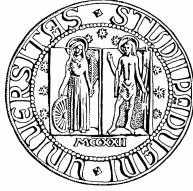


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI FARMACOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA  
TERAPIA RIANIMATIVA E INTENSIVA  
XX CICLO

**PATOLOGIA EMOCOAGULATIVA  
E SUO TRATTAMENTO IN CORSO DI SEPSI**

COORDINATORE: CH.MA PROF. ROSA MARIA GAION  
SUPERVISORE : CH.MO PROF. G.P. GIRON

DOTTORANDA: SABRINA BORASO

31 Gennaio 2008



**PATOLOGIA EMOCOAGULATIVA  
E SUO TRATTAMENTO IN CORSO DI SEPSI**





## INDICE

	<b>Riassunto</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Introduzione</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Alterazioni della coagulazione in corso di Sepsi</b>	
	<b>2.1 Emostasi primaria</b>	<b>11</b>
	<b>2.1.1 Piastrinopenia e piastrinopatia</b>	
	<b>2.2 Attivazione secondaria dell'emostasi</b>	<b>13</b>
	<b>2.3 Stato di ipercoagulabilità</b>	<b>13</b>
	<b>2.4 Ruolo dell'endotelio</b>	<b>14</b>
	<b>2.5 Microparticles con proprietà procoagulanti</b>	<b>17</b>
	<b>2.6 Riduzione degli anticoagulanti naturali</b>	<b>18</b>
	<b>2.7 Cascata coagulativa</b>	<b>19</b>
	<b>2.8. Fibrinolisi</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Manifestazioni cliniche</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>22</b>
<b>5.</b>	<b>Dove possiamo agire?</b>	<b>27</b>
	<b>a. Proteina C</b>	<b>29</b>
	<b>b. EPCR</b>	<b>39</b>
	<b>c. ATIII</b>	<b>40</b>
	<b>d. rTFPI</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>Trattamento della patologia emocoagulativa</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>Modelli di sepsi</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Nostra esperienza</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Premessa al progetto di lavoro</b>	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>VWF</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>ADAMTS13</b>	<b>72</b>
<b>12.</b>	<b>Obiettivo di studio</b>	<b>75</b>
<b>13.</b>	<b>Risultati</b>	<b>77</b>
<b>14.</b>	<b>Discussione</b>	<b>84</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>85</b>

## RIASSUNTO

La risposta dell'ospite nei confronti di un'infezione prevede il coinvolgimento sia di mediatori solubili (mediatori di flogosi e della cascata coagulativa), sia di cellule (monociti, neutrofilo, cellule endoteliali e piastrine). Tale risposta è un continuum di reazioni a catena complesse e ben organizzate che hanno come obiettivo l'eliminazione del patogeno e la restitutio ad integrum dell'ospite. Tuttavia qualora la risposta fosse esponenziale aberrante e sfuggisse ai meccanismi regolatori ne deriverebbe un'aggressione devastante nei confronti dell'ospite stesso, che porta in ultima analisi all'insufficienza d'organo.

In corso di sepsi grave o di shock settico accade proprio questo così si assiste a un'attivazione anomala sia della cascata coagulativa sia di quella flogistica. Infatti i monociti si attivano in modo aberrante e l'endotelio amplifica e perpetua questo processo che inizia come meccanismo di difesa nei confronti del patogeno ma finisce con l'essere una vera e propria aggressione nei confronti dell'ospite (effetto collaterale).

Infiammazione e coagulazione giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia vascolare. Il cross-talk tra questi due sistemi non implica soltanto che la flogosi attivi la cascata coagulativa; ma anche che la coagulazione agisca sul processo flogistico.

Nella sepsi grave i monociti circolanti stimolati dalle citochine esprimono il TF che comporta l'attivazione della cascata coagulativa. La relazione tra citochine /emostasi si evince dai dati ottenuti dagli studi negli scimpanzé dove si è osservato che gli anticorpi monoclonali anti IL6 portano ad una completa abrogazione della coagulazione endotossina-indotta.

Nella pratica clinica nel paziente settico si assiste a una condizione di piastrinopenia associata generalmente ad uno stato di ipercoagulabilità.

Le alterazioni dell'assetto coagulativo sono correlate all'attivazione primaria e secondaria dell'emostasi.

L'attivazione primaria della emostasi nella sepsi è associata a trombocitopenia con un'incidenza variabile dal 35% al 60%.

L'interazione tra leucociti attivati e cellule endoteliali porta ad un sequestro piastrinico, quindi ad un'aumentata distruzione (trombocitopenia da consumo) dovuta all'attivazione piastrinica. Le rimanenti piastrine invece vengono attivate come risposta all'evento settico: rilasciano mediatori della flogosi e partecipano al processo di flogosi stesso.

Le PTL pertanto, dimostrerebbero una diminuita aggregabilità e un aumentato rilascio di VEGF e ciò testimonia che nella sepsi, anche non complicata, vi è un'alterazione della funzione piastrinica, presente anche in assenza di altre anomalie coagulative. A dispetto della gravità della sepsi le PTL mantengono le normali molecole di adesione e quindi la loro funzione di adesione sembra conservata.

L'attivazione secondaria dell'emostasi si manifesta con un incremento dei livelli in circolo dei D-dimeri con una diminuzione della PC che riguarda il 90% dei pazienti settici e una riduzione della ATIII che riguarda più della metà dei pazienti settici infine in una percentuale variabile dal 15% al 30% con DIC conclamata.

L'ipercoagulabilità è il risultato dello slittamento dell'omeostasi coagulativa verso uno stato procoagulante ovvero verso l'attivazione piastrinica, l'attivazione della cascata coagulativa, e la soppressione dei fattori anticoagulanti naturali. Questo porta a formazione di trombina, quindi depositi di fibrina, consumo dei fattori della coagulazione e in casi estremi a DIC.

In corso si sepsi Cambiamenti della cascata coagulativa così come il sistema fibrinolitico sono stato lungamente studiati.

Molto meno è noto il ruolo e il contributo del VWF .

In condizioni fisiologiche, le cellule endoteliali inibiscono la coagulazione, prevengono l'aggregazione piastrinica , così come la aderenza e la migrazione delle cellule ematiche, regolano il tono vascolare e la vasopermeabilità. Il danno o l'attivazione delle cellule endoteliali a mezzo di citochine o di altri mediatori flogistici portano a imponenti alterazioni funzionali endoteliali.

Questi cambiamenti trasformano l'endotelio da una superficie anticoagulante in una superficie procoagulante. Alcuni studi dimostrerebbero come condizioni flogistiche possano favorire lo sviluppo di porpora trombotica trombocitopenica (TTP), attraverso l'aumento in circolo di citochine infiammatorie (IL6, IL8 TNF $\alpha$ ) che sembrano stimolare il rilascio di ultralarge von Willebrand Factor (ULVWF) e determinare una insufficiente proteolisi di VWF da parte dell'ADAMTS 13.

Recenti studi suggeriscono che le citochine infiammatorie possano stimolare il rilascio di ULVWF (IL8 e TNF $\alpha$ ) e inibire il clivaggio di ULVWF (IL6) portando ad un accumulo di ULVWF nel plasma e nella superficie delle cellule endoteliali per indurre aggregazione piastrinica ed adesione.

Lo studio della fisiopatologia del processo settico con particolare riferimento al cross-talk tra emostasi e flogosi è necessario per poter migliorare le strategie terapeutiche in corso di sepsi.

L'unico farmaco attualmente raccomandato dalla Surviving Sepsis Campaign nel paziente con sepsi grave o con shock settico associato ad almeno due insufficienze d'organo, che agisce sull'assetto emocoagulativo slittato in senso procoagulante è la proteina C attivata ricombinante, come dimostrato dallo studio PROWES . Altri farmaci come la AIII, TFPI si sono dimostrati non efficaci nel ridurre la mortalità .

Nel corso del dottorato di ricerca ho valutato i pazienti trattati con Proteina c attivata.

Negli ultimi due anni invece il mio interesse si è spostato sulla ricerca di meccanismi fisiopatologici che possano contribuire a potenziare gli eventi trombotici scatenati dall'aberrante attivazione della cascata coagulativa. A questo fine la mia attività di ricerca è spostata sullo studio del VWF.

Dal momento che nella flogosi si riscontrano livelli elevati di VWF è concettualmente ipotizzabile che nei pazienti con grave sepsi o in shock settico vi sia una normale o moderatamente depressa attività dell'ADAMTS13 potenzialmente non sufficiente a controllare i multimeri del VWF. Interessante poi è la valutazione del rapporto tra livelli di VWF e piastrine.

Da questo studio si evince come i livelli di VWF:Ag e VWF:CBA siano molto elevati e tendono a rimanere tali per tutto il periodo di valutazione (28 giorni dalla diagnosi di sepsi grave, shock settico) anche se al dosaggio del 21° e 28° giorno si assiste ad una flessione di tali livelli che rimangono però ancora estremamente alti.

I risultati da noi ottenuti sono eterogenei

Il primo paziente, che ha presentato livelli di VWF molto alti è sopravvissuto a 28 giorni, tuttavia ne è residua un'insufficienza renale cronica che abbisogna di sostituzione della funzionalità renale con dialisi e una insufficienza di circolo che ne richiede il continuo sostegno emodinamico. In questo primo paziente a differenza degli altri 2 abbiamo notato piastrinopenia in accordo con gli alti dosaggi di VWF , mentre negli altri 2 pazienti abbiamo sorprendentemente riscontrato una conta piastrinica ancora in range che si è mantenuta tale per tutto il tempo di valutazione. In uno di questi 2 pazienti il livelli di VWF restavano alti per buona parte del controllo, in un altro abbiamo riscontrato livelli superiori alla normalità ma non così elevati nei due casi precedenti. I risultati da noi ottenuti appaiono interessanti. Sembra esserci infatti una correlazione tra livelli di VWF e prognosi clinica in quanto il paziente con i più alti livelli di VWF è ancora a distanza di circa 3 mesi ricoverato in terapia intensiva, mentre il secondo paziente è stato dimesso, il terzo è ancora in osservazione ma clinicamente le sue funzioni vitali stanno migliorando . Altro dato per noi molto interessante perché sorprendente è la assenza di piastrinopenia nonostante alterati livelli di vWF



negli altri 2 pazienti. Infatti noi ci saremmo aspettati piastrinopenia in associazione con alti livelli di vWF.

Altro dato significativo: nei primi due pazienti ma in modo esponenziale nel primo anche le IL6 e IL8 e il TNF $\alpha$  sono risultate elevate. Non sono disponibili ancora i dati del terzo paziente.

Noi tuttavia, siamo ancora in attesa dei risultati e dei multimeri, del propeptide del VWF

Il propeptide infatti è un importante marker della clearance del VWF utile per capire se i livelli alti di VWF sono tali perché l'endotelio va incontro ad uno stimolo continuo, oppure se è il risultato di una ridotta clearance della molecola. Quello che notiamo da questi dati preliminari è che comunque il VWF rimane molto elevato per tutto il periodo di osservazione, nonostante riduzione dei livelli di citochine, che rimangono comunque anch'esse alterate per il periodo di studio, e che alti livelli di VWF non si accompagnano sempre a piastrinopenia.

#### Summary

The host response to infection involves soluble mediators ( components of flogosis, clotting factors) and cells(platelets, endothelial cells and monocites) and is a continuum of complex and very organized chain reactions that have as objective the elimination of pathogenic threat, and the restitution ad integrum of the host.

However if the response is excessive, the host response turn on its bearer and causes the organ dysfunction.

In sepsis there is a strong cross-talk between flogosis and coagulation.

In septic patients the primary activation of haemostasis is associated to thrombocytopenia with a variable incidence from 36%-60%.

There is an attenuation of anticoagulant mechanism, including P C; AT, and the fibrinolytic way.

In patients affected by two organ failure septic shock, the recommended therapy comprise the use of activated recombinant protein c. We analyzed the effect of activated recombinant protein c in a limited group of patients in ICU on coagulation cascade. In particular we studied coagulation parameter variation of septic patients. Despite a deep knowledge on coagulation cascade, poor information are available on VWF role on septic coagulation modifications.

Four patients were enrolled in our study that lasted 28 days.

Our study suggest that high VWF:Ag e VWF:CBA levels remain elevated during all the period evaluated. Moreover thrombocytopenia is not correlated to VWF levels. Clinical features are quite different from Moskowitz Syndrome characterized by platelets number decrease associated with high molecular weights consumption as cause-effect.

VWF level trend probably correlates with endothelium injury. In fact we can assume that persistent high levels of VWF confirm a continuous and severe endothelium injury causing a multiorgan failure. VWF dosage trend may be an important prognostic index.

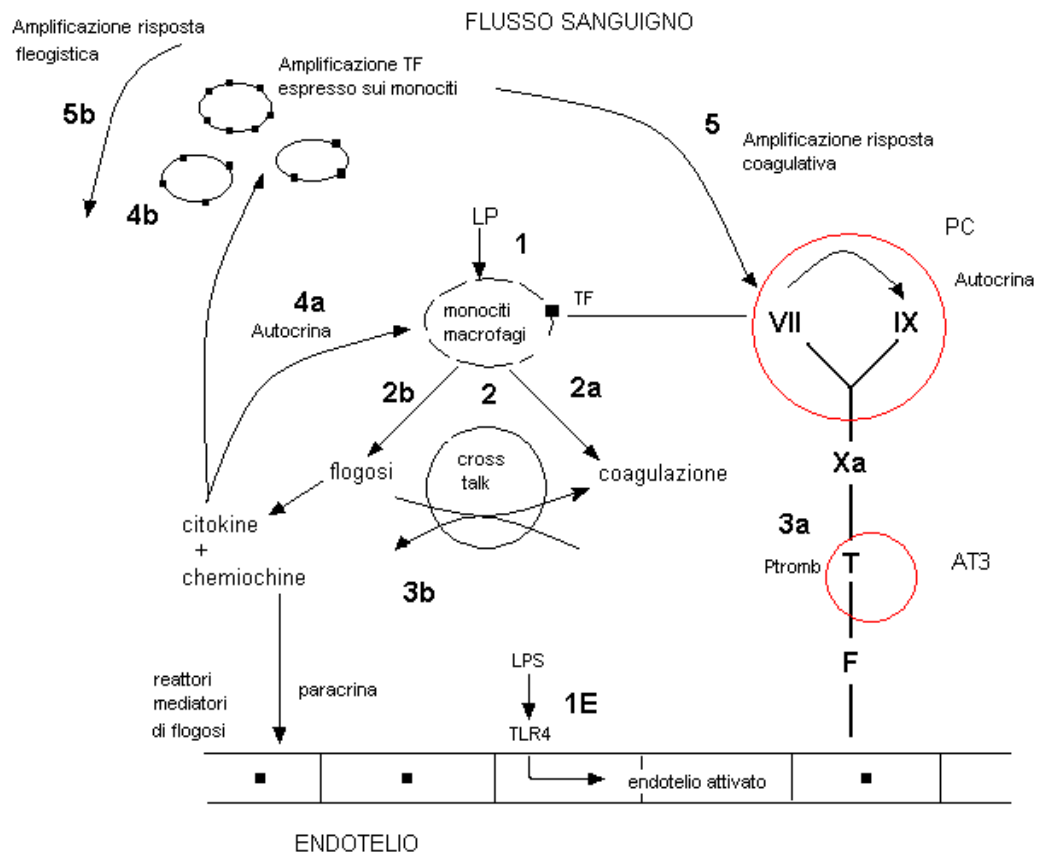
Future improvements may include propeptide and ADAMTS13 dosage, though VWF multimers distribution does not seem to be well-matched with significant deficits of this metalloproteasi.

# 1. INTRODUZIONE

La risposta dell'ospite nei confronti di un'infezione prevede il coinvolgimento sia di mediatori solubili (mediatori di flogosi e della cascata coagulativa), sia di cellule (monociti, neutrofilo, cellule endoteliali e piastrine) (1) Tale risposta è un continuum di reazioni a catena complesse e ben organizzate che hanno come obiettivo l'eliminazione del patogeno e la restituito ad integrum dell'ospite. Tuttavia qualora la risposta fosse esponenziale aberrante e sfuggisse ai meccanismi regolatori ne deriverebbe un'aggressione devastante nei confronti dell'ospite stesso, che porta in ultima analisi all'insufficienza d'organo.

In corso di sepsi grave o di shock settico accade proprio questo ovvero si assiste a un'attivazione anomala sia della cascata coagulativa sia di quella flogistica. Infatti i monociti si attivano in modo aberrante e l'endotelio amplifica e perpetua questo processo che inizia come meccanismo di difesa nei confronti del patogeno ma finisce con l'essere una vera e propria aggressione nei confronti dell'ospite (effetto collaterale).





I monociti circolanti si legano al LPS e pertanto attivano e la cascata coagulativa e quella flogistica. Ogni componente della via partecipa in modo paracrino ed autacrino. Anche l'endotelio ne risulta attivato. Le citochine che intervengono in questo processo sono: IL-6, IL-1, IP-10 ed altre

## 2. ALTERAZIONI DELLA COAGULAZIONE IN CORSO DI SEPSI

Nella pratica clinica nel paziente settico si assiste a una condizione di **piastrinopenia** associata però generalmente ad uno stato di **ipercoagulabilità**.

Le alterazioni dell'assetto coagulativo sono correlate all'attivazione primaria e secondaria dell'emostasi.

### 2.1 ATTIVAZIONE PRIMARIA DELL'EMOSTASI

L'attivazione primaria della emostasi nella sepsi è associata a trombocitopenia(2) con un'incidenza variabile dal 35% al 60%.

#### 2.1.1. PIASTRINOPENIA E PIASTRINOPATIA

Le cause sono molteplici:

- 1) pseudotrombocitopenia (3)
- 2) meccanismi immuno-mediati (4)
- 3) ematofagocitosi (5) ◀
- 4) adesione delle piastrine all'endotelio (5)
- 5) consumo in corso di DIC (6)
- 6) HIT o trombocitopenia eparina-indotta (7)▲
- 7) diluizione nei pazienti sottoposti a trasfusioni massiva

◀Consiste in una fagocitosi attiva dei megacariociti ed altre cellule emopoietiche da parte dei monociti e macrofagi determinata dal rilascio di M-CSF (Macrophage colony-stimulation factors) che è tipico della sepsi.

▲HIT è causata da Ig contro complesso eparina FP4. L'onset varia da 1 a 33 giorni dalla somministrazione di eparina. L'incidenza è di 1-3% , il tromboembolismo 0,3-0,4% ed è questa la maggiore complicanza in quanto causa TVP, IMA; trombosi dei vasi renali. La maggior parte dei casi letali di HIT porta a emboli polmonari massivi e trombosi all'aorta

La trombocitopenia è associata ad un' aumentata mortalità (8) e si manifesta generalmente nel giro poche ore (9) ed entro 4 giorni dal ricovero in UTI (10). Sorprendentemente vi è una riduzione piuttosto marcata delle PTL nonostante, nel settico, vi siano, in circolo, alti livelli di citochine proflogistiche, che ne stimolano in realtà la produzione come il TNF $\alpha$  e IL6 e la presenza di alte concentrazioni di trombopoietina.

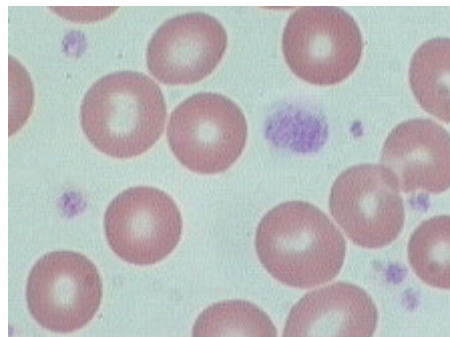
**L'interazione tra leucociti attivati e cellule endoteliali porta ad un sequestro piastrinico, quindi ad un' aumentata distruzione (trombocitopenia da consumo) dovuta all'attivazione piastrinica. Le rimanenti piastrine invece vengono attivate come risposta all'evento settico: rilasciano mediatori della flogosi e partecipano al processo di flogosi stesso (11).**

E' evidente che non solo una causa di piastrinopenia non esclude l'altra, ma spesso, la trombocitopenia è correlata ad un' associazione di cause, nel paziente con sepsi grave o shock settico. Non si trascurino poi quelle condizioni di piastrinopenia già preesistenti allo stato settico che hanno il loro peso nella pratica clinica, o quelle cause di distruzione meccanica o consumo in corso di sostituzione della funzionalità renale (CVVH, CVVHDF, etc.). Infine debbono essere ricordati i farmaci con azione piastrinopenica esempio: penicilline che allungano il tempo di sanguinamento e testimoniano il loro ruolo nell'alterazione dell'aggregazione piastrinica.

## Funzione piastrinica nella sepsi

La funzione piastrinica comprende:

- 1) adesione
- 2) aggregazione
- 3) secrezione
- 4) attività procoagulante
- 5) induzione dei fattori di crescita vascolare



In uno studio elegante di Yagushi (12) si evince che la funzione secretoria delle PTL è preservata ma il contenuto dei granuli  $\alpha$  è alterato. Questi cambiamenti sembrano correlati alla gravità della sepsi e non alla produzione di trombina (la trombina è il più potente attivatore delle PTL in vivo).

Dal momento poi, che le PTL sono prive di nucleo è evidente che questi mutamenti avvengono a livello dei megacariociti, verosimilmente come risposta all'evento flogistico. È stata osservata una riduzione della aggregazione piastrinica agonista- indotta in pazienti con shock settico. (Cowan et al. *Jama* 1976;235:12030-4). La citometria conferma il difetto di aggregazione dimostrando concomitanti alterazioni nei mutamenti conformazionali della integrina GPIIb/IIIa con diminuita avidità per Ig PAC-1 e il legame col fibrinogeno. (12).

**Le PTL pertanto, dimostrerebbero una diminuita aggregabilità e un aumentato rilascio di VEGF e ciò testimonia che nella sepsi, anche non complicata, vi è un'alterazione della funzione piastrinica, presente anche in assenza di altre anomalie coagulative.** Infatti questi mutamenti sono osservabili anche in caso di normale conta piastrinica e/o con un basso DIC score e sono indipendenti dalla generazione di trombina come viene dimostrato misurando i monomeri di fibrina, TAT, F1+2 o ancora indipendente dalla coagulazione come viene dimostrato misurando i livelli dei D-dimeri (12). La riduzione della aggregabilità piastrinica potrebbe inoltre essere spiegabile facendo questa considerazione: le PTL nel settico sarebbero già attivate e quindi sarebbero meno aggregabili; inoltre è molto probabile che queste PTL abbiano un ruolo importante nella generazione di trombina e nella conversione del fibrinogeno in fibrina. Le PTL possono essere attivate direttamente dall'endotossine o dai mediatori pro-flogistici come PAF (PTL-activating-factor). Il rilascio inoltre dei mediatori di flogosi e dei fattori di crescita sono un link importante tra attivazione della cascata coagulativa e flogosi.

**A dispetto della gravità della sepsi le PTL mantengono le normali molecole di adesione e quindi la loro funzione di adesione sembra conservata.**

Infine, la conservazione dei recettori ad alta affinità per il collagene, evidenziato dalla espressione del CD29 e dai recettori per la trombina PAR-1, anche quando l'aggregazione è indotta da questi agonisti, è profondamente alterata suggerendo un difetto a livello della via di trasduzione intracellulare piuttosto che ad una down regulation del recettore di superficie (12).

AA (13) rilevano come le P-selettine (che durante la sepsi sono aumentate) sulla membrana delle PTL non solo mediano l'adesione delle PTL coi leucociti e con le cellule endoteliali ma anche con il TF dei monociti (TF è considerato il trigger principale per l'attivazione della cascata coagulativa). Anche questo ultimo dato conferma il cross-talk tra coagulazione e flogosi.

## **ATTIVAZIONE SECONDARIA DELL'EMOSTASI**

L'attivazione secondaria dell'emostasi si manifesta con un incremento dei livelli in circolo dei D-dimeri (5) con una diminuzione della PC che riguarda il 90% dei pazienti settici (14-15) e una riduzione della ATIII che riguarda più della metà dei pazienti settici (16-17) infine in una % variabile dal 15% al 30% con DIC conclamata (18-19).

### **2.3. LO STATO DI IPERCOAGULABILITA'**

Lo stato di ipercoagulabilità è legato a :

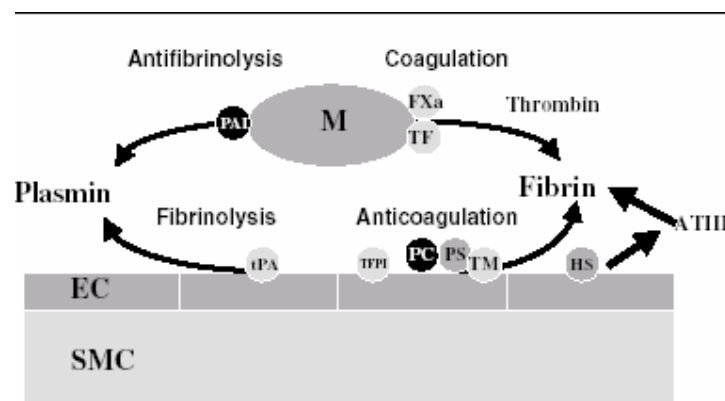
- A) attivazione piastrinica
- B) attivazione dell'endotelio
- C) TF espresso nei monociti ed endotelio
- D) Riduzione degli anticoagulanti naturali
- E) Immobilità
- F) microparticles
- G) Distruzione dell'integrità della parete dei vasi.

**L'ipercoagulabilità è il risultato dello slittamento dell'omeostasi coagulativa verso uno stato procoagulante ovvero verso l'attivazione piastrinica, l'attivazione della cascata coagulativa, e la soppressione dei fattori anticoagulanti naturali. Questo porta a formazione di trombina, quindi depositi di fibrina , consumo dei fattori della coagulazione e in casi estremi a DIC.**

## 24. Ruolo dell'endotelio nell'emostasi

L'endotelio può essere paragonato ad una barriera metabolica attiva con facoltà di ricevere e inviare messaggi cellulari ai tessuti e al circolo (20). Vista la posizione strategica l'endotelio svolge un ruolo chiave nell'emostasi:

- 1) azione anticoagulante (previene l'adesione delle cellule del sangue :leucociti e PTL)
- 2) profibrinolitica.



**Assetto coagulativo e fibrinolitico nell'endotelio non attivato. Nell'endotelio in condizioni fisiologiche è mantenuto un assetto anticoagulante e fibrinolitico (29). EC endotelio, M monociti, HS eparan-solfato, PC proteina C, TM trombomodulina, PS proteina S, TFPI tissue factor protein inhibitor, tPA tissue plasminogen activator**

L'adesione e l'aggregazione delle PTL sarebbe prevenuta da NO e dalla prostaciclina (21). Inoltre l'Eparan-solfato presente sulla matrice extracellulare dell'endotelio migliora la attività inibitoria della ATIII (19). In condizioni fisiologiche le cellule endoteliali sintetizzano ed esprimono il TFPI che inibisce il TF che è il recettore per il fattore VII che a sua volta media la cascata coagulativa. Il complesso TF-VII attiva il fattore IX e X e porta alla generazione di trombina.

Il TFPI agisce formando un complesso quaternario con il TF, Xa e fosfolipidi.

Un altro meccanismo anticoagulante è la presenza sulla superficie delle cellule endoteliali del recettore per la TM (trombomodulina) che si lega alla trombina. La TM+ trombina attiva la PC; e il recettore per la PC (EPCR) stesso è coinvolto nel processo di attivazione della PC.

APC deve dissociarsi dalla ERPC prima di legarsi al cofattore S.

APC +S attraverso il cofattore V e il fattore VII inibiscono la generazione di trombina.

La trombina inibisce se stessa.

La fibrinolisi è un'altra tappa fondamentale della coagulazione ed è indotta dalla trombina attraverso il rilascio di tPA (tissue-plasminogen activator) la cui attività è regolata dal PAI. Il tPA è espresso sulle cellule dell'endotelio.

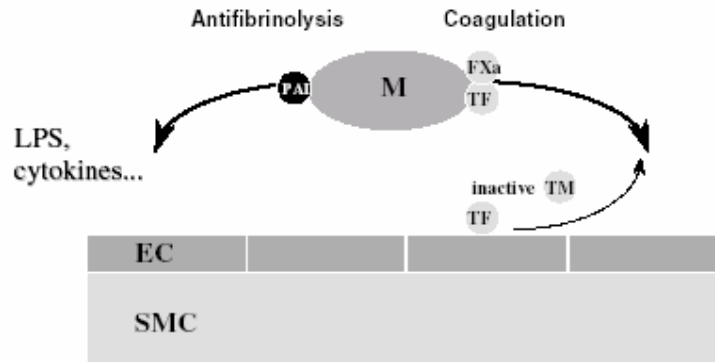
In aggiunta le cellule endoteliali producono urokinasi type plasminogen activator che contribuiscono al fenotipo profibrinolitico.

Nell'endotelio sono presenti dei recettori PAR1 e PAR2 (22). Questi recettori modulano l'angiogenesi, la permeabilità vascolare, l'espressione di P-selettine, rilascio e contrazione dell'endotelio. La trombina, tripsina, APC sono i principali antagonisti dei PAR1 (23).

PAR2 è inattivato dal fattore Xa e VIIa.

## Alterazione dell'endotelio nella Sepsi

Il danno anatomico dell'endotelio durante lo shock settico è stato messo in luce da diversi studi . Endotelio danneggiato contribuisce a favorire le alterazione coagulative sepsi-indotte.



**Assetto Coagulativo fibrinolitico nella Sepsi.** Gli stimoli settici alterano l'endotelio spostando l'assetto coagulativo in senso procoagulante. Le proprietà fibrinolitiche dell'endotelio sono indebolite a causa di un diminuito tPA. Questo avviene in un contesto nel quale, invece, aumenta il PAI-1 con attività antifibrinolitica (29).

Le citochine proflogistiche aumentano la permeabilità dell'endotelio entro 6 dalla flogosi raggiungendo l'acme alla 10-12 h ( 24- 25).La distruzione dell'endotelio consente ai fluidi e alle cellule di passare dal circolo allo spazio interstiziale.

In risposta all'evento flogistico, a mezzo dei mediatori: citochine, l'edotelio si attiva.☼

L'endotelio attivato e danneggiato può essere identificato dai livelli crescenti di marcatori solubili come TM, ICAM-1, E-selettine e von-Willebrand e il suo propeptide.

Seller ( 26 ) nei pazienti settici e nei volontari a cui era stata indotta un'endotossimia, notava un aumento dell'ICAM-1 quale marker potente di attivazione endoteliale; dimostrando una chiara relazione tra livelli elevati di ICAM-1 e MOF e outcome.

Matsukava (27),nei topi in cui veniva provocata una peritonite settica metteva in stretta correlazione morte e livelli elevati di E-selettine e P-selettine.I topi geneticamente modificati, mancanti di selettine erano resistenti alla setticemia.Da questo studio si evince che le selettine mediando il rolling dei leucociti avevano un impatto sulla sopravvivenza dei topi .

In caso di sepsi grave o shock settico anche i livelli di von-Willebrand e del suo propeptide sono molto elevati.

Poiché, durante la sepsi, divengono insufficiente e il rilascio di NO e di prostaciclina, aumenta l'aggregazione dei leucociti e delle PTL e pertanto si aggrava la coagulopatia.

L'attivazione in loco della cascata coagulativa, associata alla risposta autoimmune atta a proteggere dall'insulto, quando è generalizzata porta a deposito di fibrina e ad insufficiente perfusione.

La funzione del microcircolo è fondamentale per un'efficiente disposizione di ossigeno tissutale.

