

MECCANISMI DI MALATTIA

VESCICOLE EXTRACELLULARI NEL CONTESTO DELL'ATEROSCLEROSI

Extracellular vesicles in atherothrombosis

**MASSIMILIANO RUSCICA^{1,2}, ALESSANDRA STEFANIA RIZZUTO³, CHIARA MACCHI²,
ISABELLA FICHTNER², STEFANO CARUGO^{1,3}, ALBERTO CORSINI²**

¹Department of Cardio-Thoracic-Vascular Diseases - Foundation IRCCS Ca` Granda Ospedale
Maggiore Policlinico, Milan, Italy;

²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences "Rodolfo Paoletti",
University of Milan, Italy;

³Department of Clinical Sciences and Community Health, Università degli Studi di Milano, Italy

SUMMARY

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous group of nanoparticles released by almost all cell types into most biological fluids, under both physiological and pathological conditions. Given their ability of transporting molecular content (including proteins, nucleic acids, lipids, and even whole and/or fragmented organelles) from a donor cell to a recipient cell, EVs not only play a key role in paracrine and endocrine intercellular communication, but also represent an important source of molecular information that would otherwise be difficult to obtain. These characteristics render EVs particularly interesting in the context of the pathophysiological processes of cardiovascular diseases. Indeed, numerous studies demonstrate how significant alterations of certain EV aspects, such as circulating concentration, size, and protein content, associate with specific features of disease, including, for example, severity. Consequently, EVs yield significant clinical potential as tools that may assist on a molecular level in the diagnosis and monitoring of various diseases. In addition to their potential diagnostic role, EVs also represent promising fingerprints in the clinical setting from a prognostic point of view. By monitoring the phenotypic characteristics of EVs, it is possible to assess the onset and progression of certain 'silent' diseases, such as for instance atherosclerosis. In certain cardiovascular settings, EVs also play regenerative and reparative roles. Extensive further studies and development of new technologies will be essential to establish EVs as practical tools for a routinely diagnostic clinical use.

Keywords: *Extracellular vesicles, atherosclerosis, PCSK9.*

Indirizzo per la corrispondenza

Massimiliano Ruscica
massimiliano.ruscica@unimi.it

Le vescicole extracellulari

Le vescicole extracellulari (VEs) sono una popolazione eterogenea di nano-particelle, con dimensioni comprese tra 50 e 1000 nm, delimitate da un doppio strato fosfolipidico e prive di nucleo. Si trovano nei fluidi biologici (sangue, urina, saliva, latte materno) e vengono rilasciate da parte di quasi tutti i tipi cellulari. Originariamente, si credeva che queste nanoparticelle fossero esclusivamente un mezzo utilizzato dalle cellule per eliminare i loro 'rifiuti molecolari', tuttavia ad oggi è ampiamente riconosciuto il loro ruolo in una vasta gamma di processi fisiologici e patologici. Le VEs svolgono un ruolo fondamentale nella comunicazione intercellulare grazie alla capacità di trasferire il loro contenuto molecolare (tra cui proteine, acidi nucleici, lipidi, e persino organuli interi e/o frammentati) da una cellula donatrice a una ricevente (1). Con la pubblicazione nel 2023 delle linee guida dell'International Society of Extracellular Vesicles, si raccomanda di adottare con cautela la suddivisione delle VEs in diverse sottoclassi, basate su specifiche caratteristiche, come la dimensione, la modalità di rilascio e il contenuto molecolare. L'utilizzo di "termini tecnici", come VEs "piccole" e "grandi", dovrebbe avvenire solo se supportato da prove sperimentali che dimostrino effettivamente le dimensioni. Ad esempio, le VEs "piccole" hanno dimensioni inferiori a 100 o 200 nm, mentre le "grandi" superano i 200 nm di diametro. Quindi con la nuova nomenclatura è sconsigliato utilizzare la dicitura "esosomi", che identificava le VEs in base alle ridotte dimensioni (circa 40 nm - 160 nm) e alla modalità di rilascio (da parte di corpi multivescicolari). Allo stesso tempo è da evitare la definizione di 'microvescicola', che era invece il termine utilizzato per definire le VEs rilasciate per gemmazione da parte della membrana plasmatica, e caratterizzate da dimensioni comprese tra gli 0,1 μm e 1 μm . Questo cambiamento è dovuto a una sovrapposizione

dimensionale tra le due popolazioni, insieme alla mancanza di marcatori specifici in grado di distinguere le vie di rilascio (2).

