



UNIVERSITÀ DI PISA

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN GERIATRIA**

**Tesi di Specializzazione**

*“Sepsi e stato trombofilico correlano con l’aumento del potenziale  
trombinico in una popolazione di soggetti anziani”*

Candidato

Dr.ssa Silvia Baldi

Relatore

Chiar.mo Prof. Franco Carmassi

**Anno accademico 2009-2010**

## INDICE

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Sistema emostatico</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Esplorazione funzionale del sistema coagulativo</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Coagulazione e invecchiamento</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Modificazioni età dipendenti</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Alterazioni della coagulazione in corso di Sepsis</b>	<b>29</b>
	<b>6.1 Attivazione primaria dell'emostasi</b>	<b>29</b>
	<b>6.1.1 Piastrinopenia e piastrinopatia</b>	<b>29</b>
	<b>6.1.2 Funzione piastrinica nella sepsi</b>	<b>31</b>
	<b>6.2 Attivazione secondaria dell'emostasi</b>	<b>33</b>
	<b>6.2.1 Lo stato di ipergoagulabilità</b>	<b>33</b>
	<b>6.2.2 Alterazioni dell'endotelio nella sepsi</b>	<b>34</b>
	<b>6.2.3 Le micro particelle e la loro capacità pro coagulante</b>	<b>37</b>
	<b>6.2.4 Cascata coagulativa nella sepsi</b>	<b>38</b>
	<b>6.2.5 Fibrinolisi</b>	<b>40</b>
	<b>6.3 Manifestazioni cliniche</b>	<b>42</b>
	<b>6.3.1 Laboratorio</b>	<b>43</b>
	<b>6.3.2 I markers emocoagulativi associati alla gravità della sepsi</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>46</b>
	<b>7.1 Protocollo sperimentale</b>	<b>46</b>
	<b>7.2 Determinazione del potenziale trombinico</b>	
<b>8</b>	<b>Risultati</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Discussione</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>62</b>

## **Introduzione**

*"Senectus ipsa morbus"*

(Cicerone, Cato Maior de Senectute 44 a.C.)

*“Lo studio è la miglior previdenza per la vecchiaia”*

(Aristotele, Aforismi IV sec. a.C.)

Da sempre l'uomo ha rivolto con diffidenza lo sguardo verso la cosiddetta “*terza età*”, quasi ad averne paura, grazie alla visione sociale comune, stereotipata, che ne fa un periodo di debolezza e declino, di malattia e solitudine, di estrema fragilità.

Oggi giorno però il tema della vecchiaia è uno dei più importanti tra quelli che riguardano la struttura sociale della comunità umana all'inizio del terzo millennio. L'allungamento della vita o, meglio, dell'*aspettativa di vita*, ha portato la terza età (sopra i 65 anni) e quarta età (sopra gli 80) ad avere un ruolo attivo e passivo estremamente importante, sia per il numero degli anziani, in continuo aumento percentuale, che per la complessità del tema poiché le alte età hanno fatto emergere problematiche sanitarie un tempo sconosciute o per lo meno misconosciute. Dalla nuova situazione creatasi, è nata anche la necessità di coniare nuovi termini.

Con l'espressione inglese **Ageing society** si designa la società mondiale e la sua tendenza all'invecchiamento demografico.

È però da considerare più corretto parlare di **Ageing Population**, cioè di popolazione che invecchia (quota percentuale di persone over 65). Invecchiano le persone ed invecchia quindi la popolazione. Non solo l'età media della popolazione è aumentata negli ultimi decenni in modo straordinario, ma anche le previsioni di autorevoli organismi internazionali per i prossimi decenni confermano questa tendenza. Secondo le proiezioni delle Nazioni Unite, infatti, nel 2050 l'età media a livello planetario sarà di 38 anni, mentre nel 1990 era di 26 anni (con un aumento pari a oltre il 46% in 60 anni). Si tratta di un fenomeno unico nella storia dell'umanità, di notevole rilevanza sia relativamente che assolutamente.

L'Europa è il continente che detiene il primato dell'età media più alta: già nel 1990 era di 37 anni, mentre nel 2050 l'ONU prevede che sarà di 47 anni, mentre in Africa, il continente più giovane era di 18 anni nel 1990, secondo le proiezioni sarà di 31 anni nel 2050, con un aumento record di oltre il 70%.

Più in particolare è possibile considerare l'incidenza della popolazione residente con almeno 65 anni d'età nei Paesi dell'Unione europea, che nel 2005 era pari al 17,2%.

È evidente l'aumento per il passato, se si considera che nel 1990 era pari al 14,6%, ma si è previsto anche un aumento per il futuro del 19,4% nel 2015 e del 20,7% nel 2020. Nel 2005 il record assoluto è detenuto dall'Italia, con una

percentuale pari al 19,4%.

Se le previsioni sono corrette nei due Paesi OCSE in cui l'invecchiamento è maggiore, l'Italia e il Giappone, all'incirca una persona su quattro sarà ultrasessantacinquenne nel 2020.

Negli Stati Uniti vi sono attualmente 35 milioni di persone di età maggiore di 65 anni, con la previsione che diventino circa 60 milioni nel 2030 (1).

Le problematiche sanitarie nascono nel momento in cui si considera che l'invecchiamento è il maggior fattore di rischio per innumerevoli patologie.

Basti pensare che i nuovi casi di cancro ogni anno sono 300.000, e che di questi, secondo una stima del 2009, il 63,7% si verifica nell'età avanzata.

Inoltre, sebbene studi epidemiologici abbiano dimostrato che il diabete mellito, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione arteriosa essenziale, lo stile di vita sedentario ed i fattori genetici costituiscono fattori di rischio per lo sviluppo di cardiopatia ischemica, infarto ed arresto cardiaco, attualmente il maggior fattore di rischio cardiovascolare è rappresentato dall'invecchiamento (2). È dimostrato che con l'avanzare dell'età, in soggetti in apparente buona salute, si hanno modificazioni della struttura e della funzione cardiovascolare che fanno parte del "normale" invecchiamento, precedono malattie cliniche e sono importanti fattori predittivi di sviluppo della patologia aterosclerotica.

Anche i livelli di molti fattori della coagulazione si modificano con l'età nella direzione che sembra facilitare la

trombosi; l'origine è multifattoriale: l'invecchiamento di per sé è un'inflammatione cronica di basso grado.

Sulla vecchiaia insiste uno stato di ipercoagulabilità che può contribuire a formare trombosi arteriose e venose in zone dove la parete vasale è lesionata o dove c'è stasi.

Oltre l'80% della patologia coronarica si manifesta nell'anziano: la prevalenza sale dal 4,5% all'età di 50 anni ad almeno il 30% in soggetti di 70 anni. L'incidenza di arresto cardiaco è del 15% in persone di 80 anni (rispetto all'1-2% in soggetti di 40-50 anni) (3).

La morbilità e la mortalità per malattie cardiovascolari nella popolazione anziana avrà sempre più un impatto sostanziale sulle risorse della cura dello stato di salute.

## **2. Sistema emostatico**

Il sistema emostatico è un meccanismo di difesa che preserva l'integrità del sistema circolatorio.

In realtà, la fisiopatologia del sistema coagulativo e fibrinolitico, in modo sempre più dettagliato, è stata caratterizzata e definita solo negli ultimi due decenni. Sono infatti state precisate le proprietà biochimiche delle componenti presenti in circolo, le reazioni di attivazione con i loro meccanismi di controregolazione, le interconnessioni

esistenti con l'endotelio, i fattori del complemento, i mediatori della flogosi, le citochine, il sistema fibrinolitico.

E' stato possibile mettere in evidenza molteplici alterazioni genetiche, che hanno reso, sempre più evidente, il ruolo svolto dal sistema emostatico, nella patogenesi delle malattie tromboemboliche e delle complicanze emocoagulative della sepsi, delle neoplasie, dell'angiopatia diabetica, dell'aterosclerosi, dell'eclampsia gravidica.

Di pari passo anche la diagnostica di laboratorio si è andata affinando, fino a proporre validi tests di "prima istanza", specifici algoritmi diagnostici e di monitoraggio terapeutico, dosaggi molecolari dei difetti genetici.

L'emostasi coinvolge la parete dei vasi, rivestita da cellule endoteliali, e necessita di proteine plasmatiche solubili, alcune delle quali coinvolte direttamente nel processo emostatico e alcune come regolatori della coagulazione (vedi Tab.1).

Cambiamenti nella membrana plasmatica alterano la composizione fosfolipidica presentata al flusso sanguigno.

Con l'espressione del fattore tissutale (Tissue Factor, TF), i proenzimi (zimogeni) dei fattori della coagulazione del sangue sono convertiti sequenzialmente ad enzimi, e rapidamente viene prodotta trombina. Inizia così la formazione del coagulo (4).

Un'efficace emostasi primaria, essenzialmente, richiede tre eventi chiave:

1. L'adesione piastrinica;
2. La liberazione dei granuli;
3. L'aggregazione piastrinica.

Entro pochi secondi dal momento in cui è sopravvenuta la lesione, le piastrine aderiscono alle fibrille di collagene del sub endotelio vascolare, mediante almeno due recettori del collagene, la glicoproteina Gp Ia/IIa, appartenente alla famiglia delle integrine, e la Gp VI. Il legame al collagene della GpVI trasduce i segnali che attivano le piastrine mediante il fattore Fc (FcR $\gamma$ ). L'interazione con il collagene è stabilizzata dal fattore di von Willebrand, una glicoproteina adesiva che consente alle piastrine di rimanere adese alla parete vasale, nonostante le elevate forze laminari presenti all'interno del lume vascolare. Il fattore di von Willebrand svolge questa funzione formando un legame tra i recettori piastrinici situati sulla GpIb/XI e le fibrille di collagene. Le piastrine adese e attivate rilasciano quindi i costituenti dei granuli preformati e sintetizzano ex novo mediatori come ADP, PDGF, vWF. Come per altre cellule, l'attivazione e la secrezione di piastrine sono regolate dal livello di nucleotidi ciclici, dall'afflusso di ioni calcio, dall'idrolisi dei fosfolipidi di membrana e dalla fosforilazione di specifiche proteine intracellulari.

Il legame di sostanze agoniste, come adrenalina, collagene o trombina, ai recettori di superficie delle piastrine attiva due enzimi di membrana: il fosfatidilinositolo e la fosfatidilcolina. Inizialmente una piccola quantità di acido arachidonico è convertita in trombossano A<sub>2</sub> che, a sua volta, può attivare la fosfolipasi C. la formazione di trombossano A<sub>2</sub> dall'acido arachidonico è mediata dall'enzima ciclossigenasi.



### FIGURA 53.3 HARRISON

Il meccanismo è finemente bilanciato e controlla la velocità e l'entità dell'attivazione piastrinica.

Il trombossano A<sub>2</sub>, prodotto dall'acido arachidonico delle piastrine aumenta l'attività delle fosfolipasi C, che a sua volta stimola l'attivazione e la secrezione piastrinica. Al contrario la prostaciclina, prodotta dall'acido arachidonico delle cellule endoteliali inibisce l'attivazione piastrinica facendo aumentare i livelli di AMPciclico.

Gli agenti potenzialmente attivatori delle piastrine si legano ad un recettore di superficie che dà inizio a una cascata di eventi con funzioni di segnale. Le quattro principali classi di recettori sono:

1. Il complesso GpIIb/IX che si lega al fattore di von Willebrand
2. I recettori della famiglia delle integrine GpIIb/IIIa (che lega il fibrinogeno) e GpIa/IIa (che lega il collagene)
3. I recettori "a serpentina" che attraversano sette volte la membrana e che legano la trombina (PAR1)

o il Trombossano A2

4. GpIV/FcγRIIIa che lega il collagene.

La presenza di segnale provoca un flusso di calcio a cui conseguono il rimodellamento del citoscheletro, la variazione della forma, la formazione di filopodi e il rilascio di granuli.