Nella sepsi vi è una *ridotta densità funzionale dei capillari* (ovvero una riduzione dei capillari perfusi) e una riduzione della deformabilità dei globuli rossi, disfunzione delle cellule endoteliali con un aumento aberrante della apoptosi e della permeabilità, alterazione del tono vasale, aumento del numero di neutrofili attivati (28). La diminuzione della perfusione del microcircolo porta ad ischemia ed interviene in quelle complesse reazioni a spirale, che vedono il coinvolgimento della flogosi e del sistema coagulativo, che conducono a MOF:

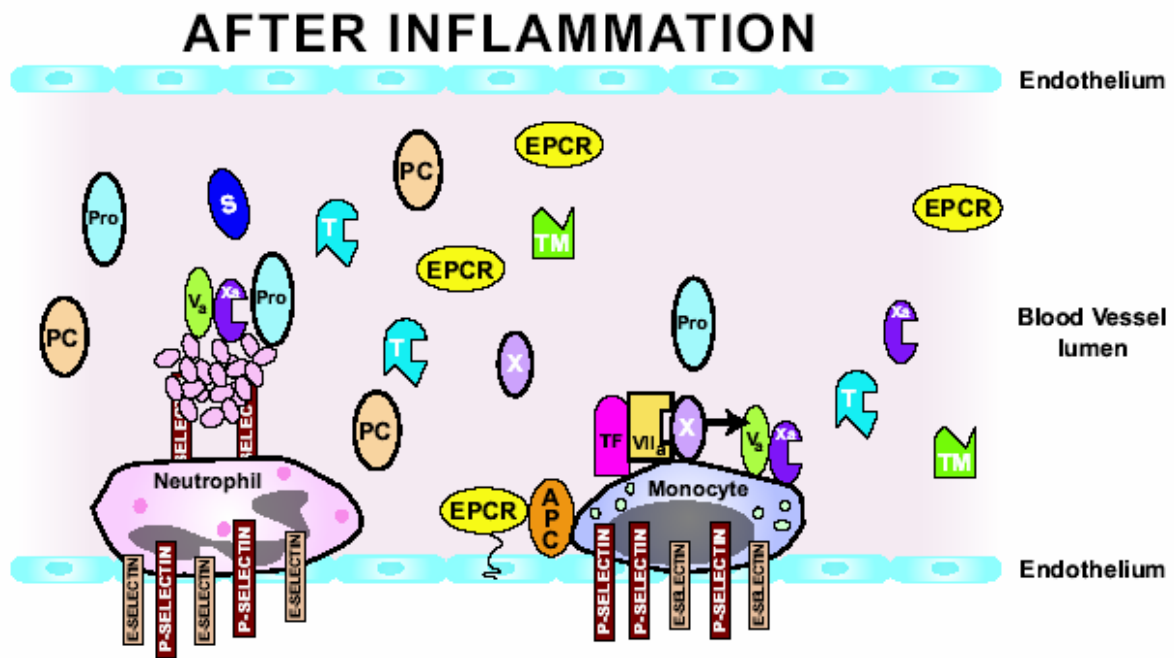
Anche l'endotelio attivato in modo esagerato produce microparticelle con proprietà procoagulante.



☀Attivazione dell'endotelio consiste nella migrazione verso i tessuti di leucociti e monociti. Sia l'adesione che la migrazione sono regolate da interazione di molecole complementari sulla superficie dei polimerfonucleati. I mediatori (citochine) regolano in modo rigoroso: l'espressione, l'avidità di adesione e la modulazione superficiale di queste molecole. Per attivazione dell'endotelio si intende in ultima analisi l'aumento di espressione o il rilascio di molecole di adesione endoteliale.

Attivazione dell'endotelio comprende 3 tappe: (29)

- 1) rolling dei leucociti sull'endotelio. Questo processo coinvolge le selettine (quelle dei leucociti: L-selettine, delle PTL: P-selettine, dell'endotelio: E-selettine). Essi agiscono come dei recettori che consentono un facile distacco in modo da consentire il rolling.
- 2) coinvolge le integrine ( $\beta$ 2-Integrine) e i recettori Ig-simili. Questi recettori consentono ai leucociti di fermarsi e di aderire strettamente all'endotelio.
- 3) Migrazione dei leucociti ai bordi dell'endotelio per interagire con le ICAM-1, con le molecole di adesione leucocitarie dell'endotelio.



Durante la flogosi specifici mediatori portano alla scomparsa della trombomodulina (TM) dalla superficie delle cellule endoteliali. Le molecole di adesione P-selettine ed E-selettine dei leucociti endoteliali sono sintetizzate ed espresse sulla superficie delle cellule endoteliali o sulle piastrine.

Il TF è espresso sui monociti dove si lega al fattore VIIa. Il complesso TF-VIIa converte il X a Xa che quindi complessa col Va per generare trombina dalla protrombina. Si forma poca APC e quella che si forma non è ben funzionante a causa dei bassi livelli della proteina S. Conseguentemente la Va non è attivato (da Remick D.G. AM J Pathol 2007)

## 2.5. MICROPARTICLES E PROPRIETA' PROCOAGULANTI

Alcuni studi evidenziano come il plasma dei pazienti affetti da sepsi da meningococco contenga un elevato numero di "microparticles" (MP), derivanti da molti tipi di cellule, specialmente granulociti (85%) e PTL, che esprimono sia CD14 sia TF in grado di promuovere in modo imponente la generazione di trombina; cioè si tratterebbe di microparticelle con proprietà pro-coagulanti (30). Sorprendentemente però lo stesso gruppo di studiosi avevano evidenziato che nelle sepsi non meningococco-correlate il numero di particelle TF positive MP era minore del gruppo di controllo. Questo risultato paradossale dimostra come non vi sia affatto chiarezza nella fisiopatologia delle varie forme di sepsi.

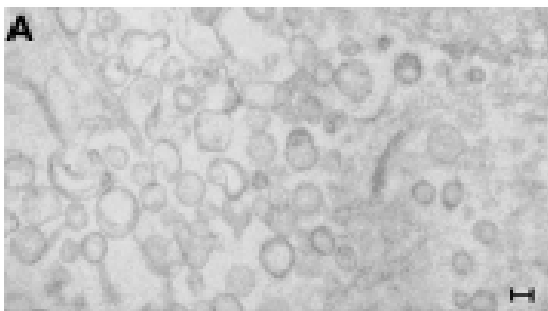
Altri studi evidenziano come vi sia una alta variabilità di risposta (produzione di TF PCA sulle MPs circolanti) tra individui in cui veniva indotta un'endotossitemia. Questa variabilità individuale può essere spiegata considerando fenotipi "high and low responder" e potrebbe riflettere variazioni interindividuali dei fattori plasmatici, piastrinici leucocitici (31).

Alcuni autori studiarono 18 volontari sottoposti a un modello di flogosi associato a generazione intravascolare di trombina. Evidenziarono mediante un test in grado di mostrare microparticelle procoagulanti ma non derivate da piastrine, un aumento di tale attività di circa 8 volte dopo 3-4 ore dalla somministrazione dell'endotossina, con ritorno ai valori basali dopo circa 8 ore.

Microparticelle con Ag-TF positive isolate dal plasma venivano visualizzate al microscopio elettronico. Vi erano però risposte molto variabili.

Alcuni Autori (32) evidenziano come le MP di origine piastrinica PMP presentano recettori di adesione per le P-selectine e che queste sono elevate nei pazienti con patologie flogistiche e trombotiche. Le MPM secondo questi studi potrebbero mediare reazioni tra leucocita-leucocita

Le MP deriverebbero da cellule attivate o da cellule che vanno incontro ad apoptosi. Esistono criteri rigorosi di definizione delle MP: dimensioni (<1.0 micron-1.5 micron) e l'espressione di cariche negative nella superficie esterna del bilayer. Anche se le funzioni fisiologiche e fisiopatologiche non sono ancora state completamente definite vi è evidenza che queste MP favoriscono il cross-talk tra cellule (31) e pertanto interferiscono nella cascata coagulativa e flogistica.



MP a forma di vescicole (da Ras 31)

## 2.6. RIDUZIONE DEGLI ANTICOAGULANTI NATURALI



**Nella sepsi c'è uno squilibrio tra gli anticoagulanti e i procoagulanti**

### **FATTORI PROCOAGULANTI**

Fattore II; VII; VIII; IX; X; XII

Fibrinogeno

Cofattori (V; VIII)

TF

PAI (plasminogen activator inhibitor)

Fattore di von Willebrand

Superfici attivate delle membrane cellulari (fosfolipidi carichi negativamente)

Riduzione del flusso

### **FATTORI ANTICOAGULANTI NATURALI:**

- Serin proteasi (proteina C, plasmina)
- Cofattori (proteina S )
- Flusso sanguineo
- Endotelio intatto
- Superficie inattiva delle membrane cellulari
- TFPI (tissue factor pathway inhibitor)
- Trombomodulina
- EPCR (endothelial protein C receptor)
- Attivatore plasminogeno tissutale
- ATIII
- Eparani

## 2.7. CASCATA COAGULATIVA NELLA SEPSI

La cascata coagulativa inizia dal TF che si comporta come un attivatore allosterico (33) del fattore VIIa.

Il complesso TF-VIIa si lega, attraverso contatti multipli: *esositi*, al fattore X, che porta alla formazione di un complesso che però è piuttosto stabile: il TF-VIIa-X nel quale il fattore X è convertito in Xa.

Quando il fattore Xa è rilasciato dal complesso, si associa al cofattore V per formare il Va+Xa (protrombinasi) che è predominante nelle PTL che espongono i fosfolipidi (procoagulanti) per il fattore Va e Xa (32).

I fattori VIIIa+ IX possono produrre ancora fattore Xa che amplifica la generazione di trombina, richiesta per l'emostasi.

I recettori sulla superficie cellulare mediano l'attivazione della PC. La TM (trombomodulina) si lega alla T (trombina) cambiandone pertanto le proprietà coagulanti stesse della T che da fattore procoagulante diviene anticoagulante.

EPCR promuove la PC in APC mediante il complesso TM-T in presenza di ioni Ca. Quando la APC è rilasciata diviene un potente anticoagulante degradando i fattori V e VIII.

La trombina viene prodotta a bassi livelli quando l'endotelio non è attivato, mentre aumenta quando è attivato da citochine come il TNF $\alpha$  che up-regola il TF nelle cellule endoteliali e nei monociti (34).

In condizioni fisiologiche ci sono basse concentrazioni di trombina e pertanto non c'è risposta trombotica. Infatti la stessa trombina stimola la produzione di APC rendendo perfettamente equilibrato l'assetto coagulativo.

Nei volontari sani, se induciamo un aumento di citochine, si osserva un aumento del fattore Xa che però avviene senza risposta trombotica.

Questo strano risultato può essere spiegato capendo come il fattore X è attivato dal TF-VIIa. Infatti solo il complesso TF-VIIa-X è in grado di produrre in modo efficace il Xa perché il Xa ha alta affinità con il complesso e quindi non si dissocia subito ma sta col complesso ternario TF-VIIa-Xa. Solo dopo la dissociazione dal complesso si lega al Va e quindi attiva la protrombina.

Da ciò si evince che se il fattore Xa non si dissocia non si forma trombina.

Il complesso ternario ha un ruolo chiave perché rappresenta il target per la normale regolazione del TF mediante TFPI che interagisce con la VIIa-Xa per formare con TF un complesso quaternario stabile (32).

In condizioni fisiologiche il X circolante è saturato dal complesso TF-VIIa esposto al circolo.

La PC è complessata alla superficie cellulare in quanto si lega in modo efficace all'EPCR.

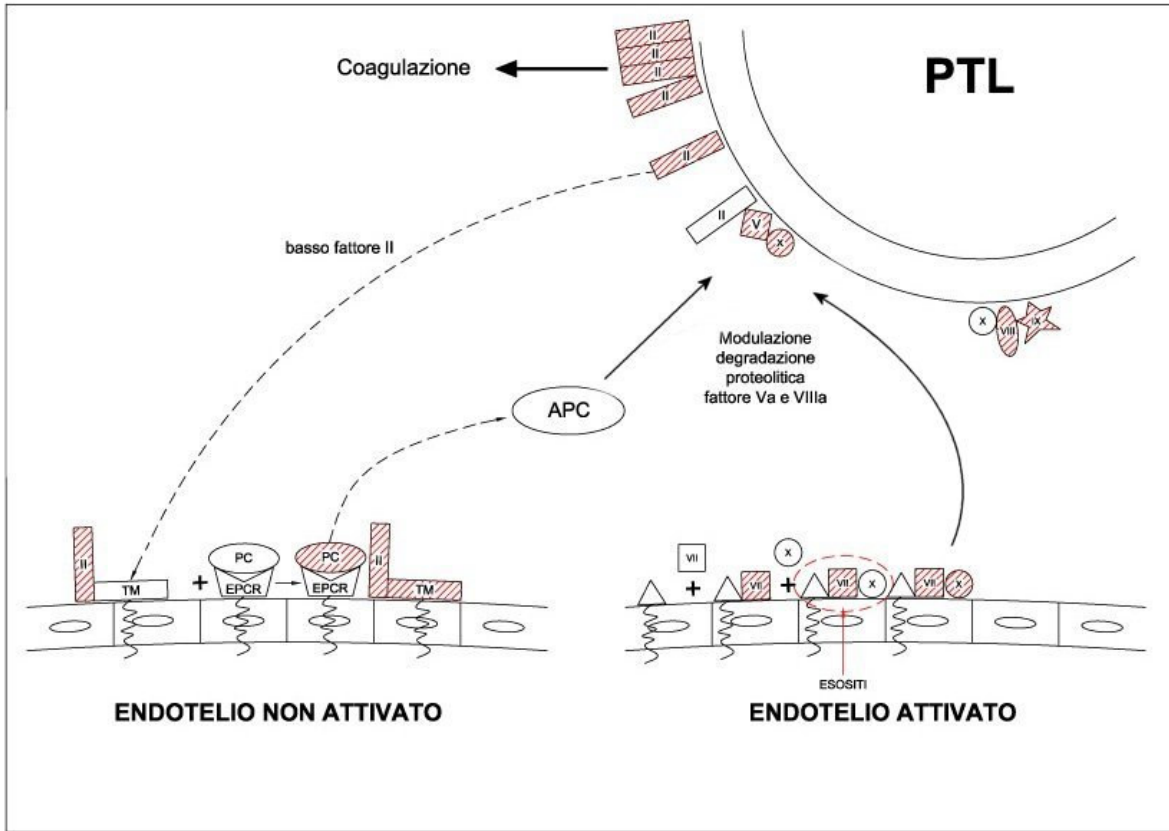
In presenza di tracce di trombina il complesso TM-T +Ca attiva la PC legata all'ERPC (anche ERPC favorisce l'attivazione della PC). Poiché però la affinità della PC per l'ERPC è uguale a quella della APC in condizioni fisiologiche la APC rimane complessata sulla superficie dell'endotelio e solo in seguito si dissocia e va a svolgere azione anticoagulante.

**In conclusione, sia la PC (anticoagulante naturale) sia il fattore X (fattore procoagulante) inizialmente, e in condizioni fisiologiche rimangono ancorate alla superficie cellulare perché in questo modo è mantenuta l'omeostasi coagulativa.**

**Nella sepsi questi meccanismi regolatori saltano verosimilmente in proporzione alla gravità stessa della sepsi.**

**La cascata coagulativa è iniziata dal TF (attivatore allosterico del fattore VIIa). Il complesso TF-VIIa si lega al X. Questo *complesso ternario* è stabile e consente al fattore X di attivarsi in**

**Xa. Il Xa rilasciato si associa al Va per formare Xa+Va (*protrombinasi*). Il fattore VIIIa+IXa possono amplificare la generazione di trombina. I recettori di superficie mediano la attivazione della PC. La TM-T in presenza del Ca e mediante promozione EPCR attivano la PC in APC. N.B. in condizioni fisiologiche sia fattore X/ Xa sia PC/APC rimangono ancorate sulla superficie cellulare garantendo l'omeostasi coagulativa.**



## 2.8 FIBRINOLISI

Modelli sperimentali indicano che quando è massima la attività coagulativa il sistema fibrinolitico è inattivo o meglio inizialmente il sistema fibrinolitico va incontro ad un rapido aumento (probabilmente per rilascio di attivatori del plasminogeno da parte delle cellule endoteliali) e poi viene soppresso (a causa dell'aumento del PAI 1).

Il ruolo del PAI 1 verrebbe messo in luce da alcuni studi sui modelli animali: topi geneticamente modificati incapaci di esprimere il PAI 1 non presentavano trombi a livello renale. Inoltre studi recenti mettono in luce un polimorfismo nel PAI 1: il 4G/5G polimorfismo che non solo sarebbe responsabile dei livelli di PAI1 in circolo ma sarebbe anche outcome-correlato nella sepsi da meningococco (35). I pazienti che presentano polimorfismo 4G/4G hanno alte concentrazioni di PAI1 in circolo ed hanno un elevato rischio di morte. Da molti studi clinici si evince come, nel paziente con DIC, elevati livelli di PAI1 sono uno degli indici predittivi di mortalità più suggestivi.

## 3. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Lo stato procoagulante porta a trombosi del microcircolo che può essere localizzata o diffusa. Queste alterazioni del microcircolo possono occasionalmente dare lesioni cutanee come nel caso della porpora fulminans.

La porpora fulminans appare simile alla reazione di Shwarzman( si ottiene inducendo 2 iniezioni di endotossina a distanza di 24h ) e porta a necrosi cutanea tromboemorragica e a DIC.

Simile clinica può svilupparsi nel paziente affetto da deficit primitivo di proteina C. Porpora è un segno che si presenta quando vi è uno stravasamento di GR nella cute come conseguenza della trombosi dei vasi del derma e quindi necrosi emorragica.

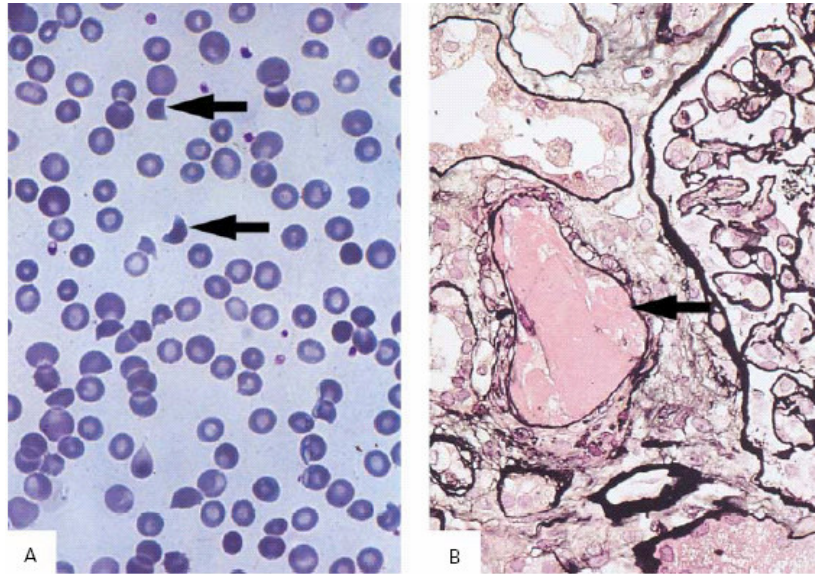
La gangrena asimmetrica periferica è un sottotipo di porpora fulminans. Ci sono poi forme minori di necrosi: esempio quella delle dita dei piedi e delle mani; che talvolta richiede l'amputazione. Nei microtrombi poi possono essere presenti dei batteri. (36) Va da se che oltre la cute sono anche altri organi colpiti specie reni e surreni e specie se la sepsi è causata da meningococco streptococco e stafilococco (36).

In caso di DIC coesistono sanguinamento e trombosi e nelle forme più perniciose si può presentare la Waterhouse-Friederichsen syndrom (rapida insorgenza, febbre, cianosi in assenza di dispnea, rash-porpora, collasso cardiocircolatorio) che si vede in alcuni casi di sepsi da meningococco (37)

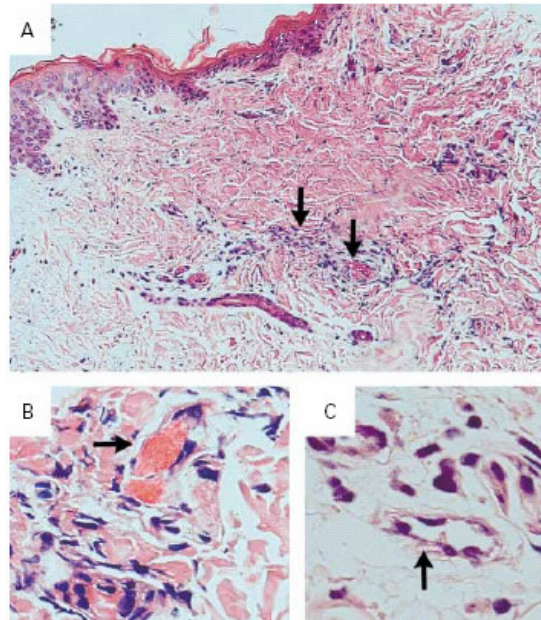
Vi sono inoltre studi che mettono in stretta relazione la DIC con la MOF. Infatti, in indagini autoptiche si evidenziava presenza di necrosi emorragica nei tessuti associata a microtrombi nei piccoli vasi ma anche a trombosi diffuse nei medi e grossi vasi arteriosi e venosi (38). La presenza poi di ischemia e necrosi sarebbe strettamente correlata a riduzione del flusso sanguigno e al deposito di fibrina nei vasi e davano spiegazione della MOF. Anche studi su animali dimostrano che i depositi di fibrina sui tessuti si traducono sul piano clinico con MOF. In altre parole la MOF sarebbe il risultato dell'attivazione e dell'iterazione aberrante della cascata flogistica e coagulativa specie in corso di DIC.

Infine la DIC nel paziente settico si è dimostrata un indice predittivo di mortalità indipendente.

In sintesi nel paziente settico prevale il fenotipo procoagulante; tuttavia quando il consumo dei fattori della coagulazione è massivo (2- 6% dei pazienti settici) si assiste a sanguinamento a volte anche imponente favorito dalla piastrinopenia, dall'uso di eparina, da patologia epatica■, da procedure invasive. ■E' molto difficile distinguere tra DIC e grave insufficienza epatica dal momento che le alterazioni coagulative sono le stesse, per cui a volte la differenziazione si evidenzia se ci sono i segni di ipertensione portale o meno. Va considerato, che generalmente nella DIC i parametri emocoagulativi mostrano un continuo e repentino peggioramento mentre nelle patologia epatica tendono a rimanere più stabili. Inoltre nella DIC il lo striscio ematico evidenzia la presenza di schistociti.(39)

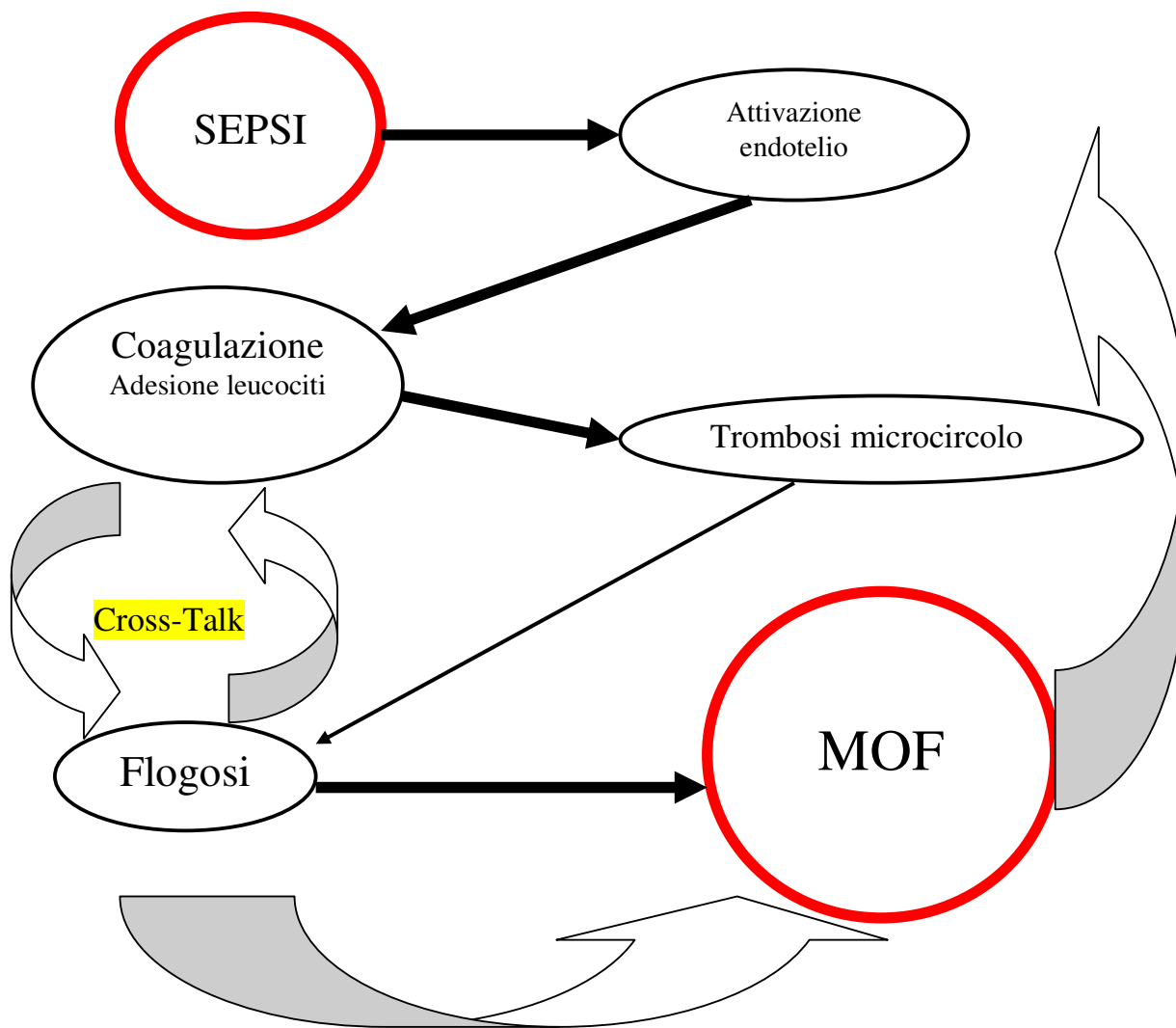


**Le immagini rappresentano: A: uno striscio di sangue dove si nota la presenza di schistociti tipici della DIC e B una biopsia renale di un paziente affetto da DIC (presenza di trombina a livello delle piccole arteriole. (Tratto da Levi NEJM)**



**La figura tratta da Faust NEJM evidenzia biopsia in lesioni cutanee da porpora. Il quadro A mostra trombosì. Il quadro C flogosi senza trombosì. (Infiltrati di polimorfonucleati)**

**La figura intende riassumere i concetti prima esposti**



Modificato da WEIL



## **4. LABORATORIO**

Nel paziente settico si monitorizza quotidianamente e anche più volte al giorno la conta piastrinica, PT/INR, PTT, la PC coagulativa, ATIII (generalmente molto bassi), il di-dimero.

PT (prothrombin time) è un test plasmatico che saggia la via estrinseca

ACT (activated clotting time).

APTT ( activated partial thromboplastin time).

Il D-dimero è generalmente alto ma non è specifico nella sepsi, infatti può aumentare in caso di tromboembolismo e/o di procedure invasive. I D-dimeri testimoniano l'attivazione del sistema fibrinolitico. Un altro test aggiuntivo è la determinazione dei monomeri di fibrina che si formano dal fibrinogeno dal clivaggio a mezzo della trombina di peptidi A e B. E' un test positivo per la clotting attivazione.

FSPs si formano quando fibrinogeno e fibrina sono digeriti dalla plasmina; ciò è indicativo dell'attivazione del sistema fibrinolitico e non della coagulazione.

Con eccezione fatta del fattore VIII (proteina della fase acuta) i fattori della coagulazione sono ridotti proporzionalmente alla gravità della sepsi. Il fibrinogeno, un'altra proteina della fase acuta può essere elevata nella prima fase della sepsi, ma si riduce al 50% nei pazienti con sepsi grave.

ATIII è uno dei più importanti regolatori del sistema coagulativo ed è consumato quando gli enzimi responsabili della coagulazione sono prodotti o quando il suo utilizzo è maggiore di quello della sua produzione.

### **5.1. MARKERS EMOCOAGULATIVI ASSOCIATI ALLA GRAVITA' DELLA SEPSI**

In uno studio pubblicato nel 2005 su "SHOCK" da Iba (40 ) si osservava che la ATIII e la PC sono i markers più affidabili per distinguere i pz settici con disfunzioni d'organo (OD) da quelli senza disfunzione (non-OD). In questo studio svolto su 78 pazienti di cui 15 OD e 65 non-OD si evinceva che la combinazione ATIII e D-dimeri e PC e D-dimeri sono i markers predittivi più accurati della gravità della sepsi. Non vi era invece differenza significativa nella conta PTL e GB tra i due gruppi.

Figura 1 di NEJM 1999; 19: 586-592 meccanismo di DIC.(39)

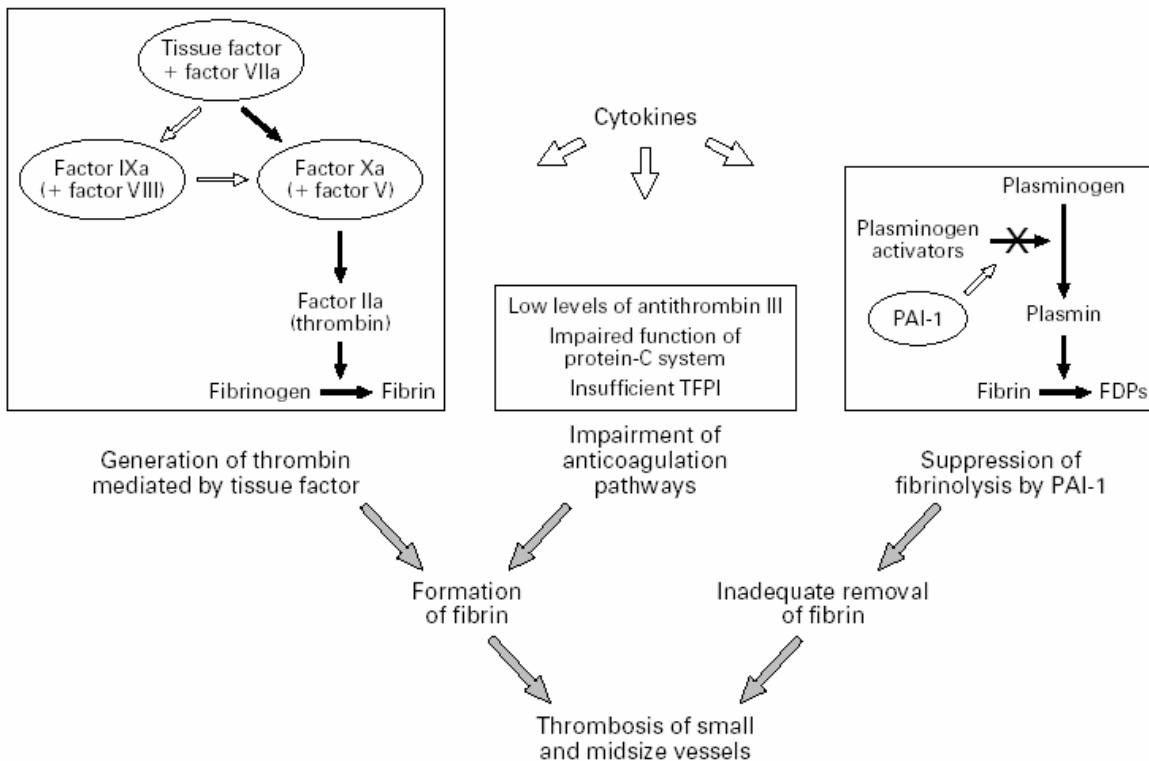


Figure 2. Pathogenetic Pathways Involved in Disseminated Intravascular Coagulation.

**Nei pazienti con DIC la formazione di trombina avviene mediante TF espresso sulla superficie dei monoliti, da cui si scatena la cascata coagulativa. Simultaneamente vi è un deficit di ATIII, APC, TFPI. La fibrina si forma perché i livelli di PAI-1 molto alti inibiscono il t-PA**

#### SISTEMA DI SCORE PER LA DIC(41)

Naturalmente la DIC è associata ad alto grado di mortalità l'acronimo infatti potrebbe essere letto come "Death is coming"(Levi)

#### ALGORITMO DIAGNOSTICO PER LA DIAGNOSI DI OVER-DIC

STEP 1. Valutazione del rischio: il paziente ha una patologia sottostante associata a over-Dic? Se sì procedere senno non utilizzare questo algoritmo.

STEP 2. Eseguire i seguenti test di laboratorio: conta piastrinica, PT, fibrinogeno solubile, monomeri di fibrina, o prodotti di degradazione della fibrina.

STEP 3. Score in base ai test di laboratorio:

- Conta piastrinica (>100=0, <100=1, <50=2)
- Elevati marker fibrina associati: (es: monomeri solubili di fibrina / prodotti di degradazione della fibrina no incremento: 0; moderato incremento: 2; grande incremento: 3. \*
- Allungato tempo di protrombina (<3 sec.=0, >3but<6 sec=1, >6 sec =2)

Elevati livelli di fibrinogeno ( $>1,0 \text{ g/L} = 0$ ,  $<1,0 \text{ g/L} = 1$ )

STEP 4. Calcolo dello score.

