



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Farmacogenetica e risposta alla
somministrazione di paracetamolo nel
paziente settico febbrile:
Studio prospettico osservazionale**

**Relatore: Chiar.mo
Prof. Abele Donati**

Donati Abele

**Tesi di Laurea di:
Emily Muselmani**

Emily Muselmani

A.A. 2019/2020

INDICE

INTRODUZIONE.....	0
LA SEPSI	2
DEFINIZIONE	2
EPIDEMIOLOGIA	8
PATOGENESI.....	10
ALTERAZIONI MICROCIRCOLATORIE	22
CLINICA	25
L'EMOGLOBINA LIBERA.....	38
LA FEBBRE	39
PARACETAMOLO	41
BACKGROUND.....	48
IL DANNO DA EMOGLOBINA LIBERA	48
IL RUOLO DEL PARACETAMOLO NELLA SEPSI	50
I POLIMORFISMI DEL PARACETAMOLO	51
MATERIALI E METODI.....	53
DISEGNO DI STUDIO	53
DURATA STUDIO.....	53
NUMEROSITÀ CAMPIONE.....	53
CRITERI INCLUSIONE	53
CRITERI DI ESCLUSIONE	53
SETTING	54
ASPETTI ETICI.....	54
CONSENSO INFORMATO	54
RACCOLTA DATI	55
PROCEDURE AI DIVERSI TIMEPOINT	56
GESTIONE DEI CAMPIONI PRELEVATI	57
ESTRAZIONE DNA E POLIMORFISMI.....	57
DOSAGGIO EMOGLOBINA LIBERA PLASMATICA	59
ANALISI STATISTICA	60
RISULTATI.....	61
LIVELLI DI PARACETAMOLO.....	62
POLIMORFISMI GENETICI	64
IMPATTO EMODINAMICO	66
DISCUSSIONE.....	70
CONCLUSIONE.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	78
RINGRAZIAMENTI	88

INTRODUZIONE

La sepsi è una sindrome clinica scatenata da un processo infettivo al quale segue un'alterata risposta infiammatoria dell'organismo.¹ Sappiamo che i microrganismi esprimono una gamma di molecole che sono strutturalmente o metabolicamente in grado di stimolare il sistema immunitario e il rilevamento di questi elementi da parte dell'ospite regola la trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione.² Molti sono i mediatori che vengono liberati e comportano una risposta anomala allo stimolo infettivo favorendo l'insorgenza della sepsi o della più grave condizione di shock settico. In questi pazienti, la temperatura corporea è molto eterogenea nelle sue presentazioni come le rispettive risposte immunitarie.³ Quest'ultime svolgendo un ruolo di protezione nei confronti degli agenti patogeni comportano la produzione di elevate quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS), causando un fenomeno definito "stress ossidativo" che danneggia le cellule dell'ospite sia a livello di membrana, determinandone la perossidazione lipidica dei componenti, che a livello nucleare con danno del DNA.⁴ Anche i globuli rossi in corso di sepsi subiscono questa sorte⁵ e l'emoglobina rilasciata reagisce con l'ossido nitrico prodotto dall'endotelio in risposta al danno.⁶ Ciò si espleta in maniera estremamente rapida ed irreversibile con un trend dose dipendente, suggerendo che l'emoglobina libera abbia un ruolo di scavenger dell'ossido nitrico.^{7,8} Il paracetamolo è indicato per il trattamento della febbre,^{9,10} ma il suo effetto non si compie solo a questo livello. Il paracetamolo, a normali concentrazioni terapeutiche, è un potente inibitore della perossidazione lipidica, suggerendo l'ipotesi che possa avere un ruolo protettivo nel danno da ROS attribuibile all'emoglobina libera.¹¹

Lo studio clinico prospettico osservazionale "Emoglobina libera circolante e microcircolo dopo somministrazione di paracetamolo nel paziente settico febbrile" si colloca all'interno di un Progetto Strategico di Ateneo, che prevede una collaborazione multidisciplinare con la Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica e con l'Unità di Malattie dell'Apparato Respiratorio afferente agli Ospedali Riuniti di Ancona. Con esso, si è voluta indagare il ruolo dell'Emoglobina libera rispetto al danno del microcircolo, meccanismo alla base della disfunzione d'organo sepsi indotta.¹² Vista la presenza di polimorfismi per enzimi coinvolti nel metabolismo del paracetamolo nella popolazione,^{13,14} si è voluto approfondire l'assetto farmacogenetico degli individui reclutati allo scopo di

osservare la variabilità nella risposta alla somministrazione di paracetamolo sia in termini di livelli plasmatici che di impatto emodinamico.

LA SEPSI

La sepsi è una condizione che presenta almeno 11 milioni di morti in tutto il mondo, ogni anno. Colpisce dai 20 ai 30 milioni di pazienti, ed a seconda del paese e del grado di istruzione, risulta conosciuta soltanto in meno del 50% della popolazione.¹⁵ Al fine di sensibilizzare la collettività su questa problematica insidiosa è stata istituita una Giornata Mondiale della Sepsì che si tiene il 13 settembre di ogni anno. La sepsi è una condizione tempo dipendente¹⁶ impostare una corretta e precoce terapia è fondamentale per ridurre la mortalità, di conseguenza la diagnosi tempestiva risulta un punto di cruciale interesse medico.

DEFINIZIONE

La definizione di sepsi ha subito numerose modifiche nel tempo.¹⁷ Prima della fine del 1991, si comprese che fosse associata alla presenza di un'infezione, ma risultava difficile distinguere la diagnosi con condizioni vagamente simili come la batteriemia e la sindrome da risposta infiammatoria sistemica(SIRS).

Il *Primo Consensus* si è svolto nell'agosto nel 1991 con l'obiettivo di concordare una serie di terminologie di utilità clinica.¹⁸ In questo contesto si definì la batteriemia come la presenza di batteri nel sangue, confermato da un criterio di carattere microbiologico documentabile tramite emocolture.¹⁹ Queste possono essere classificate, in base all'eziologia, come unimicrobiche o polimicrobiche, oppure secondo criterio temporale in: transitoria, intermittente, continua o da diretta inoculazione. Ad eccezione di quella transitoria, le altre possono essere frequentemente correlate con l'insorgenza di sepsi.²⁰ Venne distinto dal precedente il concetto di SIRS, ossia una condizione causata da una varietà di gravi insulti, come infezione, pancreatite, ischemia, politrauma, shock emorragico e lesioni d'organo immuno-mediate. Per fare diagnosi di SIRS (Tab.1) era necessaria la presenza di almeno due criteri diagnostici che rappresentavano alterazioni dei parametri vitali tra cui la temperatura, la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria e il numero di leucociti.¹⁸

CRITERI DIAGNOSTICI SIRS	
Temperatura	> 38°C o < 36°C
Frequenza Cardiaca	> 90 battiti/min
Frequenza Respiratoria	> 20 atti/min o PaCO ₂ < 32 mmHg
Leucociti	> 12.000/mm ³ o < 4.000/mm ³ o forme immature di neutrofili > 10% nel sangue

Tab. 1 : Criteri Diagnostici SIRS ; pressione parziale di CO₂ (PaCO₂)

Nella stessa sede, sono state proposte le prime definizioni per Sepsis, sepsi grave e shock settico. Per Sepsis si intendeva una sindrome da risposta infiammatoria

sistemica, ossia una SIRS, dovuta esclusivamente a cause infettive. Invece, il termine di sepsi severa si riferiva ad un quadro di sepsi in presenza di una disfunzione d'organo, con segni di ipoperfusione (acidosi lattica, oliguria, alterazione in acuto dello stato di coscienza) e ad uno stato ipotensivo indotto dalla sepsi (pressione arteriosa sistolica inferiore a 90mmHg o una sua riduzione di almeno 40mmHg rispetto al valore basale). Quando l'ipotensione diveniva refrattaria al riempimento volemico, si parlava di Shock settico.^{18,19} Il primo modello di sepsi propone una condizione incentrata sulla progressione clinica dallo stadio di sepsi a sepsi severa fino allo shock settico. Questa definizione, però non consente una valutazione della gravità della condizione o una indicazione precisa della risposta dell'ospite all'infezione.

C'è stata una volontà da parte degli esperti di modificare queste definizioni in modo da riflettere meglio la fisiopatologia della condizione. In questo scenario si svolge il *Secondo Consensus* nel 2001.²¹ I concetti di sepsi, sepsi severa e shock settico sono stati mantenuti in quanto considerati utili sia ai clinici che ai ricercatori, sebbene i criteri diagnostici per la SIRS sono eccessivamente sensibili e non specifici per la diagnosi di sepsi. Per ovviare il problema è stato proposto un elenco ampliato di segni e sintomi comunemente presenti nei pazienti settici allo scopo di aumentare la specificità diagnostica, in assenza di un gold standard (Fig.1).

INFEZIONE	• Documentata • Sospetta
PARAMETRI GENERALI	• Temperatura (>38°C o <36°C) • Tachicardia(>90 bpm) • Tachipnea(>30 atti/min) • Alterazione stato mentale • Edemi o bilancio dei fluidi positivo(>20 ml/kg/24h) • Iperglicemia(>110 mg/dl o 7,7 mm/l) in assenza di diabete
PARAMETRI INFIAMMATORI	• Leucocitosi(>12,000/μl) leucopenia(<4,000/μl) • Elevazione della Proteina C reattiva • Elevazione della Procalcitonina
PARAMETRI EMODINAMICI	• Pressione sistolica <90 mmhg o Pressione arteriosa media <70 mmHg) • Saturazione venosa centrale >70 % • Indice cardiaco >3,5 l/min
PARAMETRI DI DISFUNZIONE D'ORGANO	• PaO₂/FiO₂ < 300 • Diuresi < 0,5 ml pro kg/h o creatinina > 0,5 mg/dl, in acuto • INR > 1,5 • Piastrine < 100.000/μl • Bilirubinemia > 4 mg/dl
PARAMETRI DI PERFUSIONE DEI TESSUTI	• Lattati > 3 mmol/l • Riempimento capillare ridotto

Fig. 1 : Elenco ampliato di segni e sintomi presenti nei pazienti settici proposto durante il secondo Consensus; pressione parziale di ossigeno (PaO₂), frazione inspirata di ossigeno (FIO₂), international normalized ratio(INR)

Nella stessa sede è stato proposto un sistema di stadiazione clinica, con lo scopo di caratterizzare la sindrome sulla base dei fattori predisponenti, le comorbidità, la natura dell'infezione sottostante, le caratteristiche della risposta dell'ospite, e la disfunzione d'organo risultante. Il sistema PIRO(Tab.2), *Predisposing conditions, nature and extend of the Insult-Infections, nature and magnitude of host Response and the degree of concomitant Organ dysfunction* ha lo scopo di stimare l'entità della risposta infiammatoria dell'ospite allo stimolo e di conseguenza stratificare il rischio basale di sviluppare un esito sfavorevole, in modo da predire la risposta del singolo paziente alla terapia.²¹

DOMINIO	CARATTERISTICHE		RAZIONALE
PREDISPOSIZIONE	Presenza di comorbidità, età e genere	Polimorfismi genetici	Criticità dovute al paziente
INSULTO DI ORIGINE INFETTIVA	Agenti infettivi sensibili alla terapia e virulenza,	Sito d'infezione, dosaggio di prodotti microbici	Complessità di gestione dovuta al microrganismo o al sito d'infezione
RISPOSTA	SIRS, Sepsì, shock.	Stato infiammatorio attivo o risposta alterata dell'ospite	Criticità dovuta alla risposta immunologica alterata
DISFUNZIONE D'ORGANO	Precocità del danno e valutazione con score compositi.	Misure dinamiche di risposta cellulare all'insulto	

Tab. 2 : Sistema PIRO

Visti i notevoli progressi compiuti nella comprensione sia della patogenesi, che nella gestione ed epidemiologia della sepsi, una revisione dei termini si è ritenuta necessaria. Si svolse così un *Terzo Consensus* nel 2016 dove la sepsi ottenne la definizione (Sepsis-3) che la caratterizza fino ad oggi: una sindrome clinica con disfunzione d'organo dovuto ad una risposta inadeguata dell'ospite all'infezione.¹ Una criticità delle definizioni precedenti era dovuta al fatto che si focalizzassero su di un modello fuorviante secondo cui la sepsi segue un continuum da una condizione di sepsi grave allo shock. In più, come osservato anche nel Secondo Consensus, i criteri della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) diventavano sempre più obsoleti di fronte alle evidenze patogenetiche. In Sepsis-3, lo shock settico viene definito un sottoinsieme della sepsi in cui si presentano anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche associate con un rischio di mortalità maggiore rispetto alla sola sepsi. I pazienti con shock settico possono essere identificati clinicamente per via della necessità di somministrazione di un vasopressore per mantenere una pressione arteriosa media (PAM) di 65 mmHg o maggiore e livelli di lattato sierico superiori a 2 mmol / L in assenza di ipovolemia. Questa combinazione è associata a tassi di mortalità ospedaliera superiori al 40%¹. Dopo il *Terzo Consensus*, il termine di sepsi grave è stato abbandonato in quanto considerato un concetto ridondante¹.

Nel 2017 Gül e colleghi(Fig.2), rianalizzando i cambiamenti della definizione di sepsi, hanno segnalato che nonostante molte delle criticità iniziali sono state risolte in realtà alcune, molto insidiose, permangono e sono da tenere in considerazione nella pratica clinica. Tra queste ritroviamo che:

- In presenza di esami colturali negativi la presenza di infezione deve essere necessariamente sospetta o pregressa in quanto da definizione l'infezione rappresenta un prerequisito della sepsi;
- È necessario approfondire i meccanismi molecolari ed immunologici per ricercare biomarker cellulari;
- Nei pazienti con infezione sospetta ed insufficienza d'organo accertata rimane difficile escludere la sepsi;
- la disfunzione d'organo può presentarsi indipendentemente dallo stato di sepsi, nel paziente settico.²²

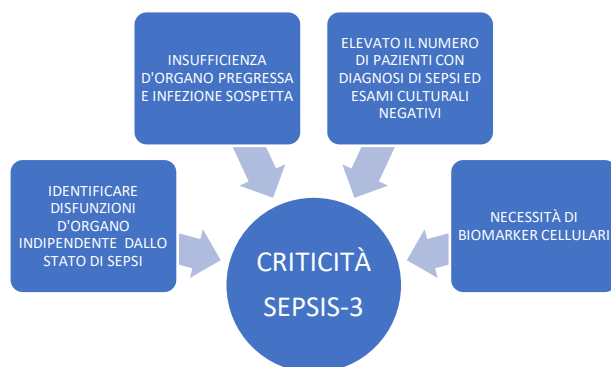


Fig. 2: Criticità che permangono nonostante la definizione Sepsis-3

Secondo una recente revisione di Braun e colleghi, nella pratica quotidiana, i medici continuano a utilizzare il termine SIRS da causa infettiva per definire la sepsi. Inoltre, molte delle valutazioni richieste non vengono misurate o vengono eseguite in ritardo rispetto alle manifestazioni cliniche comportando il calcolo di un punteggio SOFA non veritiero, riducendo l'affidabilità dello score. Sono state documentate anche ampie variazioni interindividuali nella classificazione dello stesso paziente con una disfunzione cronica d'organo.²³

VALUTAZIONE DEL DANNO D'ORGANO

La Sindrome da disfunzione multiorgano (MODS) proposta nel *Primo Consensus* viene identificata come una condizione caratterizzata dalla presenza di un'alterata funzionalità di più organi in un paziente gravemente malato, ad un livello tale per cui l'omeostasi non può essere mantenuta senza intervento medico. Questo concetto era stato proposto in sostituzione al termine "organ failure" per evidenziarne le molteplici sfumature nella manifestazione clinica. La MODS veniva distinta in primaria dove la disfunzione d'organo si verifica precocemente e può essere direttamente attribuibile all'azione di un insulto diretto, o secondaria quando si associava al contesto della SIRS.¹⁹ L'insufficienza d'organo(MOF), intesa come progressiva perdita funzionale di due o più apparati, rappresentava la principale causa di morte dei pazienti adulti ricoverati in terapia intensiva.¹⁹

Successivamente, nel 1994, la Società Europea di Terapia Intensiva ha organizzato un Consensus a Parigi istituendo un punteggio denominato SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment Score), per descrivere in modo quantitativo il grado di insufficienza d'organo nei pazienti.²⁴ Esistono due importanti applicazioni del punteggio SOFA (Tab.3):

1. Caratterizzare i pazienti all'ingresso, monitorare la progressione della disfunzione degli organi singoli e di correlarli al danno sequenziale dei vari organi;
2. Valutare gli effetti del trattamento sul decorso dell'insufficienza d'organo.

