

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Fyziologie a patofyziologie člověka



Dizertační práce

Indikátory systémového zánětu při spontánním a instrumentálním porodu.

Vliv na neonatální koncentrace zánětových markerů.

Indicators of systemic inflammation in spontaneous and instrumental delivery.

Influence on neonatal concentrations of inflammatory markers.

Autor práce: MUDr. Michaela Šibíková

Školitel: Doc. MUDr. Jan Janota, Ph.D.

Konzultant: Doc. MUDr. Jan Živný, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3. LF UK) jsou totožné.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 6. 2021

MUDr. Michaela Šibíková

Podpis:

Identifikační záznam:

ŠIBÍKOVÁ, Michaela. Indikátory systémového zánětu při spontánním a instrumentálním porodu. Vliv na neonatální koncentrace zánětových markerů. [Indicators of systemic inflammation in spontaneous and instrumental delivery. Influence on neonatal concentrations of inflammatory markers]. Praha, 2021. Počet stran: 113, počet příloh: 3. Dizertační práce (PhD). Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta. Školitel: Doc. MUDr. Jan Janota, Ph.D. Pracoviště školitele: Novorozenecké oddělení s JIRP, Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol.

Poděkování:

Děkuji doc. MUDr. Janu Janotovi, Ph.D. za důvěru, vedení a trpělivost.

Děkuji doc. MUDr. Janu Živnému, Ph.D. za odborné konzultace a edukaci v oblasti laboratorních metod.

Děkuji své rodině za pomoc a podporu.

OBSAH:

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
KLÍČOVÁ SLOVA	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
1. ÚVOD	14
2. PŘEHLED SOUČASNÝCH POZNATKŮ	17
2.1. Zánět, systémový zánět a syndrom systémové zánětové odpovědi (SIRS)	17
2.2. Zánětové markery	22
2.2.1. Buněčné biomarkery – krevní obraz	22
2.2.2. Proteiny akutní fáze	23
2.2.2.1. C-reaktivní protein (CRP)	23
2.2.2.2. Prokalcitonin	23
2.2.2.3. Sérový amyloid A (SAA)	24
2.2.3. Endoteliální markery	24
2.2.3.1. Vazoaktivní substance	25
2.2.3.1.1. Oxid dusnatý (NO)	25
2.2.3.1.2. Prostacyklin a tromboxan A ₂	25
2.2.3.2. Cytokiny	26
2.2.3.3. Adhezivní molekuly	26
2.2.3.3.1. Selektiny	27
2.2.3.3.2. Integriny	28
2.2.3.3.3. Superrodina imunoglobulinových buněčných adhezivních molekul imunoglobulinů	28
2.2.3.4. Růstové a angiogenní faktory	29
2.2.3.5. Endoteliny	30
2.2.3.6. Endocan	31
2.3. Extracelulární vezikuly (EVs)	32
2.3.1. Buněčné membránové mikrovezikuly - mikrovezikuly odvozené z buněčné membrány	32
2.3.2. Tvorba mikrovezikul – obecné mechanismy	36
2.3.3. Clearance mikrovezikul z cirkulace	37
2.3.4. Detekce a měření koncentrace mikrovezikul	37

2.3.5.	Klasifikace, funkce a klinická relevance mikrovezikul	40
2.3.5.1.	Mikrovezikuly uvolňované z trombocytů	40
2.3.5.2.	Mikrovezikuly uvolňované z leukocytů	42
2.3.5.3.	Mikrovezikuly uvolňované z erytrocytů	42
2.3.5.4.	Mikrovezikuly uvolňované endotelovými buňkami	42
2.3.6.	Mikrovezikuly a zánětová reakce	45
2.3.6.1.	Mikrovezikuly a nemoci spojené s akutními zánětovými procesy	45
2.3.6.2.	Role mikrovezikul v lokálním a v systémovém zánětu	45
2.3.6.3.	Role mikrovezikul při sepsi a systémovém zánětu	46
2.4.	Zánět a endotel v období porodu	50
2.4.1.	Zánětová aktivita v období porodu	50
2.4.2.	Role endoteliálních zánětových markerů	51
3.	HYPOTÉZY	54
4.	CÍLE	55
5.	MATERIÁL A METODIKA	56
6.	VÝSLEDKY	58
7.	DISKUZE	60
8.	ZÁVĚR	62
9.	CONCLUSION	63
10.	POUŽITÁ LITERATURA	64
11.	PUBLIKACE AUTORA SOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ	84
12.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ A PŘEDNÁŠKOVÉ ČINNOSTI AUTORA	85
13.	PŘÍLOHY	87
13.1.	Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response	87
13.2.	Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns	99
13.3.	Spontaneous delivery is associated with increased endothelial activity in cord blood compared to elective cesarean section	107

ABSTRAKT

Zánětový proces, jehož součástí je aktivace endotelu, je jedním z možných mechanismů spojovaných se zahájením spontánního porodu. Způsob porodu může ovlivnit stanovení normálních rozmezí koncentrací biomarkerů využívaných pak k detekci novorozeneckých patologií.

Cílem práce je posouzení zánětové reakce a aktivace endotelu u novorozenců po spontánním porodu a po elektivním císařském řezu a sledování jejich vývoje bezprostředně po porodu.

Studijní skupinu tvořili novorozenci a jejich matky po nekomplikované graviditě a spontánním vaginálním porodu (spontánní skupina) a po elektivním/plánovaném císařském řezu (elektivní skupina). Zkoumané vzorky pacientů byly odebrány z pupečnickové krve a z periferní venózní krve novorozence mezi 48.-72. hodinou života. Solubilní biomarkery byly měřeny pomocí multiplexní imunoanalýzy založené na platformě Luminex® xMAP. Koncentrace mikrovezikul a povrchově antigenově specifických mikrovezikul byla stanovena průtokovou cytometrií.

Prokázali jsme zvýšené koncentrace solubilních endoteliálních markerů a endoteliálních mikrovezikul v pupečnickové krvi po spontánním vaginálním porodu ve srovnání s plánovaným císařským řezem. V době 48-72 hodin po porodu došlo u většiny měřených solubilních endoteliálních markerů ke zvýšení koncentrací u obou skupin pacientů (novorozenci po spontánním vaginálním porodu a novorozenci po elektivním císařském řezu) ve srovnání s pupečnickovou krví.

Zvýšené koncentrace endoteliálních markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi při spontánním porodu mohou odrážet přirozenou aktivaci krevních buněk a vaskulatury včetně endotelových buněk spojených se zahájením porodu. Rostoucí poporodní koncentrace endoteliálních markerů jsou pravděpodobně důsledkem poporodní aktivace vrozené imunity novorozence exogeními podněty. Naše práce je první studie popisující koncentrace solubilních endoteliálních zánětových markerů a endoteliálních mikrovezikul v periferní krvi novorozenců v závislosti na různých typech porodu.

ABSTRACT

The inflammatory process, associated with endothelium activation, is one of the possible mechanisms of the initiation of spontaneous delivery. The mode of delivery may affect the concentrations of inflammatory molecules and microvesicles produced by endothelial cells. These biomarkers might be used to detect neonatal pathologies.

The aim of our study was to assess endothelial biomarkers in cord and neonatal blood following different modes of delivery: i.e. spontaneous vaginal delivery and elective cesarean section.

The study group consisted of neonates and their mothers after uncomplicated pregnancy and spontaneous vaginal delivery (spontaneous group) and after elective caesarean section (elective group). The patient samples were taken from the cord blood and from the peripheral venous blood of the newborns between 48-72 hours of life. Soluble biomarkers were measured using a multiplex immunoassay based on the Luminex® xMAP platform. The concentration of microvesicles and surface antigen-specific microvesicles was determined by flow cytometry.

We found significantly increased concentrations of cord blood soluble endothelial markers and cell-membrane derived endothelium specific microvesicles after spontaneous vaginal delivery compared to elective cesarean section. Irrespective of the delivery mode endothelial markers were significantly increased in neonatal compared to cord blood.

Increased cord blood concentrations of endothelial markers and microvesicles in spontaneous delivery may reflect the natural activation of blood cells and vasculature including endothelial cells associated with the initiation of labor. The increase of endothelial biomarkers in neonatal samples in 48 to 72 hours after both spontaneous and instrumental delivery can be explained as a possible consequence of activation of the innate immunity of the newborn by natural exogenous stimuli. This is so far the first study describing the concentrations of cord blood and neonatal endothelial microvesicles together with soluble plasma endothelial markers in different modes of delivery in uncomplicated term pregnancies and healthy term newborns.

Klíčová slova: zánět, zánětové markery, mikrovezikuly, endotel, porod, novorozenec

Key words: inflammation, inflammatory markers, microvesicles, endothelial cells, delivery, newborn

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	Aminokyseliny
ARDS	Akutní respirační selhání (<i>Acute respiratory distress syndrome</i>)
ATP	Adenosintrifosfát
Ca ²⁺	Ionty kalcia
CAMs	Molekuly buněčné adheze (<i>Cell adhesion molecules</i>)
CMP	Cévní mozková příhoda
CRP	C – reaktivní protein
DAMPs	S poškozením asociované molekulární vzorce (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DLS	Dynamický rozptyl světla
ELAM 1	Molekula adheze endoteliálních leukocytů 1 (<i>Endothelial leucocyte adhesion molecule</i>)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EDRF	Z endotelu derivovaný relaxační faktor (<i>Endothelium - derived relaxing factor</i>)
ETA	Receptor endotelinu A
ETB	Receptor endotelinu B
EVs	Extracelulární vezikuly
G-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů (<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>)
HDL	High density lipoproteins
HMGB1	High mobility group box-1
IaI _p	Interalpha inhibitor proteins

IBD	Idiopatický střevní zánět (<i>Infalmmatory bowel disease</i>)
ICAMs	Intercelulární adhezivní molekuly (<i>Intercellular adhesion molecules</i>)
IgSF CAMs	Superrodina imunoglobulinových buněčných adhezivních molekul
ILV	Intraluminální mikrovezikuly
IL-1 α	Interleukin 1 alfa
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LBP	Protein vážící lipopolysacharid (<i>Lipopolysaccharide - binding protein</i>)
LPS	Lipopolysacharid
MBL	Lektin vážící manózu (<i>Mannose - binding lectin</i>)
MCP-1	Monocytární chemoatraktantní protein
MODS	Syndrom multiorgánové dysfunkce (<i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>)
MOF	Multiorgánové selhání (<i>Multiple organ failure</i>)
MS	Hmotnostní spektrometrie
MVB	Multivezikulární tělíska (<i>Multivesicular bodies</i>)
MVs	Mikrovezikuly
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
NCAMs	Adhezivní molekuly nervových buněk (<i>neural cell adhesion molecules</i>)

NF-kB	Nukleární faktor kappa B
NO	Oxid dusnatý (<i>nitric oxide</i>)
NOS 1, 2, 3	Syntázy oxidu dusnatého
NTA	Analýza založená na sledování nanočástic (<i>Nanoparticle tracking analysis</i>)
PADGEM	Platelet activation-dependent granule external membrane
PAI-1	Inhibitor aktivátoru plasminogenu-1
PAMPs	S patogeny asociované molekulární vzorce (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCT	Prokalcitonin
PDGF	Růstový faktor odvozených z destiček (<i>Platelet derived growth factor</i>)
PECAM-1	Molekula adheze endotelových buněk trombocytů (<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PGH2	Prostaglandin H2
PGI2	Prostacyklin
PNH	Paroxysmální noční hemoglobinurie
PolyLacNAc	Polylaktosamin
PRRs	Recetory rozpoznávající buněčné vzorce (<i>Pattern recognition receptors</i>)
PSGL-1	P-selektinový glykoproteinový ligand 1
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku reactive oxygen species
TXA2	Tromboxan A2
TLR 4	Toll-like receptory 4

TNF	Tumor necrosis factor
TNF- α	Tumor necrosis factor alfa
TTP	Trombotická trombocytopenická purpura
SAA	Sérový amyloid A
SIRS	Syndrom systémové zánětové odpovědi (<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>)
S100A8	Calgranulin A
S100A9	Calgranulin B
VCAMs	Adhezivní molekuly vaskulárních buněk (<i>Vascular cell adhesion molecules</i>)
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

1. ÚVOD

Zánět je komplexní odezva tkání na infekční a neinfekční podněty. Zánětová reakce je doprovázena stimulací, aktivací, dysfunkcí a případně i poškozením endotelu. Zánětový proces, při kterém dochází k aktivaci endotelu, je jedním z možných mechanismů spojovaných s iniciací spontánního porodu (Šibíková et al. 2018).

Endotel hraje důležitou roli v mnoha fyziologických funkcích organismu, při ovlivnění vaskulárního tonu, transportu krevních buněk, udržení hemostatické rovnováhy, permeability, proliferace cév a při ovlivnění vrozené i získané imunity. Endotel je zapojený do většiny patologických stavů, a to buď jako primární cíl patogenního inzultu, nebo sekundárně, v důsledku poškození vaskularizovaných tkání. Během aktivace uvolňují endotelové buňky molekuly, které se podílí na regulaci zánětové reakce. Tyto molekuly-biomarkery lze využít v diagnostice nebo přímo jako cílové molekuly pro ovlivnění zánětové odpovědi. Biomarkery endoteliální aktivace a dysfunkce v periferní krvi mohou být využity v diagnostice a posouzení závažnosti onemocnění u dospělých, dětí a novorozenců (Paulus et al. 2011, Aird 2008). Onemocnění, která se objeví během těhotenství a porodu, jako je diabetes mellitus, hypoxie nebo mateřská infekce, mohou ovlivnit funkci endotelu a produkci zánětových a endoteliálních biomarkerů. Zvýšené koncentrace endoteliálních markerů byly detekovány při specifických komplikacích doprovázejících graviditu i porod, jako např. preeklampsie, hypertenze (Prohazka et al. 2015, Verlohren et al. 2017, Troncoso et al. 2017). Spontánní i instrumentální porod (i bez specifických mateřských patologií během gravidity) jsou také doprovázené fyziologickou zánětovou reakcí. Intenzita této reakce může být ovlivněna typem porodu. V průběhu těhotenství a porodu dochází k fyziologické aktivaci zánětové odpovědi. Úloha endotelových buněk při této zánětové odpovědi není objasněna a v současné době jsou dostupné pouze omezené informace týkající se endotelových biomarkerů u novorozenců z fyziologické gravidity v závislosti na různých způsobech porodu. Další výzkum zánětových markerů u specifických neonatálních patologií pak musí vycházet ze zjištěných koncentrací modifikovaných typem porodu (Aksoy et al. 2015, Malamitsi-Puchner et al. 1999, Malamitsi-Puchner 2000).

Somatické buňky, včetně endoteliálních buněk, produkují vezikuly odvozené z buněčné membrány. Patří mezi ně zejména exozomy, mikrovezikuly a apoptotická tělíska. Mikrovezikuly jsou považovány za důležité mediátory a indikátory buněčné aktivace, apoptózy nebo poškození tkání. Jsou uvolňovány pučením a následným oddělením z plazmatické membrány většiny eukaryotických buněk podstupujících aktivaci a vyznačují se expozicí membránových proteinů a zbytků fosfatidylserinu na jejich vnějším povrchu (Freyssinet 2003, Vítková et al. 2018). Zvýšená hladina cirkulujících mikrovezikul je spojena s různými cévními patologiemi, zánětem, maligními a hematologickými poruchami, a také s patologiemi, které jsou specifické pro graviditu (Simak et al. 2014, Campello et al. 2015). Změny v koncentraci endoteliálních mikrovezikul byly detekovány a kvantifikovány u procesů spojených se zánětovou odpovědí u dospělých. Informace o koncentraci endoteliálních biomarkerů a endoteliálních mikrovezikul u novorozenců chybí, stejně jako chybí data vztažená k různým situacím, či patologickým stavům, které doprovázejí prenatální, peripartální a časně postnatální období.

Biomarkery, uvolňované při aktivaci a poškození endotelu v průběhu porodu u matek a jejich novorozenců, lze považovat za potenciální diagnostické markery časně detekce nemocí, které mají negativní dopad na novorozeneckou mortalitu a morbiditu. Jejich průkaz a kvantifikace může vést ke snížení úmrtnosti novorozenců i jejich dlouhodobé nemocnosti. K dispozici máme omezené informace o endoteliální aktivaci u různých typů porodu. Stav aktivace endotelu v perinatálním období může ovlivnit klinické hodnocení patologických stavů jako je například novorozenecká hypoxie, respirační selhání a novorozenecká seps. Mezi markery provázející endoteliální aktivaci patří solubilní molekuly a endoteliální mikrovezikuly. Komplexní posouzení mateřských a novorozeneckých biomarkerů produkovaných endotelem (vazoaktivní látky, cytokiny, adhezivní molekuly, růstové a angiogenní faktory, mikrovezikuly) v perinatálním období a u různých typů porodů ještě nebylo provedeno.

Cílem naší práce je zjištění koncentrací solubilních endoteliálních markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi a novorozenecké periferní krvi mezi 48.-72. hodinou života u novorozenců stratifikovaných podle typu porodu. Pokud se

endoteliální a zánětová aktivita podílí na iniciaci, nebo průběhu spontánního porodu, musí se tento proces odrazit ve výsledné koncentraci biomarkerů zánětu v závislost na typu porodu. To může ovlivnit stanovení normálních rozmezí koncentrací biomarkerů využívaných pak k detekci novorozeneckých patologií.

Dalším cílem je prozkoumat koncentrace biomarkerů zánětu v periferní krvi novorozenců, sledovat jejich vývoj a možné faktory, které ovlivňují měnící se koncentraci biomarkerů bezprostředně po narození.

2. PŘEHLED SOUČASNÝCH POZNATKŮ

2.1. Zánět, systémový zánět a syndrom systémové zánětové odpovědi (SIRS)

Zánět je definován jako komplexní systém obranných reakcí vaskularizované tkáně organismu na patogenní podněty (inzulty) různého charakteru. Jeho cílem je eliminovat příčinu, odstranit nevratně poškozenou tkáň a následně umožnit regeneraci a reparaci tkání, která vede k obnovení metabolismu a funkce postiženého orgánu do stavu dynamické rovnováhy. Zánětovou odpověď vyvolávají patogenní podněty různého charakteru: biologické (mikroorganismy, paraziti), fyzikální (trauma, záření), chemické (toxiny, jedy, žíraviny), metabolické (hypoxie, malnutrice, metabolické poruchy), imunologické (autoimunitní onemocnění, alergen) a další endogenní poruchy neurohumorálních regulací a exogenní spouštěče (Šibíková et al. 2018).

Molekulární podněty spouštějící zánětovou reakci dělíme do dvou obecných kategorií: molekulární struktury asociované s patogenem, které zahajují a udržují infekční zánětovou odpověď (*PAMPs-Pathogen-associated molecular patterns*) a molekulární struktury asociované s tkáňovým poškozením, což jsou molekuly, které iniciují a zároveň udržují neinfekční zánětovou odpověď (*DAMPs-damage-associated molecular patterns*) (Janeway 1989, Šibíková et al. 2018, Takeuchi and Akira 2016).

PAMPs jsou molekulární struktury typické pro patogenní mikroorganismy, které nejsou běžně tvořeny buňkami hostitele. PAMPs struktury mohou být proto účinně rozeznávány mechanismy vrozené imunity. K typickým PAMPs strukturám patří lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, peptidoglykany grampozitivních bakterií nebo také glukany a mannany hub a kvasinek (Šibíková et al. 2018, Takeuchi and Akira 2016).

DAMPs jsou molekuly, které jsou známy také jako alarminy (Janeway 1989). Uvolňují se z poškozených buněk nebo buněk při stresových reakcích, jako jsou proteiny tepelného šoku. DAMPs jsou často proteiny pocházející z jádra či cytosolu buněk. Při jejich uvolnění z buňky či expresi na povrchu buňky po poranění tkáně, se pohybují z redukčního do oxidačního prostředí, což způsobí jejich denaturaci (Rubartelli and Lotze 2007). Mezi nejznámější DAMPs patří HMGB1 (high mobility group box-1), S100A8 (calgranulin A), S100A9

(calgranulin B) a sérový amyloid A (SAA). Zvýšené sérové hladiny molekul DAMPs jsou asociovány s mnoha zánětovými chorobami (sepsa, artritida, ateroskleróza, systémový lupus erythematosus, Crohnova choroba) a malignitami.

PAMPs a DAMPs jsou rozpoznávány specifickými receptory pro rozpoznávání patogenních struktur (*PRR – pattern recognition receptors*). PRRs jsou přítomné na povrchu buněk, tzv. transmembránové receptory (např. Toll-like receptory, lektinové receptory typu C, manózoový receptor, galaktózoový receptor) nebo v cytosolu, tzv. cytoplazmatické (např. RIG I-like receptory, NOD-like receptory) (Šibíková et al. 2018, Takeuchi and Akira 2006).

PRRs jsou exprimovány v různých buňkách. Interakce PAMPs nebo DAMPs s PRRs vede k aktivaci signálních drah, včetně aktivace kináz nukleárního faktoru- κ B (NF- κ B) a MAP kináz, což vede k regulaci transkripce genů podílejících se na zánětových reakcích (Takeuchi and Akira 2010, Salvador et al. 2016). Interleukin-1 (IL-1) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) patří mezi cytokiny, které se uvolňují jako první, a které dále zesilují prozánětovou buněčnou signalizaci tím, že aktivují proces štěpení inhibitoru NF- κ B (I κ B). NF- κ B se následně přemísťuje do jádra, kde zvyšuje expresi dalších prozánětových cytokinů (Cavaillon and Adrie 2009).

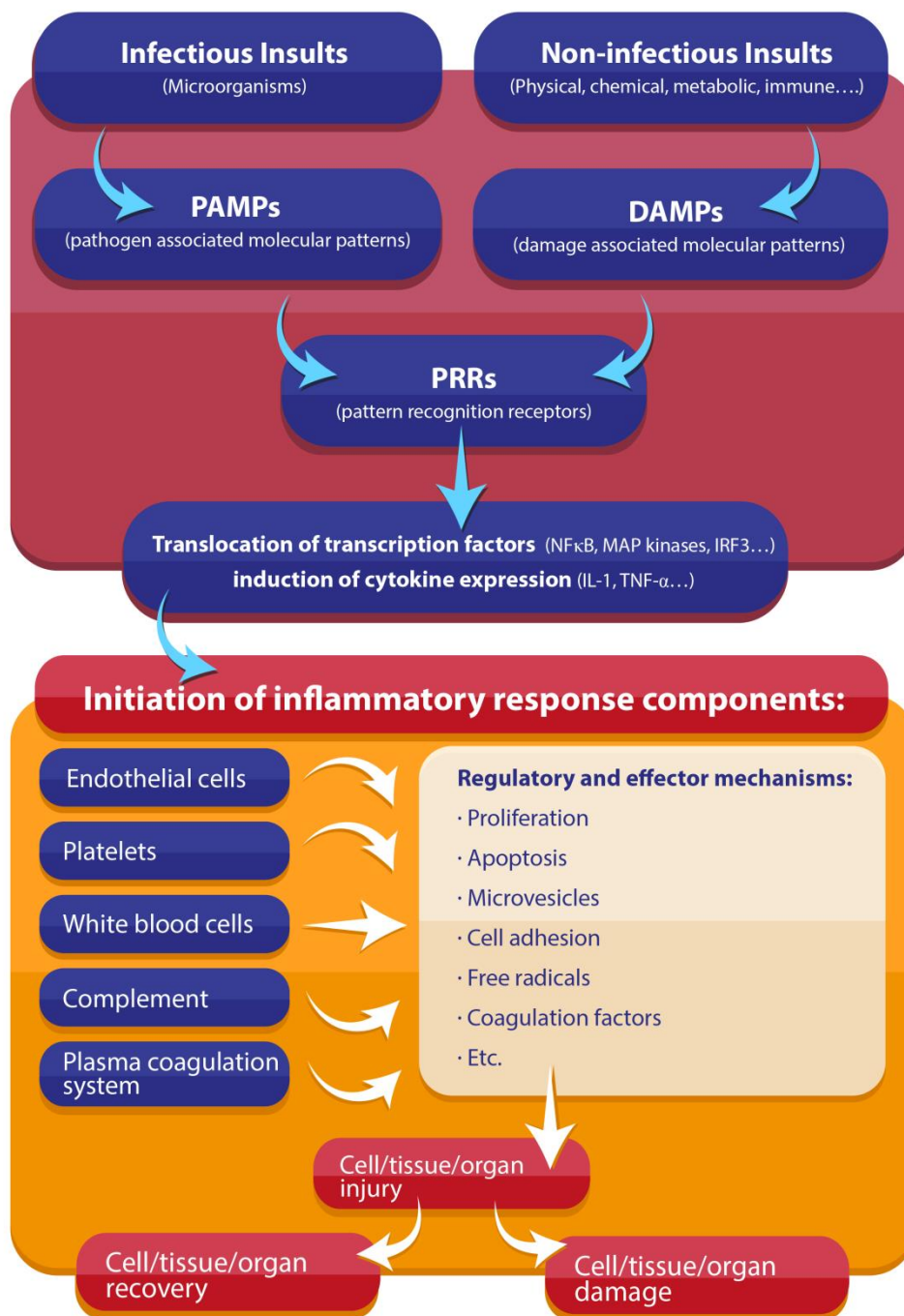
Zánětová reakce je soubor dějů, který je zprostředkován spoluprací pěti komplexních buněčných a humorálních systémů a jejich regulátorů: endoteliálních buněk, krevních destiček, bílých krvinek, plazmatického koagulačního systému a komplementu. Reakce na intenzivní inzult spouští zánětovou reakci, tedy kaskádu dějů s produkcí a uvolňováním různých humorálních regulátorů včetně cytokinů. Cytokiny jsou uvolňovány monocyty, tkáňovými makrofágy, žírnými buňkami, krevními destičkami a endotelovými buňkami (Cavaillon and Adrie 2009). Prozánětové cytokiny působí na tkáň buď přímo, nebo prostřednictvím sekundárních mediátorů, které vedou k aktivaci koagulační a komplementové kaskády, kdy dochází k uvolnění oxidu dusnatého, faktoru aktivujícího destičky, prostaglandinů a leukotrienů (Cavaillon and Adrie 2009, Sitia et al. 2010). Tento komplexní proces může vyústit až v orgánovou dysfunkci prostřednictvím specifického (cytokiny) a nespecifického (reaktivní formy kyslíku, hydrolytické

enzymy) poškození tkání. (Cavaillon and Adrie 2009, Goris 1996, Šibíková et al. 2018).

Zánět je reakce vaskularizované tkáně na inzult (Obrázek 1). Z hlediska lokalizace ho dělíme na zánět lokální nebo systémový, z hlediska regulace na zánět obranný a autoagresivní, podle toho jaký je výsledný efekt zánětového procesu na postiženou tkáň a celý organismus. Lokální reakce je omezena na poškozenou tkáň a způsobuje přechodnou dysfunkci tkáně s možným trvalým funkčním anebo strukturálním poškozením. Systémový zánět je způsobený systémovou progresí lokálního zánětu nebo inzultem systémového charakteru a je doprovázen dysfunkcemi více orgánů, které mohou vést až k syndromu multiorgánové dysfunkce (*MODS – Multiple organ dysfunction syndrome*) nebo k multiorgánovému selhání (*MOF – Multiple organ failure*) a v důsledku intenzivního zánětu nakonec až ke smrti (Cavaillon and Adrie 2009, Goris 1996, Bone et al. 1992).

Obranný zánětový proces lidského těla představuje komplex prozánětových a protizánětových reakcí. Bez ohledu na etiologii (typ inzultu) tyto reakce na sebe navazují a vzájemně se ovlivňují, výsledkem systémového zánětu je soubor klinických a laboratorních příznaků, které se nejčastěji označují jako syndrom systémové zánětové odpovědi (*SIRS-Systemic inflammatory response syndrome*) (Bone et al. 1992, Matsuda and Hattori 2006, Robertson and Coopersmith 2006, Tang et al. 2007, Lee et al. 2009, Lucignano et al. 2011, Balk 2014, Davis et al. 2017, Sauaia et al. 2017, Pittet et al. 1995). Etiologie SIRS zahrnuje infekční onemocnění, chirurgické intervence, trauma, intoxikace a také komplikace terapie. Klinické příklady hlavních infekčních příčin SIRS jsou: bakteriální sepsa, systémová kandidóza, systémové virové infekce, syndrom toxického šoku a infekční komplikace popálenin. Mezi hlavní neinfekčních příčiny SIRS patří autoimunitní poruchy, popáleniny, otravy, úrazy elektrickým proudem, hemoragický šok, malignity, infarkt myokardu, těžké srdeční arytmie, pankreatitida, vaskulitida, chirurgické zákroky a transfuzní reakce (Cavaillon and Adrie 2009, Balk 2014, Pittet et al. 1995, Rangel-Fausto et al. 1995, Singer et al. 2016).

Všechny buňky účastníci se systémové zánětové reakce produkují mikrovezikuly a jejich rozlišení a kvantifikace by mohly pomoci při hledání nových definic a způsobů detekce a determinace závažnosti a progresu infekčních a neinfekčních zánětových procesů (Burger et al. 2013).



Obrázek 1.:

Zánětová reakce na infekční a neinfekční podněty: mechanismy vedoucí k dysfunkci buněk a tkání. Počáteční kroky zahrnují aktivaci endotelových buněk a buněk vrozené imunity prostřednictvím receptorů pro rozpoznávání podnětů (PRRs) (Šibíková et al. 2018).

2.2. Zánětové markery

Zánětové markery jsou různorodé biomarkery, které se v praxi používají k hodnocení přítomnosti/absence aktivního zánětového procesu nebo k určení aktivity známe nemoci. Biomarker (biologický ukazatel) je celulární nebo molekulární indikátor expozice, účinku a vnímavosti. Pomocí biomarkerů je možné měřit biologicky účinnou dávku, časnou biologickou odpověď, alteraci struktur nebo funkcí a vnímavost organismu na infekci. Ideální biomarker by měl mít vysokou senzitivitu (100 %), specificitu >85 %, vysokou negativní prediktivní hodnotu (100 %) a pozitivní prediktivní hodnotu >85% (Hendricks-Munoz et al. 2014).

Zvýšení koncentrace zánětových markerů nacházíme u širokého spektra onemocnění, od aterosklerózy až po psychická onemocnění. Jejich důležitými charakteristikami jsou schopnost rozlišit etiologii systémové zánětové odpovědi (infekční versus non-infekční) a krátký biologický poločas. Při laboratorním měření biomarkerů jsou důležité standardizované postupy, standardní a spolehlivé referenční hodnoty, minimální laboratorní náročnost, dostupnost, rychlá proveditelnost a příznivý poměr cena/výkon (Hendricks-Munoz et al. 2014).

Klíčovými a standardně používanými zánětovými markery v humánní medicíně jsou změny v počtu leukocytů, C-reaktivní protein (CRP), prokalcitonin (PCT) a Interleukin-6 (IL-6). V současné době jsou však intenzivně studovány i proteiny akutní fáze, cytokiny, povrchové antigeny leukocytů a jejich solubilní formy. Recentní studie prezentují možnost diagnostiky zánětu pomocí detekce extracelulárních vezikul, které jsou uvolňovány buňkami působením různých stresových signálů včetně infekce. (Watson 2012, Aljoe 2018, Rodrigue et al. 2018, Bai et al. 2020)

2.2.1. Buněčné biomarkery – krevní obraz

Počet leukocytů, absolutní počet neutrofilů a počet nezralých forem, resp. poměr nezralých a všech neutrofilů (I/T index) jsou běžně používány v diagnostice infekce a systémové bakteriální infekce-sepse. Jejich senzitivita a specificita v predikci sepse je relativně nízká (Gerdes 1991, Horník 2012, Del Vecchio 2014).

2.2.2. Proteiny akutní fáze

Proteiny akutní fáze jsou endogenní peptidy primárně produkované v játrech během akutní zánětové odpovědi organismu na infekční či neinfekční podnět.

2.2.2.1. C-reaktivní protein (CRP)

C-reaktivní protein je produkován během zánětové reakce v hepatocytech po stimulaci cytokiny (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α). Má opsonizační funkci a účastní se aktivace komplementu a aktivuje expresi prozánětových mediátorů. Biologický poločas CRP je 19-24 hodin. Vzestup hladiny CRP můžeme detekovat v plasmě za 6-8 hodin, maximum za 24-48 hodin po iniciaci zánětové odpovědi, přičemž se jeho hodnota může zvýšit až tisícinásobně (Volankis 2001, Pepys 2003). Jeho nevýhodou je, že koncentrace může být ovlivněna neinfekčními komplikacemi v perinatálním období. (Kääpä and Koistinen 1993). Kinetika CRP v prvních dnech po narození je závislá na gestačním stáří novorozence. CRP je nejvíce studovaným a nejčastěji používaným biomarkerem infekce. V klinické praxi vhodné ho vždy kombinovat s dalšími biomarkery (Hofer 2012).