Questi cambiamenti permettono alla piastrina di aderire ai substrati e di formare degli aggregati intravascolari, insieme alle glicoproteine piastriniche e della matrice, come collagene, vWF e fibrinogeno.

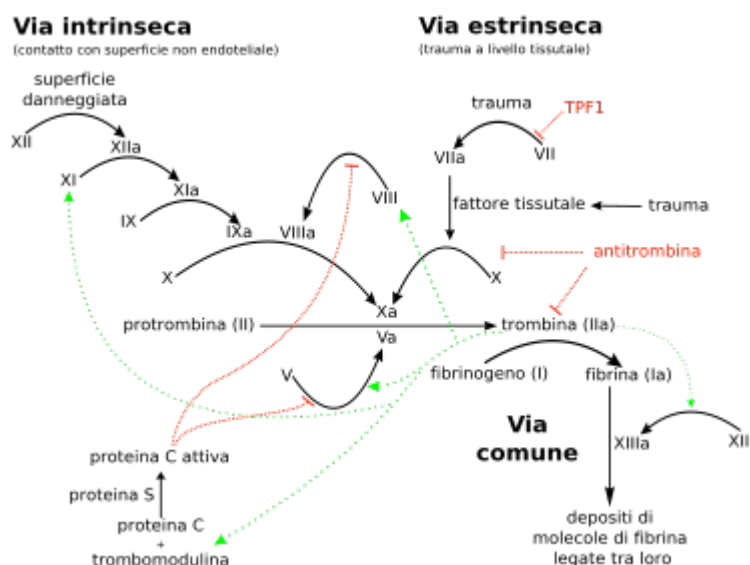
In seguito all'attivazione le piastrine liberano nel plasma il contenuto dei loro granuli: l'endoglicosilasi, enzima che scinde l'eparina, viene liberato dai lisosomi; calcio, serotonina e ADP dai granuli densi; numerose proteine, fra cui il fattore di von Willebrand, la fibronectina, la fibrospondina, il fattore di crescita di derivazione piastrinica e una proteina neutralizzante l'eparina (fattore piastrinico IV) sono liberati dai granuli  $\alpha$ . L'ADP liberato si lega a uno specifico recettore purinergico che, quando attivato, cambia la conformazione del complesso glicoproteina IIb/IIIa in modo che questo si leghi al fibrinogeno, provocando l'aggregazione delle piastrine adiacenti provocando la formazione di un tappo emostatico. Il recettore purinergicospecifico delle piastrine P2Y<sub>12</sub> è il principale recettore di attivazione sulle piastrine. Il PDGF secreto stimola la proliferazione e la chemiotassi di fibroblasti e cellule muscolari lisce entro la parete vasale, favorendo i processi riparativi della lesione iniziale. Non

appena il trombo ematico primario si è formato, le proteine plasmatiche vengono attivate per iniziare l'emostasi secondaria.

Le componenti cellulari del sangue comprendono i globuli rossi, le piastrine e i leucociti, compresi i granulociti, monociti e linfociti. Anche microparticelle, derivate da leucociti e piastrine, e recanti fattore tissutale, contribuiscono alla coagulazione e allo stato di ipercoagulabilità, sebbene le conoscenze relative al loro ruolo funzionale siano limitate.

Queste componenti comunque rivestono un ruolo chiave in varie forme di difesa, ma possono partecipare direttamente nel processo emostatico (Fig.1). In condizioni normali, le microparticelle circolano nel sangue come costituenti inattive e inerti e si attivano in seguito ad un danno tissutale che interrompe la superficie endoteliale di un vaso e il sangue viene a contatto con il tessuto connettivo subendoteliale.

Fig.1



Alternativamente, le cellule endoteliali sono attivate con l'espressione di recettori sulla membrana plasmatica, l'esocitosi dei corpi di Weibel-Palade e l'attivazione di processi biochimici intracellulari.

Nel modello classico della coagulazione sono state definite quattro reazioni che culminano nella sintesi di una quantità di trombina sufficiente a convertire una piccola quantità di fibrinogeno in fibrina. Ciascuna reazione richiede la formazione di un complesso legato alla superficie e la conversione di precursori inattivi in proteasi attive tramite una reazione proteolitica.

La prima reazione (via intrinseca o di contatto) vede tre proteine plasmatiche (fattore Hagemann o fatt. XII, il chininogeno ad alto peso molecolare e la precallieina) formare un complesso con il collagene vascolare sub endoteliale. Dopo il legame con il chininogeno ad alto peso molecolare, il fatt.XII viene lentamente attivato (proteasi attiva) per poter catalizzare la reazione di attivazione della precallieina in callicreina e il passaggio del fattore XI alla forma attivata.

Le seconda reazione (via estrinseca) vede invece la conversione del fattore VII in fatt. VIIa tramite la formazione di un complesso tra fatt. VII, calcio e fattore tissutale. L'attivazione del fatt. VII sembra che sia la principale via coagulativa, sempre attiva. Il fattore VII come il fattore II, IX, X, necessita di calcio e di vitamina K per la sua attività biologica. Infatti tali fattori sono sintetizzati nel fegato dove una carbossilasi vitamina K dipendente catalizza un'unica modificazione post-traduzionale che

aggiunge un secondo gruppo carbossilico ad alcuni residui di acido glutammico. A coppie, questi residui di acido di- $\gamma$ -carbossigluttammico legano il calcio che àncora queste proteine ai fosfolipidi carichi negativamente e conferisce loro attività biologica.

Nella terza reazione viene attivato il fattore X dalle proteasi generate nel corso delle reazioni precedenti. Il fatt. IX, attivato dal fatt. XIa, attiva in concerto il fattore X e il fattore VIII. In alternativa il fattore IX e il fattore X possono essere attivati dal fattore VIIa. Tutte queste reazioni richiedono la presenza di calcio e di fosfolipidi.

La quarta reazione costituisce la tappa finale della coagulazione in quanto consta della conversione della protrombina in trombina in presenza di fattore V, calcio e fosfolipidi. Sebbene la conversione di protrombina in trombina possa avvenire su diverse superfici naturali o artificiali ricche di fosfolipidi, viene accelerata migliaia di volte sulla superficie delle piastrine attivate o delle cellule endoteliali.

La trombina prodotta svolge diverse funzioni nell'emostasi. Oltre alla conversione del fibrinogeno in fibrina, attiva i fattori V, VIII, XIII, stimolando inoltre l'aggregazione e la secrezione piastrinica. In seguito alla liberazione dei fibrinopeptidi A e B dalle catene  $\alpha$  e  $\beta$  del fibrinogeno, la molecola modificata, polimerizza formando un gel insolubile.

Ora, per quanto la cascata emocoagulativa abbia risentito di un'eccessiva semplificazione, per com'è stata descritta essere costituita da due vie funzionalmente distinte, via intrinseca e

via estrinseca, di fatto queste due vie sono funzionalmente connesse. In particolare, l'evento biochimico che descrive la generazione di trombina per attivazione del fattore XII (via intrinseca) non ha rilevanza dal punto di vista emostatico.

Di fatto l'attivazione della cascata emocoagulativa *in vivo* è iniziata dal complesso TF-FVII in grado di promuovere quantità nanomolari di trombina (IIa), per via dell'attivazione del fattore X, ma soprattutto, in maniera e in modo estremamente più efficace dal punto di vista della cinetica enzimatica, di attivare il fattore IX (FIX). Il FIX, in presenza di fattore VIII attivato (FVIIIa), rappresenta un evento enzimatico straordinariamente efficace e funzionalmente adeguato all'attivazione del FX, nell'ordine di migliaia di volte superiore di quanto rilevabile sperimentalmente mediante l'attivazione diretta del FX da parte del FVIIa (Fig.2). Questo evento, identificabile come attività by-passante del FVIII, dà ragione del funzionamento attuale della cascata emocoagulativa e della sua straordinaria efficacia.

Fig. 2

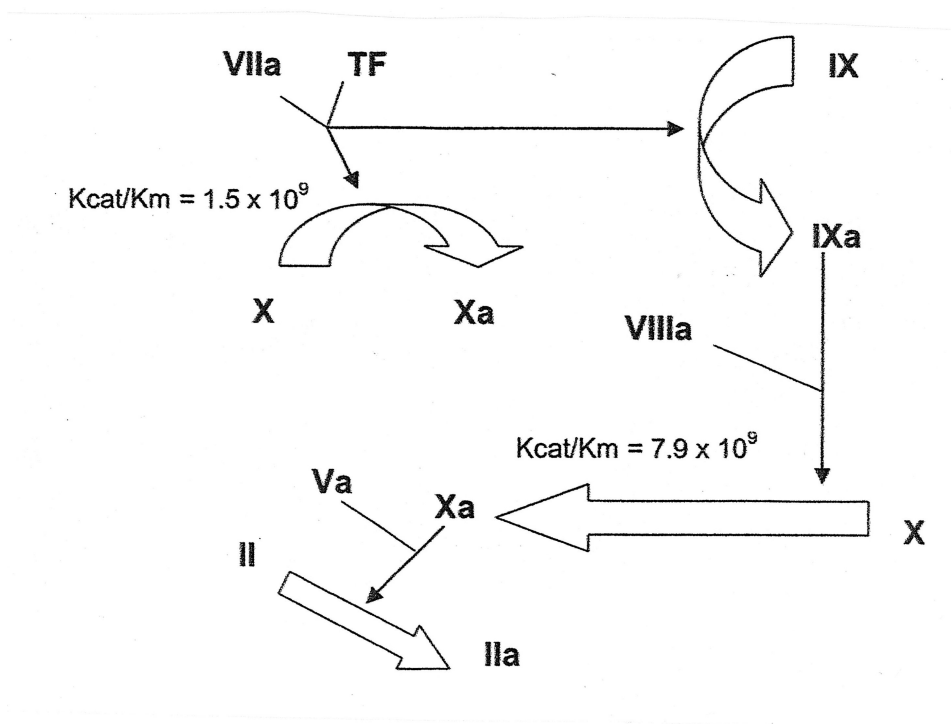




Tabella 1. I fattori della coagulazione (5).