Le VEs trasportano al loro interno un carico ricco di informazioni biologiche che riflettono lo stato fisiologico o patologico della cellula da cui originano. Questa caratteristica le rende importanti strumenti per la diagnosi e il monitoraggio di diverse patologie, fornendo una misura indiretta dello stato di salute dei tessuti e degli organi. Un'ulteriore caratteristica delle VEs è la stabilità del loro contenuto molecolare. Il loro lume idrofilo, racchiuso da un doppio strato fosfolipidico, protegge il carico biomolecolare dalla degradazione enzimatica, soprattutto a livello circolatorio, garantendone la stabilità nel tempo. La quantità e la composizione del contenuto biomolecolare delle VEs sono influenzate dalle condizioni delle cellule che le rilasciano e dagli stimoli che ne regolano il rilascio, che possono essere di natura fisiologica e/o patologica (3). Tra le numerose molecole bioattive trasportate dalle VEs, i microRNA (miRNA) sono quelli più studiati, soprattutto nell'ambito delle biopsie liquide. Nonostante le concentrazioni dei miRNA all'interno delle VEs siano basse, sembrerebbe siano sufficienti a influenzare determinate vie cellulari. Questo concetto diventa rilevante se si considera l'associazione tra i pattern di espressione dei miRNA delle VEs e alcune patologie cardiache (4). Per esempio, nel contesto della fibrillazione atriale, è stato osservato che le VEs trasportano un contenuto alterato di RNA non codificante (ad esempio, i livelli di miR-210-3p e miR-324-3p, entrambi coinvolti nella fibrosi atriale, sono rispettivamente aumentati e ridotti in soggetti con fibrillazione atriale) (5). Per quanto riguarda il contenuto proteico delle VEs, che può risiedere all'interno del lume, esso svolge un ruolo funzionale e potenzialmente clinico. L'analisi dei profili proteici delle VEs, che fornisce informazioni sulla loro origine cellulare, è sempre più utilizzata per esplorare l'insor-

genza e la progressione delle malattie. Riflettendo i cambiamenti cellulari che avvengono in diverse fasi di una patologia, le proteine trasportate dalle VEs sostengono ulteriormente la plausibilità dell'utilizzo di queste particelle biologiche nel contesto clinico (6). La possibilità di caratterizzare il proteoma delle VEs è dovuta in gran parte alle recenti innovazioni nelle tecniche basate sulla spettrometria di massa, che consentono una fenotipizzazione sempre più approfondita del contenuto proteico delle VEs (7).

Le VEs sono composte da lipidi di membrana organizzati in una struttura a doppio strato fosfolipidico. Diversi studi hanno evidenziato il colesterolo come il lipide più abbondante nelle VEs, costituendo uno degli elementi principali della membrana sia esterna che interna. Anche la fosfatidilserina è stata identificata come un lipide tipicamente ritrovato nella struttura delle VEs, in particolare con un ruolo funzionale nei meccanismi di segnalazione.

Inoltre, le VEs sono arricchite di diverse specie lipidiche bioattive contenute nel loro lume vescicolare (8).

Come descritto in precedenza, le VEs vengono rilasciate nella maggior parte dei fluidi biologici da parte di tutti i tipi cellulari. Questo aspetto rende le VEs degli strumenti accessibili in grado di fornire informazioni di tipo molecolare inerenti distretti tissutali e organi che potrebbero risultare difficili da ottenere senza ricorrere a procedure invasive come la biopsia. Tuttavia, l'applicazione clinica delle VEs è stata ostacolata principalmente a causa delle tecniche di isolamento che sono eterogenee, dispendiose, e che non consentono una purificazione totalmente priva di altri "contaminanti biologici", quali proteine sieriche o lipoproteine che spesso rappresentano elementi confondenti e non consentono una buona riproducibilità tra i diversi studi (9). Come riassunto in *Tabella 1*, l'isolamento delle VEs può essere condotto utilizzando diverse tecniche basate su proprietà

Tabella 1 - Principali metodiche per l'isolamento delle vescicole extracellulari.

Metodo di isolamento	Descrizione del metodo	Vantaggi e svantaggi
Ultracentrifugazione differenziale (10)	Metodo basato sulle differenze del coefficiente di sedimentazione delle particelle (che a sua volta dipende dalla dimensione e densità delle particelle).	Questo metodo ha il vantaggio di essere economico, tuttavia può comportare danni alle vescicole e la contaminazione da HDL.
Ultracentrifugazione a gradiente di densità (11)	Tecnica che separa le VEs in base alla loro densità, sfruttando gradienti di densità come sucrosio o iodixanolo.	È un metodo in grado di rimuovere contaminazioni proteiche dal preparato di VEs, tuttavia è una tecnica laboriosa e non garantisce l'assenza di contaminazione da lipoproteine.
Cromatografia (12)	Metodo che consiste nell'impiego di resine o colonne specifiche per separare le VEs in base alle loro dimensioni, carica o altre proprietà chimiche.	Questo metodo è caratterizzato da un'elevata efficienza e purezza, ma richiede attrezzature specializzate e comporta costi elevati.
Filtrazione (13)	Procedura di isolamento che implica il passaggio del campione attraverso filtri con pori di dimensioni specifiche per isolare le VEs in base alle loro dimensioni.	Tecnica semplice e rapida, tuttavia comporta il rischio di una bassa resa finale, senza garantire l'assenza da contaminazioni.
Immunoaffinità (14)	Metodo basato sulla formazione di un legame specifico tra gli antigeni presenti sulle VEs e degli anticorpi immobilizzati su una matrice solida.	Metodo altamente specifico che garantisce purezza delle VEs, tuttavia costoso e può comportare una bassa resa finale.