2.2.2.2. Prokalcitonin

Prokalcitonin (PCT) je produkován za fyziologických podmínek C-buňkami štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. V případě zánětového procesu, zejména infekční etiologie, je PCT produkován v parenchymatosech orgánech a buňkách neuroendokrinního systému, predominantně v hepatocytech (po stimulaci IL-6 a TNF- α) a monocitech, kdy je jeho produkce stimulována lipopolysacharidy (LPS). Jeho hladiny jsou u zdravých jedinců velmi nízké, při bakteriální infekci se jeho koncentrace mohou zvýšit až na hodnoty >1000ng/ml. V případě infekce hladina prokalcitoninu vzrůstá 3-4 hodiny, a maxima dosahuje za 8-12 hodin. Po vzestupu hladiny prokalcitoninu následuje fáze plateau. Biologický poločas je 25-30 hodin a jeho sérové koncentrace klesají velmi rychle po zahájení terapie antibiotiky, a proto je vhodný k monitorování úspěšnosti léčby. Používá se zejména při diagnostice septických stavů. Senzitivita je v diagnostice časně sepse novorozence ovlivněna jeho fyziologickým zvýšením

po porodu v prvních 48 hodinách a neonatální morbiditou (syndrom dechové tísně, intrakraniální krvácení, oběhové selhání, hypoxie, pneumotorax, resuscitace (Pacifico 2013, Chiesa 2015).

2.2.2.3. Sérový amyloid A (SAA)

Sérový amyloid patří do skupiny apoproteinů asociovaných s HDL. Cirkulující SAA se syntetizuje v játrech po stimulaci hepatocytů cytokiny (IL-1, IL-6 a TNF- α). Ovlivňuje chemotaxi, adhezi a fagocytózu neutrofilů. V klinické praxi se používá pro detekci infekce (bakteriální i virové), traumat a myokardiální dysfunkce. (Arnon 2007, Malle and De Beer 1996, Nakayama 1993).

Mezi další proteiny akutní fáze, které jsou signifikantně zvýšené v souvislosti s porodem a novorozencem, zejména u neonatální sepse, ale nemají klinické využití, patří: alfa1-antitrypsin, fibronectin, haptoglobin, lactoferin, neopterin, orosomucoid (Baek 2003, Balduyck 2000, Chaaban 2009).

2.2.3. Endoteliální markery

Endotel je plochý jednovrstvý epitel mezenchymálního původu tvořící vnitřní výstelku srdce, krevních a lymfatických cév. Ve velkých cévách mají endotelové buňky polygonální tvar, v menších cévních kmenech jsou protáhlého tvaru ve směru krevního proudu. Endotel působí jako selektivní bariéra mezi krví a subendotelovými tkáněmi. Propustnost endotelu je dána četností výskytu a strukturou mezibuněčných spojení, která zajišťují mechanickou odolnost endotelové výstelky. Obecně jsou nejčetnější v arteriální části řečiště a nejtěsnější jsou v arteriolách. Mezibuněčná spojení jsou dynamického charakteru a přizpůsobují se podle aktuálního stavu organismu. Endotelové buňky jsou vybaveny stejnými organelami jako ostatní buňky. Charakteristickou strukturou jsou inkluze tyčinkovitého tvaru, tzv. Weibel-Paladeho tělíska, která obsahují von Willebrandův faktor. Endotel je tvořený pluripotentní buněčnou populací, která řídí reakci cévní stěny. Endotelové buňky jsou schopné reagovat na fyzikální a chemické podněty produkcí faktorů, které regulují vaskulární tonus, koagulaci, adhezi krevních destiček, buněčnou adhezi, proliferaci buněk hladkého svalstva,

imunitní funkce a kontrolují objem a obsah elektrolytů v intravaskulárním a extravaskulárním prostoru. Endoteliální dysfunkce je obecně definována jako nerovnováha mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními látkami, které jsou produkovány endotelem (Biel et al. 2018).

Mezi endoteliální markery zánětu patří vazoaktivní substance, cytokiny, adhezivní molekuly, růstové a angiogenní faktory, endoteliny a endocan (Biel et al. 2018).

2.2.3.1. Vazoaktivní substance

2.2.3.1.1. Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý je důležitá buněčná signální molekula, která se účastní mnoha fyziologických a patofyziologických procesů. NO je plyn uvolňovaný endotelem (endotelem derivovaný relaxační faktor - Endothelium-Derived Relaxing Factor /EDRF/). Syntetizuje se z L-argininu katalytickým působením NO syntázy. Známe jsou tři formy: NOS1 se nachází v mozku, NOS2 se vyskytuje v makrofázích a dalších buňkách imunitního systému a NOS3 v endoteliálních buňkách (Beilman 2004, Hirs and Robson 2010). Syntázy jsou aktivovány látkami, které zvyšují intracelulární koncentraci ionizovaného vápníku. Oxid dusnatý produkováný endotelovými buňkami difunduje do buněk hladkého svalstva vaskulární stěny a aktivuje guanylátcyklázu, a tím způsobuje cévní vazodilataci. Poločas oxidu dusnatého je jen několik sekund, z toho důvodu není tento marker vhodný pro detekci poškození endotelu (Beilman 2004, Hirs and Robson 2010).

2.2.3.1.2. Prostacyklin a tromboxan A2

Prekurzorem prostacyklinu a tromboxanu A2 je kyselina arachidonová, která se účastní konverze cyklooxygenázy na prostaglandin H2 (PGH2). Prostacyklin (PGI2) je syntetizován z prostaglandinu H2 působením endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva cév účinkem prostacyklin-syntázy. PGI2 inhibuje agregaci destiček a vazodilataci. Poločas PGI2 je 42 sekund. (Stitham et al. 2011) Druhou vazoaktivní látkou je tromboxan A2 (TXA2) syntetizovaný z PGH2 pomocí tromboxan-syntázy. TXA2 podporuje agregaci krevních destiček a

vazokonstrikci. V některých případech (např. při ischemicko-reperfuzním poškození) je vylučován patologický tromboxan A, který je méně účinný než tromboxan A₂ (Nakahata 2008, Cheng 2002).

2.2.3.2. Cytokiny

Cytokiny jsou proteiny, které regulují komunikaci a interakce mezi buňkami. Tyto látky jsou regulátory reakce na infekční podnět, imunitních procesů, zánětu a traumatu. Interleukin 1 (IL-1) má velké množství funkcí. Je zodpovědný za vyvolání horečky, zvýšení počtu cirkulujících neutrofilů, zvýšení přilnavosti leukocytů k endotelu, zvýšení sekrece prostaglandinů a zvýšení propustnosti kapilár. IL-1 zvyšuje expresi adhezivních molekul na endotelových buňkách, umožňující vstup imunokompetentních buněk do infikovaných tkání nebo jinak stresovaných buněk. IL-1 α je syntetizován jako prekurzor a je neustále přítomen v menších množstvích v cytoplazmě buněk mezenchymálního původu a v epiteliálních buňkách. IL-1 α také stimuluje transkripci a sekreci IL-1 β z monocytů. IL-1 β je syntetizován jako protein prekurzorové formy teprve po stimulaci. Jeho exprese je indukována transkripčním faktorem NF- κ B po expozici buněk vrozené imunity alarminům (Aloisi 1992, Kinter et al. 2008).

Dalším cytokinem, který uvolňuje endoteliální buňky, je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Reguluje další cytokiny, růstové faktory, transkripční faktory a receptory. Může to mít za následek zvýšení teploty a smrt určitých typů nádorových buněk. Sekrece TNF- α způsobuje lokální imunitní reakci, které se účastní aktivace endotelu a okolních krevních cév, zvyšuje se permeabilita a zvyšuje se také srážlivost krve v místě infekce. Sekrece velkého množství TNF- α nastává při rozvoji sepse (Torre-Amione 1996, Strieter et al. 1993).

2.2.3.3. Adhezivní molekuly

Molekuly buněčné adheze (Cell adhesion molecules-CAMs) jsou proteinové látky exprimované na povrchu buněk. Kontrolují procesy embryogeneze, buněčného růstu a diferenciaci a zprostředkovávají interakci mezi buňkami. Hrají důležitou roli v patofyziologii infekce, neoplázií, kardiovaskulárních a kožních

chorob. Adhezivní molekuly jsou rozděleny do několika skupin podle struktury na selektiny, integriny, rodinu imunoglobulinů, kadheriny a další (Buckley 2009).

2.2.3.3.1. Selektiny

Selektiny jsou transmembránové glykoproteiny, které se účastní buněčné adheze. Jsou malou skupinou adhezivních molekul, do které patří 3 molekuly: E, L a P selektin. Všechny selektiny mají podobnou strukturu: N-terminální kalcium-dependentní lektinovou doménu, doménu podobnou epidermálnímu růstovému faktoru, variabilní počet opakujících se jednotek, transmembránovou doménu a intracelulární cytoplazmatický ocas. Po stimulaci endotelu histaminem a trombinem během zánětové reakce je P-selektin uvolňován z Weibel-Paladeho tělísek a cytoplazmatických granulí krevních destiček. Stimulace endotelu cytokiny (např. TNF- α) způsobuje expresi E-selektinu a P-selektinu (Bevilacqua and Nelson 1993)

P-selektin je známý jako CD62P, molekula závislá na aktivaci krevních destiček na externí membránový protein (PADGEM). P-selektin se nachází v endoteliálních buňkách uložený ve Weibel-Paladeho tělíscích a v granulacích krevních destiček. P-selektin je translokován na plazmatickou membránu endoteliálních buněk během zánětové odpovědi. Trombin je jedním ze spouštěčů, které mohou stimulovat uvolňování P-selektinu endotelovými buňkami. P-selektin je exprimován na povrchu endoteliálních buněk během několika minut po stimulaci. Po aktivaci destiček P-selektin podporuje agregaci destiček prostřednictvím vazby trombocytů a fibrinu (Merten and Thiagarajan 2000).

E-selektin je známý jako CD62E, molekula adheze endoteliálních leukocytů 1 (ELAM1). Tento selektin je exprimován výlučně endotelovými buňkami. Produkce E-selektinu je stimulována expresí P-selektinu, který je stimulován TNF- α a IL-1. E-selektin je exprimován na povrchu endoteliálních buněk asi dvě hodiny po stimulaci cytokiny. Maxima dosahuje za 4-12 hodin po stimulaci. Na bazální hladiny se vrátí do 24 hodin. E-selektin hraje důležitou roli při atrakci leukocytů do místa poranění během zánětu. Během progresu zánětové reakce vstupují chemokiny uvolňované postiženými tkáněmi do cév a aktivují přesun

leukocytů, které jsou nyní schopny se pevně vázat na povrch endotelu a následně pronikat do tkání (Sun et al., 2013).

L-selektin je známý jako CD62L. Tento selektin se nachází na leukocytech. L-selektin zajišťuje počáteční interakci leukocytů s endotelen a „roling“ leukocytů po endotelu kapilár (Rainer, 2002).

2.2.3.3.2. Integriny

Integriny jsou hlavními mediátory adheze mezi buňkami a extracelulární matrix. Jsou to transmembránové glykoproteiny, které se skládají ze dvou podjednotek (alfa a beta). V organismu se zapojují do mnoha procesů: zánětu, buněčného růstu a diferenciaci a implementace mezibuněčných spojení. Integriny jsou rozděleny do skupin podle typu β -podjednotky, integriny $\beta 1$ a $\beta 3$ jsou exprimovány na povrchu endotelových buněk (Takada et al 2007).

2.2.3.3.3. Superrodina imunoglobulinových buněčných adhezivních molekul imunoglobulinů

Superrodina imunoglobulinových buněčných adhezivních molekul (IgSF CAMs) je skupinou buněčných povrchových molekul, které zahrnují intracelulární adhezivní molekuly (ICAMs), adhezivní molekuly vaskulárních buněk (VCAMs), adhezivní molekuly nervových buněk (NCAM), nektinové proteiny a proteiny podobné nektinu (Nectl). Charakteristickou strukturou těchto transmembránových molekul je přítomnost různých extracelulárních domén podobných imunoglobulinu. Na povrchu endotelových buněk je exprimováno pět proteinů (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1 a MAdCAM-1). Tyto molekuly se podílejí na zajišťování pevné adheze leukocytů k endotelu a podílejí se na migraci leukocytů během zánětové reakce (Gu et al 2017).

ICAM-1 (CD54) je protein, který je typicky exprimován na endotelových buňkách a buňkách imunitního systému. Tento protein je trvale přítomný v nízkých koncentracích v membránách endotelových buněk a v leukocytech. Koncentrace ICAM-1 se značně zvyšuje po stimulaci cytokiny a je zesílená zejména první den. Hladina ICAM-1 se vrátí na výchozí hodnotu po 72 hodinách. ICAM-1 také existuje v solubilní formě. Koncentrace rozpustného ICAM-1

poskytuje dobré informace o stupni pokračujícího zánětu, nikoliv však o rychlosti aktivace endotelu (Roebuck and Finnegan 1999).

ICAM-2 (CD102) je protein exprimovaný na leukocytech a endoteliálních buňkách. Stimulace cytokinů nezvyšuje hladiny ICAM-2 (Carpenito et al 2003).

VCAM-1 (CD106) je transmembránový glykoprotein, exprimovaný na endotelových a dendritických buňkách, makrofázích a fibroblastech. VCAM-1 není exprimován endotelovými buňkami v klidovém stavu. Po stimulaci endotelu prozáněťovými cytokiny (IL-1, IL-4, TNF- α , interferon- γ) je exprimován VCAM-1. Existuje také rozpustná forma VCAM a její koncentrace poskytuje informace o stupni aktivace endotelu (Lévesque 2001).

PECAM-1 (CD31) je molekula adheze endotelových buněk trombocytů, která hraje klíčovou roli při odstraňování starých neutrofilů z organismu (Newman et al. 2014). CD31 se normálně nachází na endotelových buňkách, krevních destičkách, makrofázích a Kupfferových buňkách, granulocytech (Xie and Muller, 1996). V imunohistochemii se CD31 používá především k prokázání přítomnosti endotelových buněk v histologických řezech tkáně a pomáhá tak vyhodnotit stupeň angiogeneze nádoru. Vysoká koncentrace může znamenat rychle rostoucí nádor. Maligní endoteliální buňky také běžně zachytávají antigen CD31 (Leong et al. 2003). PECAM-1 se nachází na povrchu krevních destiček, monocytů, neutrofilů a některých typů T-buněk a tvoří velkou část mezibuněčných spojů endotelových buněk. Kódovaný protein je členem nadrodiny imunoglobulinů a je pravděpodobně zapojen do transmigrace leukocytů, angiogeneze a aktivace integrinu. CD31 na endotelových buňkách se váže na receptor CD38 NK buněk a je zodpovědný za jejich připojení k endotelu (Zambelo et al. 2020, Glaría et al. 2020).

2.2.3.4. Růstové a angiogenní faktory

VEGF-vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor) je homodimerický glykoprotein o molekulové hmotnosti 45 kDa. Tento cytokin patří do rodiny růstových faktorů odvozených z destiček (*platelet derived growth factor* /PDGF/) strukturně příbuzných mitogenů. Díky posttranslačním úpravám vznikají sestřihem čtyři hlavní izoformy – délka těchto izoform je 121,

165, 189 a 206 aminokyselin. Převládající forma VEGF je zastoupena 165 AK dlouhým proteinem. Delší formy VEGF jsou základní a vážou se na izolovaný heparin nebo heparinové proteoglykany umístěné na buněčném povrchu a v extracelulárním matrix. Jednotlivé formy mají různou vazebnou afinitu. VEGF je klíčový mediátor v angiogenezi (Ferrara et al. 2003). Významnou roli má při vzniku nádorových onemocnění, kde bývá jeho produkce značně zvýšená. Podílí se na vzniku nových cév, které vznikající nádor zásobují, vyživují ho a umožňují jeho dostatečnou oxygenaci. Zvýšená produkce VEGF nastává i v případě hypoxie (Rizov et al. 2017, Carmeliet 2005, Dayan et al. 2008)

2.2.3.5. Endoteliny

Endotelin způsobují vazokonstrikci a zvyšují tak krevní tlak. (Davenport et al. 2016, Maguire et al. 2014). Jsou produkovány primárně endotelem a mají klíčovou roli v udržení vaskulární homeostázy. Podílejí se na rozvoji cévních onemocnění v srdci, plicích, ledvinách, mozku (Agapitov et al. 2002, Schinelli et al. 2006). Existují tři izoformy endotelinů (identifikované jako ET-1, ET-2, ET-3), každá kódovaná samostatným genem, s různými oblastmi exprese a vazby na nejméně čtyři známé receptory endotelinu, ETA, ETB1, ETB2 a ETC (Davenport et al. 2016, Boron et al. 2009). Endotelin působí prostřednictvím aktivace dvou receptorů spřažených s G-proteinem, prostřednictvím receptoru endotelinu A a endotelinu B (ETA, respektive ETB). Tyto dva podtypy endotelinového receptoru se laboratorně rozlišují podle jejich afinity ke třem endotelinovým peptidům: ETA receptor je selektivní pro ET-1, zatímco ETB receptor má stejnou afinitu ke všem třem ET peptidům. Tyto dva typy receptoru ET jsou distribuovány napříč různými buňkami a orgány s různými úrovněmi exprese a aktivity (Kawanabe et al. 2011).

Endotelin-1 je nejsilnější endogenní chemická látka ovlivňující vaskulární tonus napříč orgánovými systémy (Kawanabe et al. 2001, Miyauchi et al. 2017). Sekrece endotelinu-1 z vaskulárního endotelu signalizuje vazokonstrikci a ovlivňuje místní buněčný růst a přežití. ET-1 se podílí na vývoji a progresi několika kardiovaskulárních chorob jako je ateroskleróza a hypertenze (Miyauchi et al. 2017) Endotelin má také roli v mitogenezi, přežití buněk, angiogenezi, růstu kostí, funkci nociceptorů a mechanismech vzniku nádorů (Kawanabe et al. 2011).

Nadprodukce endotelinu v plicích může způsobit plicní hypertenzi. Klinicky se anti-ET léky používají k léčbě plicní arteriální hypertenze (Kawanave et al. 2011, Miyauchi et al. 2017). ETA receptor pro ET-1 je primárně lokalizován na buňkách hladkého svalstva cév, zprostředkujících vazokonstrikci, zatímco ETB receptor pro ET-1 je lokalizován na endotelových buňkách a jeho aktivace vedek vazodilataci (Böhm and Pernow 2007, Kakutani et al. 2011).

2.2.3.6. Endocan

Endocan, původně známý jako endoteliální buněčně specifická molekula-1, je proteoglykan, který je exprimován v lidských endotelových buňkách, a to zejména v plicích a ledvinách. Nachází se ve vaskulární tkáni, ale také v odpovídajících epitelích a v adipocytech (Bécharde et al. 2000; Janke et al. 2006; Wellner et al. 2003). Exprese endocanu v endotelu je zvyšována TNF- α nebo IL1- β . Jeho sekreční forma cirkuluje v lidské krvi a může tak být snadno detekovatelná. (Bécharde et al. 2001a, 2001b; Lassalle et al. 1996). Předpokládá se, že u pacientů v septickém šoku se sérové hladiny endocanu mohou dramaticky zvýšit, reprezentují tak aktuální endoteliální poškození a mohou tak korelovat se závažností onemocnění a jeho možnými důsledky (Scherpereel et al. 2006). Vysoké koncentrace mohou detekovat systémový zánět-endocan zprostředkuje nábor cirkulujících lymfocytů do místa zánětu, ale i adhezi a aktivaci leukocytů (Bécharde et al. 2001b).

2.3. Extracelulární vezikuly (EVs)

2.3.1. Buněčné membránové mikrovezikuly-mikrovezikuly odvozené z buněčné membrány

Vezikuly původem z extracelulární buněčné membrány jsou produkovány všemi somatickými buňkami v lidském těle. Eukaryotické buňky uvolňují několik typů membránových extracelulárních vezikul (EVs). Vezikuly různého buněčného původu se běžně vyskytují v plazmě i v dalších tělesných tekutinách (Burger et al. 2013). Membranózní vezikuly jsou důležitými mediátory fyziologických buněčných procesů, jako je angiogeneze, štěpení progenitorových buněk, regulace imunitní odpovědi. Jednotlivé typy buněčných vezikul jsou produkovány různými mechanismy a jsou běžně klasifikovány do tří hlavních skupin na základě jejich předpokládané biogeneze a velikosti: apoptotická tělíska, exozomy a mikrovezikuly (Gould and Raposo 2013, Kalra et al. 2012). Základní klasifikace a charakteristika jsou shrnuty v Tabulce 1.

Apoptotická tělíska měří 50–5000 nm a tvoří se během pozdních stádií apoptózy. Jsou charakterizována fragmentovanou DNA, buněčnými organelami a dalšími cytosolovými složkami a také expozicí fosfatidylserinu na vnějším povrchu jejich membrány (Gyorgy et al. 2011). Od mikrovezikul je částečně lze rozlišit podle velikosti a jaderného obsahu (Dignat-George and Boulanger 2011). Apoptotická tělíska se mohou podílet na horizontálním přenosu fragmentů DNA, včetně těch, které obsahují onkogeny (Vader et al. 2014). Makrofágy, které pohltní apoptotické tělísko mohou prezentovat T-lymfocytům antigenní proteinové epitopy apoptotických tělísek. Apoptotická tělíska a apoptotické buňky interagují s receptory na fagocytech, jako je například scavenger receptor typu B (CD36), nebo receptor pro fosfatidylserin. Vazba nebo vychytávání apoptotických tělísek a apoptotických buněk indukuje produkci protizánětlivých imunoinhibičních cytokinů (např. TGF- β , IL-10) a snižuje produkci prozánětlivých cytokinů (např. TNF- α) (Maas et al. 2016). Selhání těchto imunomodulačních mechanismů může vést k aktivaci okolních B-lymfocytů prostřednictvím neproteinových povrchových antigenů na povrchu apoptotických tělísek a buněk, což může ovlivnit vznik a progresi systémových autoimunitních chorob (Wahren-Herlenius and Dorner 2013). Abnormální množství apoptotických tělísek obsahujících RNA

bylo identifikováno u pacientů s diabetes mellitus a kardiovaskulárními chorobami (Maas et al. 2016).

Exozomy jsou vezikuly endozomálního původu s průměrem 40-100 nm. Vnitřní vychlípení endozomální membrány během zrání pozdního endozomu vede k progresivní akumulaci intraluminálních mikrovezikul (ILV) uvnitř velkých multivezikulárních tělísek (MVB). Při fúzi těchto MVB s plazmatickou membránou buňky dochází k uvolnění exozomů (Maas et al. 2016). Exozomy jsou produkovány všemi buňkami a jsou přítomny ve všech tělesných tekutinách, včetně plazmy, moči, slin a mateřského mléka (Morel et al. 2011). Složení exosomů odráží jejich původ a obsahuje proteiny, které jsou zapojené do transmembránového transportu a fúze membrán (např. Rab GTP-ázy, annexiny, flotilliny, LAMP1-s lysozomy asociovaný membránový protein 1, integriny a tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82), proteiny tepelného šoku (např. Hsp70, Hsp 90), proteiny zapojené do biogeneze MVB (např. Alix, TSG101) a fosfolipázy. V exozomech bylo popsáno více než 4000 proteinů v závislosti na mateřských buňkách (Maas et al. 2016). Kromě typických proteinů, jsou exozomy obohaceny o rafty lipidů, jako je cholesterol a sfingolipidy (např. ceramid a sfingomyelin) a fosfolipidy, tvořené nasycenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem (Maas et al. 2016). Exozomy jsou vysoce obohaceny o manózu, polyaktosamin (PolyLacNAc), alfa 2-6 vázané kyseliny sialové a komplexní N-vázané glykany (Curtis et al. 2013). Exozomy neobsahují pouze proteiny, lipidy a sacharidy, ale také různé druhy RNA, zejména mikroRNA. Obsah RNA v exozomech je do značné míry totožný s obsahem RNA buněk, ze kterých dané exozomy pochází. Avšak koncentrace určitých RNA se může mezi exozomem a maternální buňkou významně lišit (Morel et al. 2011). Exozomy se účastní intracelulární komunikace a také řady biologických procesů, včetně apoptózy, angiogeneze, zánětu, koagulace, diferenciace a buněčné migrace (Mezouar 2014). Exozomy z endotelových buněk mohou přenášet funkční miRNA (např. miR-214) a mohou tak ovlivňovat proliferaci a migraci cílových buněk během angiogeneze nádoru prostřednictvím těchto regulačních molekul (Xiong et al. 2012).

Mikrovezikuly (MVs) představují skupinu heterogenních membranózních vezikul s velikostí v rozmezí 100-1000 nm. MVs jsou uvolňovány z buněčné

plazmatické membrány. Uvolňování mikrovezikul zahrnuje zevní protruzi plazmatické membrány, kterou následuje oddělení nově vytvořeného plazmatického výběžku. MVs jsou produkovány všemi zralými a nezralými typy buněk, včetně buněk endotelových a buněk, které tvoří cévní stěnu (tj. buňky hladkého svalstva, fibroblasty, podocyty), buňkami hematopoetickými (erytrocyty, trombocyty, leukocyty) a také nádorovými buňkami. MVs byly detekovány v krvi, moči, slinách, synoviální tekutině, ascitu a sklivci (Burger et al. 2013). Počet MVs se zvyšuje během různých patologických procesů, které vedou k poškození buněk, a to zejména během zánětu, imunitní reakce, aktivace hemostázy, koagulace a fibrinolýzy. Z onemocnění se jedná např. o aterosklerózu, akutní koronární syndrom, metabolický syndrom, diabetes mellitus, malignity, infekce včetně sepse, preeklampsii a autoimunitní choroby. MVs proto mohou být použity jako biomarkery výše uvedených nemocí (Burger et al. 2013). MVs se liší velikostí a složením fosfolipidů, proteinů a dalších molekul, které je rozlišují v závislosti na buněčném původu a stavu aktivace dané buňky. MVs nesou membránové proteiny (např. receptory, ligandy, adhezivní molekuly), cytosolové proteiny (např. enzymy, transkripční faktory) a další molekuly (např. mRNA, miRNA, jiné nekódující RNA, případně DNA) odvozené z mateřské buňky (Burger et al. 2013, Morel et al. 2011). MVs se aktivně účastní různých fyziologických a patologických procesů v lidském těle, zejména pak zánětu, koagulace, trombózy, angiogeneze, tkáňové regenerace, ale i nádorové invaze (Curtis et al. 2014). Většina MVs v krvi pochází z trombocytů (70-90 %), dále pak z endoteliálních buněk, leukocytů a erytrocytů (Mezouar et al. 2014, Xiong et al. 2012).

Tabulka 1. Charakteristika extracelulárních vezikul

Klasifikace	Exosomy	Mikrovezikuly	Apoptotická tělíska
<i>Velikost</i>	40-100 nm	100-1000 nm	50-5000 nm
<i>Mechanismus vzniku</i>	Tvorba multivezikulárních tělísek vtažením endosomální membrány dovnitř s následnou fúzí s buněčnou plazmatickou membránou.	Vnější protruze plazmatické membrány následovaná jejím oddělením.	Fragmentace buněk během apoptotického procesu.
<i>Charakteristika a složení</i>	Bohaté na lipidové rafty, buněčné endosomově specifické proteiny (např. LAMP1, CD63, TSG 101), cytoplazmatické proteiny, RNA, miRNA.	Externalizovaný fosfatidylserin (vazba anexinu V), bohatý na lipidové rafty, molekuly specifické pro povrch buněk, cytoplazmatické proteiny, RNA, miRNA, jiné ncRNA, příležitostně DNA.	Externalizovaný fosfatidylserin (vazba anexinu V), organely, DNA, cytoplazmatické proteiny, RNA, miRNA a další ncRNA.
<i>Funkce</i>	Selektivní transport (funkční proteiny, mRNA, miRNA), interakce s receptory.	Zánět, koagulace, tvorba trombů, angiogeneze, regenerace tkání, invaze nádorových buněk, metastázy, mRNA, miRNA	Přenos fragmentů DNA směrem k buňkám fagocytózy, inhibice zánětových procesů, přežití buněk.

2.3.2. Tvorba mikrovezikul – obecné mechanismy

Plazmatická koncentrace jednotlivých typů mikrovezikul je určována dynamickou rovnováhou mezi rychlostí jejich tvorby a eliminace. Akutní a chronické zánětové procesy jsou charakterizovány zvýšenou koncentrací MVs v krvi. Různé bakteriální toxiny, prozánětové cytokiny, reaktivní formy kyslíku a koagulační faktory iniciují tvorbu MVs z buněk účastnících se zánětové reakce (Yong et al. 2013, Cognase et al. 2015). Poznatky týkající se procesu tvorby a uvolňování mikrovezikul pocházejí z experimentů na izolovaných buňkách a buněčných kulturách. Mikrovezikuly jsou vytvářeny protruzí buněčné cytoplazmatické membrány. Jejich tvorba je stimulována řadou různých podnětů, které vedou ke zvýšení intracelulárního kalcia, ke ztrátě asymetrie membránových fosfolipidů a k reorganizaci cytoskeletu. Fyziologická asymetrie a integrita buněčné plazmatické membrány je řízena spoluprací několika lipidových transportérů. Během klidového stadia buňky je lipidová translokační flippáza (aminofosfolipidová translokace) aktivní pro udržování asymetrie plazmatické membrány. Po aktivaci buňky je ATP-dependentní lipidový transportér, floppáza, zodpovědný za tranzientní přenos fosfatidylserinu do vnější vrstvy plazmatické membrány.

Scrambláza, která je neaktivní v klidových buňkách, umožňuje přenos fosfolipidů v plazmatické membráně ve směru koncentračního gradientu (Morel et al. 2011, Nomura and Shimizu 2015). Fosfatidylserin na povrchu MVs se může podílet na aktivaci koagulační kaskády (Morel et al. 2011). Mikrodomény plazmatické membrány obohacené o cholesterol, lipidové rafty a kaveoly jsou implikovány jako oblast tvorby mikrovezikul. Zvýšená intracelulární koncentrace ionizovaného kalcia vede k aktivaci několika enzymů regulovaných koncentrací Ca^{2+} , jako je calpain, gelsolin a kaspázy, což vede k depolymeraci, oddělování a proteolýze cytoskeletálních proteinů (Markiewicz et al. 2013).

Biologické faktory související s endoteliální dysfunkcí, jako je $\text{TNF-}\alpha$, trombin, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1), angiotensin II, bakteriální lipopolysacharidy (LPS) a další bakteriální toxiny, mohou všechny indukovat tvorbu endoteliálních mikrovezikul *in vitro*. Přesný mechanismus tvorby endoteliálních mikrovezikul *in vivo* však stále není dostatečně objasněn.

Stimulace několika receptorů skupiny TNF (např. TNFR1, TNFR2, TRAILR2, Fas, CD95 a CD40) vede k tvorbě a uvolňování endoteliálních mikrovezikul. Aktivace receptorů TNF má za následek nábor faktorů spojených s TNFR (TRAF, např. TRAF2, TRAF6) do signálního komplexu, který iniciuje aktivaci NF- κ B a JNK-kinázy (c-Jun N-terminální kinázy). TRAF se rekrutuje buď přímo (např. CD40), nebo nepřímo (např. TNFR1) prostřednictvím adaptačních proteinů TNFR asociovaných s dead-doménou (TRADD) do cytoplazmatické domény aktivovaného receptoru (Nomura and Shimizu 2015). Trombin podporuje tvorbu endoteliálních MVs prostřednictvím proteázou aktivovaného receptoru PAR-1, následuje reorganizace cytoskeletu zprostředkovaného Rho kinázou II (ROCK II), aktivovanou kaspázou 2, zvýšenou expresí intercelulární adhezivní molekuly-1 (ICAM-1) a uvolňováním interleukinu-8 (IL-8). Adhezivní molekuly, cytokiny a jejich receptory účastníci se tohoto procesu představují klíčové komponenty spojující koagulaci a zánět (Nomura and Shimizu 2015, Markiewicz et al. 2013).

2.3.3. Clearance mikrovezikul z cirkulace

Bez ohledu na původ jsou mikrovezikuly odstraňovány z extracelulárních tekutin procesem fagocytózy. Fagocyty rozpoznávají mikrovezikuly pomocí externalizovaného membránového fosfatidylserinu nebo, jsou-li opsonizované, prostřednictvím C3b složky komplementu, případně cestou laktadherinových receptorů (Jansen et al. 2012, Faille et al. 2012). Některé typy mikrokovezikul, jako jsou mikrovezikuly odvozené z trombocytů, mohou být fagocytovány endotelovými buňkami (Faille et al. 2012, Dasguota et al. 2012). Rychlost odstraňování mikrovezikul z oběhu závisí na typu analyzovaných mikrovezikul a v experimentálních podmínkách dosahuje rozmezí od několika minut do několika hodin (Rank et al. 2011, Augustine et al. 2014).

2.3.4. Detekce a měření koncentrace mikrovezikul

Povrchové antigeny MVs odrážejí jejich buněčný původ a umožňují imunodetekci buněčně specifických mikrovezikul (Burger et al. 2013, Deng et al. 2017, Inzhutova et al. 2012). K detekci mikrovezikul se využívá především průtoková cytometrie. Je to metoda umožňující detekci mikrovezikul na základě

jejich velikosti a identifikaci jejich původu prostřednictvím buněčně specifických povrchových antigenů. Pro značení mikrovezikul se nejčastěji používá kalcium dependentní, povrchový, externalizovaný fosfatidylserin značený annexinem V (Yuana et al. 2011). Ke stanovení endoteliálního původu mikrovezikul může být použita následná kombinace markerů: CD144 (VE cadherin), CD62E (E-selectin), CD105 (endoglin), CD31 (PECAM-1) (Curtis et al. 2013, Latham et al. 2015). Fenotypy endoteliálních mikrovezikul se mohou lišit v závislosti na způsobu stimulace buněk a mechanismu uvolňování mikrovezikul. Například aktivace endotelu TNF- α vede ke zvýšené produkci CD62E, CD106, CD54, CD31, CD105 a CD51 pozitivních endoteliálních mikrovezikul. Proapoptotická stimulace endotelové buňky, jako je deprivace růstového faktoru, vede pouze ke zvýšené produkci CD31, CD105 a CD51 pozitivních mikrovezikul, zatímco koncentrace CD62E, CD54 a CD106 pozitivních endoteliálních mikrovezikul zůstává stejná (Nomura and Shimizu 2015).