Il tasso di mortalità è direttamente correlato al grado di disfunzione d'organo, e di conseguenza anche con il punteggio SOFA di ciascun organo.^{1,24} Clinicamente, la disfunzione d'organo viene rappresentata da un aumento del punteggio SOFA di 2 punti o più, e questo comporta un rischio di mortalità intraospedaliera aumentato del 10%. Il punteggio di base SOFA viene considerato pari a zero nei pazienti che non hanno disfunzione d'organo preesistente, mentre se presentano modeste disfunzioni, possono peggiorare ulteriormente¹. Attualmente, per disfunzione d'organo in corso di sepsi si intende, un cambiamento acuto nel punteggio totale SOFA di 2 punti conseguente all'infezione. Il vantaggio del SOFA score, nei pazienti settici, è quello di permettere il monitoraggio sia del danno d'organo di nuova insorgenza che di quello cronico.

SOFA Score		PUNTEGGIO				
		0	1	2	3	4
Sistema Respiratorio	PaO ₂ /FIO ₂ , mmHg	≥400	<400	<300	<200 Con supporto ventilatorio	<100 Con supporto ventilatorio
Sistema della Coagulativo	Piastrine, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Funzionalità Epatica	Bilirubina, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Sistema Cardiovascolare	Vasopressori, μg/kg/min	PAM ≥70 mmHg	PAM <70 mmHg	Dopamina <5 or dobutamina (qualsiasi dose)	Dopamina 5.1-15 o Adrenalina ≤0.1 or Noradrenalina ≤0.1	Dopamina >15 o Adrenalina >0.1 or Noradrenalina >0.1
Sistema nervoso centrale	Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	<6
Funzionalità Renale	Creatinina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
	Output urinario, mL/d				<500	<200

Tab. 3 : Sequential Organ Failure Assessment Score(SOFA), Pressione arteriosa media(PAM), pressione parziale di ossigeno (PaO₂), frazione inspirata di ossigeno (FIO₂); dosaggio catecolamine in μg/kg/min mantenute per minimo un'ora

In ambienti extraospedalieri o nei reparti non intensivi ospedalieri, pazienti adulti con sospetta infezione e più probabilità di andare incontro a un peggioramento clinico, possono essere identificati rapidamente e con semplicità, grazie ad un punteggio clinico chiamato quickSOFA (qSOFA) (Tab.4). La presenza di almeno 2 criteri clinici suggestivi, come una frequenza respiratoria uguale o superiore a 22 atti/min, l'alterazione del comportamento o una pressione arteriosa sistolica uguale o inferiore a 100 mmHg, presentano una buona capacità predittiva di peggioramento clinico in setting al di fuori della terapia intensiva.^{1,25}

Criteri qSOFA		Punteggio
Frequenza respiratoria	>22/min	1
Alterazione mentale (GCS)	<13	1
Pressione arteriosa sistolica	<100 mmHg	1

Tab. 4 : QuickSOFA (qSOFA): Glasgow Coma Scale (GCS)

EPIDEMIOLOGIA

Inizialmente i tassi di mortalità della sepsi raggiungevano il 49,7%²⁶ e questo fu uno stimolo per la ricerca di un trattamento in grado di ridurre la mortalità. River e colleghi hanno proposto una Early goal therapy che ha permesso una riduzione del tasso di mortalità al 30%.²⁷ L'efficacia del trattamento precoce ha portato alla redazione delle prime linee guida internazionali per la gestione della sepsi grave, pubblicate nel 2004.²⁸ Nel 2010 la Campagna stessa ha pubblicato i risultati del programma dimostrando che, sebbene la riduzione assoluta della mortalità fosse minima (5,4%), la compliance aveva raggiunto solo il 31%.²⁹ Questa campagna alla fine ha portato all'adozione di Early Management Bundle for Severe Sepsis/Septic Shock (SEP-1) nell'ottobre 2015. Una meta-analisi del periodo confermava il calo della mortalità annuo nei pazienti settici attorno al 4,5% all'anno.³⁰ L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito la sepsi come una priorità sanitaria globale nel 2017.

L'incidenza globale di sepsi è scesa del 37% dal 1990-2017. Sempre nel 2017, si stima un'incidenza di 48 milioni di casi di sepsi in tutto il mondo e 11 milioni di morti per sepsi.³¹ Il calo è stato osservato in quasi tutte le località del mondo. L'incidenza globale di sepsi stratificata per l'età nel 2017 è stata più elevata nel sesso femminile rispetto alla controparte maschile. Questo non avviene nei paesi

occidentali dove invece si segnala un'incidenza più elevata nel genere maschile rispetto a quello femminile.³¹ Il rischio di sepsi ha una distribuzione dell'età bimodale: con un aumento dell'incidenza per età nei neonati che tende a diminuire durante l'infanzia, per aumentare di nuovo in età adulta con un picco intorno ai 50-60 anni.³² Sembra esserci una correlazione tra genere ed età nell'incidenza di una manifestazione più grave, tale per cui gli uomini presentano un'incidenza simile a quella delle donne aggiustata per l'età di 5 anni.³² Le comorbidità croniche associate alla sepsi comprendono: diabete mellito, insufficienza cardiaca congestizia, malattia polmonare cronica, immunosoppressione, malattie del fegato, cancro, insufficienza renale cronica.³²⁻³⁴

Oltre alle caratteristiche dell'individuo un ruolo cruciale è svolto dai microrganismi nella patogenesi della sepsi. Le infezioni del tratto genito-urinario (36,7%), l'infezione del tratto respiratorio inferiore (36,6%) e l'infezione fungina sistemica (9,2%) sono le tre principali sedi di infezione nei pazienti con sepsi. Infezione intra-addominale (30,7%), infezione del tratto respiratorio inferiore (27,7%) e quelle del tratto biliare (25,5%) sono state associate ad un più alto tasso di mortalità.³² Anche l'eziologia della sepsi ha subito rilevanti modifiche nel tempo. Attualmente si sospetta che molti dei casi di sepsi a livello mondiale siano dovuti a infezioni nosocomiali, sebbene dati affidabili a riguardo restano scarsi.³¹ La mortalità in terapia intensiva era più alta per la sepsi addominale (29%) e i fattori predittivi di mortalità indipendenti includevano le malattie linfoproliferative, la cirrosi, la ventilazione meccanica e la terapia renale sostitutiva. Nel 15% dei casi l'eziologia è polimicrobica con sepsi miste che includono microrganismi Gram negativi, positivi e talora anche batteri anaerobi. L'incidenza delle sepsi da anaerobi attualmente oscilla tra il 5% e il 15%.^{35,36} Ai fini della terapia è importante tenere in considerazione che nella maggior parte dei casi le infezioni da anaerobi sono infezioni miste, associate a Gram negativi.

La malnutrizione e la scarsa igiene potrebbero contribuire ad alti tassi di infezione. D'altra parte, l'obesità è diventata una problematica rilevante per la salute nei paesi occidentali. Oltre all'aumento del rischio cardiovascolare e ai più alti tassi di comorbidità, l'obesità è anche associata a risposte immunitarie compromesse, evidenziando la stretta interazione tra controllo metabolico e tolleranza immunitaria.³⁷ L'obesità come fattore di rischio rimane una questione aperta.³⁸⁻⁴⁰

Nello studio di Pepper e colleghi, la riduzione della mortalità per sepsi a breve termine sembrava correlare con un BMI più elevato.^{39,41}

PATOGENESI

La sepsi è una condizione complessa che consta di alterazioni fisiopatologiche causate dalla perdita dell'omeostasi nella risposta immunitaria all'infezione. Questa anomalia è riconducibile a tre principali fattori:

1. La virulenza del microrganismo,
2. La risposta immunitaria disregolata dell'ospite,
3. La disfunzione del microcircolo.

L'INFEZIONE E RISPOSTA DELL'OSPITE

Le manifestazioni cliniche della sepsi possono considerarsi il risultato dell'interazione tra i componenti microbici e i mediatori dell'ospite. I microrganismi esprimono una gamma di molecole che sono in grado di indurre una risposta immunitaria da parte dell'ospite² tramite:

- Il lipopolisaccaride(LPS), in particolare la componente lipidica A, nei gram negativi;
- Il peptidoglicano nei gram positivi;
- La flagellina;
- La tossina che induce la sindrome dello shock tossico (TSST-1) dello Stafilococco;
- RNA a doppio filamento.

Il primo passo nella patogenesi della sepsi è il rilevamento della presenza di agenti patogeni all'interno dell'organismo. L'individuazione di schemi molecolari associati ai patogeni (PAMP) è permessa grazie a recettori cellulari che, se attivati, sono in grado di indurre una risposta del sistema immunitario innato.⁴² Tuttavia, anche il danno tissutale che si verifica a seguito di un'infezione genera dei segnali di pericolo. Questi vengono riconosciuti da una serie di molecole (o frammenti di molecole) endogene in grado di determinare una risposta immunitaria che vengono definiti damage or danger associated molecular patterns (DAMP).⁴² Questi segnali di pericolo (DAMP e PAMP) presentano sequenze comuni che possono essere

facilmente rilevati dai recettori di riconoscimento dei pattern (PRR) presenti sui leucociti.

Il rilevamento di PAMP o DAMP da parte dei PRR regola la trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione. Questi PRR sono recettori con codifica germinale presenti sia sulla porzione esterna della membrana cellulare che a livello intracellulare. Sono state descritte cinque sottoclassi di PRR finora:

- recettori Toll-like (TLR)
- recettori con domini di oligomerizzazione nucleotidica (NOD o NLR),
- recettori con geni inducibili dell'acido retinoico (RIG-1),
- recettori della lectina di tipo C
- recettori endocitoplasmatici in grado di riconoscere pattern molecolari entrati all'interno del citosol, come NOD e RIG. Questi riconoscono porzioni di peptidoglicano.

L'attivazione dei PRR, porta attraverso diverse vie, all'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B e di AP-1, per la produzione di citochine, chemochine, molecole di adesione endoteliale e ossido nitrico. Il loro ruolo risulta essere centrale in quanto favoriscono l'amplificazione della risposta e la chemiotassi delle cellule dell'immunità innata. Attraverso i recettori NLR viene attivato l'inflammosoma che taglia la pro-interleuchina-1 β , formando l'interleuchina-1 β inducendone produzione amplificata in risposta ad uno stato infiammatorio. L'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B costituisce il punto di arrivo anche dei PRR citosolici e dei DAMPs. Tra i DAMPs ricordiamo le Heat shock proteins (HSP), le catelicidine, l'acido urico, fibrinogeno, DNA mitocondriale e High mobility group box 1 (HMGB-1). Le proteine S100 sono secrete da cellule fagocitarie e inducono la risposta infiammatoria nelle cellule endoteliali, determinando un incremento della permeabilità vascolare e un effetto protrombotico. HMGB1 invece, è una proteina nucleare coinvolta nella formazione dei nucleosomi. Generalmente, viene liberata solo in corso di morte cellulare non apoptotica, poichè in corso di apoptosi si lega in maniera irreversibile alla cromatina. Questa proteina ha un'importante funzione proinfiammatoria indiretta, favorendo la chemiotassi di macrofagi, monociti, neutrofili e cellule dendritiche. I DAMP attivano una varietà di recettori tra cui i *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), recettori Toll-like (TLR) e recettori più specifici come IL (interleuchina) -1R. I DAMP correlano con la gravità della malattia, suggerendo un loro ruolo nella risposta disregolata dell'ospite in corso di sepsi.

L'attivazione del TLR3, nello specifico, segue una pathway differente che attraverso TRIF, porta all'attivazione dell'IRF, e alla produzione di interferone.⁴²

TEMPESTA CITOCINICA

La tempesta di citochine indotta dall'infezione è il risultato di un fenomeno autoamplificante disregolato volto a eliminare l'agente infettivo. Diversi mediatori sono prodotti in risposta allo stimolo infettivo dall'ospite tra cui le interleuchine che svolgono un ruolo cruciale nella sepsi. Quelle che hanno dimostrato rilevanza maggiore nella sua patogenesi sono IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α .⁴³ L'IL-1 Aumenta la sensibilità cellulare al TNF- α e Induce l'espressione di molecole di adesione e promuove l'attivazione e la chemiotassi dei polimorfonucleati. Essa promuove il rilascio di TNF- α e di INF gamma, ma ha anche effetti sull'output cardiaco aumentandolo, mentre riduce la frazione di eiezione come la pressione arteriosa e le resistenze vascolari periferiche. L'IL-4 agisce sinergicamente con il TNF- α e l'IL-1, promuovendo l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali. É noto che elevati livelli di IL-6 sono predittivi di morte in corso di sepsi. Questa interleuchina interagisce sinergicamente con IL-1 e TNF- α e promuovendo l'attivazione e la chemiotassi dei polimorfonucleati. IL-8 è un fattore chemiotattico per neutrofili e linfociti e induce la diapedesi di entrambi. Il TNF- α è la citochina a più potente azione pro-infiammatoria e agisce in innumerevoli distretti. Induce la tachicardia, ipotensione, depressione miocardica, aumentata permeabilità capillare, ed a livello metabolico comporta acidosi, aumentato catabolismo fino alla cachessia. Febbre e mobilitazione dei leucociti, ma anche soppressione dell'eritropoiesi e della mielopoiesi, leucopenia, CID sono associate a alti livelli di TNF- α .⁴³

Mediatori di competenza endoteliale sono invece il fattore attivante le piastrine (PAF) e l'ossido nitrico (NO). Il PAF é un mediatore endoteliale che contribuisce al danno d'organo in modo rilevante causando vasodilatazione, aumento della permeabilità vasale, l'aggregazione piastrinica con un'azione cento volte più potente dell'istamina. Esso è responsabile anche dell'amplificazione catalitica del rilascio delle citochine.⁴⁴ Un ruolo peculiare e subdolo è quello svolto dall'ossido nitrico. Esso è una molecola a basso peso molecolare, con emivita molto breve (6 sec.) che nelle fasi iniziali mantiene il flusso di sangue ai visceri e nel microcircolo, contrastando l'effetto vasocostrittore di trombossani e di endotelina 1,

bloccando l'aggregazione piastrinica e l'adesione dei leucociti, prevenendo la stasi e la trombosi microvascolare. In sintesi, nella prima fase l'ossido nitrico funge da controregolatore. Nelle fasi più avanzate dello shock, a seguito della continua stimolazione dell'endotelio da parte dei vari mediatori, si ha un'aumentata ed eccessiva produzione di NO che svolge un ruolo dannoso contribuendo all'insorgenza di ipotensione refrattaria e vasoplegia. Recenti studi in vitro hanno dimostrato il suo effetto proinfiammatorio in seguito al rilascio di citochine dai fagociti, inducendo effetti citotossici responsabili del danno tissutale e d'organo. Inoltre in vitro è stata dimostrata una sua azione depressiva sul miocardio, ma rimane incerto il reale ruolo di esso in vivo. L'NO potenzia l'azione della prostaciclina, altro controregolatore prodotto dalle cellule endoteliali, che è un potente vasodilatatore, ma labile inibitore dell'attivazione piastrinica.⁶

Mentre la comprensione della predisposizione della risposta immunitaria cellulare indotta dalle citochine durante la sepsi è in costante progresso, manca ancora una visione complessiva, di ciò che succede a livello cellulare. La gestione della risposta dell'ospite all'infezione non è ancora completamente chiara.