biofisiche e biochimiche delle VEs stesse, come dimensioni, densità ed esposizione di specifici antigeni. La scelta del metodo di isolamento dipende dalla fonte biologica delle VEs e dall'obiettivo dello studio, come l'analisi proteomica o genomica. Uno dei metodi più comuni di isolamento è l'ultracentrifugazione differenziale che, attraverso una serie di centrifugazioni a velocità crescente, separa le VEs in base alle loro dimensioni e densità (10). Un'altra tecnica è l'ultracentrifugazione a gradiente di densità, che sfrutta gradienti di densità come sucrosio o iodixanolo per separare le VEs in base alla loro densità. Questo metodo offre una migliore separazione e purezza delle VEs, ma richiede tempi più lunghi e attrezzature dedicate (11). Un ulteriore metodo è la cromatografia, che utilizza resine o colonne specifiche per separare le VEs in base alle loro dimensioni, carica o altre proprietà chimiche. Questo metodo è caratterizzato da un'elevata efficienza e purezza, ma richiede attrezzature specializzate e comporta costi elevati (12). La filtrazione è una procedura di isolamento che implica il passaggio del campione attraverso filtri con pori di dimensioni specifiche per isolare le VEs in base alle loro dimensioni. Questa tecnica è semplice e rapida, ma comporta il rischio di una bassa resa così come di contaminazioni (13). È possibile isolare le VEs per immunoaffinità, metodo che si basa sul legame specifico tra gli antigeni presenti sulle VEs e degli anticorpi immobilizzati su una matrice solida. È un metodo altamente specifico che garantisce purezza delle VEs, anche se risulta molto costoso e la concentrazione finale delle VEs potrebbe essere bassa (14).

Le vescicole extracellulari nel contesto delle malattie cardiovascolari a eziologia aterosclerotica

Il ruolo delle VEs nella comunicazione tra cellule, la loro capacità di trasportare molecole che riflettono il loro distretto di origine e il fatto

che le loro concentrazioni nei fluidi biologici siano il risultato di un equilibrio altamente controllato tra rilascio e assorbimento da parte delle cellule 'donatrici' e 'riceventi', sono tutte caratteristiche che rendono le VEs particolarmente interessanti nell'ambito dei processi fisiopatologici. Oltre al loro potenziale ruolo diagnostico, le VEs rappresentano strumenti promettenti in ambito clinico anche da un punto vista prognostico. Monitorando le caratteristiche fenotipiche delle VEs è possibile valutare l'insorgenza e la progressione di determinate patologie 'silenti', come ad esempio l'aterosclerosi (Figura 1). Questo processo è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata dalla formazione di lesioni nella tonaca intima della parete arteriosa. Queste lesioni sono caratterizzate dall'accumulo e dalla trasformazione di lipidi e cellule di vario tipo (infiammatorie, muscolari, endoteliali), che contribuiscono alla progressione della patologia attraverso la creazione di una complessa rete di comunicazione intercel-

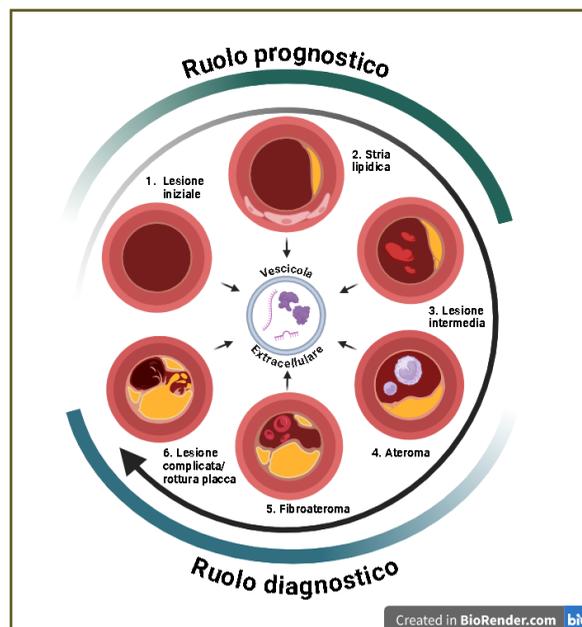


Figura 1 - Schema riassuntivo del possibile ruolo diagnostico e prognostico delle vescicole extracellulari nella progressione del processo aterosclerotico.