<b>Denominazione del Comitato Internazionale</b>	<b>Nome e sinonimi</b>	<b>Sito di produzione</b>	<b>Funzioni Principali</b>
Fattore I	Fibrinogeno	Fegato	Si trasforma in fibrina
Fattore II	Protrombina	Fegato, dipendente dalla vitamina K	Viene convertita in trombina
Fattore III	Fattore tissutale (TF) o tromboplastina tissutale	Cellule danneggiate	Forma complessi con il FVIIa, in presenza di ioni $Ca^{++}$ , per attivare il FX
Fattore IV	Ione $Ca^{++}$	Dalla dieta o riserva ossea	Favoriscono l'interazione tra enzimi, cofattori e fosfolipidi
Fattore V	Proaccelerina o acceleratore della protrombina fattore labile	Fegato	Agisce da cofattore non enzimatico nel formare complessi con il FXa e con i fosfolipidi piastrinici per attivare la protrombina



Fattore VI	Non più in uso	--	--
Fattore VII	Proconvertina o acceleratore della conversione della protrombina sierica o autoprotrombina I o fattore stabile	Fegato, dipendente dalla vitamina K	Forma complessi con il TF, in presenza di ioni $Ca^{++}$ , per attivare il FX
Fattore VIII	Fattore antiemofilico (AHF) o fattore antiemofilico A	Fegato	La porzione a basso peso molecolare agisce da cofattore non enzimatico nel complesso tenasico per attivare il FX

	Fattore di Christmas o fattore antiemofilico B; componente	Fegato,	Agisce con il complesso tenasico per attivare il FX; è , a propria volta, attivato dal complesso TF/FVIIa della via
--	--	---------	---

Fattore IX	della tromboplastina plasmatica o autoprotrombina II	dipendente dalla vitamina K	estrinseca ( cross-over tra via estrinseca e via intrinseca )
Fattore X	Fattore di Stuart-Prower o autoprotrombina III	Fegato, dipendente dalla vitamina K	E' l'enzima direttamente responsabile della formazione della trombina dalla protrombina
Fattore XI	Antecedente della tromboplastina plasmatica o fattore antiemofilico C	Fegato	Attiva il FIX
Fattore XII	Fattore di Hageman (HF) o fattore da contatto	Fegato	Legandosi al sottoendotelio innesca la via intrinseca della coagulazione
Fattore XIII	Fattore di Laki-Lorand o fattore stabilizzante la fibrina o transglutaminasi plasmatici	Fegato	Causa la polimerizzazione della fibrina solubile in fibrina insolubile
			Attivata dal FXIIa, con

Precallicreina (PK)	Fattore di Fletcher	Fegato	il contributo di HMWK, promuove a sua volta l'attivazione del FXII (amplificazione dell' attivazione )
Chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK)	Fattore di Fitzgerald	Fegato	Contribuisce all'attivazione del sistema plasmatico attivabile da contatto convertendo la precallicreina in callicreina e fornendo l'attacco per il FXI

### **3. Esplorazione funzionale del sistema coagulativo**

La funzionalità del sistema coagulativo del singolo paziente può essere esplorata attraverso alcune indagini di laboratorio.

Il *tempo di tromboplastina parziale (PTT)* viene eseguito su un campione di sangue mescolato con citrato ( citratato ). Il Plasma viene separato e posto in una provetta in cui vengono aggiunti calcio, agenti attivanti come il caolino e un'emulsione di fosfolipidi.

Il caolino ha la funzione di produrre un'attivazione da contatto ottimale, i fosfolipidi ( sostituti piastrinici ) forniscono una superficie adatta per le interazioni enzima-substrato necessarie allo svolgimento delle reazioni coagulative e, infine, il calcio aggiunto rimpiazza il calcio chelato dal citrato.

Il tempo impiegato per la formazione del coagulo di fibrina, in queste condizioni, rappresenta il tempo di tromboplastina parziale attivato ( aPTT ) e dipende dalla concentrazione di molti fattori: XII, IX, VIII, X, V, II, I, ma è più sensibile ai deficit di IX e VIII.

Il PTT è allungato quando la concentrazione di questi fattori ( soprattutto IX e VIII ) è inferiore al 25-30% del normale.

Questo tempo è detto “parziale” perché misura la generazione della protrombinasi (tromboplastinogenesi) solo per la via intrinseca.

Può essere espresso in secondi o meglio, come rapporto tra PTT in esame e il PTT di un pool di plasmi normali ( PTT ratio ) (6,7).

Il *tempo di protrombina* ( *PT* ) o tempo di Quick, misura il tempo necessario alla formazione del coagulo di fibrina quando al plasma citratato del paziente si aggiungono tromboplastina tissutale ( estratto tissutale contenente quantità significative di TF ) e  $Ca^{++}$ .

Il tempo di protrombina, quindi, non dipende solo dalla concentrazione di protrombina, ma anche, e in misura superiore, dalla concentrazione dei fattori VII, X, V e in parte del fibrinogeno.

Il PT è indipendente dalle piastrine, poiché la tromboplastina tissutale che si aggiunge ricombinante o meno, contiene fosfolipidi.

I valori di PT dipendono dal tipo di reagenti utilizzati e sono pertanto soggetti ad ampie variazioni tra laboratorio e laboratorio.

Per questo motivo il PT è stato standardizzato secondo il metodo INR (International Normalized Ratio) che mette in relazione la preparazione tromboplastinica utilizzata dallo specifico laboratorio con un reattivo standard.

In questo modo l'attività di ogni preparazione tromboplastinica può essere espressa con un valore, denominato ISI (International Sensitivity Index), che la quantifica in relazione con la preparazione standard il cui ISI è posto uguale a 1.

Di conseguenza, il valore PT corretto per questo valore darà un INR normalizzato tra i diversi laboratori, indipendentemente dall'attività della preparazione tromboplastinica utilizzata.

Il calcolo dell'INR viene effettuato con la seguente formula (6,7) :

$$\text{INR} = [ \text{PT ( paziente )} / \text{PT ( media dei controlli )} ] * \text{ISI}$$
  
(considerato come potenza).

Il tempo di trombina ( TT ) misura il tempo necessario alla formazione del coagulo di fibrina quando al plasma citratato del paziente si aggiunge trombina e  $\text{Ca}^{++}$ .

Quindi il tempo dipende dalla concentrazione del fibrinogeno (FI) ed è allungato nelle ipofibrinogenemie, nelle disfibrinogenemie, nell'ipereparinemia e quando vi è un eccesso di fibrinopeptidi (che interferiscono con l'azione della trombina e con la polimerizzazione della fibrina).

Una condizione di deficit di fibrinogeno può essere distinta da una situazione in cui sia presente un inibitore aggiungendo una piccola quantità di plasma normale al plasma del paziente e ripetendo quindi la misurazione del TT (6,7).

Inoltre, tutti i fattori plasmatici che intervengono nell'emostasi possono essere dosati singolarmente con metodi funzionali, confrontandone l'attività con quella di plasmi naturalmente o artificialmente privi del fattore in esame.

Aggiungendo al plasma del paziente un uguale volume di plasma normale, contenente il fattore di cui manca il paziente, si avrà la normalizzazione del PTT o del PT.

Se nonostante tale aggiunta non si ha normalizzazione, è indicativo della presenza di inibitori nel plasma del paziente, che andranno quindi a bloccare anche i fattori contenuti nel plasma normale (6,7).

La tecnica consiste nell'incubare il plasma del paziente con plasma normale, in rapporto 1:1, a 37°C per 2 ore.

Quando il quadro emorragico orienta per un'alterazione plasmatica, come test di screening si eseguiranno il PT e il aPTT, in base ai quali si configureranno le seguenti possibilità:

1. PT normale e aPTT allungato sono compatibili con deficit di uno o più fattori della via intrinseca (XII, XI, IX, VIII). Prima di procedere al dosaggio dei singoli fattori è opportuno indagare sull'esistenza di eventuali inibitori circolanti.
2. PT allungato e aPTT normale sono compatibili con alterazione della via estrinseca per deficit di FVII.
3. PT e aPTT entrambi allungati sono compatibili con deficit dei fattori della via comune (X, V, II, I), con disfibrinogenemia, con la presenza anormale di anticoagulanti.

A questo punto si esegue il tempo di trombina: se esso è normale si penserà ad un deficit della via comune (X, V, II), mentre se è allungato si penserà ad ipofibrinogenemia o disfibrinogenemia o presenza di anticoagulanti o a un quadro di coagulazione intravasale (7). Pur essendo molto utile tale schematismo si deve tener conto che il PTT si allunga solo se il tasso di FVIII e FIX è <25%. Pertanto se si ha il sospetto clinico di emofilia o di malattia di von Willebrand non severe, bisogna procedere al dosaggio specifico dei fattori VIII e IX (7).

#### **4. Coagulazione e invecchiamento**

L'incidenza di complicazioni trombotiche aumenta con l'età, non solo per la fibrillazione atriale ma anche per i fenomeni trombo embolici venosi, infatti il rischio di trombosi venosa aumenta da 1 caso per 10.000 persone sotto i 40 anni di età ad 1 per 100 sopra i 75 anni (8,9).

La fibrina viene formata localmente dall'azione della trombina sul fibrinogeno che si trova nel plasma in quantità relativamente abbondanti (2-4g/L) e la **sua concentrazione aumenta con l'età**. Al contrario del fibrinogeno, gli altri fattori della coagulazione sono presenti nel plasma in relative basse concentrazioni e devono prima essere assemblate su una superficie per avere un'interazione efficace e questa è data dalle piastrine che vengono attivate da un danno alla parete vasale.

Le piastrine attivate espongono all'esterno fosfolipidi negativi (fosfatidilserine) che normalmente sono rappresentate sul versante interno della membrana cellulare e questi legano numerosi fattori della coagulazione. Questi servono da ligandi per molti fattori della coagulazione: protrombina, fattore VII, IX e X sono proenzimi che si legano alle fosfatidilserine tramite il residuo acido gammacarbossiglutammino dovuto alla carbossilazione, vitamina K dipendente, dell'acido glutammico.

In vivo la cascata coagulativa è iniziata dal Fattore Tissutale, proteina integrale di membrana presente sulla superficie di molte cellule esterne al torrente circolatorio come quelle della tunica avventizia dei vasi, pronta ad attivare la coagulazione quando si perde l'integrità del vaso (10).

Le cellule endoteliali possono essere indotte, in vitro, ad esprimere il fattore tissutale come anche in condizioni patologiche: le placche aterosclerotiche sono ricche di fattore tissutale, maggiormente espresso dai macrofagi (11).

Il fattore tissutale è un cofattore che lega il fattore VII e ne promuove l'attivazione. Il complesso fattore tissutale/fattore



VIIIa attiva i fattori X e IX (12): il fattore X attivato determina la fase iniziale mentre il fattore IX è responsabile della propagazione. Il fattore Xa attiva, in presenza del fattore Va, la protrombina sulla superficie piastrinica; poi il complesso fattore VIIIa/fattore IXa attiva il fattore X determinando la propagazione.

Il trombo si forma non solo nella zona di lesione dell'arteria ma anche in zone di stasi come le trombosi venose in caso di immobilizzazione o la formazione di trombi atriali in caso di fibrillazione. Nelle aree di stasi la trombina non viene diluita rapidamente inoltre si verifica una maggiore interazione tra piastrine e leucociti determinando una maggiore espressione di fattore tissutale (13).

Per impedire la propagazione del trombo nei vasi indenni, ci sono dei meccanismi feed-back negativi come l'Antitrombina III, il sistema trombomodulina/proteina C/proteina S e l'inibitore del fattore tissutale.

L'Antitrombina è una proteasi che blocca la trombina ma anche i fattori IX, X e XI attivati; l'eparina determina un cambiamento di configurazione dell'antitrombina rendendola più efficiente nell'interazione.

La trombomodulina è una proteina trans membrana della superficie endoteliale che lega efficacemente la trombina. Una volta legata, la trombina perde le sue proprietà pro coagulanti ma attiva la proteina C legata al recettore sulla superficie endoteliale. La proteina C attivata è una proteasi vitamina K-dipendente che, con il cofattore proteina S, inattiva i fattori Va e VIIIa.

Deficit congeniti di proteina C ed S e la mutazione del fattore V Leiden determinano un aumento di trombosi venose.

Infine l'inibitore del fattore tissutale (TFPI), serinproteasi che si lega al fattore tissutale e blocca la fase iniziale della coagulazione.

La trombosi è un processo dinamico. Con la fibrinolisi viene degradata la fibrina tramite una proteasi chiamata plasmina che a sua volta si forma dall'attivazione del plasminogeno.

Si formano così prodotti solubili della degradazione della fibrina contenenti l'epitopo chiamato D-Dimero.