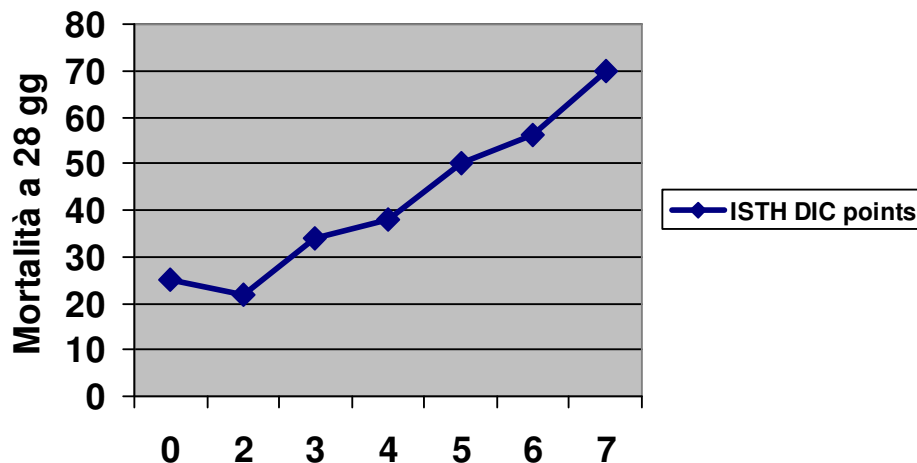
STEP 5. Se  $\geq 5$ : compatibile con l'overt DIC; ripetere giornalmente lo score.

Se  $< 5$  suggestivo (non affermativo) per non-overt DIC; ripetere lo score dopo 1-2 giorni.

La tabella del DIC scoring è importante perché consente di fare diagnosi di DIC con dati di laboratorio semplici ma altamente specifici 98% e altamente sensibili 93%

TABELLA DIC

### ISTH DIC nel settico grave



Al di fuori di un centro di eccellenza la diagnosi di DIC, nel settico e non, viene posta valutando complessivamente :

- 1) conta PTL
- 2) PT
- 3) Dosaggio fibrinogeno e prodotti di degradazione della fibrina

Test seriatî della coagulazione appaiono indispensabili per la diagnosi di DIC. Recentemente la presenza di una curva del PTT bifasica sembra essere un indice predittivo di DIC, anche se questa tecnica è coagulometer-dipendente

### 5.2. NON-OVERT DIC IN SEPSIS

International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISHT) ha messo a punto uno scoring system per la valutazione della DIC.

La non-overt DIC è definita come una condizione in cui vi è attivazione della coagulazione disseminata senza però che vi siano i segni clinici di sanguinamento e di trombosi (42). Non sono stati identificati i fattori che portano la non-overt DIC in overt-DIC.

La overt-DIC è definita come una combinazione di dati laboratoristici e clinici associabili all'attivazione della coagulazione disseminata. La overt DIC secondo alcuni autori sarebbe presente nel 22% dei pazienti settici.(43).

I fattori che portano ad una possibile transizione tra la non- over DIC sepsi e la over-Dic sepsi non sono stati identificati.

E' importante ricordare che nei pazienti critici lo score non over\_DIC sepsi proposto dalla ISHT identifica i pazienti con aumentato rischio di mortalità , ma non predice la over-DIC sepsi (44)

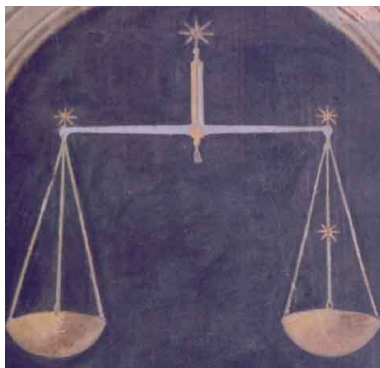
Molti AA, tuttavia, definiscono la overt-DIC solo sulla base dei dati laboratoristici senza che ci sia una clinica specifica (34) ed è per questo motivo che non vi è un protocollo di terapia raccomandato.

Nella pratica clinica si usano due diagnosi che sono sinonimi di over-DIC sepsi: la coagulopatia da consumo e la porpora fulminans. (34). La prima rappresenta un disordine emorragico acquisito che si può osservare in pazienti con sepsi così come in quelli con altre condizioni patologiche , determinata da consumo dei fattori della coagulazione (procoagulanti) in corso di attivazione della cascata coagulativa. Una condizione specifica della coagulopatia da consumo è la sindrome da defibrinazione (44 a) che è caratterizzata da una combinazione di livelli molto bassi di fibrinogeno plasmatici con alti livelli di prodotti di degradazione della fibrina così come dei prodotti di degradazione del fibrinogeno plasmatici (34).

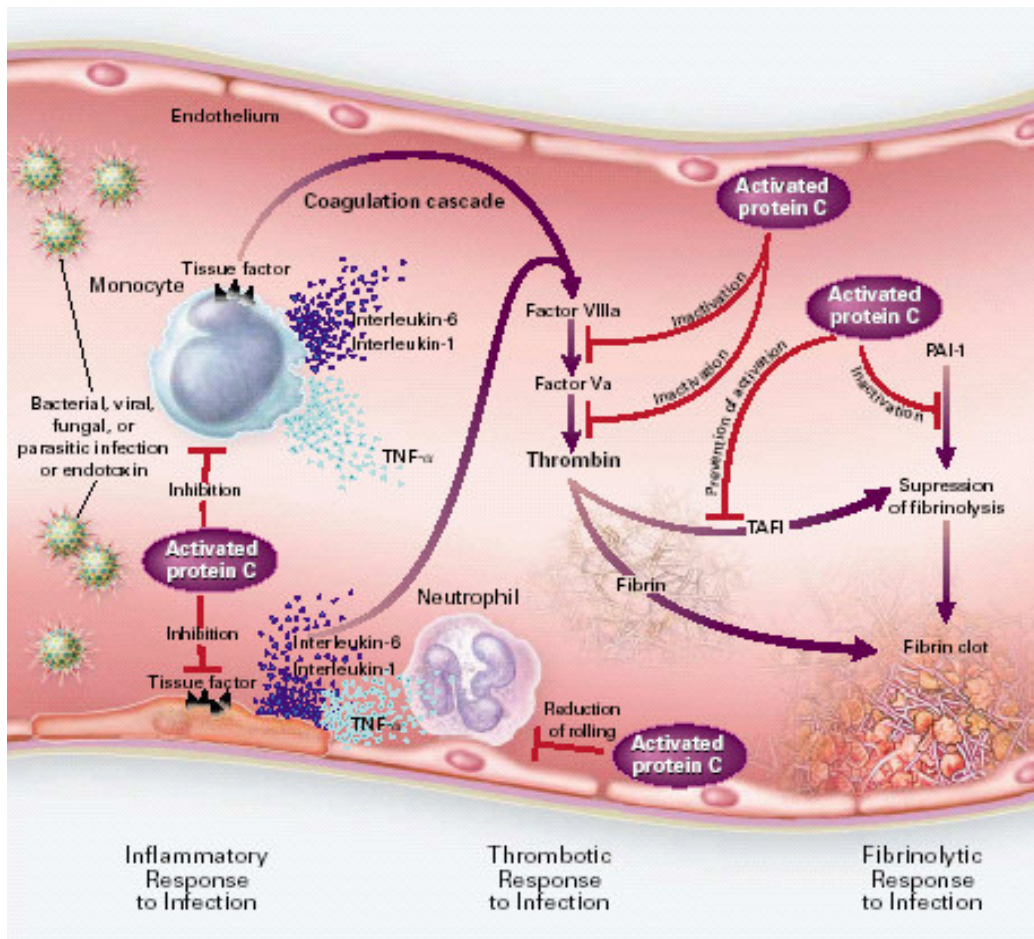
In conclusione la patogenesi della Dic è data da:

- 1) generazione di trombina
- 2) deficit degli anticoagulanti naturali
- 3) deficit sistema fibrinolitico

### 3 DOVE POSSIAMO AGIRE PER RIEQUILIBRARE L'ASSETTO COAGULATIVO?



- **ATIII che agisce a livello della trombina e fattore Xa**
- **APC che agisce sul cofattore V e VIII**
- **TFPI che agisce sul TF/fattore VIIa**



VINCENT BERNARD (14)

La conversione della APC a mezzo della T-TM è insufficiente a causa della flogosi. Endotelio è danneggiato e ne risulta un deficit di TM.

Il risultato è un danno endovascolare diffuso, trombosi microvascolare, ischemia d'organo e MOF.

## 5.1. PROTEINA C

E' una proteina vitamina-K dipendente sintetizzata nel fegato e nelle cellule endoteliale come polipeptide a singola catena (45)

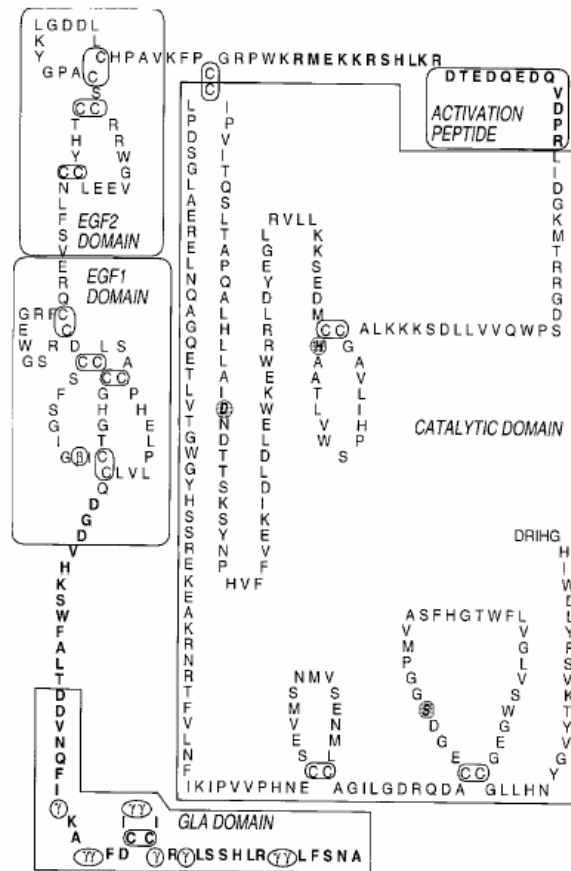


Figura da Foster 1985 (46)

La struttura è analoga ad altre proteine vitamina-K dipendenti quali: fattori VII, IX, X.

La maggior parte della proteina è convertita in uno zimogeno a due catene unite da un legame disolfido.

Lo zimogeno è formato da:

1. un pre-pro-peptide leader (assente nella proteina matura)
2. un dominio (Gla) di ac.γ-carbossiglutamato a 9 residui Gla
3. una corta elica idrofobica di aa
4. due domini EGF-simili (EGF-1, EGF-2)
5. un peptide di legame tra la catena leggera e pesante
6. un peptide di attivazione
7. un dominio trypsina-simile dove è locato il sito catalitico

Dopo la traslazione vengono rimossi il di-peptide Lys 156-Arg 157 e così la singola catena è convertita in 2 catene congiunte da un legame disolfido. L'80% dello zimogeno circolante è in questa forma (45)

L'attivazione avviene quando un peptide carico negativamente ( Lys-158 Arg-169) è rimosso dal clivaggio del peptide tra Arg-169 e Leu-170,

L'attivazione della PC (APC) in presenza del cofattore proteina S (PS) inattiva proteoliticamente:

- Fattore V
- Fattore VII

presenti sulle PTL e sulle cellule endoteliali.

Si è messa in luce un'altra azione del fattore V che oltre ad essere un procoagulante (dopo essere attivato dalla trombina) svolgerebbe un ruolo anche nel sistema anticoagulante come cofattore di legame fosfolipidico (PL) della PC (45). AA hanno infatti dimostrato che il fattore V (in presenza di ioni Ca) agisce sinergicamente con la PS quale cofattore-PL di legame (47)

Yegneswaran (48) in uno studio conclude che la funzione della PS quale cofattore della PC è quella di modificare la localizzazione del sito attivo della APC sulla membrana.

Lo stesso autore dimostrava che la chimera proteica ottenuta rimpiazzando il Gla –dominio della APC con quello della protrombina , alterava la localizzazione del sito attivo sulla superficie.La chimera proteica era in grado di inattivare allo stesso modo del complesso PC-wild-type/Ps il fattore Va.

Sia la forma attiva che quella precursore del fattore X si legano al fattore Va con uguale efficacia ed entrambi competono con l'APC per il sito di legame (49)

Oltre all'attività anticoagulante la PC avrebbe funzione:

- Profibrinolitica (50) (Zolton 1973) (51) ( Esmon 1981)
- Anti-ischemica (51) (Esmon 1991)
- Antiflogistica (51) (Esmon 1991) .

APC potrebbe opporsi alla riduzione della attività fibrinolitica endogena nella sepsi attraverso l'inibizione del PAI-1.

L'APC ha *in vitro* e nei modelli animali un'azione antiflogistica diretta anche se ad alte concentrazioni (non fisiologiche e sovraterapeutiche), riducendo e il TNF-a rilasciato e la traslocazione nucleare del fattore nucleare k-B nel sistema macrofagi/ monociti e bloccando l'adesione dei leucociti. I dati ottenuti da modelli animali e trials clinici dimostrano che l'azione antiflogistica della PC è indipendente dalla azione anticoagulatoria. Le basi molecolari di tale funzione non sono completamente note. AA hanno evidenziato che APC può indurre geni protettivi nelle cellule endoteliali attivando PAR1 (EPCR-legame dipendente).

Cheng et al. hanno riscontrato che i segnali APC-mediati possono inibire l'aumento transitorio della p53 mRNA indotto dall'ipossia nelle cellule endoteliali cerebrali. L'apoptosi endoteliale potrebbe svolgere un ruolo importante nella sepsi. La decisione finale di una cellula a sopravvivere o ad andare incontro ad apoptosi è il risultato di complesse ed intricate reazioni a catena. In altri termini la down-regulation della p53 mRNA, a livello delle cellule endoteliali, indotto dai segnali APC-mediati potrebbe indebolire l'efficacia degli stimoli pro-flogistici e proteggere l'endotelio in condizioni di stress come in caso di flogosi, ischemia/riperfusion.

La azione della PC è ottimale quando la PC è legata ad un'altra proteina di superficie: il recettore PC delle cellule endoteliali EPCR. L'attivazione della PC dal complesso trombina –TM è una reazione Ca-dipendente ed è anche stimolata dal ECPR presente nella superficie delle cellule endoteliali.

Numerosi studi hanno dimostrato che il sito di legame con il Ca è sul loop 70-80 dellaPC.

E' noto inoltre che questo loop è conosciuto essere un sito di legame per il Ca anche in altre proteasi coagulative vit-K dipendenti come nella trypsina.

## Thrombin-TM Complex

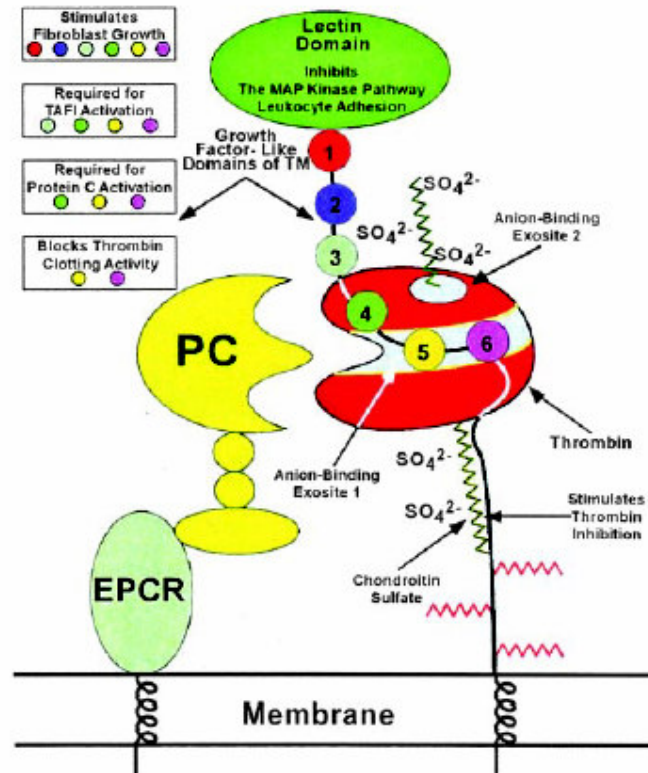


Figura tratta da ESMON . Il legame t (trombina) TM (trombomodulina) coinvolge l'esosite 1 della trombina e l'EGF domain dal 4 al 6 sulla TM. Il condroitinsolfato sulla trombomodulina aumenta l'affinità per la trombina ma non ne viene richiesta la sua presenza per la sua funzione. Il lectin domain inibisce l'adesione dei leucociti. Altre funzioni della trombomodulina richiedono la presenza di differenti EGF domain come indicato. L'attivazione della proteina C ad APC dal complesso T<sub>2</sub>TM è migliorata dal legame della proteina C al EPCR attraverso il suo gla domain.

Oltre a questo sito la PC ha un altro sito di legame per il Ca che è collocato a livello del primo dominio EGF-like e numerosi altri siti a bassa affinità locati nel dominio G1a. Comunque il legame del Ca a tutti questi altri siti non è necessario per attivazione della PC da parte della trombina.

Il Ca gioca un ruolo complesso a proposito delle proprietà zimogeniche della PC perché non solo stimola l'attivazione dello zimogeno da parte della trombina in presenza della TM ma anche, in modo potente, la inibisce in assenza di TM.

La duplice funzione del Ca nella attivazione della PC da parte della trombina in presenza o assenza della TM non è ben conosciuta. E' però verosimile che: il legame del Ca al loop 70-80 possa portare a un cambiamento conformazionale tale da rendere ottimale l'interazione colla trombina se associata a TM ma inibire l'interazione in assenza del cofattore. Si ritiene infatti che il Ca legandosi con la PC ne crei una struttura tale da inibire la trombina che non sarebbe più in grado di agire sul sito catalitico.



In conclusioni la PC necessita per la sua attivazione sia del Ca sia della TM.

Sorprendentemente però il Ca è un potentissimo inibitore della attivazione della PC trombina mediata in assenza della TM.

Studi recenti hanno dimostrato come l'autolisi del loop potrebbe essere anch'essa responsabile delle proprietà anticoagulanti. Anche una estesa autolisi della APC umana sostituita con una più corta sequenza bovina di APC (APC mutante) avrebbe una capacità anticoagulante maggiore a 2-3 volte quella normale. Altri studi dimostrano che la proteina S migliora la funzione anticoagulante della APC eliminando le potenziali iterazioni inibitorie derivanti da un'autolisi più lunga del loop con fVa. Similmente ad altre serin proteasi la PC è inibita dalle serpine plasmatiche. Le serpine regolano il livello di APC attraverso un meccanismo d'inibizione-suicida. Pertanto la emivita è di circa 20' per APC e di 10' per lo zimogeno. Quindi se l'ingegneria genetica fosse in grado di aumentare la resistenza all'inattivazione da parte delle serpine si potrebbe ottenere un'azione anticoagulante, antiflogistica e antifibrinolitica. Il vantaggio di ottenere queste varianti potrebbe avere enorme importanza nelle patologie in cui si riscontrano alti dosaggi di serpine come nella CID e nella SEPSI.

La rapida e prolungata deplezione di PC è tipica nella sepsi e in ultima analisi porta a una deplezione della APC. L'attivazione endogena della PC è inoltre indebolita dalla down-regulation della trombomodulina e dall'ERPC espresso sulla superficie delle cellule endoteliali (attraverso citochine pro-infiammatorie) e dal rilascio di elastasi da parte dei leucociti.

In altre parole la PC regola numerosi processi sia di natura flogistica che coagulativa associata alla sepsi. In un modello di batteremia nei babbuini l'inibizione della conversione della PC in APC o la riduzione di attività della APC porta ad un aumento della risposta procoagulante e proinfiammatoria e a gravi conseguenze. LA rapida e prolungata deplezione di PC evidenziata nei pazienti settici potrebbe essere dovuta:

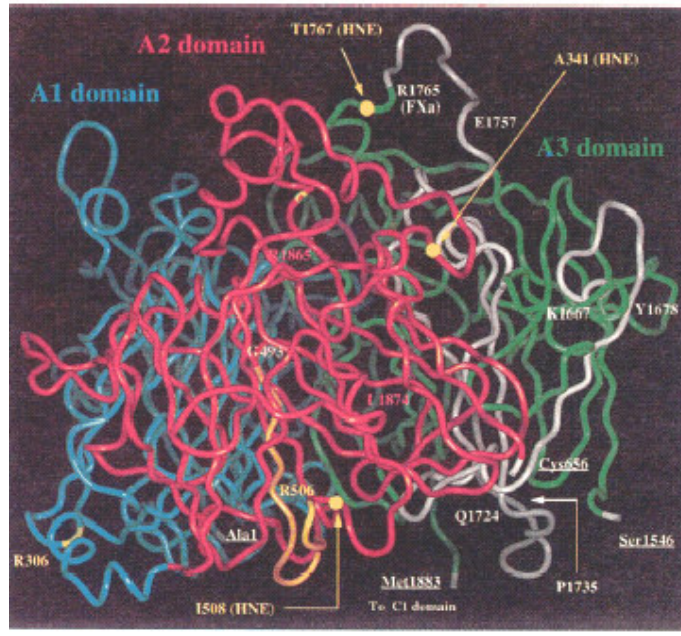
- ad un aumentato consumo,
- ad un aumentato processo di degradazione,
- ad una diminuita sintesi epatica

La carenza di PC contribuisce alla coagulopatia sepsi- indotta e sarebbe inoltre correlata a cattiva prognosi.

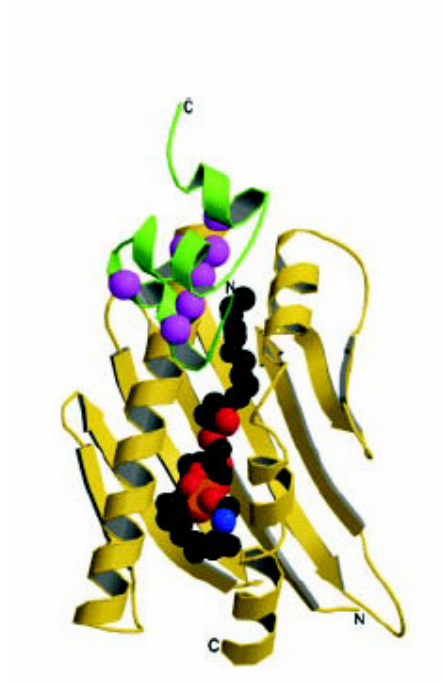
In ossequio a queste premesse (effetto profibrinolitico, antiflogistico e attività anti apoptosi importante nell'ischemia ) la PC si è prospettata come punto di riferimento nel trattamento della sepsi.

Inoltre a causa della alta specificità nelle azioni interattive, è possibile alterare specifici substrati per le serin proteasi in genere e in particolare per la APC sostituendo aminoacidi che sono locati in impotanti siti di contatto con altri substrati, tali da modificarne l'attività biologica.

Intento della ingegneria genetica potrebbe essere quella di limitare la inattivazione della APC proprio in quelle patologie in cui è alta la presenza delle serpine



La figura rappresenta il fattore V con i siti di legame per APC, P S e la membrana. La APC si lega ai residui 1865-75 (residui color Magenta)



Rappresentazione dell'ERCP con una porzione di proteina C. Le sfere color magenta rappresentano gli ioni Ca, ERCP è la molecola in giallo. In verde è rappresentato il dominio Gla della proteina C (52)

## Protocolli di studio della proteina C

Ad oggi l'unico studio che ha dimostrato efficacia significativa del rhAPC è stato quello di Vincent pubblicato su NEJM 2001.

Studi clinici in precedenza avevano dimostrato l'azione protettiva della rhAPC nelle peritoniti settiche (modelli di sepsi), da E. Coli in gruppi di babuini.

In fase II, i pazienti settici a cui veniva somministrata rhAPC, se comparati con placebo, dimostravano una riduzione dose-dipendente dei livelli di D-dimero e di IL-6 (entrambi marcatori di coagulopatia e flogosi).

### STUDIO DI BERNARD E VINCENT (*PROWESS*) (14)

Dal luglio 1998 a giugno 2000 venivano arruolati, in 11 paesi e in 164 centri, 2280 pazienti per uno studio randomizzato, placebo-controllato, a doppio cieco.

I criteri di selezione erano:

- 3 o più segni di flogosi sistemica
- disfunzione sepsi-indotta

Lo studio era organizzato in modo tale che per ogni paziente trattato con rhAPC ve ne era un altro trattato con placebo.

**Il dosaggio somministrato era di 24mcg/Kg/h per 96h. Infusione veniva interrotta 1h prima di ogni procedura invasiva e in caso di chirurgia maggiore; veniva ripresa dopo 1h ed entro 12h successiva se assenti complicanze emorragica.**

Non vi era invece un approccio standardizzato per la terapia antibiotica, modalità di ventilazione, vasopressori, fluidi.

I pazienti venivano seguiti per 28 giorni dall'inizio dell'infusione o fino all'exitus.

Inizialmente, come accennato sopra, si intendevano arruolare 2280 pazienti, ma ad una prima verifica in itinere (1520 pazienti) si è provveduto a sospendere il trial vista la provata efficacia dell'APC (differenza di mortalità significativa tra i due gruppi).

Come si vede dal grafico sottostante, le condizioni di base dei 2 gruppi, erano simili.

Il 73% dei pazienti avevano almeno 2 disfunzioni d'organo.

#### Le cause di infezione:

- 53,6% aveva un'infezione polmonare
- 19,9% aveva una peritonite
- 10% infezioni delle vie urinarie
- 10% altre infezioni

L'incidenza Gram+ Gram- era simile.

**TABLE 1. BASE-LINE CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS.\***

CHARACTERISTIC	PLACEBO GROUP (N=840)	DROTRECOGIN ALFA ACTIVATED GROUP (N=850)
Age (yr)	60.6±16.5	60.5±17.2
Age (%)		
< 60 yr	43.6	44.1
< 65 yr	53.5	51.4
< 75 yr	78.5	75.9
Male sex (%)	58.0	56.1
White race (%)	82.0	81.8
Prior or preexisting conditions (%)		
Hypertension	35.0	38.2
Myocardial infarction	14.4	12.1
Congestive cardiomyopathy	9.0	6.4
Diabetes	22.4	20.7
Pancreatitis	3.9	3.4
Liver disease	2.6	2.1
COPD	26.1	22.2
Cancer	18.8	17.1
Recent trauma	5.1	3.3
Recent surgical history (%)		
Elective surgery	6.2	5.8
Emergency surgery	21.2	20.7
No history of surgery	72.6	73.5
APACHE II score	25.0±7.8	24.6±7.6
Other indicators of disease severity (%)		
Mechanical ventilation	77.6	73.3
Shock	71.7	70.4
Use of any vasopressor	75.5	71.8
Use of dobutamine	13.5	13.9
No. of dysfunctional organs or systems (%)		
0	0	0.1
1	24.2	25.3
2	32.5	31.8
3	26.0	25.2
4	13.8	14.0
5	3.6	3.6
Time from first organ dysfunction to start of drug infusion (hr)	17.4±9.1	17.5±12.8

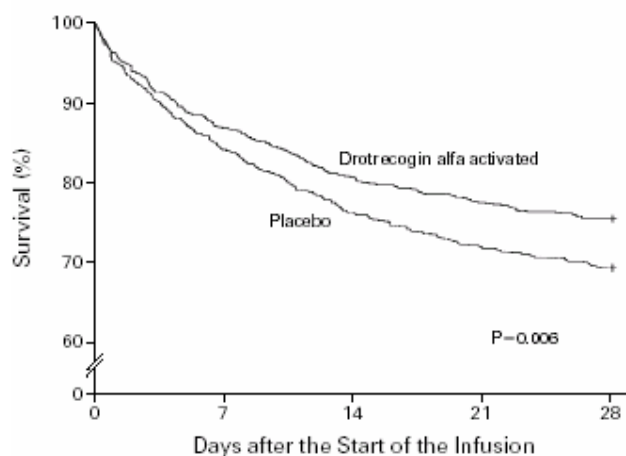
**Come si nota dalla tabella i 2 gruppi erano omogenei per le condizioni di base.**

Come si nota dalla tabella sottostante la percentuale dei pazienti che presentavano sanguinamento erano simili. L'incidenza di grave sanguinamento era maggiore nei pazienti sottoposti a rhAPC fino a che veniva infusa poi i 2 gruppi erano sovrapponibili. Infatti durante i 28 giorni l'incidenza di sanguinamenti maggiori era del 2,4% nel gruppo APC comparato all'1% del gruppo controllo. I sanguinamenti gastrointestinali poi, erano le principali cause di sanguinamento ( 3,5% nel gruppo APC e 2% nel gruppo controllo).

Tra i pazienti che ricevevano rhAPC non vi era differenza significativa tra quelli che ricevevano rhAPC solo e quelli che ricevevano anche eparina (3,7% contro i 3,5%). Inoltre il sanguinamento si notava soprattutto nei soggetti predisposti, per esempio l'ulcera gastrica, PTT>120sec e INR>3, o con una conta PTL<30000 per millimetro cubo, mentre i sanguinamenti spontanei erano rari. Erano state riscontrate 2 casi di emorragia intracranica fatale.

**TABLE 5. INCIDENCE OF SERIOUS ADVERSE EVENTS.**

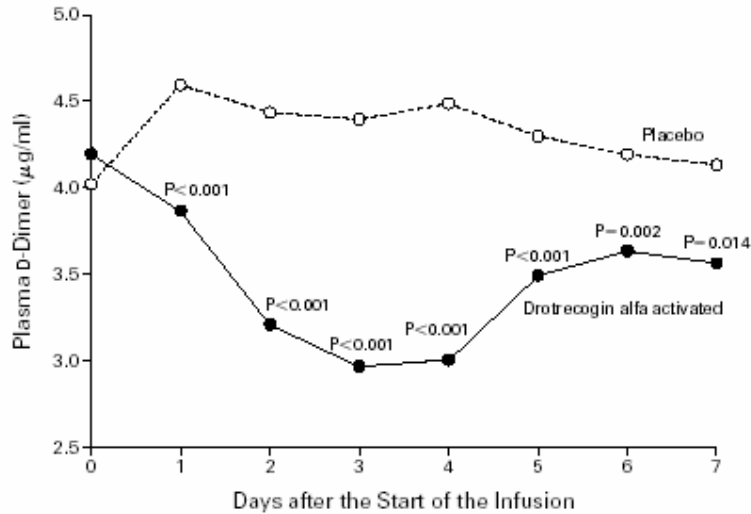
VARIABLE	PLACEBO	DROTRECOGIN	P
	GROUP	ALFA ACTIVATED	
	(N=840)	(N=850)	VALUE
	no. of patients (%)		
At least one serious adverse event	102 (12.1)	106 (12.5)	0.84
Serious bleeding event*	17 (2.0)	30 (3.5)	0.06
Gastrointestinal	9 (1.1)	9 (1.1)	
Intraabdominal	4 (0.5)	3 (0.4)	
Intrathoracic	1 (0.1)	6 (0.7)	
Retroperitoneal	0	4 (0.5)	
Intracranial	1 (0.1)	2 (0.2)	
Skin or soft tissue	0	2 (0.2)	
Genitourinary	0	2 (0.2)	
Source unidentified†	2 (0.2)	2 (0.2)	
Thrombotic events	25 (3.0)	17 (2.0)	0.20



**Dopo 28 giorni dall'infusione di rhAPC morivano:**

- **259/840** pazienti trattati con placebo (mortalità del **30,8%**)
- **210/850** pazienti trattati con rhAPC (mortalità del **24,7%**)

Questa differenza di mortalità 6,1% era significativa a tal punto da interrompere il trial. In questo studio si dimo



Il grafico evidenzia i cambiamenti dei valori medi del plasma di 770 pazienti trattati con rhAPC e 729 trattati con placebo.

Studio ADDRESS: La FDA (Food and Drug Administration) richiede uno studio per valutare l'efficacia del Drotrecogin A per adulti con sepsi grave ma a basso rischio di morte.

La conclusione di questo studio fu che in assenza di benefici e in presenza di un'aumentata incidenza di gravi complicanze emorragiche che il farmaco non doveva essere somministrato nei pazienti con sepsi grave a basso rischio di morte, come quelli con una sola insufficienza d'organo e/o con un APACHE score >25. In questo studio vennero arruolati 2460 pazienti e raccolti i dati di 2613 (1297 placebo e 1316 con DroAA) con un follow up di 28 giorni.