lulare (15). Infatti, le cellule all'interno della lesione influenzano altri tipi cellulari adiacenti in maniera paracrina, secernendo una vasta gamma di molecole bioattive, spesso attraverso le stesse VEs, aggravando ulteriormente il carico complessivo della lesione e portando a fenomeni quali disfunzione endoteliale, stress ossidativo e attivazione piastrinica (16, 17). Nonostante i progressi compiuti nel trattamento e gestione delle malattie cardiovascolari aterosclerotiche, grazie all'implementazione di misure preventive e terapie basate sui fattori di rischio, la stratificazione del rischio individuale rimane una sfida complessa. Con gli attuali modelli di stratificazione, l'elevata eterogeneità dei fenotipi e del rischio residuo tra i pazienti rende difficile una valutazione accurata del rischio cardiovascolare (18). Pertanto, vi è la necessità di nuovi marcatori che riflettano il reale "burden" delle malattie cardiovascolari aterosclerotiche e che aiutino a spiegare la fisiopatologia di tale contesto clinico.

Ad esempio, sono state osservate associazioni tra i livelli circolanti di VEs e l'entità delle lesioni angiografiche e della calcificazione vascolare (19). In pazienti con sindrome coronarica acuta è stato riscontrato un aumento di determinate 'sottopopolazioni' di VEs circolanti rispetto a soggetti sani; tali cambiamenti si associavano con la rottura della placca aterosclerotica (20, 21). In pazienti che sono stati sottoposti a intervento coronarico percutaneo primario (pPCI), in seguito a infarto miocardico di tipo STEMI (sopra-slivellamento del tratto ST), si è osservato un aumento del rilascio di VEs di derivazione eritrocitaria. Ciò sostiene il possibile ruolo delle VEs di derivazione eritrocitaria come marcatori acuti di trombosi. Da un punto di vista meccanicistico, altre sottopopolazioni di VEs circolanti e il loro stato di attivazione sono stati analizzati durante l'evoluzione temporale dello STEMI. In particolare, nelle 72 ore post-STEMI si osserva un aumento delle concentrazioni di VEs di derivazione leucocitari, a riflettere l'accezione infiammato-

ria di questo quadro clinico (22, 23). In pazienti STEMI è stato inoltre osservato che, rispetto a pazienti con sindrome coronarica cronica, vi sono delle differenze significative in termini di numero di VEs, dimensione e contenuto proteico, con un'incrementata espressione delle proteine GPIIb e le caderine, sottolineando la presenza di una iper-reattività piastrinica e di una disfunzione endoteliale (24).

Da un punto vista prognostico, la valutazione dello stato della parete vascolare attraverso le VEs potrebbe costituire una strategia nella prevenzione primaria della malattia aterosclerotica vascolare in pazienti asintomatici con aterosclerosi subclinica. Ad esempio, le VEs rilasciate dalle cellule endoteliali riflettono, attraverso la loro composizione molecolare, la presenza di una disfunzione endoteliale, evento decisivo nell'insorgenza dell'aterosclerosi. Difatti è stata osservata un'alterazione significativa nella concentrazione di VEs derivate da cellule endoteliali e da leucociti in un gruppo di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare (FH), nonostante questi fossero asintomatici e sottoposti a terapia ipolipemizzante. Gli stessi pazienti presentavano anche delle placche aterosclerotiche ricche di contenuto lipidico (25). Pazienti ad alto rischio di eventi cardiovascolari con aterosclerosi sub-clinica mostrano un elevato numero di VEs circolanti rilasciate da piastrine che trasportavano marcatori di attivazione piastrinica e del fattore tissutale. L'analisi di questo 'sottotipo' di VEs può migliorare l'accuratezza dei modelli di valutazione di rischio cardiovascolare nell'ambito dello studio dell'aterosclerosi subclinica (26). Pertanto, un aumentato livello circolante di VEs rilasciate da cellule infiammatorie e da piastrine può rappresentare un indicatore notevole di rischio aterosclerotico, confermando anche l'interazione tra infiammazione e trombosi. In un ulteriore studio, in pazienti con cardiopatia coronarica sottoposti a intervento di bypass aorto-coronarico, è stato valutato il profilo preoperatorio delle VEs circolanti in termini di numero, origi-

ne cellulare e fenotipo procoagulante. È emerso come il pattern preoperatorio delle VEs fosse stato un predittore indipendente di occlusione del graft nei pazienti sottoposti a bypass aorto-coronarico e che uno score cumulativo di VEs fosse stato in grado di stratificare tale rischio negli stessi pazienti. In questo caso specifico, poiché il profilo delle VEs rifletteva un'attivazione piastrinica in corso, si presuppone che i pazienti con uno score elevato di VEs avrebbero potuto beneficiare di una terapia antiplastrinica personalizzata (27).