Il sistema fibrinolitico è regolato a tre livelli:

- 1) l'inibitore della fibrinolisi trombino-attivato
- 2) Alfa 2- antiplasmina
- 3) inibitore dell'attivatore del plasminogeno.

## **5. Modificazioni età dipendenti**

I livelli di molti fattori della coagulazione si modificano con l'età nella direzione che sembra facilitare la trombosi.

L'origine è multifattoriale: l'invecchiamento di per sé è un'inflammatione cronica di basso grado.

In uno studio fatto su soggetti ultracentenari si è visto come questi abbiano valori più elevati di fattori della coagulazione e della fibrinolisi rispetto ai giovani controlli.

Si evidenzia una maggior quantità di enzimi della coagulazione attivati. Inoltre i complessi Trombina-antitrombina (T-AT) aumentano a causa di un aumento di generazione di trombina. L'aumento di trombina determina

un aumento dei valori di fibrina, testimoniato dagli alti livelli circolanti di fibrinopeptide A, D-Dimero e complessi plasmina-alfa<sub>2</sub>antiplasmina.

I livelli circolanti di fibrinogeno e di fattore VIII (14) sono maggiori negli ultracentenari mentre gli altri fattori della coagulazione non subiscono modificazioni.

All'invecchiamento è associato quindi uno stato di ipercoagulabilità che di per sé non causa trombosi se il flusso sanguigno e le pareti vasali sono integre.

L'incremento dei livelli di fattore VIIa indica che l'esposizione al fattore tissutale aumenta con l'età.

I livelli di fibrinogeno aumentano con l'età (15) ma anche negli obesi e nei fumatori mentre l'alcool riduce i livelli di fibrinogeno che è ritenuto essere un fattore di rischio forte ed indipendente di infarto miocardico e morte improvvisa.

Il rischio di trombosi venosa associato ad alti livelli plasmatici di fibrinogeno è maggiore negli anziani; il fibrinogeno determina un aumento di dimensioni del trombo e lo rende più resistente alla fibrinolisi.

Anche il fattore VIII, la cui normale concentrazione nel plasma è estremamente bassa, aumenta con l'età (16) e si associa ad una maggior incidenza di trombosi e quindi di malattie cardiovascolari, ictus e trombosi venose negli anziani.

L'attività fisica risulta essere significativamente ed inversamente proporzionale ai livelli plasmatici di fibrinogeno, fattore VIII e IX, D-Dimero, TPA.

I benefici dell'attività fisica sulle malattie cardiovascolari è dovuto, almeno in parte, agli effetti sulla coagulazione.

Gli effetti dell'invecchiamento sulle proteine vitamina K dipendenti è complesso: i fattori VII e IX aumentano con l'età mentre la proteina C rimane invariata (17); l'aumento del fattore VII è associato ad un aumento di malattie cardiovascolari.

Livelli di fattore VII sono regolati inoltre dai polimorfismi del gene del fattore VII stesso (18,19), dai grassi della dieta e dai lipidi del sangue (20) e questa correlazione è vera in particolar modo negli anziani.

Anche l'assunzione di fibre con la dieta è in relazione, in modo inversamente proporzionale, con i livelli di fattore VII.

L'incremento di livelli plasmatici di fattore IX costituisce un fattore di rischio per le trombosi venose. Sono stati identificati due elementi genetici, ASE (age stable expression) e AIE (age increased expression) che sono essenziali per l'espressione dei geni per la formazione età correlata, stabile o incrementata, del fattore IX.

La vecchiaia è uno stato di ipercoagulabilità che può contribuire a formare trombosi arteriose e venose in zone dove la parete vasale è lesionata o dove c'è stasi.

D'altro canto l'esercizio fisico e una dieta sana sembra possano dare effetti benefici su questo stato di ipercoagulabilità.

## 6. La 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.

### 6.1 Attivazione primaria dell'emostasi

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

#### 6.1.1. 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.

### 6.1.2 **Funzione piastrinica nella sepsi**

La funzione piastrinica comprende:

1. adesione,
2. aggregazione,
3. secrezione,
4. attività pro coagulante,
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. E' stata osservata una riduzione della aggregazione piastrinica agonista-indotta in pazienti con shock settico (Cowandin Jama 1976235:12030-4). 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 VEGFe 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 proflogistici 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 delle 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.

## **6.2 Attivazione secondaria dell'emostasi**

L'attivazione secondaria dell'emostasi si manifesta con un incremento dei livelli in circolo dei D-dimero (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 percentuale variabile dal 15% al 30% con DIC conclamata (18-19).

### **6.2.1 Lo stato di ipercoagulabilità**

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 (14).

### **6.2.2 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 alterazioni coagulative sepsi-indotte.

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 h 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, le citochine, l'endotelio si attiva.

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

Seller (26) nei pazienti settici e nei volontari a cui era stata indotta un'endotossitemia, 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 polimorfonucleati. 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-selectine). 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, cioè 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 il fatt. V non è attivato (da Remick D.G. AM J Pathol 2007).

### **6.2.3 Le microparticelle e la loro capacità procoagulante**

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’endotossimia. 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 microparticle 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 presentino 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 leucociti e leucociti.

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.

#### **6.2.4 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 l'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.

### **6.2.5 Fibrinolisi**

Modelli sperimentali indicano che, quando è massima l'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.

### 6.3 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 sé 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 sanguineo 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<sup>1</sup>, da procedure invasive.

### **6.3.1 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-

---

<sup>1</sup> 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)

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.

### **6.3.2 I markers emocoagulativi associati alla gravità 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-dimero e PC e D-dimero 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.

## **7. Scopo della tesi**

Lo scopo dello studio è di valutare le modificazioni del sistema coagulativo associate allo stato di sepsi e all'età, che nelle fasi più avanzate è caratterizzata da un fenotipo clinico con importanti connotazioni trombotiche.

A questo scopo sono stati inseriti nello studio 56 soggetti di età compresa tra i 65 e i 106 anni, consecutivamente ricoverati nel reparto di Medicina d'Urgenza.

Oltre a questi, abbiamo preso in esame un gruppo di 26 soggetti non affetti da patologia in atto, di età < 65 anni.

I 56 soggetti in esame erano 27 di sesso femminile e 29 di sesso maschile, di età compresa tra i 65 e i 106 anni. Tale popolazione veniva suddivisa in 4 gruppi

1. *Pazienti con sepsi* (19 soggetti)
2. *Pazienti neoplastici* (12 soggetti)
3. *Pazienti neoplastici con sepsi* (7 soggetti)
4. *Pazienti sani* (18 soggetti), cioè non affetti da nessuna delle due forme patologiche prese in esame

Per paziente con sepsi abbiamo inteso un paziente con aumento significativo della conta leucocitaria e incremento della neutrofilico nella formula con concomitante aumento della temperatura corporea. I 26 soggetti in esame avevano un range di età variabile tra i 66 e i 106 anni, con un'età media di 82,47 anni ed erano maggiormente di sesso maschile (uomini 15, donne 11). 7 di essi erano affetti da patologia neoplastica oltre che da un aumento della conta leucocitaria. 12 presentavano una riacutizzazione della BPCO, 7 un'infezione delle vie urinarie (4 erano portatori di

catetere vescicale a permanenza), 3 avevano piaghe da decubito infette, 4 variazione di ndd.

Nessuno dei soggetti ammessi allo studio era in terapia antitrombotica né terapia con anticoagulanti orali.

## **7.1 Protocollo sperimentale**

All'ingresso in reparto, i pazienti reclutati venivano sottoposti a prelievo venoso per lo screening della coagulazione e della fibrinolisi:

- aPTT
- PT
- INR
- Fibrinogeno
- Antitrombina III
- D-Dimero
- Complessi Trombina/Antitrombina (T-AT)
- Frammento F1+2
- tPA
- PAI-1

Contemporaneamente veniva prelevato un campione di sangue, il cui plasma, ottenuto dopo centrifugazione a 3000xg, era stoccato a temperatura di -20°C per la valutazione del potenziale trombinico.

## **7.2 Determinazione del Potenziale trombinico**

Il processo emostatico che porta alla generazione di trombina e alla conseguente formazione del coagulo di

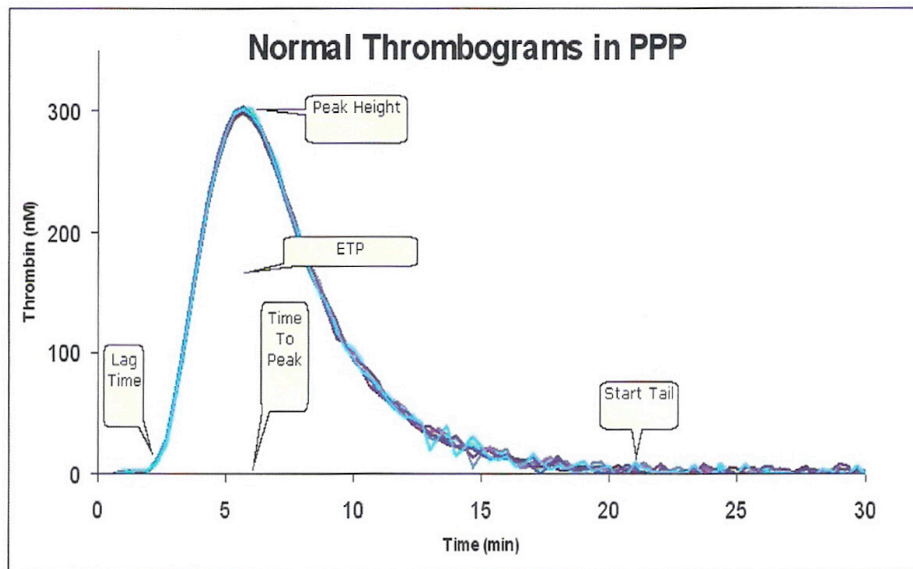
fibrina viene comunemente esplorato attraverso la valutazione di PT e PTT.

La cascata coagulativa è bensì più complessa e articolata, essendo caratterizzata, oltre che da questa prima fase in cui si generano quantità minime di trombina, ragionevolmente identificata come fase iniziale, lagtime, (Fig. 3), anche da una fase di propagazione ed amplificazione che consentono lo sviluppo esponenziale di trombina.

Poiché il PT e il PTT pongono importanti limitazioni nello studio della cascata coagulativa, essendo essi espressione della fase iniziale della stessa, non consentendo invece un'immagine esaustiva della fase di propagazione e amplificazione della genesi di trombina, è stato utilizzato un metodo, non ancora di uso routinario, che permette di calcolare il potenziale trombinico, inteso come quantità di trombina generata in un determinato tempo. Lo strumento impiegato, il thrombinoscope, si basa su un metodo fluorogenico e il programma di analisi elabora tutti i parametri di una curva definita trombogramma.

Fig. 3





Il profilo e l'area della curva risultano dalla concentrazione relativa dei fattori della coagulazione e dei loro inibitori e quindi sono espressione del fenotipo clinico attuale.

La misura della generazione di trombina fu inizialmente descritta da Macfarlane e Biggs nel 1953 e da Pitney e Dacie nello stesso anno. Questo metodo era comunque difficoltoso da mettere su ed era soggetto ad alta variabilità.

Dopo oltre 30 anni il gruppo di Hemker ha sviluppato un metodo automatizzabile, in grado di misurare la generazione di trombina in più campioni simultaneamente (Hemker: 1986, 1993, 2000, 2003), così facilitando la misurazione.