Tuttavia una recente analisi di questo trial mostra che i pazienti con DIC in accordo con i criteri ISTH ricevevano un beneficio maggiore di quelli che non presentavano la over-DIC sepsi.

Infatti la riduzione del rischio relativo di mortalità nei pazienti settici con DIC che ricevevano DroAA era del 38% comparata con un rischio relativo di riduzione della mortalità del 18% nei pazienti che non avevano DIC:

Questa osservazione è assai importante in quanto sottolinea l'importanza del deragliament del processo emocoagulativo in corso di sepsi e l'impatto che la ricostituzione dell'assetto anticoagulante nel microcircolo potrebbe avere nel trattamento della sepsi stessa. (Levi. Compendio)

## 5.2. EPCR

EPCR (endothelial cell protein C receptor) è una glicoproteina transmembrana formata da 221 residui aminoacidici.

Condivide circa 20-28% di sequenze aminoacidiche con la famiglia delle MHC (molecole del complesso di istocompatibilità) di classe I/CD1 e accelera la generazione di APC (anticoagulante naturale) T-TM dipendente legandosi ai neutrofili attivati.(52)

Il EPCR si lega sia alla forma zimogeno della PC, sia alla forma attivata (APC) in modo:

- A) specifico
- B) saturabile
- C) Ca-dipendente

A dispetto delle piccole dimensioni la EPCR può legare 3 ligandi contemporaneamente:

- Proteinasi 3 (auto-Ag nella granulomatosi di Wegener)
- PC/APC
- fosfolipidi

Le MHC di tipo I sono proteine transmembrana integrali associate in modo covalente con la  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m).

L'espressione EPCR è ristretto all'endotelio (Fukudome ed Esmon 1995) (53) ed è principalmente locato sulla parete dei grossi vasi.(Fukudome et al 1996) (54).

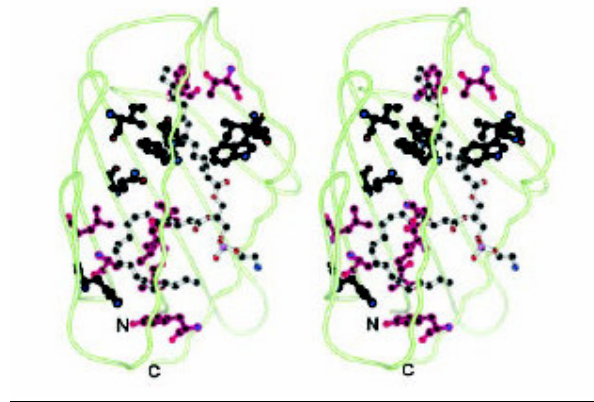
EPCR aumenta in risposta all'endossine. (esmon 1997) (55)

EPCR solubile (sEPCR) comprendente residuo 1—194 è riscontrabile nel plasma. La forma sEPCR lega la PC/APC con la stessa affinità del recettore transmembrana. Questo significa che l'iterazione è dovuta principalmente alla iterazione proteina-proteina e non sarebbe coinvolta in questo processo la membrana fosfolipidica.(54).

Si pensa che la PC/APC si legi all'EPCR attraverso il suo dominio GIa in quanto la PC mancando di questo dominio non spiazza la PC dall'EPCR (56)

Subito dopo il legame con ERPC la PC perde la sua attività anticoagulante a causa della inibizione della degradazione proteolitica del fattore Va. (57)

La iterazione PC/APC\_ERPC non previene né l'attivazione della PC a mezzo della T-TM né l'inattivazione della APC a mezzo delle serpine. Questo significa che EPCR non blocca stericamente la APC ma ne modula l'attività enzimatica (57).



La figura dimostra uno stereodiagramma che visualizza la ERPC molecola ad elica (52)

### 5.3. AT

Il termine AT non dà giustizia della sua funzione poiché non inibisce solo la trombina ma anche tutte le serin-proteasi e tutti i relativi fattori della coagulazione (fattore Xa, IXa, VIIa, XIa, XIIa). Ciò significa che tutti gli enzimi prodotti durante l'attivazione della coagulazione sono neutralizzati dalla trombina.(58).

Lo sviluppo dello shock settico si accompagna alla diminuzione dell' AT e la mortalità è maggiore nei pazienti con bassi livelli AT (59)

Secondo Taylor (60) AT avrebbe anche un'azione antiflogistica. Il legame della AT ai glucosamminoglicani delle cellule endoteliali porta al rilascio di PGI2.

Il PGI2 ha tre effetti antiflogistici:

- 1) diminuzione del rilascio dei radicali dell'ossigeno dai granulociti
- 2) Diminuzione dell'aggregazione delle PTL (61)
- 3) Diminuzione del TNFa dai monociti attivati

La PGI2 protegge le cellule dall'endotelio e preserva il flusso sanguigno nel microcircolo; potrebbe inoltre promuovere la vasodilatazione nelle arterie polmonari. La AT non ha azione sulla pressione sistemica e la sua la sua capacità di prevenire la ipertensione polmonare può essere spiegato con la riduzione plasmatica dei livelli di TXB2(61)

Il razionale dell'uso di AT muove da tre considerazioni:

- a) AT è uno dei principali regolatori del sistema coagulativo
- b) Eparina esercita il suo effetto anticoagulante attraverso AT
- c) AT diminuisce durante la DIC

AT appare inadeguata nel regolare l'attività della trombina nella DIC per tre ragioni principali:

- 1) i suoi livelli sono continuamente consumati man mano che si forma la trombina (62)
- 2) antitrombina è degradata dalla elastasi rilasciata dai neutrofili (63)
- 3) deficit di sintesi a causa di un'insufficienza epatica o come nella sepsi anche per l'aumentata permeabilità capillare che contribuisce alla riduzione plasmatica.

#### TRIALS CON AT NELLA SEPSI

Già nel 1978 Schipper aveva utilizzato la AT nel paziente con DIC.

Da allora sono stati numerosi gli studi pubblicati (64)

Nel 1985 la fase II in uno studio sui pazienti affetti da shock settico dimostrava come i pazienti sottoposti a AT avevano un periodo di DIC più breve di quelli che erano sottoposti ad eparina o a eparina + AT (65).

Studi su modelli animali inoltre dimostravano non solo l'efficacia della AT sull'omeostasi coagulativa ma anche la sua efficacia nel migliorare la sopravvivenza (60).

Fourier riportava una riduzione del 44% del rischio di mortalità in 35 pazienti in shock settico (studio randomizzato con placebo a doppio cieco) trattati con alte dosi di AT (59).

Baudo in uno studio del 1998 in un gruppo di 120 pazienti non dimostrava differenza di sopravvivenza tra placebo e AT ma in un sottogruppo di malati molto critici osservava un miglioramento della sopravvivenza (66).

Balk in un gruppo di 35 pazienti settici ma non molto critici trattati con AT dimostrava prognosi peggiore (67)

Warren, (68) nel 2001, evidenziava che la somministrazione AT, ad alte dosi, entro sei ore nel paziente con sepsi grave o shock non sortiva alcun effetto sulla mortalità a 28 giorni. Inoltre le alte dosi di AT associata all'eparina portavano ad aumentati rischi di sanguinamento. Tuttavia in un sottogruppo di pazienti a cui non veniva somministrata in concomitanza anche l'eparina si osservava ad un trend in ribasso della mortalità a 28 giorni.



Il KybernSept Trial è uno studio farmacocinetico che ha coinvolto 2314 pazienti settici in tutto il mondo. Questo studio non è riuscito a dimostrare un miglioramento significativo dell'outcome a 28 giorni. Lo studio era a doppio cieco, placebo-controllato e multicentrico. In questi pazienti poteva essere utilizzata eparina anche se a basso dosaggio (10000UI/g) per la profilassi delle TVP. Si pensava infatti che bassi dosaggi di eparina associati ad alti dosaggi di AT non comportasse alto rischio di sanguinamento. In questo trial di fatto non c'è una separazione randomizzata tra i pazienti trattati e non con eparina.

I risultati sono però stati deludenti in quanto non vi era a 28 giorni un miglioramento significativo dell'outcome a 28 giorni rispetto al placebo.

## 5.4. rTFPI

rTFPI è una proteasi inibitore avente 3 domini di Kunitz. Il rTFPI si lega al fattore Xa attraverso il secondo dominio Kunitz (69). Mediante un processo Xa-mediato il TFPI è in grado di limitare la produzione del fattore Xa legandosi al VIIa-Tfal 1 dominio di Kunitz (70). Questa azione anticoagulante è responsabile del prolungamento del tempo di protrombina (71). Inoltre il TFPI avrebbe anche altre azioni: inibire l'attivazione del PAR inibendo il legame del Xa con il complesso TF-VIIa. Infatti il fattore Xa in associazione col TF-VIIa attiva il PAR1-2 provocando: produzione di citochine proflogistiche (72), evidenziando le molecole di adesione (73), favorendo la vasodilatazione (74). Hinshaw in un modello letale di scimmie dimostrava l'effetto benefico del TFPI sulla sopravvivenza e riduzione dell'insufficienza d'organo e dei livelli di IL-6. L'effetto protettivo non c'era se veniva inibito il sito attivo del fattore Xa (75).

### Dosaggio del rTFPI

Il TFPI si trova, nel nostro organismo, in 3 distinti pools (76):

- 3% è contenuto nelle PTI
- 10% è associato alle lipoproteine plasmatiche
- 80-85% è legato ai glucosaminoglicani (GAG) sulla superficie dell'endotelio.

I livelli di TFPI nel sano sono di circa 100ng/ml (77). Uno studio eseguito sui pazienti affetti da sepsi (78) si dimostrava che i livelli di TF erano elevati a differenza di quelli del TFPI; inoltre i pazienti con alto TF avevano prognosi peggiore. Tuttavia il livello del TFPI era solo debolmente inferiore ai casi controllo. Da questo studio si evince che il TFPI non è in grado nella sepsi di controbilanciare l'azione del TF. Gli stessi autori poi asserivano che verosimilmente le elastasi dei neutrofili, elevate nel settico, potevano contribuire all'inattivazione del TFPI.

In uno studio su TF / TFPI svolto nei bambini con meningococco si evidenziava che mentre i livelli plasmatici di TFPI diminuiscono quelli nelle urine non si riducevano, ciò era suggestivo di un'inattivazione plasmatica di TFPI (79).

E' stato difficile formulare un adeguato dosaggio del TFPI. In pazienti settici trattati con dosaggi di 0,33 mg/kg/h per 96h si prolungava eccessivamente il tempo di protrombina e un aumentato sanguinamento.

## TRIALS TFPI

Fase III Sept 2001 OPTIMIST trial.

Lo studio era multicentrico a doppio cieco placebo-controllato.

In questo studio i pazienti venivano arruolati in due stadi diversi:

- pazienti con 2 segni di SIRS, con presenza di 2 disfunzioni d'organo e/o ipotensione e INR $\geq$ 1,2
- pazienti con gli stessi criteri ma con INR $\leq$ 1,2

In entrambi i trials i pazienti erano randomizzati e ricevevano per 96h o rTFPI al dosaggio di 0,025 mg/Kg/h o placebo.

Lo studio si proponeva di esaminare:

1. disfunzione d'organo
2. markers ematochimici
3. flogosi e coagulazione
4. funzioni vitali

Sono stati arruolati 1754 pazienti nel gruppo con INR alto. La mortalità risultante, a 28 giorni, era stata del 34,2% contro il 33,9% del placebo; cioè non era significativa e l'aumento dell'INR non risultava benefico.

Quelli con basso INR presentavano, comparati col placebo, minore mortalità (12% contro il 22,9%). Un'attenta analisi dei sottogruppi dimostrava che c'erano delle chiare interazioni eparina-rTFPI nel senso che i pazienti che non venivano trattati con eparina avevano minore mortalità (rTFPI 34,6% contro 42,7% del placebo) quando assieme all'rTFPI veniva somministrata eparina<sup>^</sup> (rTFPI 34% verso 29,8% del placebo).

Dai dati ottenuti appariva inoltre che il rTFPI dimostrava maggiore efficacia quando l'infezione era documentata dalle indagini microbiologiche all'emocolture e in pazienti con documentata pneumonia in assenza di trattamento con eparina. Viceversa l'efficacia era minore nel sospetto di infezioni che però mancavano di conferma diagnostica e nei pazienti trattati con eparina (80).

<sup>^</sup>Il 3° dominio di Kuniz del TFPI ha un legame per l'eparina. Studi dimostrano che il legame TFPI-eparina fa sì che il TFPI si stacchi dall'endotelio quando l'endotelio è attivato come in corso di sepsi (81). Ciò varrebbe sia per la eparina a basso peso molecolare che per quella non frazionata (82) e avviene anche con bassi dosaggi (150).

Tuttavia durante il trials si assisteva a cambiamenti delle % di mortalità, ovvero all'inizio pareva che il rTFPI avesse grande efficacia 29,1% di mortalità contro il 38,9% successivamente la mortalità si riduceva per il placebo e aumentava per il rTFPI.

Le possibili cause di questi risultati: (99)

- errori di randomizzazione
- cambiamenti nella potenza farmacodinamica
- cambiamento del sostegno delle funzioni vitali

## **6 TRATTAMENTO DELLA PATOLOGIA EMOCOAGULATIVA NEL PAZIENTE SETTICO**

- 1) terapia antibiotica adeguata (trattamento dell'infezione)**
- 2) trattamento della trombocitopenia (quando è sepsi-correlata)**
- 3) trattamento della coagulopatia se sepsi-correlata**
- 4) profilassi e trattamento della TVP**
- 5) trattamento dell'ospite (ventilazione a basso volume; APC; basse dosi di corticosteroidi; terapia con insulina; terapia microbica adeguata)**

E' evidente che bassi livelli di piastrine e di fattori della coagulazione possono incrementare il rischio di sanguinamento. Tuttavia plasma e piastrine devono essere somministrati non in base ai dati laboratoristici ma solo in caso di sanguinamento attivo o qualora il paziente sia sottoposto a procedure invasive. La suggestione che la somministrazione di emoderivati comporti "Add fuel to fire" non è stata dimostrata da studi clinici.

La presunta efficacia di trattamento con plasma, fibrinogeno, crioprecipitati e piastrine, non è basata su trials randomizzati, ma rappresenta terapia ragionevole in pazienti sanguinanti o quelli ritenuti ad alto rischio per la grave deplezione dei fattori emostatici (100).

### **PIASTRINE E PLASMA NEL PZ SETTICO**

Non vi è attualmente evidenza che la somministrazione profilattica delle PTL o PFC possa essere utile nel trattamento del paziente settico in presenza di DIC.

Le PTL dovrebbero essere somministrate se sono al di sotto di 20000 nel paziente non sanguinante e sotto le 500000 nel paziente sanguinante o prima di procedure invasive. Non vi è un dosaggio preciso ma generalmente nell'adulto ne vengono somministrate 5-6 pools.

Nel paziente settico con sanguinamento in atto PFC deve essere somministrato alla dose di 10-15ml/Kg corporeo. Per avere un miglioramento sostanziale della coagulazione è necessario somministrare un volume elevato di plasma (6unità nelle 24h). A causa poi della diversa emivita dei diversi fattori della coagulazione la somministrazione ripetuta di PFC potrebbe portare a uno squilibrio coagulativo tra fattori a breve e lunga emivita.

Il trattamento con fattori concentrati della coagulazione non è consigliabile, in quanto, questi ultimi, possono essere contaminati con tracce di fattori attivanti la coagulazione peggiorandone il quadro clinico. Infine anche se questi fattori fossero selezionati sarebbero comunque poco utili in quanto ciò che è alterato è tutto l'assetto coagulativo(84).

La plasmateresi è indicata nella porpora fulminans sepsi-indotta.

### **FATTORE rVII**

Il fattore rVII viene usato nei pazienti con grave sanguinamento non responsivo alla terapia convenzionale. Il bolo iniziale è di 60-120 microg/Kg e potrebbe essere ripetuto dopo 6h se necessario. Se le PTL fossero inferiori a 20000 vanno somministrate in parallelo dal momento che l'effetto è PTL dipendente. In letteratura sono pochissimi i casi di pazienti settici in DIC trattati con rFVIIa. Martinez (85) ha dimostrato blocco del sanguinamento in un caso di paziente settico traumatizzato. AA lo hanno utilizzato nella Dengue-shock syndrom (86). L'uso di questo farmaco

nel settico è controverso. Il suo meccanismo d'azione è ancora in studio. Tuttavia AA (84) ritengono che la sua azione sia limitata al sito danneggiato sanguinante senza che ci sia una attivazione sistemica della coagulazione. In questa ottica il fattore rFVIIa potrebbe essere utilizzato anche nel settico qualora i trattamenti convenzionali siano falliti.

## **TERAPIA CON AT**

Se il paziente è in terapia con CVVH o altre procedure extracorporee e presentasse bassi livelli di AT se in terapia con eparina non frazionata o a basso peso molecolare ne è indicata la somministrazione(44).

Il target da raggiungere sono livelli in range della AT.

I livelli di AT dovrebbero essere dosati quotidianamente nei pazienti sottoposti a emofiltrazione. I pazienti con sepsi e tromboembolismo venoso o polmonare trattato con eparina non frazionata o a basso peso molecolare così come i pazienti con deficit di trombina ereditaria dovrebbero essere trattati con AT, se l'antitrombina plasmatica è al di sotto del 60% .

I risultati ottenuti dal KyberSept non raccomandano l'uso della AT nel paziente settico, anzi ne negano l'efficacia.

Tuttavia Hoffman (87) recentemente in uno studio svolto su 40 pazienti, gravemente settici, ha dimostrato miglioramento dei parametri coagulativi nei pazienti che ricevevano alti dosaggi di ATIII( atti a raggiungere il 120%.)

Secondo La Rosa (76 ) quindi, in futuro, l'uso di AT ma anche di altri anticoagulanti dovrebbero essere rivalutati anche alla luce di diversità individuali dei pazienti, e in termini di dosaggio, di durata del trattamento.

Un altro punto debole di questo lavoro era l'incapacità di raggiungere i dosaggi ematici di AT prefissati.

In base al dosaggio stabilito i pazienti dovevano raggiungere livelli di AT >al 200%, in realtà il valore medio raggiunto era del 180%.. I dati preclinici sembravano indicare che per ottenere le potenzialità terapeutiche dovevano essere raggiunti dosaggi sovralfisiologici. L'outcome dei pazienti con livelli >200 avevano outcome migliore a 28 giorni. Non è accertato il motivo per cui i dosaggi sperati in circolo non sono stati raggiunti. Una possibile ipotesi è che tutti i pazienti ricevevano 30000UI di AT indipendentemente dal peso corporeo a dal livello plasmatico della antitrombina.

Altro risultato inaspettato era la documentazione di un aumentato rischio di sanguinamento nei pazienti a cui venivano somministrati bassi dosaggi di eparina in concomitanza alla AT. Il rischio di sanguinamento era del 23,8% nei pazienti trattati anche con eparina e del 17,8 % nei non trattati.

## **TFPI**

Non è ancora completamente chiaro qual è o quali sono i meccanismi protettivi dell'TFPI e quale è il dosaggio per ottenerne l'effetto desiderato (76). Sarebbe necessario testare dosaggi >0,05 mg/Kg/h in un gruppo allargato di pazienti e saggiarne l'effetto anti-flogistico, anticoagulante e la reale efficacia (76). Secondo La Rosa potrebbe essere utile testarlo in un gruppo omogeneo di pazienti come quelli affetti da pneumonia (trial in corso). Inoltre lo stesso autore auspica che questi studi vengano svolti in assenza di eparina.

## CONCENTRATI DI PC NEL TRATTAMENTO DELLA SEPSI GRAVE

L'uso terapeutico del concentrato PC nella sepsi grave era già stato preso in considerazione a partire dai primi anni '90.

I livelli plasmatici di PC sono raggiunti dopo circa 30' 60' minuti dall'infusione e rimangono elevati per 6 ore con dosaggi 50 e 100IU/KG mentre quelli che ne ricevevano dai 100 ai 150 UI/KG mantenevano livelli di PC normali per 72 h. (studio a doppio cieco sui bambini affetti da sepsi da meningococco e porpora fulminans). Nessuna variazione di PC si evidenziava in caso di somministrazione di placebo.

La conversione della PC in APC si notava nella maggior parte dei pazienti che avevano ricevuto PC dopo 30' 60' ed era dose dipendente. Tuttavia solo i pazienti che ricevevano alti dosaggi di PC concentrato presentavano un significativo incremento plasmatico della APC che raggiungeva livelli 3-4 volte superiori a quelli basali durante le prime 72 h dalla somministrazione.

In tutti i pazienti tuttavia i livelli di APC ritornavano al di sotto dei livelli basali dopo circa 6 h. Una dose cumulativa di PC pare necessaria per mantenere la attivazione di PC e per mantenere l'elevata attività di APC potrebbe essere necessario fare boli almeno entro 6 ore.

La proteina C è una serin proteasi con azione anticoagulativa, antiflogistica che gioca un ruolo essenziale nella emostasi vascolare ed è stato dimostrato che la PCA ricombinante (drotrecogin alfa) riduce la mortalità nel paziente settico.

Importanza fisiologica della PC è dimostrata dalla pratica clinica: il suo deficit comporta svariate e gravi patologie trombotiche per esempio in omozigosi nei bambini porta a porpora fulminante potenzialmente letale e negli adulti in eterozigosi porta ad elevato rischio di TVP.

A causa della alta specificità nelle azioni interattive, è possibile alterare specifici substrati per le serin proteasi in genere e in particolare per la APC sostituendo aminoacidi che sono locati in importanti siti di contatto con altri substrati, tali da modificarne l'attività biologica.

Intento della ingegneria genetica potrebbe essere quella di limitare la inattivazione della APC attraverso la a-AT proprio in quelle patologie in cui è alta la presenza delle serpine.

Nel trattamento dello shock settico, o della sepsi grave, con almeno 2 insufficienze d'organo, il trattamento con rhAPC è attualmente raccomandato, in assenza di controindicazioni.

Le nuove linee guida (2008) Surviving Sepsis Campaign suggeriscono che i pazienti con disfunzione d'organo associato a condizioni cliniche di alto rischio di morte, la maggior parte dei quali hanno un APACHE >25, o MOF sia somministrata rhAPC se non ci sono controindicazioni (Grado 2B di evidenza eccetto per i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico negli ultimi 30 giorni dove il Grado di evidenza è 2C)

## Xigris<sup>®</sup> Drotrecogin alfa (activated)

### DESCRIPTION

Xigris<sup>®</sup> (drotrecogin alfa (activated)) is a recombinant form of human Activated Protein C. An established human cell line possessing the complementary DNA for the inactive human Protein C zymogen secretes the protein into the fermentation medium. Fermentation is carried out in a nutrient medium containing the antibiotic geneticin sulfate. Geneticin sulfate is not detectable in the final product. Human Protein C is enzymatically activated by cleavage with thrombin and subsequently purified.

Drotrecogin alfa (activated) is a serine protease with the same amino acid sequence as human plasma-derived Activated Protein C. Drotrecogin alfa (activated) is a glycoprotein of approximately 55 kilodalton molecular weight, consisting of a heavy chain and a light chain linked by a disulfide bond. Drotrecogin alfa (activated) and human plasma-derived Activated Protein C have the same sites of glycosylation, although some differences in the glycosylation structures exist.

Xigris is supplied as a sterile, lyophilized, white to off-white powder for intravenous infusion. The 5 and 20 mg vials of Xigris contain 5.3 mg and 20.8 mg of drotrecogin alfa (activated), respectively. The 5 and 20 mg vials of Xigris also contain 40.3 and 158.1 mg of sodium chloride, 10.9 and 42.9 mg of sodium citrate, and 31.8 and 124.9 mg of sucrose, respectively.

### CLINICAL PHARMACOLOGY

#### General Pharmacology

Activated Protein C exerts an antithrombotic effect by inhibiting Factors Va and VIIIa. *In vitro* data indicate that Activated Protein C has indirect profibrinolytic activity through its ability to inhibit plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and limiting generation of activated thrombin-activatable-fibrinolysis-inhibitor. Additionally, *in vitro* data indicate that Activated Protein C may exert an anti-inflammatory effect by inhibiting human tumor necrosis factor production by monocytes, by blocking leukocyte adhesion to selectins, and by limiting the thrombin-induced inflammatory responses within the microvascular endothelium.

#### Pharmacodynamics

The specific mechanisms by which Xigris exerts its effect on survival in patients with severe sepsis are not completely understood. In patients with severe sepsis, Xigris infusions of 48 or 96 hours produced dose dependent declines in D-dimer and IL-6. Compared to placebo, Xigris-treated patients experienced more rapid declines in D-dimer, PAI-1 levels, thrombin-antithrombin levels, prothrombin F1.2, IL-6, more rapid increases in protein C and antithrombin levels, and normalization of plasminogen. As assessed by infusion duration, the maximum observed pharmacodynamic effect of drotrecogin alfa (activated) on D-dimer levels occurred at the end of 96 hours of infusion for the 24 mcg/kg/hr treatment group.

#### Human Pharmacokinetics

Xigris and endogenous Activated Protein C are inactivated by endogenous plasma protease inhibitors. Plasma concentrations of endogenous Activated Protein C in healthy subjects and patients with severe sepsis are usually below detection limits.

In patients with severe sepsis, Xigris infusions of 12 mcg/kg/hr to 30 mcg/kg/hr rapidly produce steady state concentrations ( $C_{ss}$ ) that are proportional to infusion rates. In the Phase 3 trial (*see* **CLINICAL STUDIES**), the median clearance of Xigris was 40 L/hr (interquartile range of 27 to 52 L/hr). The median  $C_{ss}$  of 45 ng/mL (interquartile range of 35 to 62 ng/mL) was attained within 2 hours after starting infusion. In the majority of patients, plasma concentrations

of Xigris fell below the assay's quantitation limit of 10 ng/mL within 2 hours after stopping infusion. Plasma clearance of Xigris in patients with severe sepsis is approximately 50% higher than that in healthy subjects.

### Special Populations

In adult patients with severe sepsis, small differences were detected in the plasma clearance of Xigris with regard to age, gender, hepatic dysfunction, or renal dysfunction. Dose adjustment is not required based on these factors alone or in combination (*see* **PRECAUTIONS**).

*End stage renal disease* — Patients with end stage renal disease requiring chronic renal replacement therapy were excluded from the Phase 3 study. In patients without sepsis undergoing hemodialysis (n=6), plasma clearance (mean  $\pm$  SD) of Xigris administered on non-dialysis days was  $30 \pm 8$  L/hr. Plasma clearance of Xigris was  $23 \pm 4$  L/hr in patients without sepsis undergoing peritoneal dialysis (n=5). These clearance rates did not meaningfully differ from those in normal healthy subjects ( $28 \pm 9$  L/hr) (n=190).

*Pediatrics* — Data from a placebo-controlled clinical trial in pediatric patients did not establish efficacy of Xigris (*see* **PRECAUTIONS**), therefore no dosage recommendation can be made. The pharmacokinetics of a dose of 24 mcg/kg/hr of Xigris appear to be similar in pediatric and adult patients with severe sepsis.

*Drug-Drug Interactions* — Formal drug interactions studies have not been conducted.

## CLINICAL STUDIES

### Study 1

The efficacy of Xigris was studied in an international, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial (PROWESS) of 1690 patients with severe sepsis.<sup>1</sup> Entry criteria included a systemic inflammatory response presumed due to infection and at least one associated acute organ dysfunction. Acute organ dysfunction was defined as one of the following: cardiovascular dysfunction (shock, hypotension, or the need for vasopressor support despite adequate fluid resuscitation); respiratory dysfunction (relative hypoxemia (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio <250)); renal dysfunction (oliguria despite adequate fluid resuscitation); thrombocytopenia (platelet count <80,000/mm<sup>3</sup> or 50% decrease from the highest value the previous 3 days); or metabolic acidosis with elevated lactic acid concentrations. Patients received a 96-hour infusion of Xigris at 24 mcg/kg/hr or placebo starting within 48 hours after the onset of the first sepsis induced organ dysfunction. Exclusion criteria encompassed patients at high risk for bleeding (*see* **CONTRAINDICATIONS and WARNINGS**), patients who were not expected to survive for 28 days due to a pre-existing, non-sepsis related medical condition, HIV positive patients whose most recent CD<sub>4</sub> count was  $\leq 50$ /mm<sup>3</sup>, patients on chronic dialysis, and patients who had undergone bone marrow, lung, liver, pancreas, or small bowel transplantation.

The primary efficacy endpoint was all-cause mortality assessed 28 days after the start of study drug administration. Prospectively defined subsets for mortality analyses included groups defined by APACHE II score<sup>2</sup> (a score designed to assess risk of mortality based on acute physiology and chronic health evaluation, see <http://www.sfar.org/scores2/scores2.html>), protein C activity, and the number of acute organ dysfunctions at baseline. The APACHE II score was calculated from physiologic and laboratory data obtained within the 24-hour period immediately preceding the start of study drug administration irrespective of the preceding length of stay in the Intensive Care Unit.

The study was terminated after a planned interim analysis due to significantly lower mortality in patients on Xigris than in patients on placebo (210/850, 25% versus 259/840, 31% p=0.005, see Table 1).

Baseline APACHE II score, as measured in PROWESS, was correlated with risk of death; among patients receiving placebo, those with the lowest APACHE II scores had a 12% mortality rate, while those in the 2nd, 3rd, and 4th APACHE quartiles had mortality rates of 26%, 36%,

of Xigris fell below the assay's quantitation limit of 10 ng/mL within 2 hours after stopping infusion. Plasma clearance of Xigris in patients with severe sepsis is approximately 50% higher than that in healthy subjects.

### Special Populations

In adult patients with severe sepsis, small differences were detected in the plasma clearance of Xigris with regard to age, gender, hepatic dysfunction, or renal dysfunction. Dose adjustment is not required based on these factors alone or in combination (*see* **PRECAUTIONS**).

*End stage renal disease* — Patients with end stage renal disease requiring chronic renal replacement therapy were excluded from the Phase 3 study. In patients without sepsis undergoing hemodialysis (n=6), plasma clearance (mean  $\pm$  SD) of Xigris administered on non-dialysis days was  $30 \pm 8$  L/hr. Plasma clearance of Xigris was  $23 \pm 4$  L/hr in patients without sepsis undergoing peritoneal dialysis (n=5). These clearance rates did not meaningfully differ from those in normal healthy subjects ( $28 \pm 9$  L/hr) (n=190).

*Pediatrics* — Data from a placebo-controlled clinical trial in pediatric patients did not establish efficacy of Xigris (*see* **PRECAUTIONS**), therefore no dosage recommendation can be made. The pharmacokinetics of a dose of 24 mcg/kg/hr of Xigris appear to be similar in pediatric and adult patients with severe sepsis.

*Drug-Drug Interactions* — Formal drug interactions studies have not been conducted.

## CLINICAL STUDIES

### Study 1

The efficacy of Xigris was studied in an international, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial (PROWESS) of 1690 patients with severe sepsis.<sup>1</sup> Entry criteria included a systemic inflammatory response presumed due to infection and at least one associated acute organ dysfunction. Acute organ dysfunction was defined as one of the following: cardiovascular dysfunction (shock, hypotension, or the need for vasopressor support despite adequate fluid resuscitation); respiratory dysfunction (relative hypoxemia (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio <250)); renal dysfunction (oliguria despite adequate fluid resuscitation); thrombocytopenia (platelet count <80,000/mm<sup>3</sup> or 50% decrease from the highest value the previous 3 days); or metabolic acidosis with elevated lactic acid concentrations. Patients received a 96-hour infusion of Xigris at 24 mcg/kg/hr or placebo starting within 48 hours after the onset of the first sepsis induced organ dysfunction. Exclusion criteria encompassed patients at high risk for bleeding (*see* **CONTRAINDICATIONS and WARNINGS**), patients who were not expected to survive for 28 days due to a pre-existing, non-sepsis related medical condition, HIV positive patients whose most recent CD<sub>4</sub> count was  $\leq 50$ /mm<sup>3</sup>, patients on chronic dialysis, and patients who had undergone bone marrow, lung, liver, pancreas, or small bowel transplantation.

The primary efficacy endpoint was all-cause mortality assessed 28 days after the start of study drug administration. Prospectively defined subsets for mortality analyses included groups defined by APACHE II score<sup>2</sup> (a score designed to assess risk of mortality based on acute physiology and chronic health evaluation, see <http://www.sfar.org/scores2/scores2.html>), protein C activity, and the number of acute organ dysfunctions at baseline. The APACHE II score was calculated from physiologic and laboratory data obtained within the 24-hour period immediately preceding the start of study drug administration irrespective of the preceding length of stay in the Intensive Care Unit.