Nell'ambito della relazione tra VEs e meccanismi correlati allo sviluppo e progressione dell'aterosclerosi, la proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) ricopre un ruolo non secondario. Infatti, tralasciando il ben noto ruolo di PCSK9 quale principale regolatore della colesterolemia LDL, la proteina PCSK9 è implicata anche in modo diretto nello sviluppo della placca aterosclerotica. PCSK9 può favorire direttamente il processo infiammatorio nelle lesioni aterosclerotiche, promuovendo l'infiltrazione di monociti nella placca e favorendo i macrofagi a secernere citochine infiammatorie (28). Da un punto di vista molecolare, nelle cellule dendritiche della placca, PCSK9 regola l'espressione del miR-27a che è coinvolto nel metabolismo dei lipidi (29). Uno studio epidemiologico condotto su 936 soggetti affetti da obesità (Indice di Massa Corporea = $33,3 \pm 5,6$ Kg/m²) e lieve ipercolesterolemia (LDL = $131,6 \pm 36,4$ mg/dL) ha dimostrato come la proteina PCSK9 potesse favorire non solo il rilascio di VEs derivate da componenti aterosclerotiche (come piastrine, endotelio, monociti/macrociti e neutrofilii), ma anche di VEs arricchite in miRNA correlati al processo aterosclerotico (hsa-miR-362, hsa-miR-150, hsa-miR-1244, hsa-miR-520b-3p e hsa-miR-638). In particolare, grazie all'utilizzo di un diagramma di Venn è stato possibile identificare come potenzialmente questi miRNA fossero in grado di regolare l'espressione genica del recettore delle LDL, del toll-like receptor 4 (TLR4) e il recet-

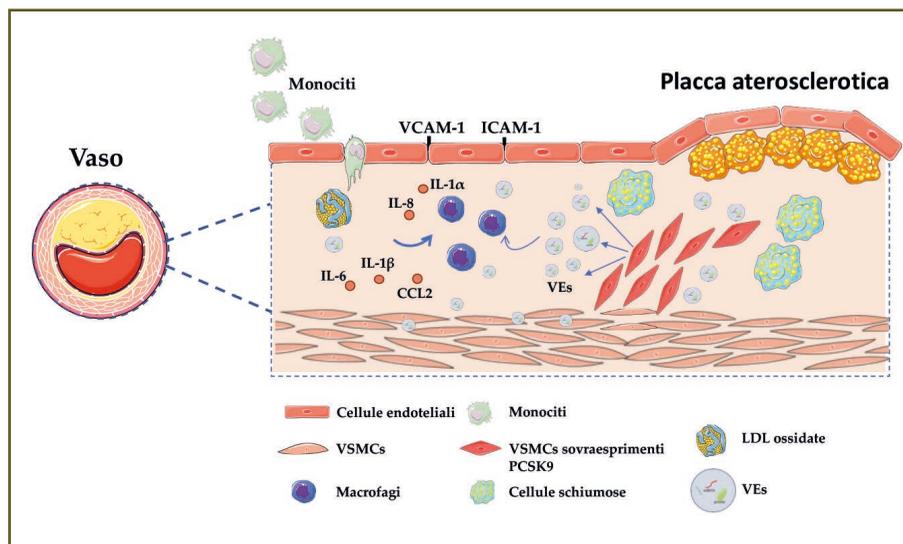
tore degli estrogeni, tutte componenti correlate al processo aterosclerotico (30).

In uno studio meccanicistico effettuato *in vitro* su alcuni elementi chiave nell'ambito della fisiopatologia dell'aterosclerosi, è stato dimostrato come le VEs rilasciate da cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) sovra-esprimenti PCSK9 (VSMC^{PCSK9}) fossero in grado di influenzare le cellule riceventi (endoteliali, monociti e macrofagi) inducendo un fenotipo 'pro-aterogeno'. Infatti, le VEs rilasciate dalle VSMC^{PCSK9}, rispetto a quelle rilasciate dalle VSMC native, quando utilizzate per trattare le cellule riceventi, favorivano un aumento della produzione di molecole di adesione, nelle cellule endoteliali, di citochine pro-infiammatorie, nei monociti e un'augmentata capacità di captare particelle di LDL ossidate nei macrofagi (31) (Figura 2).

In tale ambito è importante non solo sottolineare l'effetto diretto protrombotico di PCSK9 a livello piastrinico (32, 33), ma anche come il trattamento delle cellule mononucleate con PCSK9 avesse stimolato il rilascio di VEs con un fenotipo pro-coagulante (34).