ALTERAZIONE EMOSTASI

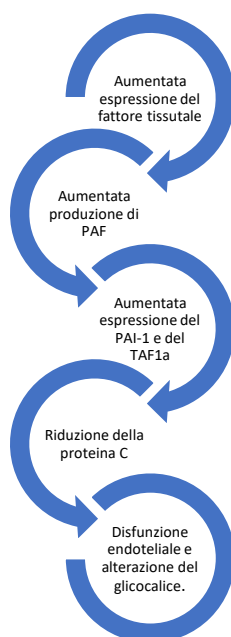


Fig. 3 Alterazioni dell'emostasi in corso di sepsi; fattore attivante le piastrine (PAF); inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI); inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina(TAF)

Come abbiamo visto diversi sono i mediatori dell'ospite liberati in risposta allo stimolo infettivo e implicati nella patogenesi della sepsi e dello shock settico. Tra questi metaboliti attivi vi sono anche frazioni del complemento, le chinine, i fattori del sistema della coagulazione, enzimi e sostanze ossidanti prodotte dai polimorfonucleati, peptidi vasoattivi e prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico.

Il LPS, dal canto suo, comporta l'attivazione del complemento e di conseguenza la liberazione di frammenti vasoattivi come il C5a, istamina e bradichinina. Anche un'aumentata espressione del fattore tissutale (TF) da parte dei monociti viene innescata dal

rilascio di citochine proinfiammatorie. L'attivazione diretta del fattore XII di Hageman, invece porta all'attivazione del sistema bradichinina-callicreina e comporta una vasodilatazione importante associata all'aumento della permeabilità capillare e l'attivazione del sistema intrinseco della coagulazione.

I macrofagi attivati rilasciano $\text{TNF-}\alpha$ favorendo l'attivazione, aggregazione e adesione dei leucociti all'endotelio. Questo mediatore aumentata anche espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali favorendo il reclutamento e l'aumento della permeabilità vasale. A questo punto viene ad instaurarsi uno stato infiammatorio generalizzato che, oltre che aumentare il catabolismo proteico, induce il picco piretico. Oltre ai suddetti anche le fosfolipasi di membrana vengono attivate e comportano la produzione dei metaboliti dell'acido arachidonico. Tra questi il trombossano A e leucotrieni, che aumentano la permeabilità vasale, e le prostaglandine, con azione pro-infiammatoria. Vengono attivati anche in questo modo i polimorfonucleati che degranulano e liberano specie reattive dell'ossigeno(ROS) e proteasi.

Le Cellule endoteliali subiscono nuovamente modificazioni anatomo-funzionali con rilascio di mediatori controregolatori e mediatori che amplificano il danno causando disfunzione endoteliale e alterazione del glicocalice. Quest'ultimo fisiologicamente oltre a regolare la permeabilità vascolare, è un sito di legame per molecole anticoagulanti come ATIII. L' aumentata produzione del fattore attivante le piastrine (PAF) a seguito del rilascio di citochine proinfiammatorie, in particolare $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 insieme ad un'aumentata espressione del PAI-1 (inibitore di tipo 1 dell'attivatore del plasminogeno), del TAF1a (inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina) e la riduzione della proteina C promuovono uno stato protrombotico, che porta a una trombosi microvascolare e contribuisce alla disfunzione d'organo. Clinicamente tale aspetto della sepsi si manifesta come una coagulazione intravascolare disseminata (CID).

DANNO OSSIDATIVO

La generazione di ROS da parte dei neutrofili e monociti nei pazienti settici è aumentata ed è modulata diversamente a seconda della severità della condizione e dei fattori che l'hanno innescata,⁴⁵ e la loro persistenza assieme al NO è associata a scarsa prognosi.⁴⁶ Nel 2006, Brunialti e colleghi hanno dimostrato un'aumentata produzione di citochine nelle fasi precoci della sepsi, correlabile con il riconoscimento del patogeno.⁴⁷ Santos e colleghi hanno dimostrato che i monociti, provenienti da pazienti settici con produzione di citochine compromessa, hanno comunque una potente attività fagocitaria e una ancora maggiore capacità di generare ROS e NO. Questa modulazione rappresenta lo stato in cui l'ospite tenta di controllare la risposta infiammatoria sistemica iniziale mantenendo il controllo sull'infezione.⁴⁸ La riduzione della regolazione delle citochine infiammatorie osservata in pazienti con sepsi grave e shock settico, al contrario, sembra essere correlata alle vie intracellulari comuni a LPS, IL-1 β , e TNF- α ,⁴⁷ suggerendo una maggiore produzione di ROS e NO in risposta a LPS e batteri gram negativi o gram positivi. Santos e colleghi hanno dimostrato che alcuni monociti con produzione di citochine compromessa provenienti da pazienti settici, hanno comunque una potente attività fagocitaria e una ancora maggiore capacità di generare ROS e NO. Questa modulazione rappresenta lo stato in cui l'ospite tenta di controllare la risposta infiammatoria sistemica iniziale mantenendo il controllo sull' infezione.⁴⁸

Un eccesso di ROS attacca le membrane cellulari, causando reazioni a catena di perossidazione lipidica che inducono diversi tipi di morte cellulare. I ROS sono molecole contenenti ossigeno parzialmente ridotte, ossia radicali liberi e/o derivati dell'ossigeno e tra questi ritroviamo l'anione superossido, il perossido di idrogeno, il radicale idrossile, gli idroperossidi lipidici e i radicali perossilici. La maggior parte dei ROS intracellulari sono derivati dal radicale superossido, la cui formazione avviene principalmente attraverso ossidasi NADPH, xantina ossidasi, e la catena di trasporto degli elettroni mitocondriali da sistemi biologici endogeni.

Recentemente una nuova forma di morte cellulare programmata, la ferroptosi, si ipotizza essere causata da perossidazione lipidica(Fig.4).⁴⁹ In particolare, sembrerebbe che i ROS convertiti in perossido di idrogeno dalla superossido dismutasi, danno origine al radicale idrossile altamente tossico in presenza di ferro ridotto (Fe^{2+}) attraverso la reazione di Fenton. Lo ione ferrico (Fe^{3+}) può essere

riciclato in Fe^{2+} attraverso la reazione di Haber-Weiss mediante ossidazione con un radicale perossile e ossigeno. Lo squilibrio nel tasso di generazione di ROS porta a stress ossidativo e conseguente produzione di radicali liberi che possono danneggiare DNA, proteine e lipidi.⁵⁰

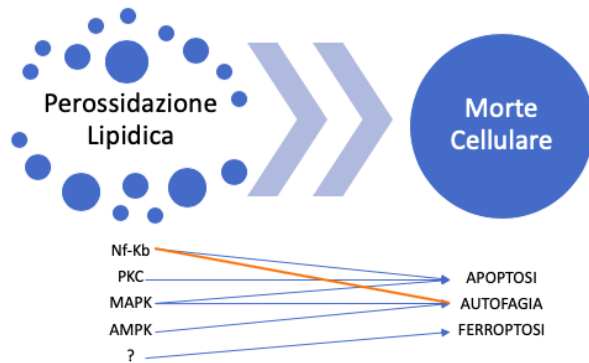


Fig. 4 : La perossidazione lipidica induce diversi tipi di morte cellulare: l'apoptosi è indotta da mediatori a cascata *Nf-Kb*, *PKC* e *MAPK*; l'autofagia è processo bloccato dall'*Nf-Kb*, ma favorito da *MAPK* e *AMPK*; la ferroptosi è un processo che si sta ancora indagando.

Gli antiossidanti possono contrastare i radicali liberi e neutralizzare gli ossidanti. Il sistema antiossidante endogeno generale è costituito da :

- antiossidanti enzimatici
 - superossido dismutasi,
 - catalasi,
 - glutazione perossidasi,
 - tioredoxina
- antiossidanti non enzimatici
 - vitamine o suoi analoghi (vitamine A, C ed E; coenzima Q10; e flavonoidi),
 - minerali (selenio e zinco)
 - metaboliti (bilirubina e melatonina)

I radicali liberi (soprattutto dell'ossigeno e dell'ossido nitrico) generati dai diversi pattern proinfiammatori durante la sepsi, hanno un importante ruolo nel danno diretto al DNA. Dopo il danno da ROS si attiva la poli-ADP-ribosio-polimerasi (PARP), enzima deputato alla riparazione e alla replicazione del DNA nella trascrizione genica.⁵¹ Se il danno al DNA è moderato, può essere riparato con l'attivazione della PARP, altrimenti l'eccessiva attivazione di tale enzima, comporta un consumo di NAD^+ , che induce un rallentamento della glicolisi e del ciclo di Krebs con alterazione della funzione mitocondriale e riduzione dei livelli di ATP. L'esito è rappresentato

dalla morte cellulare attraverso la pathway necrotica, con promozione dell'infiammazione da parte della stessa PARP a seguito dell'attivazione di NF- κ B.⁵²

Tornando all'ossido nitrico, in una condizione di sepsi ha importanti effetti sia nella disfunzione mitocondriale che livello microcircolatorio ed è prodotto dall'ossido nitrico sintetasi. Questo enzima è presente in diverse isoforme, ma quella inducibile è quella coinvolta nella sepsi, essendo la sua trascrizione indotta dall'NF- κ B e quindi da uno stato infiammatorio. Una volta prodotto l'NO entra nelle cellule e aumenta la produzione di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP), attivando la Protein-chinasi-cGMP-dipendente (PKG) che induce una riduzione del calcio citosolico e della sensibilità alla stimolazione catecolaminergica, portando sia alla vasodilatazione tipica dello shock settico che alla riduzione dell'attività cardiaca.⁵³

DISFUNZIONE MITOCONDRIALE

Vari studi preclinici e clinici hanno dimostrato un'associazione tra il grado di compromissione mitocondriale, il danno tissutale e la gravità clinica con insorgenza della disfunzione d'organo e scarsa prognosi.

I mitocondri possono essere colpiti in vari modi in uno stato infiammatorio sistemico:

- 1) Livelli estremamente bassi possono compromettere la generazione di ATP e innescare i percorsi di morte cellulare;
- 2) Generazione di quantità in eccesso di NO e altri ROS inibiscono direttamente la respirazione mitocondriale, danneggiano direttamente le proteine mitocondriali e altre strutture come la membrana lipidica;
- 3) Le alterazioni ormonali in corso di sepsi influenzano la funzione e l'efficienza mitocondriale;
- 4) I geni che trascrivono le proteine mitocondriali sono down regolati all'inizio della risposta infiammatoria.⁵⁴

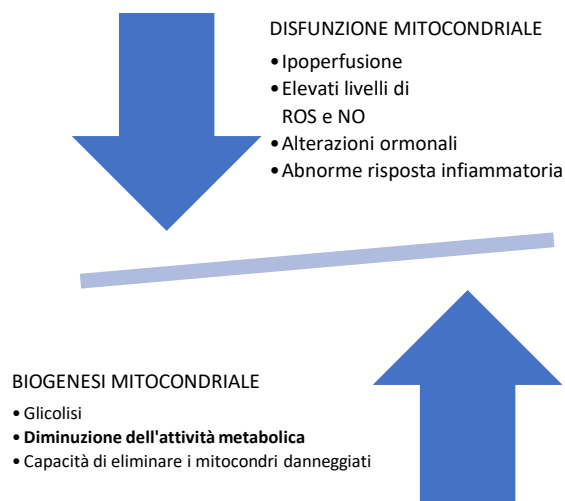


Fig. 5 : I mitocondri possono essere colpiti in vari modi durante un processo infiammatorio sistemico e la biogenesi mitocondriale sembra quindi fondamentale per il recupero funzionale.

L'ipossia tissutale porterà allo shunt del piruvato che accumulandosi verrà convertito in lattato nei pazienti critici. Le Condizioni che sono note per favorire la produzione di lattato includono ipoperfusione sistemica, che favorisce un metabolismo anaerobico, ipoperfusione regionale e disfunzione microcircolatoria. Nella sepsi, l'iperlattatemia è il risultato di molteplici aggiustamenti metabolici, non semplicemente dell'ipoperfusione tissutale, ma rappresenta l'insieme di un aumento della produzione e una riduzione della clearance. L'aumento della glicolisi aerobica può produrre un eccesso di piruvato che travolge la piruvato deidrogenasi utilizzata per portare il piruvato nel ciclo di Krebs per il metabolismo aerobico. Con l'eccesso di piruvato presente, una porzione verrà deviata per la conversione del lattato e si accumulerà nel citoplasma prima di essere dispersa nel flusso sanguigno. L'aumento di lattato si verifica anche nei globuli bianchi, che, specialmente quando attivati, ricavano energia dal metabolismo anaerobico, e hanno dimostrato di contribuire all'aumento dei livelli ematici di acido lattico. ^{55,56}

Tornando al mitocondrio, il recupero della sua funzione è preceduto da una sovraregolazione di marcatori di biogenesi mitocondriale ed è accompagnata da un miglioramento clinico. I tempi necessari possono variare ed è probabile che siano dipendenti dall'età, dal tipo di insulto, e possono essere favoriti o rallentati da interventi terapeutici (antibiotici batteriostatici, catecolamine e sedativi).