Množství mikrovezikul detekovaných průtokovou cytometrií závisí na preanalytické fázi (technika odbírání vzorků, čas mezi odběrem a zpracováním vzorku, typ použité antikoagulace, odstředivá síla a čas centrifugace, skladování vzorků a kontaminace vzorků trombocyty) a analytické fázi (typ použitého laseru a zvolená vlnová délka, protilátky, analytické zařízení a jeho kalibrace). Hlavní nevýhoda této metody je limitace omezená na možnost detekce malých částic. Mikrovezikuly jsou svojí velikostí na dolní hranici schopnosti detekce průtokovým cytometrem. Z tohoto důvodu může být konečný naměřený výsledek nižší, protože některé mikrovezikuly jsou pod hranicí detekce průtokového cytometru. Může také docházet k fenoménu, který se označuje jako „microvesicle swarming“, kdy mikrovezikuly menších rozměrů jsou detekovány dohromady jako jedna částice (Van der Pol 2012). Dalším omezením této metody je malé množství antigenů exprimovaných na povrchu mikrovezikul, které i po navázání protilátky mohou vytvořit pouze slabý, někdy obtížně detekovatelný signál (Burger et al. 2013).

MVs lze detekovat také metodou ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). V daném vzorku jsou mikrovezikuly zachyceny pomocí specifických protilátek proti povrchovým antigenům (navázaná protilátka) na povrchu reakční

jamky. Zachycené MVs jsou pak detekovány pomocí protilátek proti jinému povrchovému antigenu a tím se zvýší specifita samotné detekce. Výhodou je, že detekce není omezena velikostí mikročástic. Nevýhoda spočívá v tom, že se jedná pouze o semikvantitativní metodu (Vítková et al. 2018).

Detekce mikrovezikul elektronovou mikroskopií umožňuje posoudit morfologii, membránovou i cytoskeletonovou strukturu mikrovezikul. Nevýhodou této metody je to, že je časově náročná a nemůže poskytnout přímou identifikaci a kvantifikaci mikrovezikul (Vítková et al. 2018).

Funkční zhodnocení mikrovezikul je možné pomocí několika metod, zejména měřením jejich prokoagulační či protrombotické aktivity. Nevýhody těchto metod však spočívají v tom, že nejsou schopny identifikovat původ mikrovezikul, a neposkytují informace o jiných vlastnostech, jako je indukce zánětového procesu, či produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Burger et al. 2013). V současné době existuje několik nově dostupných metod pro detekci a vyšetření mikrovezikul: hmotnostní spektrometrie (MS), která je založená na vysoce výkonných proteomických metodách, které mohou identifikovat složení proteinu mikrovezikul po jejich extrakci, chromatografické presepaci a proteolytickém (trypsinovém) štěpení proteinů mikrovezikul. Dynamický rozptyl světla (DLS) a analýza založená na sledování nanočástic (NTA) jsou založené na detekci Brownova pohybu mikrovezikul v suspenzi. NTA je schopná sledovat pohyb jednotlivých částic, zatímco DLS analyzuje všechny částice najednou a výsledky jsou uvedeny jako průměr částic. Výběr metody pro hodnocení mikrovezikul proto závisí na konečném cíli dané analýzy (Yuana et al. 2011).

2.3.5. Klasifikace, funkce a klinická relevance mikrovezikul

Mikrovezikuly mají na svém povrchu antigeny, které odrážejí jejich buněčný původ a umožňují tak imunodetekci buněčně specifických mikrovezikul. (Vítková et al. 2018). Tabulka 2 uvádí základní rozdělení mikrovezikul podle buněčného původu. Expresí povrchových antigenů mikrovezikul a jejich funkce je shrnuta v Tabulce 3 (Šibíková et al. 2018).

2.3.5.1. Mikrovezikuly uvolňované z trombocytů

Aktivace trombocytů představuje nedílnou součást zánětové reakce. Mikrovezikuly tvořené z destiček se hromadí v místech cévního poškození, a to na leukocytech a na aktivovaném endotelu. Tyto mikrovezikuly mohou přispívat k interakcím leukocyt-leukocyt, prostřednictvím vazby P-selektinu a P-selektinového glykoproteinového ligandu 1 (PSGL-1) (Nomura and Shimizu 2015). Tento typ mikrovezikul také může zvýšit aktivitu a koncentraci imunitních buněk (monocyty, T a B-lymfocyty a NK-buňky) a modulovat zánětové procesy. Vysoká koncentrace kostimulačního ligandu CD40L/CD154 na povrchu mikrovezikul z krevních destiček může přispívat k antigenově specifickým nežádoucím reakcím po podání trombocytů a při akutním respiračním selhání, který souvisí s hyperhydratací organismu (Blumberg et al. 2006, Khan et al. 2006). Mikrovezikuly z destiček podporují transcelulární transport kyseliny arachidonové na prostaglandinový endoperoxid H₂, jeden z důležitých prekurzorů prostacyklinu (Barry et al. 1999). Prostacyklin je důležitá efektorová molekula, která indukuje vazodilataci a inhibuje proliferaci, angiogenezi, adhezi a agregaci destiček a má protizánětlivý účinek díky stimulačnímu účinku na expresi protizánětlivých cytokinů (např. IL-10) a inhibiční účinek na expresi prozánětlivých cytokinů (Nomura and Shimizu 2015). Trombocytární mikrovezikuly mohou stimulovat produkci prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 (monocytární chemoatraktantní protein) a další prozánětlivé molekuly prostřednictvím přímé interakce ligand-receptor. Tyto cytokiny stimulují zánětlivé buňky ke zvýšené produkci mikrovezikul, čímž vytvářejí pozitivní zpětnou vazbu (Cognase et al. 2015, Wu et al. 2013).

Tabulka 2. Buněčné zdroje MVs a podněty související se zánětem, které vedou k jejich uvolnění

Zdroj/původ mikrovezikul	Podněty stimulující jejich uvolnění
<i>Trombocyty</i>	Lipopolysacharid (LPS), bakteriální toxiny, ligand CD40, cytokiny (např. TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , erythropoetin), trombin, kolagen, agonisté receptoru aktivovaného proteinázou (PAR), prostaglandiny, vápník, reaktivní formy kyslíku, katecholaminy.
<i>Endoteliální buňky</i>	Lipopolysacharid (LPS), bakteriální toxiny, cytokiny (IL-1, TNF- α), trombin, inhibitor plazminového aktivátoru (PAI)-1, reaktivní formy kyslíku, uremické toxiny, angiotensin-2, CRP, homocysteinémie, hyperglykémie, hypoxie, hyperglykémie.
<i>Lymfocyty</i>	Cytokiny (TNF- α , FasL, IL-2), lipopolysacharid (LPS).
<i>Monocyty/makrofágy</i>	Lipopolysacharid (LPS), TNF- α , FasL, Toll-like receptor (TLR) 3 a TLR4 ligandy.
<i>Neutrofily</i>	Anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky, chemotaktický peptid N-formylmethionyl-leucyl-fenylalanin, bakteriální toxiny.
<i>Erytrocyty</i>	Reaktivní formy kyslíku a další volné radikály.

2.3.5.2. Mikrovezikuly uvolňované z leukocytů

Experimenty *in vitro* ukázaly, že mikrovezikuly odvozené od aktivovaných polymorfonukleárních leukocytů podporují uvolňování prozáněťových cytokinů, IL-1, IL-6, IL-8, chemoaktivního proteinu monocytů (MCP-1), TNF- α a dalších molekul podílejících se na regulaci zánětu (Cognase et al. 2015, Wu et al. 2013). Mikrovezikuly monocytů zvyšují expresi buněčných adhezivních molekul na cílových buňkách prostřednictvím aktivace translokace NF- κ B do jádra. Leukocytární mikrovezikuly mohou stimulovat expresi proangiogenních chemokinů CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 a CXCL8 pomocí synoviálních fibroblastů. Mikrovezikuly uvolňované z T-lymfocytů podporují produkci TNF- α a IL-1 β monocyty (Distler et al. 2005).

2.3.5.3. Mikrovezikuly uvolňované z erytrocytů

Zvýšené hladiny erytrocytárních mikrovezikul jsou spojeny s hemolytickými nemocemi, jako je talasémie, paroxysmální noční hemoglobinurie a srpkovitá anémie. Předpokládá se, že se podílejí na aktivaci koagulace, fibrinolýzy a také na endoteliální aktivaci (Simak et al. 2004, van Beers et al. 2009).

2.3.5.4. Mikrovezikuly uvolňované endotelovými buňkami

Široké spektrum fyzikálních, chemických a biologických podnětů aktivuje endotelové buňky a vede k uvolňování endoteliálních mikrovezikul. Prozáněťové cytokiny, jako je TNF- α a IL-1, aktivované koagulační faktory, inhibitor 1 aktivátoru trombinu a plazminu (PAI-1), bakteriální produkty a toxiny (LPS, ROS), C-reaktivní protein, angiotenzin II, uremické toxiny (p-kresol, p-kresylsulfát, indoxyl-sulfát), homocystein, hyperglykémie, stimulují tvorbu a uvolňování endoteliálních mikrovezikul (Burger et al. 2013, Brown et al. 2011, McCarthy et al. 2016, Pan et al. 2017, Jansen et al. 2014, Devaraj et al. 2011, Huang et al. 2012, Erdbrügger 2016, Sekula et al. 2011). Uvolňování endoteliálních mikrovezikul stimulují i fyzikální inzulty (Vion et al. 2013). Oxid dusnatý a statiny naopak snižují syntézu a uvolňování endoteliálních MVs (Devaraj et al. 2012).

Endotelové buňky produkují mikrovezikuly bohaté na tkáňový faktor, který má významné prokoagulační vlastnosti. Schopnost endoteliálních mikrovezikul vázat se na koagulační faktory a podněcovat tak tvorbu trombinu, byla popsána *in vitro*, ale také u akutního koronárního syndromu, či hypoxicko-reperfuzního poškození tkání (Deng et al. 2014). Endoteliální mikrovezikuly bohaté na tkáňový faktor se mohou vázat na monocyty a trombocyty, čímž dále zesilují zánětový proces a zesilují prokoagulační potenciál. Mikrovezikuly uvolňované aktivovanými endotelovými buňkami se mohou vázat na neporušené endotelové buňky a indukovat tak zvýšenou expresi molekul buněčné adheze a usnadňovat interakci monocytů a endotelových buněk. Endoteliální mikrovezikuly se vážají na monocyty a podporují jejich transendoteliální migraci (Cognase et al. 2015). Endoteliální mikrovezikuly bohaté na tkáňový faktor, který je uvolňovaný mikrovaskulárními endotelovými buňkami, podporují postischemickou neovaskularizaci a reperfúzi tkání a mohou tak překonat následky arteriální okluze a tkáňové ischemie (Arderiu et al. 2015). Zvýšené hladiny některých typů endotelových mikrovezikul, zejména mikrovezikul nesoucích adhesin kapilár střevních endotelových buněk MadCAM, byly detekovány i u kriticky nemocných novorozenců léčených extrakorporální membránovou oxygenací (Vítková et al. 2018).

Tabulka 3. Exprese povrchových antigenů mikrovezikul a jejich funkce.

Buněčný zdroj	Povrchové antigeny	Působení
<i>Erytrocyty</i>	CD235a	Podpora interakce monocytů a endoteliálních buněk
<i>Trombocyty</i>	CD31, CD41, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P	Indukce agregace trombocytů
		Interakce monocytů a endotelových buněk prostřednictvím ICAM-1
		Dodávka kyseliny arachidonové do endotelových buněk
		Chemotaxe monocytů
		Posílení agregace neutrofilů
		Zvýšení fagocytární aktivity
		Posílení vazby leukocyt-leukocyt
		Tvorba trombinu
		Indukce proliferace endotelu a angiogeneze
<i>Endotelové buňky</i>	CD31, CD34, CD54, CD62E, CD51, CD105, CD106, CD144, CD146	Aktivace neutrofilů
		Chemotaktická atrakce leukocytů
		Agregace trombocytů prostřednictvím exprese von Willebrandova faktoru
		Tvorba trombinu
		Tvorba ROS a snížení produkce NO
		Proliferace endotelu, angiogeneze, buněčná invaze
		Nosič proteinu C
<i>Polymorfonukleární leukocyty</i>	CD45	Aktivace endotelových buněk <i>in vitro</i>
		Produkce cytokinů (IL-6, IL-8)
		Chemotaxe leukocytů
		Produkce molekul buněčné adheze
		Aktivace primární hemostázy a koagulace
<i>Lymfocyty</i>	CD4, CD8, CD20	Snížení exprese a reaktivity buněk hladkého svalstva cév
		Produkce NOS2 (iNOS) a COX2
		Zvýšení oxidačního stresu v endotelových buňkách
<i>Monocyty</i>	CD14	Aktivace trombocytů
		Přenos chemokinového receptoru
		Produkce prozánětlivých cytokinů (IL-8, MCP-1) a adhezivních molekul (ICAM-1)
		Produkce superoxidu v monocytech
		Zvýšení exprese proteinu PPAR- γ v monocytech a makrofázích

2.3.6. Mikrovezikuly a zánětová reakce

2.3.6.1. Mikrovezikuly a nemoci spojené s akutními zánětovými procesy

Zvýšené hladiny mikrovezikul v plazmě byly popsány u několika akutních zánětových onemocnění. Funkční komponenty mikrovezikul (např. adhezivní molekuly, vazomotorické substance, cytokiny, růstové faktory, kódující a nekódující RNA apod.) mohou stimulovat produkci prozánětových cytokinů, které následně indukují tvorbu dalších mikrovezikul pozitivní zpětnou vazbou. Koncentrace mikrovezikul v plazmě může být užitečná pro stanovení závažnosti onemocnění. U akutního koronárního syndromu byl zaznamenán nárůst mikrovezikul různého původu. Zvýšení koncentrace mikrovezikul z krevních destiček a endotelu predikuje kardiovaskulární morbiditu a mortalitu (Sinning et al. 2011, Amabile et al. 2012). Zvýšená hladina mikrovezikul z neutrofilů byla popsána u vaskulitidy spojené s pozitivitou antineutrofilních cytoplazmatických autoprotiátů (Hong et al. 2012). Zvýšení hladin mikrovezikul pocházejících z endotelu, erytrocytů, trombocytů a leukocytů bylo popsáno u reakce štěpu proti hostiteli. Plazmatická koncentrace mikrovezikul je také zvýšená v případě hyperkoagulačních stavů (Lia et al. 2018). Konečná koncentrace mikrovezikul v cirkulující krvi závisí na rychlosti jejich tvorby a na jejich odstraňování z organismu. Stále však chybí dostatek vědeckých důkazů o míře tvorby a odbourávání mikrovezikul jak za fyziologických, tak patologických podmínek.

2.3.6.2. Role mikrovezikul v lokálním a v systémovém zánětu

Mikrovezikuly se účastní zánětových reakcí. Uvolňování mikrovezikul z krevních destiček, leukocytů, či endotelu je během zánětu zvýšeno. Mikrovezikuly uvolňované z těchto buněk mohou indukovat, ale i modifikovat zánětovou odpověď. Dále regulují syntézu četných prozánětových cytokinů, enzymů a dalších solubilních zánětových mediátorů. Mikrovezikuly mohou také indukovat expresi buněčných adhezivních molekul v endotelových buňkách. Aminofosfolipidy na povrchu mikrovezikul mohou představovat substráty potřebné pro produkci kyseliny lysofosfatidové, kyseliny arachidonové a dalších lipidových mediátorů zánětu (Wu et al. 2013). Prozánětové cytokiny, jako je

TNF- α a IL-1, zároveň potencují tvorbu mikrovezikul v cílových buňkách (Cloutier et al. 2013).

2.3.6.3. Role mikrovezikul při sepsi a systémovém zánětu

Sepse je klinický syndrom charakterizovaný systémovou zánětovou odpovědí na infekční podnět. Systémová zánětová odpověď je charakterizována aktivací koagulačního systému, inhibicí antikoagulačních mechanismů a fibrinolýzou, což může vést k rozvoji diseminované intravaskulární koagulace s mikrovaskulární trombózou. Zvýšení intenzity zánětové odpovědi a aktivity neuroendokrinního systému vede k vaskulární hyporeaktivitě a zvýšené apoptóze zúčastněných tkáňových buněk, což může vyústit až v multiorgánové selhání s rozvojem septického šoku (Annane et al. 2015). Endoteliální dysfunkce se zvýšenou permeabilitou endotelu, zvýšenými hladinami oxidu dusnatého, sníženou vaskulární reaktivitou na oxid dusnatý a reaktivními formami kyslíku, které jsou indukovány oxidačním stresem, jsou důležité patogenní mechanismy sepse (Kirkeboen and Strand 1999). Ustálené experimentální modely septických stavů prokázaly přímou indukci uvolňování mikrovezikul, která může způsobit endoteliální aktivaci (Brown and McIntyre 2011). Experimentální data předpokládají, že při sepsi mají mikrovezikuly prozánětový účinek. U pacientů s meningokokovou sepsí byly prokázány zvýšené hladiny trombocytárních, granulocytárních a endoteliálních mikrovezikul (Reid and Webster 2012). Mikrovezikuly mají také prokoagulační aktivitu, spojenou s tvorbou trombinu prostřednictvím mechanismu závislého na tkáňovém faktoru. Zvýšená koagulační aktivita zprostředkovaná mikrovezikulami byla popsána u diseminované intravaskulární koagulace (Aras et al. 2004). Produkce leukocytárních MVs se zvyšuje ve spojení se zvýšenou oxidační aktivitou. Naopak cirkulující hladiny monocytárních MVs byly u sepse sníženy a mohou tak odrážet dysfunkci monocytů v průběhu těžké sepse. Leukocyty aktivované během sepse produkují mikrovezikuly se zvýšenou expozicí adhezivních molekul na povrchu. Interakce mezi aktivovanými leukocytárními MVs a endotelovými MVs u pacientů se SIRS je zvýšená prostřednictvím adhezivních molekul (Nieuwland et al. 2000). MVs septických pacientů indukují produkci ROS a apoptózu endotelových buněk a

buněk hladkého svalstva *in vitro* prostřednictvím cesty závislé na NADP-oxidáze (Reid and Webster 2012, Mortaza et al. 2009, Mostefai et al. 2008, Laher 2011). Systémový zánět a sepsa jsou často doprovázeny syndromem akutní respirační tísně (ARDS). ARDS je spojený s přítomností MVs v alveolárním prostoru. Vyšší hladiny leukocytárních MVs v krvi a bronchoalveolární laváži pacientů s ARDS byly spojeny s lepší prognózou v časném stádiu onemocnění. To naznačuje, že MVs mohou hrát protektivní roli v patogenezi ARDS a mohou sloužit jako biomarker prognostického významu (Guervilly et al. 2011). U pacientů s meningokokovou sepsí a septickým šokem, těžkým traumatem a traumatickým poškozením mozku byly identifikovány zvýšené hladiny cirkulujících MVs, krevních destiček a endoteliálních MVs (Nieuwland et al. 2000, Fujimi et al. 2002). Vysoké hladiny endoteliálních MVs byly spojeny s vaskulární dysfunkcí a mohou přispívat k tkáňové hypoperfuzi a orgánové dysfunkci (Forest et al. 2010). MVs pacientů v septickém šoku mají pleiotropní a variabilní účinky na cílové tkáně. MVs získané od pacientů v časném stádiu septického šoku vpravené do oběhu myši indukují expresi prozáněťových proteinů NOS-2, COX-2 a NF- κ B v srdci a plicích, současně se zvýšeným oxidačním stresem. Zvýšený oxidační stres byl také detekován v játrech a v menší míře v ledvinách (Mastronardi 2011). To naznačuje, že mikrovezikuly indukované v krvi v průběhu septického šoku mohou přispívat k patogenezi dysfunkce orgánů. Zvýšené hladiny trombocytárních, endoteliálních a leukocytárních mikrovezikul predikují horší prognózu těžké sepsy (Reid and Webster 2012). Endoteliální mikrovezikuly nesou funkční receptor endoteliálního proteinu C (CD201) a přispívají ke zvýšené trombogenicitě tím, že spotřebovávají aktivovaný protein C (Morel et al. 2009).

K dispozici jsou omezené informace o roli mikrovezikul v neseptických, neinfekčních formách SIRS. Zvýšené hladiny leukocytárních MVs byly zjištěny u pacientů s popáleninami (O'Dea et al. 2016). Hypoxicko ischemický inzult vedoucí k systémové zánětové odpovědi s rozvojem multiorgánové dysfunkce je spojený se zvýšenými hladinami MVs u novorozenců (Vítková et al. 2018). MVs, vytvořené během systémové zánětové odpovědi, mohou participovat na vzniku vaskulární a endoteliální dysfunkce, což vede k oběhovému selhání s poškozením tkání a orgánů (Reid and Webster 2012). Podíl jednotlivých typů mikrovezikul při

systémovém zánětu a jejich role v patogenezi zánětových onemocnění tedy stále nejsou jasné. Hladiny MVs v krvi však mohou sloužit jako důležité ukazatele systémového zánětu.

Zánět je spojený se zvýšenou hladinou mikrovezikul v krvi. Mikrovezikuly uvolňované aktivovanými endotelovými buňkami, erytrocyty, krevními destičkami a bílými krvinkami modulují řadu buněčných procesů, což má dopad na patogenezu chorob spojených se zánětem. Pro detailní pochopení funkce MVs při zánětu jsou nezbytné studie zaměřené na stanovení jejich původu a jejich vylučování za různých fyziologických a patologických stavů. V budoucnu by se výzkum týkající se MVs měl zaměřit na optimalizaci a implementaci standardizovaného preanalytického a analytického zpracování vzorků. Důležitým krokem v našem chápání biologických účinků MVs je vývoj selektivních látek se schopností modulovat uvolňování, funkci a vylučování MVs. Přehled detekovaných mikrovezikul a jejich chování při akutních i chronických zánětových onemocněních uvádí Tabulka 4.

Tabulka 4. Mikrovezikuly při akutním zánětu a akutní exacerbaci chronických zánětových onemocnění

Nemoc	Typy MVs	Autor a rok publikace
Akutní koronární syndrom	Endoteliální MVs signifikantně zvýšené.	Sinning et al. 2011 Amabile et al. 2012 Bernal-Mizrachi et al. 2003
CMP	Endoteliální MVs signifikantně zvýšené.	Simak et al. 2006
Vaskulitida	Zvýšené MVs odvozené od tkáňového faktoru neutrofilů.	Kambas et al. 2014
Plicní embolie	Endoteliální MVs signifikantně zvýšené.	Thaler et al. 2012
Sclerosis multiplex	Endoteliální a trombocytární MVs zvýšené	Marcos-Ramiro et al. 2014 Sáenz-Cuesta et al. 2014
Reumatoidní artritida	Elevace trombocytárních MVs.	Knijff-Dutmer et al. 2002
Systémový lupus erytematodes	Zvýšení všech MVs.	Nielsen et al. 2012 Ostergaard et al. 2013
Antifosfolipidový syndrom	Endoteliální a trombocytární MVs zvýšené.	Breen et al. 2015 Chaturvedi et al. 2015
IBD	Zvýšená hladina celkových MVs a zvýšená hladina leukocytárních MVs. Zvýšená prokoagulační aktivita MVs u pediatrických pacientů.	Leonetti et al. 2013 Deutschmann et al. 2013
TTP	Endoteliální MVs zvýšené	Jimenez et al. 2001
Virová myokarditida	Endoteliální MVs zvýšené	Bachelier et al. 2017

2.4. Zánět a endotel v období porodu

2.4.1. Zánětová aktivita v období porodu

Imunitní systém hraje klíčovou roli po celé těhotenství. Stanovení správné imunitní tolerance je nezbytné pro úspěšný vývoj embrya a plodu (Pearson 2002). Těhotenství vrcholí reakcí, na které se podílí komponenty zánětu. Tato komplexní reakce iniciuje porod a modifikuje jeho průběh (Unal et al. 2011, Houben et al. 2009, Herrera et al. 2017).

Základní mechanismy, které spouští fyziologický spontánní porod v termínu nejsou zcela objasněny, zánětová aktivita zde pravděpodobně hraje významnou roli. Narůstají důkazy, které podporují asociaci mezi zánětovou reakcí a fyziologickým termínovým spontánním porodem. Hodnoty IL-1, IL-6 a TNF- α v amniální tekutině u žen v době termínu porodu byly popsány jako signifikantně zvýšené ve srovnání s hodnotami u žen, které ještě termínu porodu nedosáhly. Zvýšené hodnoty IL-1, IL-6 a IL-8 byly detekovány v amniálních tkáních u žen, které rodily spontánně v porovnání s těmi ženami, které porodily v termínu plánovaným císařským řezem. Bylo prokázáno zvýšení zánětové aktivity u matek na počátku spontánního porodu. Hodnoty IL-6 jsou zvýšené na počátku porodu ve srovnání s hladinami, které byly nalezeny před jeho počátkem. Časový vztah mezi zánětovou reakcí a nástupem porodu zůstává nejasný (Unal et al. 2011).

Zánětové molekuly byly studovány v kontextu různých perinatálních patologií. Několik studií ukázalo, že hladiny zánětových markerů mají určitou dynamiku během fyziologického porodu a významně se liší v mnoha patologických stavech (Takahashi et al. 2010). Koncentrace cytokinů (IL-1, IL6, TNF- α) typicky stoupají těsně před nástupem porodu, pokračují ve zvyšování během porodu, poté začínají klesat. Novorozenci nižšího gestačního věku mají vyšší koncentraci zánětových markerů v pupečníkové krvi ve srovnání se zdravými novorozenci porozenými v termínu (Lausten-Thomsen et al. 2014). Vysoké koncentrace IL-6 v pupečníkové krvi byly spojeny s vyšším výskytem neonatální nekrotizující enterokolitidy, periventrikulární leukomalacie a syndromu systémové zánětové odpovědi u předčasně narozených dětí (Goepfert et al. 2004).

Dynamika zánětových a endoteliálních markerů v krvi zdravých novorozenců a její změny v závislosti na způsobu porodu dosud nebyly systematicky studovány. Pochopení zánětové reakce a jejího vztahu k způsobu porodu může pomoci při včasném rozpoznání perinatálních život ohrožujících stavů, perinatální asfyxie a časně neonatální sepse.

2.4.2. Role endoteliálních zánětových markerů

Endotel je zapojený do většiny patologických stavů, a to buď jako primární cíl patogenního inzultu, nebo sekundárně, v důsledku poškození vaskularizovaných tkání. Během aktivace uvolňují endotelové buňky molekuly, které se podílí na regulaci zánětové reakce. Tyto molekuly - biomarkery, lze využít v diagnostice nebo přímo jako cílové molekuly pro ovlivnění zánětové odpovědi. Biomarkery endoteliální aktivace a dysfunkce v periferní krvi mohou být využity v diagnostice a posouzení závažnosti onemocnění u dospělých, dětí a novorozenců (Paulus et al. 2011, Aird 2008). Spontánní i instrumentální porod (i bez specifických mateřských patologií během gravidity) jsou doprovázené fyziologickou zánětovou reakcí. Intenzita této reakce může být ovlivněna typem porodu. Zvýšené koncentrace endoteliálních markerů byly detekovány při specifických komplikacích doprovázejících graviditu i porod, jako např. preeklampsie, hypertenze a diabetes mellitus (Prohazka et al. 2015, Verlohren et al. 2017, Troncoso et al. 2017). V průběhu těhotenství a porodu dochází k fyziologické aktivaci zánětové odpovědi. Úloha endotelových buněk při této zánětové odpovědi není objasněna a v současné době jsou dostupné pouze omezené informace týkající se endotelových biomarkerů u novorozenců z fyziologické gravidity v závislosti na různých způsobech porodu. Další výzkum zánětových markerů u specifických neonatálních patologií pak musí vycházet ze zjištěných koncentrací modifikovaných typem porodu (Aksoy et al. 2015, Malamitsi-Puchner et al. 1999, Malamitsi-Puchner 2000).

Mikrovezikuly produkované endotelem jsou považovány za důležité mediátory a indikátory buněčné aktivace, apoptózy nebo poškození tkání. Zvýšená hladina cirkulujících mikrovezikul je spojena s různými cévními patologiemi, zánětem, maligními a hematologickými poruchami, a také

s patologiemi, které jsou specifické pro graviditu (Simak et al. 2014, Campello et al. 2015). Změny v koncentraci endoteliálních mikrovezikul byly detekovány a kvantifikovány u procesů spojených se zánětovou odpovědí u dospělých. Informace o koncentraci endoteliálních biomarkerů a endoteliálních mikrovezikul u novorozenců chybí, stejně jako chybí data vztažená k různým situacím, či patologickým stavům, které doprovázejí prenatální, peripartální a časně postnatální období. Biomarkery, uvolňované při aktivaci a poškození endotelu v průběhu porodu u matek a jejich novorozenců, lze považovat za potenciální diagnostické markery časně detekce nemocí, které mají negativní dopad na novorozeneckou mortalitu a morbiditu. Identifikace a detekce těchto markerů a jejich klinická implementace může vést ke snížení úmrtnosti novorozenců i jejich dlouhodobé nemocnosti. K dispozici máme omezené informace o endoteliální aktivaci u různých typů porodu.

Změny v koncentracích solubilních endoteliálních markerů a mikrovezikul dané typem porodu pak mohou být postnatálně modifikovány řadou neonatálních faktorů. Studie zaměřených na vybrané solubilní zánětové markery a endoteliální markery v pupečnickové krvi a u novorozenců ukazují zvýšenou koncentraci těchto markerů po porodu, odrážející přirozené zvýšení aktivity endotelových buněk po porodu (Malamitzi et al. 2000). Endoteliální buňky se účastní nebo případně samy vyvolávají přirozenou zánětovou reakci, která je součástí aktivace vrozené imunity identifikované u novorozenců v době krátce po porodu (Shao et al. 2019, Dominguez-Bello et al. 2010). Zvýšené hladiny endoteliálních markerů včetně mikrovezikul v novorozenecké krvi ve srovnání s pupečnickovou krví mohou také odrážet kardiovaskulární změny po narození. Tento proces je spojen s aktivací a remodelací endotelových buněk, zejména v plicním systému (Wojciak-Stothard et al. 2006). Některé zánětové markery mohou být naopak spojeny přímo s porodem, kulminují v jeho průběhu a po porodu mohou klesat (Koch et al. 2011, Raynor et al. 2000).

Stav aktivace endotelu v perinatálním období může ovlivnit klinické hodnocení patologických stavů jako je například novorozenecká hypoxie, respirační selhání a novorozenecká seps. Komplexní posouzení mateřských a novorozeneckých biomarkerů produkovaných endotelem (vazoaktivní látky,

cytokiny, adhezivní molekuly, růstové a angiogenní faktory, mikrovezikuly) v perinatálním období a u různých typů porodů ještě nebylo provedeno.

Cílem naší práce je zjištění koncentrací solubilních endoteliálních markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi a novorozenecké periferní krvi mezi 48.-72. hodinou života u novorozenců stratifikovaných podle typu porodu. Pokud se endoteliální a zánětová aktivita podílí na iniciaci, nebo průběhu spontánního porodu, musí se tento proces odrazit ve výsledné koncentraci biomarkerů zánětu v závislost na typu porodu. Dalším cílem je prozkoumat koncentrací biomarkerů zánětu v periferní krvi novorozenců, sledovat jejich vývoj a možné faktory, které ovlivňují jejich měnící se koncentraci bezprostředně po narození.

O způsobech uvolňování endoteliálních mikrovezikul v pupečnickové a novorozenecké krvi v různých podskupinách pacientů v závislosti na různých typech porodů nejsou v současné době k dispozici žádná data.

3. HYPOTÉZY

Hypotéza 1: Buňky endotelu (solubilní endoteliální markery a endoteliální mikrovezikuly) budou reagovat na porod a jejich změny budou detekovatelné v pupečnickové a novorozenecké krvi.

Hypotéza 2: Změny endoteliálních markerů a mikrovezikul budou rozdílné u různých typů porodu v závislosti na vyvolavateli (spontánní porod, elektivní císařský řez).

Hypotéza 3: Rozdíly v koncentracích endoteliálních markerů a mikrovezikul mezi pupečnickovou krví a krví novorozence (3. den života) budou odrážet změny (v oblasti imunity, mikrobiální kolonizace), ke kterým dochází u novorozence po porodu.

4. CÍLE

Cíl 1: Stanovení a posouzení změn koncentrace endoteliálních zánětových markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi zdravých donošených novorozenců po spontánním porodu a po porodu elektivním císařským řezem.

Cíl 2: Stanovení a posouzení změn koncentrace endoteliálních zánětových markerů v séru zdravých donošených novorozenců 2. den života (48-72 hodin věku) po spontánním porodu a po porodu elektivním císařským řezem.

Cíl 3: Porovnání dynamiky endoteliálních zánětových markerů v čase (porod - druhý den života) u novorozenců po spontánním porodu a po porodu elektivním císařským řezem.