L'interazione tra PCSK9 e VEs è stata studiata anche a livello della calcificazione delle cellule muscolari lisce. Per raggiungere tale obiettivo, sono stati utilizzati sia un modello murino (ratti iperuremici) che uno *in vitro* (VSMC^{PCSK9}). Nonostante le concentrazioni intracellulari di PCSK9 svolgano un'azione diretta sulla calcificazione vascolare, è stato anche osservato che, in condizioni di elevate concentrazioni di fosfato, una condizione che mima una situazione di calcificazione, le VSMC^{PCSK9} tendevano a rilasciare un'augmentata quantità di VEs, eterogenee nella loro origine e composizione. In aggiunta, queste VEs trasportavano al loro interno un'augmentata quantità di calcio e fosfatasi alcalina, fattori che contribuiscono ulteriormente al fenomeno di calcificazione (35).

Infine, non va trascurato il concetto che le VEs svolgono anche ruoli rigenerativi e riparatori nel contesto cardiovascolare. Il tessuto adi-

**Figura 2**

Rappresentazione schematica di un possibile ruolo delle vescicole extracellulari nei processi molecolari dell'aterosclerosi. Legenda. La sovraespressione della pro-proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) nelle cellule muscolari lisce (VSMC) favorisce il rilascio di vescicole extracellulari in grado di aumentare i processi infiammatori a livello delle componenti cellulari della placca aterosclerotica.

poso epicardico (EAT) funge da fonte di cellule stromali mesenchimali, una popolazione di cellule progenitrici multipotenti che promuovono la rigenerazione cardiaca in seguito a danno ischemico (36). In un modello di ratto soggetto a danno ischemico seguito da riperfusione, sono state somministrate VEs isolate da cellule stromali mesenchimali adipose. Questa somministrazione ha determinato una riduzione significativa della dimensione dell'infarto del miocardio, insieme a una diminuzione dei livelli circolanti di troponina cardiaca I e lattato deidrogenasi (37). Inoltre, nel contesto di un danno ischemico, è stato osservato che le VEs rilasciate dalle cellule staminali dell'EAT sono in grado di 'riprogrammare' i fibroblasti cardiaci maturi residenti, che subiscono uno 'switch' fenotipico verso quello di cardiomiociti, trasformandosi in elementi costituenti il miocardio stesso (38). L'EAT è fenotipicamente un tessuto adiposo bruno durante le prime fasi della vita e, nonostante aumenti la presenza di adipociti bianchi con l'età, tende a mantenere le caratteristiche brune. Le VEs derivate da questo EAT bruno svolgono un ruolo cruciale nella cardioprotezione. Veicolando al cuore i miRNA miR-125b-5p, miR-128-3p e miR-30d-5p, le VEs sono

in grado di sopprimere l'attivazione di vie pro-apoptotiche in un modello murino di lesione da ischemia/riperfusione del miocardio (39).

Conclusioni

Anche se molti passi devono ancora essere fatti al fine di superare i gap inerenti la standardizzazione nei metodi di isolamento e la caratterizzazione delle VEs, queste particelle emergono come promettenti biomarcatori di aterosclerosi subclinica e di malattia cardiovascolare a eziologia aterosclerotica. Infatti, nell'ambito della medicina di precisione, le VEs sono da considerarsi, a tutti gli effetti, delle "biopsie liquide". Nello specifico ambito cardiovascolare, le VEs non sono solo semplici indicatori di danno cellulare o indicatori di uno stato di malattia, ma sono anche da considerarsi effettori funzionali in alcuni processi alla base della progressione del processo aterosclerotico, quali l'infiammazione, la trombosi e la neoangiogenesi. Certamente per definire il collegamento tra le VEs e l'aterotrombosi sarà necessario implementare nuove tecnologie, come i modelli "vessel-on-chip", l'imaging in tempo reale e gli approcci omici.

RIASSUNTO

Le vescicole extracellulari (VEs) sono una popolazione eterogenea di nano-particelle rilasciate nella maggior parte dei fluidi biologici da quasi tutti i tipi cellulari, sia in condizioni fisiologiche che di malattia. Essendo in grado di trasportare un contenuto molecolare (tra cui proteine, acidi nucleici, e persino organuli interi e/o frammentati) da una cellula donatrice a una ricevente, le VEs non solo svolgono un ruolo fondamentale nella comunicazione paracrina ed endocrina tra cellule, ma rappresentano una fonte importante di informazioni di tipo molecolare. Queste caratteristiche rendono le VEs particolarmente interessanti nell'ambito dei processi fisiopatologici in ambito cardiovascolare. Difatti, alterazioni significative nella quantità, nella dimensione e nel contenuto proteico potrebbero associarsi con specifiche caratteristiche fisiopatologiche, tra cui, ad esempio, la severità del grado di danno endoteliale. Di conseguenza, le VEs godono di un potenziale clinico di notevole importanza e rappresentano un'impronta molecolare specifica utile sia in termini diagnostici che prognostici. Monitorando le caratteristiche delle VEs è possibile valutare l'insorgenza e l'andamento di determinate patologie 'silenti', come ad esempio l'aterosclerosi. In determinati contesti cardiovascolari, le VEs svolgono anche ruoli rigenerativi e riparatori. Ovviamente saranno necessari ulteriori studi e l'applicazione di nuove tecnologie per far sì che le VEs possano essere considerate veri e propri strumenti sia di diagnosi che di prognosi nell'ambito delle patologie a eziologia aterosclerotica.