Nella sepsi si osserva una disfunzione d'organo a livello clinico e biochimico in assenza però di un importante danno istologico, fenomeno conosciuto come il "Paradosso della sepsi". Una possibilità suggerita da Singer e colleghi è una

diminuzione dell'attività metabolica, che si tradurrà in una riduzione del fabbisogno energetico e presupporrebbe l'istituzione di un nuovo steady-state cellulare. A sostegno, uno studio sui ratti con polmonite da pneumococco ha dimostrato che l'ipotermia era associata ad un aumento della disponibilità dell'adenosina e turnover del trifosfato. Interessanti sono i benefici osservati a seguito dell'induzione dell'ipotermia terapeutica dopo un evento ischemico cardiaco. Durante la biogenesi mitocondriale il monossido di carbonio endogeno viene rilasciato dopo l'attivazione di emeossigenasi (HO) -1. Nei modelli di sepsi, l'induzione di HO-1 è stata ricollegata alla biogenesi mitocondriale e ad un miglioramento della sopravvivenza. Mentre livelli elevati di monossido di carbonio risultano essere tossici per i mitocondri, a concentrazioni più basse potrebbe essere protettivo per i tessuti in quanto è in grado di indurre uno "stato di letargo", inteso come rallentamento delle necessità metaboliche cellulari.⁵⁴

IMMUNITÀ INNATA E ADATTATIVA

Il ruolo centrale della risposta infiammatoria è svolto dai monociti e si basa sul riconoscimento e l'eliminazione degli agenti infettivi. Essi sono in grado di presentare gli antigeni alle cellule dell'immunità adattativa, grazie all'espressione di *Human leukocyte antigen* (HLA, complesso maggiore di istocompatibilità) e secernono citochine proinfiammatorie per favorire l'amplificazione della risposta immunitaria. A sostegno dell'importanza dei monociti, alcuni studi hanno osservato in corso di sepsi, una riduzione della secrezione di citochine e l'espressione dei recettori HLA,^{57,58} aumentando la suscettibilità alle infezioni secondarie e una peggiore prognosi.^{57,59,60} Tra le cellule dell'immunità innata, anche quelle dendritiche hanno dimostrato una posizione di rilievo. Infatti secondo Guisset e colleghi i pazienti settici che sopravvivevano mostravano un numero di cellule dendritiche circolanti più alto rispetto ai pazienti che avevano esito infausto.⁶¹

I linfociti svolgono un ruolo centrale nella modulazione della risposta in corso di sepsi. La loro importanza è dovuta non solo all'interazione con le risposte immunitarie innate, ma anche alla loro capacità di coordinare, amplificare e attenuare la risposta infiammatoria. Di rilievo sono le cellule T CD4, che in base al tipo di stimolo che ricevono, vengono attivate e acquisiranno caratteristiche funzionali distinte. Questi linfociti possono essere suddivisi prevalentemente in due

sottogruppi a seconda del loro modello di secrezione di linfocine: le cellule T helper di tipo 1 (Th1) e le cellule T helper di tipo 2 (Th2). Le cellule Th1 secernono citochine con proprietà proinfiammatorie, tra cui TNF- α , interferone- γ e IL-2, mentre i Th2 producono citochine con proprietà antinfiammatorie (ad es. IL-4 e -10).⁵⁷ Pazienti con un quadro di sepsi presentano linfociti T alterati che non riescono a proliferare e produrre citochine, ciò si traduce in una riduzione della risposta effettrice delle cellule T. Recenti scoperte coinvolgono altre popolazioni di cellule T: le cellule T regolatorie. Queste cellule sopprimono l'immunità delle cellule T, comprese le cellule T natural killer (NKT) e le cellule T gamma-delta ($\gamma\delta$).⁶² I meccanismi esatti con cui questi sottogruppi di linfociti regolatori influenzano la risposta immunitaria rimangono oggetto di controversie. La regolazione dell'apoptosi delle popolazioni di cellule immunitarie durante la sepsi e altri stati traumatici può svolgere un ruolo cruciale bilanciando lo stato infiammatorio iperattivo con un danno eccessivo all'ospite.⁵⁷

SINDROME CARS

Il termine CARS riflette una condizione di autoimmunosoppressione causata da un grave insulto come sepsi, ustioni o lesioni gravi ai tessuti. L'immunoparalisi è il segno distintivo della risposta CARS nella sepsi e può essere correlato all'aumento dell'apoptosi delle cellule effettrici immunitarie.⁵⁷

I pazienti che manifestano la sindrome CARS sono anergici e presentano una funzionalità linfocitaria compromessa. La risposta CARS include:

- Anergia cutanea;
- Riduzione del numero dei linfociti mediante apoptosi;
- Riduzione della risposta dei monociti alla stimolazione citochinica;
- Diminuzione quantitativa dell'espressione dell'antigene leucocitario umano (HLA) sui monociti;
- Espressione di citochine come IL-10.

Molti pazienti settici, in particolare quelli che hanno comorbidità croniche, sembrano presentare più frequentemente una bassa conta leucocitaria e ipotermia.⁵⁷

Tra le diverse citochine coinvolte nella risposta CARS la più importante è IL-10. Questa interleuchina ha il ruolo di regolazione delle cellule T.^{57,63,64} Ashare e colleghi hanno seguito i livelli di citochine proinfiammatorie e antinfiammatorie durante tutto il decorso della sepsi nei topi scoprendo che i livelli batterici tissutali

correlavano con i livelli di IL-10 e che se la risposta proinfiammatoria complementare veniva bloccata dal pretrattamento con l'antagonista del recettore dell'IL-1, i livelli batterici erano più alti, così come la mortalità. Un'osservazione altrettanto interessante fu riguarda il recettore dell'IL-1: se questo veniva bloccato con un ritardo di 12 ore dopo l'insorgenza della sepsi, al contrario la mortalità tendeva a ridursi.⁶⁵ Queste valutazioni sono emblematiche di come la disregolazione immunitaria abbia un ruolo molto importante sulla mortalità da sepsi.

La fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte di macrofagi e cellule dendritiche stimola la tolleranza immunitaria inducendo il rilascio di citochine antinfiammatorie, incluso IL-10 e il fattore di crescita trasformante- β (TGF) e sopprimendo il rilascio di citochine proinfiammatorie. L'apoptosi linfocitaria si verifica rapidamente portando ad una perdita importante e persistente di linfociti, associata a scarsa prognosi del paziente.⁵⁷

La sepsi o altri importanti stress infiammatori, enfatizzano equilibrio molto delicato e complesso che sussiste all'interno dell'organismo ospite. Mentre le componenti proinfiammatorie aumentano per eliminare gli agenti patogeni, i tessuti che vengono danneggiati al contrario causano lesioni all'ospite. Proprio come l'immagine speculare della SIRS, la risposta CARS (Fig.6) può essere pericolosa nel momento in cui i suoi effetti sono mal regolati e lasciano l'ospite troppo vulnerabile all'aggressione da parte della noxa patogena. Bone aveva ipotizzato che esistesse già una potente risposta antinfiammatoria per bilanciare l'azione distruttiva della risposta proinfiammatoria, e che agenti che sconvolgono troppo questo labile equilibrio in entrambe le direzioni potrebbero portare alla morte dell'ospite.¹⁹

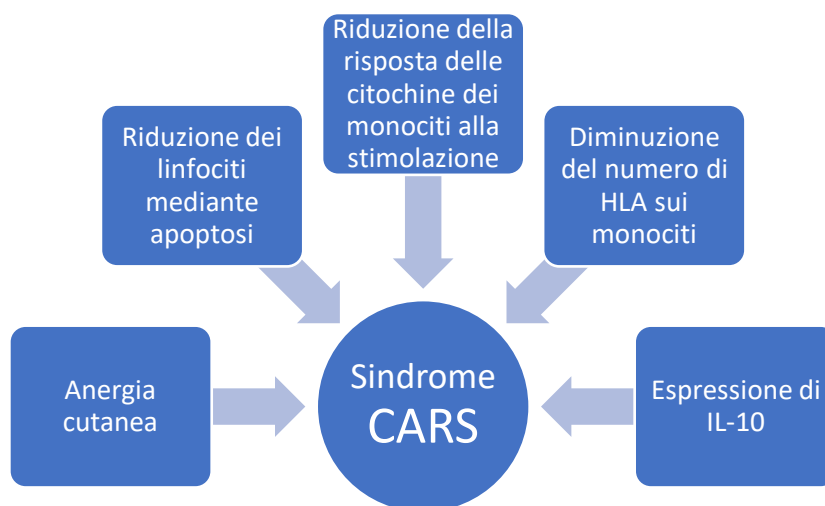


Fig. 6 : Le caratteristiche dei pazienti con sindrome di CARS

ALTERAZIONI MICROCIRCOLATORIE

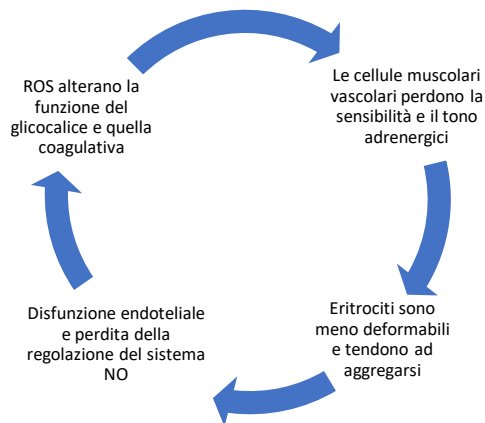


Fig. 7 : Come il microcircolo diventa il “motore della sepsi”; Specie reattive dell’ossigeno (ROS); Ossido nitrico (NO)

La disfunzione del microcircolo in pazienti con sepsi è stata descritta per la prima volta da De Backer e colleghi.⁶⁶ Il suo ruolo cruciale però è stato individuato da Ince, che ha definito il microcircolo come il “motore della sepsi”.⁶⁷ Con microcircolo si fa riferimento all’insieme dei vasi di diametro

inferiore a 100µm, ed è composto prevalentemente da capillari e venule. La sua principale funzione è il trasporto di ossigeno e sostanze nutritive, oltre che la rimozione dell'anidride carbonica dai tessuti. Le alterazioni microvascolari riscontrate in pazienti settici sono spiegate da diversi meccanismi presenti in figura (Fig.7). In corso di tali alterazioni la pressione parziale di O₂ a livello del microcircolo scende sotto la pO₂ venosa. Questa disparità permette la creazione di shunt funzionali, che si verificano in maniera importante nella sepsi.⁶⁸ Gli shunt provocano un’eterogeneità del flusso, con la presenza di zone non perfuse e zone eccessivamente perfuse. Nonostante ciò, l’ipossia si presenta in entrambi i distretti in quanto i tessuti perfusi non riescono a compensare aumentando l’estrusione di O₂. Il tutto esita in una riduzione dei livelli di O₂ periferici.⁶⁹ Grazie all’introduzione di due dispositivi è possibile visualizzare direttamente il microcircolo nella pratica clinica. Queste due tecniche sono la polarizzazione ortogonale spettrale (OPS)⁷⁰ o il flusso laterale in campo scuro (SDF).

Entrambi i sistemi si basano sul principio di emissione di una luce verde che illumina in profondità il tessuto mucosale, generalmente del cavo orale, a livello sublinguale (fino a 3 mm), la quale viene assorbita dall'emoglobina dei globuli rossi contenuti nei vasi superficiali, permettendo l’osservazione di capillari e venule.⁷¹

Per un’analisi accurata, l’acquisizione dell’immagine dovrebbe includere almeno tre sequenze di buona qualità di 20 sec ciascuna. I cinque punti chiave evidenziati in un Consensus per l’acquisizione dell’immagine sono:

1. L'acquisizione di Cinque siti per organo;
2. Evitare artefatti da pressione;
3. Eliminare le secrezioni;
4. Messa a fuoco e regolazione del contrasto adeguate;
5. Registrazione di alta qualità.

L'assenza di perfusione nelle venule suggerisce un artefatto da pressione.⁷¹

L'analisi del microcircolo può essere, quindi ottenuta in modo affidabile usando punteggi semiquantitativi. Due sono i punteggi utilizzati nella pratica clinica per la valutazione dello stato del microcircolo: il De Backer score e il MFI score.

Le variabili misurate sono:

- La *Total Vessels Density* (TVD), indice oggettivo di densità vasale;
- La *Perfused Vessel Density* (PVD), indice della densità dei capillari perfusi;
- La *Proportion of Perfused Vessels* (PPV), un indice percentuale di perfusione vasale;
- Il *Microcirculatory Flow Index* (MFI), un indice della qualità del flusso microcircolatorio;
- Il *Flow Heterogeneity Index* (FHI), un indice della disomogeneità del flusso, caratteristica specifica degli stati di sepsi.

Il primo è lo score suggerito da De Backer caratterizzato dalla misurazione di diverse variabili, tra cui la densità capillare funzionale, che ha una buona riproducibilità ed è una variabile continua. Purtroppo però il punteggio è sensibile all'isotropia ossia alla modifica delle dimensioni dell'immagine durante l'ingrandimento ottico.⁶⁶ Il secondo suggerito, MFI score, introduce una nuova variabile ossia l'Indice di flusso microvascolare. Caratteristiche principali a suo favore sono la rapidità di valutazione, oltre che fornisce anche informazioni sul tipo di flusso nei vasi perfusi (lento, normale, rapido). La densità capillare funzionale non viene tenuta in considerazione nell'MFI score.⁷²

MICROCIRCOLO E COERENZA EMODINAMICA

La valutazione dello stato emodinamico di questi pazienti per molto si è limitata alle misurazioni della gittata cardiaca e al rilascio di ossigeno. Purtroppo l'erogazione di ossigeno microvascolare non viene tenuto in considerazione dalle misurazioni emodinamiche globali nonostante sia il sito principale dello scambio di

ossigeno e nutrienti.^{69,73} Esistono sempre più prove che sottolineano che la riduzione della funzione microcircolatoria è associata a morbidità e mortalità in diversi quadri clinici e che nonostante gli interventi di ottimizzazione dello stato emodinamico macrocircolatorio, gli alti tassi di mortalità persistono nei pazienti critici e soprattutto nei pazienti settici. Pertanto, piuttosto che limitare la terapia al raggiungimento di target macrocircolatori, il microcircolo potrebbero essere utile se valutato adeguatamente per ridurre i tassi di mortalità.⁷⁴ De Backer e colleghi hanno scoperto che le alterazioni microcircolatorie nei pazienti settici con esito infausto erano più gravi rispetto a quelle dei pazienti che sopravvivevano. L'insufficienza microcircolatoria ha dimostrato di avere, quindi un valore prognostico nei pazienti settici.⁶⁶ I disturbi microcircolatori prima del ricovero in rianimazione e la loro persistenza dopo, sono stati associati ad un aumentato rischio di morbidità e mortalità. Trzeciak e colleghi hanno dimostrato che il precoce aumento della perfusione microcircolatoria durante il riempimento volemico erano associati a ridotta gravità dell'insufficienza d'organo, valutato con il punteggio SOFA nei pazienti con sepsi.^{12,75}

Tuttavia, i cambiamenti nel microcircolo non erano correlati ai cambiamenti nel macrocircolo, probabilmente perché il macro e il microcircolo non hanno la stessa dose-risposta al riempimento volemico. Molti studi in letteratura hanno descritto le condizioni di una perdita di coerenza emodinamica in cui la rianimazione ha comportato una normalizzazione delle variabili emodinamiche sistemiche, ma non ha portato a un miglioramento concomitante della perfusione microcircolatoria e dell'ossigenazione.⁷⁵⁻⁷⁷

Sono stati identificati quattro tipi di alterazioni microcircolatorie associate ad una perdita della coerenza emodinamica con il macrocircolo(Fig.8⁶⁹). Nel tipo 1, si osserva una eterogeneità nella perfusione microcircolatoria con capillari ostruiti accanto ai capillari con globuli rossi, condizione frequente nei pazienti settici. Il tipo 2, si verifica in corso di emodiluizione, condizione che provoca una perdita di capillari riempiti di globuli rossi e aumenta la distanza per la diffusione di ossigeno tra globuli rossi, che lo trasportano e cellule tissutali. Queste alterazioni principalmente descritte nei pazienti cardiocirurgici in cui l'emodiluizione, causata da soluzioni di

adescamento, cardioplegia e somministrazione di liquidi, provoca una perdita di capillari popolati di globuli rossi. Nel tipo 3, il quadro tipico è la vasocostrizione dei vasi arteriosi che provoca ischemia microcircolatoria o aumento delle pressioni venose che inducono tamponamento microcircolatorio, entrambi con conseguente

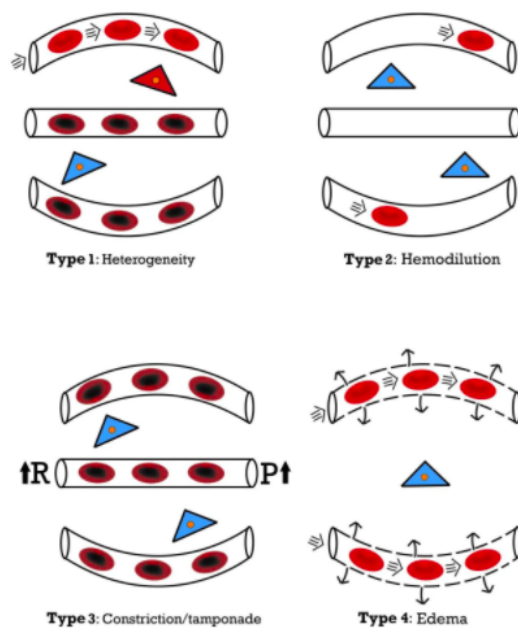


Fig. 8 : I quattro tipi di alterazioni microcircolatorie associate ad una perdita della coerenza emodinamica con il macrocircolo

ossigenazione tissutale compromessa.