5. MATERIÁL A METODIKA

Pacienti – studijní skupina

Studijní skupinu tvořili novorozenci a jejich matky po nekomplikované graviditě a spontánním vaginálním porodu (spontánní skupina) a po elektivním/ plánovaném císařském řezu (elektivní skupina) v období od ledna 2016 do února 2018. Kritéria pro zařazení do studijní skupiny jsou uvedena v příloze 13.3.

Zpracování a skladování odebraných vzorků krve

Zkoumané vzorky pacientů byly odebrány z venózní pupečnickové krve a z periferní venózní krve novorozence mezi 48.-72. hodinou života, tj. v době, kdy byly odebírány vzorky krve pro povinný metabolický screening. Uvedené vzorky byly zpracovány standardizovanými metodami (Příloha 13.2 a 13.3)

Měření solubilních biomarkerů

Solubilní biomarkery byly měřeny pomocí multiplexní imunoanalýzy založené na platformě Luminex® xMAP a analyzovány na systému MAGPIX® (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty. Metodika je popsána v příloze 13.3.

Izolace a měření mikrovezikul

Mikrovezikuly byly izolovány centrifugací uložených vzorků bez krevních destiček. Celkový počet mikrovezikul a počet povrchově antigenově specifických mikrovezikul byl stanoven průtokovou cytometrií (BD FACS CantoII; BD Biosciences, San Jose, CA). Membránovní mikrovezikuly byly identifikovány na a rozlišovány podle velikosti a po označení Annexinem-V-FITC (Apronex s.r.o., Vestec, Česká republika). Buněčný původ mikrovezikul byl stanoven pomocí označení specifického antigenu pomocí destičkové a endoteliální buněčné adhezní molekuly/ PECAM1/ CD31-BV510 (BD Biosciences), molekuly adheze buněk slizničního vaskulárního adhesinu/ MadCAM1-APC (Biotechne R&D Systems), molekuly adheze vaskulárních buněk/ VCAM1/ CD106-PE, receptor

endoteliálního proteinu C/ EPCR/ CD201-PE, mezibuněčná adhezní molekula 1/ ICAM1/ CD54-pacifická modř. Specifikace izolace a protokol měření je uveden v příloze 13.2 a 13.3.

Nastavení průtokové cytometrie

Dopředný (FSC) a boční rozptyl (SSC) byl upraven pomocí směsi z polystyrenového latexu a oxidu křemičitého o definovaných velikostech ApogeeMix (Apogee flow systems, Hemel Hempstead, UK). ApogeeMix obsahuje vodnou směs plastových sférických částic o průměrech 180 nm, 240 nm, 300 nm, 590 nm, 880 nm a 1300 nm s indexem lomu $n = 1,43$ (oxid křemičitý) a 110 nm a 500 nm zelené fluorescenční částice s indexem lomu $n = 1,59$ (latex). Byli jsme schopni rozlišit velikost sférických částic na základě FSC a SSC mezi 300 nm a 1000 nm. Analýza dat byla provedena z 20.000 započítaných měření pomocí softwaru FACS BD Diva Acquisition a analytického softwaru. Výsledky byly vyjádřeny jako počet mikrovezikul na mikrolitr (MV/ μ l) plazmy vypočítaný na základě vstupního objemu plazmy a průtoku cytometru. Metodika průtokové cytometrie je podrobně zpracována v příloze 13.2 a 13.3.

Statistická analýza

Pro analýzu dat byl použit systém GraphPad-Prism5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Mann-Whitneyův U-test byl proveden ke stanovení statistické významnosti mezi skupinami. Pro analýzu párových vzorků byl použitý t-test párových vzorků. Všechny statistické testy jsou založeny na hladině významnosti $p < 0,05$.

6. VÝSLEDKY

Studijní skupinu tvořilo celkem 59 zdravých novorozenců a jejich matek. Spontánní skupina (novorozenci po spontánním vaginálním porodu, $n = 39$) a elektivní skupina (novorozenci po elektivním císařském řezu, $n = 20$). Podrobná charakteristika pacientů je uvedena v příloze 13.3. Mezi skupinami nebyly žádné významné rozdíly v porodní hmotnosti, pohlaví a skóre dle Apgarové. GestáčnÍ věk elektivní skupiny (průměr 38,7 týdne) byl významně nižší než ve skupině spontánní (průměr 39,7 týdne; $P = 0,0002$).

Koncentrace VEGFR1, endotelinu-1 a sVCAM1 v pupečníkové krvi byly významně vyšší ve skupině spontánní ve srovnání se skupinou elektivní; naopak koncentrace VEGF byly významně nižší.

Koncentrace měřených molekul v periferní novorozenecké krvi mezi 48.-72. hodinnou po narození nevykazovaly žádné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, s výjimkou endocanu, který byl významně vyšší ve skupině elektivní, ve srovnání se skupinou spontánní ($p = 0,021$).

Ve skupině spontánní bylo pět markerů (sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, sICAM1) významně vyšší v novorozenecké krvi ve srovnání s pupečnickovou krví. Endotelin-1 a sVCAM1 byly významně nižší u novorozenců ve srovnání s pupečnickovou krví.

Ve skupině elektivní vykazovalo šest markerů (sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, sICAM1, sMadCAM1) významné změny v plazmatických koncentracích, které se všechny signifikantně zvýšily v periferní novorozenecké krvi ve srovnání s pupečnickovou krví.

Plazmatické koncentrace všech sledovaných solubilních endoteliálních markerů ve vzorcích pupečníkové krve a v krvi novorozenců v různých podskupinách jsou uvedeny v příloze 13.3.

PECAM1/ CD31 pozitivní, ICAM1/ CD54 pozitivní a EPCR/ CD201 pozitivní mikrovezikuly byly významně vyšší ve skupině spontánní ve srovnání s elektivní skupinou ($P = 0,026$; $P = 0,004$; $P = 0,033$). Nebyly nalezeny žádné další významné rozdíly mezi podskupinami mikrovezikul v pupečníkové krvi. Ve vzorcích krve získaných od novorozenců po porodu se koncentrace mikrovezikul

pozitivních na Annexin-V (všechny mikrovezikuly) a mikrovezikul odvozených od endotelu nelišily mezi jednotlivými skupinami.

Celkové plazmatické koncentraci všech (Annexin-V pozitivní) a endoteliálních mikrovezikul v pupečnickové krvi a novorozeneckých vzorcích jsou uvedeny v příloze 13.3.

7. DISKUZE

Tato studie se zaměřuje na produkci zánětových markerů (solubilní markery aktivace endotelu a endoteliální mikrovezikuly) během různých typů porodu. Zaměřili jsme se na fyziologická těhotenství bez patologií, které by mohly ovlivnit koncentrace endoteliálních markerů. Ze studie byla vyloučena těhotenství komplikovaná preeklampií, mateřskou a novorozeneckou infekcí, nebo alterovanou postnatální adaptací novorozence. Jediným parametrem, který vykazoval statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami, byl gestační věk, který byl nižší ve skupině elektivní ve srovnání se skupinou spontánní. Elektivní císařské řezy jsou obvykle plánovány a jsou prováděny před spontánním nástupem porodu, rozdíly v gestačním věku mezi oběma skupinami pacientů odráží tuto skutečnost (Kolas et al. 2006).

Koncentrace endoteliálních markerů a mikrovezikul byly signifikantně zvýšeny ve skupině pacientů po spontánním porodu ve srovnání se skupinou porozenou císařským řezem. Toto zjištění je v souladu s výsledky jiných studií, které ukazují, že spontánní porod je doprovázen zánětovou odpovědí zprostředkovanou aktivací různých komplexních mechanismů včetně endoteliálních buněk (Unal et al. 2013, Aksoy et al. 2015, Malamitsi-Puchner et al. 2000, Laforgia et al. 2001). VEGF byl jediný marker významně nižší ve skupině spontánní ve srovnání s elektivní skupinou. To lze vysvětlit skutečností, že VEGF je jediným měřeným markerem, který není produkován endotelovými buňkami, a proto jeho produkce není indukována aktivací endotelu (Neufeld et al. 1999). Elektivní císařský řez je příkladem porodu, který není spuštěn přirozenými signály. Proto se u elektivního (plánovaného) císařského řezu neočekává intenzivní prodloužená zánětová/ endoteliální aktivace před nebo během porodu.

Zvýšení koncentrace endotelových markerů při spontánním porodu však nebylo nalezeno ve vzorcích novorozenecké krve odebraných třetí den života. Jediné změny zánětových markerů, které byly nalezeny v periferní krvi u novorozenců mezi 48.-72. hodinou života, byly koncentrace endocanu (významně vyšší u novorozenců porozených císařským řezem). Toto zvýšení lze vysvětlit několika mechanismy: reakcí nepřipraveného plodu na operační typ porodu nebo

změnami v rámci imunitní odpovědi novorozence v důsledku změn mikrobioty u novorozenců po císařském řezu (Laforgia et al. 2001, Shao et al. 2019)

Změny a rozdíly mezi pupečnickovou a novorozeneckou krví u každé skupiny pacientů byly hodnoceny ve druhé části studie. U většiny solubilních markerů byla detkována vyšší koncentrace v periferní krvi pacientů než v pupečnickové krvi bezprostředně po porodu.

Tato zjištění jsou v souladu s výsledky předchozích studií zaměřených na vybrané solubilní zánětové markery a endoteliální markery v pupečnickové krvi a u novorozenců odrážející přirozené zvýšení aktivity endotelových buněk po porodu (Malamitzi et al. 2000). Endotelové buňky se účastní nebo případně samy vyvolávají přirozenou zánětovou reakci, která je součástí aktivace vrozené imunity identifikované u novorozenců v době krátce po porodu (Shao et al. 2019, Dominguez-Bello et al. 2010). Zvýšené hladiny endoteliálních markerů včetně mikrovezikul v novorozenecké krvi ve srovnání s pupečnickovou krví mohou také odrážet kardiovaskulární změny po narození. Tento proces je spojen s aktivací a remodelací endotelových buněk, zejména v plicním systému (Wojciak-Stothard et al. 2006).

Dva markery (Endotelin-1 a sVCAM1) byly významně sníženy u spontánní skupiny pacientů v novorozenecké krvi. Tyto molekuly mohou odrážet endogenní změny spojené se zahájením porodu, proto jejich hladina klesá v novorozenecké krvi během několika hodin až dnů po porodu (Koch et al. 2011, Raynor et al. 2000).

V současné době nejsou k dispozici žádná data týkající se uvolňování endoteliálních mikrovezikul u zdravých novorozenců v závislosti na různých typech porodu. Naše nálezy mohou být základem pro pochopení fyziologické aktivace endotelu během porodu a v poporodním období. Při interpretaci biomarkerů zánětu u novorozenců po porodu a při přidávání nových biomarkerů do diagnostického panelu neonatálních patologických stavů je potřeba vzít způsob porodu v úvahu.

8. ZÁVĚR

Cílem naší práce bylo zjištění koncentrací solubilních endoteliálních markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi a v periferní krvi novorozenců mezi 48.-72. hodinou života u nekomplikovaných těhotenství a sponánních vaginálních porodů ve srovnání s porody elektivním císařským řezem.

Dále jsme sledovali změny koncentrací endoteliálních biomarkerů zánětu v periferní krvi novorozenců a možné faktory, které ovlivňují jejich měnící se koncentraci bezprostředně po narození.

Prokázali jsme zvýšené koncentrace solubilních endoteliálních markerů a endoteliálních mikrovezikul v pupečnickové krvi po spontánním vaginálním porodu ve srovnání s plánovaným císařským řezem. Zvýšené koncentrace endoteliálních markerů a mikrovezikul v pupečnickové krvi při spontánním porodu mohou odrážet přirozenou aktivaci krevních buněk a vaskulatury včetně endotelových buněk spojených se zahájením porodu.

Po porodu došlo u většiny měřených solubilních endoteliálních markerů ke zvýšení koncentrací u obou skupin pacientů (novorozenci po spontánním vaginálním porodu a novorozenci po elektivním císařském řezu) ve srovnání s pupečnickovou krví. Rostoucí poporodní koncentrace endoteliálních markerů jsou pravděpodobně důsledkem poporodní aktivace vrozené imunity novorozence exogeními podněty.

Naše práce je první studie popisující koncentrace solubilních endoteliálních zánětových markerů a endoteliálních mikrovezikul v periferní krvi novorozenců v závislosti na různých typech porodu. Výsledky přispívají k mapování potenciálních spouštěčů spontánního porodu a přinášejí nové informace o aktivitách zánětu a endotelu v perinatálním období. Stanovení koncentrací solubilních endoteliálních biomarkerů a endoteliálních mikrovezikul u různých typů porodů je prvním krokem k mapování a vytvoření normálních rozmezí koncentrací pupečnickových a neonatálních biomarkerů, které pak mohou být využívány k identifikaci a kvantifikaci perinatálních a novorozeneckých patologií.

9. CONCLUSION

The aim of our study was to assess endothelial biomarkers in cord and neonatal blood following different modes of delivery.

We found significantly increased concentrations of cord blood soluble endothelial markers (sVEGFR1, Endothelin-1 and sVCAM1) and cell-membrane derived endothelium specific microvesicles (EPCR/CD201+, ICAM1/CD54+ and PECAM1/CD31+) after spontaneous vaginal delivery compared to elective cesarean section. Increased cord blood concentrations of endothelial markers and microvesicles in spontaneous delivery may reflect the natural activation of blood cells and vasculature including endothelial cells associated with the initiation of labor.

Irrespective of the delivery mode endothelial markers sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, and sICAM1, were significantly increased in neonatal compared to cord blood. This increase in both groups of patients (after spontaneous and instrumental delivery) can be explained as a possible consequence of activation of the innate immunity of the newborn by quantity of exogenous stimuli.

This is so far the first study describing the concentrations of cord blood and neonatal endothelial microvesicles together with soluble plasma endothelial markers in different modes of delivery in uncomplicated term pregnancies and healthy term newborns.

10. POUŽITÁ LITERATURA

AGAPITOV, A. V. a W. G. HAYNES. Role of endothelin in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* [online]. 2002, **3**(1), 1-15 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1470-3203. Dostupné z: doi:10.3317/jraas.2002.001

AIRD, W. C. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep.* 2008, **60**(1):139-43. ISSN 1734-1140.

AKIRA, S. a O.TAKEUCHI. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*[online]. 2006, **124**(4), 783-801 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015

AKSOY, M., A.N. AKSOY, E. LALOGLU et al. Umbilical cord blood endocan levels according to the delivery mode. *Clin Exp Obstet Gynecol.* Clin Exp Obstet Gynecol. 2015, **42**(6):776-80. ISSN 2709-0094.

ALJOE, J. Gallbladder volvulus-acute cholecystitis ‘with a twist’. *Journal of Surgical Case Reports*[online]. 2018, **2018**(11) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2042-8812. Dostupné z: doi:10.1093/jscr/rjy303

ALOISI, F., A. CARÉ, P. GALLO, et al. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1992, **149**(7) 2358-2366. ISSN 0022-1767.

AMABILE, N., A. P. GUERIN, A. TEDGUI, et al. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. 2012, **27**(5), 1873-1880 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfr573

ANNANE, D., E. BELLISSANT a J-M CAVAILLON. Septic shock. *The Lancet* [online]. 2005, **365**(9453), 63-78 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(04)17667-8

ARAS, O., A. SHET, R. R. BACH, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* [online]. 2004, **103**(12), 4545-4553 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2003-03-0713

ARDERIU, G., E. PEÑA a L. BADIMON. Angiogenic Microvascular Endothelial Cells Release Microparticles Rich in Tissue Factor That Promotes Postischemic Collateral Vessel Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2015, **35**(2), 348-357 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.114.303927

ARNON, S., I. LITMANOVITZ, R. H. REGEV, et al. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis. *Journal of Perinatology* [online]. 2007, **27**(5), 297-302 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0743-8346. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jp.7211682

AUGUSTINE, D., L. V. AYERS, E. LIMA, et al. Dynamic Release and Clearance of Circulating Microparticles During Cardiac Stress. *Circulation Research* [online]. 2014, **114**(1), 109-113 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301904

BAEK, Y. W., S. BROKAT, J. F. PADBURY, et al. Inter- α inhibitor proteins in infants and decreased levels in neonatal sepsis. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2003, **143**(1), 11-15 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(03)00190-2

BAI, S., W. GUO, Y. FENG, et al. Efficacy and safety of anti-inflammatory agents for the treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 2019, **91**(1), 21-32 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-3050. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp-2019-320912

BALDUYCK, M., D. ALBANI, M. JOURDAIN, et al. Inflammation-induced systemic proteolysis of inter- α -inhibitor in plasma from patients with sepsis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* [online]. 2000, **135**(2), 188-198 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00222143. Dostupné z: doi:10.1067/mlc.2000.104462

BALK, R. A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Virulence* [online]. 2013, **5**(1), 20-26 [cit. 2021-8-3]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.27135

BARRY, O. P., M. G. KAZANIETZ, D. PRATICÒ, et al. Arachidonic Acid in Platelet Microparticles Up-regulates Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin Formation via a Protein Kinase C/Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(11), 7545-7556 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.11.7545

BÉCHARD, D., T. GENTINA, M. DELEHEDDE, et al. Endocan Is a Novel Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Proteoglycan That Promotes Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Mitogenic Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(51), 48341-48349 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M108395200

BÉCHARD, D., V. MEIGNIN, A. SCHERPEREEL, et al. Characterization of the Secreted Form of Endothelial-Cell-Specific Molecule 1 by Specific Monoclonal Antibodies. *Journal of Vascular Research* [online]. 2000, **37**(5), 417-425 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1018-1172. Dostupné z: doi:10.1159/000025758

BÉCHARD, D., A. SCHERPEREEL, H. HAMMAD, et al. Human Endothelial-Cell Specific Molecule-1 Binds Directly to the Integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and Blocks Binding to Intercellular Adhesion Molecule-1. *The Journal of Immunology* [online]. 2001, **167**(6), 3099-3106 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.167.6.3099

BEILMAN, G. Exhaled Nitric Oxide in Pathophysiologic States. *Chest* [online]. 2004, **125**(1), 11-13 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00123692. Dostupné z: doi:10.1378/chest.125.1.11

BEVILACQUA, M. P. a R. M. NELSON. Selectins. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1993, **91**(2), 379-387 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI116210

BIEL, V., J. NOVÁK, L. PLUHÁČEK, et al. Endothelial function, its relation to arterial hypertension and the possibility of its modulation. *Vnitřní lékařství* [online]. 2018, **64**(7-8), 762-770 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0042773X. Dostupné z: doi:10.36290/vnl.2018.104

BLUMBERG, N., K. F. GETTINGS, CH. TURNER, et al. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion* [online]. 2006, **46**(10), 1813-1821 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00979.x

BOHM, F. a J. PERNOW. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* [online]. 2007, **76**(1), 8-18 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00086363. Dostupné z: doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.004

BONE, R. C., A.B. ROBERT, B. C. FRANK, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* [online]. 1992, **101**(6), 1644-1655 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00123692. Dostupné z: doi:10.1378/chest.101.6.1644

BORON, W. F. a E. L. BOULPAEP. *Medical physiology a cellular and molecular approach*. 2nd International ed. Philadelphia: Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009. p. 480. ISBN 978-1-4377-2017-4. ISBN 978-1-4377-2017-4

BROWN, M., M. BROWN, D.FEAIRHELLER, et al. Racial differences in tumor necrosis factor- α -induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. *Vascular Health and Risk Management* [online]. 2011, **2011**(7), 541-50 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1178-2048. Dostupné z: doi:10.2147/VHRM.S22930

BROWN, G. T. a T. M. MCINTYRE. Lipopolysaccharide Signaling without a Nucleus: Kinase Cascades Stimulate Platelet Shedding of Proinflammatory IL-1 β -Rich Microparticles. *The Journal of Immunology* [online]. 2011, **186**(9), 5489-

5496 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-1767. Dostupné z:
doi:10.4049/jimmunol.1001623

BUCKLEY, CH. D., G. E. RAINGER, P.F. BRADFELD, et al. Cell adhesion: More than just glue (Review). *Molecular Membrane Biology* [online]. 2009, **15**(4), 167-176 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0968-7688. Dostupné z:
doi:10.3109/09687689709044318

BURGER, D., S. SCHOCK, CH. S. THOMPSON, et al. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science* [online]. 2013, **124**(7), 423-441 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20120309

BURNOUF, T., M-L. CHOU, H. GOUBRAN, et al. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful? *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2015, **53**(2), 137-145 [cit. 2021-8-3]. ISSN 14730502. Dostupné z:
doi:10.1016/j.transci.2015.10.010

CAMPELLO, E., L. SPIEZIA, C. M. RADU, et al. Circulating microparticles in umbilical cord blood in normal pregnancy and pregnancy with preeclampsia. *Thrombosis Research* [online]. 2015, **136**(2), 427-431 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00493848. Dostupné z: doi:10.1016/j.thromres.2015.05.029

CARMELIET, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* [online]. 2005, **69**(3), 4-10 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0030-2414. Dostupné z: doi:10.1159/000088478

CARPENITO, C., A. M. PYSZNIAK a F. TAKEI. ICAM-2 Provides a Costimulatory Signal for T Cell Stimulation by Allogeneic Class II MHC. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. 2003, **45**(3), 248-254 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0300-9475. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3083.1997.d01-391.x

CAVAILLON, J. M. a CH. ADRIE. *Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation: From Biology to Critical Care*. 1. Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-3-527-62616-8.

CHAABAN, H., K. SINGH, J. HUANG, et al. Role of Inter-Alpha Inhibitor Proteins in the Diagnosis of Neonatal Sepsis. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2009, **154**(4), 620-622.e1 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00223476. Dostupné z:
doi:10.1016/j.jpeds.2008.10.008

CHENG, Y. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. *Science* [online]. **296**(5567), 539-541 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1068711

CHIESA, C., L. PACIFICO, J. F. OSBORN, et al. Early-Onset Neonatal Sepsis. *Medicine* [online]. 2015, **94**(30) [cit. 2021-8-3]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.0000000000001230

CLOUTIER, N., S. TAN, L. H. BOUDREAU, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 2013, **5**(2), 235-249 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1757-4676. Dostupné z: doi:10.1002/emmm.201201846

COGNASSE, F., H. HAMZEH-COGNASSE, S. LARADI, et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2015, **53**(2), 159-167 [cit. 2021-8-3]. ISSN 14730502. Dostupné z: doi:10.1016/j.transci.2015.10.013

CORROLL, S.G. a K.H. NICOLAIDES. Fetal Haematological Response to Intra-Uterine Infection in Preterm Prelabour Amniorrhexis. *Fetal Diagnosis and Therapy* [online]. 1995, **10**(5), 279-285 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1421-9964. Dostupné z: doi:10.1159/000264244

CURTIS, A. M., J. EDELBERG, R. JONAS, et al. Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vascular Medicine* [online]. 2013, **18**(4), 204-214 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1358-863X. Dostupné z: doi:10.1177/1358863X13499773

DASGUPTA, S. K., A. LE, T. CHAVAKIS, et al. Developmental Endothelial Locus-1 (Del-1) Mediates Clearance of Platelet Microparticles by the Endothelium. *Circulation* [online]. 2012, **125**(13), 1664-1672 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.068833

DAVIS, A.L., J. A. CARCILLO, R. K. ANEJA, et al. American College of Critical Care Medicine Clinical Practice Parameters for Hemodynamic Support of Pediatric and Neonatal Septic Shock. *Critical Care Medicine* [online]. 2017, **45**(6), 1061-1093 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0000000000002425

DAVENPORT, A.P., K. A. HYNDMAN, N. DHAUN, et al. Endothelin. *Pharmacological Reviews* [online]. 2016, **68**(2), 357-418 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.115.011833

DAYAN, F., N. M. MAZURE, M. CH. BRAHIMI-HORN et al. A Dialogue between the Hypoxia-Inducible Factor and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment* [online]. 2008, **1**(1), 53-68 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1875-2292. Dostupné z: doi:10.1007/s12307-008-0006-3

DEL VECCHIO, A. Evaluation and management of thrombocytopenic neonates in the intensive care unit. *Early Human Development* [online]. 2014, **90**,

S51-S55 [cit. 2021-8-3]. ISSN 03783782. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-3782(14)50014-X

DENG, F., S. WANG, S. CAI, et al. Inhibition of Caveolae Contributes to Propofol Preconditioning-Suppressed Microvesicles Release and Cell Injury by Hypoxia-Reoxygenation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**, 1-13 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/3542149

DESMONTS, G., F. FORESTIER, P. THULIEZ, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. 1985, **325**(8427), 500-504. ISSN 0140-6736.

DEVARAJ, S., P. R. KUMARESAN a I. JIALAL. C-Reactive Protein Induces Release of Both Endothelial Microparticles and Circulating Endothelial Cells In Vitro and In Vivo: Further Evidence of Endothelial Dysfunction. *Clinical Chemistry* [online]. 2011, **57**(12), 1757-1761 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2011.169839

DIGNAT-GEORGE, F. a CH. M. BOULANGER. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2011, **31**(1), 27-33 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.110.218123

DOMINGUEZ-BELLO, M. G., E. K. COSTELLO, M. CONTRERAS, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(26), 11971-11975 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1002601107

DONDERS, G.G.G., P. MOERMAN, J. CAUDRON et al. Intra-uterine Candida infection: a report of four infected fetusses from two mothers. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* [online]. 1991, **38**(3), 233-238 [cit. 2021-8-3]. ISSN 03012115. Dostupné z: doi:10.1016/0028-2243(91)90298-Y

ERDBRÜGGER, U. a T. H. LE. Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers? *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 2015, **27**(1), 12-26 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2015010074

FAILLE, D., F. EL-ASSAAD, A. J. MITCHELL, et al. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2012, **16**(8), 1731-1738 [cit. 2021-8-3]. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01434.x

FERRARA, N., H-P. GERBER a J. LECOUTER. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* [online]. 2003, **9**(6), 669-676 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm0603-669

FERRARA, N. a T. DAVIS-SMYTH. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* [online]. 1997, **18**(1), 4-25 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/edrv.18.1.0287

FOREST, A., E. PAUTAS, P. RAY, et al. Circulating Microparticles and Procoagulant Activity in Elderly Patients. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* [online]. 2010, **65A**(4), 414-420 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5006. Dostupné z: doi:10.1093/gerona/glp187

FREYSSINET, J-M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2003, **1**(7), 1655-1662 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1538-7933. Dostupné z: doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00309.x

FUJIMI, S., H. OGURA, H. TANAKA, et al. Activated Polymorphonuclear Leukocytes Enhance Production of Leukocyte Microparticles with Increased Adhesion Molecules in Patients with Sepsis. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* [online]. 2002, **52**(3), 443-448 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-5282. Dostupné z: doi:10.1097/00005373-200203000-00005

GERDES, Jeffrey S. Clinicopathologic Approach to the Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Clinics in Perinatology* [online]. 1991, **18**(2), 361-381 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00955108. Dostupné z: doi:10.1016/S0095-5108(18)30528-1

GLARÍA, E. a A.F. VALLEDOR. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells* [online]. 2020, **9**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9010228

GOEPFERT, A. R., W. W. ANDREWS, W. CARLO, et al. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2004, **191**(4), 1375-1381 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2004.06.086

GOMEZ, R., R. ROMERO, F. GHEZZI, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 1998, **179**(1), 194-202 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9378(98)70272-8

GORIS, R. J. A. MODS/SIRS: Result of an Overwhelming Inflammatory Response? *World Journal of Surgery* [online]. 1996, **20**(4), 418-421 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0364-2313. Dostupné z: doi:10.1007/s002689900066

GOTSCH, F., R. ROMERO, J. P. KUSANOVIC, et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic

infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: A role for interleukin-10. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [online]. 2009, **21**(8), 529-547 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1476-7058. Dostupné z: doi:10.1080/14767050802127349

GOULD, S. J. a G. RAPOSO. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v2i0.20389

GU, P., A. THEISS, J. HAN, et al. Increased Cell Adhesion Molecules, PECAM-1, ICAM-3, or VCAM-1, Predict Increased Risk for Flare in Patients With Quiescent Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* [online]. 2017, **51**(6), 522-527 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0192-0790. Dostupné z: doi:10.1097/MCG.0000000000000618

GUERVILLY, CH., R. LACROIX, J.-M. FOREL, et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. *Critical Care* [online]. 2011, **15**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/cc9978

GYÖRGY, B., T. G. SZABÓ, M. PÁSZTÓI, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2011, **68**(16), 2667-2688 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-011-0689-3

HENDRICKS-MUNOZ, K., J. XU a P. MALLY. Biomarkers for neonatal sepsis: recent developments. *Research and Reports in Neonatology* [online]. 2014, **2014**(4), 157-168. [cit. 2021-8-3]. ISSN 1179-9935. Dostupné z: doi:10.2147/RRN.S48316

HERRERA, CH. A., J. STOERKER, J. CARLQUIST, et al. Cell-free DNA, inflammation, and the initiation of spontaneous term labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2017, **217**(5), 583.e1-583.e8 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2017.05.027

HIBBERT, J. E., A. CURRIE a T. STRUNK. Sepsis-Induced Immunosuppression in Neonates. *Frontiers in Pediatrics* [online]. 2018, **6** [cit. 2021-8-3]. ISSN 2296-2360. Dostupné z: doi:10.3389/fped.2018.00357

HIRST, D. G. a T. ROBSON. Nitric Oxide Physiology and Pathology. MCCARTHY, Helen O. a Jonathan A. COULTER, ed. *Nitric Oxide* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-11-26, s. 1-13 [cit. 2021-8-3]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61737-963-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61737-964-2_1

HOFER, N., E. ZACHARIAS, W. MÜLLER, et al. An Update on the Use of C-Reactive Protein in Early-Onset Neonatal Sepsis: Current Insights and New

Tasks. *Neonatology* [online]. 2012, **102**(1), 25-36 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1661-7819. Dostupné z: doi:10.1159/000336629

HONG, Y., D. ELEFThERIOU, A. A. K. HUSSAIN, et al. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies Stimulate Release of Neutrophil Microparticles. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 2012, **23**(1), 49-62 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2011030298

HORNIK, CH. P., D. K. BENJAMIN, K. C. BECKER, et al. Use of the Complete Blood Cell Count in Early-onset Neonatal Sepsis. *Pediatric Infectious Disease Journal* [online]. 2012, **31**(8), 799-802 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0891-3668. Dostupné z: doi:10.1097/INF.0b013e318256905c

HOUBEN, M. L., P. G. J. NIKKELS, G. M. Van BLEEK, et al. The Association between Intrauterine Inflammation and Spontaneous Vaginal Delivery at Term: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* [online]. 2009, **4**(8) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006572

HUANG, S. T., K. H. SHU, C. H. CHENG, et al. Serum Total p-Cresol and Indoxyl Sulfate Correlated With Stage of Chronic Kidney Disease in Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* [online]. 2012, **44**(3), 621-624 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00411345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2011.11.023

INZHUTOVA, A. I., A. A. LARIONOV, M. M. PETROVA, et al. Theory of Intercellular Communication in the Development of Endothelial Dysfunction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* [online]. 2012, **153**(2), 201-205 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0007-4888. Dostupné z: doi:10.1007/s10517-012-1676-x

JANEWAY, CH. Immunogenecity signals 1,2,3... and 0. *Immunology Today* [online]. 1989, **10**(9), 283-286 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01675699. Dostupné z: doi:10.1016/0167-5699(89)90081-9

JANKE, J., S. ENGELI, K. GORZELNIAK, et al. Adipose Tissue and Circulating Endothelial Cell Specific Molecule-1 in Human Obesity. *Hormone and Metabolic Research* [online]. 2006, **38**(1), 28-33 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0018-5043. Dostupné z: doi:10.1055/s-2006-924973

JASANI, B., AS-Y. LEONG, K. COOPER et al. Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology. *Mol Pathol*. 2000; **53**(1):53. Oxford University Press, 1999. ISBN 1 900151 31 6.

