosomes: An emerging factor in atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;115:108951.
84. Aghabozorgi AS, Ahangari N, Eftekhari TE, et al. Circulating exosomal miRNAs in cardiovascular disease? Pathogenesis: New emerging hopes. *J Cell Physiol.* 2019;1–14.
85. Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kaminska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine.* 2017;26:865–874.
86. Iaconetti C, Sorrentino S, DeRosa S, et al. Exosomal miRNAs in heart disease. *Physiology.* 2015;31:16–24.
87. Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular vesicles in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2017;120:1649–1657.
88. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith? *J Physiol.* 2016;594:2881–2894.
89. Bei Y, Das S, Rodosthenous RS, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular theranostics. *Theranostics* 2017;7:4168–4182.