The study was terminated after a planned interim analysis due to significantly lower mortality in patients on Xigris than in patients on placebo (210/850, 25% versus 259/840, 31% p=0.005, see Table 1).

Baseline APACHE II score, as measured in PROWESS, was correlated with risk of death; among patients receiving placebo, those with the lowest APACHE II scores had a 12% mortality rate, while those in the 2nd, 3rd, and 4th APACHE quartiles had mortality rates of 26%, 36%,



and 49%, respectively. The observed mortality difference between Xigris and placebo was limited to the half of patients with higher risk of death, i.e., APACHE II score  $\geq 25$ , the 3rd and 4th quartile APACHE II scores (Table 1). The efficacy of Xigris has not been established in patients with lower risk of death, e.g., APACHE II score  $< 25$ .

**Table 1: 28-Day All-Cause Mortality for All Patients and for Subgroups Defined by APACHE II Score<sup>a</sup>**

	Xigris Total N <sup>b</sup>	N <sup>c</sup> (%)	Placebo Total N <sup>b</sup>	N <sup>c</sup> (%)	Absolute Mortality Difference (%)	Relative Risk (RR)	95% CI for RR
<b>Overall</b>	850	210 (25)	840	259 (31)	-6	0.81	0.70, 0.93
APACHE II quartile (score)							
<b>1st + 2nd (3-24)</b>	436	82 (19)	437	83 (19)	0	0.99	0.75, 1.30
<b>3rd + 4th (25-53)</b>	414	128 (31)	403	176 (44)	-13	0.71	0.59, 0.85

<sup>a</sup> For more information on calculating the APACHE II score, see: <http://www.sfar.org/scores2/scores2.html>

<sup>b</sup> Total N=Total number of patients in group.

<sup>c</sup> N=Number of deaths in group.

Of measures used, the APACHE II score was most effective in classifying patients by risk of death within 28 days and by likelihood of benefit from Xigris, but other important indicators of risk or severity also supported an association between likelihood of Xigris benefit and risk of death. Absolute reductions in mortality of 2%, 5%, 8%, and 11% with Xigris were observed for patients with 1, 2, 3, and 4 or more organ dysfunctions, respectively. Similarly, each of the three major components of the APACHE II score (acute physiology score, chronic health score, age score) identified a higher risk population with larger mortality differences associated with treatment. That is, the reduction in mortality was greater in patients with more severe physiologic disturbances, in patients with serious underlying disease predating sepsis, and in older patients.

Treatment-associated reductions in mortality were observed in patients with normal protein C levels and those with low protein C levels. No substantial differences in Xigris treatment effects were observed in subgroups defined by gender, ethnic origin, or infectious agent.

### Long-Term Follow-Up (Study 1)

The one-year survival status was provided for 93% of the 1690 PROWESS subjects. For patients with APACHE II score  $\geq 25$ , mortality was lower for the Xigris group compared to the placebo group through 90-days (41% versus 52%; RR: 0.72, 95% CI: 0.59-0.88) and through 1 year (48% versus 59%; RR: 0.73, 95% CI: 0.60-0.88).

However, for patients with APACHE II score  $< 25$ , mortality was higher for the Xigris group compared to the placebo group through 90-days (27% versus 25%; RR: 1.09, 95% CI: 0.84-1.42) and through 1 year (35% versus 28%; RR: 1.24, 95% CI: 0.97-1.58).

### Study 2

A randomized, double-blind, placebo-controlled trial (ADDRESS) of Xigris (96-hour infusion of Xigris at 24 mcg/kg/hr) was performed in adult patients with severe sepsis who were not at high risk of death. Most patients had APACHE II score  $< 25$  or only one sepsis-induced organ failure. The study was stopped at an interim analysis after enrollment of 2640 patients due to futility. All-cause mortality at 28 days after randomization was 18% (243/1333) in patients randomized to Xigris and 17% (221/1307) in patients randomized to placebo (RR: 1.08, 95% CI: 0.91-1.27).

The results of Studies 1 and 2 do not provide evidence of benefit of Xigris in patients with severe sepsis who are not at high risk of death (e.g., patients with single-organ dysfunction or APACHE II score  $< 25$ ). Xigris is not indicated for such patients.

### INDICATIONS AND USAGE

Xigris is indicated for the reduction of mortality in adult patients with severe sepsis (sepsis associated with acute organ dysfunction) who have a high risk of death (e.g., as determined by APACHE II, *see* **CLINICAL STUDIES**).

Xigris is not indicated in adult patients with severe sepsis and lower risk of death (*see* **CLINICAL STUDIES**). Safety and efficacy have not been established in pediatric patients with severe sepsis.

### CONTRAINDICATIONS

Xigris increases the risk of bleeding. Xigris is contraindicated in patients with the following clinical situations in which bleeding could be associated with a high risk of death or significant morbidity:

- Active internal bleeding
- Recent (within 3 months) hemorrhagic stroke
- Recent (within 2 months) intracranial or intraspinal surgery, or severe head trauma
- Trauma with an increased risk of life-threatening bleeding
- Presence of an epidural catheter
- Intracranial neoplasm or mass lesion or evidence of cerebral herniation

Xigris is contraindicated in patients with known hypersensitivity to drotrecogin alfa (activated) or any component of this product.

### WARNINGS

#### Bleeding

Bleeding is the most common serious adverse effect associated with Xigris therapy. Each patient being considered for therapy with Xigris should be carefully evaluated and anticipated benefits weighed against potential risks associated with therapy.

Certain conditions, many of which led to exclusion from the Phase 3 trial, are likely to increase the risk of bleeding with Xigris therapy. For individuals with one or more of the following conditions, the increased risk of bleeding should be carefully considered when deciding whether to use Xigris therapy:

- Concurrent therapeutic dosing of heparin to treat an active thrombotic or embolic event (*see* **PRECAUTIONS, Drug Interactions**)
- Platelet count  $<30,000 \times 10^6/L$ , even if the platelet count is increased after transfusions
- Prothrombin time-INR  $>3.0$
- Recent (within 6 weeks) gastrointestinal bleeding
- Recent administration (within 3 days) of thrombolytic therapy
- Recent administration (within 7 days) of oral anticoagulants or glycoprotein IIb/IIIa inhibitors
- Recent administration (within 7 days) of aspirin  $>650$  mg per day or other platelet inhibitors
- Recent (within 3 months) ischemic stroke (*see* **CONTRAINDICATIONS**)
- Intracranial arteriovenous malformation or aneurysm
- Known bleeding diathesis
- Chronic severe hepatic disease
- Any other condition in which bleeding constitutes a significant hazard or would be particularly difficult to manage because of its location

Should clinically important bleeding occur, immediately stop the infusion of Xigris. Continued use of other agents affecting the coagulation system should be carefully assessed. Once adequate hemostasis has been achieved, continued use of Xigris may be reconsidered.

Xigris should be discontinued 2 hours prior to undergoing an invasive surgical procedure or procedures with an inherent risk of bleeding. Once adequate hemostasis has been achieved, initiation of Xigris may be reconsidered 12 hours after major invasive procedures or surgery or restarted immediately after uncomplicated less invasive procedures.

#### **Mortality in Patients with Single Organ Dysfunction and Recent Surgery**

Among the small number of patients enrolled in PROWESS with single organ dysfunction and recent surgery (surgery within 30 days prior to study treatment) all-cause mortality was numerically higher in the Xigris group (28-day: 10/49; in-hospital: 14/48) compared to the placebo group (28-day: 8/49; in-hospital: 8/47).

In an analysis of the subset of patients with single organ dysfunction and recent surgery from a separate, randomized, placebo-controlled study (ADDRESS) of septic patients not at high risk of death all-cause mortality was also higher in the Xigris group (28-day: 67/323; in-hospital: 76/325) compared to the placebo group (28-day: 44/313; in-hospital: 62/314). Patients with single organ dysfunction and recent surgery may not be at high risk of death irrespective of APACHE II score and therefore not among the indicated population.

### **PRECAUTIONS**

#### **Laboratory Tests**

Most patients with severe sepsis have a coagulopathy that is commonly associated with prolongation of the activated partial thromboplastin time (APTT) and the prothrombin time (PT). Xigris may variably prolong the APTT. Therefore, the APTT cannot be reliably used to assess the status of the coagulopathy during Xigris infusion. Xigris has minimal effect on the PT and the PT can be used to monitor the status of the coagulopathy in these patients.

#### **Immunogenicity**

As with all therapeutic proteins, there is a potential for immunogenicity. The incidence of antibody development in patients receiving Xigris has not been adequately determined, as the assay sensitivity is inadequate to reliably detect all potential antibody responses. One patient in the Phase 2 trial developed antibodies to Xigris without clinical sequelae. One patient in the Phase 3 trial who developed antibodies to Xigris developed superficial and deep vein thrombi during the study, and died of multi-organ failure on day 36 post-treatment but the relationship of this event to antibody is not clear.

Xigris has not been readministered to patients with severe sepsis.

#### **Drug Interactions**

Drug interaction studies with Xigris have not been performed in patients with severe sepsis. However, since there is an increased risk of bleeding with Xigris, caution should be employed when Xigris is used with other drugs that affect hemostasis (*see CLINICAL PHARMACOLOGY, WARNINGS*). Approximately 2/3 of the patients in the Phase 3 study received either prophylactic low dose heparin (unfractionated heparin up to 15,000 units/day) or prophylactic doses of low molecular weight heparins as indicated in the prescribing information for the specific products. Concomitant use of prophylactic low dose heparin did not appear to affect safety, however, its effects on the efficacy of Xigris have not been evaluated in an adequate and well-controlled clinical trial.

#### **Drug/Laboratory Test Interaction**

Because Xigris may affect the APTT assay, Xigris present in plasma samples may interfere with one-stage coagulation assays based on the APTT (such as factor VIII, IX, and XI assays). This interference may result in an apparent factor concentration that is lower than the true concentration. Xigris present in plasma samples does not interfere with one-stage factor assays based on the PT (such as factor II, V, VII, and X assays).

### **Carcinogenesis, Mutagenesis, Impairment of Fertility**

Long-term studies in animals to evaluate potential carcinogenicity of Xigris have not been performed.

Xigris was not mutagenic in an *in vivo* micronucleus study in mice or in an *in vitro* chromosomal aberration study in human peripheral blood lymphocytes with or without rat liver metabolic activation.

The potential of Xigris to impair fertility has not been evaluated in male or female animals.

### **Pregnancy Category C**

Animal reproductive studies have not been conducted with Xigris. It is not known whether Xigris can cause fetal harm when administered to a pregnant woman or can affect reproduction capacity. Xigris should be given to pregnant women only if clearly needed.

### **Nursing Mothers**

It is not known whether Xigris is excreted in human milk or absorbed systemically after ingestion. Because many drugs are excreted in human milk, and because of the potential for adverse effects on the nursing infant, a decision should be made whether to discontinue nursing or discontinue the drug, taking into account the importance of the drug to the mother.

### **Pediatric Use**

Data from a placebo-controlled trial in 477 patients did not establish efficacy of Xigris in pediatric patients.

This study stopped for futility after a planned interim analysis showed that Xigris was highly unlikely to show an improvement over placebo in the primary endpoint of "Composite Time to Complete Organ Failure Resolution" over 14 days. Overall 28-day mortality was similar between the Xigris and placebo groups (41/240 versus 41/237), with 2 deaths in the Xigris group and 5 deaths in the placebo group attributed to bleeding events.

There was a higher rate of central nervous system (CNS) bleeding in the Xigris versus the placebo group. Over the infusion period (study days 0-6) the number of patients experiencing CNS bleeding was 5 versus 1 for the overall population (Xigris versus placebo), with 4 of the 5 events in the Xigris group occurring in patients  $\leq 60$  days or  $\leq 3$  kg. Fatal CNS bleeding events, serious bleeding events (over the infusion period and over the 28-day study period), serious adverse events, and major amputations were similar in the Xigris and placebo groups.

### **Geriatric Use**

In clinical studies evaluating 1821 patients with severe sepsis, approximately 50% of the patients were 65 years or older. No overall differences in safety or effectiveness were observed between these patients and younger patients.

## **ADVERSE REACTIONS**

### **Bleeding**

Bleeding is the most common adverse reaction associated with Xigris.

In the Phase 3 study, serious bleeding events were observed during the 28-day study period in 3.5% of Xigris-treated and 2.0% of placebo-treated patients, respectively. The difference in serious bleeding between Xigris and placebo occurred primarily during the infusion period and is shown in Table 2.<sup>1</sup> Serious bleeding events were defined as any intracranial hemorrhage, any life-threatening bleed, any bleeding event requiring the administration of  $\geq 3$  units of packed red blood cells per day for 2 consecutive days, or any bleeding event assessed as a serious adverse event.

**Table 2: Number of Patients Experiencing a Serious Bleeding Event by Site of Hemorrhage During the Study Drug Infusion Period<sup>a</sup> In PROWESS<sup>1</sup>**

	<b>Xigris N=850</b>	<b>Placebo N=840</b>
<b>Total</b>	<b>20 (2.4%)</b>	<b>8 (1.0%)</b>
Site of Hemorrhage		
Gastrointestinal	5	4
Intra-abdominal	2	3
Intra-thoracic	4	0
Retroperitoneal	3	0
Intracranial	2	0
Genitourinary	2	0
Skin/soft tissue	1	0
Other <sup>b</sup>	1	1

<sup>a</sup> Study drug infusion period is defined as the date of initiation of study drug to the date of study drug discontinuation plus the next calendar day.

<sup>b</sup> Patients requiring the administration of  $\geq 3$  units of packed red blood cells per day for 2 consecutive days without an identified site of bleeding.

In PROWESS, 2 cases of intracranial hemorrhage (ICH) occurred during the infusion period for Xigris-treated patients and no cases were reported in the placebo patients. The incidence of ICH during the 28-day study period was 0.2% for Xigris-treated patients and 0.1% for placebo-treated patients. ICH has been reported in patients receiving Xigris in non-placebo controlled trials with an incidence of approximately 1% during the infusion period. The risk of ICH may be increased in patients with risk factors for bleeding such as severe coagulopathy and severe thrombocytopenia (*see* **WARNINGS**).

In PROWESS, 25% of the Xigris-treated patients and 18% of the placebo-treated patients experienced at least one bleeding event during the 28-day study period. In both treatment groups, the majority of bleeding events were ecchymoses or gastrointestinal tract bleeding.

#### **Other Adverse Reactions**

Patients administered Xigris as treatment for severe sepsis experience many events which are potential sequelae of severe sepsis and may or may not be attributable to Xigris therapy. In clinical trials, there were no types of non-bleeding adverse events suggesting a causal association with Xigris.

#### **OVERDOSAGE**

There is no known antidote for Xigris. In case of overdose, immediately stop the infusion and monitor closely for hemorrhagic complications (*see* **Human Pharmacokinetics**).

In postmarketing experience there have been a limited number of medication error reports of excessive rate of Xigris infusion for short periods of time (median 2 hours). No unexpected adverse events were observed during the overdose period. However, this information is insufficient to assess whether Xigris overdose is associated with an increased hemorrhage risk beyond that observed with Xigris administered at the recommended dose.

#### **DOSAGE AND ADMINISTRATION**

Xigris should be administered intravenously at an infusion rate of 24 mcg/kg/hr (based on actual body weight) for a total duration of infusion of 96 hours. Dose adjustment based on clinical or laboratory parameters is not recommended (*see* **PRECAUTIONS**).

If the infusion is interrupted, Xigris should be restarted at the 24 mcg/kg/hr infusion rate. Dose escalation or bolus doses of Xigris are not recommended.

In the event of clinically important bleeding, immediately stop the infusion (*see WARNINGS*).

**Preparation and Administration Instructions:**

1. Use appropriate aseptic technique during the preparation of Xigris for intravenous administration.
2. Calculate the approximate amount of Xigris needed based upon the patient's actual body weight and duration of this infusion period. The maximum duration of infusion from one preparation step is 12 hours. Multiple infusion periods will be needed to cover the entire 96-hour duration of administration.

$$\text{mg of Xigris} = (\text{patient weight, kg}) \times 24 \text{ mcg/kg/hr} \times (\text{hours of infusion}) \div 1000$$

Round the actual amount of Xigris to be prepared to the nearest 5 mg increment to avoid discarding reconstituted Xigris.

3. Determine the number of vials of Xigris needed to make up this amount.
4. Reconstitute each vial of Xigris with Sterile Water for Injection, USP. The 5 mg vials must be reconstituted with 2.5 mL; the 20 mg vials with 10 mL. Slowly add the Sterile Water for Injection, USP to the vial and avoid inverting or shaking the vial. Gently swirl each vial until the powder is completely dissolved. The resulting Xigris concentration of the solution is 2 mg/mL.
5. Xigris contains no antibacterial preservatives; the intravenous solution should be prepared immediately after reconstitution of the Xigris in the vial(s). If the vial of reconstituted Xigris is not used immediately, it may be held at controlled room temperature 20° to 25°C (68° to 77°F), but must be used within 3 hours.
6. Inspect the reconstituted Xigris in the vials for particulate matter and discoloration before further dilution. Do not use vials if particulate matter is visible or the solution is discolored.
7. Xigris should be administered via a dedicated intravenous line or a dedicated lumen of a multilumen venous catheter. The ONLY other solutions that can be administered through the same line are 0.9% Sodium Chloride Injection, USP; Lactated Ringer's Injection, USP; Dextrose Injection, USP; and Dextrose and Sodium Chloride Injection, USP.
8. Avoid exposing Xigris solutions to heat and/or direct sunlight. Studies conducted at the recommended concentrations indicate the Xigris intravenous solution to be compatible with glass infusion bottles, and infusion bags and syringes made of polyvinylchloride, polyethylene, polypropylene, or polyolefin.

**Dilution and Administration Instructions for an Intravenous Infusion Pump Using an Infusion Bag:**

1. Complete Preparation and Administration steps 1-8, then complete the next 6 steps.
2. The solution of reconstituted Xigris must be further diluted into an infusion bag containing 0.9% Sodium Chloride Injection, USP to a final concentration of between 0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL. Bag volumes between 50 mL and 250 mL are typical.
3. Confirm that the intended bag volume will result in an acceptable final concentration.

$$\text{Final concentration, mg/mL} = (\text{actual Xigris amount, mg}) \div (\text{bag volume, mL})$$

If the calculated final concentration is not between 0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL select a different bag volume and recalculate the final concentration.

4. Slowly withdraw the reconstituted Xigris solution from the vial(s) and add the reconstituted Xigris into the infusion bag of 0.9% Sodium Chloride Injection, USP. When injecting the Xigris into the infusion bag, direct the stream to the side of the bag to

minimize the agitation of the solution. Gently invert the infusion bag to obtain a homogeneous solution. Do not transport the infusion bag using mechanical transport systems such as pneumatic-tube systems that may cause vigorous agitation of the solution.

- Calculate the actual duration of the infusion period for the diluted Xigris.

$$\text{Infusion period, hours} = (\text{actual Xigris amount, mg}) \times 1000 \div (\text{patient weight, kg}) \div 24 \text{ mcg/kg/hr}$$

- Account for the added volume of reconstituted Xigris (0.5 mL per mg of Xigris used) and the volume of bag saline solution removed (if saline solution is removed prior to adding the reconstituted Xigris).

$$\text{Final bag volume, mL} = \text{starting bag volume, mL} + \text{reconstituted Xigris volume, mL} - \text{saline volume removed (if any), mL}$$

Calculate the actual infusion rate of the diluted Xigris.

$$\text{Infusion rate, mL/hr} = \text{final bag volume, mL} \div \text{infusion period, hours}$$

- After preparation, the intravenous solution should be used at controlled room temperature 20° to 25°C (68° to 77°F) within 14 hours. If the intravenous solution is not administered immediately, the solution may be stored refrigerated 2° to 8°C (36° to 46°F) for up to 12 hours. If the prepared solution is refrigerated prior to administration, **the maximum time limit for use of the intravenous solution, including preparation, refrigeration, and administration, is 24 hours.**

#### Dilution and Administration Instructions for a Syringe Pump:

- Complete Preparation and Administration steps 1-8, then complete the next 7 steps.
- The solution of reconstituted Xigris must be further diluted with 0.9% Sodium Chloride Injection, USP to a final concentration of between 0.1 mg/mL and 1.0 mg/mL.
- Confirm that the intended solution volume will result in an acceptable final concentration.

$$\text{Final concentration, mg/mL} = (\text{actual Xigris amount, mg}) \div (\text{solution volume, mL})$$

If the calculated final concentration is not between 0.1 to 1.0 mg/mL select a different volume and recalculate the final concentration.

- Slowly withdraw the reconstituted Xigris solution from the vial(s) into a syringe that will be used in the syringe pump. Into the same syringe, slowly withdraw 0.9% Sodium Chloride Injection, USP to obtain the desired final volume of diluted Xigris. Gently invert and/or rotate the syringe to obtain a homogenous solution.
- Calculate the actual duration of the infusion period for the diluted Xigris.

$$\text{Infusion period, hours} = (\text{actual Xigris amount, mg}) \times 1000 \div (\text{patient weight, kg}) \div 24 \text{ mcg/kg/hr}$$

- Calculate the actual infusion rate of the diluted Xigris.

$$\text{Infusion rate, mL/hr} = (\text{solution volume, mL}) \div (\text{infusion period, hours})$$

- When administering Xigris using a syringe pump at low concentrations (less than approximately 0.2 mg/mL) with low flow rates (less than approximately 5 mL/hr), the

infusion set must be primed for approximately 15 minutes at a flow rate of approximately 5 mL/hr.

8. After preparation, the intravenous solution should be used at controlled room temperature 20° to 25°C (68° to 77°F) within 12 hours. **The maximum time limit for use of the intravenous solution, including preparation and administration, is 12 hours.**

#### HOW SUPPLIED

Xigris is available in 5 mg and 20 mg single-use vials containing sterile, preservative-free, lyophilized drotrecogin alfa (activated).

#### Vials:

5 mg Vials

NDC 0002-7559-01

20 mg Vials

NDC 0002-7561-01

Xigris should be stored in a refrigerator 2° to 8°C (36° to 46°F). Do not freeze. Protect unconstituted vials of Xigris from light. Retain in carton until time of use. Do not use beyond the expiration date stamped on the vial.

#### REFERENCES

1. Bernard GR, et al. Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344:699-709
2. Knaus WA, et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13:818-29

Literature revised August 18, 2005

**Eli Lilly and Company**  
**Indianapolis, IN 46285, USA**

[www.lilly.com](http://www.lilly.com)

PV 3428 AMP

PRINTED IN USA

Copyright © 2001, 2005, Eli Lilly and Company. All rights reserved.



## 7 MODELLI DI SEPSI

Qualora si infonda 3-4 ng/Kg di LPS i volontari cominciano a sviluppare sintomi simil-influenzali, compresa fatica, mal di testa, nausea. I sintomi compaiono circa 50-90 minuti dopo somministrazione di LPS. Alcuni riportano mialgia, anoressia.

La febbre è un segno importante nella sepsi e nei modelli si vedono incrementi di circa 0.6°C – 1.5°C.

Emodinamica: il battito cardiaco aumenta dal 35-50% e la PAM passa da 99 a 88 mmHg a 5 h dalla somministrazione di LPS.

Leucociti: a un'ora dall'iniezione di LPS c'è un incremento dei leucociti di circa il 50% e ciò si mantiene per le 8 ore successive. Comincia inoltre l'attivazione dei neutrofili che appare evidente dagli aumenti sierici della elastasi neutrofila e dall'incremento dell'espressione dei recettori per il C3b dei neutrofili. I linfociti diminuiscono entro 1 ora e il nadir è raggiunto dopo 4 ore.

Produzione di citochine: si evidenzia un picco di TNF $\alpha$  a 60-90 minuti seguito da IL1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 a 2-3 ore. Il TNF- $\alpha$  è circa 10 volte superiore ai valori basali. In 3-5 ore si ritorna ai livelli di base.

Trombina: è un link tra flogosi e coagulazione nella sepsi. Le cellule infiammatorie, le PTL, e i mediatori della flogosi portano ad un aumento della trombina attraverso diversi meccanismi. Si testa la formazione di trombina attraverso e il frammento 1 + 2 di attivazione della protrombina e il complesso trombina-antitrombina (TATc).

Fibrinolisi: inizialmente viene attivato attraverso il TNF- $\alpha$  mediante il rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno, poi ne consegue una prolungata inibizione a causa del PAI 1 e 2.

Inibitori endogeni della coagulazione: i livelli dei 3 maggiori anticoagulanti (AT3, PC TFPI) sono diminuiti nei pazienti con sepsi. Nei modelli umani la AT3 diminuisce meno del 10% la PC meno del 15% il TFPI non varia.

### Modelli di sepsi negli animali

- generalmente animali giovani
- endotossina o microrganismo ben precisato
- focus settico a partenza dal circolo o da legatura del ceco
- onset rapido
- trattamento rapido
- alto livello di tolleranza anticoagulativa
- tolleranza emorragica

### Paziente settico

- spesso neonato o anziano
- spesso microrganismi sconosciuti
- focus settico di solito a partenza tessutale
- antibiotici spesso inefficaci
- trattamento solitamente tardivo
- onset generalmente lento
- basso livello di tolleranza anticoagulativa
- scarsa tolleranza all'emorragia

Da questi dati si evince che i modelli di sepsi possono essere, solo in parte, utili per comprendere i meccanismi patologici indotti dall'endotossiemia e hanno dei limiti ben precisi.

Drotrecigin alfa è un farmaco che ha dimostrato efficacia nella sepsi nei diversi trials clinici.

Tuttavia in modelli sperimentali umani la ACP ha minimo effetto su sintomi indotti da LPS, sull'emodinamica, sul profilo delle cellule infiammatorie, sulla generazione di trombina, sulla fibrinolisi, sui markers di attivazione cellulare.

I pazienti affetti da sepsi sono scarsamente riproducibili in modelli umani perché il paziente settico è un paziente molto critico e solitamente complesso, pertanto modelli umani che si basano su un'unica iniezione di endotossina appaiono inadeguati. Infatti il paziente settico presenta comorbidità: diabete, insufficienza renale, polimorfismo genetico, complessa cinetica dell' LPS, e lo sviluppo di MOF è generalmente precoce e drammatico. Per comprenderne la complessità bastino alcuni esempi: il pz neoplastico presenta una diminuzione dei leucociti questo già di per sé comporta una incapacità battericida; inoltre nella pratica clinica AA evidenziano come il 50% dei pazienti settici o sono antibiotici-resistenti o ricevono un antibiotico o un'associazione antibiotica del tutto inefficace.

Negli animali se è vero che si potrebbe riprodurre un modello più complesso di sepsi è però altresì vero che in tal caso l'intervento sull'animale studiato è precoce e avviene comunque nelle prime fasi della sepsi quando le citochine sono in aumento e il danno d'organo o di circolo è ancora minimo; mentre nell'uomo solitamente la diagnosi è più tardiva.

Inoltre al paziente settico vengono somministrati numerosi farmaci la cui azione sui mediatori è difficile da determinare.

## 8 NOSTRA ESPERIENZA

**Nel paziente settico grave o in shock settico, in presenza di almeno 2 insufficienze d'organo ed in assenza di controindicazioni, veniva somministrata precocemente la rhAPC.**

Ovviamente il paziente non doveva presentare controindicazioni assolute all'uso del farmaco.

### CONTROINDICAZIONI ASSOLUTE:

- paziente ipersensibile al farmaco o alla trombina
- paziente che presenti un sanguinamento interno
- paziente che presenti una tumefazione al cervello una compressione sul cervello
- paziente che nello stesso periodo è in trattamento con eparina (<15UI/Kg/h)
- paziente che presenti una tendenza al sanguinamento non sepsi correlata
- paziente che presenti da tempo grave insufficienza epatica
- paziente che presenti piastrinopenia nonostante la trasfusione
- paziente che presenti alto rischio di sanguinamento:
  - A) ha avuto un intervento chirurgico nelle ultime 12h o potrebbe esserne sottoposto entro breve tempo
  - B) grave trauma cranico o intervento di neurochirurgico negli ultimi 3 mesi, o un'anomalia ai vasi cerebrali o posizionamento di catetere peridurale
  - C) nato con predisposizione al sanguinamento
  - D) perdita di sangue dall'intestino nelle ultime 6 settimane a meno che non sia stato efficacemente trattato
  - E) ha avuto grave infortunio

### PAZIENTI E METODI

Le UTI dell'Istituto di Anestesia e Rianimazione e dell'OSA venivano valutati per un'eventuale utilizzo della rhAPC seguendo le indicazioni specifiche previste dal farmaco.

Tutti i pazienti con sospetta SEPSI venivano monitorati in modo omogeneo e presentavano monitoraggio arterioso e catetere venoso centrale e potevano essere eventualmente sottoposti a rilievi emodinamici con Swan-Ganz o Picco.

Dopo un riempimento con colloidali e/o cristalloidi si somministravano inotropi positivi a dosaggi stabiliti in base ai parametri emodinamici tali da consentire il raggiungimento di PAM>65mmHg e valori di CI>3,0L.

In caso di necessità, e nonostante le conseguenze di una VAP il paziente veniva intubato e se necessario curarizzato.

Qualora si fossero presentati i segni precoci di IRA, si procedeva a sostituzione precoce della funzione renale (CRRT).

La glicemia era mantenuta ai valori della norma 80 mg/dl < glicemia < 120 mg/dl.

La terapia antibiotica veniva stabilita precocemente con antibiotici a largo spettro in attesa di una terapia mirata dopo risultati delle culture microbiologiche.

Il monitoraggio emocoagulativo era essenziale e ogni 12h venivano eseguiti

- conta PTL

- PT/INR
- PTT
- Fibrinogeno
- FDP
- ATIII
- PC coagulativa

N.B. il dosaggio della PC veniva eseguito con metodo cromogenetico.

In presenza di almeno 2 disfunzioni d'organo il paziente veniva candidato ad trattamento precoce con rhAPC, se il farmaco aveva controindicazione relativa per rischio di sanguinamento si somministrava il farmaco solo con un dosaggio di PC<50%.

## **DOSE SOMMINISTRATA**

PROTEINA C ATTIVATA viene somministrata in infusione continua per 96 h

INFUSIONE CONTINUA 24 mcg/Kg /h

Sono stati sottoposti a trattamento con rhAPC, secondo dosaggio di cui sopra, un totale di 24 pazienti affetti da sepsi grave e/o shock settico.  
Causa di sepsi in questi pazienti erano la infezione polmonare e le peritoniti.

## **RISULTATI**

Sono stati sottoposti a rhAPC un totale di 24 pazienti affetti da sepsi grave e/o shock settico.

Sono deceduti 8 pazienti con una mortalità pari al 30%

I livelli plasmatici di PC coagulativa venivano mantenuti ai valori fisiologici con la dose indicata in precedenza.

In tutti i pazienti si erano ottenuti miglioramento dei parametri coagulativi, in particolare nel paziente con porpora e DIC si erano ottenuto il blocco delle lesioni cutanee.

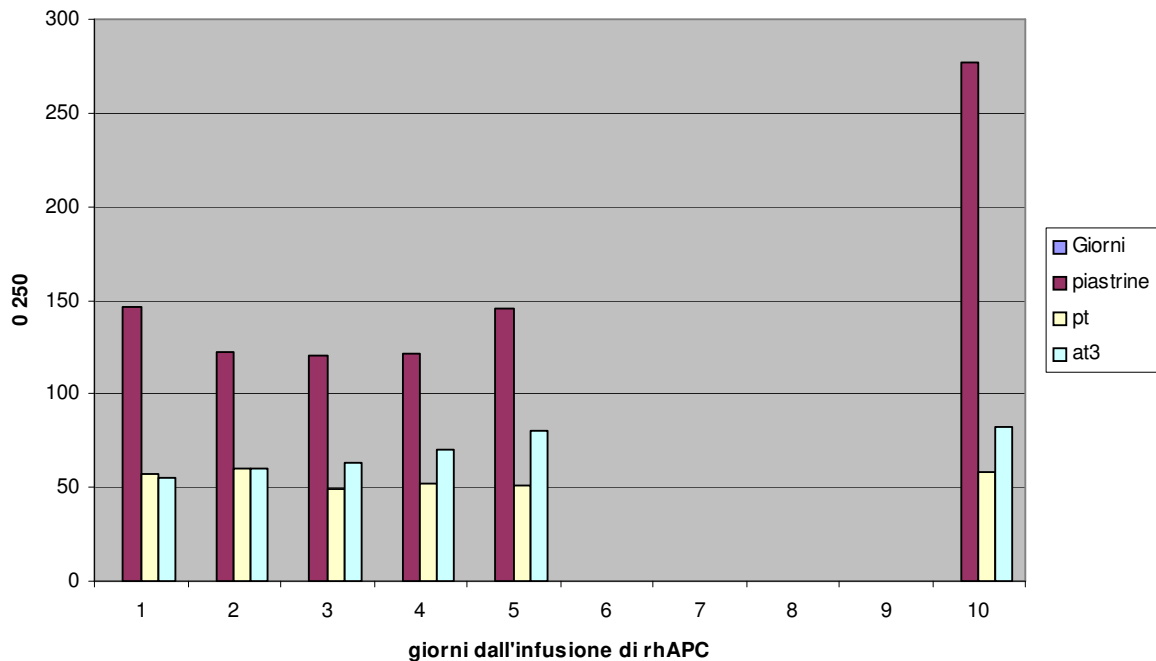
A rigore nei pazienti trattati si osservavano: aumento delle PTL, AT, calo FDP, riduzione dell'acido lattico, anche il SOFA tendeva a scendere.