Parole Chiave: *Vescicole extracellulari, aterosclerosi, PCSK9.*

Bibliografia

1. Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, et al. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology. *J Extracell Vesicles*. 2022 Jan; 11 (1): e12151. doi: 10.1002/jev2.12151.
2. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024 Feb; 13 (2): e12404. doi: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024 May; 13 (5): e12451.
3. Badimon L, Suades R, Vilella-Figuerola A, et al. Liquid Biopsies: Microvesicles in Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2020 Sep 20; 33 (9): 645-662. doi: 10.1089/ars.2019.7922. Epub 2019 Dec 17.
4. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Oct; 21 (10): 585-606. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y. Epub 2020 May 26.
5. Limpitikul W.B., Garcia-Contreras M., and Das S. The emerging role of extracellular vesicle RNAs as mediators of cardiometabolic diseases: from pathophysiology to clinical Applications. *Current Opinion in Physiology* 2024, 40: 100764 doi: 10.1016/j.cophys.2024.100764. Epub 2024 May 31.
6. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 23; 113 (8): E968-77. doi: 10.1073/pnas.1521230113. Epub 2016 Feb 8.
7. Mallia A, Gianazza E, Zoanni B, et al. Proteomics of Extracellular Vesicles: Update on Their Composition, Biological Roles and Potential Use as Diagnostic Tools in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Oct 19; 10 (10): 843. doi: 10.3390/diagnostics10100843.
8. Pfrieger FW, Vitale N. Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. *J Lipid Res*. 2018 Dec; 59 (12): 2255-2261. doi: 10.1194/jlr.R084210. Epub 2018 Apr 20.
9. Lozano-Andrés E, Enciso-Martinez A, Gijssbers A, et al. Physical association of low density lipoprotein particles and extracellular vesicles unveiled by single particle analysis. *J Extracell Vesicles*. 2023 Nov; 12 (11): e12376. doi: 10.1002/jev2.12376.
10. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem*. 2013 Oct; 394 (10): 1253-1262. doi: 10.1515/hsz-2013-0141.
11. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep*. 2020 Jan 23; 10 (1): 1039. doi: 10.1038/s41598-020-57497-7.
12. Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, et al. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Jun; 76(12):2369-2382. doi: 10.1007/s00018-019-03071-y. Epub 2019 Mar 19.
13. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A*. 2021 Jan 11; 1636:461773. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461773. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33316564.