In questa metodica, si dà l'avvio alla misurazione della generazione di trombina aggiungendo un attivatore (Fattore Tessutale) al plasma ricalcificato in presenza di fosfolipidi, cosa che provoca la scissione di un substrato cromogenico o fluorogenico da parte della trombina.

Il metodo cromogenico deve essere allestito in un plasma defibrinato, mentre ciò non è necessario con i metodi

fluorogenici i quali possono essere eseguiti sia in plasmi ricchi di piastrine PRP che in plasmi poveri di piastrine PPP.

I parametri misurati nel metodo fluorogenico (cioè con thrombinoscope) sono:

**Lag-time:** esprime la fase iniziale della generazione di trombina e del processo emocoagulativo.

**Endogenous Thrombin Potential (ETP):** area sottesa alla curva prodotto della concentrazione di trombina per il tempo.

**Peak height:** picco massimo di produzione di trombina

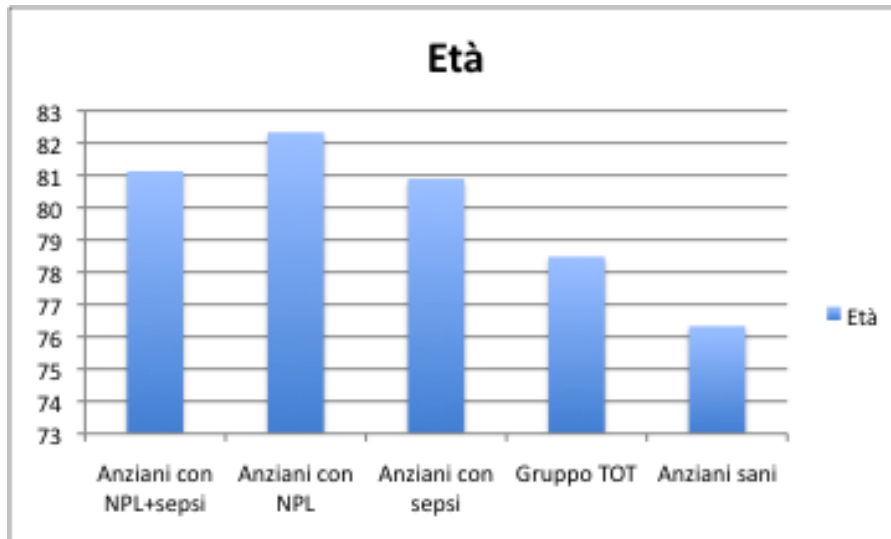
**Time to Peak:** tempo impiegato per raggiungere il picco di formazione di trombina.

**Start Tail:** termine della produzione di trombina, momento nel quale cioè, i sistemi di inibizione della coagulazione prevalgono sulla generazione di trombina.

E' dall'interpretazione di tutti questi parametri che si deduce il potenziale trombinico del singolo soggetto nella sua accezione più ampia e cioè come tendenza alla trombosi o alla emorragia, definita non solo dalla quantità di trombina generata ma anche dal tempo che impiega la cascata coagulativa ad avere inizio, a raggiungere il suo acme e ad estinguersi per il prevalere dei sistemi di inibizione della coagulazione.

## **8. Risultati**

Lo studio comprende 56 pazienti di età compresa tra 65 e 106 anni e un gruppo di controllo con età inferiore ai 65 anni, con età compresa tra i 18 anni e i 64.



I 56 pazienti erano 27 femmine e 29 maschi. Le 27 femmine avevano un'età media di 82,94 anni, mentre quella dei maschi era di 81,26 anni nonostante il gruppo contenesse il paziente più anziano di 106 anni.

I casi di sepsi erano più frequenti nel sesso femminile (29,4%) che in quello maschile (23,1%) come pure la patologia neoplastica, rispettivamente il 35,3% contro il 30,8%. L'associazione tra le due forme patologiche era invece più frequente nei maschi (46,2%) che nelle femmine (35,3%).

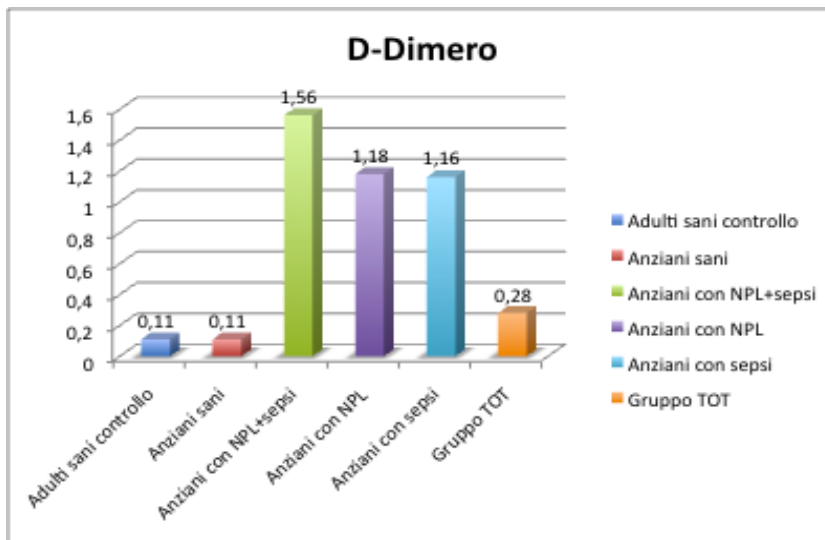
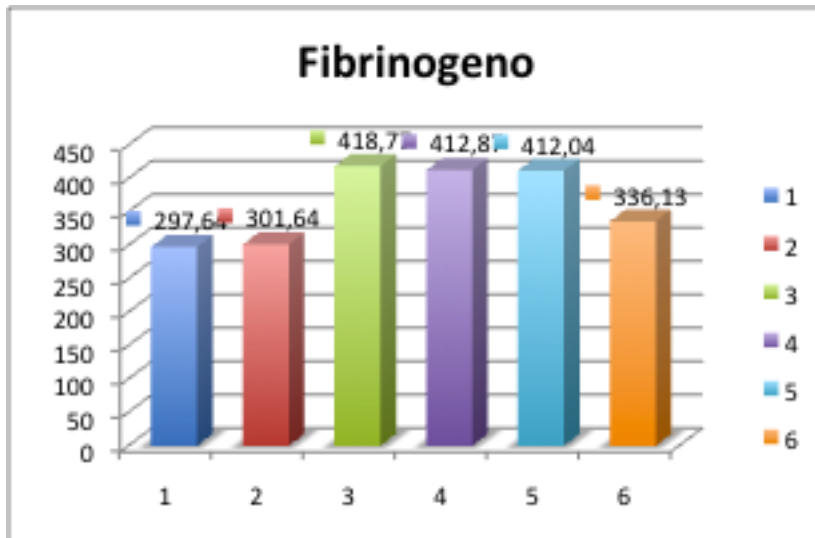
In tabella 2 sono riportati i parametri di laboratorio dei soggetti studiati, suddivisi nei 4 gruppi stabiliti.

Tabella 2.

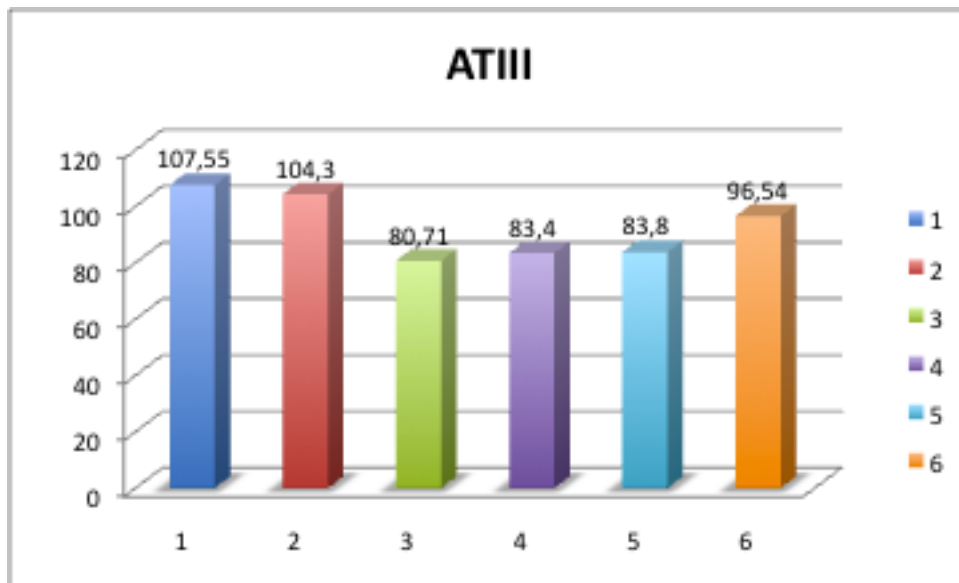
Adulti sani controllo	Anziani sani	Anziani con NPL+sepsi	Anziani con NPL	Anziani con sepsi	Gruppo TOT	Deviazione standard

Età	41	76,33	81,125	82,33	80,89	78,48	
Fibrinogeno	297,64	301,64	418,77	412,87	412,04	336,13	14,126
ATIII	107,55	104,3	80,71	83,4	83,8	96,54	3,325
D-Dimero	0,11	0,69	1,56	1,18	1,16	0,28	0,243
T-AT	2,3	2,85	11	9,98	10,16	4,3	1,095
F1+2	119,2	125,67	305,67	303,2	303,25	167,74	11,39
TPA	1,36	1,88	5,27	5,03	4,89	2,17	1,930
PAI	2,11	2,59	7,78	6,35	6,38	3,7	2,011
lagtime	3,21	3,38	5,3	5,19	5,15	3,68	0,897
ETP	1213,02	1256,22	1598,21	1546,27	1547,85	1317,65	51,04
Peak	203,54	205,58	256,1	254,81	254,54	206,24	23,76
ttPeak	6,73	7,03	9,99	9,6	9,54	7,67	1,92
Start Tail	19,25	21,5	29,93	29,02	28,81	23,59	4,47