L'ultimo il tipo 4, presenta edema tissutale, con anche qui un aumento delle distanze tra i globuli rossi e le cellule dei tessuti. Si associa a danni alle cellule endoteliali con alterazione del glicocalice e / o compromissione delle giunzioni intercellulari.

Per identificare la perdita di coerenza emodinamica possono essere utilizzati marker di perfusione d'organo, come il lattato, la temperatura periferica e il tempo di riempimento capillare (*capillary refill*).

Alterazioni in queste variabili sono state suggerite come endpoint di riempimento

volemico.⁶⁷

CLINICA

Le manifestazioni cliniche della sepsi sono estremamente variabili e spesso sono dovute all'interessamento d'organo (Tab. 5). La presentazione clinica all'esordio può essere subdola e aspecifica e il passaggio a shock settico può avvenire in modo graduale o repentino.

Temperatura	> 38 °C o < 36°C
Leucociti	> 12.000/mm ³ oppure < 4000/mm ³ O neutrofili immaturi > 10%
Frequenza respiratoria	> 20 atti/min
Frequenza cardiaca	> 90 bpm
Astenia	
Alterazione dello stato mentale	Grave= GCS ≤ 8; Moderata=GCS 9-13; Minore, GCS ≥ 14.

Tab. 5 : Manifestazioni cliniche eterogenee nella sepsi; Glasgow Coma Scale (GCS)

L'ipotensione arteriosa è la caratteristica più comune della disfunzione cardiovascolare nei pazienti con sepsi. I principali fattori che contribuiscono alla fisiopatologia dell'ipotensione arteriosa sono l'ipovolemia, il tono vascolare ridotto e la riduzione dell'attività miocardica, che

può essere grave ed è associata a diminuzioni globali delle frazioni di eiezione ventricolare sinistra e destra. La presentazione clinica predominante nei pazienti con disfunzione cardiovascolare associata alla sepsi è la scarsa tolleranza alla somministrazione di liquidi, che è associata a bassa saturazione venosa centrale ($ScvO_2$).⁷⁸ Lo shock settico è di tipo distributivo e si presenta come un'ipotensione persistente con pressione arteriosa media inferiore a 65 mmHg che necessita di supporto con farmaci vasopressori e nonostante il riempimento volemico, i livelli di lattati si mantengono superiori a 2 mmol/L,¹

L'ipossiemia, ossia la diminuzione della pressione arteriosa parziale dell'ossigeno (PaO_2), è un segno distintivo di disfunzione polmonare nei pazienti con sepsi ed è evidente clinicamente come iperventilazione (aumento della frequenza respiratoria), che può portare a una bassa pressione arteriosa parziale di anidride carbonica ($PaCO_2$). L'alcalosi respiratoria risultante può essere implementata in presenza di acidosi metabolica.⁷⁸

Il coma può svilupparsi in pazienti con forme gravi di disfunzione cerebrale associate alla sepsi ed è caratterizzata da uno stato mentale alterato, incluso disorientamento e confusione. Sebbene i segni neurologici focali siano di solito assenti, sono comunemente presenti anomalie dell'elettroencefalogramma. È importante sottolineare che la disfunzione cerebrale associata alla sepsi può essere presente anche senza altre disfunzioni d'organo che potrebbero causare encefalopatia, come l'insufficienza epatica. I pazienti con disfunzione cerebrale associata a sepsi hanno un'alta mortalità e spesso presentano sequele cognitive e funzionali.⁷⁸

Secondo le Linee guida Surviving Sepsis Campaign (SSC), la diagnosi di disfunzione epatica durante la sepsi si basa sull'aumento della concentrazione di bilirubina >2 mg / dL e l'insorgenza di disturbi della coagulazione con International Normalized Ratio (INR) $>1,5$. La bilirubina come singolo parametro non riflette in modo esaustivo la funzionalità epatica. Manca di specificità e non permette di distinguere l'insufficienza epatica acuta dalla disfunzione cronica. La principale citochina della risposta infiammatoria del fegato è l'interleuchina-6 (IL-6), che è responsabile della sintesi proteica della fase acuta come la proteina C-reattiva (CRP), α -1 antitripsina, fibrinogeno, protrombina e aptoglobina. L'aumento delle concentrazioni proteiche della fase acuta porta all'inibizione della via della proteina C, e quindi è responsabile dell'aumento dell'attività coagulativa.

La coagulazione vascolare disseminata (CID) nel contesto di sepsi si presenta spesso con complicanze sia trombotiche che emorragiche. La gravità del sanguinamento è variabile, mentre la presentazione trombotica è suddivisa in due categorie: trombosi macrovascolare e microvascolare. Le complicanze trombotiche macrovascolari comprendono trombosi venose e coronariche, causa di infarto del miocardio, ma anche infarto cerebrale da trombosi o emboli all'interno del Circolo di Willis e trombosi della circolazione viscerale. Queste complicanze si presentano acutamente e comportano alti tassi di morbilità e mortalità.⁷⁹ La trombosi microvascolare è più blanda e in genere si manifesta come disfunzione multiorgano. Il microcircolo polmonare, epatico e renale è particolarmente suscettibile alla trombosi.⁷⁹ La diagnosi di CID viene effettuata mediante l'identificazione di anomalie di laboratorio. Tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), la conta piastrinica, la concentrazione di fibrinogeno e le misurazioni del prodotto di degradazione della fibrina sono i classici esami utilizzati nel riconoscimento e nel monitoraggio della CID. Tuttavia, nessun esame di laboratorio è completamente sensibile o specifico. A volte, i pazienti mostrano anche fibrinolisi non regolata.⁷⁹

La disfunzione renale in corso di sepsi si presenta clinicamente come oliguria che di solito è secondaria allo shock settico, altri fattori però, possono contribuire come i farmaci nefrotossici. Sono comuni l'aumento dell'urea sierica (o dell'azoto ureico nel sangue) e della creatinina. Nell'ultimo decennio, diversi biomarcatori urinari e plasmatici come la cistatina C, lipocalina associata a gelatinasi neutrofila (NGAL) sono stati studiati per la diagnosi precoce di disfunzione renale associata a sepsi o a scopo prognostico. Sebbene potenzialmente promettente, l'efficacia clinica di questi biomarcatori e il loro ruolo nella diagnosi della disfunzione renale correlata alla sepsi non sono chiari e la loro disponibilità è limitata.⁷⁸

DIAGNOSI

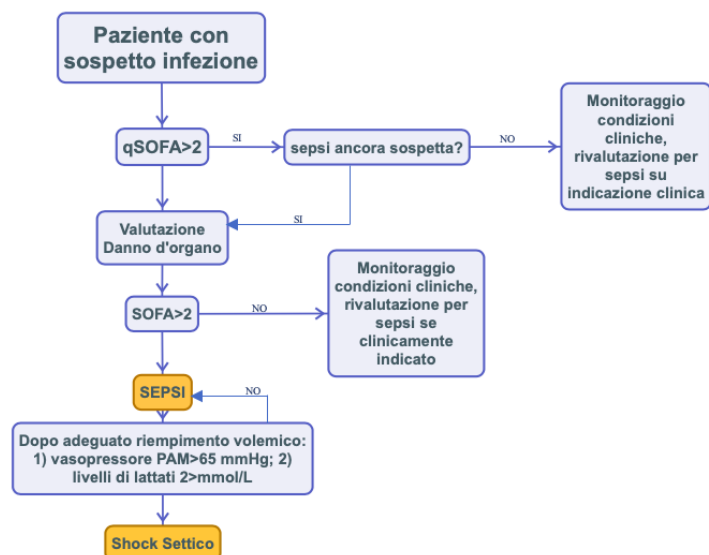


Fig. 9: Algoritmo diagnostico proposto nel terzo consensus

Un contributo sostanziale apportato dal *Terzo consensus*, fu la strutturazione di un algoritmo diagnostico (Fig. 9).¹ L'importanza di un iter diagnostico ben definito è indispensabile per l'identificazione precoce della condizione, soprattutto alla luce degli ultimi "Sepsis- Bundles" del 2018 che rivendicano la "1-hour bundle", ovvero di intraprendere il trattamento entro la prima ora.^{80,81}

LABORATORIO

I reperti di laboratorio variano a seconda della fase della malattia e dipendono principalmente dalla presenza o meno di shock e danno d'organo. Abitualmente all'esame emocromo-citometrico si riscontra spiccata leucocitosi neutrofila, ma occasionalmente può aversi leucopenia e il suo riscontro all'esordio può essere un segno prognostico sfavorevole. Qualche volta possono osservarsi reazioni leucemoidi con più di 50.000 globuli bianchi. La piastrinopenia quando è rilevante (sotto 50.000/mm) può rappresentare la manifestazione di una CID e in questo caso si associa all'allungamento del tempo di protrombina (PT) e del tempo di tromboplastina parziale (PTT), a bassi livelli di fibrinogeno ed elevati di prodotti di degradazione della fibrina e del fibrinogeno (FDP). Utile è lo striscio di sangue periferico per la messa in evidenza di globuli rossi frammentati (ad elmetto, schistociti) nonché delle forme immature dei globuli bianchi (band form). La reticulocitosi è elevata. L'emoglobina e l'ematocrito, che possono essere apparentemente normali all'inizio in caso di marcato calo del volume intravascolare, devono essere misurati frequentemente.⁴²

Non esiste ancora uno marker che abbia il ruolo di gold standard nella diagnosi e nella prognosi di sepsi. La procalcitonina è un propeptide della

calcitonina, in passato nota per essere prodotta a livello della tiroide. E' prodotta in seguito a stimoli citochinici e ha un ruolo nella modulazione dell'attività dell'ossido nitrico, nella regolazione delle resistenze periferiche e nel passaggio dei fluidi tra compartimenti, modulando il legame di altri peptidi ai propri recettori.^{82,83} Si ha un innalzamento della procalcitonina plasmatica dopo 2-3h dall'iniezione di LPS e si individua un picco a 6h, con un plateau di 8-24h, più rapida di quella della proteina C reattiva.⁸⁴ Valori limite sono fissati fra 0,25ng/mL e 0,5ng/mL per una sepsi di origine batterica mentre valori al di sotto di 0,25ng/mL rendono improbabile la diagnosi di sepsi o shock settico, ma permane la possibilità di un'infezione di tipo batterico.⁸⁵ La procalcitonina, infatti, è capace di discernere fra gli stati evolutivi di quello che era definito secondo i vecchi criteri di diagnosi della sepsi, ma anche più semplicemente distinguere le infezioni batteriche da quelle non batteriche.⁸⁶ Un altro utilizzo è quello di guida in corso di terapia antibiotica, sia in termini di efficacia che di valutazione della sospensione, permettendo una riduzione dei giorni di trattamento.⁸⁷⁻⁸⁹ Falsi positivi sono traumi e chirurgia maggiore, ustioni gravi, shock cardiogeno.⁸⁵

Infine, risulta utile il monitoraggio della diuresi nonché l'esame delle urine per la ricerca eventuale di ematuria, proteinuria e segni di infezione. L'incremento della creatininemia e dell'urea sono espressione del danno renale. L'incremento della bilirubina, della fosfatasi alcalina(FA) e delle transaminasi(ALT e AST) 2-3 volte la norma, sono reperti frequenti e non hanno particolare valore prognostico negativo. L'albumina plasmatica può scendere a 15-20 g/l oltre le 24 ore e ciò può essere dovuto sia all'aumentata permeabilità capillare sia dalla scarsa nutrizione del soggetto in caso di sepsi di lunga durata. Spesso i lipidi sierici sono elevati.⁴²

Più recentemente si è visto che alti livelli sierici di recettore-1 solubile del fattore di necrosi tumorale (sTNFR1) e di IL-8 sono indici prognostici sfavorevoli essendo associati ad alti tassi di mortalità, è utile quindi, se possibile, la determinazione dell'assetto citochinico del paziente settico.⁹⁰

TRATTAMENTO

River e colleghi hanno proposto una Early goal therapy che ha permesso una riduzione del tasso di mortalità al 30%.²⁷ L'efficacia del trattamento precoce ha portato alla redazione delle prime linee guida internazionali per la gestione della sepsi grave, pubblicate nel 2004.²⁸ Nel 2010 la Campagna stessa ha pubblicato i

risultati del programma dimostrando che, sebbene la riduzione assoluta della mortalità fosse minima (5,4%), la compliance aveva raggiunto solo il 31%.²⁹ Questa campagna alla fine ha portato all'adozione di Early Management Bundle for Severe Sepsis/Septic Shock (SEP-1) nell'ottobre 2015. Una meta-analisi del periodo confermava il calo della mortalità dei i pazienti con sepsi attorno al 4,5% all'anno.³⁰

Sia lo studio precedente di River e colleghi, che altri studi clinici randomizzati (ProCESS, ARISE e ProMISe) presentano però tassi di mortalità che sembrano essere più bassi con linee di trattamento normali piuttosto che per bundles.⁹¹⁻⁹³ Baghdadi e colleghi suggeriscono che sebbene più componenti del SEP-1 fossero associati a una ridotta mortalità, l'aderenza alla cura nel complesso non è stata associata con un miglioramento dell'outcome nella sepsi⁹⁴ e questo può essere dovuto alla necessità di rivalutazione e miglioramento degli attuali parametri utilizzati come indice di miglioramento allo scopo di erogare cure sempre più personalizzate in questi pazienti.⁹⁵

La fase iniziale di gestione è organizzata in bundles, promossa dalle linee guida della Surviving Sepsis Campaign. Nonostante i numerosi studi e le raccomandazioni, rimane un argomento di dibattito. A causa della complessità del quadro clinico, la gestione del paziente settico è stata organizzata in 2 bundles di cure. Il primo gruppo aiuta nella gestione del quadro di sepsi acuto a 3 e 6 ore, mentre il secondo è di ausilio nella gestione della sepsi a 24 ore.