JANSEN, F., X. YANG, F. F. HOYER, et al. Endothelial Microparticle Uptake in Target Cells Is Annexin I/Phosphatidylserine Receptor Dependent and Prevents Apoptosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2012, **32**(8), 1925-1935 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.112.253229

JANSEN, F., X. YANG, S. PROEBSTING, et al. MicroRNA Expression in Circulating Microvesicles Predicts Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American Heart Association* [online]. 2014, **3**(6) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2047-9980. Dostupné z: doi:10.1161/JAHA.114.001249

JUNG, E., R. ROMERO, L. YEO, et al. The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* [online]. 2020, **25**(4) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1744165X. Dostupné z: doi:10.1016/j.siny.2020.101146

KÄÄPÄ, P. a E. KOISTINEN. Maternal and neonatal C-reactive protein after interventions during delivery. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* [online]. 1993, **72**(7), 543-546 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0001-6349. Dostupné z: doi:10.3109/00016349309058160

KALRA, H., R. J. SIMPSON, H. JI, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biology* [online]. 2012, **10**(12) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1001450

KAWANABE, Y. a S. M. NAULI. Endothelin. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2011, **68**(2), 195-203 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-010-0518-0

KHAN, S. Y., M. R. KELHER, J. M. HEAL, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* [online]. 2006, **108**(7), 2455-2462 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-04-017251

KINTER, A. L., E. J. GODBOUT, J. P. MCNALLY, et al. Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *The Journal of Immunology* [online]. 2008, **181**(10), 6738-6746 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.181.10.6738

KIRKEBOEN, K. A. a O. A. STRAND. The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [online]. 1999, **43**(3), 275-288 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00015172. Dostupné z: doi:10.1034/j.1399-6576.1999.430307.x

KOCH, L., M. T. DABEK, D. FROMMHOLD a J. POESCHL. Stable Precursor Fragments of Vasoactive Peptides in Umbilical Cord Blood of Term and Preterm Infants. *Hormone Research in Paediatrics* [online]. 2011, **76**(4), 234-239 [cit. 2021-8-2]. ISSN 1663-2826. Dostupné z: doi:10.1159/000329285

KOLÅS, T., O. D. SAUGSTAD, A. K. DALTVEIT, et al. Planned cesarean versus planned vaginal delivery at term: Comparison of newborn infant outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2006, **195**(6), 1538-1543 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2006.05.005

LAFORGIA, N., I. DIFONZO, M. ALTOMARE, et al. Cord blood endothelin-1 and perinatal asphyxia. *Acta Paediatrica* [online]. 2001, **90**(3), 351-352 [cit. 2021-8-3]. ISSN 08035253. Dostupné z: doi:10.1111/j.1651-2227.2001.tb00317.x

LAHER, I. Microparticles have macro effects in sepsis*. *Critical Care Medicine* [online]. 2011, **39**(7), 1842-1843 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0b013e31821cb06d

LATHAM, S. L., N. TIBERTI, N. GOKOOLPARSADH, et al. Immuno-analysis of microparticles: probing at the limits of detection. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep16314

LASSALLE, P., S. MOLET, A. JANIN, et al. ESM-1 Is a Novel Human Endothelial Cell-specific Molecule Expressed in Lung and Regulated by Cytokines. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(34), 20458-20464 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.34.20458

LAUSTEN-THOMSEN, U., M. OLSEN, G. GREISEN et al. Inflammatory Markers in Umbilical Cord Blood from Small-For-Gestational-Age Newborns. *Fetal and Pediatric Pathology* [online]. 2013, **33**(2), 114-118 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1551-3815. Dostupné z: doi:10.3109/15513815.2013.879239

LEE C.Y., P.Y. CHEN, F.L. HUANG, et al. Microbiologic spectrum and susceptibility pattern of clinical isolates from the pediatric intensive care unit in a single medical center - 6 years' experience. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009, **42**(2):160-5. PMID: 19597649. ISSN 1684-1182.

LÉVESQUE, J-P., Y.TAKAMATSU, S. K. NILSSON, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* [online]. 2001, **98**(5), 1289-1297 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.5.1289

LIA, G., L. BRUNELLO, S. BRUNO, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease. *Leukemia* [online]. 2018, **32**(3), 765-773 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2017.277

LUCIGNANO, B., S. RANNO, O. LIESENFELD, et al. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis. *Journal of Clinical Microbiology* [online].

2011, **49**(6), 2252-2258 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.02460-10

MAAS, S. L.N., X. O. BREAKFIELD a A. M. WEAVER. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology* [online]. 2017, **27**(3), 172-188 [cit. 2021-8-3]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003

MAGUIRE, J. J. a A. P. DAVENPORT. Endothelin@25 – new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR R review 12. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2014, **171**(24), 5555-5572 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.12874

MALAMITSI-PUCHNER, A., J. TZIOTIS, E. PROTONOTARIOU, et al. Angiogenic Factors in the Perinatal Period: Diversity in Biological Functions Reflected in Their Serum Concentrations Soon after Birth. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2000, **900**(1), 169-173 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06227.x

MALAMITSI-PUCHNER, A., T. BOUTSIKOU, E. ECONOMOU, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Intrauterine Growth-Restricted Fetuses and Neonates. *Mediators of Inflammation* [online]. 2005, **2005**(5), 293-297 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/MI.2005.293

MALLE, E. a F. C. DE BEER. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *European Journal of Clinical Investigation* [online]. 1996, **26**(6), 427-435 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0014-2972. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2362.1996.159291.x

MARKIEWICZ, M., E. RICHARD, N. MARKS et al. Impact of Endothelial Microparticles on Coagulation, Inflammation, and Angiogenesis in Age-Related Vascular Diseases. *Journal of Aging Research* [online]. 2013, **2013**, 1-11 [cit. 2021-8-3]. ISSN 2090-2204. Dostupné z: doi:10.1155/2013/734509

MASTRONARDI, M. L., H. A. MOSTEFAI, F. MEZIANI, et al. Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress*. *Critical Care Medicine* [online]. 2011, **39**(7), 1739-1748 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0b013e3182190b4b

MATSUDA, N. a Y. HATTORI. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy. *Journal of Pharmacological Sciences* [online]. 2006, **101**(3), 189-198 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1347-8613. Dostupné z: doi:10.1254/jphs.CRJ06010X

MCCARTHY, E.M., D. MORENO-MARTINEZ, F.L. WILKINSON, et al. Microparticle subpopulations are potential markers of disease progression and

vascular dysfunction across a spectrum of connective tissue disease. *BBA Clinical*[online]. 2017, **7**, 16-22 [cit. 2021-8-3]. ISSN 22146474. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbacli.2016.11.003

MERTEN, M. a P. THIAGARAJAN. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* [online]. 2000, **102**(16), 1931-1936 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.102.16.1931

MEZOUAR, S., D. MEGE, R. DARBOUSSET, et al. Involvement of Platelet-Derived Microparticles in Tumor Progression and Thrombosis. *Seminars in Oncology* [online]. 2014, **41**(3), 346-358 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00937754. Dostupné z: doi:10.1053/j.seminoncol.2014.04.010

MIYAUCHI, T. a S. SAKAI. Endothelin and the heart in health and diseases. *Peptides* [online]. 2019, **111**, 77-88 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2018.10.002

MOREL, O., L. JESEL, J-M. FREYSSINET et al. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2011, **31**(1), 15-26 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.109.200956

MOREL, O., F. TOTI, N. MOREL, et al. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* [online]. 2009, **94**(3), 313-317 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2008.003657

MORGAN-CAPNER, P., C. H. RODECK, K. H. NICOLAIDES et al. Prenatal detection of rubella-specific IgM in fetal sera. *Prenatal Diagnosis* [online]. 1985, **5**(1), 21-26 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01973851. Dostupné z: doi:10.1002/pd.1970050105

MORTAZA, S., M. C. MARTINEZ, C. BARON-MENGUY, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats*. *Critical Care Medicine* [online]. 2009, **37**(6), 2045-2050 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0b013e3181a00629

MOSTEFAI, H. A., F. MEZIANI, M. L. MASTRONARDI, et al. Circulating Microparticles from Patients with Septic Shock Exert Protective Role in Vascular Function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2008, **178**(11), 1148-1155 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.200712-1835OC

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2008, **118**(1), 18-35 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.001

NAKAYAMA, T., S. SONODA, T. URANO, et al. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clinical Chemistry* [online]. 1993, **39**(2), 293-297 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/39.2.293

NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH S., et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, **13**(1): 9-22. ISSN 1530-6860.

NEWMAN, P. J. a D. K. NEWMAN. Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2003, **23**(6), 953-964 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi: 10.1161/01.ATV.0000071347.69358.D9

NIEUWLAND, R., R. J. BERCKMANS, S. MCGREGOR, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* [online]. 2000, **95**(3), 930-935 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V95.3.930.003k46_930_935

NOMURA, S. a M. SHIMIZU. Clinical significance of procoagulant microparticles. *Journal of Intensive Care* [online]. 2015, **3**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2052-0492. Dostupné z: doi:10.1186/s40560-014-0066-z

O'DEA, K. P., J. R. PORTER, N. TIRLAPUR, et al. Circulating Microvesicles Are Elevated Acutely following Major Burns Injury and Associated with Clinical Severity. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(12) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0167801

PACIFICO, L., J. F. OSBORN, F. NATALE, et al. *Procalcitonin in Pediatrics* [online]. Elsevier, 2013, 203-263 [cit. 2021-8-3]. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780124052116. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-405211-6.00007-3

PAN, Q., H. LIU, CH. ZHENG, et al. Microvesicles Derived from Inflammation-Challenged Endothelial Cells Modulate Vascular Smooth Muscle Cell Functions. *Frontiers in Physiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2021-8-3]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2016.00692

PAULUS, P., C. JENNEWEIN, a K. ZACHAROWSKI. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* [online]. 2011, **16**(sup1), S11-S21 [cit. 2021-8-2]. ISSN 1354-750X. Dostupné z: doi:10.3109/1354750X.2011.587893

PEARSON, H. Immunity's pregnant pause. *Nature* [online]. 2002, **420**(6913), 265-266 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/420265a

PEPYS, M. B. a G. M. HIRSCHFIELD. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2003, **111**(12), 1805-1812 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI18921

PITTET, D., S. RANGEL-FRAUSTO, N. L. D. TARARA, et al. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: Incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Medicine* [online]. 1995, **21**(4), 302-309 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0342-4642. Dostupné z: doi:10.1007/BF01705408

PROCHAZKA, M., J. PROCHÁZKOVÁ, J. LUBUŠSKÝ et al. Markers of endothelial activation in preeclampsia. *Clin Lab.* 2015, **61**(1-2), 39-46. ISSN 1433-6510.

RANGEL-FRAUSTO, M., S. D. PITTET, M. COSTIGAN, et al. The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *JAMA* [online]. 1995, **273**(2) [cit. 2021-8-3]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1995.03520260039030

RAINER, T. H. L-selectin in health and disease. *Resuscitation* [online]. 2002, **52**(2), 127-141 [cit. 2021-8-3]. ISSN 03009572. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9572(01)00444-0

RANK, A., R. NIEUWLAND, A. CRISPIN, et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* [online]. 2010, **22**(2), 111-116 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0953-7104. Dostupné z: doi:10.3109/09537104.2010.520373

RAYNOR, B. D., S. PARTHASARTHY a E. K. EMORY. Umbilical cord vascular cell adhesion molecule concentration following labor. *Matern Fetal Med.* 2000, **9**(5), 291-3. ISSN 3099067.

RIZOV, M., P. ANDREEVA a I. DIMOVA. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2017, **56**(2), 127-132 [cit. 2021-8-3]. ISSN 10284559. Dostupné z: doi:10.1016/j.tjog.2016.06.019

REID, V.L. a N.R. WEBSTER. Role of microparticles in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* [online]. 2012, **109**(4), 503-513 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00070912. Dostupné z: doi:10.1093/bja/aes321

ROBERTSON, CH. M. a C. M. COOPERSMITH. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes and Infection* [online]. 2006, **8**(5), 1382-1389 [cit. 2021-8-3]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2005.12.016

ROEBUCK, K. A. a A. FINNEGAN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* [online].

1999, **66**(6), 876-888 [cit. 2021-8-3]. ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1002/jlb.66.6.876

RUBARTELLI, A. a M. T. LOTZE. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology* [online]. 2007, **28**(10), 429-436 [cit. 2021-8-3]. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2007.08.004

RODRIGUEZ, A. J., A. MOUSA, P. R. EBELING, et al. Effects of vitamin D supplementation on inflammatory markers in heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-19708-0

SALVADOR, B., A. ARRANZ, S. FRANCISCO, et al. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological Research* [online]. 2016, **108**, 46-56 [cit. 2021-8-3]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2016.03.038

SARRAZIN, S., E. A., M. LYON, et al. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): A potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2006, **1765**(1), 25-37 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0304419X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2005.08.004

SAUAIA, A., F. A. MOORE a E. E. MOORE. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. *Critical Care Clinics* [online]. 2017, **33**(1), 167-191 [cit. 2021-8-3]. ISSN 07490704. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccc.2016.08.00

SCHERPEREEL, A., F. DEPONTIEU, B. GRIGORIU, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis*. *Critical Care Medicine* [online]. 2006, **34**(2), 532-537 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/01.CCM.0000198525.82124.74

SCHINELLI, S. Pharmacology and Physiopathology of the Brain Endothelin System: An Overview. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2006, **13**(6), 627-638 [cit. 2021-8-3]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986706776055652

SEKULA, M., G. JANAWA, E. STANKIEWICZ, et al. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine in vitro. *Cellular and Molecular Biology Letters* [online]. 2011, **16**(1) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1689-1392. Dostupné z: doi:10.2478/s11658-010-0040-2

SHAO, Y., S. C. FORSTER, E. TSALIKI, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* [online]. 2019, **574**(7776), 117-121 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-019-1560-1

SINGER, M., C. S. DEUTSCHMAN, CH. W. SEYMOUR, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* [online]. 2016, **315**(8) [cit. 2021-8-3]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2016.0287

SINNING, J. M., J. LOSCH, K. WALENTA, et al. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *European Heart Journal*[online]. 2011, **32**(16), 2034-2041 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehq478

SITIA, S., L. TOMASONI, F. ATZENI, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2010, **9**(12), 830-834 [cit. 2021-8-3]. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2010.07.016

STAMPALIJA, T., R. ROMERO, S. J. KORZENIEWSKI, et al. Soluble ST2 in the fetal inflammatory response syndrome: in vivo evidence of activation of the anti-inflammatory limb of the immune response. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [online]. 2013, **26**(14), 1384-1393 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1476-7058. Dostupné z: doi:10.3109/14767058.2013.784258

STITHAM, J., CH. MIDGETT, K. A. MARTIN, et al. Prostacyclin: An Inflammatory Paradox. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2011, **2** [cit. 2021-8-3]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2011.00024

STRIETER, R. M., S. L. KUNKEL a R. C. BONE. Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Critical Care Medicine* [online]. 1993, **21**(Supplement) [cit. 2021-8-3]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/00003246-199310001-00006

SUN, J., L. Yuhua , L. Gina, et al. E-Selectin Mediated Adhesion and Migration of Endothelial Colony Forming Cells Is Enhanced by SDF-1 α /CXCR4. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(4) [cit. 2021-8-3]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0060890

ŠIBÍKOVÁ, M., J. ŽIVNÝ a J. JANOTA. Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia Biol.* 2018, **64**(4), 113-124. ISSN 0015-5500.

ŠIMAK, J., K. HOLADA, A. M. RISITANO, et al. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology* [online]. 2004, **125**(6), 804-813 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04974.x

TAKADA, Y., X. YE a S. SIMON. The integrins. *Genome Biology* [online]. 2007, **8**(5) [cit. 2021-8-3]. ISSN 14656906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2007-8-5-215

TAKAHASHI, N., R. UEHARA, M. KOBAYASHI, et al. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine* [online]. 2010, **49**(3), 331-337 [cit. 2021-8-3]. ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/j.cyto.2009.11.024

TAKEUCHI, O. a S. AKIRA. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* [online]. 2010, **140**(6), 805-820 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

TANG, A. H., G. J. BRUNN, M. CASCALHO et al. Pivotal Advance: Endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2007, **82**(2), 282-285 [cit. 2021-8-3]. ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.1206752

THILAGANATHAN, B., S. G. CARROLL, N. PLACHOURAS et al. Fetal immunological and haematological changes in intrauterine infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* [online]. 1994, **101**(5), 418-421 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1470-0328. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0528.1994.tb11915.x

TORRE-AMIONE, G., S. KAPADIA, J. LEE, et al. Tumor Necrosis Factor- α and Tumor Necrosis Factor Receptors in the Failing Human Heart. *Circulation* [online]. 1996, **93**(4), 704-711 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.93.4.704

TRONCOSO, F., J. ACURIO, K. HERLITZ, et al. Gestational diabetes mellitus is associated with increased pro-migratory activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 and reduced expression of vascular endothelial growth factor receptor 1. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(8) [cit. 2021-8-2]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0182509

UNAL, E. R., J. T. CIERNY, CH. ROEDNER, et al. Maternal inflammation in spontaneous term labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2011, **204**(3), 223.e1-223.e5 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ajog.2011.01.002

VADER, P., X. O. BREAKFIELD a M. J.A. WOOD. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2014, **20**(7), 385-393 [cit. 2021-8-3]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi: 10.1016/j.molmed.2014.03.002

VAN BEERS, E. J., M. C. L. SCHAAP, R. J. BERCKMANS, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* [online]. 2009, **94**(11), 1513-1519 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2009.008938

VAN DER POL, E., M. J. C. VAN GEMERT, A. STURK, et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2012, **10**(5), 919-930 [cit. 2021-8-3]. ISSN 15387933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04683.x

VERLOHREN, S., F. H. PERSCHEL, B. THILAGANATHAN, et al. Angiogenic Markers and Cardiovascular Indices in the Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension* [online]. 2017, **69**(6), 1192-1197 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0194-911X. Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09256

VION, A-C., B. RAMKHELAWON, X. LOYER, et al. Shear Stress Regulates Endothelial Microparticle Release. *Circulation Research* [online]. 2013, **112**(10), 1323-1333 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300818

VÍTKOVÁ, V., J. ŽIVNÝ a J. JANOTA. Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2018, **12**(2), 161-175 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1752-0363. Dostupné z: doi:10.2217/bmm-2017-0182

VÍTKOVÁ, V., M. PÁNEK, P. JANEK, et al. Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns. *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, 1-8 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1975056

VOLANAKIS, J. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology* [online]. **38**(2-3), 189-197 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/S0161-5890(01)00042-6

WAHREN-HERLENIUS, M. a T. DÖRNER. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *The Lancet* [online]. 2013, **382**(9894), 819-831 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(13)60954-X

WATSON, J., A. ROUND a W. HAMILTON. Raised inflammatory markers. *BMJ* [online]. 2012, **344**(3), 454-454 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.e454

WELLNER M., F. HERSE, J. JANKE, et al. Endothelial Cell Specific Molecule-1-A Newly Identified Protein in Adipocytes. *Hormone and Metabolic Research* [online]. 2003, **35**(4), 217-221 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0018-5043. Dostupné z: doi:10.1055/s-2003-39477

WENDEL, G. D Jr, P.J. SANCHEZ, M. T. PETERS et al. Identification of *Treponema pallidum* in amniotic fluid and fetal blood from pregnancies complicated by congenital syphilis. *Obstet Gynecol.* 1991, **78** (5), 890-895. ISSN 00297844.

WOJCIAK-STOTHARD, B. a S. G. HAWORTH. Perinatal changes in pulmonary vascular endothelial function. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2006, **109**(1-2), 78-91 [cit. 2021-8-3]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.016

WU, Z-H., C-L Ji, H. Li, et al. (2013) Membrane microparticles and diseases. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013, **17**(18): 2420-2427. ISSN 1128-3602.

XIE, Y. a W. A. MULLER. Fluorescencein SituHybridization Mapping of the Mouse Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM1) to Mouse Chromosome 6, Region F3–G1. *Genomics*[online]. 1996, **37**(2), 226-228 [cit. 2021-8-3]. ISSN 08887543. Dostupné z: doi:10.1006/geno.1996.0546

XIONG, Z., T. B. ORISS, J. P. CAVARETTA, et al. Red cell microparticle enumeration: validation of a flow cytometric approach. *Vox Sanguinis* [online]. 2012, **103**(1), 42-48 [cit. 2021-8-3]. ISSN 00429007. Dostupné z: doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01577.x

YONG, P. JA., C. H. KOH a W. S. SHIM. Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *European Journal of Preventive Cardiology* [online]. 2013, **20**(3), 496-512 [cit. 2021-8-3]. ISSN 2047-4873. Dostupné z: doi:10.1177/2047487312445001

YUANA, Y., R. BERTINA a S. OSANTO. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2017, **105**(03), 396-408 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0340-6245. Dostupné z: doi:10.1160/TH10-09-0595

ZAMBELLO, R., G. BARILÀ, S. MANNI, et al. NK cells and CD38: Implication for (Immuno)Therapy in Plasma Cell Dyscrasias. *Cells* [online]. 2020, **9**(3) [cit. 2021-8-3]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9030768

11. PUBLIKACE AUTORA SOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ

2020:

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Veronika VÍTKOVÁ, Linda JAMRICHOVÁ, Martin HALUZÍK, Jan ŽIVNÝ a Jan JANOTA. Spontaneous delivery is associated with increased endothelial activity in cord blood compared to elective cesarean section. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*[online]. 2020, **251**, 229-234 [cit. 2021-8-4]. ISSN 03012115. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejogrb.2020.05.059

2018:

VÍTKOVÁ, Veronika, Martin PÁNEK, Petr JANEČ, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Václav VOBRUBA, Martin HALUZÍK, Jan ŽIVNÝ a Jan JANOTA. Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns. *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, **19,2018**, 1-8. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1975056

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Jan ŽIVNÝ, Jan JANOTA: Review Article: Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia Biologica*. 2018, **64(4)**:113-124. ISSN 0015-5500.

12. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ A PŘEDNÁŠKOVÉ ČINNOSTI AUTORA

1. Články v časopisech s IF

2021:

DAVID, Jan, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Shenali Anne AMARATUNGA a Jan LEBL. COVID19 Pandemic in the Czech Republic: Substantial Decline of the Demand for Pediatric Healthcare Services. *Klinische Pädiatrie* [online]. 2021, **233**(01), 40-42. ISSN 0300-8630. Dostupné z: doi:10.1055/a-1268-9211. IF 0,882.

2020:

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Veronika VÍTKOVÁ, Linda JAMRICHOVÁ, Martin HALUZÍK, Jan ŽIVNÝ a Jan JANOTA. Spontaneous delivery is associated with increased endothelial activity in cord blood compared to elective cesarean section. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* [online]. 2020, **251**, 229-234. ISSN 03012115. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejogrb.2020.05.059

2018:

VÍTKOVÁ, Veronika, Martin PÁNEK, Petr JANEČ, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Václav VOBRUBA, Martin HALUZÍK, Jan ŽIVNÝ a Jan JANOTA. Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns. *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, **2018**, 1-8. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1975056

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Jan ŽIVNÝ, Jan JANOTA: Review Article: Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia Biologica*. 2018, **64**(4):113-124. ISSN 0015-5500.

2. Články v ostatních recenzovaných časopisech

2021:

FENCL, Filip, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Jan DAVID a Hana MALCOVÁ. Syndrom multisystémové zánětlivé odpovědi asociovaný s COVID-19 u dětí. Doporučený postup ČPS ČLS JEP. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2021, **76**(1), 4-9. ISSN 0069-2328.

DAVID, Jan, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Jakub JONÁŠ, Veronika STARÁ, Hana MALCOVÁ a Filip FENCL. Závažná komplikace COVID-19 u dětí: syndrom multisystémové zánětlivé odpovědi. *Pediatric pro praxi*. 2021, **22**(1), 8-11. ISSN 1213-0494.

2020:

DAVID, Jan, **Michaela ŠIBÍKOVÁ** a Filip FENCL. Rabdomyolýza u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2020, **21**(1), 17-21. ISSN 1213-0494.

DAVID, Jan, **Michaela ŠIBÍKOVÁ**, Shenali Anne AMARATUNGA a Jan LEBL. Vliv první vlny pandemie COVID19 na pediatrickou péči v České republice. *Paediatric News*. 2020, **1**(1), 10-12. ISSN 2695-0847.

2019:

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Jan DAVID, Jana LHOTSKÁ a Milan BAYER. Závažný průběh celiakie. *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2019, **74**(5), 275-279. ISSN 0069-2328

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, Jan DAVID, Jana LHOTSKÁ a Helena JAHNOVÁ. Problematika časně diagnostiky neuroinfekcí. *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2019, **74**(6), 366-370. ISSN 0069-2328

3. Monografie:

2020:

Fencel Filip, Tejnická Jana, Lebl Jan et al.: *Selhání střeva u dětí-etiopatogeneze a terapie*, 2020, Galén, Praha. ISBN 9788074924910.

Bláhová Květa, Fencel Filip et al.: *Kazuistiky z pediatrie - 2. přepracované a doplněné vydání*, 2020, Maxdorf, Praha. ISBN 978-80-7345-667-2.

4. Postery:

2019:

17th International Congress of Immunology: 19. - 23. 10. 2019, Beijing China:
Michaela ŠIBÍKOVÁ, Veronika VÍTKOVÁ, Martin PÁNEK, Petr JANEČ, Linda JAMRICHOVÁ, Jan ŽIVNÝ, Jan JANOTA: Spontaneous delivery is associated with increased levels of cord blood endothelial cell-derived microvesicles compared to elective caesarean section

Studentská vědecká konference, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 21. 5.
Michaela ŠIBÍKOVÁ, Veronika VÍTKOVÁ, Martin PÁNEK, Petr JANEČ, Linda JAMRICHOVÁ, Jan ŽIVNÝ, Jan JANOTA: Koncentrace endoteliálních mikrovězikul v pupečnickové krvi je zvýšena u spontánního porodu ve srovnání s porodem císařským řezem

2018:

World Congress on Fetal and Maternal Medicine, Osaka, Japan, 5.-6.10.2018:
Michaela ŠIBÍKOVÁ, Veronika VÍTKOVÁ, Martin PÁNEK, Petr JANEČ, Jan ŽIVNÝ, Jan JANOTA: Markers of Endothelial Activation and Injury: Influence of the Mode of Delivery.

13. PŘÍLOHY

13.1. Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response

Review Article

Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response

(microvesicles / inflammation / systemic inflammatory response syndrome / biomarkers / sepsis)

M. ŠIBÍKOVÁ¹, J. ŽIVNÝ², J. JANOTA^{2,3}

¹Third Faculty of Medicine, ²Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³Department of Neonatology, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract. Human body reacts to physical, chemical and biological insults with a complex inflammatory reaction. Crucial components and executors of this response are endothelial cells, platelets, white blood cells, plasmatic coagulation system, and complement. Endothelial injury and inflammation are associated with elevated blood levels of cell membrane-derived microvesicles. Increased concentrations of microvesicles were found in several inflammatory reactions and diseases including acute coronary syndromes, stroke, vasculitis, venous thromboembolism, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid antibody syndrome, inflammatory bowel disease, thrombotic thrombocytopenic purpura, viral myocarditis, sepsis, disseminated intravascular coagulation, polytrauma, and burns. Microvesicles can modulate a variety of cellular processes, thereby having an impact on pathogenesis of diseases associated with inflammation. Microvesicles are important mediators and potential

biomarkers of systemic inflammation. Measurement of inflammatory cell-derived microvesicles may be utilized in diagnostic algorithms and used for detection and determination of severity in diseases associated with inflammatory responses, as well as for prediction of their outcome. This review focuses on the mechanisms of release of microvesicles in diseases associated with systemic inflammation and their potential role in the regulation of cellular and humoral interactions.

Introduction

Inflammation is a system of defensive tissue reactions to pathogenic insults. Human body reacts to physical, chemical and biological insults with a complex of defensive reactions. Crucial components and executors of these reactions are endothelial cells, platelets, white blood cells, plasmatic coagulation system, and complement (Bone et al., 1992; de Jong et al., 2010; Singer et al., 2016; Sauaia et al., 2017). The inflammatory process at any level creates transient tissue or organ dysfunctions. An insult of extreme intensity, such as polytrauma, burns, poisoning, and sepsis, creates a systemic response. These reactions have a significant impact on morbidity and mortality through the initiation of multiple organ dysfunction and multiple organ failure (Bone et al., 1992; Balk, 2014). Biomarkers serve as indicators of biological processes, including pathologic processes or responses to therapeutic interventions. The goals of current research in this field are to find and evaluate biomarkers and important mediators and bystander molecules of systemic inflammation that would allow early detection, quantify severity of inflammatory processes, and predict the outcome (Bone et al., 1992; Cavaillon and Adrie, 2009; Singer et al., 2016). Potential biomarkers of inflammation include soluble mediators of protein, polysaccharide or lipid basic structure, cells participating in inflammatory reactions, and cell membrane-derived microvesicles (MVs) (Cavaillon and Adrie, 2009; Angus and Van der Poll, 2013; Burger et al., 2013; Larsen and Petersen, 2017). MVs may represent poten-

Received September 14, 2018. Accepted September 24, 2018.

This work is supported by a grant from the Czech Health Research Council Agency (AZV CR), Ministry of Health of the Czech Republic, grant number 16-27800A.

Corresponding author: Jan Janota, Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Videňská 800, 140 59 Prague 4, Czech Republic. E-mail: janjanota@yahoo.com

Abbreviations: ARDS – acute respiratory distress syndrome, COX-2 – cyclooxygenase 2, DAMP – damage-associated molecular patterns, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, EVs – extracellular vesicles, IL-1 – interleukin-1, MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1, MODS – multiple organ dysfunction syndrome, MV(s) – microvesicle(s), NF-κB – nuclear factor κB, NOS-2 – nitric oxide synthase 2, NTA – nanoparticle tracking analysis, PAMP(s) – pathogen-associated molecular pattern(s), PRR(s) – pattern recognition receptor(s), PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand 1, ROS – reactive oxygen species, SIRS – systemic inflammatory response syndrome, TNF-α – tumour necrosis factor α.

Folia Biologica (Praha) 64, 113-124 (2018)

tial biomarkers of various cell functions and responses that can be detected and measured in the blood and other biological fluids. MVs may also play a significant role in cell-to-cell communication. MVs with distinct functions in inflammatory processes can be detected and measured, including identification of their origin based on the pattern of antigens of the cell from which they originate (Xu et al., 2016).

Detection and isolation of different types of MVs is essential to studying their function and interaction within the organism, tissues and cells, and to introducing them into the description of pathophysiologic processes in the human body including inflammation (Chironi et al., 2009; Burger et al., 2013; Vitkova et al., 2018b). Various techniques of MV isolation from body fluids are described in the literature including sequential centrifugation, density gradient centrifugation, filtration, and chromatography methods. Flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), electron microscopy, dynamic light scattering (DLS), and nanoparticle tracking analysis (NTA) are widely used methods for MV analysis and measurement. Selection of the method for evaluating MVs depends on the ultimate goal of the analysis (Aupeix et al., 1997; Gelderman and Simak, 2008; Dragovic et al. 2011; Yuana et al., 2011).

MVs are functionally active in the intercellular communication between extracellular vesicle-producing cells and the other cells, and they can be a potential biomarker for diagnosis, for the response to medical treatment by a therapeutic agent and for prognosis (Amabile et al., 2012; Fujita et al., 2014).

Inflammation, systemic inflammation and systemic inflammatory response syndrome (SIRS)

Inflammation is a system of defensive tissue reactions to the pathogenic insults. Its goal is to eliminate damaged tissues, foreign materials, and microorganisms and, subsequently, to enhance regeneration and repair of the tissues. Insults that cause an inflammatory response can be of diverse character: biological (microorganism, parasites), physical (trauma, radiation), chemical (toxins), metabolic (hypoxia, malnutrition, metabolic disorders), immunological (autoimmune diseases), and other endogenous disorders and exogenous triggers. The molecular stimuli triggering the inflammatory reaction fall into two general categories, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). PAMPs represent structures conserved among microbial species such as bacterial lipopolysaccharides. DAMPs represent endogenous molecules released from damaged cells or cells in stress such as heat-shock proteins. PAMPs and DAMPs are recognized by specific transmembrane (e.g., Toll-like receptors, C-type lectin receptors) or cytoplasmic (e.g., RIG I-like receptors, NOD-like receptors) pattern recognition receptors (PRRs).

These PRRs are expressed in various cells. Sensing of PAMPs or DAMPs by PRRs results in activation of signalling pathways including nuclear factor- κ B (NF- κ B) and MAP kinases, leading to up-regulation of the transcription of genes involved in inflammatory responses (Takeuchi and Akira, 2010; Salvador et al., 2016). Interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor α (TNF- α) are among the cytokines released first. These inflammatory cytokines further amplify the pro-inflammatory cellular signalling through activation of the cleavage process of NF- κ B inhibitor (I κ B). NF- κ B translocates to the nucleus, where it enhances expression of several other pro-inflammatory cytokines. The inflammatory response is mediated by co-operation of five complex cellular and humoral systems and their regulators: endothelial cells, platelets, white blood cells, plasmatic coagulation system, and complement. The response to an intensive insult triggers the inflammatory cascade, with production and release of various humoral regulators including cytokines.

Cytokines are released by monocytes, tissue macrophages, mast cells, platelets, and endothelial cells (Cavaillon and Adrie, 2009). Pro-inflammatory cytokines either function directly on the tissue or via secondary mediators to activate the coagulation cascade and the complement cascade, with release of nitric oxide, platelet-activating factor, prostaglandins, and leukotrienes (Sitia et al., 2010; Flammer et al., 2012). The results of this complex process may cause organ dysfunctions through specific and nonspecific damage to the tissues (Goris, 1996; Cavaillon and Adrie, 2009). Inflammation is a reaction of a vascularized tissue to the insult (Fig. 1). The local reaction is limited to the injured tissue and causes transient tissue dysfunction with possible permanent functional and/or structural impairment. Systemic inflammation, caused by systemic progression of the local insult or systemic insult, is accompanied by multiple organ dysfunctions, which can lead to the progressive multiple organ dysfunction syndrome (MODS) or multiple organ failure as a result of intensive inflammation, and to death (Bone et al., 1992; Goris, 1996; Cavaillon and Adrie, 2009).