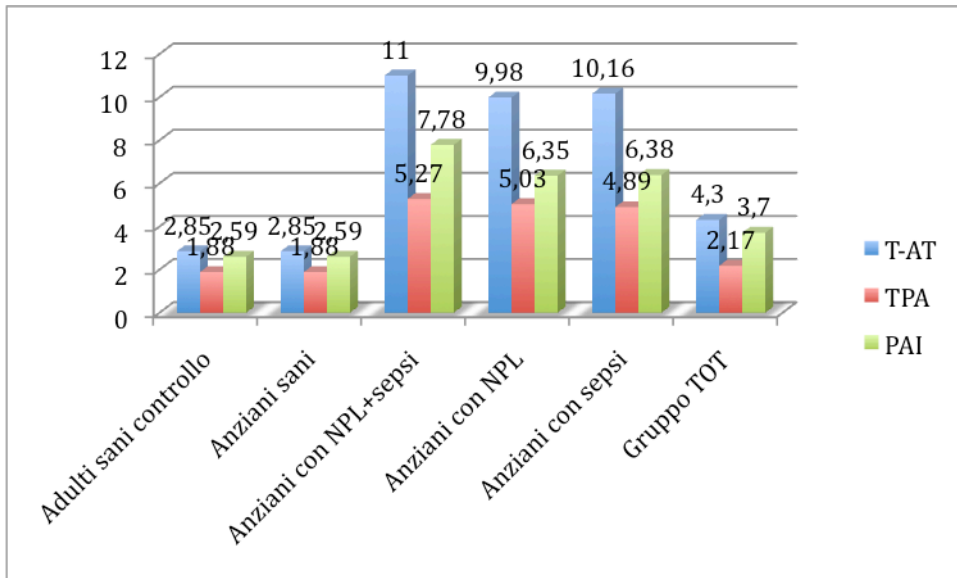
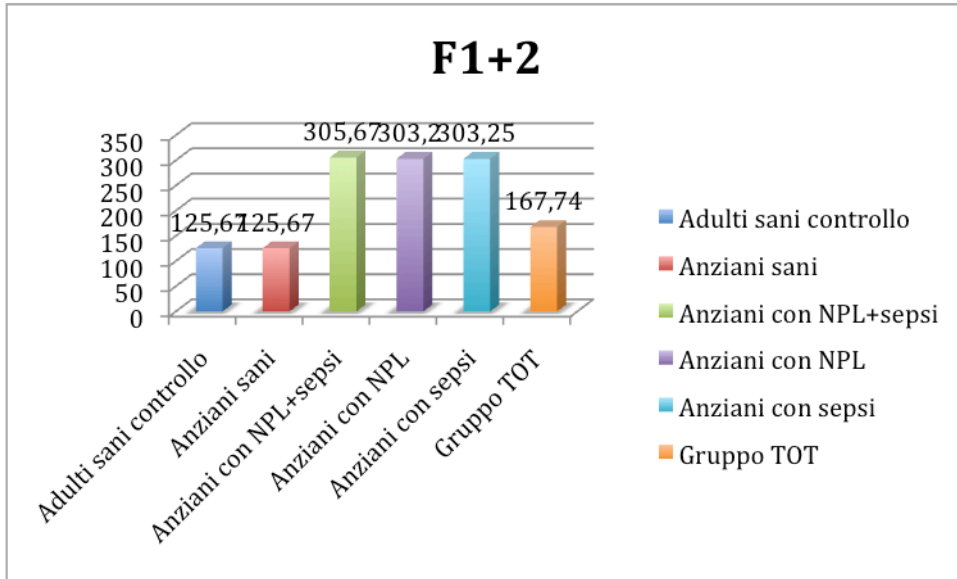
I valori plasmatici di fibrinogeno (Fig.5) e D-Dimero (Fig.7) risultavano essere più elevati nei gruppi “Anziani con NPL e sepsi” (418,77 mg/dl e 1,56mg/l), “Anziani con NPL” (412,87 mg/dl e 1,18 mg/l), “Anziani con sepsi” (412,04 mg/dl e 1,16 mg/l) rispetto ai due gruppi “Anziani sani” e “Adulti” .



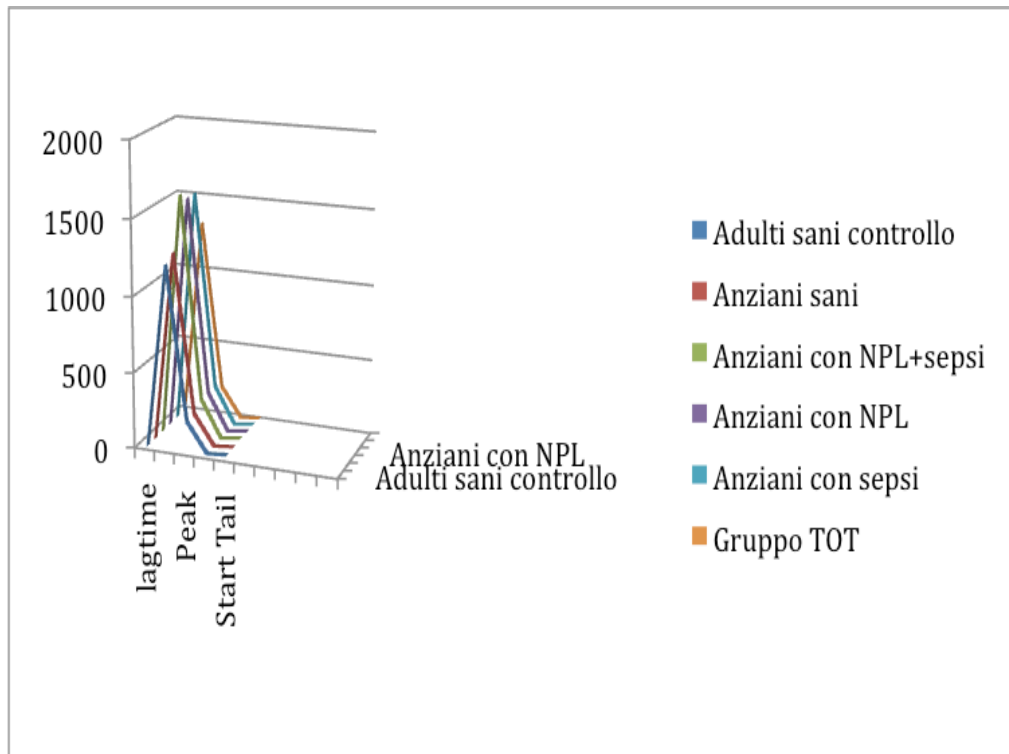
L'antitrombina III (Fig.6) presentava andamento pressoché opposto, con valori inferiori nei primi tre gruppi (rispettivamente 80,71%; 83,4%; 83,8%) rispetto ai gruppi “Anziani sani” e “Adulti”.



I prodotti derivanti dall'attivazione della coagulazione F1+2 (Fig.9), T-AT (Fig.8), TPA (Fig.10) e PAI (Fig.11) risultano più elevati nei tre gruppi affetti da malattia neoplastica e/o sepsi, mentre i valori minori si registrano negli "Adulti" e negli "Anziani sani".



Infine i dati relativi alla generazione di trombina, Lagtime (Fig.12), Peak (Fig.14), ttPeak (Fig.15), Start tail (Fig.16) ed ETP (Fig.13) presentano andamento simile con valori massimi nel gruppo “Anziani”, intermedi nel gruppo “Adulti” con patologia in atto e minimi nel gruppo “Adulti sani” con differenze fra questi ultimi due gruppi più o meno evidenti a seconda del parametro esaminato.





## **9. Discussione**

Lo scopo dello studio era di ricercare le differenze della generazione di trombina in soggetti di differenti classi patologiche e di età successivamente ricoverati nel reparto di Medicina d'Urgenza, per identificarne il fenotipo clinico, essendo questo, come descritto, caratterizzato da evidente tendenza alle complicanze trombotiche. In particolare volevamo porre l'attenzione su una sottopopolazione affetta da sepsi, per individuarne il rischio di complicanza trombotica.

Abbiamo così suddiviso il gruppo dei 56 anziani reclutati in quattro sottogruppi divisi in “Anziani con sepsi”, “Anziani con patologia neoplastica”, “Anziani con sepsi e patologia neoplastica” e “Anziani sani” ad indicare in essi l'assenza di tali patologie. Abbiamo inoltre selezionato un pull di adulti tra i 18 e i 64 anni di controllo.

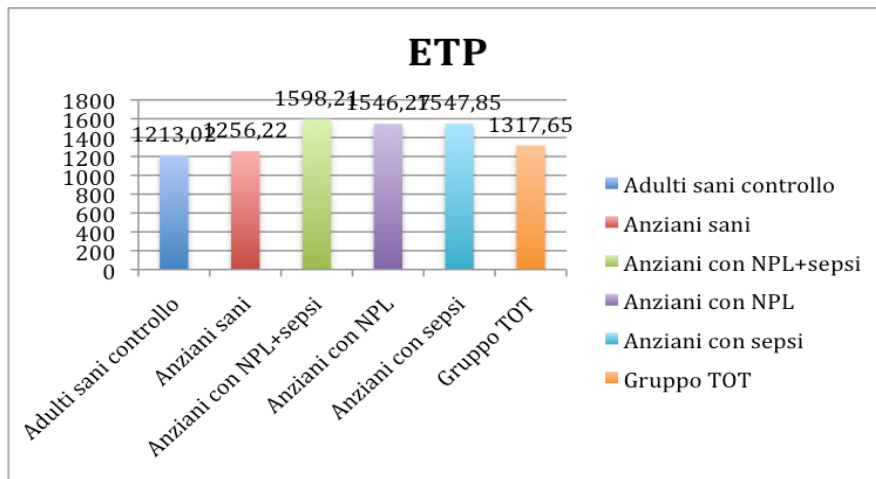
aPTT ed attività protrombinica non evidenziavano differenze nei gruppi esaminati, dimostrando che questi due esami ematochimici sono inadeguati ad evidenziare aspetti connessi con uno stato ipercoagulabile.

In effetti uno stato “ipertonico” della coagulazione appariva possibile dato l'incremento del fibrinogeno, del D-Dimero e

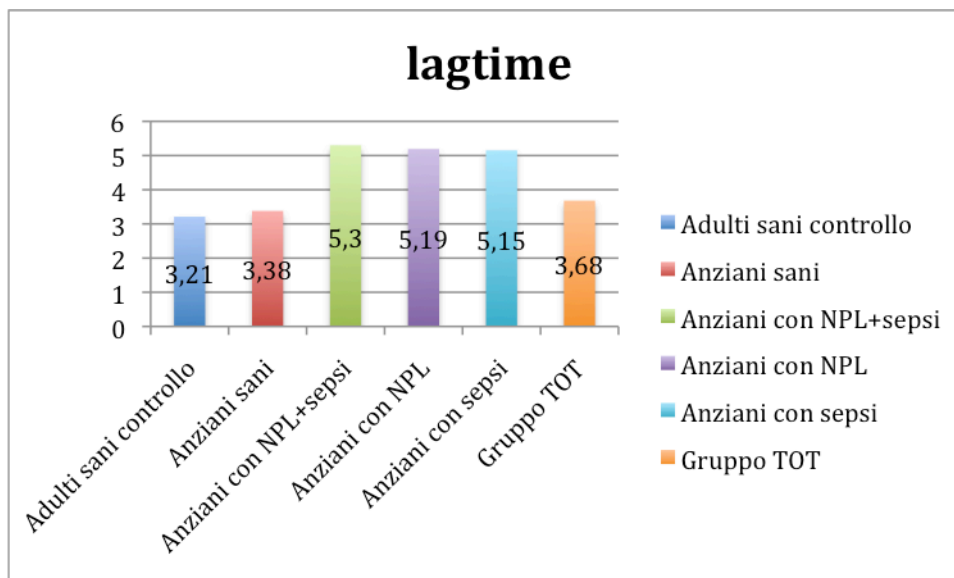
dei prodotti della coagulazione F1+2 e T-AT nei “gruppi patologici”.

In particolare tutti questi parametri erano significativamente più elevati nel gruppo degli “anziani con sepsi e/o patologia neoplastica” rispetto agli “anziani sani” e anche rispetto al gruppo “adulti” di controllo, come effetto della maggiore “sensibilità” del sistema emostatico degli anziani alla produzione di trombina, come descritto (8,9), che risiede nell’aumento di alcuni fattori della coagulazione e nella riduzione dei principali inibitori.

Per quanto concerne i dati relativi alla generazione di trombina, gli “Anziani con sepsi e quelli con e/o patologia neoplastica” risultavano avere un potenziale trombinico (ETP) ed un picco massimo di generazione trombinica significativamente aumentati rispetto agli “Anziani sani” e agli “Adulti” del gruppo di controllo.



Il tempo di latenza per il “burst” di trombina, lag-Time, era maggiore nel gruppo degli “Anziani” rispetto agli “Adulti”, ed entrambi i gruppi mostravano valori superiori al gruppo di controllo.