## CAUSE DI SEPSI :

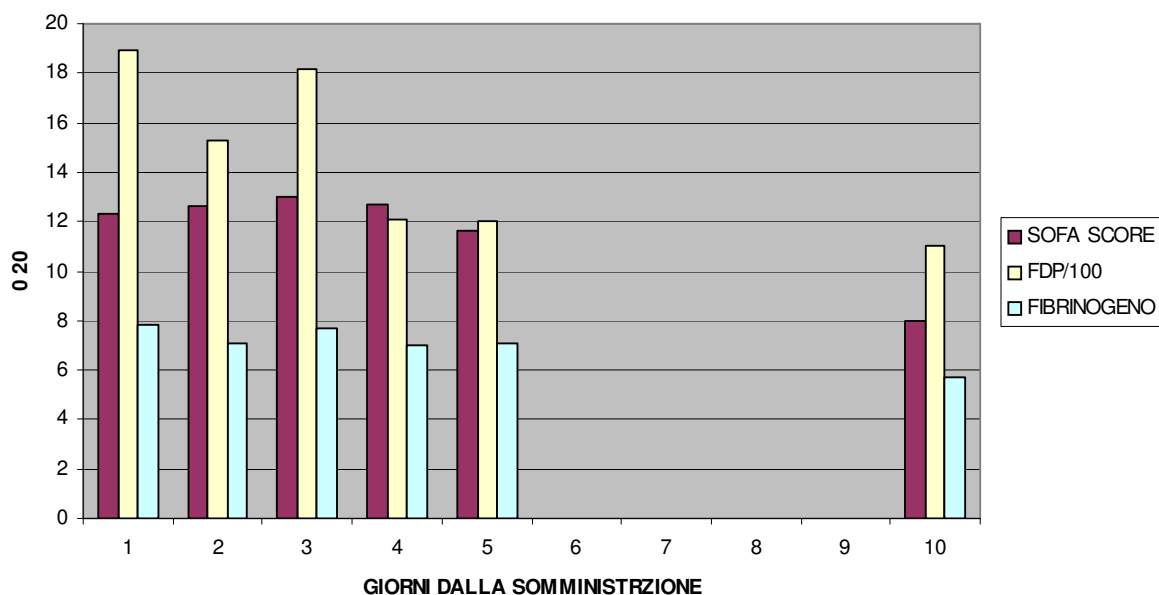
- POLMONARI n°10 di cui 4 legionelle
- PERITONITI n° 7
- SPIROCHETE n°1
- SEPSI PUERPERALE n°1
- MENINGITE n° 3 di cui una da meningococco
- MEDULLOBLASTOMA n° 1
- VIE URINARIE n°1

Come si osserva dal grafico i pazienti andavano incontro ad un miglioramento dei parametri coagulatori in accordo con i risultati ottenuti dal trail in fase III (14) e differiscono dallo studio effettuato da Le Pont su 13 pazienti, nei quali non c'era evidenza di miglioramento dei parametri di laboratorio. Infatti dopo la somministrazione di rhAPC non si osservava un calo significativo dei D-dimeri. Infatti i livelli di D-dimeri erano sovrapponibili a quelli del placebo.

La de Pont(89) come Dhainaut (90) concludeva però che si riducevano i livelli di IL6, dimostrativo della efficacia antiflogistica del farmaco.



VARIAZIONI SOFA SCORE ;FDP; FIBRINOGENO DOPO SOMMINISTRAZIONE rhAPC



## DISCUSSIONE

La netta evidenza che l'attivazione aberrante della cascata coagulativa/flogistica è responsabile di MOF e quindi di morte ha portato a ricercare farmaci che possano limitare lo squilibrio coagulativo e/o anche flogistico.

Attualmente l'unica terapia raccomandata, nella sepsi, a parte il sostegno precoce delle funzioni vitali, il mantenimento del range glicemico, dosaggio basso di corticosteroidi, ventilazione polmonare protettiva, è la rhAPC che si è dimostata efficace nel trattamento della sepsi da meningococco.

L'uso pertanto della terapia estesa ad altre forme di sepsi nasce dalla speranza di ottenere un miglioramento della morbilità e mortalità ancora elevatissime in corso di sepsi grave e shock settico.

L'osservazione e la dimostrazione che nel settico i livelli di PC siano bassi è un segno chiaro dell'alterazione dell'assetto coagulativo e il razionale della somministrazione della PC sarebbe quello di riequilibrare tale assetto ipotizzando che così facendo si interrompa la spirale che porta a MOF.

Noi abbiamo osservato un miglioramento dei parametri coagulativi, in un caso di porpora sopramenzionato anche un miglioramento della clinica, ma l'intento, in futuro, è quello di aumentare il numero di pazienti trattati attraverso uno studio anche multicentrico ai fini di dimostrarne l'efficacia nel ridurre la mortalità. Va da se che questo obiettivo, in questo studio, con una casistica ancora assolutamente ristretta, non può porsi.

## 9. PREMESSA AL PROGETTO DI LAVORO

La sepsi grave e lo shock settico sono la conseguenza di un'estesa, incontrollata, aberrante attivazione della risposta infiammatoria, in risposta ad un microrganismo. Si assiste pertanto ad un'attivazione anomala sia della cascata coagulativa sia di quella flogistica. Infatti i monociti si attivano in modo aberrante e l'endotelio amplifica e perpetua questo processo che inizia come meccanismo di difesa nei confronti del patogeno ma finisce con l'essere una vera e propria aggressione nei confronti dell'ospite (effetto collaterale).

L'endotelio è quindi il target principale e più precoce di eventi fisiopatologici sepsi-indotta.

In condizioni fisiologiche, le cellule endoteliali inibiscono la coagulazione, prevengono l'aggregazione piastrinica, così come la aderenza e la migrazione delle cellule ematiche, regolano il tono vascolare e la vasopermeabilità. Il danno o l'attivazione delle cellule endoteliali a mezzo di citochine o di altri mediatori flogistici porta a imponenti alterazioni funzionali endoteliali.

Questi cambiamenti portano l'endotelio dall'essere una superficie anticoagulante in una procoagulante.

In corso di sepsi i cambiamenti della cascata coagulativa così come il sistema fibrinolitico sono stato lungamente studiati. Molto meno è noto il ruolo e il contributo del VWF.(101)

Il VWF endoteliale è secreto costituzionalmente, in aggiunta le cellule endoteliali immagazzinano VWF primariamente in forma di ULVWF in organelli chiamati corpi di Weibel-Palade. Questo ultimo pool è rilasciato sotto stimolo (per esempio endotossine, citochine o trombina) ed è responsabile della formazione di trombi piastrinici nel microcircolo in TTP (102-103)

Anche se deficit grave di ADAMTS 13 (<5% di attività nel umano normale) sembra essere specifico per TTP, livelli moderatamente ridotti di ADAMTS13 sono stati riscontrati in alcune condizioni patologiche come nella flogosi, nella DIC, trombocitopenie non TTP connesse, cirrosi epatica, gravidanza, e dopo interventi chirurgici (101- 104-105)) Dal momento che nella flogosi si riscontrano livelli elevati di vWF è concettualmente ipotizzabile che in tali pazienti una normale o moderatamente depressa attività dell'ADAMTS13 possa non essere sufficiente a controllare i multimeri del vWF.

Il risultato potrebbe essere un accumulo di ULVWF estremamente adesivi sulla superficie di un endotelio danneggiato, quindi ne deriverebbe una patologica iterazione piastrine-endotelio che in sinergia con altri cambiamenti protrombotici potrebbero contribuire ad amplificare il processo trombotico del microcircolo, a consumare piastrine, a favorire una DIC e a favorire la MOF.

Studi atti alla stimolazione di vWF da parte delle cellule endoteliali mediante desmopressina o endotossina in volontari sani hanno dimostrato una reciproca relazione tra VWF e ADAMTS13.

Altri due recenti studi dimostrano deficit di ADAMTS 13 in un 15% dei pazienti con sepsi grave e nel 31% dei bambini settici. Scopo di questo studio è la valutazione del VWF:Ag, VWF:CBA, multimeri del vWF, propeptide del VWF, e attività e Ag dell'ADAMTS13 in relazione alle citochine IL6; IL8, TNF $\alpha$ , nel paziente settico per un periodo di ventotto giorni. Interessante per noi è inoltre la valutazione del vWF in rapporto alle piastrine e agli altri parametri emocoagulativi.

Alcuni autori hanno evidenziato come condizioni flogistiche possano favorire lo sviluppo di porpora trombotica trombocitopenica (TTP), attraverso l'aumento in circolo di citochine infiammatorie (IL6, IL8 TNF $\alpha$ ) che sembrano stimolare il rilascio di ultralarge von Willebrand Factor (ULVWF) e determinare una insufficiente proteolisi di VWF da parte dell'ADAMTS 13.(102)

Recenti studi suggeriscono che le citochine infiammatorie possano stimolare il rilascio di ULVWF (IL8 e TNF $\alpha$ ) e inibire il clivaggio di ULVWF (IL6) portando ad un accumulo di ULVWF nel plasma e nella superficie delle cellule endoteliali per indurre aggregazione piastrinica ed adesione all'endotelio vascolare.

Infatti IL8 e TNF $\alpha$  e in misura minore IL6 stimolano il rilascio di ULVWF in modo dose dipendente. Inoltre IL6 ma non IL8 e TNF $\alpha$  inibisce il clivaggio dei filamenti di ULVWF in condizioni di alto flusso, ma non in condizioni statiche.

In altre parole questi risultati suggeriscono che le citochine flogistiche potrebbero alterare l'equilibrio tra la quantità di ULVWF rilasciati e livelli clivati dall' ADAMTS13.

Di conseguenza i multimeri potrebbero persistere nelle cellule dell'endotelio vascolare e nel plasma così a lungo da indurre adesione ed aggregazione piastrinica e questo porterebbe a trombosi. Ciò potrebbe rappresentare un' ulteriore conferma del cross-talk tra flogosi e coagulazione.

IL 8 è una chemiochina rilasciata da diversi tipi cellulari in risposta a diversi stimoli flogistici. E' immagazzinata nei corpi di Weibel-Palade, e rilasciata attiva le cellule endoteliali e in particolare quelle del microcircolo, e media la formazione di aggregati piastrine-leucociti. IL8 favorisce il rilascio epatico della proteina C reattiva e del fibrinogeno e promuove la proliferazione delle cellule muscolari lisce.

Il TNF $\alpha$ , principalmente deriva dai monociti e permette il rilascio di IL8 e IL6 e di altre citochine dall'endotelio.

Inoltre si è dimostrato che IL6 ha un effetto procoagulante sulle piastrine e inoltre ne stimolerebbe e produzione e la risposta alla trombina. Si è evidenziato che IL6 inibisce l'attività dell'ADAMTS13 ma come ciò avvenga deve essere ancora dimostrato.

Un meccanismo possibile è che l'IL6 potrebbe indebolire l'ancoraggio dell'ADAMTS13 sui filamenti del ULVWF multimeri sotto alto flusso, questo però pare non verificarsi in condizioni statiche.

La potente influenza dell'IL6 sul clivaggio dell'ULVWF è stato già suggerito da numerose osservazioni cliniche. Infatti i livelli di IL6 aumentano nella TTP in fase di insorgenza e diminuiscono in caso di remissione; naturalmente alti livelli di IL6 sono correlati a prognosi peggiore.

Non ultimo, i pazienti con placche aterosclerotiche e con trombosi arterie coronarie presentavano alti livelli di IL6.

Tutti questi dati fanno pensare che il rilascio di citochine possa alterare quei processi cinetici che convertirebbero gli ULVWF multimeri in forme di VWF meno emostaticamente attive.

Ciò potrebbe essere correlato o ad un aumento degli ULVWF rilasciati che supererebbero la capacità di clivaggio da parte dell'ADAMTS13 o direttamente da una ridotta attività di ADAMTS13.

Va comunque precisato che dal momento che IL6 inibirebbe solo parzialmente l'attività di ADAMTS13, l'evento trombotico non sarebbe da collegare ad un singolo episodio flogistico ma piuttosto a ripetuti eventi di flogosi che porterebbero eventualmente a aterosclerosi e trombosi.

Altri autori, in uno studio retrospettivo, hanno dimostrato come deficit grave secondario di ADAMTS13 possa essere associato a DIC sepsi-indotta e potrebbe contribuire allo sviluppo di insufficienza renale. In questi pazienti il deficit di ADAMTS13 era parzialmente causato dal clivaggio delle proteasi tipo trombina e plasmina che aumentano nei pazienti con DIC e ad una diminuita sintesi epatica proteica. (Inoltre la formazione di microtrombi può forse consumare ADAMTS13)

Il deficit grave di ADAMTS13 presente nei pazienti con DIC-sepsi indotta sarebbe molto comune. Le manifestazioni cliniche e i dati di laboratorio di questi pazienti li renderebbero indistinguibili dagli altri pazienti affetti da PPT. Ciò farebbe pensare che in questi pazienti la patologia sia simile alla TTP.

L'insufficienza d'organo potrebbe poi essere causata dalla formazione di fibrina TF (tissue-factor) dipendente e anche dalla aggregazione piastrinica causata dal grave deficit di ADAMTS13 nei pazienti con DIC-sepsi-indotta con livelli di ADAMTS13 inferiori al 10%. Questo dato è in accordo con la relazione che si è appurata tra deficit di ADAMTS13 e insufficienza renale. La presenza di ULVWF multimeri nel plasma dei pazienti con grave deficit secondario di ADAMTS13 e la sua correlazione con i livelli di creatinina sierica supportano i dati sopradescritti.

In questo studio non si evidenzia tuttavia correlazione tra ULVWF multimeri e livelli di ADAMTS13 ma probabilmente ciò sarebbe dovuto sia a difficoltà tecniche nel determinare ULVWF sia alla variabilità del danno endoteliale tra i diversi pazienti.



Perché nel paziente settico vi sarebbe una riduzione di ADAMTS13?

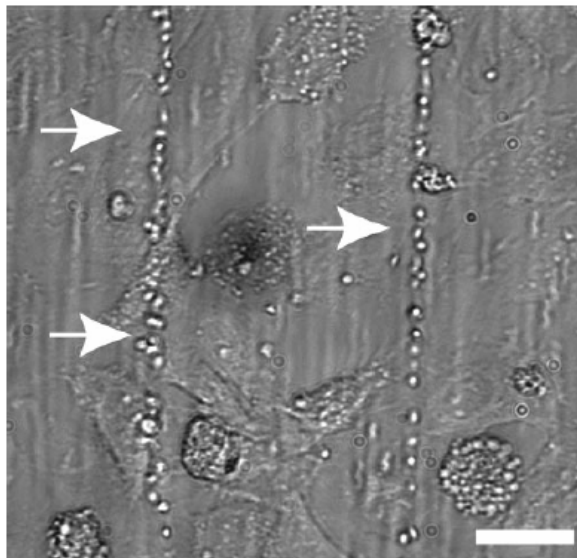
Trombina e plasmina sono generate dalla DIC e questi enzimi potrebbero clivare l'ADAMTS13 e quindi causarne la inattivazione.

Studi suggeriscono che le elastasi dei granulociti potrebbero clivare l'ADAMTS13, insieme alla trombina e plasmina

Va segnalato che poiché i livelli di albumina diminuiscono nella maggior parte dei pazienti con DIC-sepsi-indotta, alterazioni epatiche legate alla malattia sottostante potrebbero essere un meccanismo aggiuntivo atto a spiegare il deficit di ADAMTS13. Anche se tale meccanismo è differente da quello di TTP idiopatica, le caratteristiche cliniche dei pazienti con DIC-sepsi-indotta e TTP sono simili.

Questo studio avrebbe anche delle implicazioni cliniche notevoli perché se la sepsi avesse la stessa fisiopatologia del grave deficit idiopatico della TTP si aprirebbero nuove possibilità terapeutiche nel paziente somministrando per esempio l'ADAMTS13, o gli inibitori delle elastasi dei granulociti.

Nei pazienti settici, infatti, sono stati riscontrati alti livelli di citochine in circolo, e batteriemie sperimentali hanno evidenziato un incremento sierico delle stesse. Il TNF è riscontrabile per primo, seguito poi da un incremento in circolo di IL6 ed IL1.



**Bernardo et al.**

**TNF $\alpha$  e l'IL8 ma non IL6 stimolerebbero il rilascio di ULVWF dalle cellule endoteliali delle vene ombelicali umane (HUVECs) in modo dose dipendente.**

## 10. VWF

E' una glicoproteina circolante. E' sintetizzata nelle cellule endoteliali e megacariociti come precursore polipeptidico di 2813 aminoacidi (pre-pro-vWF), comprendente il peptide segnale di 12 residui, il propeptide di 751-residui e la subunità matura di 2050 residui. Il VWF è soggetto ad estese modificazioni intracellulari. Nel reticolo endoplasmatico, il peptide segnale è rimosso, e vengono formati dei ponti disolfuro. Il VWF è proteina ricca di residui di cisteina (234) e questi vengono appaiati con ponti disolfuro

Nel Golgi il VWF va incontro ad un processo di glicosilazione che apportano circa il 18-19% della totale massa proteica. Il VWF propeptide è poi clivato nel "trans" Golgi nella sua forma matura.

Difetti di in una di queste fasi porta ad ritenzione cellulare o mancata secrezione di VWF o difettoso immagazzinamento e/o secrezione o a produzione di proteina difettosa.

Il VWF è composto da una serie di multimeri ad alto peso molecolare compresi tra un range di 600.000 (VWF dimero) e 20 milioni di Da.

I multimeri di VWF sono ad alto peso molecolare, i più grandi raggiungono dimensioni di alcuni virus.

Sotto condizioni di "shear stress", o di altre modificazioni in vivo, porzioni del VWF possono aprirsi permettendo l'esposizione a molteplici siti interattivi che possono partecipare all'adesione piastrinica. Diminuite dimensioni dei multimeri determinate da riduzione dei legami disolfuro comportano una ridotta attività aggregante piastrinica. Pazienti che hanno la malattia tipo 2 A VWD (alterazione qualitativa della molecola) presentano assenza multimeri di VWF, e spesso hanno grave-moderato sanguinamento come i pazienti con deficit di proteina ma con multimeri di dimensioni normali (tipo 1 VWD; alterazione quantitativa)

I multimeri sono sia immagazzinati in specifici organelli per regolarne il rilascio (corpi di Weibel-Palade nelle cellule endoteliali e nei granuli  $\alpha$  dei megacariociti o piastrine dopo la trombocitopoiesi) sia secreti costituzionalmente.

Una volta secreti i multimeri di VWF circolano nel sangue ad una concentrazione di 10  $\mu$ g/ml con un'emivita di circa 12h. Il propeptide libero circola nel plasma ad una concentrazione di 1  $\mu$ g/ml con un'emivita di circa 2-3 h. Si sa poco del meccanismo sottostante di clearance del vWF in circolo. L'aumento della clearance in circolo è stato correlato alla VWD di tipo 1. (Sono state individuate 2 mutazioni legate ad aumentata clearance:

1. Arg 1205 His
2. Ser 2175 Phe

La mutazione Ser 2175 Phe è stata identificata in numerose generazioni di membri affetti da VWD tipo I moderatamente grave. Questi pazienti avevano una significativa riduzione dell'emivita di VWF (2-3 h). In questi pazienti la clearance non era dipendente dalle dimensioni dei multimeri: piccoli e grandi scompaiono velocemente.

I megacariociti non secernono costituzionalmente il VWF, ma le piastrine lo rilasciano durante la trombogenesi. Il propeptide è normalmente clivato prima della secrezione dei multimeri e potrebbe avere il ruolo di modulatore indipendente della adesione delle cellule al collagene. Il grado di polimerizzazione del VWF è correlato all'attività protrombotica.

La forma multimerica è composta da subunità polipeptidiche di 250 Kda legate insieme da ponti disolfuro, ed è conosciuta come l'essere il maggior determinante e della affinità di legame con le piastrine ed il collagene, e dell'efficienza emostatica del VWF.

vWF media l'adesione delle piastrine al subendotelio della parete dei vasi danneggiati.

Si pensa che le cellule endoteliali secretano grandi forme polimeriche di VWF e che le forme a basso peso molecolare (LMW) di VWF originino dal clivaggio proteolitico.

La degradazione proteolitica di VWF è normalità nei soggetti sani, ma può aumentare nei pazienti con malattia di VWF, ovvero VW tipo 2) determinando l'assenza di larghi multimeri.

Solo i multimeri più larghi sono emostaticamente attivi, in quanto sono molto più flessibili e quindi molto più responsivi allo shear stress. Questi multimeri infatti si legano alle piastrine molto più strettamente del VWF plasmatico tipico.

Le piastrine aderiscono al VWF presente sulle cellule endoteliali; ma l'ADAMTS13 rapidamente cliva il VWF e ciò comporta rilascio di piastrine, pertanto queste aderiscono anche al VWF legato alla matrice extracellulare e le piastrine, possono essere reclutate per accrescere il trombo con un meccanismo VWF-dipendente. Questi processi dovrebbero essere inibiti mediante clivaggio da parte dell'ADAMTS13. Il deficit di ADAMTS13 determina un'aumentata aggregazione piastrinica "shear stress" indotta probabilmente permettendo una crescita incontrollata dei trombi ricchi di piastrine e VWF

In altre parole i larghi multimeri sembrano coinvolti nella patogenesi della aggregazione intravascolare piastrinica che porta alla formazione del trombo e a piastrinopenia nel paziente affetto da TTP.

Molte sono le proteasi plasmatiche e dei granulociti delle piastrine possono degradare ULVWF in vitro ma i frammenti generati sono diversi da quelli in circolo.

### **Ruolo del VWF nella formazione del trombo**

La molecola matura di VWF è una proteina multimerica composta da un numero variabile di subunità identiche legate da ponti disolfuro per formare dimeri di circa 500 KDa, i quali a loro volta sono legati in multimeri raggiungendo massa molecolare fino a 20 MDa.

La comprensione della struttura e della funzione del VWF e i meccanismi che sottendono al suo coinvolgimento nel processo emostatico sono in continuo aggiornamento.

Tuttavia la funzione del VWF è stata molto bene descritta e prevede :

- Il legame e il trasporto del fattore VIII (fattore procoagulante)
- La mediazione dell'adesione piastrinica alle superfici reattive
- Mediazione dell'aggregazione piastrinica
- La formazione del trombo.

I principali domini funzionali del VWF sono

- l' A1 che contiene il solo sito di legame per il recettore piastrinico (GP)Iba
- l' A3 attraverso il quale il VWF si lega al collagene
- C1 che contiene le sequenze RGD riconosciute dalla  $\beta_3$  integrina ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$ )
- D'-D3 che forma il sito per il legame con il FVIII.

Sono anche noti molti dettagli riguardanti e la biosintesi e la secrezione del VWF: è sintetizzato esclusivamente dalle cellule endoteliali e dai megacariociti.

Dopo la sintesi il VWF prodotto dalle cellule endoteliali è secreto attraverso una delle 2 distinte vie :

- Via costitutiva direttamente legata alla sintesi ( le molecole sono rilasciate non appena la loro sintesi è completa )
- Via regolata: che prevede l'immagazzinamento delle molecole mature e il loro rilascio richiede lo stimolo da parte dei secretagoghi.

Poiché dopo il rilascio il VWF va incontro ad un processo che prevede la riduzione controllata delle sue dimensioni , la disponibilità di una fonte di larghi multimeri non clivati, dai siti cellulari dove sono immagazzinati, permette massima efficienza nelle aree dove viene richiesta la rapida adesione e aggregazione piastrinica.

Gli organelli deputati all'immagazzinamento del VWF nelle cellule endoteliali e nei megacariociti sono rispettivamente i corpi di Weibel-Palade e i granuli alfa.

Nelle piastrine circolanti, derivate dai megacariociti, non è effettivamente operativa la via secretoria. Pertanto il VWF circolante nel plasma è essenzialmente di origine endoteliale, mentre le piastrine rilasciano il contenuto dei loro granuli alfa solo quando attivate.

Il VWF secreto dalle cellule endoteliali , e attraverso la via costitutiva e attraverso la via regolamentata è diretto e verso il lume e verso la matrice sub-endoteliale.

IL vWF è inizialmente non clivato e la riduzione delle dimensioni dei multimeri avviene attraverso un processo di clivaggio proteolitico.

L'ADAMTS13 cliva in modo specifico il legame peptidico tra tyr 1605-Met 1606. Questo clivaggio modifica le dimensioni dei multimeri circolanti e conseguentemente ne modifica la funzione proadesiva. I multimeri di alto peso molecolare dimostrano una migliore capacità

trombogenica forse perché i molteplici siti interattivi per i componenti della parete dei vasi delle piastrine garantiscono una migliore adesione.

Va da sé che il rilascio controllato dei larghi multimeri al momento del danno endoteliale consente la loro presenza nel sito di danno, e il meccanismo fisiologico regolatore che ne causa la scomparsa dal circolo verosimilmente dovrebbe prevenire una eccessiva formazione del trombo.

## **Ruolo del vWF nella adesione e nella aggregazione piastrinica.**

Il VWF partecipa alla formazione del trombo non solo mantenendo le piastrine adese al sito danneggiato, ma anche supportando la coesione piastrine- piastrine e l'aggregazione.

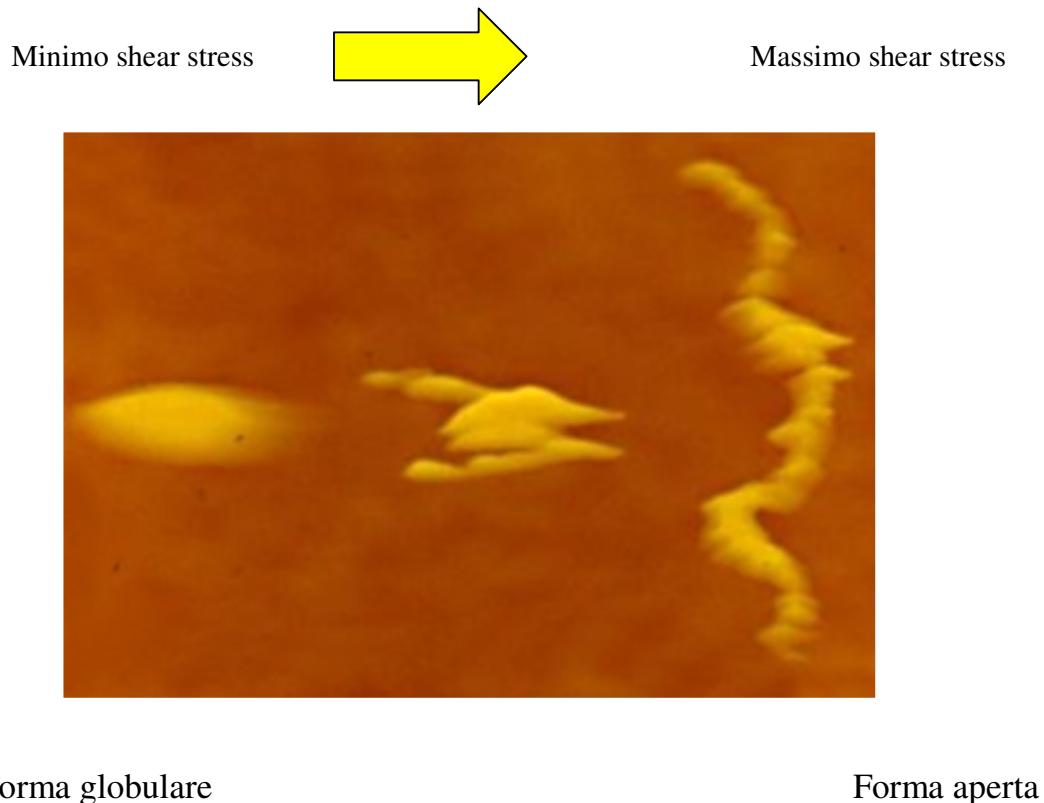
Le piastrine rispondono rapidamente alle alterazione dello stato endoteliale attaccandosi saldamente al sito di lesione dove sono esposti i componenti subendoteliali. Il primo strato piastrinico è in contatto con la superficie trombogenica (adesione) mentre la successiva crescita del tappo piastrinico dipende dalle interazioni piastrine-piastrine (aggregazione).

Entrambe queste due funzioni sono influenzate dalle interazioni del VWF con specifici recettori di membrana piastrinici. Molteplici domini di VWF sono coinvolti nel processo iniziale e poi di crescita del tappo piastrinico.

## **Shear Stress e vWF**

Lo shear stress in circolo apre la proteina globulare del VWF mentre è legata in modo transitorio alla superficie vascolare. Il legame della GP Iba al dominio A1 del VWF è la principale iterazione che può trattenere le piastrine sulla superficie, anche in condizioni di alto flusso.

Tuttavia l'ancoraggio stabile delle piastrine richiede delle integrine  $\alpha 2\beta 1$  e  $\alpha 2b\beta 3$  ai loro rispettivi substrati.



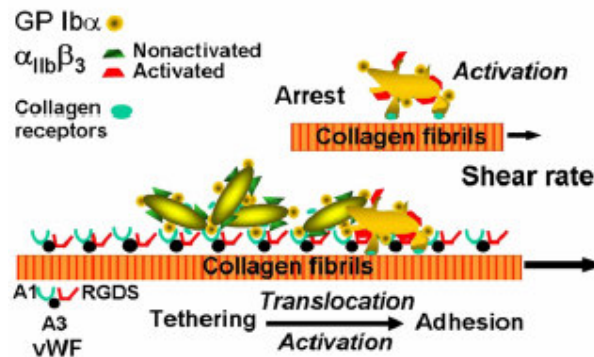
## Meccanismi di adesione piastrinica (Ruggeri Review)

In condizioni di flusso con livelli di shear sopra a un a certa soglia ( nel circolo umano attorno a  $1000 \text{ s}^{-1}$ ) solo l'interazione della GP Iba con VWF multimerico immobilizzato (per esempio legato al collageno) può iniziare il legame delle piastrine circolanti nel vaso. Il legame della GP Iba al dominio A1 del VWF avviene rapidamente ed è essenzialmente un'iterazione adesiva che può legare piastrine quando lo shear stress è elevato. Questa interazione è inizialmente supportata da ponti transitori e quindi c'è translocazione di piastrine legate.

L'attivazione della integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  avviene durante il legame transitorio, principalmente attraverso dei segnali iniziati da recettori di membrana che legano collageno ed altre componenti del subendotelio o in risposta a stimoli agonisti rilasciati (ADP) o generati ( $\alpha$ -trombina) localmente.

Risultato finale è l'adesione stabile.