The defensive inflammatory process of the human body represents a complex of pro-inflammatory and anti-inflammatory reactions. Regardless of the insult, the reaction of the body seems to be uniform, starting with a pro-inflammatory reaction; therefore, the name systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is mostly used (Bone et al., 1992; Matsuda and Hattori, 2006; Robertson and Coopersmith, 2006; Tang et al., 2007; Lee et al., 2009; Lucignano et al., 2011; Balk, 2014; Davis et al., 2017; Sauaia et al., 2017). The aetiology of SIRS includes infectious diseases, surgical procedures, trauma, intoxications, and therapy complications. The clinical examples of the main infectious causes of SIRS are: bacterial sepsis, systemic candidiasis, systemic viral infections (influenza), toxic shock syndrome, and burn wound infections. The clinical examples of the main non-infectious causes of SIRS are:

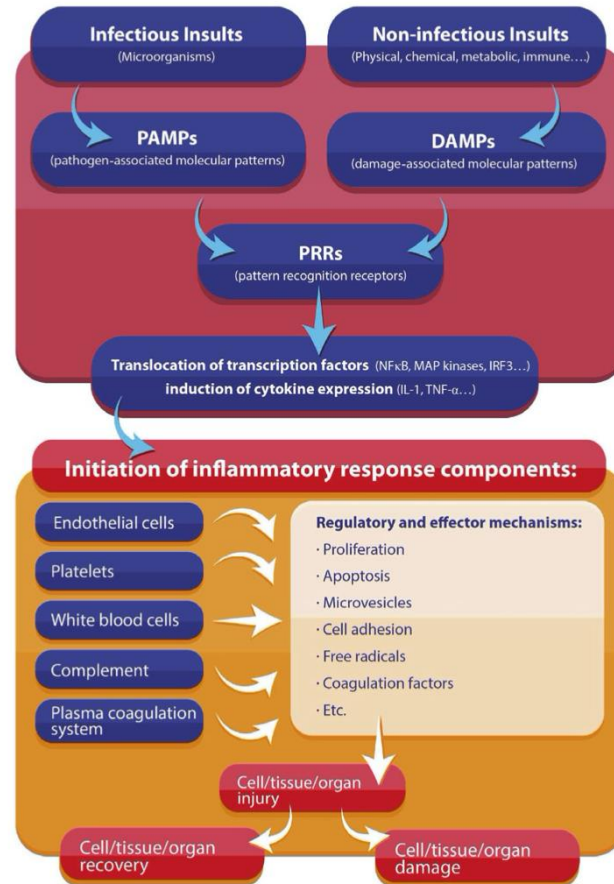


Fig. 1. Inflammatory response to infectious and non-infectious insults: mechanisms leading to cell and tissue dysfunction. The initial steps include activation of endothelial cells and innate immunity cells through pattern recognition receptors (PRRs). Several other factors may contribute during the initial steps of inflammatory response including direct activation of complement by bacterial components and adaptive immune responses (not shown in the figure)

autoimmune disorders, burns, poisoning, electrical tissue damage, haemorrhagic shock, malignancies, myocardial infarction, severe cardiac arrhythmias, pancreatitis, vasculitis, surgical procedures, and transfusion reactions (Pittet et al., 1995; Rangel-Fausto et al., 1995; Cavaillon and Adrie, 2009; Balk 2014; Singer et al., 2016). All cells participating in the inflammatory response produce MVs, and their distinction and quantification may help in finding new definitions and ways of detection and determination of the severity and progression of the infectious and non-infectious inflammatory process including SIRS (Burger et al., 2013).

Cell-derived membrane MVs

Eukaryotic cells release several types of membrane-derived extracellular vesicles (EVs). Cells release vesicles into extracellular space under both normal and stress conditions (Yamamoto et al., 2016). Detectable levels of EVs from different cell origins are commonly found in the plasma and other body fluids (Burnouf et al., 2015). They are produced by all somatic cells in the human body. Membranous vesicles are important mediators of physiological cellular processes, such as angiogenesis, stem/progenitor cell engraftment, and regu-

Table 1. Characterization of extracellular vesicles

Classification	Exosomes	Microvesicles	Apoptotic bodies
Size	30-100 nm	100-1000 nm	50-5000 nm
Mechanism of formation	Formation of multivesicular bodies by inward budding of endosomal membrane followed by fusion with cell plasma membrane	Outward protrusion (blebbing) of plasma membrane followed by detachment	Fragmentation of cells during the apoptotic process
Characteristics and composition	Rich in lipid rafts, cell endosome-specific proteins (e.g., LAMP1, CD63, TSG 101), cytoplasmic proteins, RNA, miRNA	Externalized phosphatidylserine (annexin V binding), rich in lipid rafts, cell surface-specific molecules, cytoplasmic proteins, RNA, miRNA, other ncRNA, occasionally DNA	Externalized phosphatidylserine (annexin V binding), organelles, DNA, cytoplasmic proteins, RNA, miRNA and other ncRNA
Functional properties	Selective cargo transfer (functional proteins, mRNA, miRNA), receptor interaction	Inflammation, coagulation, thrombosis, angiogenesis, tissue regeneration, tumour cell invasion, metastasis, mRNA, miRNA	Transfer of DNA fragments to the phagocytes, inhibition of inflammatory processes, cell survival

lation of immune responses. Individual types of EVs are released from cells by different mechanisms (Gould and Raposo, 2013). EVs are commonly classified into three major groups (Kalra et al., 2012) based on their theoretical biogenesis pathways and sizes (Table 1). MVs represent a heterogeneous subgroup of cell-membrane vesicular bodies, with sizes ranging from 100–1000 nm.

Formation and clearance of MVs during inflammation

Plasma concentrations of MVs are determined by a dynamic balance between the rate of their formation and elimination. Acute and chronic inflammatory processes are characterized by increased concentration of MVs in the blood. Various bacterial toxins, inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and coagulation factors initiate formation of MVs from cells participating in the inflammatory reaction (Yong et al., 2013; Cognasse et al., 2015). The cell sources of inflammation-associated MVs and stimuli leading to their release are summarized in Table 2. Less information is available about the

mechanisms of elimination of MVs. Phagocytosis appears to be the primary mechanism of MV elimination *in vivo*. The externalized phosphatidylserine may signal scavenger receptors to promote endocytosis of MVs (Jansen et al., 2012). Opsonized MVs might be endocytosed through the C3b or lactadherin receptors (Faillie et al., 2012). Macrophages may discriminate and prioritize the clearance of MVs and other extracellular vesicles on the basis of glycosylation patterns (Burger et al., 2013). Certain types of MVs, such as thrombocyte MVs, might be phagocytosed by endothelial cells (Dasgupta et al., 2012; Faillie et al., 2012). The rate of MV clearance from the circulation depends on the type of MVs analysed and temporal variations in experimental setups ranging from several minutes up to a few hours (Augustine et al., 2014).

Classification, function, and clinical relevance of MVs

Surface antigens of MVs reflect their cell origin and allow immunodetection of cell-specific MVs (Inzhutova

Table 2. The cell sources of inflammation-associated MVs and stimuli leading to their release

Source of MVs	Stimuli
Platelets	Lipopolysaccharide (LPS), bacterial toxins, CD40 ligand, cytokines (e.g., TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , erythropoietin), thrombin, collagen, proteinase-activated receptor (PAR) agonists, prostaglandins, calcium ionophore, reactive oxygen species and other free radicals, catecholamines
Endothelial cells	Lipopolysaccharide (LPS), bacterial toxin, cytokines (e.g., IL-1, TNF- α , thrombin, plasmin-activator inhibitor (PAI)-1, reactive oxygen species and other free radicals, uremic toxins, angiotensin-2, C-reactive protein, homocysteinaemia, hyperglycaemia, thrombin, hypoxia, hyperglycaemia
Lymphocytes	Cytokines (TNF- α , FasL, IL-2), lipopolysaccharide (LPS)
Monocytes/Macrophages	Lipopolysaccharide (LPS), TNF- α , FasL, Toll-like receptor (TLR) 3 and TLR4 ligands
Neutrophils	Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, chemotactic peptide N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, bacterial toxins
Red blood cells	Reactive oxygen species and other free radicals

Table 3. Surface antigen expression of MVs and MV function

Cellular source	Surface antigens	Effect
Red blood cells	CD235a	Promotion of monocyte-endothelial cell interaction
Platelets	CD31, CD41, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P	Induction of platelet aggregation
		Cell-cell interaction of monocytes to endothelial cells via ICAM-1
		Delivery of arachidonic acid to endothelial cells
		Chemotactic attraction of monocytes
		Enhancement of neutrophil aggregation
		Increase of phagocytic activity
		Increase of leukocyte-leukocyte binding
		Thrombin formation
		Induction of endothelial proliferation and angiogenesis
Endothelial cells	CD31, CD34, CD54, CD62E, CD51, CD105, CD106, CD144, CD146	Neutrophil activation
		Chemotactic attraction of leukocytes
		Platelet aggregation via expression of von Willebrand factor
		Thrombin formation
		Generation of ROS and reduction of nitric oxide production
		Endothelial proliferation, angiogenesis and cell invasion
Polymorphonuclear leukocytes	CD45	Carrier of protein C
		Activation of endothelial cells <i>in vitro</i>
		Production of inflammatory cytokines (e.g., IL-6, IL-8)
		Chemotactic attraction of leukocytes
		Up-regulation of cell adhesion molecules
Lymphocytes	CD4, CD8, CD20	Activation of primary haemostasis and coagulation
		Reduction of NOS3 (eNOS) expression and reactivity of vascular smooth muscle cells
		Up-regulation of NOS2 (iNOS) and COX2
Monocytes	CD14	Increase of oxidative stress in endothelial cells
		Platelet activation
		Chemokine receptor transfer
		Up-regulation of inflammatory cytokines (e.g., IL-8, MCP-1) and adhesion molecules (e.g., ICAM-1)
		Superoxide anion production in monocytes
		Enhancement of PPAR- γ protein expression in monocytes and macrophages

et al., 2012; Reid and Webster, 2012; Burger et al., 2013; Wu et al., 2013; Trzepizur et al., 2014; Deng et al, 2017) (Table 3).

MVs in local and systemic inflammation

MVs play a crucial role in inflammation. The release of platelet, endothelial and leukocyte MVs is in general increased during inflammation. MVs from certain cells may induce and modulate the inflammatory response. MVs up-regulate synthesis of numerous inflammatory cytokines, enzymes and other soluble mediators of inflammation. MVs can also promote expression of cell adhesion molecules in endothelial cells. Aminophospholipids of MVs may represent substrates for production of lysophosphatidic acid, arachidonic acid and other

lipid mediators of inflammation (Wu et al., 2013). On the other hand, inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1, potentiate MV generation by target cells (Cloutier et al., 2013).

Platelet MVs

Activation of platelets represents an inherent part of the inflammatory reaction. Platelet MVs accumulate at the sites of vascular injury on leukocytes and on activated endothelium. These MVs can contribute to leukocyte-leukocyte interactions through the binding of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) (Nomura et al., 2000). Platelet MVs may increase recruitment of immune cells such as monocytes, T and B lymphocytes, and natural killer cells and modulate the inflammatory processes. A high concentration of costim-

ulatory ligand CD40L/CD154 on platelet MVs may contribute to antigen-specific adverse reactions to platelet transfusion and transfusion-related acute lung injury (Blumberg et al., 2006; Khan et al., 2006). Platelet MVs support transcellular transport of arachidonic acid to increase expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in a human monocyte cell line, which converts arachidonic acid to prostaglandin endoperoxide H₂, an important precursor of prostacyclin (Barry et al., 1999).

Prostacyclin is an important effector molecule that induces vasodilatation and inhibits proliferation, angiogenesis, platelet adhesion, and aggregation and has an anti-inflammatory effect through a stimulatory effect on the expression of anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-10) and inhibitory effect on the expression of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1 and IL-6) (Nomura and Shimizu, 2015). The complexity of the effect of platelet MVs on target cells underlines that they can stimulate production of pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and other pro-inflammatory molecules through a direct ligand-receptor interaction (Wu et al., 2013; Cognasse et al., 2015). These cytokines activate inflammatory cells to generate more MVs, forming a positive feedback loop.

Endothelial MVs

Endothelial cells activated by endotoxin or inflammatory cytokines produce tissue factor-rich MVs with pro-coagulation properties. The ability of endothelial MVs to bind coagulation factors and promote thrombin generation has been described *in vitro* and also in several inflammatory conditions such as acute coronary syndrome and hypoxia-reoxygenation injury (Deng et al., 2017). Tissue factor-rich endothelial MVs bound to monocytes and platelets amplify the inflammatory process and disseminate the pro-coagulant potential. MVs released by activated endothelial cells can bind to unperturbed endothelial cells and induce increased expression of cell adhesion molecules and facilitate monocyte-endothelial cell interactions. Endothelial MVs have also been shown to bind to monocytes and promote their trans-endothelial migration (Cognasse et al., 2015). Tissue factor-rich endothelial MVs released by microvascular endothelial cells can overcome the consequences of arterial occlusion and tissue ischaemia by promoting post-ischemic neovascularization and tissue reperfusion (Arderiu et al., 2015).

White blood cell MVs

In vitro experiments have shown that MVs derived from activated polymorphonuclear leukocytes promote release of inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP-1), TNF- α , and other molecules involved in the regulation of inflammation (Wu et al., 2013; Cognasse et al., 2015). Monocyte MVs have been reported to increase expression of cell adhesion molecules on the target cells through activation of NF- κ B translocation to the nucleus. MVs released by leukocytes can stimulate expres-

sion of proangiogenic chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, and CXCL8 by synovial fibroblasts. T-cell-derived MVs have been reported to promote production of TNF- α and IL-1 β by monocytes (Distler et al., 2005).

Red blood cell MVs

Increased levels of erythrocyte MVs are associated with haemolytic diseases, such as thalassemia, paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, and sickle cell anaemia. They are suggested to be involved in activation of coagulation, fibrinolysis, and endothelial activation (Simak et al., 2004; van Beers et al., 2009).

MVs and diseases with acute inflammatory processes

Increased plasma MV levels were reported in several acute inflammatory diseases (Table 4). MVs stimulate production and release of inflammatory cytokines, and these induce formation of MVs by a positive feedback loop. The MV plasma concentration may distinguish acute and chronic inflammatory processes in the organism and can be useful for determination of the severity of disease. Increases in MVs of various origins were reported in acute coronary syndromes. Elevations in plasma levels of platelet and endothelial MVs predict cardiovascular morbidity and mortality (Sinning et al., 2011; Amabile et al., 2012). Increases in neutrophil-derived MVs have been reported in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis (Hong et al., 2012). Increases in endothelial, erythrocyte, platelet and leukocyte MVs were reported in the graft-versus-host disease (Lia et al., 2018). MVs are increased in hypercoagulation states. Elevations in MVs of various origins have been proposed as a predictor of deep vein thrombosis (Park et al., 2012; Thaler et al., 2012). The concentration of MVs in circulating blood depends on the rate of their formation and clearance. However, there is still insufficient scientific evidence of the rate of MV formation and clearance both in the health and in disease states.

MVs in sepsis and systemic inflammation

Sepsis is a clinical syndrome characterized by a systemic inflammatory response to infection. The systemic inflammatory response is characterized by activation of the coagulation system, inhibition of anticoagulant mechanisms, and fibrinolysis, which can lead to disseminated intravascular coagulation with microvascular thrombosis. Up-regulation of the inflammatory responses and neuroendocrine system activity leads to vascular hyporeactivity and enhanced apoptosis of the involved tissue cells, which may contribute to multiple organ dysfunction and septic shock (Annane et al., 2005). Endothelial dysfunction with increased endothelial permeability, increased levels of nitric oxide, reduced vascular reactivity to nitric oxide, and reactive oxygen species

Table 4. Blood MVs in acute inflammation and acute exacerbation of chronic inflammatory diseases

Disease	Type of MVs	Result	Author
Acute coronary syndromes	Endothelial MVs are significantly elevated	Predictor of cardiovascular events in stable coronary artery disease patients Associated with the presence of cardiometabolic risk factors Are able to discriminate patients with acute coronary syndrome and stable angina	Sinning et al., 2011 Amabile et al., 2012 Bernal-Mizrachi et al., 2003
Stroke	Endothelial MVs are significantly elevated	Associated with the severity, lesion volume and outcome of acute ischemic stroke	Simak et al., 2006
Vasculitis	Elevated neutrophil-derived tissue factor-positive MVs	Potential explanation for the hypercoagulability and vascular injury associated with vasculitis	Kambas et al., 2014
Venous thromboembolism	Endothelial MVs are significantly elevated	May contribute to pathophysiology of venous thromboembolism	Thaler et al., 2012
Multiple sclerosis	Elevated platelet and endothelial MVs	Markers of early stages of multiple sclerosis Increase of MV release during the inflammatory period	Marcos-Ramiro et al., 2014 Sáenz-Cuesta et al., 2014
Rheumatoid arthritis	Elevated platelet MVs	Platelet MVs correlated with disease activity	Knijff-Dutmer et al., 2002
Systemic lupus erythematosus (SLE)	Elevated total MVs	SLE patients' MVs have a unique protein signature and are tagged for removal	Nielsen et al., 2012 Ostergaard et al., 2013
Anti-phospholipid antibody syndrome	Endothelial and platelet MVs are significantly increased	Increased in anti-phospholipid antibody syndrome patients with thrombotic and obstetric complications Correlation of MV levels with anti- β_2 -glycoprotein I antibodies	Breen et al., 2015 Chaturvedi et al., 2015
Inflammatory bowel disease (IBD)	Increased total and leukocyte MVs in active Crohn's disease patients Increased pro-coagulant activity of MVs in paediatric patients	MVs from Crohn's disease patients significantly alter endothelial and vascular function and may contribute to vascular-dependent intestinal damage MVs may initiate extra intestinal thrombosis during IBD	Leonetti et al., 2013 Deutschmann et al., 2013
Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)	Elevation of endothelial MVs	Marked elevation of endothelial MVs during acute phase of TTP Normalized during remission	Jimenez et al., 2001
Viral myocarditis	Increased endothelial MVs	Endothelial MV pattern changed in humans with parvovirus B19V+ myocarditis compared with B19V- myocarditis and controls	Bachelier et al., 2017

(ROS)-induced oxidative stress are important pathogenic mechanisms in the sepsis (Kirkeboen and Strand, 1999). Established experimental models of sepsis showed direct induction of MV release that may cause the endothelial activation (Brown and McIntyre, 2011). Experimental data suggest that MVs have a pro-inflammatory effect in the sepsis. Raised levels of platelet, granulocyte, and endothelial MVs were reported in patients with meningococcal sepsis (Reid and Webster, 2012). MVs have pro-coagulant activity with thrombin generation via a tissue factor-dependent mechanism. Enhanced coagulation mediated by MVs was described in disseminated intravascular coagulation (Aras et al., 2004).

Production of leukocyte MVs is increased in association with increased oxidative activity. Circulating levels of monocyte MVs were reduced in sepsis and may reflect monocyte dysfunction in severe sepsis. Leukocytes activated during the sepsis produce MVs with increased exposure of adhesion molecules on the surface. Interaction between activated leukocyte MVs and endothelial MVs through adhesion molecules is enhanced in patients with SIRS (Nieuwland et al., 2000). Septic patients' MVs induce ROS production and apoptosis of endothelial cells and smooth muscle cells *in vitro* through a NADP oxidase-dependent pathway (Reid and Webster, 2012). Rats inoculated with MVs isolated from septic rats exhibited an increase in superoxide anion

production, NF- κ B activation, enhanced expression of nitric oxide synthase 2 (NOS-2), and overproduction of nitric oxide in the vascular wall (Mortaza et al., 2009). MVs from septic shock patients enhanced sensitivity of contraction of the mouse aorta to serotonin, suggesting a protective effect against vascular hyporeactivity during sepsis (Mostefai et al., 2008). Such protective effects may be important during the early phase of septic shock by compensating for vascular hyporeactivity associated with hypotension (Laher, 2011).

Systemic inflammation and sepsis are often accompanied by the acute respiratory distress syndrome (ARDS). ARDS is associated with the presence of MVs in the alveolar space. Higher levels of leukocyte MVs in the blood and bronchoalveolar lavage of ARDS patients were associated with a better outcome in early-stage disease. This suggests that MVs may play a protective role in the pathogenesis of ARDS and may serve as a biomarker of prognostic significance (Guervilly et al., 2011). Raised levels of circulating platelet, granulocyte, and endothelial MVs were identified in patients with meningococcal sepsis and septic shock, severe trauma, and traumatic brain injury (Nieuwland et al., 2000; Fujimi et al., 2002). High levels of endothelial MVs were associated with vascular dysfunction and may contribute to tissue hypoperfusion and organ dysfunction (Forest et al., 2010). Septic shock patients' MVs exert pleiotropic and variable effects on target tissues. MVs obtained from patients with early-stage septic shock injected into mouse circulation induced expression of pro-inflammatory proteins NOS-2, COX-2, and NF- κ B in the heart and lungs, along with increased oxidative and nitration stress. Increased oxidative stress was also detected in the liver and to a lesser extent in the kidneys (Mastroradi et al., 2011). This suggests that blood-derived septic shock MVs may contribute to pathogenesis of organ dysfunction in the septic shock. Elevated levels of platelet, endothelium, and leukocyte MVs predict fa-

vourable outcome in severe sepsis (Reid and Webster, 2012). Endothelial MVs carry functional endothelial protein C receptor (CD201) and contribute to enhanced thrombogenicity via consumption of activated protein C (Morel et al., 2009).

Limited information is available on the role of MVs in non-septic SIRS. Elevated levels of leukocyte MVs were found in patients with burn injury (O'Dea et al., 2016). Hypoxic ischemic insult leading to systemic inflammatory response with multiple organ dysfunction was associated with increased levels of MVs in newborns (Vitkova et al., 2018a). Recent publications that focus on the role of MVs in septic and non-septic systemic inflammatory response are shown in Table 5. MVs produced during the systemic inflammatory response may participate in vascular and endothelial dysfunction, leading to circulatory failure, tissue injury and organ dysfunction (Reid and Webster, 2012). On the other hand, several clinical and experimental studies suggest a protective role of MVs during the sepsis. The mechanisms of contribution of MVs derived from individual cell types in systemic inflammation and their role in pathogenesis are thus still unclear. However, the levels of MVs in the blood may serve as important indicators of systemic inflammation.

Conclusion

Inflammation is associated with elevated blood levels of MVs. MVs released by activated endothelial cells, red blood cells, platelets, and white blood cells modulate a variety of cellular processes, thereby having an impact on the pathogenesis of diseases associated with inflammation. To better understand how MVs achieve their biological effects, studies focusing on determination of their origin and their clearance in the health and disease are essential. Future research relating to MVs should focus on the optimization and implementation of

Table 5. Blood MV analysis in systemic inflammatory response

Inflammatory disease	Type of MVs	Result	Author
Sepsis	Elevated levels of leukocyte, granulocyte, platelet and endothelial MVs Decreased levels of monocyte MVs	Pro-inflammatory and pro-coagulant activity	Nieuwland et al., 2000 Fujimi et al., 2002 Reid and Webster, 2012
Disseminated intravascular coagulation (DIC)	Elevation of endothelial MVs	Level of endothelial MVs is increased in DIC induced by septic shock	Delebranche et al., 2013
Polytrauma	Elevated levels of MVs and platelet MVs	Level of platelet MVs negatively correlated with mortality	Curry et al., 2014
Burns	Elevated levels of leukocyte MVs	Markedly increased granulocyte and monocyte MVs in patients following burn injury and their potential role in progression to sterile SIRS	O'Dea et al., 2016
Hypoxia and multiple organ dysfunction syndrome	Increased level of MVs	Increased level of MVs and mucosal endothelial MVs in newborns on extracorporeal membrane oxygenation	Vitkova et al., 2018a

standardized pre-analytical and analytical processing of samples. An important step in our understanding of the biological effects of MVs is development of selective agents with the ability to modulate MV release, function and clearance.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Klára Ulčová for the graphical work. J. J. and J. Z. contributed equally.

References

- Amabile, N., Guerin, A. P., Tedgui, A., Boulanger, C. M., London, G. M. (2012) Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 1873-1880.
- Angus, D. C., Van der Poll, T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840-851.
- Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J. M. (2005) Septic shock. *Lancet* **365**, 63-78.
- Aras, O., Shet, A., Bach, R. R., Hysjulien, J. L., Slungaard, A., Hebbel, R. P., Escolar, G., Jilma, B., Key, N. S. (2004) Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* **103**, 4545-4553.
- Arderiu, G., Peña, E., Badimon, L. (2015) Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 348-357.
- Augustine, D., Ayers, L. V., Lima, E., Newton, L., Lewandowski, A. J., Davis, E. F., Ferry, B., Leeson, P. (2014) Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress. *Circ. Res.* **114**, 109-113.
- Aupeix, K., Hugel, B., Martin, T., Bischoff, P., Lill, H., Pasquali, J. L., Freyssinet, J. M. (1997) The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* **99**, 1546-1554.
- Bachelier, K., Biehl, S., Schwarz, V., Kindermann, I., Kandolf, R., Sauter, M., Ukena, C., Yilmaz, A., Sliwa, K., Bock, C. T., Klingel, K., Böhm, M. (2017) Parvovirus B19-induced vascular damage in the heart is associated with elevated circulating endothelial microparticles. *PLoS One* **12**, e0176311.
- Balk, R. A. (2014) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence* **5**, 20-26.
- Barry, O. P., Kazanietz, M. G., Praticò, D., FitzGerald, G. A. (1999) Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 7545-7556.
- van Beers, E. J., Schaap, M. C., Berckmans, R. J., Nieuwland, R., Sturk, A., Van Doormaal, F. F., Meijers, J. C., Biemond, B. J., CURAMA study group. (2009) Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* **94**, 1513-1519.
- Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jimenez, J. J., Pastor, J., Mauro, L. M., Horstman, L. L., de Marchena, E., Ahn, Y. S. (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* **145**, 962-970.
- Blumberg, N., Gettings, K. F., Turner, C., Heal, J. M., Phipps, R. P. (2006) An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion* **46**, 1813-1821.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., Sibbald, W. J. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* **101**, 1644-1655.
- Breen, K. A., Sanchez, K., Kirkman, N., Seed, P. T., Parmar, K., Moore, G. W., Hunt, B. J. (2015) Endothelial and platelet microparticles in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb. Res.* **135**, 368-374.
- Brown, G. T., McIntyre, T. M. (2011) Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.* **186**, 5489-5496.
- Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakin, A. M., Touyz, R. M. (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci. (Lond.)* **124**, 423-441.
- Burnouf, T., Chou, M. L., Goubran, H., Cognasse, F., Garraud, O., Seghatchian, J. (2015) An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components. *Transf. Apher. Sci.* **53**, 137-145.
- Cavaillon, J. M., Adrie, C. (2009) *Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Chaturvedi, S., Cockrell, E., Espinola, R., Hsi, L., Fulton, S., Khan, M., Li, L., Fonseca, F., Kundu, S., McCrae, K. R. (2015) Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations. *Thromb. Res.* **135**, 102-108.
- Chironi, G. N., Boulanger, C. M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J. M., Tedgui, A. (2009) Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* **335**, 43-51.
- Cloutier, N., Tan, S., Boudreau, L. H., Cramb, C., Subbaiah, R., Lahey, L., Albert, A., Shnayder, R., Gobeze, R., Nigrovic, P. A., Farndale, R. W., Robinson, W. H., Brisson, A., Lee, D. M., Boilard, E. (2013) The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticles associated imine complexes. *EMBO Mol. Med.* **5**, 235-249.
- Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Laradi, S., Chou, M. L., Seghatchian, J., Burnouf, T., Boulanger, C., Garraud, O., Amabile, N. (2015) The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus. Apher. Sci.* **53**, 159-167.
- Curry, N., Raja, A., Beavis, J., Stanworth, S., Harrison, P. (2014) Levels of procoagulant microvesicles are elevated after traumatic injury and platelet microvesicles are negatively correlated with mortality. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 25625.

- Dasgupta, S. K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R. E., Thiagarajan, P. (2012) Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* **125**, 1664-1672.
- Davis, A. L., Carcillo, J. A., Aneja, R. K., Deymann, A. J., Lin, J. C., Nguyen, T. C., Okhuysen-Cawley, R. S., Relvas, M. S., Rozenfeld, R. A., Skippen, P. W., Stojadinovic, B. J., Williams, E. A., Yeh, T. S., Balamuth, F., Brierley, J., de Caen, A. R., Cheifetz, I. M., Choong, K., Conway, E., Cornell, T., Doctor, A., Dugas, M. A., Feldman, J. D., Fitzgerald, J. C., Flori, H. R., Fortenberry, J. D., Graciano, A. L., Greenwald, B. M., Hall, M. W., Han, Y. Y., Hernan, L. J., Irazuzta, J. E., Iselin, E., Van der Jagt, E. W., Jeffries, H. E., Kache, S., Katyal, C., Kissoon, N. T., Kon, A. A., Kutko, M. C., MacLaren, G., Maul, T., Mehta, R., Odetola, F., Parbuoni, K., Paul, R., Peters, M. J., Ranjit, S., Reuter-Rice, K. E., Schnitzler, E. J., Scott, H. F., Torres, A., Weingarten-Abrams, J., Weiss, S. L., Zimmerman, J. J., Zuckerberg, A. L. (2017) American College of Critical Care Medicine clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock. *Crit. Care Med.* **45**, 1061-1093.
- Delabranche, X., Boissramé-Helms, J., Asfar, P., Berger, A., Mootien, Y., Lavigne, T., Grunebaum, L., Lanza, F., Gachet, C., Freyssinet, J. M., Toti, F., Meziani, F. (2013) Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med.* **39**, 1695-1703.
- Deng, F., Wang, S., Cai, S., Hu, Z., Xu, R., Wang, J., Feng, D., Zhang, L. (2017) Inhibition of caveolae contributes to oropof preconditioning-suppressed microvesicles release and cell injury by hypoxia-reoxygenation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 3542149.
- Deutschmann, A., Schlagenhaut, A., Leschnick, B., Hoffmann, K. M., Hauer, A., Muntean, W. (2013) Increased procoagulant function of microparticles in pediatric inflammatory bowel disease: role in increased thrombin generation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **56**, 401-407.
- Distler, J. H., Jungel, A., Huber, L. C., Seemayer, C. A., Reich, C. F., Gay, R. E., Michel, B. A., Fontana, A., Gay, S., Pisetsky, D. S., Distler, O. (2005) The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2892-2897.
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., Sargent, I. L. (2011) Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* **7**, 780-788.
- Faillie, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M. C., Chimini, G., Fusai, T., Grau G. E., Combes V. (2012) Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1731-1738.
- Flammer, A. J., Anderson, T., Celermajer, D. S., Creager, M. A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N. M., Lüscher, T. F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J. A., Lerman, A. (2012) The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* **126**, 753-767.
- Forest, A., Pautas, E., Ray, P., Bonnet, D., Verny, M., Amabile, N., Boulanger, C., Riou, B., Tedgui, A., Mallat, Z., Bodaert, J. (2010) Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med.* **65**, 414-420.
- Fujimi, S., Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Hosotsubo, H., Nakamori, Y., Kuwagata, Y., Shimazu, T., Sugimoto, H. (2002) Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *J. Trauma* **52**, 443-448.
- Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T., Takeshita, F. (2014) The impact of extracellular vesicle-encapsulated circulating micro RNAs in lung cancer research. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 486413.
- Gelderman, M. P., Simak, J. (2008) Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol. Biol.* **484**, 79-93.
- Goris, R. J. (1996) MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J. Surg.* **20**, 418-421.
- Gould, S. J., Raposo, G. (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 20389.
- Guervilly, C., Lacroix, R., Forel, J. M., Roch, A., Camoin-Jau, L., Papazian, L., Dignat-George, F. (2011) High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care* **15**, R31.
- Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A. A., Price-Kuehne, F. E., Savage, C. O., Jayne D., Little, M. A., Salama, A. D., Klein, N. J., Brogan, P. A. (2012) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 49-62.
- Inzhutova, A. I., Larionov, A. A., Petrova, M. M., Salmina, A. B. (2012) Theory of intercellular communication in the development of endothelial dysfunction. *Bull. Exp. Biol. Med.* **153**, 201-205.
- Jansen, F., Yang, X., Hoyer, F. F., Paul, K., Heiermann, N., Becher, M. U., Abu, Hussein, N., Kebschull, M., Bedorf, J., Franklin, B. S., Latz, E., Nickenig, G., Werner, N. (2012) Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1925-1935.
- Jimenez, J. J., Jy, W., Mauro, L. M., Horstman, L. L., Ahn, Y. S. (2001) Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br. J. Haematol.* **112**, 81-90.
- de Jong, H. K., van der Poll, T., Wiersinga, W. J. (2010) The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* **2**, 422-430.
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikaa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borras, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A. (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* **10**, e1001450.
- Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Vassilopoulos, D., Apostolidou, E., Skendros, P., Girod, A., Arelaki, S., Froudarakis, M., Nakopoulou, L., Giatromanolaki, A., Sidiropoulos, P., Koffa, M., Boumpas, D. T., Ritis, K., Mitroutis, I. (2014) Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cy-

- toplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1854-1863.
- Khan, S. Y., Kelher, M. R., Heal, J. M., Blumberg, N., Boshkov, L. K., Phipps, R., Gettings, K. F., McLaughlin, N. J., Silliman, C. C. (2006) Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* **108**, 2455-2462.
- Kirkeboen, K. A., Strand, O. A. (1999) The role of nitric oxide in sepsis – an overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **43**, 275-288.
- Knijff-Dutmer, E. A., Koerts, J., Nieuwland, R., Kalsbeek-Batenburg, E. M., van de Laar, M. A. (2002) Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 1498-1503.
- Laher, I. (2011) Microparticles have a macro effect in sepsis. *Crit. Care Med.* **39**, 1842-1843.
- Larsen, F. F., Petersen, J. A. (2017) Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *Eur. J. Intern. Med.* **45**, 46-50.
- Lee, C. Y., Chen, P. Y., Huang, F. L., Lin, C. F. (2009) Microbiologic spectrum and susceptibility pattern of clinical isolates from the pediatric intensive care unit in a single medical center – 6 years' experience. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **42**, 160-165.
- Leonetti, D., Reimund, J. M., Tesse, A., Viennot, S., Martinez, M. C., Bretagne, A. L., Andriantsitohaina, R. (2013) Circulating microparticles from Crohn's disease patients cause endothelial and vascular dysfunctions. *Plos One* **8**, e73088.
- Lia, G., Brunello, L., Bruno, S., Carpanetto, A., Omedè, P., Festuccia, M., Tosti, L., Maffini, E., Giaccone, L., Arpinati, M., Ciccone, G., Boccadoro, M., Evangelista, A., Camussi, G., Bruno, B. (2018) Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease. *Leukemia* **32**, 765-773.
- Lucignano, B., Ranno, S., Liesenfeld, O., Pizzorno, B., Putignani, L., Bernaschi, P., Menichella, D. (2011) Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2252-2258.
- Marcos-Ramiro, B., Oliva-Nacarino, P., Serrano-Pertierra, E., Blanco-Gelaz, M. A., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P. O., Tuñón, A., López-Larrea, C., Millán, J., Cernuda-Morollón, E. (2014) Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neurosci.* **15**, 110.
- Mastronardi, M. L., Mostefai, H. A., Meziani, F., Martínez, M. C., Asfar, P., Andriantsitohaina, R. (2011) Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress. *Crit. Care Med.* **39**, 1739-1748.
- Matsuda, N., Hattori, Y. (2006) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 189-198.
- Morel, O., Toti, F., Morel, N., Freyssinet, J. M. (2009) Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* **94**, 313-317.
- Mortaza, S., Martínez, M. C., Baron-Menguy, C., Burban, M., de la Bourdonnaye, M., Fizanne, L., Pierrot, M., Calès, P., Henrion, D., Andriantsitohaina, R., Mercat, A., Asfar, P., Meziani, F. (2009) Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit. Care Med.* **37**, 2045-2050.
- Mostefai, H. A., Meziani, F., Mastronardi, M. L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., Asfar, P., Martínez, M. C., Andriantsitohaina, R. (2008) Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 1148-1155.
- Nielsen, C. T., Ostergaard, O., Stener, L., Iversen, L. V., Truedsson, L., Gullstrand, B., Jacobsen, S., Heegaard, N. H. (2012) Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum.* **64**, 1227-1236.
- Nieuwland, R., Berckmans, R. J., McGregor, S., Böing, A. N., Romijn, F. P., Westendorp, R. G., Hack, C. E., Sturk, A. (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930-935.
- Nomura, S., Okamae, F., Abe, M., Hosokawa, M., Yamaoka, M., Ohtani, T., Onishi, S., Matsuzaki, T., Teraoka, A., Ishida, T., Fukuhara, S. (2000) Platelets expressing P-selectin and platelet-derived microparticles in stored platelet concentrates bind to PSGL-1 on filtrated leukocytes. *Clin. Appl. Thromb.* **6**, 213-221.
- Nomura, S., Shimizu, M. (2015) Clinical significance of procoagulant microparticles. *J. Intensive Care* **3**, 2.
- O'Dea, K. P., Porter, J. R., Tirlapur, N., Katbeh, U., Singh, S., Handy, J. M., Takata, M. (2016) Circulating microvesicles are elevated acutely following major burns injury and associated with clinical severity. *PLoS One* **11**, e0167801.
- Ostergaard, O., Nielsen, C. T., Iversen, L. V., Tanassi, J. T., Knudsen, S., Jacobsen, S., Heegaard, H. H. (2013) Unique protein signature of circulating microparticles in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **65**, 2680-2690.
- Park, M. S., Owen, B. A., Ballinger, B. A., Sarr, M. G., Schiller, H. J., Jenkins, D. H., Zietlow, S. P., Ereth, M. H., Owen, G. W., Heit, J. A. (2012) Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not. *Surgery* **151**, 831-836.
- Pittet, D., Rangel-Fausto, M. S., Li, N. (1995) Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Int. Care Med.* **21**, 302-309.
- Rangel-Fausto, M. S., Pittet, D., Costigan, M. (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* **273**, 117-123.
- Reid, V. L., Webster, N. R. (2012) Role of microparticles in sepsis. *Br. J. Anaesth.* **109**, 503-513.
- Robertson, C. M., Coopersmith, C. M. (2006) The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect.* **8**, 1382-1389.
- Sáenz-Cuesta, M., Irizar, H., Castillo-Triviño, T., Muñoz-Culla, M., Osorio-Querejeta, I., Prada, A., Sepúlveda, L., López-Mato, M. P., López de Munain, A., Comabella, M., Villar, L. M., Olascoaga, J., Otaegui, D. (2014) Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark. Med.* **8**, 653-661.

- Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Córdoba, L., Punzón, C., Llamas, M. Á., Fresno, M. (2016) Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacol. Res.* **108**, 46-56.
- Sauaia, A., Moore, F. A., Moore, E. E. (2017) Postinjury inflammation and organ dysfunction. *Crit. Care Clin.* **33**, 167-191.
- Simak, J., Holada, K., Risitano, A. M., Zivny, J. H., Young, N. S., Vostal, J. G. (2004) Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **125**, 804-813.
- Simak, J., Gelderman, M. P., Yu, H., Wright, V., Baird, A. E. (2006) Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1296-1302.
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., Angus, D. C. (2016) The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801-810.
- Sinning, J. M., Losch, J., Walenta, K., Böhm, M., Nickenig, G., Werner, N. (2011) Circulating CD31⁺/Annexin V⁺ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur. Heart J.* **32**, 2034-2041.
- Sitá, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P. (2010) From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* **9**, 830-834.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820.
- Tang, A. H., Brunn, G. J., Cascalho, M., Platt, J. L. (2007) Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 282-285.
- Thaler, J., Ay, C., Mackman, N., Bertina, R. M., Kaider, A., Marosi, C., Key, N. S., Barcel, D. A., Scheithauer, W., Konek, G., Zielinski, C., Pabinger, I. (2012) Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1363-1370.
- Trzepizur, W., Martinez, M. C., Priou, P., Andriantsitohaina, R., Gagnadoux, F. (2014) Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* **44**, 207-216.
- Vitkova, V., Panek, M., Janec, P., Šibíková, M., Vobruha, V., Haluzik, M., Zivny, J., Janota, J. (2018a) Endothelial microvesicles and soluble markers of endothelial injury in critically ill newborns. *Mediators Inflamm.* **2018**, 1975056.
- Vitkova, V., Zivny, J., Janota, J. (2018b) Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes. *Biomark. Med.* **12**, 161-175.
- Wu, Z. H., Ji, C. L., Li, H., Qiu, G. X., Gao, C. J., Weng, X. S. (2013) Membrane microparticles and diseases. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 2420-2427.
- Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N., Simpson, R. J. (2016) Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest.* **126**, 1152-1162.
- Yamamoto, S., Azuma, E., Muramatsu, M., Hamashima, T., Yoko, I., Sasahara, M. (2016) Significance of extracellular vesicles: pathobiological roles in disease. *Cell Struct. Funct.* **41**, 137-143.
- Yong, P. J., Koh, C. H., Shim, W. S. (2013) Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *Eur. J. Prev. Cardiol.* **20**, 496-512.
- Yuana, Y., Bertina, R. M., Osanto, S. (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemost.* **105**, 396-408.

13.2. Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns

Hindawi
Mediators of Inflammation
Volume 2018, Article ID 1975056, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/1975056>



Research Article

Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns

Veronika Vítková,^{1,2} Martin Pánek,^{2,3} Petr Janec,^{2,3} Michaela Šibíková,⁴ Václav Vobruba,⁵ Martin Haluzík,⁶ Jan Živný,² and Jan Janota^{1,2}

¹Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Videnska 800, 14059 Praha 4, Czech Republic

²Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, U Nemocnice 5, 12853 Praha 2, Czech Republic

³Department of Neonatology, Masaryk Hospital Usti nad Labem, Krajska zdravotni, Socialni pece 3316/12A, 40113 Usti nad Labem, Czech Republic

⁴Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, 10000 Praha 10, Czech Republic

⁵Department of Pediatrics, General University Hospital in Prague and First Faculty of Medicine, Charles University, Ke Karlovu 2, 121 00 Praha 2, Czech Republic

⁶The Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Kateřinská 32, 12853 Praha 2, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jan Janota; janjanota@yahoo.com

Received 25 April 2018; Accepted 27 June 2018; Published 19 July 2018

Academic Editor: Anshu Agrawal

Copyright © 2018 Veronika Vítková et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neonatal systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction syndrome are the main postnatal insults influencing mortality and morbidity. Critically ill newborns with high predicted mortality are supported by extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). Biomarkers of inflammatory response and endothelial injury can be used for early diagnosis and treatment of critical neonatal situations. The aim of our study was to explore plasma proteins and endothelial microvesicles as markers of inflammation and endothelial activation in newborns on ECMO and to compare them with healthy neonates. Thirteen newborns on ECMO and 13 healthy newborns were included in the study. Plasma soluble biomarkers were measured using multiplex immunoassay based on Luminex® xMAP multianalyte profiling platform. The total microvesicle count and plasma level of surface antigen-specific microvesicles were determined by flow cytometry. The plasma concentration of cell-derived microvesicles was measured using annexin-V labeling, and the endothelial origin of microvesicles was determined using lineage-specific antigen labeling of endothelial cell/microvesicle markers (endoglin/CD105, PECAM1/CD31, VEGFR2/CD309, and MadCAM1). Inflammatory markers (procalcitonin, IL-1 β , IL-6, and IL-22) were increased in the ECMO group ($P < 0.01$). The assessment of endothelial markers showed higher concentrations of endocan and angiopoietin-2 ($P < 0.01$) in the ECMO group while VEGF in the ECMO group was significantly lower ($P < 0.01$). In the ECMO group, the concentration of annexin-V-positive microvesicles (total microvesicles) and endothelial microvesicles expressing mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 (MadCAM1) was increased ($P = 0.05$). In summary, we found increased concentrations of soluble inflammatory and endothelial markers in the plasma of critically ill newborns with multiple organ dysfunction. Increased plasma concentrations of microvesicles may reflect the activation or damage of blood cells and vasculature including endothelial cells. The measurement of cell membrane-derived microvesicles may be added to the panel of established inflammatory markers in order to increase the sensitivity and specificity of the diagnostic process in critically ill newborns.

1. Introduction

Neonatal mortality and morbidity are important factors reflecting the level of medical care [1]. Pathological situations and diseases of mother and newborn during perinatal period influence significantly neonatal mortality and long-term morbidity [2]. Neonatal pathologies causing multiple organ dysfunction—prematurity, systemic infections, and perinatal asphyxia—are the main postnatal insults influencing neonatal mortality and morbidity [2, 3]. Critically ill newborns with high predicted mortality and maximum conventional support of vital functions are candidates for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)—an invasive method of life support which improves their survival [4, 5]. These patients have clinical and laboratory signs of systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction or failure [5, 6]. The search for novel markers helping the early diagnosis, assessment of severity, and early treatment of serious perinatal complications associated with systemic inflammation and organ dysfunction is the priority of current neonatology [3].

Neonatal mortality, morbidity, and the successful approach to therapy of critically ill newborns depend on the understanding of the pathophysiology of defensive inflammatory response to perinatal insults. Biomarkers and mediators of inflammatory response can be used for early diagnosis and treatment of critical neonatal situations associated with multiple organ dysfunction [7].

The endothelium plays an important role in many physiological functions, including the control of vasomotor tone, blood cell trafficking, hemostatic balance, permeability, proliferation, survival, and innate and adaptive immunity. The endothelium is involved in most disease states, either as a primary determinant of pathophysiology or as a victim of collateral damage [8, 9]. Almost every stimulus leading to a systemic inflammatory response, that is, severe infection, trauma, excessive tissue breakdown, solid tumors, leukemia, pregnancy-associated complications, vascular anomalies, liver failure, and toxicological or immunological responses, and activation of the coagulation system can be associated with endothelial damage. The level of systemic endothelial injury limits the reversibility of organ dysfunction. Endothelial cell release during stimulation, activation, and injury soluble biomarkers. Biomarkers can be detected and quantified in the peripheral blood [9]. Detection of biomarkers of endothelial injury in peripheral blood helps to detect and quantify the severity of systemic, cardiovascular, and infectious diseases in adults, children, and newborns [10–12].

Somatic cells, including endothelial cells, secrete a variety of small, defined cell membrane-derived vesicles termed exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. Cell membrane microvesicles (microparticles) are currently judged as important messenger and indicators of cell activation, apoptosis, or tissue degeneration [13, 14]. Microvesicles (~100–1000 nm) are released by budding from the plasma membrane of most eukaryotic cells undergoing activation and are characterized by exposure of membrane proteins and phosphatidylserine residues on their outer surface. Elevated levels of circulating microvesicles are associated with various

vascular pathologies, inflammatory, malignant, and hematologic disorders [15].

Changes in the levels of endothelial microvesicles were detected, measured, and might be potentially used to evaluate the severity of the disease in serious systemic and cardiovascular pathologies in adults [16]. In neonates and children, endothelial microvesicles were determined in patients with vasculitis and blood group incompatibility [17, 18].

Maternal and neonatal biomarkers of endothelial injury in diseases associated with perinatal period can be used as potential diagnostic markers influencing early detection and treatment of diseases with negative impact on neonatal mortality and morbidity. This may lead to decrease in neonatal mortality and long-term morbidity. There is limited information regarding endothelial cells, endothelial dysfunction, and endothelial damage in newborns. The complex assessment of maternal and neonatal markers produced by endothelium (vasoactive substances, cytokines, adhesive molecules, growth, and angiogenic factors) during perinatal period was not done yet. There is currently no information available regarding endothelial microvesicles in critically ill newborns.

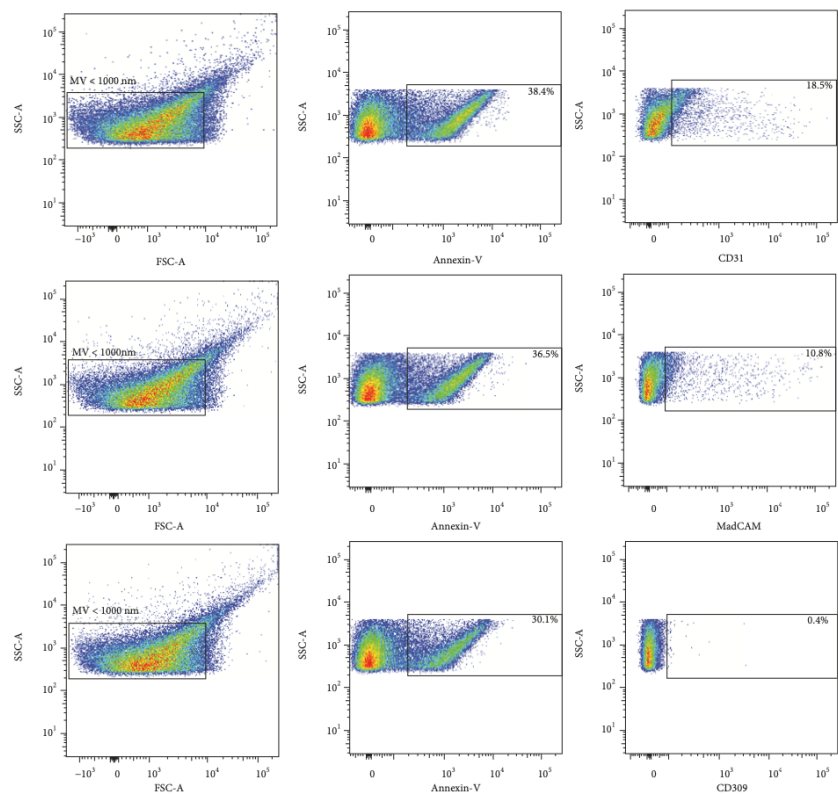
The aim of our study was to explore biomarkers of endothelial activation and damage in critically ill newborns during extracorporeal membrane oxygenation and to compare them with biomarkers in healthy term neonates.

2. Materials and Methods

2.1. Patients. Thirteen patients on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO group) admitted to ECMO Center, General University Hospital in Prague from October 2012 to April 2016 were enrolled in the study after informed consent of their parents had been obtained. Thirteen healthy term newborns (control group), admitted to Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Czech Republic, from January 2016 to July 2016 were enrolled in the study after informed consent of their parents had been obtained. The study was approved by institutional ethics committee in both participating hospitals.

2.2. Blood Sample Processing and Storage. Blood samples for both groups of patients were collected within the first week of life into sodium citrate. In the ECMO group, blood samples were collected during ECMO support, and in the control group, samples were collected when bloods for mandatory metabolic screening were taken. Blood samples were processed by standardized method published previously and stored at -80°C [15]. Samples were processed within 60 minutes of collection. Full blood was centrifuged at the $2700g$ for 15 min at 10°C followed by the second spin of collected plasma at $2700g$ for 10 minutes at 10°C . Collected plasma was then aliquoted into screw cap tubes and stored at -80°C until used for isolation of microvesicles or measurement of soluble markers.

2.3. Soluble Biomarker Measurement. Soluble biomarkers were measured using multiplex magnetic bead immunoassay based on Luminex® xMAP multianalyte profiling platform and analyzed on MAGPIX® System (Merck Millipore) at



(a) ECMO
FIGURE 1: Continued.

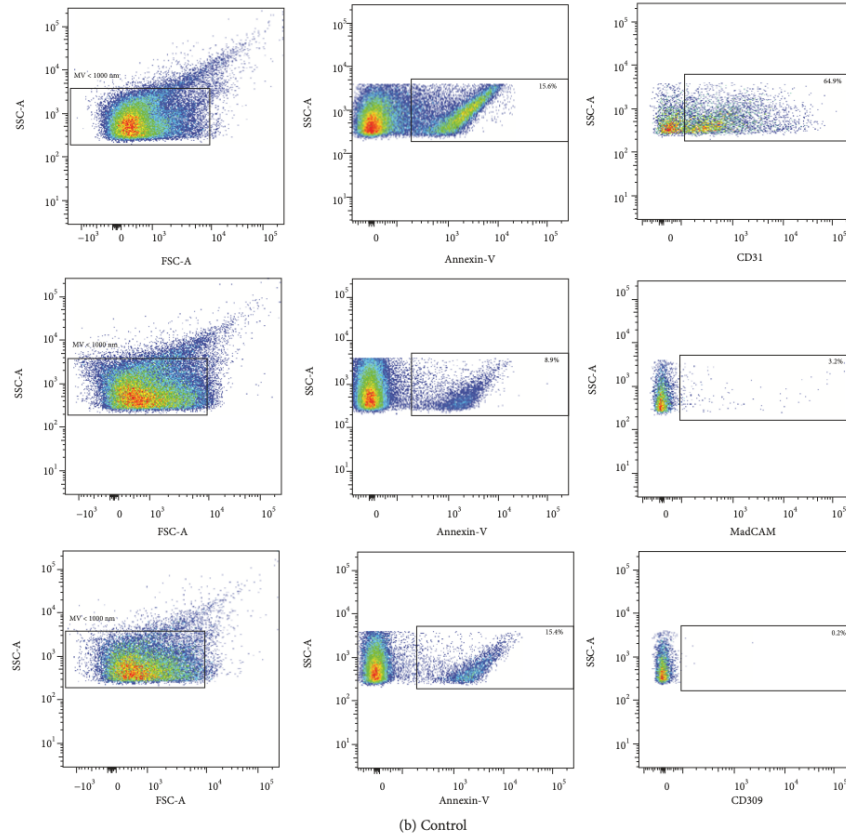


FIGURE 1: Representative dot plots showing gating strategy for the analysis of antigen-specific microvesicles: (a) ECMO patient; (b) control. Based on the size analysis of the standard ApogeeMix beads, the gate for microvesicles (MV < 1000 nm) was created (left column). From the gate MV < 1000 nm, the phosphatidyl serine-positive microvesicles were identified based on the labeling with annexin-V and the gate of MV < 1000 nm/annexin-V+ was created (middle column). The annexin-V-positive microvesicles were then analyzed for the positivity of individual cell-specific markers PECAM/CD31, MadCAM1, and VEGFR2/CD309 (right column).

the Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of The General University Hospital and of the First Faculty of Medicine of Charles University in Prague. The following premixed magnetic bead kits were used for plasma sample analysis: LXSAHM-07: endoglin (BR22), IL-1 β (BR28), IL-22 (BR35), IL-6 (BR13), procalcitonin (BR39), VCAM-1 (BR57), and VEGF-A (BR26) and LXSAHM-08: angiopoietin-2 (BR26), endothelin-1 (BR76), ICAM-1 (BR61), IL-1 α (BR38), IL-17A (BR42), IL-18 (BR78), IL12 p70 (BR563), TNF- α (BR12) (both from Biotechne R&D Systems), and Milliplex MAP human soluble receptor magnetic bead panel (HSCRMAG-32K-02: VEGFR1 and

VEGFR2) and cardiovascular disease (CVD) magnetic bead panel (HCVD1MAG-67K-01: endocan1/ESM1) (Merck).

2.4. Isolation and Measurement of Microvesicles. Plasma cell membrane-derived microvesicles were isolated by centrifugation of stored platelet-free sample aliquots at 21000g for 10 min. The total microvesicle count and the number of surface antigen-specific microvesicles were determined by flow cytometry (BD FACS CantoII). The plasma microvesicles were identified based on size discrimination and annexin-V FITC (Apronex Biotechnologies) labeling. Cell origin of microvesicles was determined using lineage-

specific antigen labeling with CD105 AF647 (BD Biosciences), platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1)/CD31 BV510 (BD Biosciences), VEGFR2/CD309 AF647 (BD Biosciences), and mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1/MadCAM APC (Biotechne R&D Systems). A representative dot plots describing the gating strategy to identify the vesicles in the flow cytometry data are shown in Figure 1.

2.5. Flow Cytometry Setup. The forward (FSC) and side scatter (SSC) were adjusted using polystyrene latex and silica bead mixture of defined sizes (ApogeeMix, Apogee). ApogeeMix contains aqueous mixture of plastic spheres with diameters 180 nm, 240 nm, 300 nm, 590 nm, 880 nm, and 1300 nm with refractive index $n = 1.43$ (silica), and 110 nm and 500 nm green fluorescent beads with refractive index $n = 1.59$ (latex). We were able to discriminate bead size based on FSC and SSC between 300 nm and 1000 nm. Data analysis was performed from 25,000 counted events using BD FACS-Diva Acquisition and analysis software. The results were expressed as the number of microvesicles per microliter (MV/ μ l) of plasma calculated based on the input volume of plasma and cytometer flow rate.

2.6. Statistical Analysis. GraphPad Prism5 system was used for data analysis. The Mann-Whitney U test was performed to determine the statistical significance between the groups. All statistical tests are based on a significance level of $P \leq 0.05$.

3. Results

Thirteen newborns on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO group) and 13 healthy term newborns (Control group) were included in the study. Characteristics of ECMO and control groups are shown in Table 1. There were no significant differences in gestational age, birthweight, and gender between groups. Characteristics of the ECMO group were as follows: veno-arterial support in 11 patients (85%) and veno-venous support in 2 patients (15%). Primary diagnosis was pulmonary hypertension of the newborn in 7 patients (55%), sepsis in 2 patients (15%), congenital diaphragmatic hernia in 2 patients (15%), and meconium aspiration in 2 patients (15%). One patient died during ECMO, and 2 patients died in hospital after ECMO support.

Plasma concentrations of soluble inflammatory and endothelial markers are shown in Tables 2 and 3. Inflammatory markers were significantly increased in the ECMO group, increase in TNF α did not reach statistical significance ($P = 0.0616$). The assessment of endothelial markers showed significantly higher concentrations of endocan ($P = 0.0005$) and angiopoietin-2 ($P = 0.0013$) in the ECMO group and significantly higher concentrations of VEGF in the control group ($P = 0.0001$).

Plasma concentrations of microvesicles are shown in Figure 2. Concentration of annexin-V-positive microvesicles (total microvesicles) was significantly increased in the ECMO group ($P = 0.0007$). From endothelium-specific microvesicles, the only significantly increased were those expressed

TABLE 1: Characteristics of the ECMO and control groups.

Patients	ECMO group	Control group
Number	13	13
Birth weight (grams)	3377 (111)	3392 (125)
Gestational age (weeks)	38.9 (0.4)	39.4 (0.3)
Male	7 (54%)	7 (54%)
Apgar at 1 minute	4.5 (0.9)**	9.0 (0.5)**
Apgar at 5 minutes	6.2 (0.8)**	9.5 (0.3)**
Apgar at 10 minutes	7.3 (0.6)**	9.9 (0.2)**
Blood collection (hours)	104 (23)*	58 (2)*

Data presented as mean (SEM) or number (%); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

TABLE 2: Plasma concentrations of soluble inflammatory markers in the ECMO and control groups.

Inflammatory markers	ECMO group (pg/ml)	Control group (pg/ml)
TNF- α	12.53 (6.34)	3.26 (0.97)
Procalcitonin	16,220 (3749)**	680 (260)**
IL-1 β	9.98 (2.53)**	1.67 (0.31)**
IL-6	2043.00 (1330)**	7.33 (0.82)**
IL-22	17.46 (4.73)**	3.41 (1.37)**

Data presented as mean (SEM); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

TABLE 3: Plasma concentrations of soluble endothelial markers in the ECMO and control groups.

Endothelial markers	ECMO group (ng/ml)	Control group (ng/ml)
Endocan	2789 (271)**	1496 (128)**
Angiopoietin-2	21.44 (6.26)**	6.93 (0.75)**
VEGF	4.19 (1.17) $\times 10^{-3}$ **	88.50 (21.19) $\times 10^{-3}$ **
sVEGFR1	5866 (1354)	4330 (541)
sVEGFR2	6543 (979)	7398 (397)
Endothelin-1	6.63 (1.18) $\times 10^{-3}$	5.49 (1.90) $\times 10^{-3}$
VCAM-1	5580 (1158)	3193 (172)
ICAM-1	512 (81)	372 (175)

Data presented as mean (SEM); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 (MadCAM1) ($P = 0.05$). Other endothelium-specific microvesicles (PECAM/CD31 positive, VEGFR2 positive) were increased in the ECMO group, but did not reach statistical significance ($P = 0.0606$ and $P = 0.2986$, resp.).

4. Discussion

Neonatal extracorporeal membrane oxygenation is an invasive method used for life support of critically ill newborns with cardiorespiratory failure and high predicted mortality.

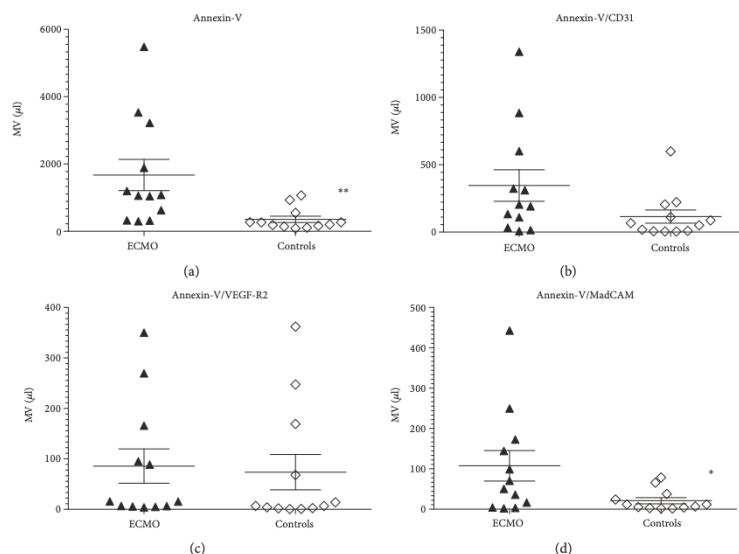


FIGURE 2: Concentrations of microvesicles (MV) in the plasma of newborns on extracorporeal membrane oxygenation group (ECMO) and term newborn group (controls): (a) annexin-V-positive MV; (b) annexin-V, PECAM/CD 31-positive MV; (c) annexin-V, VEGFR2-positive MV; (d) annexin-V, MadCAM1-positive MV. Data presented as values of individual patients and mean ($n = 12$ for each group). The error bars represent the standard error of the mean (SEM) (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$).

We analyzed levels of inflammatory markers and markers of endothelial impairment of newborns supported by extracorporeal circulation and compared them to healthy newborns. Both groups of patients showed significant differences in Apgar scores, which reflect expected problems of postnatal adaptation in the ECMO group. Control group samples were collected during mandatory metabolic screening tests as approved and allowed by Ethics committee, which should be between 48 and 72 hours of life. The blood samples of the ECMO group were collected significantly later, between 36 and 350 hours of life, after fulfilling the ECMO criteria, transport to ECMO center, initiation of ECMO, and obtaining the informed consent.

Soluble markers of inflammation were significantly increased in the ECMO group. This is an expected increase because of the presence of systemic inflammation and multiple organ dysfunction in all ECMO patients, and this finding is in agreement with published data [19, 20]. When assessing the data of ECMO patients who died ($n = 3$), we did not find any significant differences within measured parameters compared to the patients who survived.

Soluble plasma endocan and angiopoietin-2 were significantly increased in the ECMO group showing potential endothelial impairment in newborns with systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. Increased concentrations of endocan and angiopoietin-2 were associated with clinical worsening and progression into specific

organ dysfunctions in adult septic patients and as predictors of multiple organ failure. Endocan was used as sensitive marker of systemic inflammation in neonatal sepsis. Our findings are in agreement with these adult and pediatric clinical data [21–23]. The lower VEGF concentration in the ECMO group might possibly reflect impaired normal increase described during early neonatal period in healthy newborns. VEGF is a paracrine regulator of endothelial cell differentiation, angiogenesis, and maintenance of existing vessels [24, 25]. Indications for ECMO in our group of newborns were severe pulmonary or cardiopulmonary compromise. Under these circumstances, the tissues may be incapable of responding to the hypoxia and inflammatory stimuli with an increase in VEGF production [26, 27]. Lower VEGF may contribute to the pathophysiology of acute lung injury and multiple organ dysfunction [28, 29].

Cell-membrane-derived microvesicle concentrations were higher in the ECMO group suggesting generalized endothelial and blood cell injury. We detected statistically significant increase in the concentration of mucosal endothelium marker MadCAM1 microvesicles. Systemic inflammation and multiple organ dysfunction in critically ill newborns are accompanied with circulatory failure. Redistribution of the circulation leads to underperfusion of the mucosa mainly in the gut [30, 31]. Mucosal perfusion impairment and reperfusion injury following the stabilization of systemic circulation due to extracorporeal

circulation therapy might cause the injury of the mucosal vessel endothelium. These processes may possibly lead to the release of mucosal endothelial microvesicles recorded in our study. Recently, reports on ECMO model on newborn piglets described mechanisms of gut barrier dysfunction associated with extracorporeal membrane oxygenation. This would suggest that not only the health conditions but also the extracorporeal circulation itself may contribute to the mucosal endothelial injury followed by the release of mucosal endothelium microvesicles (MadCAM1+) [32, 33].

Other endothelium-specific microvesicles (PECAM/CD31 positive, VEGFR2 positive) were also increased in the ECMO group, but did not reach statistical significance. This may reflect the reaction of endothelial cells, probably expressed less in other organ systems than in the mucosa [14]. We can only speculate about reasons of MV release in the study group as there are currently no data available regarding endothelial MV release in critically ill newborns.

5. Conclusions

We found increased concentrations of soluble inflammatory and endothelial markers in the plasma of critically ill newborns with multiple organ dysfunction and systemic inflammatory response syndrome. Increased plasma concentrations of microvesicles may reflect the activation or damage of endothelial cells. The measurement of cell-membrane-derived microvesicles may be added to the panel of established inflammatory markers in order to increase the sensitivity and specificity of the diagnostic process in critically ill newborns. This is so far the first study describing the concentrations of endothelial microvesicles together with inflammatory and endothelial markers in critically ill newborns.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Disclosure

The results of this study were presented as a poster in The Australasian Society for Immunology 2017 Annual Scientific Meeting, Brisbane, Australia, November 29, 2017.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Jan Živný and Jan Janota contributed equally.

Acknowledgments

This work is supported by the grant from the Czech Health Research Council Agency, Ministry of Health of the Czech Republic (Grant no. 16-27800A), and Medical and Research

Program, Ministry of Health, Czech Republic, MH CZ-DRO Thomayer Hospital (Grant no. TN 0064190). The authors would like to acknowledge Alena Louzecka and Renata Pavlovicova for the excellent technical assistance, Yiannis Vyrides and Stella Akrivi for the help with data analysis, and Klara Ulcova for the graphical work.