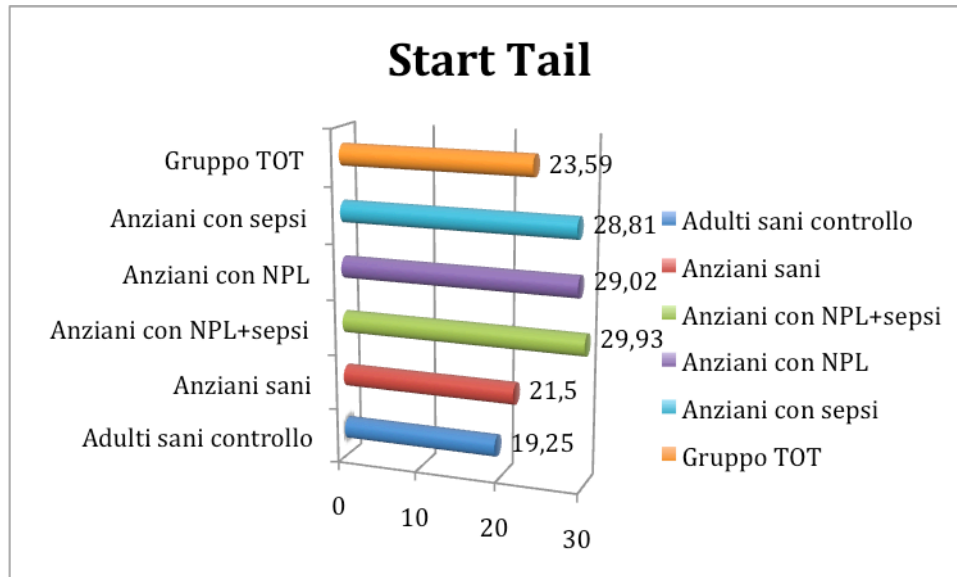


I dati relativi al picco massimo (Peak) di generazione trombinica mostravano andamento simile a quelli del Lag-

Time con valori più elevati negli “Anziani patologici” rispetto agli “Anziani sani” e agli “Adulti”.

Negli “Anziani con sepsi” e in quelli con patologia neoplastica, il termine della generazione di trombina (Start Tail), per il prevalere degli inibitori della coagulazione, risulta ritardato rispetto ai soggetti più giovani.

Confrontando i dati dei soggetti privi di patologia in atto con quelli dei primi due gruppi si riscontrano, quindi, differenze importanti con gli “Anziani” e con i soggetti “Adulti” con patologia in atto.



Questo rivela che se l'età è determinante nelle differenze rilevate fra i gruppi degli anziani con o senza patologia è anche vero che, essendo il gruppo di controllo omologabile

per età agli adulti, la patologia, e non solo l'età, determina un fenotipo pro-trombotico.

Con l'avanzare dell'età, quindi, si determina un incremento della quantità di trombina generata ed ancor più in presenza di patologia settica, che, dai dati sopra illustrati, appare un fattore pro trombotico assimilabile alla patologia neoplastica. Questo sostanziale aumento di potenziale trombinico è alla base dell'aumentato rischio di complicanze ischemiche nella popolazione anziana. Dai dati si evince pure che la concomitanza di neoplasia e sepsi aumentano sinergicamente il rischio protrombotico.

Pertanto la patologia settica, la patologia neoplastica e l'età, definita da alcuni una "malattia infiammatoria cronica", sono singolarmente, ed ancor più se associate, determinanti nella genesi complessiva di trombina. Queste tre condizioni divengono, in questo modo, fattori di rischio indipendenti e predominanti nell'incrementare il potenziale trombinico dell'individuo.

Per quanto attiene le indicazioni pratiche derivanti dallo studio, appare chiara l'importanza della profilassi antitrombotica nei pazienti anziani che, a causa dell'età, incorrono nella possibilità di complicanze trombotiche, ma

soprattutto nel paziente anziano affetto da sepsi o, comunque, a rischio di esposizione a fattori settici, che lo espongono, in modo ancora più evidente, a rischio pro trombotico e alle eventuali complicanze.

## **Bibliografia**

1. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease interprises. Part I: Aging arteries: a “set up” for cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 139-146
2. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease interprises. Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 2003; 107: 346-354
3. Kelly DT. Disease burden of cardiovascular disease in the elderly. *Coron Artery Dis.* 1997 Oct; 8(10):667-9
4. Furie B, Furie BC. *In vivo* thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl. 1): 12-17.
5. Conti F. *et al.* *Fisiologia medica.* Edi-Ermes 2005; 84-100.
6. R.A. Sacher, R.A. McPherson. Interpretazione clinica degli esami di laboratorio. McGraw-Hill Ed.2001; 219-229.
7. Tura S. *Lezioni di ematologia.* Società editrice Esculapio. 2003; 505-511.
8. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992; 232: 155-60
9. Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, et al. A population based perspective of the hospital incidence and case-fatality rate of deep vein thrombosis and pulmonary

- embolism. The Worcester DVT study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 933-8.
10. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134: 1087-97.
  11. Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson T. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb Haemost* 1997; 78:247-55.
  12. Almus FE, Rao LVM, Rapaport SI. Functional properties of factor VIIa/tissue factor formed with purified tissue factor and with tissue factor expressed on cultured endothelial cells. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1067-73.
  13. Makino A, Glogauer M, Bokoch GM, Chien S, Schmid-Schonbein GW. Control of neutrophil pseudopods by fluid shear: role of the Rho family GTPases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C863-C871.
  14. Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population. I. Baseline data in regard to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost* 1985; 54: 475-9.
  15. Meade TW, Chakrabarti R, Haines AP, North WR, Stirling Y. Characteristics affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentration. *Br Med J* 1979; 1: 153-6.
  16. Ariens RA, Kohler HP, Mansfield MW, Grant PJ. Subunit antigen and activity levels of blood coagulation factor XIII in healthy individuals: relation to sex, age, smoking and



- hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2012-16.
17. Bauer K, Weiss LM, Sparrow D, Vokonas PS, Rosenberg RD. Aging-associated changes in indices of thrombin generation and protein C activation in humans. Normative aging study. *J Clin Invest* 1987; 80: 1527-34.
18. Di Castelnuovo A, D'Orazio A, Amore C, et al. Genetic modulation of coagulation factor VII plasma levels: contribution of different polymorphisms and gender-related effects. *Thromb Haemost* 1998; 80: 592-7.
19. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95: 1517-32.
20. Mennen LI, Schouten EG, Grobbee DE, Kluft C. Coagulation FVII, dietary fat and blood lipids: a review. *Thromb Haemost* 1996; 76: 492-9.
21. Rapporto Nazionale 2009, Ageing Society-Osservatorio della Terza Età, **Roma 2009 -**
22. **Rapporto Nazionale 2007, Ageing Society-Osservatorio della Terza Età**, Roma 2007 -  
[www.ageingsociety.com](http://www.ageingsociety.com)
23. Rapporto Onu sulla Popolazione Anziana - Anno degli anziani - 1999
24. Secondo rapporto dell'Onu su "Invecchiamento della popolazione mondiale: 1950-2050"
25. Dati OCSE
26. Rapporto della Commissione delle Comunità europee del 12 ottobre 2006)
27. Crowther MA, Kelton JG, congenital thrombophilic

- states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification. *Ann Intern Med* 138:128, 2003
28. George JN et al: Platelets: Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology 2002* (American Society of Hematology Education Program book). 315:2002
  29. Hartwig JH, Italiano JE JR: Life of the blood platelet, in *Blood: principles and practice of Hematology*, 2nd ed, RI Handin et al (eds) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2003
  30. Mann KG et al: The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1:17, 2003
  31. S. Boraso et al.: *Patologia emocoagulativa e suo trattamento in corso di sepsi* Univ. Degli studi di Padova, 2008
  32. Aird W. C. Sepsis e coagulation. *Crit Care Clin* 21 (2005) 417-431
  33. (Aird W.C. The hematologic system as a marker of organ dysfunction sepsis. *Mayo Clin Proc* 2003;78:869-881.
  34. Mori M., kudo H., Yoshitake S transient EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2000; 26:218-220.
  35. Stephan F., Cheffi M.A., Kaplan C.. Autoantibodies against platelet glycoproteins in critically ill patients with thrombocytopenia. *Am J Med* 2000; 108: 554-60
  36. 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.
37. Warkentin T.E., Aird W.C., Rand J.H.. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid-syndrome. *Hematology* 2003;:497-519.
38. (7) 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.
- 39.(8) Vanderschueren S., De Weerd A.. Thrombocythopenia and prognosis in intensive care. *Critical Care Med* 2000; 28: 1871-1876.
40. (9) Gary T., Kinasewitz M.D., et all. Prognostic value of simple involving DIC score in patiens with severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:2214-2221.
41. (10) Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2:2094-5.
42. (11) Levi M. Disseminated Intravascular Coagulation: What's News? *Critical Care Clinics* 2005; 21: 449-467.
43. (12) Yaguchi A., Lobo F. L. M., Vincent J. L., et all. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2: 2096-2102.
44. (12 a) Cowan DH. Platelet aggrgation as a sign of septicemia in thermal injury. A prospective study. *Jama* 1976; 235:1230-4
45. (13) Levi M. Platelet in sepsis. *Hematology* 2005;10 (s 1): 129-31.
46. (14) Bernard G.F., Vicent J.L., Laterre P.F.. Efficacy and safety of recumbinant human activated protein C for severe sepsis. *NEJM* 2001; 344:699-709.

47. (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.
48. 16) White B., Perry D.. Acquired antithrombin deficiency in sepsis. *Br J haematol* 2001, 112: 26-31.
49. (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.
50. (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.
51. (19) Bauer K.A., Rosenberg R. D. Role of ATIII as a regulator in vivo coagulation. *Semin Hematol* 1991;28(1):10-8.
52. (20) Wiel E., Vallet B, et al .The Endothelium in intensive care. *Crit care Clin* 2005;21:403-413
53. (21) van Hinsbergh V.W. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95(2):198-201.
54. (22) Riewald M., Ruf W. Science review:role of coagulation protease cascade in sepsis. *Crit Care* 2003;7:123-9.
55. (23) Leclerc J., et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and

- a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000; 28:3672-3678.
56. (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.
57. (25) Bauer P.R. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 2002; 8:141-148.
- 58.(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.
59. (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.
60. (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.
61. (29) Vallet B. Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis:role in organ dysfunction? *Critical Care* 2003; 7:130-8.
62. (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.
63. (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.

- 64.(32 ) Riewald M., Ruf W. Science review:role of coagulation protease cascade in sepsis. Crit Care 2003;7:123-9.
65. (33) Ruf W., Dickinson C.D. Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. Trends Cardiovasc Med 1998;8:350-56.
66. (34) Ruf W., Edgington T.S. Structural biology of TF, the initiator of thrombogenesis in vivo. FASEB J 1994;8: 385-90.
67. (35) Hermans P. W., Hibberd M. L., booy R.,et all. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Reserch Group. Lancet 1999; 354:556-60.
68. (36) Dempfle C. E. Coagulopathy of sepsis. Thromb Haemost 2004; 91: 213-24
69. (37) Ratnoff O.D., Nebehay W.G.. Multiple coagulative defects in patiens with the Waterhouse-Friderihsen syndrome. Ann Inter Med 1962; 56: 627-630.
70. (38) Shimamura K., Oka K., Nakazawa M.. Distribution patterns of microthrombi in DIC. Arch Pathol Lab Med 1983; 107:543-7.
71. (39) Levi M., Cate H. Dissiminated intravascular coagulation. NEJM 1999;19:586-592.
72. (40) Iba T., Kidokoro A., Fukunaga M., et all. Association between the severity of sepsis and the changes in hemostatic molecular markers and vascular endothelial damage markers. Shock 2005;1:25-29

73. (41) Dhainaut JF. ISTH score. *Thromb Haemost* 2004;2:1924-33
74. (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.
75. (43) Ely E.W., Laterre P.F., Angus D.C., et al. Drotrecogin alfa (activaed) administration across clinically important subgrups of patients with severe sepsis. *Crit Care med* 2003; 31(1):12-9.
76. (44) Taylor FB. Toward definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86(5):1327-30.
77. (44 a) Regan DH. Defibrination syndrome: changing concepts and recognition of the low grade form. *Am J Med Sci* 1973;266(2):84-91
78. (45) Perera L., Foley C., et all. Modelling zymogen PC. *Biophysical Journal* 2000; 79:2925-2943.
79. (46) Foster D., Yoshitake s.,et all. The nucleotide sequence of gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci. USA*: 82:4673-77.
80. (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.