Bundles di 3 ore:	Bundles di 6 ore:	Bundles da completare in 24 ore
▪ Esami culturali ▪ Lattato sierico ▪ Antibiotici ad ampio spettro ▪ Iniziare la somministrazione di cristalloidi a 30 ml / kg entro le prime 3 ore	▪ Utilizzare i vasopressori per mantenere pressione arteriosa media > 65 mmHg ▪ In caso di ipotensione persistente o se lattato iniziale è maggiore di 4 mmol / L, rivalutare la volemia e la perfusione dei tessuti ▪ monitoraggio livelli di lattato	▪ Se indicato: idrocortisone alla dose di 200 mg al giorno; ▪ Livelli di glucosio nel sangue inferiori a 180 mg / dl; ▪ Mantenere la pressione di plateau delle vie aeree a meno di 30 cm H2O nei pazienti in ventilazione meccanica; ▪ Rivalutare la terapia antibiotica ▪ Inizio precoce dell'alimentazione enterale ▪ Profilassi per la trombosi venosa profonda; ▪ Profilassi dell'ulcera da stress

Fig. 10 : Bundles promossi dalle linee guida della Surviving Sepsis Campaign

I pazienti con sepsi ad eziologia ancora sconosciuta devono essere trattati subito con una terapia antibiotica empirica a largo spettro così da coprire tutti i potenziali patogeni.

Di fronte ad un paziente in stato di shock occorre come prima cosa accertarsi che le vie aeree siano pervie e somministrare ossigeno a 3-6 l/min. Stabilire se é necessaria la sua intubazione e ventilazione meccanica. Le Indicazioni alla

intubazione sono: a) pressione parziale arteriosa di O₂ inferiore a 50 mmHg; b) pressione parziale arteriosa di CO₂ superiore a 50 mmHg; c) acidosi metabolica severa; d) incapacità di salvaguardare la pervietà delle vie aeree; e) edema polmonare grave o distress respiratorio severo che richiedono pressione positiva di fine espirazione (PEEP).

E' indispensabile controllare continuamente la perfusione monitorando la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, l'ECG, la temperatura corporea, il tempo di riempimento capillare, la diuresi (mediante cateterismo vescicale), l'equilibrio acido-base e lo stato di vigilanza (Glasgow Coma Scale).

RIEMPIMENTO VOLEMICO

La fluid resuscitation raccomandata, nella fase acuta, è di 30 ml / kg di cristalloidi. Questo numero fisso è stato preso come volume medio di fluidi somministrato ai pazienti negli studi PROCESS, ARISE e PROMISE.⁹¹⁻⁹³ Il volume di liquidi per via endovenosa da somministrare nella rianimazione precoce è ancora un punto di contestazione e dibattito, poiché la metà dei pazienti nello studio non ha avuto la necessità di raggiungere tale target e l'altra metà ha richiesto quantità maggiori.

Anche il tipo di fluido da somministrare è un punto controverso, con una raccomandazione generale per "fluidi cristalloidi" come il Ringer lattato o il plasmalyte dalle più recenti linee guida della Surviving Sepsis Campaign.⁹⁶ Recenti studi e report hanno riportato alcuni benefici dalla somministrazione di soluzioni di cristalloidi come Ringer lattato rispetto alla soluzione salina normale (NaCl).^{97,98} L'attuazione di una strategia restrittiva del cloruro in una terapia intensiva è stata associata a una diminuzione dell'incidenza di insufficienza renale acuta e dell'uso di terapia renale sostitutiva.⁹⁹

ANTIBIOTICOTERAPIA

Possono tornare utili l'esame microbiologico dell'espettorato o dell'aspirato bronchiale, l'imaging volto all'individuazione di ascessi, di focolai polmonari, di infezioni di interesse gastroenterologico, di perforazioni degli organi cavi. Ciò ha senso anche alla luce dell'impostazione di una terapia antibiotica mirata.

Si raccomanda di iniziare la terapia antibiotica il prima possibile dopo la diagnosi di sepsi grave o shock settico in quanto ritardi sono stati associati ad un aumento della mortalità. Le raccomandazioni impongono di iniziare la terapia entro 1 ora dalla diagnosi.¹⁰⁰

La mortalità per sepsi non è correlata né al sito di infezione, né all'organismo causale, compresi i microrganismi multi resistenti.¹⁰¹ Per questo motivo, sono raccomandati antibiotici ad ampio spettro contro la fonte sospetta, anche se l'agente antimicrobico potrebbe non risultare il più appropriato.

Ottenere colture microbiologiche ha lo scopo di aggiustare la terapia antibiotica dopo che la fase acuta è passata. Molta enfasi è stata posta in passato sui tempi e sulla tecnica con cui ottenere una emocoltura in modo da aumentare le probabilità di ottenere un vero risultato positivo tuttavia, non vi è stata correlazione tra i tempi di prelievo dell'emocoltura e il rilevamento di una batteriemia significativa. Le raccomandazioni della Infectious Disease Society of America (IDSA) enfatizzano la necessità di effettuare prelievi in modo sterile da almeno due sedi diverse, ponendo attenzione maggiore al volume del campione di sangue, piuttosto che i tempi di prelievo.¹⁰²

SUPPORTO EMODINAMICO E FARMACI VASOATTIVI

I vasopressori sono indicati nello shock settico se la condizione non risponde al bolo del fluido. I vasopressori forniscono la vasocostrizione per aiutare a mantenere una buona pressione sanguigna, con una PAM target superiore a 65 mmHg.¹⁰³ La scelta del vasopressore inizialmente dovrebbe essere la noradrenalina, con la vasopressina aggiunta se la noradrenalina dopo la dose di titolazione non riesce a migliorare la pressione sanguigna da sola. L'epinefrina deve essere usata come agente di seconda linea. Le raccomandazioni a questo punto sono di evitare l'uso della dopamina, tranne nei pazienti accuratamente selezionati. In caso di evidenza di disfunzione miocardica, le raccomandazioni supportano l'aggiunta di un'infusione di dobutamina alla terapia vasopressore in corso. I vasopressori devono essere somministrati attraverso un catetere venoso centrale non appena è possibile il posizionamento.⁹⁶

Il monitoraggio della pressione venosa centrale(CVP) durante la terapia infusionale è utile perché permette di riportare il volume circolante fino al giusto

limite per un corretto riempimento. Spesso per ottenere il massimo effetto terapeutico, si usano più agenti pressori contemporaneamente, l'associazione più usata è quella tra la dopamina a basse dosi (0.5-3 mg/Kg/min), attiva nel mantenere la perfusione renale grazie alla sua capacità di dilatare il letto vascolare renale e quello splancnico, e la dobutamina (5-15 mg/Kg/min.). La dobutamina incrementa la contrattilità del miocardio e riduce le resistenze periferiche aumentando così la gittata cardiaca e la perfusione tissutale non modificando la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca. È controindicato l'uso di sostanze adrenergiche alfa stimolanti che aumentano le resistenze periferiche e il lavoro del cuore, mentre lasciano invariate la contrattilità del miocardio, l'irrorazione periferica e la gittata sistolica.

SUPPORTO VENTILATORIO E MONITORAGGIO DIURESI

La ventilazione meccanica è una componente importante nella gestione del paziente settico, in quanto il sistema respiratorio, principalmente i polmoni, sono l'organo più comunemente colpito nella sepsi grave e nello shock settico. Nel caso in cui il paziente manifesti una lesione polmonare acuta che progredisce in Sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) che richiede ventilazione meccanica, è necessaria una strategia di protezione polmonare. Questa consisteva in un volume corrente inferiore di 6 ml / kg di peso corporeo previsto e manteneva PEEP inferiori a 30 cm H₂O. Nello storico studio ARDSNet, i pazienti che ricevevano ventilazione meccanica e avevano sviluppato ARDS avevano una mortalità più bassa e una riduzione dei giorni dipendenti dal ventilatore utilizzando la strategia di protezione polmonare. La convinzione diffusa che l'ipossia tissutale in corso di sepsi fosse il problema, ha portato a trasfusioni importanti di globuli rossi per aumentare il rilascio di ossigeno in periferia, soprattutto nei primi anni della gestione della sepsi. Tuttavia, è stato smentito e la raccomandazione attuale impone una soglia trasfusionale inferiore di 7 g / dL nei pazienti settici a meno che non ci siano segni di malattia coronarica, ischemia miocardica o emorragia acuta.^{96,104}

In corso di shock è importante monitorare la diuresi posizionando un catetere a permanenza in vescica, fino a quando le condizioni circolatorie non siano nettamente migliorate e la diuresi non sia ritornata normale (0.5-0.75 cc/Kg/h). L'oliguria è un reperto frequente ed è secondaria ad un'insufficienza da causa prerenale (ipovolemia e/o ipoperfusione) o a una necrosi tubulare acuta.

SQUILIBRIO ELETTROLITICO

Devono essere corretti sia gli squilibri elettrolitici e dell'equilibrio acido-base, poiché peggiorano la ventilazione, riducono l'attività il miocardio, predispongono alle aritmie e alterano la risposta alle catecolamine. L'acidosi va corretta se il pH scende sotto il valore di 7,15. Se la causa é metabolica si somministrano 1-2 mEq/Kg di bicarbonato di sodio e.v. in 5 min. Il pH va corretto e portato a valori non superiori a 7,25 - 7,30. Vanno eseguiti frequenti controlli emogasanalitici. La quantità di HCO_3^- in mEq da somministrare per via endovenosa, si calcola moltiplicando il peso in Kg per l'eccesso di basi per 0,3.

L'ipocalcemia si manifesta con una riduzione degli ioni calcio in associazione ad una ridotta perfusione tissutale. L'ipocalcemia, come l'ipofosfatemia, riduce la funzionalità miocardica. Per la correzione vanno somministrati 10-20 mg/Kg (0.1-0.2 ml/Kg) di CaCl_2 al 10% e.v. lentamente, meglio attraverso un catetere venoso centrale.

La fosfatemia, in presenza di livelli di potassio ematico normale, va monitorata. Si tratta infusioni lente di con 5-10 mg/Kg di KPO_4 , in caso di concomitante ipopotassiemia. Al contrario se il fosforo risulta aumentato bisogna infondere calcio.

DISTURBI EMOSTASI

Il trattamento della CID prevede la somministrazione di fattori della coagulazione e di piastrine infondendo sangue o plasma fresco: la scelta dipende dal grado di anemizzazione del paziente. Il plasma fresco risulta essere migliore del semplice fibrinogeno, in quanto contiene gli altri fattori della coagulazione oltre che gli inibitori fisiologici ed ha effetti anche sulla volemia.

Concentrati piastrinici, crioprecipitati contenenti fibrinogeno, Fattore VIII, e concentrati di AT3a vengono somministrati se non si ottengono risultati soddisfacenti con la somministrazione di plasma fresco. La terapia con fattori plasmatici e concentrato di piastrine deve essere continuata in seguito all'inizio della terapia con eparina al fine di minimizzare il rischio di emorragia.

L'eparina, oltre che essere utilizzata nella profilassi anti tromboembolica, é indicata a scopo terapeutico in presenza di estesa trombosi o in corso di emorragia

non controllabile con la reintegrazione di fattori di coagulazione e di piastrine allo scopo di bloccare un ulteriore consumo di fattori della coagulazione. L'eparina viene somministrata somministrazione per infusione continua o in bolo. L'efficacia della terapia viene monitorata misurando il livello di fibrinogeno e, in seguito, quello delle piastrine.

CORTICOSTEROIDI

L'uso di corticosteroidi è controverso. Tuttavia un dato certo è che i cortisonici hanno un effetto antishock da imputare alla loro azione di stabilizzanti delle membrane lisosomiali. I corticosteroidi hanno due implicazioni importanti nella terapia dei pazienti settici sia un'attività antinfiammatoria che amplificano la risposta vasocostrittiva alle catecolamine.

Gli studi CORTICUS e ADRENAL, non sono riusciti a mostrare un beneficio diretto sulla mortalità. Tuttavia, è stata osservata una riduzione della durata della degenza in terapia intensiva nei sopravvissuti.^{105,106} Lo studio APROCCHSS, al contrario, ha esaminato una combinazione di fluidrocortisone e idrocortisone ed ha mostrato un beneficio in termini di mortalità nei pazienti con shock settico.¹⁰⁷

Attualmente, le raccomandazioni supportano l'uso di idrocortisone nello shock settico che non risponde al riempimento volemico.

CONTROLLO GLICEMICO

In ICU, qualsiasi farmaco antidiabetico va sostituito con la terapia insulinica e deve essere iniziata quando la glicemia sale al di sopra i 180 mg/dl. Il monitoraggio glicemico ha lo scopo di limitare le oscillazioni plasmatiche nelle 24 ore. Per la valutazione adeguata della glicemia, andrebbero evitati gli stick glicemici che non correlano in maniera precisa con i livelli ematici.

PROTEZIONE GASTRICA E NUTRIZIONE

Non è raro che in corso di sepsi si possa verificare un aumento della secrezione acida a livello gastrico. E' bene impostare una profilassi contro l'ulcera da stress con inibitori di pompa protonica e promuovere una nutrizione enterale precoce. Se questo non fosse possibile, la nutrizione parenterale non va intrapresa

prima di sette giorni dalla diagnosi di sepsi per evitare di aumentare il rischio infettivo.

SUPPORTO AL SISTEMA IMMUNITARIO

Le Linee Guida non pongono indicazione alla somministrazione di immunoglobuline nel paziente settico. Tuttavia, nuove prospettive terapeutiche si basano proprio sull'immunoterapia a base di immunoglobuline. Le immunoglobuline agiscono con un effetto modulatorio sulla risposta infiammatoria, in particolare le IgM arricchite sono il tipo di immunoglobuline che hanno mostrato maggiore efficacia terapeutica nel paziente settico. Uno studio clinico randomizzato con placebo recente ha dimostrato che l'infusione a 72 ore di immunoglobuline arricchite da IgM in pazienti con sepsi o shock settico può essere associata ad un aumento della perfusione microvascolare sublinguale.¹⁰⁸ Ulteriori studi sperimentali in corso si pongono l'obiettivo di indagare la ricaduta clinica e le criticità dell'utilizzo delle immunoglobuline in corso di sepsi.

MONITORAGGIO DEL PAZIENTE SETTICO

La rivalutazione è di fondamentale importanza per la gestione di questi pazienti dopo la fase rianimatoria iniziale. Ciò include in genere un esame clinico approfondito e monitoraggio simultaneo delle variabili quali frequenza cardiaca, pressione sanguigna, produzione di urina, frequenza respiratoria. Si è tentato di definire degli obiettivi chiari per la rianimazione acuta e includendo la misurazione della pressione venosa centrale (CVP), la saturazione venosa centrale (SvO₂), l'acido lattico, la pressione arteriosa media (PAM) e l'output di urina. La valutazione della CVP è imprecisa e ritenuta inutile nel prevedere la risposta del paziente o meno alla somministrazione di liquidi per via endovenosa. La PAM rispecchia la perfusione negli organi e nei tessuti periferici e rappresenta uno degli obiettivi per la somministrazione sia di fluidi che di vasopressori. Specialmente nella sepsi, elevati livelli di lattati sono stati correlati all'aumento della mortalità. La clearance del lattato è stata anche suggerita come obiettivo per la rianimazione precoce, poiché una sua riduzione del 10% nelle prime 6 ore corrispondeva ad una riduzione dell'11% della probabilità di mortalità.^{55,56} Viceversa, ci sono prove deboli di una riduzione della mortalità quando la rianimazione viene guidata dal lattato.¹⁰⁹

Tre grandi studi recenti non hanno mostrato alcun beneficio sulla mortalità generale con l'utilizzo dei bundles rispetto alle cure abituali.^{27,91-93} Nonostante i progressi nella gestione della sepsi che hanno portato a un miglioramento della mortalità a breve termine, la prognosi per i pazienti che sopravvivono rimane ancora scarsa con i tassi di mortalità complessivi che sembrano non essere migliorati.