References

- [1] A. D. Mohangoo, S. E. Buitendijk, K. Szamotulska et al., "Gestational age patterns of fetal and neonatal mortality in Europe: results from the Euro-Peristat project," *PLoS One*, vol. 6, no. 11, article e24727, 2011.
- [2] J. Zeitlin, K. Wildman, G. Bréart et al., "Selecting an indicator set for monitoring and evaluating perinatal health in Europe: criteria, methods and results from the PERISTAT project," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 111, Supplement 1, pp. S5–S14, 2003.
- [3] W. M. Sappenfield, M. G. Peck, C. S. Gilbert, V. R. Haynatzka, and T. Bryant, "Perinatal periods of risk: phase 2 analytic methods for further investigating foeto-infant mortality," *Maternal and Child Health Journal*, vol. 14, no. 6, pp. 851–863, 2010.
- [4] M. Mugford, D. Elbourne, and D. Field, "Extracorporeal membrane oxygenation for severe respiratory failure in newborn infants," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 16, no. 3, article CD001340, 2008.
- [5] K. J. Rehder, D. A. Turner, and I. M. Cheifetz, "Extracorporeal membrane oxygenation for neonatal and pediatric respiratory failure: an evidence-based review of the past decade (2002–2012)," *Pediatric Critical Care Medicine*, vol. 14, no. 9, pp. 851–861, 2013.
- [6] R. J. Mildner, N. Taub, J. R. Vyas et al., "Cytokine imbalance in infants receiving extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure," *Biology of the Neonate*, vol. 88, no. 4, pp. 321–327, 2005.
- [7] N. Hofer, W. Müller, and B. Resch, "Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) definition and correlation with early-onset bacterial infection of the newborn," *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, vol. 95, no. 2, article F151, 2010.
- [8] P. Paulus, C. Jennewein, and K. Zacharowski, "Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis?," *Biomarkers*, vol. 16, supplement 1, pp. S11–S21, 2011.
- [9] W. C. Aird, "Endothelium in health and disease," *Pharmacological Reports*, vol. 60, no. 1, pp. 139–143, 2008.
- [10] D. D'Alquen, B. W. Kramer, S. Seidenspinner et al., "Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis," *Pediatric Research*, vol. 57, no. 2, pp. 263–269, 2005.
- [11] S. Masoura, I. Kalogiannidis, K. Makedou et al., "Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case-control study," *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, vol. 175, pp. 119–123, 2014.
- [12] J. L. Hecht, R. N. Fichorova, V. F. Tang et al., "Relationship between neonatal blood protein concentrations and placenta histologic characteristics in extremely low GA newborns," *Pediatric Research*, vol. 69, no. 1, pp. 68–73, 2011.

- [13] J. M. Freyssinet, "Cellular microparticles: what are they bad or good for?," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no. 7, pp. 1655–1662, 2003.
- [14] V. Vítková, J. Živný, and J. Janota, "Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes," *Biomarkers in Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 161–175, 2018.
- [15] J. Simak, K. Holada, A. M. Risitano, J. H. Živný, N. S. Young, and J. G. Vostal, "Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria," *British Journal of Haematology*, vol. 125, no. 6, pp. 804–813, 2004.
- [16] F. Lovren and S. Verma, "Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction," *Clinical Chemistry*, vol. 59, no. 8, pp. 1166–1174, 2013.
- [17] H. A. Awad, A. A. Tantawy, R. A. El-Farrash, E. A. Ismail, and N. M. Youssif, "CD144+ endothelial microparticles as a marker of endothelial injury in neonatal ABO blood group incompatibility," *Blood Transfusion*, vol. 12, no. 2, pp. 250–259, 2014.
- [18] Z. Tan, Y. Yuan, S. Chen, Y. Chen, and T. X. Chen, "Plasma endothelial microparticles, TNF- α and IL-6 in Kawasaki disease," *Indian Pediatrics*, vol. 50, no. 5, pp. 501–503, 2013.
- [19] R. B. McLlwain, J. G. Timpa, A. R. Kurundkar et al., "Plasma concentrations of inflammatory cytokines rise rapidly during ECMO-related SIRS due to the release of preformed stores in the intestine," *Laboratory Investigation*, vol. 90, no. 1, pp. 128–139, 2010.
- [20] A. Ruth, C. E. McCracken, J. D. Fortenberry, and K. B. Hebbar, "Extracorporeal therapies in pediatric severe sepsis: findings from the pediatric health-care information system," *Critical Care*, vol. 19, no. 1, p. 397, 2015.
- [21] A. Palud, E. Parmentier-Decrucq, J. Pastre, N. de Freitas Caires, P. Lassalle, and D. Mathieu, "Evaluation of endothelial biomarkers as predictors of organ failures in septic shock patients," *Cytokine*, vol. 73, no. 2, pp. 213–218, 2015.
- [22] A. Ioakeimidou, E. Pagalou, M. Kontogiorgi et al., "Increase of circulating endocan over sepsis follow-up is associated with progression into organ dysfunction," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 36, no. 10, pp. 1749–1756, 2017.
- [23] M. Saldır, T. Tunc, F. Cekmez et al., "Endocan and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as novel markers for neonatal sepsis," *Pediatrics and Neonatology*, vol. 56, no. 6, pp. 415–421, 2015.
- [24] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen," *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1306–1309, 1989.
- [25] J. L. Shifren, N. Doldi, N. Ferrara, S. Mesiano, and R. B. Jaffe, "In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 79, no. 1, pp. 316–322, 1994.
- [26] P. Lassus, M. Turanlahti, P. Heikkilä et al., "Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 10, pp. 1981–1987, 2001.
- [27] K. M. Oltmanns, H. Gehring, S. Rudolf et al., "Acute hypoxia decreases plasma VEGF concentration in healthy humans," *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 290, no. 3, pp. E434–E439, 2006.
- [28] A. Malamitsi-Puchner, J. Tziotis, A. Tsonou, E. Protonotariou, A. Sarandakou, and G. Creatsas, "Changes in serum levels of vascular endothelial growth factor in males and females throughout life," *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, vol. 7, no. 5, pp. 309–312, 2000.
- [29] A. Malamitsi-Puchner, J. Tziotis, E. Protonotariou, A. Sarandakou, and G. Creatsas, "Angiogenic factors in the perinatal period: diversity in biological functions reflected in their serum concentrations soon after birth," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 900, pp. 169–173, 2000.
- [30] G. R. Polglase, T. Ong, and N. H. Hillman, "Cardiovascular alterations and multiorgan dysfunction after birth asphyxia," *Clinics in Perinatology*, vol. 43, no. 3, pp. 469–483, 2016.
- [31] H. T. Hassoun, B. C. Kone, D. W. Mercer, F. G. Moody, N. W. Weisbrodt, and F. A. Moore, "Post-injury multiple organ failure: the role of the gut," *Shock*, vol. 15, no. 1, pp. 1–10, 2001.
- [32] A. R. Kurundkar, C. R. Killingsworth, R. B. McLlwain et al., "Extracorporeal membrane oxygenation causes loss of intestinal epithelial barrier in the newborn piglet," *Pediatric Research*, vol. 68, no. 2, pp. 128–133, 2010.
- [33] K. MohanKumar, C. R. Killingsworth, R. Britt McLlwain et al., "Intestinal epithelial apoptosis initiates gut mucosal injury during extracorporeal membrane oxygenation in the newborn piglet," *Laboratory Investigation*, vol. 94, no. 2, pp. 150–160, 2014.

13.3. Spontaneous delivery is associated with increased endothelial activity in cord blood compared to elective cesarean section

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 251 (2020) 229–234



Contents lists available at ScienceDirect
European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrb



Spontaneous delivery is associated with increased endothelial activity in cord blood compared to elective cesarean section



Michaela Sibikova^a, Veronika Vitkova^{b,c}, Linda Jamrichova^{a,b}, Martin Haluzik^{d,f}, Jan Zivny^c, Jan Janota^{b,c,e,*}

^a Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, Praha 10, 10000, Czech Republic

^b Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Videnska 800, 14059, Praha 4, Czech Republic

^c Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, U Nemocnice 5, Praha 2, 12853, Czech Republic

^d The Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Katerinska 32, Praha 2, 12853, Czech Republic

^e Department of Obstetrics and Gynaecology, Neonatal Unit, Motol University Hospital and Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, V Uvalu 84, 15000, Praha 5, Czech Republic

^f Diabetes Centre and Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21, Prague 4, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2020

Received in revised form 26 May 2020

Accepted 29 May 2020

Keywords:

Endothelial cell

Inflammation

Delivery

Newborn

Cord blood

Microvesicles

ABSTRACT

Objectives: It is suggested that delivery whether spontaneous or by elective cesarean section is associated with an inflammatory reaction which may be modified by the type of delivery. Inflammatory reactions are associated with endothelial activation. The aim of our study was to assess endothelial biomarkers in cord and neonatal blood following different modes of delivery.

Study design: The study group consisted of term healthy newborns after uncomplicated pregnancies and either spontaneous vaginal delivery (n = 39) or elective cesarean section (n = 20). Plasma soluble biomarkers were measured using multiplex magnetic bead immunoassay. The microvesicle count and number of surface antigen-specific microvesicles were determined by flow cytometry.

Results: We found significantly increased concentrations of cord blood endothelial markers (sVEGFR1, Endothelin-1 and sVCAM1) and microvesicles (EPCR/CD201+, ICAM1/CD54+ and PECAM1/CD31+) in spontaneous vaginal delivery when compared to elective cesarean section. Irrespective of the delivery mode endothelial markers sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, and sICAM1, were significantly increased in neonatal compared to cord blood.

Conclusion: We found increased cord blood concentrations of endothelial markers and microvesicles following spontaneous vaginal delivery, which may reflect the natural activation of endothelial cells during labor. Following the delivery, most of the soluble markers increased, as a possible consequence of activation of neonatal innate immunity and postnatal cardiovascular transition.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Inflammation is a complex response of tissues to infectious and noninfectious stimuli. Inflammatory reaction is accompanied by endothelial stimulation, activation, dysfunction and injury. Upon activation endothelial cells release bioactive molecules and extracellular vesicles, which can be used as diagnostic biomarkers for detection and treatment of the inflammatory response [1]. Pathological conditions during pregnancy and delivery such as diabetes, hypoxia or maternal infection may influence

concentrations of inflammatory and endothelial biomarkers [2]. Spontaneous and instrumental delivery even without specific prelabor maternal pathologies is suggested to be accompanied by an inflammatory reaction. The intensity of this reaction is modified by the actual type of delivery [3,4].

Endothelium plays an important role in many physiological functions, including the control of vascular tone, blood cell trafficking, hemostatic balance, permeability, proliferation, survival, and innate and adaptive immunity. Endothelium is involved in most disease states, either as a primary determinant of pathophysiology or as a victim of collateral damage [5,6]. Endothelial cells represent important initiators of the inflammatory reaction and the target of molecules that regulate immune responses. Almost every stimulus leading to an inflammatory

* Corresponding author at: Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Videnska 800, 14059, Praha 4, Czech Republic.

E-mail address: jan.janota@fnmotol.cz (J. Janota).

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.05.059>

0301-2115/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

response can be associated with increased endothelial activity. Endothelial cells release activation and injury molecules during stimulation, which can be detected and quantified in the peripheral blood [6]. Markers of endothelial activation in peripheral blood help to detect and quantify the severity of diseases in adults, children and newborns and can serve as predictors of pathological processes [7,8]. Endothelial biomarkers can be used to determine and monitor pathological processes during pregnancy and delivery. Increased concentrations of endothelial markers were detected in specific pregnancy and perinatal complications such as preeclampsia, hypertension and diabetes mellitus [9,10]. There is limited data regarding endothelial activation during uncomplicated pregnancies, different modes of delivery and in newborns within the first days of life [11,12].

Somatic cells, including endothelial cells, secrete a variety of cell membrane-derived vesicles termed exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. Cell membrane microvesicles (microparticles or large extracellular vesicles) are currently judged as important messenger and indicators of cell activation, apoptosis, or tissue degeneration [13–15]. Increased concentrations of endothelial microvesicles in pregnant women and cord blood have been detected in preeclampsia [16–19]. In neonates and children, endothelial microvesicles have been found in patients with vasculitis, blood group incompatibility and in multiple organ dysfunction [20–22].

Maternal and neonatal biomarkers of inflammation and endothelial injury in diseases associated with the perinatal period can be used as potential diagnostic markers influencing early detection and treatment of diseases with negative impact on neonatal mortality and morbidity. This may lead to a decrease in neonatal mortality and long-term morbidity. There is limited information regarding endothelial cells and endothelial dysfunction associated with different types of delivery, which might influence the further assessment of other diseases associated with the perinatal period such as neonatal hypoxia, respiratory distress and neonatal sepsis. There is currently no available information regarding endothelial microvesicles in different types of delivery and in newborns. The complex assessment of maternal and neonatal markers produced by endothelium (vasoactive substances, cytokines, adhesive molecules, growth and angiogenic factors, microvesicles) during the perinatal period has not been reported previously.

Spontaneous vaginal delivery is supposed to be associated with an inflammatory reaction. Endothelial activation is an integral part of the inflammatory reaction. Therefore spontaneous vaginal delivery may present with higher levels of endothelium released bioactive molecules and endothelium-derived microvesicles when compared to instrumental modes of delivery. Postnatal cardiovascular transition, angiogenesis and activation of immunity due to the interaction of the newborn with the external environment may be followed by a further increase in endothelial activity. To establish these differences (spontaneous delivery vs. cesarean section; cord blood vs. neonatal blood) may help in the future when using these molecules as potential markers of early neonatal pathology (hypoxia, pulmonary hypertension, early onset bacterial sepsis).

The aim of our study was to explore markers of endothelial activation in cord blood in different modes of delivery and in newborns after delivery.

Materials and methods

Patients

The study group consisted of newborns and their mothers after uncomplicated pregnancy and spontaneous vaginal delivery (Spontaneous group) and after elective cesarean section (Elective

group). Healthy term newborns, admitted to the Department of Neonatology, Thomayer Hospital Prague, Czech Republic and Department of Neonatology, Masaryk Hospital Usti nad Labem, Czech Republic, from January 2016 to February 2018, were enrolled in the study. Inclusion criteria were: uncomplicated pregnancy, one fetus, term delivery, healthy newborn. Exclusion criteria: preeclampsia, maternal infection, neonatal infection, neonatal hypoxia requiring resuscitation, and any type of neonatal distress requiring neonatal intensive care unit stay. Participants in the study were enrolled after informed consent of the mothers had been obtained. Mothers were consented before delivery in case of uncomplicated pregnancy if all prenatal inclusion criteria were met. We excluded all mothers meeting the prenatal exclusion criteria before consenting. Consenting was done by the members of the pediatric team available to discuss all the aspects of the study with women admitted to the hospital before delivery. The study was approved by institutional ethics committees in both participating hospitals: Thomayer Hospital Prague (Registration number 969/15; A 15-06-01) and Masaryk Hospital Usti nad Labem (Registration number 16-27800A).

Blood samples processing and storage

Samples from all patients were collected from venous umbilical cord blood and from neonatal peripheral venous blood at the time when bloods for mandatory metabolic screening were taken (48–72 hours of life). Blood samples were processed by standardized methods published previously and stored at -80°C [21]. Samples were processed within 60 min of collection. Full blood was centrifuged at the 2700g for 15 min at 10°C followed by the second spin of collected plasma at 2700g for 10 min at 10°C . Collected plasma was then aliquoted into screw cap tubes and stored at -80°C until used for measurement of microvesicles and soluble markers. Actual numbers of neonatal samples in specific subgroups of patients depended on volumes obtained from the newborns and were occasionally reduced due to venous accessibility difficulties.

Soluble biomarker measurement

Soluble biomarkers were measured using multiplex magnetic bead immunoassay based on Luminex [®]xMAP multi-analyte profiling platform and analyzed on MAGPIX[®] System (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at the Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of The General University Hospital and of the First Faculty of Medicine of Charles University in Prague. Following this premixed magnetic bead kits were used for plasma sample analysis: LXSAM-07 (this set included: sVCAM1 (BR57), VEGF-A (BR26), LXSAM-08 (this set included: Angiopoietin-2 (BR26), Endothelin-1 (BR76), sICAM1 (BR61), sMadCAM1 (BR33) (Biotechne R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) and Milliplex MAP human soluble receptor magnetic bead panel (HSCRMAG-32K-02: sVEGFR1) and cardiovascular disease (CVD) magnetic bead panel (HCVD1MAG-67K-01: Endocan /ESM1) (Merck).

Isolation and measurement of microvesicles

Plasma cell membrane-derived microvesicles were isolated by centrifugation of stored platelet free sample aliquots at 21,000g for 10 min. The total microvesicle count and number of surface antigen-specific microvesicles was determined by flow cytometry (BD FACS Cantoll; BD Biosciences, San Jose, CA). The plasma microvesicles were identified based on size discrimination and Annexin-V-FITC (Apronex s.r.o., Vestec, Czech Republic) labeling. Cell origin of microvesicles was determined using lineage specific antigen labeling with Platelet and endothelial cell adhesion

molecule /PECAM1/CD31-BV510 (BD Biosciences), Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule /MadCAM1-APC (Biotechne R&D Systems), Vascular cell adhesion molecule /VCAM1/CD106-PE, Endothelial protein C receptor /EPCR/CD201-PE, Intercellular adhesion molecule 1 /ICAM1/CD54-Pacific Blue as published previously by the authors [22].

Flow cytometry setup

The forward (FSC) and side scatter (SSC) was adjusted using polystyrene latex and silica bead mixture of defined sizes ApogeeMix (Apogee flow systems, Hemel Hempstead, UK). ApogeeMix contains aqueous mixture of plastic spheres with diameters 180 nm, 240 nm, 300 nm, 590 nm, 880 nm and 1300 nm with refractive index $n = 1.43$ (silica), and 110 nm and 500 nm green fluorescent beads with refractive index $n = 1.59$ (latex). We were able to discriminate bead size based on FSC and SSC between 300 nm and 1000 nm. Data analysis was performed from 20 000 counted events using FACS BD Diva Acquisition and analysis software. The results were expressed as number of microvesicles per microliter (MV/ μ l) of plasma calculated based on the input volume of plasma and cytometer flow rate [22].

Statistical analysis

GraphPad-Prism5 system (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for data analysis. The Mann-Whitney *U* test was performed to determine the statistical significance between the groups or paired Student *t*-test was used to analyze paired samples. All statistical tests are based on a significance level of $P < 0.05$.

Results

The study group consisted of 59 term healthy newborns and their mothers. Spontaneous group (newborns after spontaneous vaginal delivery, $n = 39$) and Elective group (newborns after elective cesarean section, $n = 20$). Table 1 reveals the neonatal characteristics of the study groups. There were no significant differences in birth weight, gender and Apgar scores among groups. Gestational age of the Elective group (mean 38.7 weeks) was significantly lower than the Spontaneous group (mean 39.7 weeks; $P = 0.0002$).

Plasma concentrations of soluble endothelial markers in cord blood and neonatal samples in different subgroups of patients are shown in Table 2.

Cord blood plasma concentrations of sVEGFR1, Endothelin-1 and sVCAM1 were significantly higher in the Spontaneous compared to the Elective group; concentrations of VEGF were significantly lower.

Neonatal blood concentrations of measured molecules showed no differences between groups, with the exception of Endocan, which was significantly higher in Elective group compared to Spontaneous group ($p = 0.021$).

Table 1
Characteristics of the newborns from Spontaneous and Elective groups.

Patients	Spontaneous group	Elective group	P value
Number	39	20	
Birth weight (grams)	3444 (79)	3309 (101)	0.2555
Gestational age (weeks)	39.7 (0.2)	38.7 (0.2)	0.0002
Male	19 (49 %)	12 (60 %)	0.5585
Apgar at 1 min	8.6 (0.4)	9.1 (0.3)	0.7584
Apgar at 5 min	9.3 (0.2)	9.8 (0.1)	0.4520
Apgar at 10 min	9.6 (1.3)	9.9 (0.2)	0.6624

Data presented as mean (SEM), or number (%).

In Spontaneous group, five markers (sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, sICAM1) were significantly higher in neonatal blood compared to cord blood. Endothelin-1 and sVCAM1 were significantly lower in neonatal compared to cord blood.

In Elective group, six markers (sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, sICAM1, sMadCAM1) showed significant changes in plasma concentrations, all increased in neonatal blood compared to cord blood.

Fig. 1 shows plasma concentrations of cord blood total (Annexin-V positive) and endothelium specific microvesicles. PECAM1/CD31 positive, ICAM1/CD54 positive, and EPCR/CD201 positive microvesicles were significantly higher in Spontaneous compared to Elective group ($P = 0.026$; $P = 0.004$; $P = 0.033$, respectively). There were no other significant differences between subgroups found in cord blood microvesicles. In neonatal blood samples, concentrations of Annexin-V positive microvesicles (total microvesicles) and endothelium specific microvesicles were not different between groups (Fig. 2).

Comment

This study focuses on release of different inflammatory markers (soluble markers of endothelial activation and cell-membrane derived endothelium specific microvesicles) during different modes of delivery. When selecting the groups of mothers and their newborns, we focused on pregnancies without pathologies, which might influence concentrations of inflammatory and endothelial markers regardless of the mode of delivery. Pre-eclampsia, maternal and neonatal infection, altered postnatal adaptation or neonatal intensive care stay were set as exclusion criteria. The only parameter, which showed a statistically significant difference among study groups, was gestational age. This was lower in the Elective group compared to the Spontaneous group. Elective cesarean sections are usually planned and done before the spontaneous onset of labor, therefore differences in gestational age found in our study (lower gestational age in pregnancies with elective cesarean sections) can be expected and are within the range of term delivery [23].

Cord blood characteristics of endothelial activation and inflammation showed increased concentration of different soluble endothelial markers and cell-membrane derived endothelium specific microvesicles in spontaneous deliveries compared to cesarean section. This finding is in agreement with the results of other studies showing that spontaneous delivery is accompanied or triggered by inflammatory response mediated by activation of different complex mechanisms including endothelial cells [3,11,12,24]. VEGF was the only marker significantly lower in the Spontaneous compared to Elective group. This may possibly be explained by the fact that VEGF is the only measured marker which is not produced by endothelial cells and therefore its production is not induced by endothelial activation [25]. Elective cesarean section is an example of delivery mode not triggered by intrinsic natural signals. Therefore, in elective cesarean section an intensive prolonged inflammatory/endothelial activation before or during delivery is not expected. The same pattern (increase in endothelial markers in spontaneous delivery) was not confirmed in neonatal samples taken on the third day of life. The only changes in neonatal blood markers were in Endocan (significantly higher in cesarean section). This increase might be explained by several mechanisms including inflammatory reaction of unprepared fetus to the cesarean delivery, or changes of neonatal immune response due to changes of microbiota in newborns after cesarean section [24,26].

The changes and differences between cord blood and neonatal blood within each group of patients were assessed in the second part of the study. Most of the soluble markers, namely sVEGFR1,

Table 2
Plasma concentrations of endothelial markers in cord blood and neonatal blood.

Endothelial markers	Spontaneous Group [ng/mL]		Elective Group [ng/mL]		P value Spontaneous vs. Elective
sVEGFR1	P = 0.0003		P = 0.0095		
cord	2402	(254)	1468	(382)	0.007
neonatal	3280	(313)	2524	(232)	0.445
Endocan	P = 0.0066		P = 0.0022		
cord	1380	(814)	1652	(154)	0.167
neonatal	1887	(141)	2450	(225)	0.021
Angiopoietin-2	P < 0.0001		P < 0.0001		
cord	4263	(201)	3714	(202)	0.101
neonatal	6270	(427)	5945	(473)	0.495
VEGF	P < 0.0001		P = 0.0034		
cord	10.5	(2.2)	16.6	(3.5)	0.041
neonatal	83.3	(9.8)	106.9	(22.4)	0.624
Endothelin-1	P < 0.0001		P = 0.7561		
cord	18.4	(1.3)	11.9	(1.6)	0.008
neonatal	3.9	(0.7)	9.5	(2.8)	0.072
sVCAM1	P < 0.0001		P = 0.5421		
cord	6426	(644)	3635	(351)	0.001
neonatal	3784	(443)	4045	(798)	0.864
sICAM1	P < 0.0001		P < 0.0001		
cord	191,210	(41,621)	175,459	(43,564)	0.767
neonatal	310,445	(54,656)	242,194	(23,948)	0.646
sMadCAM1	P = 0.6437		P = 0.0016		
cord	226,329	(5886)	229,547	(8391)	0.765
neonatal	232,149	(12,276)	256,846	(9452)	0.174

Data presented as mean (SEM), P values reflecting statistical significance between cord blood and neonatal blood concentrations of soluble endothelial markers are situated above the mean values.

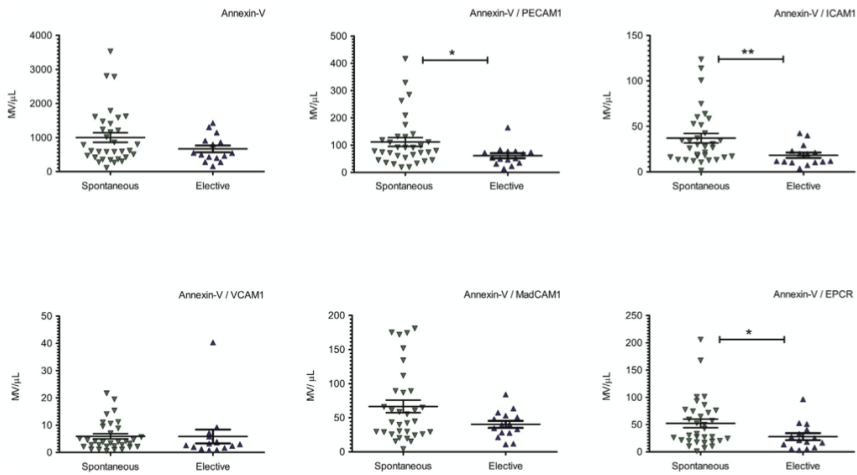


Fig. 1. Plasma concentrations of cord blood endothelium specific microvesicles in Spontaneous and Elective groups of patients. Data presented as mean (SEM), *P < 0.05, **P < 0.01.

Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, and sICAM1 in the Spontaneous group and sVEGFR1, Endocan, Angiopoietin-2, VEGF, sICAM1, and sMadCAM1 in the Elective group were significantly increased in neonatal blood compared to cord blood. These findings are in agreement with the results of previous studies focused on selected soluble inflammatory and endothelial markers in cord blood and in newborns reflecting the normal increase in activity of the endothelial cells after delivery [12]. Endothelial cells participate or possibly initiate natural inflammatory reaction which is a part of the activation of innate immunity identified in term neonates shortly after term delivery [26,27]. Increased levels of endothelial

markers including microvesicles in newborns compared to cord blood may also reflect the cardiovascular transition following birth. The transition process is associated with activation and remodeling of endothelial cells, especially in the pulmonary system [28].

Two markers (Endothelin-1 and sVCAM1) were significantly decreased in neonatal blood in the Spontaneous group. These molecules may reflect endogenous changes associated with initiation of delivery, therefore decreasing in neonatal blood within several hours to days following delivery.

We can only speculate about the patterns of cord blood and neonatal blood microvesicle release in different subgroups of

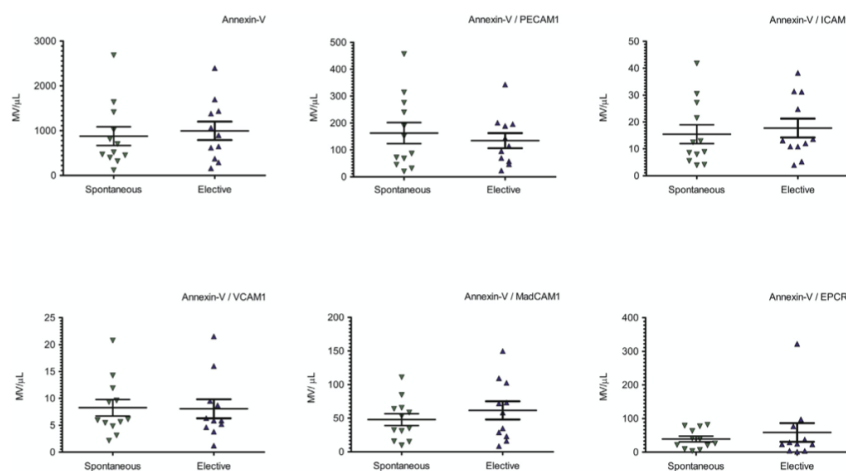


Fig. 2. Plasma concentrations of neonatal blood endothelium specific microvesicles in Spontaneous and Elective groups of patients. Data presented as mean (SEM), * $P < 0.05$.

patients, as there are currently no data available regarding endothelial microvesicle release in healthy term newborns after different modes of delivery.

Our findings may set the basis for the understanding of physiological activation of endothelium during and following delivery. The mode of delivery should be considered when interpreting biomarkers of inflammation in neonates after delivery and when adding new biomarkers to the diagnostic panel of neonatal inflammatory conditions.

Conclusion

We found increased concentrations of cord blood soluble endothelial markers and cell-membrane derived endothelium specific microvesicles after spontaneous vaginal delivery compared to cesarean section. Increased cord blood concentrations of endothelial markers and microvesicles in spontaneous delivery may reflect the natural activation of blood cells and vasculature including endothelial cells associated with the initiation of labor. Following the delivery, most of the measured soluble markers increased in both groups of patients, as a possible consequence of activation of the innate immunity of the newborn by quantity of exogenous stimuli. This is so far the first study describing the concentrations of cord blood and neonatal endothelial microvesicles together with soluble plasma endothelial markers in different modes of delivery.

Author contributions

J.J. and J.Z. contributed equally.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This work is supported by the grants from the Czech Health Research Council Agency, Ministry of Health of the Czech Republic

[grant number 16-27800A and NU20-07-00109]; Medical and Research Program, Ministry of Health, Czech Republic, MH CZ - DRO Thomayer Hospital [grant number TN 0064190]. The authors would like to like to acknowledge Alena Louzecka and Renata Pavlovicova for the excellent technical assistance.

References

- [1] Sibikova M, Zivny J, Janota J. Cell membrane-derived microvesicles in systemic inflammatory response. *Folia Biol* 2018;64:113–24.
- [2] Genc MR, Ford CE. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22:116–21.
- [3] Unal ER, Cierny JT, Roedner C, Newman R, Goetzl L. Maternal inflammation in spontaneous term labor. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:223–5.
- [4] Herrera CA, Stoerker J, Carlquist J, et al. Cell-free DNA, inflammation, and the initiation of spontaneous term labor. *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:583–3.
- [5] Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011;16:11–21.
- [6] Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 2008;60:139–43.
- [7] D'Alquen D, Kramer BW, Seidenspinner S, et al. Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis. *Pediatr Res* 2005;57:263–9.
- [8] Masoura S, Kalogiannidis I, Makedou K, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;175:119–23.
- [9] Verlohren S, Perschel FH, Thilaganathan B, et al. Angiogenic markers and cardiovascular indices in the prediction of hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertension* 2017;69:1192–7.
- [10] Troncoso F, Acurio J, Herlitz K, et al. Gestational diabetes mellitus is associated with increased pro-migratory activation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and reduced expression of vascular endothelial growth factor receptor 1. *PLoS One* 2017;12:e0182509. doi:10.1371/journal.pone.0182509.
- [11] Aksoy M, Aksoy AN, Laloglu E, Dostbil A, MGI Celik. Umbilical cord blood endocan levels according to the delivery mode. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015;42:776–80.
- [12] Malamitsi-Puchner A, Tziotis J, Protonotariou E, Xymi K, Sarandakou A, Creatsas G. Angiogenic factors in the perinatal period: diversity in biological functions reflected in their serum concentrations soon after birth. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:169–73.
- [13] Freyssonet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1655–62.
- [14] Vitkova V, Zivny J, Janota J. Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes. *Biomark Med* 2018;12:161–75.

- [15] Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004;125:804–13.
- [16] Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Circulating microparticles in umbilical cord blood in normal pregnancy and pregnancy with preeclampsia. *Thromb Res* 2015;136:427–31.
- [17] Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem* 2013;59:1166–74.
- [18] Radu CM, Campello E, Spiezia L, et al. Origin and levels of circulating microparticles in normal pregnancy. A longitudinal observation in healthy women. *J Clin Lab Invest* 2015;75:487–95.
- [19] Uszynski M, Zekanowska E, Uszynski W, Kuczynski J, Zylinski A. Microparticles (MPs), tissue factor (TF) and tissue factor inhibitor (TFPI) in cord blood plasma. A preliminary study and literature survey of procoagulant properties of MPs. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;158:37–41.
- [20] Awad HA, Tantawy AA, El-Farrash RA, Ismail EA, Youssif NM. CD144+ endothelial microparticles as a marker of endothelial injury in neonatal ABO blood group incompatibility. *Blood Transfus* 2014;12:250–9.
- [21] Tan Z, Yuan Y, Chen S. Plasma endothelial microparticles, TNF- α and IL-6 in Kawasaki disease. *Indian Pediatr* 2013;50:501–3.
- [22] Vitkova V, Panek M, Janec P, et al. endothelial microvesicles and soluble markers of endothelial injury in critically ill newborns. *Mediators Inflamm* 2018;1975056, doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2018/1975056>.
- [23] Kolas T, Saugstad OD, Daltveit AK, Nilsen ST, Oian P. Planned cesarean versus planned vaginal delivery at term: comparison of newborn infant outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1538–43.
- [24] Laforgia N, Difonzo I, Altomare M, Mautone A. Cord blood endothelin-1 and perinatal asphyxia. *Acta Paediatr* 2001;90:351–2.
- [25] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9–22.
- [26] Shao Z, Forster SC, Tsiliki E, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* 2019;574:117–21.
- [27] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11971–5.
- [28] Wojciak-Stothard B, Haworth SG. Perinatal changes in pulmonary vascular endothelial function. *Pharmacol Ther* 2006;109:78–91.