14. Oksvold MP, Neurauder A, Pedersen KW. Magnetic bead-based isolation of exosomes. *Methods Mol Biol.* 2015; 1218: 465-81. doi: 10.1007/978-1-4939-1538-5_27.
15. Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell.* 2022 May 12; 185 (10): 1630-1645. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.004. Epub 2022 May 2.
16. Davidson SM, Boulanger CM, Aikawa E, et al. Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies: from exosomes to microvesicles. *Cardiovasc Res.* 2023 Mar 17; 119 (1): 45-63. doi: 10.1093/cvr/cvac031.
17. Konkoth A, Saraswat R, Dubrou C, et al. Multifaceted role of extracellular vesicles in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2021 Feb; 319: 121-131. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.11.006. Epub 2020 Nov 11.
18. Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J.* 2022 Feb 22; 43 (8): 716-799. doi: 10.1093/eurheartj/ehab892. Erratum in: *Eur Heart J.* 2022 Feb 04.
19. Chiva-Blanch G, Padró T, Alonso R, et al. Liquid Biopsy of Extracellular Microvesicles Maps Coronary Calcification and Atherosclerotic Plaque in Asymptomatic Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 May; 39 (5): 945-955. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.312414.
20. Montoro-García S, Shantsila E, Tapp LD, et al. Small-size circulating microparticles in acute coronary syndromes: relevance to fibrinolytic status, reparative markers and outcomes. *Atherosclerosis.* 2013 Apr; 227(2):313-22. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.028. Epub 2013 Jan 29.
21. Badimon L, Padro T, Arderiu G, et al. Extracellular vesicles in atherothrombosis: From biomarkers and precision medicine to therapeutic targets. *Immunol Rev.* 2022 Nov; 312(1):6-19. doi: 10.1111/imr.13127. Epub 2022 Aug 22.
22. Suades R, Padró T, Vilahur G, et al. Growing thrombi release increased levels of CD235a(+) microparticles and decreased levels of activated platelet-derived microparticles. Validation in ST-elevation myocardial infarction patients. *J Thromb Haemost.* 2015 Oct; 13 (10): 1776-1786. doi: 10.1111/jth.13065. Epub 2015 Sep 2.
23. Suades R, Padró T, Crespo J, et al. Circulating microparticle signature in coronary and peripheral blood of ST elevation myocardial infarction patients in relation to pain-to-PCI elapsed time. *Int J Cardiol.* 2016 Jan 1; 202: 378-387. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.09.011. Epub 2015 Sep 12.
24. Zarà M, Campodonico J, Cosentino N, et al. Plasma Exosome Profile in ST-Elevation Myocardial Infarction Patients with and without Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 28; 22 (15): 8065. doi: 10.3390/ijms22158065.
25. Caballero P, Alonso R, Rosado P, et al. Detection of subclinical atherosclerosis in familial hypercholesterolemia using non-invasive imaging modalities. *Atherosclerosis.* 2012 Jun; 222 (2): 468-472. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.043. Epub 2012 Mar 7.
26. Suades R, Padró T, Alonso R, et al. High levels of TSP1+/CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2015 Nov 25; 114 (6): 1310-1321. doi: 10.1160/TH15-04-0325. Epub 2015 Jul 16.
27. Camera M, Brambilla M, Canzano P, et al. Association of Microvesicles With Graft Patency in Patients Undergoing CABG Surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Jun 9; 75 (22): 2819-2832. doi: 10.1016/j.jacc.2020.03.073.
28. Macchi C, Ferri N, Sirtori CR, et al. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9: A View beyond the Canonical Cholesterol-Lowering Impact. *Am J Pathol.* 2021 Aug; 191 (8): 1385-1397. doi: 10.1016/j.ajpath.2021.04.016. Epub 2021 May 19.
29. Liu A, Frostegård J. PCSK9 plays a novel immunological role in oxidized LDL-induced dendritic cell maturation and activation of T cells from human blood and atherosclerotic plaque. *J Intern Med.* 2018 Apr 4. doi: 10.1111/joim.12758. Epub ahead of print.
30. Macchi C, Greco MF, Favero C, et al. Associations Among PCSK9 Levels, Atherosclerosis-Derived Extracellular Vesicles, and Their miRNA Content in Adults With Obesity. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jan 7; 8: 785250. doi: 10.3389/fcvm.2021.785250.
31. Greco MF, Rizzuto AS, Zarà M, et al. PCSK9 Confers Inflammatory Properties to Extracellular Vesicles Released by Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 28; 23 (21): 13065. doi: 10.3390/ijms232113065.
32. Camera M, Rossetti L, Barbieri SS, et al. PCSK9 as a Positive Modulator of Platelet Activation. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Feb 27; 71 (8): 952-954. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.069.
33. Qi Z, Hu L, Zhang J, et al. PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9) Enhances Platelet Activation, Thrombosis, and Myocardial Infarct Expansion by Binding to Platelet CD36. *Circulation.* 2021 Jan 5; 143(1):45-61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046290. Epub 2020 Sep 29. Erratum in: *Circulation.* 2021 Jan 5; 143 (1): e4. doi: 10.1161/CIR.0000000000000948.
34. Scalise V, Lombardi S, Sanguinetti C, et al. A novel prothrombotic role of proprotein convertase subtilisin kexin 9: the generation of procoagulant extracellular vesicles by human mononuclear cells. *Mol Biol Rep.* 2022 May; 49 (5): 4129-4134. doi: 10.1007/s11033-022-07433-x. Epub 2022 Apr 12.
35. Lupo MG, Bressan A, Donato M, et al. PCSK9 promotes arterial medial calcification. *Atherosclerosis.* 2022 Apr; 346: 86-97. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.01.015. Epub 2022 Jan 22.

36. Lambert C, Arderiu G, Bejar MT, et al. Stem cells from human cardiac adipose tissue depots show different gene expression and functional capacities. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Nov 29; 10 (1): 361. doi: 10.1186/s13287-019-1460-1.
37. Cui X, He Z, Liang Z, et al. Exosomes From Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017 Oct; 70 (4): 225-231. doi: 10.1097/FJC.0000000000000507.
38. Thankam FG, Sedighim S, Kuan R, et al. Ischemia challenged epicardial adipose tissue stem cells-derived extracellular vesicles alter the gene expression of cardiac fibroblasts to cardiomyocyte like phenotype. *Transl Res.* 2023 Apr; 254: 54-67. doi: 10.1016/j.trsl.2022.10.004. Epub 2022 Oct 21.
39. Zhao H, Chen X, Hu G, et al. Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection. *Circ Res.* 2022 May 13; 130 (10): 1490-1506. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320458. Epub 2022 Apr 7.