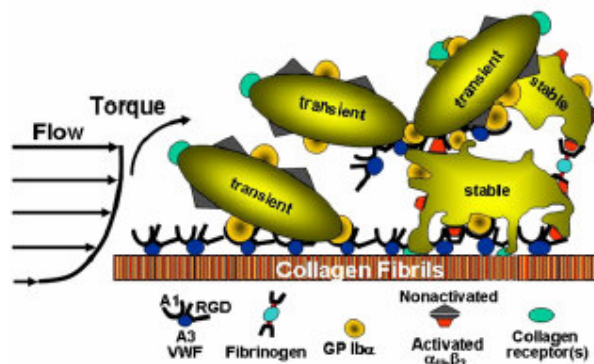
A basso livello di shear la funzione adesiva del VWF non è a lungo indispensabile per l'ancoraggio alla superficie trombogena, e i recettori del collageno (tra gli altri) possono permettere che una stabile iterazione adesiva si formi rapidamente



Thrombosis Research (2007) 120, 55-59

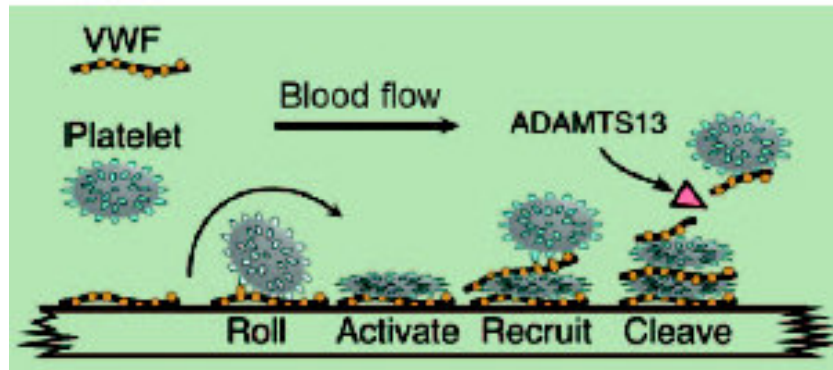
Rappresentazione schematica del meccanismo di adesione piastrinica in condizioni di flusso.

Al momento del danno vascolare, in particolare nei vasi dove si sviluppano condizioni di alto shear stress, le piastrine inizialmente aderiscono in modo transitorio al vWF subendoteliale attraverso il recettore GPIb. Questo contatto rallenta in modo significativo il movimento delle piastrine e le porta ad un arresto transitorio delle stesse consentendo l'ancoraggio ad un altro recettore di adesione come al recettore per il collagene qui mostrato. Il risultato è un attacco stabile.



Thrombosis Research (2007) 120, 55-59

Rappresentazione schematica dei meccanismi di aggregazione piastrinica in condizioni di flusso. Dopo stabile adesione, le piastrine sono attivate, secernono il contenuto dei loro granuli e legano proteine adesive dal plasma come il fibrinogeno e il vWF, i quali formano il substrato entro il quale piastrine ulteriori vengono reclutate a formare il trombo. (Ruggeri)



VWF media l'adesione nel sito vascolare di danno , e l'ADAMTS13 metalloproteasi limita la crescita del trombo clivando il vWF. Difetti nella secrezione e/o clearance del vWF sono comuni cause di vWD tipo

## Iterazione VWF e piastrine

Il VWF si lega al subendotelio, forse grazie alla sua iterazione con il collageno.

Pertanto in un sistema emostatico normale, l'endotelio intatto preclude la iterazione tra piastrine e matrice legante il VWF.

Dopo lesione vascolare, tuttavia questo legame può essere indotto dalla iterazione con il recettore GP Ib delle piastrine. Dopo questa iterazione le piastrine aderiscono e si attivano.

VWF si lega anche ad un secondo recettore piastrinico il GP IIb/IIIa (o integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3).

Il GP IIb/IIIa è il sito di legame fisiologico per il fibrinogeno durante aggregazione in vitro. La ristocetina induce legame VWF- GP Ib che può essere bloccato da anticorpi monoclonali verso il sito di legame del GP Ib per il VWF.

L'ADP/epinefrina o trombina induce il il legame del VWF al recettore GP IIb/IIIa e questa iterazione può essere bloccata da anticorpi monoclonali direttamente contro il complesso GPIIb/IIIa.

Anche se gli stimoli fisiologici dell'attivazione del VWF con le piastrine non sono noti completamente , tuttavia il VWF può andare incontro a modificazioni conformazionali sia mediante l'iterazione con il subendotelio , sia in condizioni di "shear stress".

"Shear stress può indurre aggregazione piastrinica

## Meccanismi di adesione piastrinica (Ruggeri Review)

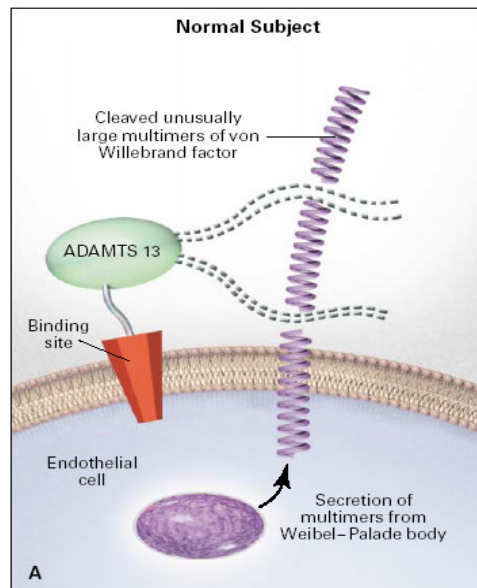
L'ancoraggio della GPIIb/IIIa nel dominio vWF A1. I residui della sequenza GLY-ASP-Thr-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Tyr della GPIIb/IIIa sono mostrati in arancione. La struttura del dominio A1 basata sui dati raggi-xcristallografici è rappresentata come un nastro porpora (eccetto per l'elica  $\alpha 3$ , mostrata in blu, e l'elica  $\alpha 4$  mostrata in rosso) e il filo  $\beta$  in verde chiaro (eccetto per il filo  $\beta 3$  mostrato in blu). Il filamento  $\beta 3$  e l'elica  $\alpha 3$  contengono molti dei residui che formano il proposto sito di legame GPIIb/IIIa; l'elica  $\alpha 4$  contiene i residui che interagiscono con la funzione di blocco anticorpale NMC-4. Loops contenenti le eliche  $\alpha$  e i filamenti  $\beta 3$  sono rappresentati dai tubi sottili. N e C rappresentano rispettivamente la porzione N-terminale e la C-terminale del frammento di vWF utilizzato per lo studio cristallografico.

### 11. ADAMTS13

Gli ULVWF formano lunghe strutture filiformi che rimangono ancorate alla superficie delle cellule endoteliali attraverso la iterazione di VWF con le proteine di membrana P selettine. Adamts 13 ha un ruolo importante nel processare il VWF.

Esso cliva i legami degli ULVWF rapidamente sotto condizioni di alto "shear stress".

Recentemente si è visto che il legame GPIIb/IIIa piastrinico al dominio A1 di VWF stimola il clivaggio del dominio A2 adiacente, da parte dell'ADAMTS13.



Sono state identificate un certo numero di mutazioni dell'ADAMTS13 che ne inficiano o la sintesi o la funzione e causano la forma congenita di TTP.

Al contrario sono state identificate altre mutazioni nel VWF in grado di determinare un' aumentata suscettibilità alla proteolisi, portando ad una perdita di multimeri ad alto peso molecolare nel plasma e a difetti di legame con le piastrine.

Le forme multimeriche di VWF nel flusso sanguigno sono emostaticamente più attive. In risposta ad un danno endoteliale o comunque in risposta all'attivazione endoteliale, sono rilasciati da organelli cellule-endoteliali-specifiche, chiamati corpi di Weibel-Palade, "unusually large multimeri" biologicamente attivi.

Questi multimeri estremamente grandi hanno alta affinità di legame per i recettori piastrinici GPIIb e/o GPII/IIIa rispetto alle forme più grandi presenti nel plasma normale e possono indurre ad aggregazione piastrinica sotto condizione di elevato “shear stress”.

“Unusually large multimeri” di VWF sono individuati nei pazienti con TTP. Deficit gravi congeniti di proteasi sono state documentati nei pazienti con TTP familiare, con presenza di anticorpi inibenti il VWF-cp osservate nelle TTP non familiari.

Adamts 13 può clivare gli “unusually large multimeri” di VWF sulla superficie delle cellule endoteliali, prevenendo l’entrata in circolo di questi multimeri

ADAMTS 13 sembra sintetizzato nel fegato ed in particolare nelle cellule stellate epatiche che si riscontrano nello spazio di Disse adiacente agli epatociti. Rimane comunque da chiarire quale è il contributo delle cellule epatiche nel regolare i valori plasmatici dell’ ADAMTS 13. Inoltre i pazienti con cirrosi epatica o con significativa proliferazione ed attivazione delle cellule epatiche stellate presentano livelli di attività dell’ ADAMTS 13. variabili o ridotti.

Quindi l’ADAMTS 13 del plasma potrebbe derivare da altre fonti. Recenti studi hanno evidenziato che l’ADAMTS 13 è sintetizzato e rilasciato dai megacariociti e piastrine umane.

L’mRNA è stato riscontrato nei tessuti della maggior parte degli organi mediante RT-PCR (reverse-transcriptase-polymerase chain-reaction) e ciò sembra suggerire che anche l’endotelio vascolare possa essere fonte di ADAMTS 13.

Considerando pertanto l’enorme area rappresentata da tutta la superficie del letto vascolare endoteliale, una piccola frazione di cellule endoteliali producenti ADAMTS13 potrebbe in ogni momento contribuire in modo significativo ai livelli di attività plasmatici di ADAMTS13. Di conseguenza ogni perturbazione della funzione cellulare endoteliali o dell’iterazione ADAMTS13/vWF nel sito di sintesi mediata da citochine flogistiche o farmaci potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi della TTP, e forse nelle altre complicanze trombotiche.

Lo studio di Shang evidenzia che l’ADAMTS 13 è sintetizzato nelle culture delle cellule endoteliali e in particolar modo in vivo, l’ADAMTS13 è smistato a livello apicale in cellule polarizzate, lo smistamento apicale dipenderebbe dal dominio CUB; mutazioni CUB implicano “blocco del traffico” e quindi sarebbero responsabili di una ridotta attività congenita di ADAMTS13. Questi dati pertanto sembrano suggerire come l’ADAMTS13 sia secreto apicalmente nell’endotelio vascolare e possa contribuire in modo significativo alla presenza dell’ADAMTS13 plasmatico.

Secondo Dong che commenta il lavoro di Shang l’associazione con la membrana lipidica che funge da piattaforma per assemblare e convertire segnali intracellulari, accresce l’ipotesi che l’ADAMTS13 rilasciato sia regolato da segnali intracellulari.

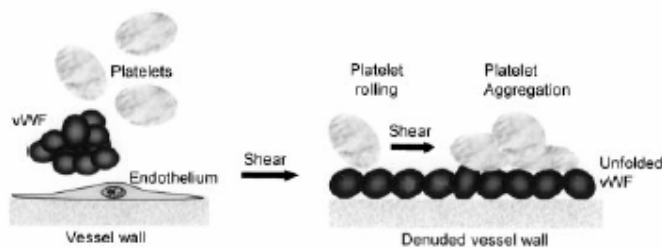
Questo fa emergere due questioni importanti:

1 il rilascio di ADAMTS 13 da parte delle cellule endoteliali è inducibile?

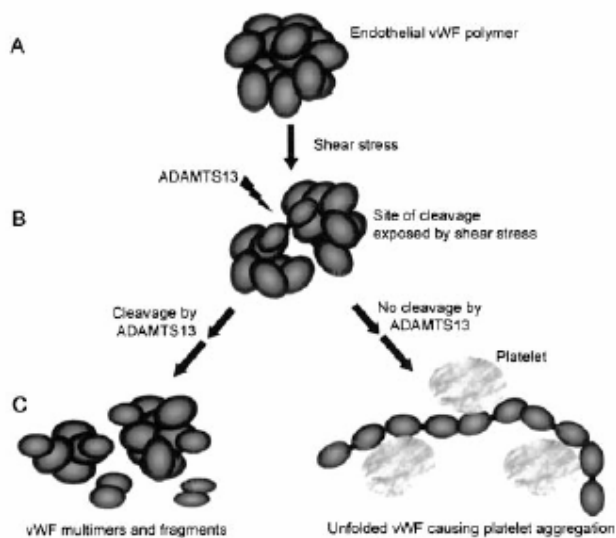
2 se fosse inducibile quali sarebbero gli agonisti?, E questi potrebbero indurre anche il rilascio di ULVWF?

In altri termini se gli stessi segnali inducono il rilascio di UL-VWF l’ADAMTS13 derivato dalle cellule endoteliali potrebbe servire come meccanismo di difesa contro improvvisi rilasci di UL-VWF comunemente riscontrabile in condizioni particolari come si hanno nella flogosi sistemica?





Questa figura sta ad indicare come lo shear stress possa promuovere l'aggregazione piastrinica vWF-mediato nel sito di danno. Il multimeri aperto di vWF sull'endotelio danneggiato forma una piattaforma per il rollig, l'adesio e l'aggregazione piastrinica



La figura mostra come un deficit di ADAMTS13 possa causare trombosi. Il polimero endoteliale (a) di vWF quando si apre perché esposto ad alti livelli di shear stress nelle arteriose e nei capillari diviene suscettibile al clivaggio da parte dell'ADAMTS13 (B). Questo meccanismo si ripete quando il vWF attraversa il microcircolo e genera una serie di multimeri (C a sinistra). Il deficit di ADAMTS 13 porta ad un accumulo di vWF aperti, i quali facilitano l'aggregazione piastrinica e trombosi del microcircolo (C a destra). Un incremento dello shear stress causato da occlusioni vscolari porta ad un maggior numero di vWF aperti e si stabilisce pertanto un ciclo che porta alla trombosi tipica della TTP.

## 12. OBIETTIVO DELLO STUDIO

- Valutare il pattern multimerico del VWF, ( il VII:C;VWF:Ag ; VWF:CBA, i multimeri
- Valutare il rapporto tra VWF:Ag e piastrine
- Dosare i livelli plasmatici di IL6, IL8 TNF $\alpha$  per valutare il ruolo delle citochine infiammatorie in relazione ai livelli di VWF
- Studiare la relazione tra livelli di IL6 IL8 TNF $\alpha$  e livelli di VWF

## MATERIALI E METODI

Eleggibili per questo studio sono pazienti consecutivi affetti da sepsi per cause mediche o chirurgiche ricoverati presso la terapia intensiva dell'Ospedale S: Antonio di Padova con anamnesi negativa per malattie ematologiche, IMA recente, malattie reumatiche, HELLP sindrome, PTT, HUS, Diabete mellito insulino-dipendente. I campioni di sangue vengono prelevati da pazienti settici: sepsi grave e shock settico La diagnosi di stato settico verrà stabilita in base alle linee guida di "Consensus document ACCP/SCCM Crit Care Med 1992;20:864-874. La diagnosi di DIC viene stabilita in accordo con International Society of thrombosis and Haemostasis.

Il dosaggio di IL6, IL8, TNF $\alpha$  e di procalcitonina vengono eseguiti già all'ingresso in terapia intensiva. Quotidiano è stato il controllo dell'emocromo, PTL, PT/INR, PTT, Fibrinogeno, ATIII, D-Dimero .

Il primo prelievo per il VWF:Ag; VWF:CBA; VIII :C viene eseguito all'ingresso del paziente in terapia intensiva. Seguono poi prelievi ogni 24 ore nella prima settimana, quindi ogni 48 ore nella seconda, ogni 72 ore nella terza e l'ultimo prelievo al 28° giorno.

Si prelevano dal paziente 4 provette da coagulazione

Le provette vengono processate entro 2 ore dal prelievo, quindi vengono centrifugate per 15 minuti a 6000 rpm. Quindi il plasma così ottenuto viene filtrato e aliquotato in volumi di 300 ul. I campioni vengono conservati a -80 °C fino al momento del dosaggio.

PAZIENTE	SESSO	ETA'	OUTCOME A 28 GIORNI	FOLLOW UP	TIPO DI INFEZIONE
1	M	79	sopravissuto	exitus	pancreatite infetta
2	M	67	sopravissuto	sopravissuto	sepsi in sdr di fournier
3	M	39	exitus	exitus( non sepsi correlato)	sepsi in protesi d'anca
4	M	26	sopravissuto	sopravissuto	sepsi meningococcica

Figura 1. Caratteristiche dei pazienti.



La Figura 2 mostra le provette utilizzate.



La Figura 3 mostra il materiale utilizzato per le aliquote

Il VWF:Ag e VWF:CBA vengono ottenuti mediante test Elisa che utilizza per il VWF:Ag un anticorpo policlonale anti VWF legato alla plastica; e per il VWG:CBA una molecola di collagene di tipo 1 e 3.

In entrambi i dosaggi come secondo anticorpo viene utilizzato un anticorpo policlonale coniugato con perossidasi.

Il VIII :C è stato dosato mediante metodo coagulometrico automatizzato.

I multimeri del VWF sono stati ordinati mediante elettroforesi in condizioni non riducenti ed autoradiografia.

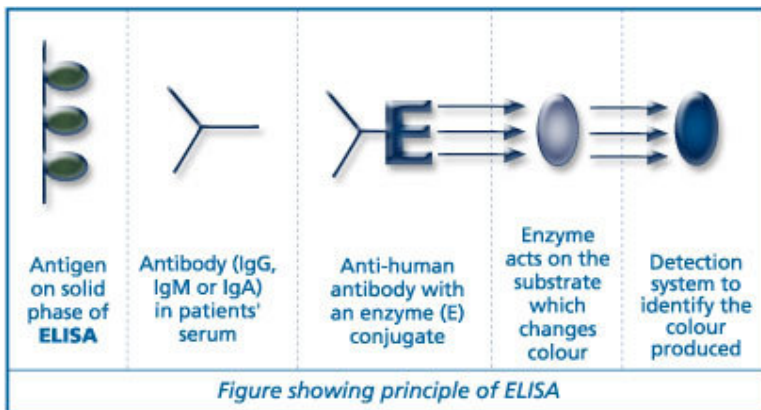
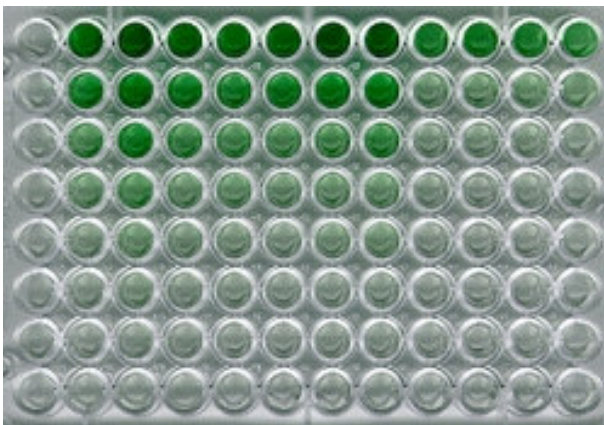


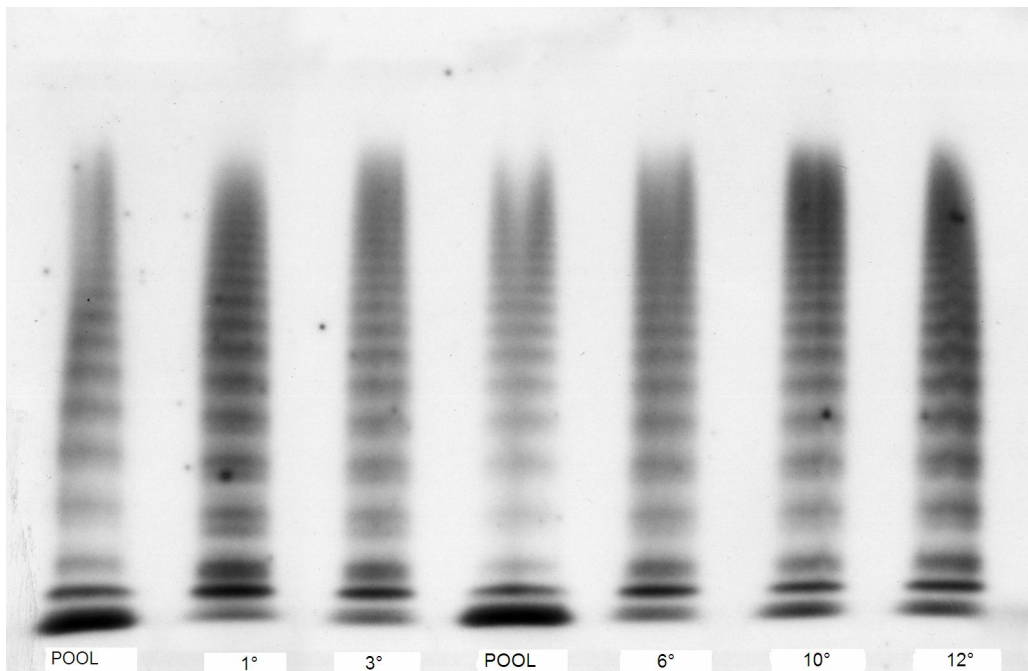
Figura 4. Lo schema riassume la tecnica elisa



Piastra per ELISA

### 13 RISULTATI

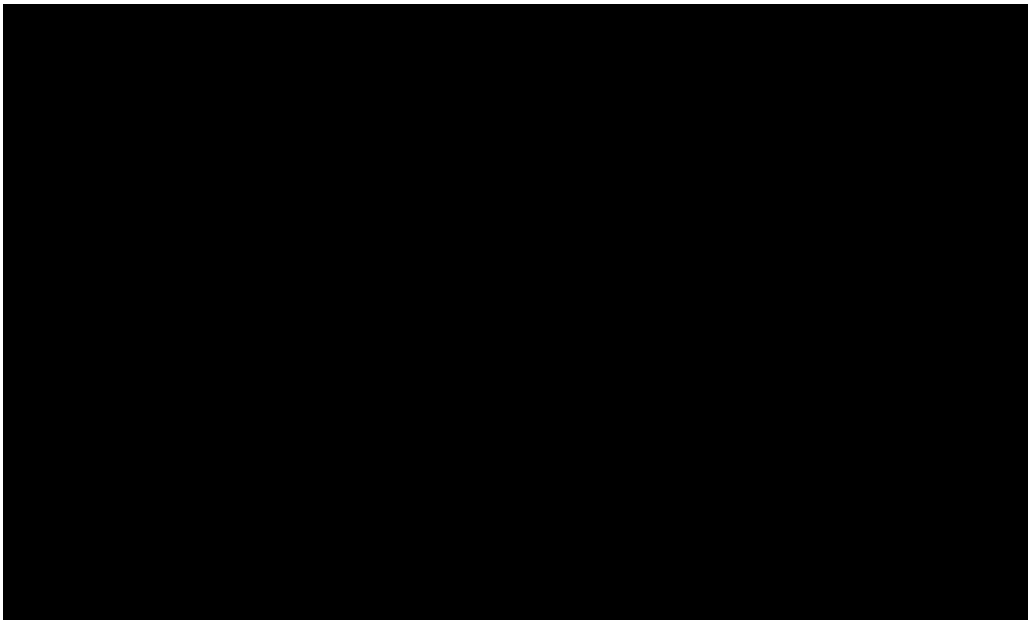
Abbiamo analizzato i valori di VWF:Ag, VWF: CBA, VIII:C e i multimeri dei 4 pazienti affetti da shock settico. La figura 1 in alto riassume le caratteristiche dei pazienti. In tutti quattro i pazienti abbiamo riscontrato alti livelli di vWF Ag e di CBA e di VIII. (Figura n° 6-7-8-9) I multimeri sono invece normorappresentati. (Figura n°5) La piastrinopenia ha interessato il paziente numero 1 e il paziente numero 4, gli altri due mostravano conta piastrinica normale (Figura n° 10-11-12-13). I livelli di IL6, IL8 TNFa sono molto elevati in tutti i pazienti, ma come si vede dal grafico in modo particolare nel primo (Figura 14-15-16-17)



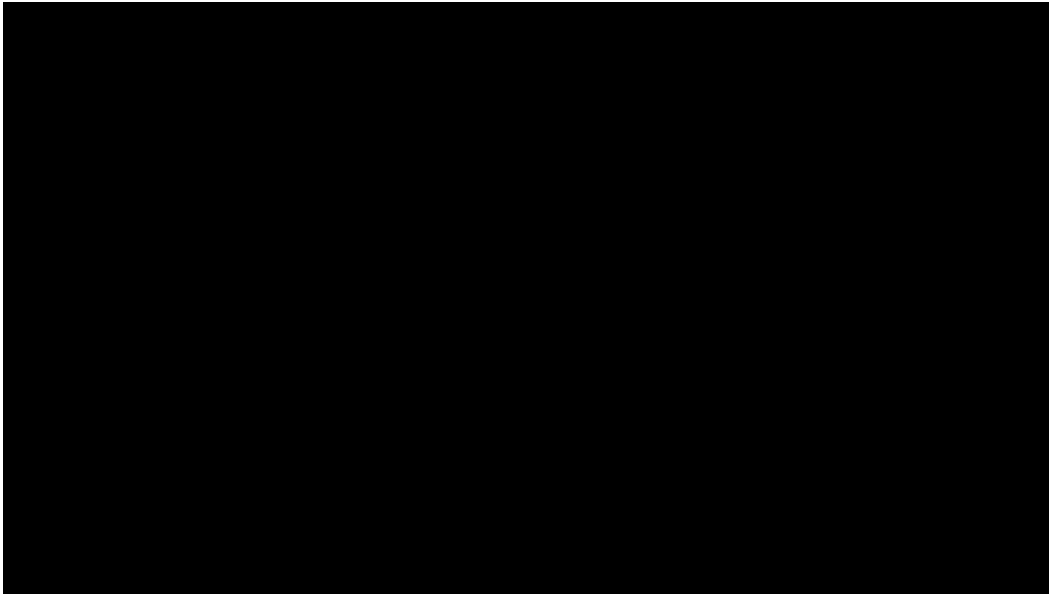
**Figura n°5. Multimeri del VWF del primo paziente esaminato. In tutti i prelievi la distribuzione dei multimeri è normorappresentata. Va ricordato che la diluizione del pool è di 1:20, mentre quella del paziente esaminato è di 1: 100**