L'EMOGLOBINA LIBERA

L'emoglobina è un tetramero formato da 2 globine alfa e 2 globine beta, e un gruppo prostetico contenente ferro. Quest'ultimo è definito gruppo eme e consiste in 4 anelli di protoporfirina ognuno legato ad un atomo di ferro presente allo stato ferroso (Fe^{2+}). Durante lo sviluppo cambia le sue componenti globiniche da forme a maggiore affinità per l'ossigeno fino a quelle che ritroviamo nell'adulto. L'emoglobina è una molecola altamente conservata. Nei mammiferi, l'emoglobina svolge principalmente una funzione respiratoria nel rilascio di ossigeno e rimozione di anidride carbonica. L'emoglobina occupa il 30% del volume dei globuli rossi e rappresenta un efficace sistema di trasporto grazie alla proprietà allosterica e alla cooperatività indotta dal legame e dal rilascio di ossigeno. È il sistema di trasporto dell'ossigeno più importante e la sua concentrazione ematica è un indice della disponibilità di ossigeno. In corso di sepsi vari meccanismi inducono l'emolisi e questo comporta il rilascio di vari mediatori intracellulari, tra cui soprattutto l'emoglobina. Normalmente l'emoglobina libera nel plasma lega l'aptoglobina e ciò permette l'uptake, mediato dal recettore CD163, da parte dei macrofagi che grazie all'emeossigenasi(HO)-1 convertono l'eme in bilirubina la quale poi sarà escreta dal fegato. L'eme ferrico liberato invece, essendo facilmente dissociabile dalle globine nel plasma, si lega all'emopexina (HPX) e segue la stessa sorte.¹¹⁰ Infatti, le concentrazioni osservate di aptoglobina e di HPX, molecole scavenger dell'emoglobina, risultano marcatamente ridotte nello stato infiammatorio più severo rispetto a quello di grado lieve.¹¹¹ Larsen e colleghi in un loro studio definiscono i meccanismi molecolari del danno ossidativo e della pathway di morte cellulare sostenuti da alti livelli di emoglobina plasmatica, e sottolineano come il consumo o la mancanza dei sistemi antiossidanti del HPX e dell'OH-1 contribuiscano allo sviluppo di un quadro di sepsi severa nel modello animale proposto.¹¹² Se questi sistemi di eliminazione vengono saturati, l'emoglobina libera può essere considerata una molecola di danno a tutti gli effetti.

Prime osservazioni sul rilascio di emoglobina libera e la sua influenza sul metabolismo dell'ossido nitrico intravascolare (NO) dopo la trasfusione sono state descritte da Donadee e riconfermate successivamente, aggiungendo maggiore consapevolezza sul suo ruolo dannoso.⁷ Questo studio ha aperto la strada a Vermeulen Windsant e colleghi nel suggerire un ruolo dell'emoglobina libera come

scavenger di NO, il più importante vasodilatatore endogeno.¹¹³ In linea con lo studio precedente, l'aumento dei livelli di emoglobina libera nei pazienti con emolisi acuta e cronica è stato associato ad una ridotta biodisponibilità di NO nel letto microcapillare e ad una riduzione della perfusione con un aumento del danno d'organo.^{8,113-115} In più alti livelli di emoglobina libera hanno comportato una riduzione significativa della densità del microcircolo in pazienti settici sottoposti a emotrasfusione.

Uno dei prodotti della degradazione dell'eme da parte dell'eme ossigenasi (HO) è il monossido di carbonio (CO). Quest'ultimo è responsabile del mantenimento della perfusione regionale del fegato e dell'attivazione dei leucociti, oltre che il legame HO-1 / CO previene l'apoptosi sopprimendo le reazioni infiammatorie. In uno studio sull'infiammazione sistemica indotta da ischemia-riperfusion del modello dei roditori, è stato dimostrato che la CO esogena ha un effetto epatoprotettivo migliorando l'integrità delle cellule del fegato e lo stato redox, oltre a proteggere il microcircolo epatico.¹¹⁶

LA FEBBRE

Nei pazienti settici la febbre è molto eterogenea nelle sue presentazioni come le rispettive risposte immunitarie.³ La termoregolazione è strettamente legata al sistema immunologico. È stato dimostrato che l'innalzamento della temperatura migliora diversi parametri della funzione immunitaria, tra cui l'attivazione delle cellule T, la produzione di citochine e il potenziamento della funzione dei neutrofili e dei macrofagi.¹¹⁷ Le citochine rilasciate dalle cellule monocitiche svolgono un ruolo centrale nella genesi della febbre. Il TNF- α , IL-1 β e IL-6 sono mediatori alla base della risposta febbrile, mentre è dimostrato che IL-10 può svolgere un ruolo nella defervescenza della febbre. L'interazione tra queste citochine è complessa, si legano ai propri recettori specifici situati in prossimità della regione preottica dell'ipotalamo anteriore dove si attiva la fosfolipasi A2, con conseguente liberazione dell'acido arachidonico. I derivati dell'acido arachidonico sono mediatori dell'infiammazione, causano vasodilatazione ed aumento della permeabilità di membrana; essi sono coinvolti anche in diversi processi fisiopatologici: modulano l'aggregazione piastrinica, aumentano la sensibilità dei recettori periferici nocicettivi inducendo iperalgesia e agiscono da pirogeni endogeni. Il processo di pirogenesi si innesca a

seguito di un'aumentata sintesi di PGE2 e la PGD2 a livello ipotalamico (in risposta allo stato infiammatorio innescato da pirogeni esogeni come l'LPS).

Dopo la liberazione della prostaglandina E2, questa diffonde attraverso la barriera emato-encefalica, dove agisce per ridurre la velocità di scarica dei neuroni preottici sensibili al caldo, portando all'attivazione di risposte che riducono la dispersione e aumentano la produzione di calore.¹¹⁷ Le prostaglandine determinano un incremento del set-point di termoregolazione, con successiva attivazione dei meccanismi di termogenesi, vasocostrizione periferica e ridotta dispersione di calore, che nell'insieme producono un rialzo della temperatura corporea e febbre. Recentemente è stata descritta anche un pathway mediata dalle ceramidi: la citochina IL-1 β attiva la sfingomielinasi che incrementa la concentrazione di ceramidi nei neuroni dell'area preottica ipotalamica, con successivo incremento del setpoint della termoregolazione.¹¹⁸

Una temperatura corporea elevata può tuttavia essere associata anche a una serie di effetti deleteri, in particolare un aumento della gittata cardiaca, del consumo di ossigeno, della produzione di anidride carbonica e del dispendio energetico. Il consumo di ossigeno aumenta di circa il 10% per grado Celsius. Questi cambiamenti possono essere scarsamente tollerati nei pazienti con riserva cardiorespiratoria limitata.¹¹⁷

La febbre è presente più frequente nei pazienti con outcome migliore, mentre l'ipotermia lo è in quelli con esito infausto.¹¹⁹ Young et al.¹²⁰ hanno riportato che picchi di temperatura più elevati sono stati associati ad un tasso di mortalità in ospedale ridotto nei pazienti con infezione, mentre l'ipotermia è stata associata ad un aumento del tasso di mortalità. In un altro studio, i pazienti settici con ipotermia erano generalmente più anziani, con un indice di massa corporea inferiore e manifestavano una prevalenza di shock settico rispetto a quelli con temperatura corporea superiore a 38 °C.¹²¹ L'assenza di febbre è associata alla soppressione dell'espressione di HLA-DR, che suggerisce una disfunzione monocitaria in corso di sepsi, nonché peggiore outcome.¹²²

La febbre è associata ad un aumento della durata della degenza in unità di terapia intensiva e ad un esito peggiore in alcuni sottogruppi di pazienti. Sebbene la febbre possa attivare i sistemi fisiologici coinvolti nella clearance dei patogeni, causa un aumentare del consumo di ossigeno. Questo equilibrio, tra danni e benefici, deve essere preso in considerazione ogni volta che si decide di trattare o no la febbre in

un dato paziente. Tra gli antipiretici, il paracetamolo oltre che essere indicato per il trattamento a breve termine della febbre,^{9,10} ha dimostrato un'associazione protettiva con la mortalità in ospedale.¹²³

PARACETAMOLO

Il paracetamolo è un analgesico sintetico, non oppioide, ad azione centrale e antipiretico. Nel setting di terapia intensiva la somministrazione per via endovenosa è clinicamente giustificata dalla presenza di accessi venosi e mentre il dosaggio per il bambino è stabilito in base al peso del paziente, nell'adulto la dose dipende prevalentemente dai fattori di rischio che possono favorire l'insorgenza di danno epatico. Infatti, negli adulti con insufficienza epatocellulare, alcolismo cronico, malnutrizione cronica (basse riserve di glutathione epatico), disidratazione: La dose massima giornaliera non deve superare i 3 g.¹²⁴

Il paracetamolo riduce la febbre in 30 minuti dall'inizio della somministrazione con una durata dell'effetto antipiretico di almeno 6 ore.¹²⁴ Il suo effetto antipiretico si verifica tramite l'inibizione della cicloossigenasi-3 e la sintesi delle prostaglandine, all'interno del sistema nervoso centrale, ripristinando il centro di regolazione del calore ipotalamico⁹ e si traduce in vasodilatazione periferica, sudorazione e aumentata dissipazione del calore, che portano alla normalizzazione della temperatura corporea. Il paracetamolo inibisce in modo non selettivo la cicloossigenasi COX-1, l'isoforma costitutiva, e la cicloossigenasi COX-2, l'isoforma inducibile da stimoli infiammatori, che determina un'aumentata produzione di eicosanoidi in stati di flogosi acuta e cronica.

L'inibizione delle COX da parte del paracetamolo avviene in modo competitivo, attraverso il legame del farmaco alla porzione superiore del sito catalitico dell'enzima, ostacolando l'ingresso del substrato naturale, ovvero l'acido arachidonico, nel sito attivo. Il meccanismo d'azione è influenzato e fortemente ridotto in presenza di perossidi, le cui concentrazioni sono generalmente elevate nel sito infiammatorio mentre sono minime nel sistema nervoso centrale; ciò spiega perché l'efficacia del farmaco sia maggiore a livello centrale, mentre minore è l'effetto antinfiammatorio del paracetamolo rispetto ai FANS. Da un punto di vista molecolare, l'inibizione dell'attività delle COX si riflette nel blocco a cascata della conversione dell'acido arachidonico in prostaglandina G₂, della PG₂ in PH₂, ed in

ultimo nel blocco della sintesi di prostaglandine, prostaciline e trombossani da parte di isomerasi tessuto specifiche.⁹

CONTROINDICAZIONI	
ASSOLUTE	RELATIVE
In pazienti con ipersensibilità al paracetamolo o ad uno qualsiasi degli eccipienti	L'uso concomitante di anticoagulanti orali può indurre leggere variazioni nei valori INR.
In caso di grave insufficienza epatocellulare non superare dosaggi raccomandati	Grave compromissione della funzione renale (clearance della creatinina ≤ 30 ml/min)

Tab. 6 : Controindicazioni alla somministrazione di paracetamolo

FARMACOCINETICA

La farmacocinetica del paracetamolo è lineare fino a 2 g dopo singola somministrazione e dopo somministrazioni ripetute nell'arco di 24 ore.¹²⁴ La farmacocinetica e il metabolismo del paracetamolo non sono modificati nei soggetti anziani, per cui non è necessario un aggiustamento posologico.¹²⁴ L'emivita plasmatica è di 2,7 ore e la clearance totale corporea è di 18 l/h, mentre la concentrazione plasmatica massima (C_{max}) del paracetamolo osservata alla fine di una infusione di endovenosa di 500 mg e 1 g in 15 minuti è, rispettivamente, di circa 15 µg/ml e 30 µg/ml.¹²⁴ Il volume di distribuzione del paracetamolo è approssimativamente 1 l/kg e non si lega alle proteine plasmatiche. A seguito dell'infusione di 1 g di paracetamolo, sono state osservate significative concentrazioni (circa 1,5 µg/ml) nel liquido cefalo-rachidiano dopo 20 minuti dall'infusione.¹²⁴

METABOLISMO

Il paracetamolo è metabolizzato principalmente nel fegato seguendo due vie epatiche maggiori: coniugazione con acido glucuronico e coniugazione con acido solforico.¹²⁴

La glucuronidazione è catalizzata dalle UDP-glucuronosyl transferases (UGT) che trasferiscono un gruppo glucuronico al paracetamolo convertendolo in APAP-Gluc, il quale verrà escreto tramite le urine. Nei casi di intossicazione da paracetamolo, è stata osservata un'aumentata espressione dei trasportatori di efflusso, come probabile meccanismo adattivo e di compenso per favorire l'eliminazione del metabolita tossico dagli epatociti. Le isoforme enzimatiche attivate sono UGT1A6 per basse concentrazioni e la UGT1A1 e UGT1A9 per concentrazioni tossiche.

Le sulfotransferasi (SULT), in particolare le isoforme SULT1A1 e SULT1A3, sono gli enzimi citosolici che convertono il paracetamolo in coniugato sulfonato, anch'esso eliminato per via urinaria. Se l'assunzione del farmaco avviene a dosi superiori rispetto a quelle raccomandate di 4g/die, il pathway di solfatazione viene rapidamente saturata, al contrario le vie di glucuronidazione e l'ossidazione risultano incrementate, e si riduce la quota di farmaco direttamente eliminata. A dosaggi tossici, perfino il processo di glucuronidazione va incontro a saturazione, ne risulta un aumento del NAPQI (N-acetil benzochinoneimina) e delle frazioni escrete nelle urine immodificate.

Una piccola frazione (attorno al 5%¹²⁴) va incontro a reazioni di fase I di ossidazione del paracetamolo a NAPQI è catalizzata dalla famiglia dei CYP450. Questo metabolita tossico viene rapidamente detossificato dal glutathione ridotto ed eliminata nelle urine dopo coniugazione con cisteina e acido mercaptourico. Tuttavia, nei sovradosaggi massicci, come anche alcune condizioni cliniche obesità, steatosi epatica e digiuno prolungato, possono causare una deplezione delle riserve di glutathione e attivare il pathway ossidativo, con aumentata produzione ed accumulo di NAPQI. la quantità di questo metabolita tossico è aumentata. Diverse sono isoforme contribuiscono alla bioattivazione, in funzione della concentrazione del farmaco. Il primo enzima microsomiale identificato nel metabolismo ossidativo del APAP è stato il CYP2E1, altri citocromi coinvolti sono CYP1A2, CYP3A4 e CYP3A5.

Il paracetamolo viene metabolizzato anche in p-aminofenolo in una reazione di deacetilazione, catalizzata dall'enzima N-deacetylase.