81. 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.
82. Jane S.M., Hau L., et al. Regulation of APC by factor Xa. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2:723-729.
83. Zolton R.P, Seegers W.H. Autoprotrombina II-A:trombin removal and mechanism of induction fibrinolysis. *Thromb Res* 1973;3:23-33.
84. 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.
85. Oganessian V., Terzyan S., et al. The crystal structure of the EPCR and a bound phospholipid. *J Biological chemistry* 2002; 28: 24851-54..
86. 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
87. (54) Fukudome K , Kurusawa S., et al. The endothelial cell protein c receptor cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996;271:17491-17498
88. (55) Esmon C.T., et al. The protein c pathway : new insights. *Thromb Haemost* 1997; 78:70-74
89. (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.
90. (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
  91. (58) Mammen E. F.. The haematological manifestatios of sepsis. *JAC* 1998;41(suppl) :17-24.
  92. (59) Fourrier F., Chopin C et all. Septic shock, MOF,DIC. Compared patterns of ATIII, PC, and protein S deficiens. *Chest* 1992,101.816/823.
  93. (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.
  94. (61) Fourrier F., Chopin C et all. Septic shock, MOF,DIC. Compared patterns of ATIII, PC, and protein S deficiens. *Chest* 1992,101.816/823.
  95. (62) Dickneite G., Leithauser B. Influence of ATIII on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 1999; 19:1566-1572.
  96. (63) Levi M., de Jongue E., et all. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathway in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 2001; 29:S:90-4.
  97. (64) Opal S.M. Therapeutic rationale for antithrombin in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28S:34-7.
  98. 87
  99. (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.
100. (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
101. (68) Warren BL, et al. High-dose ATIII in severe sepsis a randomized-controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869-78
102. (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.
103. (70) Creasey A. New potential therapeutic modalities: TFPI. *Sepsis* 1999;3:173-82.
104. (71) La Rosa S. P., Opal S.M. Tissue Factor Pathway Inhibitor and Antithrombin Trial results. *Crit Care Clin* 2005;21:433-48.
105. (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.
106. (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
107. (74) Schaeffer P., Mares A.M., et al. Coagulation factor Xa induces endothelium-dependent relaxation in

- rat aorta. *Cir Res* 1997;81:824-8.
108. (75) Creasy A., Chang A.C.K., et al. TFPI reduces mortality from *Escherichia Coli* septic shock. *J Clin Invest* 1993;91:2850-60.
109. (76) La Rosa S. P., Opal S.M. Tissue Factor Pathway Inhibitor and Antithrombin Trial results. *Crit Care Clin* 2005;21:433-48.
110. (77) Creasey A. Reinhart K. TFPI activity in sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29 (suppl):S126-9.
111. (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.
112. (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.
113. (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>nd</sup> annual meeting Infectious Disease Society of America. Boston: 2004. p.76
114. (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.
115. 88
116. (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.

117. (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.
118. (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
119. (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.
120. (86) Chuansumrit A., Tangnararatchakit 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.
121. (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
122. (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
123. (89) Dhainaut JF et al. Soluble thrombomodulin , plasma-derived unactivated protein C and rhAPC. *Crit Care Med* 2002; 30(5 suppl):S318-324
124. (100) de Jonge E, Levi M. Current drugs treatment

strategies for disseminated intravascular coagulation.

Drugs 1998;55:767-777.

125. (101) Hovinga JA K. Adamts13, vWF and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemostasis* 2007
126. (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)
127. (104) Mannucci PM. Changes in health and disease of metallo-protease that cleaves VWF. *Blood* 2001,98:2730-2735
128. (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
129. 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.
130. Nasqvi T.A. et al. Post-operative TTP a review. *Int J clin Pract* 2004; 58: 169-172)
131. Stephan F., Cheffi M.A., Kaplan C.. Autoantibodies against platelet glycoproteins in critically ill patients with thrombocytopenia. *Am J Med* 2000; 108: 554-60
132. Mori M., Kudo H., Yoshitake S transient EDT A-dependent pseudothrombocytopenia in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2000; 26:218-220.

133. 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.
134. 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.
135. Vanderschueren S., De Weerd A..  
Thrombocythopenia and prognosis in intensive care.  
*Critical Care Med* 2000; 28: 1871-1876.
136. Gary T., Kinasewitz M.D., et all. Prognostic value of  
simple envolving DIC score in patiens with severe sepsis.  
*Crit Care Med* 2005; 33:2214-2221.
137. Sjöbring U, Ringdhal U, Ruggeri ZM. Induction of  
platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood*  
2002;100:4470-4477
138. White B., Perry D.. Acquired antithrombin  
deficiency in sepsis. *Br J haematol* 2001, 112: 26-31.
139. Eisele B., Lamy M..Antithrombin III in patiens 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.
140. 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. *Crir Care Med*  
1997;25:1115-24.

141. Wang P., Wood T.J. et al. Inhibition of the biological activity of TNF maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma* 1996; 40: 694-71.
142. Bauer P.R. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 2002; 8:141- 148.
143. Ratnoff O.D., Nebhay W.G.. Multiple coagulative defects in patients with the Waterhouse- Friderihsen syndrome. *Ann Inter Med* 1962; 56: 627-630.
144. Shimamura K., Oka K., Nakazawa M.. Distribution patterns of microthrombi in DIC. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107:543-7.
145. 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
146. Utgaard JO . Rapid secretion of prestored IL8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 1998;188:1751-1756).
147. 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.
148. 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
149. Z.M. Ruggeri. Prospective series: cell adhesion in vascular biology. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 559- 564
150. Ruggeri ZM. Structure and function of VWF.

- Thromb Haemost. 1992;67:594-99
151. Ohomori K. Electron microscopy of human factor VIII/VWglycoprotein : effect of reducing reagents on structure and function . J Cell Biol 1982; 95:632-640.
  152. Counts RB. Disulfide bond and quaternary structure of factor VIII/VWF. J. Clin Invest 1978;62:702-709.
  153. Gralnick HR. effect of multimeric structure of factor VIII/VWF protein on binding to platelets. Blood 1981;58:387-397)
  154. 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
  155. Casonato A et al Reduced VWF survival in type Vicenza von Willebrand disease. Blood 2002; 99:180-184
  156. Furlan . Partial purification and characterization of proteasi from human plasma cleaving VWF to fragment produced by in vivo proteolysis. Blood 1996;87:4223-4234
  157. Tsai HM. A journey from sickle cell anemia to ADAMTS13. J Thromb Haemost 2004;2:1510-1514
  158. 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
  159. Levy. Mutations in a memmber of ADAMTS gene family cause TTP. Nature 2001;413:488-50
  160. Furlan. Deficient activity of VWF-cleaving protease in chronic relapsing TTP. Blood 1997;89:3097-3103



161. Dong J et al. ADAMTS 13 cleaves newly secreted ultralarge vWF multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002;100:4033-4039.
162. 91
163. Andersen. Support of ristocetin-induced platelet aggregation by procoagulant-inactive and plasmin-cleaved form of human Factor VIII/VWF. *Blood* 1980;55:101-108
164. 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)
165. Padilla A. P-selectin anchors newly released ultralarge VWF multimers to the endothelial cell-surface. *Blood* 2004; 103:2150-56.
166. Dong J et al. ADAMTS 13 cleaves newly secreted ultralarge vWF multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002;100:4033-403
167. 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
168. Moake JL  
Thrombotic microangiopathy *NEJM* 2002;347:589-600  
Sadler JE . A new name in thrombosis  
ADAMTS13. *PNAS* 2002;99:11552-11554
169. Dong JF, Moake JL. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge VWF multimers on the endothelial surface under flowing condition. *Blood*

2002;5:1401

170. Savage B, Ruggeri ZM. Cell 1998;94:657-666
171. Matsumoto M. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutation in Japanese patients with Upshaw-Schulman Syndrome. Blood 2004;103:1305-1310
172. Litch C. Two novel . ADAMTS13 gene mutation in TTP/HUS. Kidney Int 2004;66:955-958
173. Kokame K. Mutations and common polymorphism in ADAMTS13 gene responsible for VWF- cleaving protease activity. Proc natl Acad Sci USA. 2002;99:11902-11907
174. Levy. ADAMTS13 turns 3. Blood 2005;106:11-17
175. Banno F. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but alone is not sufficient to causes TTP. Blood 2006; 8:3161-3166
176. Lattuada A. Mild to moderate reduction of vWF cleaving protease (ADAMTS13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. Haematologica 2003;88:1029-34
177. Egerman RS. HELLP syndrome. Clin Obstet Gynecol 1999;42:381-9
178. Mannucci PM VWF cleaving protease (ADAMTS13) in 123 patients with connective tissue disease systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. Haematologica 2003;88:914-918
179. 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

180. 92
181. Gorge JN. Familiar acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood* 2004;103:4195-4197
182. Furlan M. Acquired deficiency of VWF-cleaving protease in a patient with TTP. *Blood* 1998;91:2839-46
183. Colman RW Hemostasis and thrombosis . Fifth edition LWW. Kitchens. Consultative Hemostasis and thrombosis Saunders. Second edition 2007. Sterling T. Bennett. Laboratory Hemostasis. Springer 2007
184. 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.
185. 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.
186. 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.
187. Dhainaut J-F. Re-establishing organ function in severe sepsis: targeting the microcirculation. *Crit Care* 2005, 9(suppl-4):S1-S2.
188. Brown G. Coagulation cascade in sepsis: getting from bench to bedside? *Critical Care* 2003;7:117- 118.
189. Slade E., et al. The surviving sepsis campaign:

raising awareness to reduce mortality. *Critical Care* 2003; 7:1-2.

190. Markou N., Apostolakos H., et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7: R78-R-83.
191. 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.
192. Esmon C. T. : Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32, 5: S219-222.
193. 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.
194. Freeman B.D., Zehnbaauer B. A., Buchman T. G. A meta-analysis of controlled trials of anticoagulant therapies in patients with sepsis. *Shock* 2003 20;5-9.
195. 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.
196. 93
197. O' Brien J. M., Abraham E: Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. *Crit Care Med* 2004; 32, 5: S202-208.
198. Mesters R. M., Mannucci P. M., Coppola et al. Factor VIIa and ATIII activity during severe sepsis and

- septic shock in neutropenic patients. *Blood* 1996;88: 881-886.
199. Seita R., Wolf M., Egbring R., et al. 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.
200. White B., Perry D.. Acquired antithrombin deficiency in sepsis. *Br J haematol* 2001, 112: 26-31.
201. Zeerlerder S., Hack C. E., Wuillemin W. A. Disseminated Intravascular coagulation in sepsis. *Chest* 2005; 24:2864-2875.
202. *Critical Care Clinics* 2005;21:3 GUEST EDITORS
- 203.
- 204.