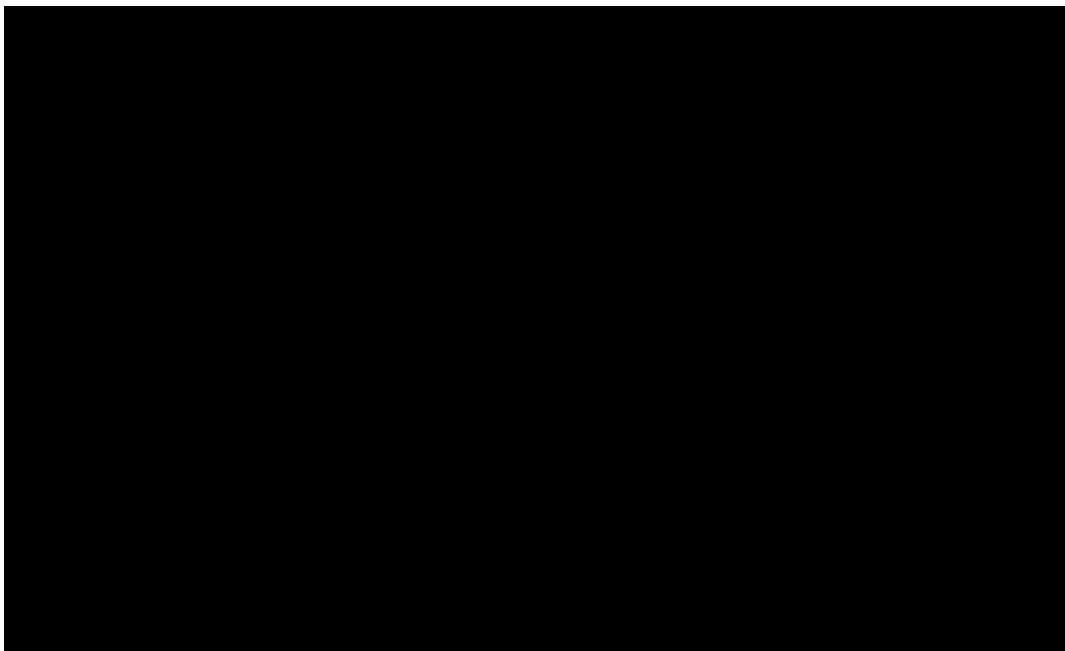
Figura n°6



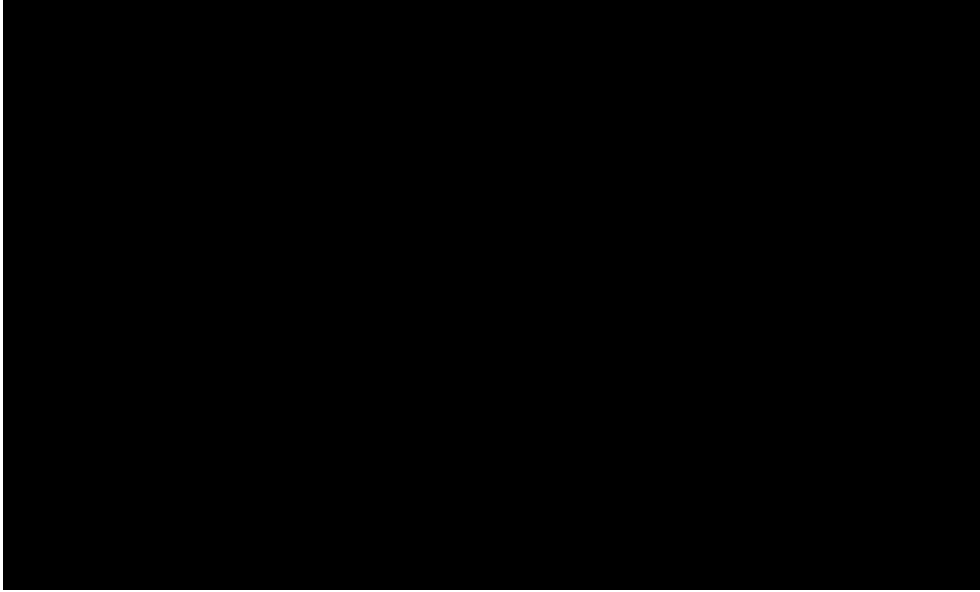
**Figura n° 7**



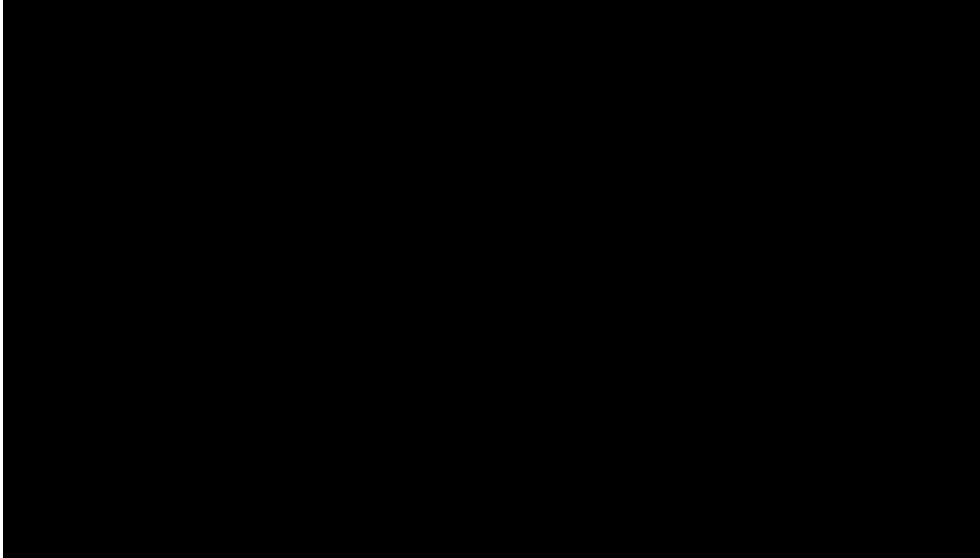
**igura n° 8**



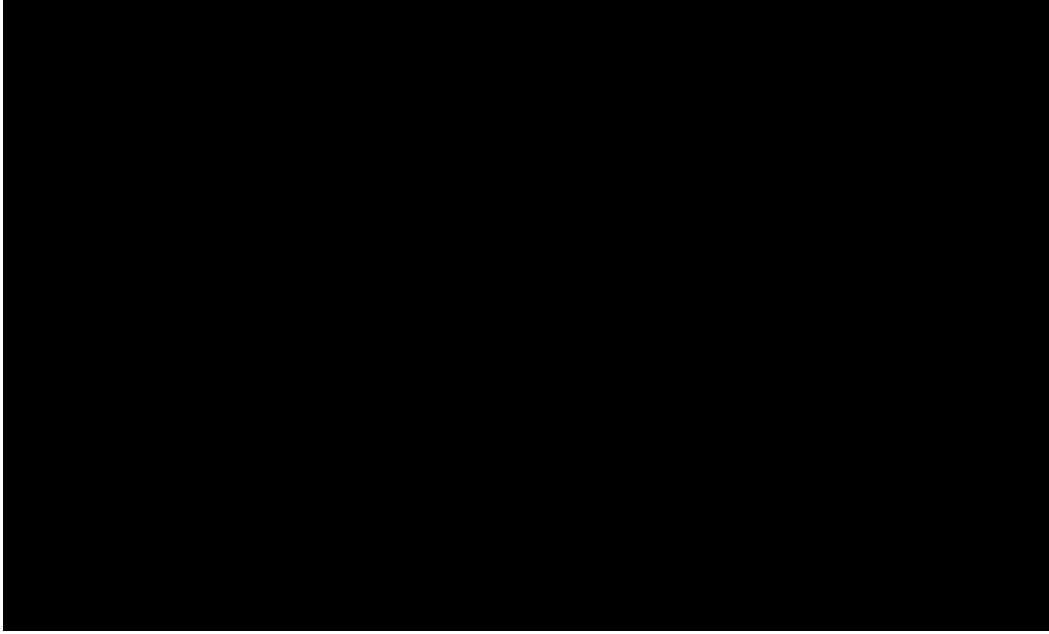
**Figura n° 9**



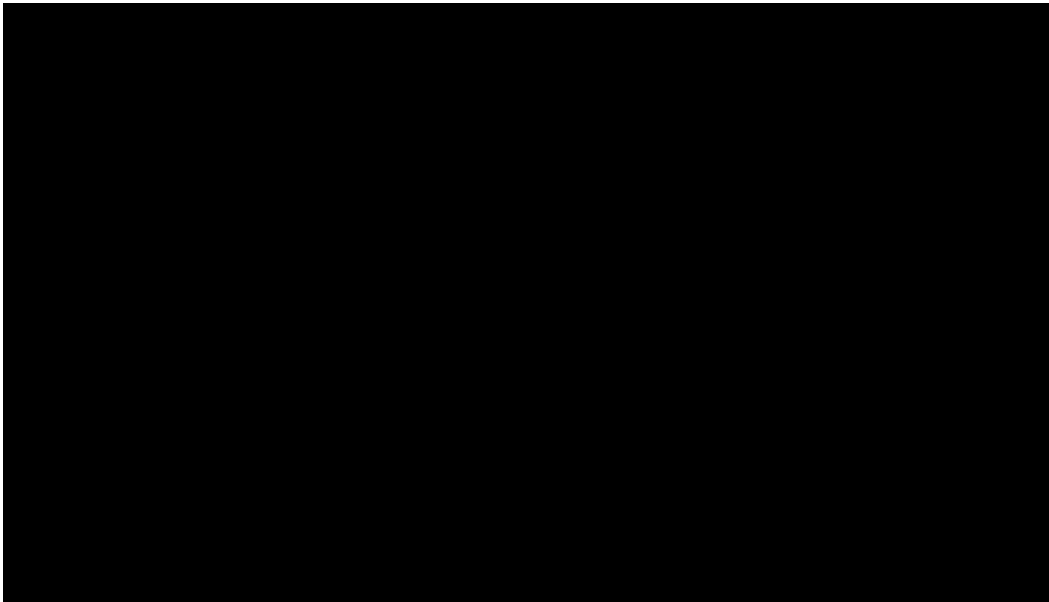
**Figura n°10**



**Figura n°11**



**Figura 12**



**Figura 13**





Figura 14

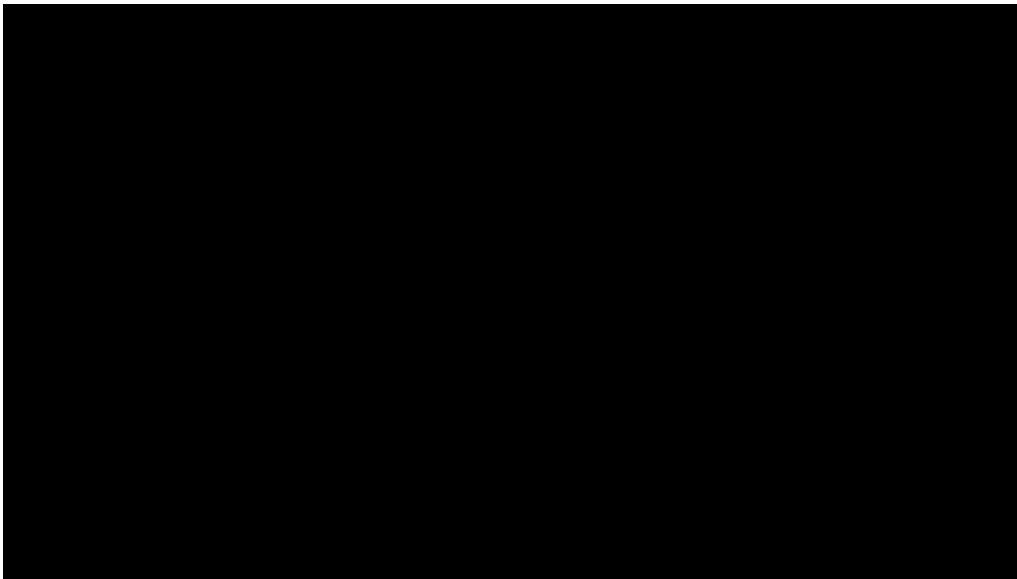
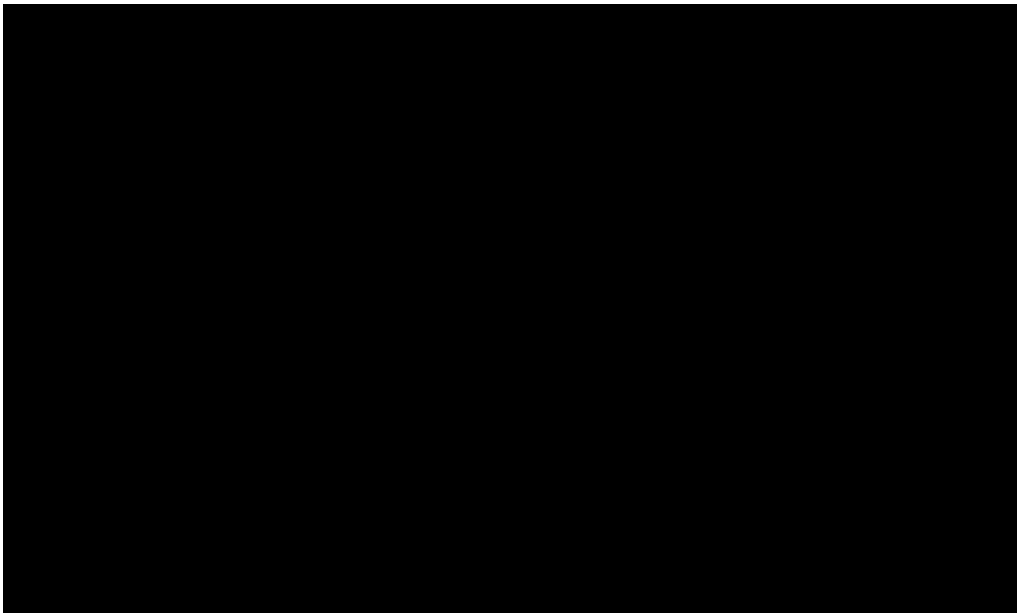


Figura 15



**Figura 16**



**Figura 17**

## 14 DISCUSSIONE

Da questo studio si evince come i livelli di VWF:Ag e VWF:CBA siano molto elevati e tendono a rimanere tali per tutto il periodo di valutazione. Nel paziente 1 e 4 abbiamo notato piastrinopenia associata ad alti dosaggi di VWF, mentre nel paziente 2 e 3 la conta piastrinica era normale.

In tutti i pazienti, ma in modo più evidente nel numero 1 le IL6 e IL8 e il TNF $\alpha$  erano molto elevate. Si può ipotizzare che le citochine siano la causa del rilascio di VWF depositato nei corpi di Weibel-Palade della parete dei vasi. Questo sembra essere in accordo con alcuni autori che hanno dimostrato come le citochine infiammatorie (IL6, IL8 TNF $\alpha$ ) sembrano stimolare il rilascio di ultralarge von Willebrand Factor (ULVWF) e determinare una insufficiente proteolisi di VWF da parte dell'ADAMTS 13.

Dal nostro lavoro si evince che la piastrinopenia è indipendente dal VWF e il quadro appare anche diverso dalla Moshkovitz, dove il consumo di piastrine si associa a consumo di alti pesi molecolari come causa-effetto.

Nei nostri pazienti il consumo di piastrine è indipendente dal consumo di VWF, che rimane elevato per tutto il periodo di osservazione ad eccezione del paziente n°4, ed è caratterizzato da conservazione degli alti pesi molecolari.

Noi non siamo in accordo con la letteratura, in quanto non sembra esserci deficit di proteolisi da parte dell'ADAMTS13, visto la normorappresentazione dei multimeri e l'assenza di multimeri a peso molecolare abnormemente elevato.

Abbiamo inoltre osservato che i livelli di VWF:Ag, VWF:CBA, VIII:C correlavano con l'aumento di citochine ma non in modo proporzionale. Infatti come si può osservare da diagrammi i livelli di citochine tendevano a scendere ma a ciò non corrisponde una significativa flessione di VWF:Ag; VWF: CBA, VIII:C.

Abbiamo altresì osservato come il paziente numero 4, affetto da sepsi meningococcica (con un quadro di porpora), abbia mostrato già in 13° giornata un'importante riduzione dei livelli di VWF:Ag e VWF:CBA, e che tale riduzione ben correlasse con la clinica (infatti dopo l'ultimo prelievo il paziente è stato trasferito in reparto).

Il paziente numero 1, invece, che aveva elevati livelli di VWF per tutto il periodo d'osservazione è sopravvissuto ai 28 giorni, ma poi è andato incontro ad exitus. Il paziente numero 2 è sopravvissuto ai 28 giorni ma necessita tuttora di dialisi trisettimanale. Il paziente numero 3 è deceduto per cause non sepsi-correlate. Da questi dati preliminari è verosimile supporre che il riscontro isolato di un unico elevato livello di VWF:Ag; VWF:CBA, VIII:C, dosato all'ingresso in terapia intensiva, non sia utile ai fini prognostici. E' verosimile invece, che il trend possa darci un'indicazione importante di come sta evolvendo il danno endoteliale. Questo è uno studio preliminare, i pazienti sono pochi, tuttavia noi riteniamo che possa essere utile studiare il ruolo e il contributo del VWF in corso di sepsi. Si potrebbe ipotizzare infatti che la persistenza di elevati livelli di VWF possa essere spia di grave e continuo danno endoteliale, danno che porterebbe all'insufficienza multiorgano. Il dosaggio del VWF quotidiano potrebbe pertanto essere un importante indice prognostico.

Nel futuro potrebbe essere utile dosare il propeptide e l'ADAMTS13 anche se la distribuzione dei multimeri non sembra essere compatibile con deficit significativi di questa metalloproteasi.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- (1) Aird W. C. Sepsis e coagulation. *Crit Care Clin* 21 (2005) 417-431
- (2) Aird W.C. The hematologic system as a marker of organ dysfunction sepsis. *Mayo Clin Proc* 2003;78:869-881.
- (3) Mori M., Kudo H., Yoshitake S. Transient EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2000; 26:218-220.
- (4) Stephan F., Cheffi M.A., Kaplan C.. Autoantibodies against platelet glycoproteins in critically ill patients with thrombocytopenia. *Am J Med* 2000; 108: 554-60
- (5) Francois B., Trimoreau F., Vignon P. Thrombocytopenia in sepsis syndrome: role of hemaphagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am J Med* 1997; 103: 114-120.
- (6) Warkentin T.E., Aird W.C., Rand J.H.. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome. *Hematology* 2003;:497-519.
- (7) Sawaki D. MD, Yoshitaka O., et al. A case of Heparin- Induced Thrombocytopenia with sepsis and congestive Heart failure. *Circ J* 2004;68:1215-1218.
- (8) Vanderschueren S., De Weerd A.. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Critical Care Med* 2000; 28: 1871-1876.
- (9) Gary T., Kinasevitz M.D., et al. Prognostic value of simple evolving DIC score in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:2214-2221.
- (10) Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2:2094-5.
- (11) Levi M. Disseminated Intravascular Coagulation: What's News? *Critical Care Clinics* 2005; 21: 449-467.
- (12) Yaguchi A., Lobo F. L. M., Vincent J. L., et al. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2: 2096-2102.
- (12 a) Cowan DH. Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury. A prospective study. *Jama* 1976; 235:1230-4
- (13) Levi M. Platelet in sepsis. *Hematology* 2005;10 (s 1): 129-31.
- (14) Bernard G.F., Vincent J.L., Laterre P.F.. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *NEJM* 2001; 344:699-709.
- (15) Yan S.B., Helterbrand J.D., Hartman D.L.. Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest* 2001; 120:915-22.
- (16) White B., Perry D.. Acquired antithrombin deficiency in sepsis. *Br J haematol* 2001, 112: 26-31.

- (17) Eisele B., Lamy M..Antithrombin III in patients with severe sepsis: a randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with Antithrombin III in severe sepsis. *Intensive Care Med* 1998;24:663-72.
- (18) Opal S.M., fisher Jr C. J., Dhainaut J.F.. Confirmatory IL-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trials. *Crit Care Med* 1997;25:1115-24.
- (19) Bauer K.A., Rosemberg R. D. Role of ATIII as a regulator in vivo coagulation. *Semin Hematol* 1991;28(1):10-8.
- (20) Wiel E., Vallet B, et all .The Endothelium in intensive care. *Crit care Clin* 2005;21:403-413
- (21) van Hinsebergh V.W. The endothelium : vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95(2):198-201.
- (22) Riewald M., Ruf W. Science review:role of coagulation protease cascade in sepsis. *Crit Care* 2003;7:123-9.
- (23) Leclerc J., et all. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000; 28:3672-3678.
- (24) Wang P., Wood T.J.et all. Inhibition of the biological activity of TNF maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma* 1996; 40: 694-71.
- (25) Bauer P.R. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 2002; 8:141-148.
- (26) Sessler C., Windsor A., et all. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1420-27.
- (27) Matsukawa A., Lukacs N. W., et all. Mice genetically lacking endothelial selectins are resistant to the lethality in septic peritonitis. *Exp Mol Pathol* 2002;72:68-76.
- (28) Vincent J.L., De Backer D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 2005; 9 (suppl): S9-S-12.
- (29) Vallet B. Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis:role in organ dysfunction? *Critical Care* 2003; 7:130-8.
- (30) Nieuwland R., Berckmans R.J., Mc Gregor S., et all. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;1. 95 (3):930-935.
- (31) Ras O., Shet A., Bach R.R. Induction of microparticle-and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; 103: 4545-4553.
- (32 ) Riewald M., Ruf W. Science review:role of coagulation protease cascade in sepsis. *Crit Care* 2003;7:123-9.

- (33) Ruf W., Dickinson C.D. Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. *Trends Cardiovasc Med* 1998;8:350-56.
- (34) Ruf W., Edgington T.S. Structural biology of TF, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 1994;8: 385-90.
- (35) Hermans P. W., Hibberd M. L., booy R., et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Reserch Group. *Lancet* 1999; 354:556-60.
- (36) Dempfle C. E. Coagulopathy of sepsis. *Thromb Haemost* 2004; 91: 213-24
- (37) Ratnoff O.D., Nebehay W.G.. Multiple coagulative defects in patients with the Waterhouse-Friderihsen syndrome. *Ann Inter Med* 1962; 56: 627-630.
- (38) Shimamura K., Oka K., Nakazawa M.. Distribution patterns of microthrombi in DIC. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107:543-7.
- (39) Levi M., Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *NEJM* 1999;19:586-592.
- (40) Iba T., Kidokoro A., Fukunaga M., et al. Association between the severity of sepsis and the changes in hemostatic molecular markers and vascular endothelial damage markers. *Shock* 2005;1:25-29
- (41) Dhainaut JF. ISTH score. *Thromb Haemost* 2004;2:1924-33
- (42) Taylor F.B., Wada H., Kinasewitz G. Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia Coli* sepsis and human models of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit Care Med* 2000; 28 (9suppl):S12-9.
- (43) Ely E.W., Laterre P.F., Angus D.C., et al. Drotrecogin alfa (activaed) administration across clinically important subgroups of patients with severe sepsis. *Crit Care med* 2003; 31(1):12-9.
- (44) Taylor FB. Toward definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86(5):1327-30.
- (44 a) Regan DH. Defibrination syndrome: changing concepts and recognition of the low grade form. *Am J Med Sci* 1973;266(2):84-91
- (45) Perera L., Foley C., et al. Modelling zymogen PC. *Biophysical Journal* 2000; 79:2925-2943.
- (46) Foster D., Yoshitake s., et al. The nucleotide sequence of gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci. USA*: 82:4673-77.
- (47) Dahlback B., Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 91:1396-1400.

- (48) Yegneswaran S., Wood G.M., et al. Protein S alters location of the activated protein C above the membrane surface. A fluorescence resonance energy transfer study of topography. *J Biol. Chem.*1997;272:25013-25021.
- (49) Jane S.M., Hau L., et al. Regulation of APC by factor Xa. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2:723-729.
- (50) Zolton R.P, Seegers W.H. Autoprotrombina II-A:trombin removal and mechanism of induction fibrinolysis. *Thromb Res* !973;3:23-33.
- (51) Esmon C., Taylor B.B.J., et al.Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost* 1991; 66: 160-165.
- (52) Oganesyanyan V., Terzyan S., et al. The crystal structure of the EPCR and a bound phospholipid. *J Biological chemistry* 2002; 28: 24851-54..
- (53) Fukudome K., Esmon CT. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein c /activated protein c receptor (EPCR). *J Biol Chem.*1995; 270:5571-5577
- (54) ) Fukudome K , Kurusawa S., et all. The endothelial cell protein c receptor cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor.*J Biol Chem* 1996;271:17491-17498
- (55) Esmon C.T., et all. The protein c pathway : new insights. *Thromb Haemost* 1997; 78:70-74
- (56) Fukudome K., Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein c /activated protein c receptor (EPCR). *J Biol Chem* 1994, 269:24486-91.
- (57) Regan L. M, et all. The endothelial cell protein c receptor . Inhibition of activated protein c anticoagulant function without modulation of reaction with protein inhibition.*J Biol Chem* 1996;271:17499-17503
- (58) Mammen E. F.. The haematological manifestations of sepsis. *JAC* 1998;41(suppl) :17-24.
- (59) Fourrier F., Chopin C et al. Septic shock, MOF,DIC. Compared patterns of ATIII, PC, and protein S deficiency. *Chest* 1992,101.816/823.
- (60) Taylor Jr F.B., Emerson Jr R.E., Jordan R., Chang A.K.,Blick K.E. Antithrombin-III prevents the lethal effects of Escherichia Coli infusion in baboons . *Circ Shock* 1988;26:227-35.
- (61) Fourrier F., Chopin C et al. Septic shock, MOF,DIC. Compared patterns of ATIII, PC, and protein S deficiency. *Chest* 1992,101.816/823.
- (62) Dickneite G., Leithauser B. Influence of ATIII on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 1999; 19:1566-1572.
- (63) Levi M., de Jongue E., et al. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathway in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 2001; 29:S:90-4.
- (64) Opal S.M. Therapeutic rationale for antithrombin in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28S:34-7.

- (65) Blauhut B., Kramar H., Vinazzer H., bergmann H. Substitution of ATIII in shock and DIC: a randomized study. *Thromb Res* 1985;39: 81-9.
- (66) Baudo F, Caimi TM et al. ATIII replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complication: a controlled double-blind, randomized, multicenter study. *Intensive Care Med* 1998;24:336-42
- (67) Balk R., Bedrosian C., et al. Prospective, double-blind, placebo controlled, trial of ATIII substitution in severe sepsis. *Intensive Care Med* 1995; 2(suppl):517
- (68) Warren BL, et al. High-dose ATIII in severe sepsis a randomized- controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869-78
- (69) Hitendra S., Schmidz A., et al. Structure function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human TFPI-2. *J Biological chemistry* 2004;17:17500-17507.
- (70) Creasey A. New potential therapeutic modalities: TFPI. *Sepsis* 1999;3:173-82.
- (71) La Rosa S. P., Opal S.M. Tissue Factor Pathway Inhibitor and Antithrombin Trial results. *Crit Care Clin* 2005;21:433-48.
- (72) Riewald M., Ruf. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by TF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(14):7742-7.
- (73) Senden N.H.M., et al. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998; 161:4318-24
- (74) Schaeffer P., Mares A.M., et al. Coagulation factor Xa induces endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Cir Res* 1997;81:824-8.
- (75) Creasey A., Chang A.C.K., et al. TFPI reduces mortality from *Escherichia Coli* septic shock. *J Clin Invest* 1993;91:2850-60.
- (76) La Rosa S. P., Opal S.M. Tissue Factor Pathway Inhibitor and Antithrombin Trial results. *Crit Care Clin* 2005;21:433-48.
- (77) Creasey A. Reinhart K. TFPI activity in sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29 (suppl):S126-9.
- (78) Gando S., Kameue T., et al. TF production not balanced by TFPI in sepsis promotes poor prognosis. *Crit Care Med* 2002;30:1729-34.
- (79) Eling M., Stephens A.C., et al. TFPI level in the plasma and urine of children with meningococcal disease. *Thromb Haemost* 2001;85:240-4.
- (80) Opal S., Wunderink R., Laterre P.F. Therapeutic rationale for tissue factor pathway inhibitor for severe community-acquired pneumonia (CAP) In: Final program and abstracts of 42<sup>o</sup> annual meeting Infectious Disease Society of America. Boston: 2004. p.76
- (81) Enjyoji K., Miyata T., et al. Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by TFPI: a segment Gly212-Phe243, of the third Kunitz domain is a heparin-binding site. *Biochemistry* 1995; 34:5725-35.



- (82) Hansen J.B., Sandset P.M. Differential effects of low molecular weight and unfractionated heparin on circulating levels of antithrombin and TFPI : a possible mechanism for difference in therapeutic efficacy. *Thromb Res* 1998;91:177-8.
- (83) Kemme M.J.B., Burggraaf J. Qualification of heparin-induced TFPI release: a maximum release at low heparin dose. *Br j Clin Pharmacol* 2002;54:627-34.
- (84) Iba T., Kidokoro A., Fukunaga M., et al. Association between the severity of sepsis and the changes in hemostatic molecular markers and vascular endothelial damage markers. *Shock* 2005;1:25-29
- (85) Martinez J., Cid A.R., et al. Treatment of intra-abdominal bleeding with recombinant activated factor VII a patients with DIC secondary to septic shock. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:297-99.
- (86) Chuansumrit A., Tangnaratchakit K., et al. The use of recombinant activated factor VII for controlling life-threatening bleeding in Dengue shock syndrom. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:335-42.
- (87) Hoffman J. N., Vollmar B., et al. Effect of long-term and high-dose ATIII supplementation on coagulation and fibrinolysis in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2004;32 (9):1851-1859
- (88) de Pont A.C., et al. Recombinant human activated protein C reset thrombin generation in patients with severe sepsis- a case control. *Critical Care* 2005; ):R490-7
- (89) Dhainaut JF et al. Soluble thrombomodulin , plasma-derived unactivated protein C and rhAPC. *Crit Care Med* 2002; 30(5 suppl):S318-324
- (100) de Jonge E, Levi M. Current drug treatment strategies for disseminated intravascular coagulation. *Drugs* 1998;55:767-777.
- (101) Hovinga JA K. Adamts13, vWF and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemostasis* 2007
- (102) Furlan M, et al. VWF-cleaving protease in TTP and HUS. *NEJM* 1998;339:1578-84
- (103) Tsai .Antibodies to VWF-cleaving protease in acute TTP. *NEJM* 1998;339:1585-94)
- (104) Mannucci PM. Changes in health and disease of metallo-protease that cleaves VWF. *Blood* 2001,98:2730-2735
- (105) Bernardo. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell- derived ultralarge VWF multimers under flow. *Blood* 2004;104:100-106

## LETTURE

Boyer A. et al. Thrombotic microangiopathy: a typical cause of acute renal failure in patients with acute pancreatitis. *Intensive care medicine* 2004; 30:1235-1239.

Nasqvi T.A. et al. Post-operative TTP a review. *Int J clin Pract* 2004; 58: 169-172)

Stephan F., Cheffi M.A., Kaplan C.. Autoantibodies against platelet glycoproteins in critically ill patients with thrombocytopenia. *Am J Med* 2000; 108: 554-60

Mori M., kudo H., Yoshitake S transient EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2000; 26:218-220.

Francois B., Trimoreau F., vignon P. Thrombocytopenia in sepsis syndrome : role of hematophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am J Med* 1997; 103: 114-120.

Sawaki D. MD, Yoshitaka O., et all. A case of Heparin- Inducee Thrombocytopenia with sepsis and congestive Heart failure. *Circ J* 2004;68:1215-1218.

Vanderschueren S., De Weerd A.. Thrombocythopenia and prognosis in intensive care. *Critical Care Med* 2000; 28: 1871-1876.

Gary T., Kinasewitz M.D., et all. Prognostic value of simple involving DIC score in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:2214-2221.

Sjöbring U, Ringdhal U, Ruggeri ZM. Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood* 2002;100:4470-4477

White B., Perry D.. Acquired antithrombin deficiency in sepsis. *Br J haematol* 2001, 112: 26-31.

Eisele B., Lamy M..Antithrombin III in patients with severe sepsis: a randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with Antithrombin III in severe sepsis. *Intesive Care Med* 1998;24:663-72.

Opal S.M., fisher Jr C. J., Dhainaut J.F.. Confirmatory IL-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trials. *Crit Care Med* 1997;25:1115-24.

Wang P., Wood T.J.et all. Inhibition of the biological activity of TNF mantains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma* 1996; 40: 694-71.

Bauer P.R. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 2002; 8:141-148.

Ratnoff O.D., Nebehay W.G.. Multiple coagulative defects in patients with the Waterhouse-Friderihsen syndrome. *Ann Inter Med* 1962; 56: 627-630.

Shimamura K., Oka K., Nakazawa M.. Distribution patterns of microthrombi in DIC. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107:543-7.

Wolff B. Endothelial cell memory of inflammatory stimulation. Human venular endothelial cells store IL8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med* 1998;188:1757-1762

Utgaard JO . Rapid secretion of prestored IL8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 1998;188:1751-1756).

Tomolo ono, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* 2006;107:528-534.

Hack CE, et al. Role of cytokines in sepsis. *Adv immunol* 1997;66:101-195

Consensus document ACCP/SCCM *Crit Care Med* 1992;20:864-874

Z.M. Ruggeri. Prospectives series: cell adhesion in vascular biology. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 559-564

Ruggeri ZM. Structure and function of VWF. *Thromb Haemost.* 1992;67:594-99

Ohomori K. Electron microscopy of human factor VIII/VWglycoprotein : effect of reducing reagents on structure and function . *J Cell Biol* 1982; 95:632-640.

Counts RB. Disulfide bond and quaternary structure of factor VIII/VWF. *J. Clin Invest* 1978;62:702-709.

Gralnick HR. effect of multimeric structure of factor VIII/VWF protein on binding to platelets. *Blood* 1981;58:387-397)

Van Mourick el al. VWF propeptide in vascular disorders: a tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* 1999; 94:179-185

Casonato A et al Reduced VWF survival in type Vicenza von Willebrand disease. *Blood* 2002; 99:180-184

Furlan . Partial purification and characterization of proteasi from human plasma cleaving VWF to fragment produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-4234

Tsai HM. A journey from sickle cell anemia to ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 2004;2:1510-1514

Arya M. Ultralarge multimers of VWF form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* 2002;99:3971-77

Levy. Mutations in a member of ADAMTS gene family cause TTP. *Nature* 2001;413:488-50

Furlan. Deficient activity of VWF-cleaving protease in chronic relapsing TTP. *Blood* 1997;89:3097-3103

Dong J et al. Adams 13 cleaves newly secreted ultralarge vWF multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002;100:4033-4039.

Andersen. Support of ristocetin-induced platelet aggregation by procoagulant-inactive and plasmin-cleaved form of human Factor VIII/VWF. *Blood* 1980;55:101-108

Howard RJ . Cleavage of human VWF by porcine pancreatic elastase. *Blood* 1989;74:673-678

Kunicki TJ Cleavage of human VWF by platelet calcium-activated. *Blood* 1985;65:352)

Padilla A. P-selectin anchors newly released ultralarge VWF multimers to the endothelial cell-surface. *Blood* 2004; 103:2150-56.

Dong J et al. ADAMTS 13 cleaves newly secreted ultralarge vWF multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002;100:4033-403

Shang . Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine-kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid raft .*Blood* 2006;7; 2207-2215

Moake JL Thrombotic microangiopathy *NEJM* 2002; 347:589-600

Sadler JE . A new name in thrombosis ADAMTS13. *PNAS* 2002;99:11552-11554

Dong JF, Moake JL. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge VWF multimers on the endothelial surface under flowing condition. *Blood* 2002;5:1401

Savage B, Ruggeri ZM. *Cell* 1998;94:657-666

Matsumoto M. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutation in Japanese patients with Upshaw-Schulman Syndrome. *Blood* 2004,103:1305-1310

Litch C. Two novel . ADAMTS13 gene mutation in TTP/HUS. *Kidney Int* 2004;66:955-958

Kokame K. Mutations and common polymorphism in ADAMTS13 gene responsible for VWF-cleaving protease activity. *Proc natl Acad Sci USA*. 2002;99:11902-11907

Levy. ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005;106:11-17

Banno F. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but alone is not sufficient to causes TTP. *Blood* 2006; 8:3161-3166

Lattuada A. Mild to moderate reduction of vWF cleaving protease (ADAMTS13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003;88:1029-34

Egerman RS. HELLP syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42:381-9

Mannucci PM VWF cleaving protease (ADAMTS13) in 123 patients with connective tissue disease systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Haematologica* 2003;88:914-918

Barbot J. Ten years of prophylactic treatment with fresh frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as the result of a congenital deficiency of VWF cleaving protease. *Br J Haematol* 2001;113:649-51

Gorge JN. Familiar acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood* 2004;103:4195-4197

Furlan M. Acquired deficiency of VWF-cleaving protease in a patient with TTP. *Blood* 1998;91:2839-46

Colman RW Hemostasis and thrombosis . Fifth edition LWW.

Kitchens. Consultative Hemostasis and thrombosis Saunders. Second edition 2007.

Sterling T. Bennett. Laboratory Hemostasis. Springer 2007

Rivers E., McIntyre L., et al. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of window of opportunity. *CMAJ* 2005;25: 1054-1065.

Monnet X., Lamia B., Anguel N., et al. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Int Care Med* 2005; 31:1573-1576.

Vincent J. L., De Backer D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;9 (suppl 4):S-9-S12.

Dhainaut J-F. Re-establishing organ function in severe sepsis: targeting the microcirculation. *Crit Care* 2005, 9(suppl-4):S1-S2.

Brown G. Coagulation cascade in sepsis: getting from bench to bedside? *Critical Care* 2003;7:117-118.

Slade E., et al. The surviving sepsis campaign: raising awareness to reduce mortality. *Critical Care* 2003; 7:1-2.

Markou N., Apostolakis H., et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multidrug-resistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7: R78-R-83.

Arabi Y., Al Shirawi N., et al. Assessment of six mortality prediction models in patients admitted with severe sepsis and septic shock to the intensive care unit: a prospective cohort study. *Crit Care* 2003; 7:R116-R122.

Esmon C. T. : Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32, 5: S219-222.

Johnson K, Choi Y., De Groot E., et al. Potential mechanism for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *The Journal of Immunology* 1998; 23: 5130-35.

Freeman B.D., Zehnauer B. A., Buchman T. G. A meta-analysis of controlled trials of anticoagulant therapies in patients with sepsis. *Shock* 2003 20;5-9.

Sawaki D. MD, Yoshitaka O., et al. A case of Heparin- Induced Thrombocytopenia with sepsis and congestive Heart failure. *Circ J* 2004;68:1215-1218.

O' Brien J. M., Abraham E: Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. Crit Care Med 2004; 32, 5: S202-208.

Mesters R. M., Mannucci P. M., Coppola et all. Factor VIIa and ATIII activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients. Blood 1996;88: 881-886.

Seita R., Wolf M., Egbring R., et all. The disturbance of hemostasis in septic shock: role of neutrophil and elastase and thrombin, effects of antithrombin III and plasma substitution. Eur J Haematol 1989;43:22-8.

White B., Perry D.. Acquired antithrombin deficiency in sepsis. Br J haematol 2001, 112: 26-31.

Zeerlerder S., Hack C. E., Wuillemin W. A. Disseminated Intravascular coagulation in sepsis. Chest 2005; 24:2864-2875.

Critical Care Clinics 2005;21:3 GUEST EDITORS