ELIMINAZIONE

Come anticipato, i metaboliti del paracetamolo sono escreti principalmente nelle urine. Il 90% della dose somministrata è escreto in 24 ore, per lo più in forma glucoronidata (60-80%) e sulfoconiugata (20-30%). Meno del 5% è eliminato in forma immodificata.¹²⁴ I metaboliti del paracetamolo possono essere eliminati tramite le urine o nella bile. La via di eliminazione dipende dal tipo di trasportatore a cui il metabolita si lega. I trasportatori appartengono alle superfamiglie di solute carrier transporters (SLC) e ATP-binding cassette (ABC) transporters. Dei coniugati glucoronidati e solfati, prodotti a livello epatico, la maggiorparte viene trasportata nel torrente ematico fino al rene legata al ABCC3 transporter, per essere escreta attraverso le urine, mentre una piccola frazione viene eliminata nella bile per interazione con ABCC2 and ABCG2 carriers. Nei soggetti con insufficienza renale con clearance della creatinina tra 10 e 30 ml/min, l'eliminazione di paracetamolo è leggermente ritardata, con un'emivita di eliminazione compresa tra 2 e 5,3 ore.¹²⁴ Per i glucuroconiugati e i sulfoconiugati, la velocità di eliminazione è 3 volte più lenta nei soggetti con grave compromissione renale rispetto a soggetti sani. Perciò si raccomanda di aumentare l'intervallo minimo tra due somministrazioni a 6 ore quando il paracetamolo viene somministrato a pazienti con grave compromissione renale (clearance della creatinina ≤ 30 ml/min).¹²⁴

EFFETTI INDESIDERATI		
In casi rari (più di un paziente su 10.000)	In casi molto rari (meno di un paziente su 10.000, inclusi i casi isolati)	In casi isolati
Malessere Calo della pressione Aumento anomalo dei livelli degli enzimi epatici	Eruzione cutanea severa Reazioni allergiche	Diminuzione anomala dei livelli di piastrine, globuli bianchi, con possibili manifestazioni emorragiche; Sono stati segnalati casi di rossore della pelle, arrossamento, prurito e accelerazione anomala del battito del cuore. Sono stati segnalati casi di dolore e sensazione di bruciore alla sede di somministrazione
Necessario monitoraggio esami ematici	Interrompere il trattamento immediatamente	Analisi regolari del sangue

Tab. 7 : Effetti Indesiderati dovuti alla somministrazione di paracetamolo

EPATOTOSSICITÀ DA PARACETAMOLO

Il paracetamolo è una delle principali cause di insufficienza epatica acuta (ALF).¹³

Il NAPQI è il metabolita reattivo, epatotossico del paracetamolo. Il suo accumulo in caso di intossicazione da paracetamolo è responsabile del danno epatico. In condizioni di compenso, l'organismo provvede alla sua eliminazione tramite l'azione del glutathione (GSH), principale sistema antiossidante cellulare. La reazione, spontanea o catalizzata dalla glutathione-S-transferases (GSTs), permette la formazione del coniugato del glutathione, ovvero il complesso APAP-GSH, la successiva ossidazione del glutathione stesso in GSSG e il rilascio del coniugato di cisteina (APAP-cys), che verrà eliminato nelle urine. Tuttavia, anche alcune condizioni cliniche, quali obesità, steatosi epatica e digiuno prolungato, possono causare una deplezione delle riserve di glutathione e attivare il pathway ossidativo, con aumentata produzione ed accumulo di NAPQI.¹³

L'ALF può manifestarsi con esordio precoce dopo massiccio sovradosaggio dove si forma una grande quantità di NAPQI che inibisce la funzione mitocondriale. In questa circostanza il metabolita reagisce con i gruppi cisteinici delle proteine cellulari; in particolar modo esso si lega alle proteine mitocondriali e ai canali ionici, causandone la disfunzione, seguita da alterazione della fosforilazione ossidativa e dissipazione dell'energia, squilibrio ionico fino a morte cellulare.

Un'altra manifestazione dell'epatotossicità da paracetamolo, più subdola, si presenta in genere dopo il 2° giorno dal sovradosaggio e deriva dall'ipossia tissutale e dalla riduzione della clearance epatica del lattato nei soggetti con ALF.¹³

Diversi fattori, come il consumo o l'abuso di alcol concomitante, i farmaci concomitanti, i fattori genetici e lo stato nutrizionale, possono influenzare la suscettibilità e la gravità dell'epatotossicità da paracetamolo.¹³ Tra i farmaci (Fig. 11) ricordiamo principalmente quelli che rappresentano altri substrati degli enzimi che metabolizzano il paracetamolo. Nel particolare i substrati del CYP3A4 e CYP3A5 oltre al paracetamolo sono Alprazolam, amlodipina, atorvastatina, ciclosporina, diazepam, estradiolo, simvastatina, verapamil, e zolpidem.

Alcuni farmaci riducono il metabolismo del paracetamolo e vengono definiti inibitori. Con il termine inibitore enzimatico si indica una molecola in grado di instaurare un legame chimico con un enzima, diminuendone così l'attività. Al contrario, altri farmaci definiti induttori sono molecole con effetto stimolante

sull'attività degli enzimi epatici che partecipano al metabolismo di altre sostanze farmacologiche.

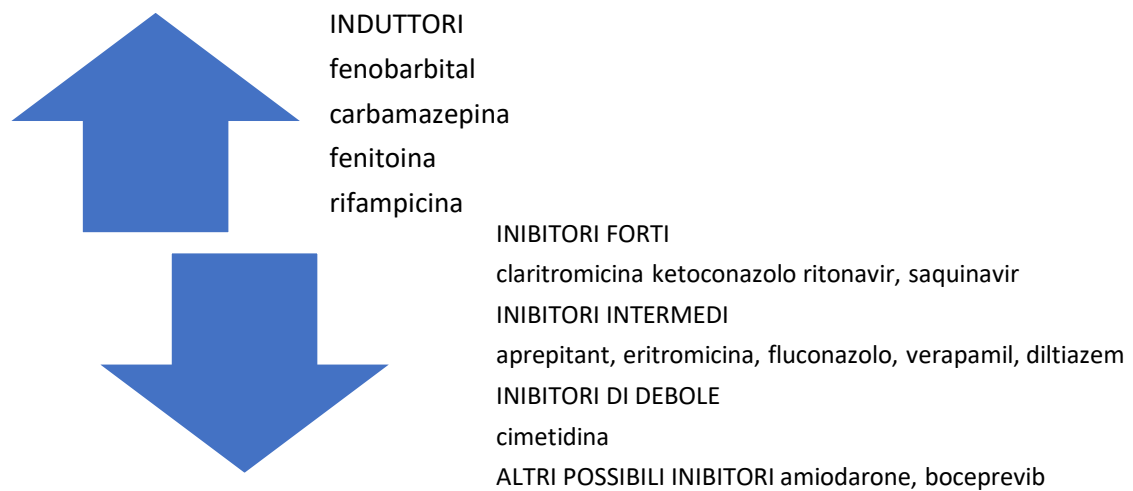


Fig. 11 : Farmaci induttori e inibitori del metabolismo del paracetamolo

Da un punto di vista laboratoristico l'epatotossicità acuta da paracetamolo si manifesta come un'elevazione sierica di alanina aminotransferasi ($ALT > 3000$ IU/L) che si presenta in 24 -36 ore e presenta un picco a 72 ore dopo l'overdose e correla con il danno epatocellulare. L'aspartato aminotransferasi (AST) può raggiungere valori superiori a 10000 IU/L e spesso maggiore delle ALT. I livelli di lattato rappresentano un marker prognostico negativo.¹²⁵ L'insufficienza renale acuta si sviluppa nel 10-25% dei pazienti con epatotossicità significativa e si riscontra in oltre il 50% di quelli con ALF. La prognosi dei pazienti con ALF indotta da paracetamolo è migliore rispetto a quella dovuta a altre cause di ALF, di conseguenza, il trapianto di fegato rappresenta un'opzione terapeutica nei casi più gravi. I criteri del King's College (Tab.8), sono utili per inquadrare la severità della condizione e riconoscere il danno epatico indotto o meno da paracetamolo.¹³

CRITERI DEL KING'S COLLEGE			
INDOTTA DA PARACETAMOLO		NON INDOTTA DA PARACETAMOLO	
pH arterioso <7,3		PT >100s ○ INR>6.5, indipendentemente dal grado di encefalopatia	
○ lattato nel sangue> 3 mg / dL (0,33 mmol / L); dopo 12 ore dalla fluid resuscitation, indipendentemente dal grado di encefalopatia		○ 3 parametri tra i seguenti :	
○ Lattato di sangue> 3,5 mg / dL (0,39 mmol / L); dopo 4 ore dalla fluid resuscitation, indipendentemente dal grado di encefalopatia		Età <11 e >40	
○ tre dei seguenti:		Esclusione di epatite A o B o da alcol o da reazione idiosincrasica a farmaci	
	Encefalopatia di grado III o IV	durata ittero >7 gg dall'insorgenza dell'encefalopatia	
	PT > 100 s (o INR> 6.5)	PT >50s (INR>3.5)	
	Creatinina sierica> 3,4 mg / dL (o> 300 mmol / L)	Bilirubina > 17 mg/dl	

Tab. 8 : Criteri del King's College per la valutazione dell'epatotossicità indotta da paracetamolo; Tempo di protrombina(PT); international normalized ratio (INR)

BACKGROUND

La risposta immunitaria contro gli agenti patogeni comporta la produzione di elevate quantità di specie reattive dell'ossigeno(ROS). Queste causano un fenomeno definito “stress ossidativo” che danneggia le cellule dell'ospite sia a livello di membrana, determinandone la perossidazione lipidica dei componenti, che a livello nucleare con danno del DNA.⁴ Anche i globuli rossi in corso di sepsi subiscono questa sorte⁵ e l'ossiemoglobina rilasciata dalle emazie reagisce con l'ossido nitrico prodotto dall'endotelio in risposta al danno⁶. Questa evenienza si espleta in maniera estremamente rapida ed irreversibile con un trend dose dipendente, suggerendo che l'emoglobina libera abbia un ruolo scavenger dell'ossido nitrico.^{7,8} Anche se il paracetamolo è indicato per il trattamento della febbre,^{9,10} a normali concentrazioni terapeutiche, è un potente inibitore della perossidazione lipidica, suggerendo l'ipotesi che possa avere un ruolo protettivo nel danno da ROS attribuibile all'emoglobina libera.¹¹ Il paracetamolo è metabolizzato principalmente nel fegato seguendo due vie epatiche maggiori: coniugazione con acido glucuronico e coniugazione con acido solforico. Una piccola frazione è metabolizzata dal citocromo P450 in un intermedio reattivo che, in normali condizioni, viene rapidamente rimossa dal glutathione ridotto ed eliminata nelle urine dopo coniugazione con cisteina e acido mercaptourico. L'eliminazione dei metaboliti del paracetamolo sono escreti principalmente nelle urine. Alcuni dei polimorfismi di UGT1A e CYP3A5 presenti nella popolazione potrebbero influenzare sulla formazione e l'eliminazione di questi metaboliti.^{13,14}

IL DANNO DA EMOGLOBINA LIBERA

Alti livelli di emoglobina libera sono stati associati ad outcome sfavorevole e complicanze gravi tra le quali insufficienza renale acuta ed infarto miocardico.^{113,126}

Nel momento in cui si saturano i suoi sistemi scavenger, l'emoglobina libera e i suoi derivati possono indurre molti effetti citotossici, infiammatori e ossidanti che

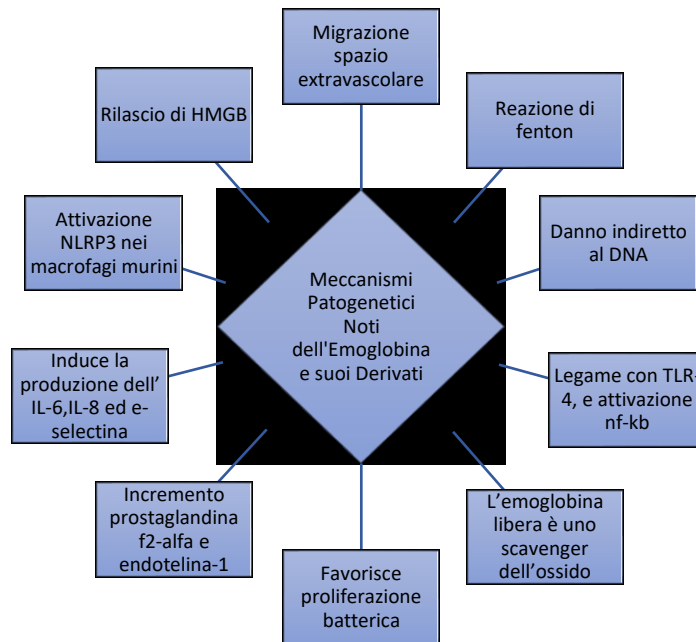


Fig. 12 : Meccanismi Patogenetici noti del danno da Emoglobina libera

influiscono negativamente sulla funzione endoteliale¹²⁷ (Fig. 12). Questi meccanismi di tossicità includono: la capacità dell'emoglobina libera di eliminare l'ossido nitrico e indurre vasocostrizione vascolare, attivazione dei neutrofili, danno endoteliale,¹²⁷ e la capacità dell'emoglobina libera di sottoporsi a cicli redox che portano all'ossidazione delle membrane lipidiche e al rilascio di isoprostani F2.¹¹

Queste interazioni dell'ossido nitrico con l'emoglobina nei mammiferi hanno suscitato grande interesse, poiché la reazione dell'ossido nitrico con le grandi quantità di ossiemoglobina intravascolare (16 g / dL) è rapida (107 M-1s-1) e irreversibile, ma fortunatamente, limitata dalla compartimentazione dell'emoglobina all'interno dell'eritrocita. Il danno ossidativo indotto dall'effetto scavenger del NO e dalla perossidazione lipidica di membrana, entrambi mediati dall'emoglobina libera plasmatica, determina nel paziente settico: esacerbazione dell'infiammazione, rilascio dell'eme e del Ferro che possono promuovere la crescita batterica, danno tissutale irreversibile con progressione fino alla disfunzione d'organo.¹²⁸ Infatti, l'ossido nitrico è un regolatore del tono della muscolatura liscia e dell'attivazione piastrinica e la riduzione dei livelli plasmatici di ossido nitrico porta a distonie muscolari lisce, tra cui ipertensione, contrazioni gastrointestinali e disfunzione erettile, nonché formazione di coaguli.¹²⁷

A sostegno della centralità della FreeHb nella patogenesi della sepsi, studi clinici e preclinici hanno ampiamente dimostrato che infusioni di aptoglobina o di

emopexina riducono considerevolmente gli effetti della tossicità eme-mediata, aprendo a nuove possibilità terapeutiche¹¹² Larsen e colleghi hanno studiato in un modello animale di sepsi l'effetto dell'emoglobina plasmatica nel promuovere il danno tissutale e nella progressione dello stato settico in due gradi diversi di infiammazione. A conferma di tutto ciò, in uno studio su topi, la somministrazione di emoglobina libera ha contribuito alla patogenesi della sepsi severa indipendentemente dal tipo di infezione primaria.¹²⁸ È stato osservato che l'emoglobina infusa nei ratti è stata escreta principalmente dai reni.¹²⁹ Studi in vivo sulla nefrotossicità dei sostituti del sangue a base di emoglobina sembrano confermare che la forma non modificata è nefrotossica,¹³⁰ a sostegno dell'importanza del ruolo degli scavenger. Inoltre, in base alle osservazioni di Janz e colleghi i pazienti con concentrazioni di emoglobina libera più elevate avevano più probabilità di andare incontro ad outcome sfavorevole,¹¹ evidenza confermata da successivi studi clinici.¹³¹ Alla luce di queste evidenze, Adamki e colleghi hanno valutato a fini prognostici la concentrazione plasmatica di emoglobina libera nel paziente settico rispetto ai criteri clinici validati di prognosi (SOFA score, SAPS II, procalcitonina): i livelli della molecola dosati in prima giornata si sono dimostrati fattori prognostici indipendenti di outcome clinico, mentre non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti per considerarla un nuovo biomarker per porre diagnosi di sepsi.¹³²

Evidenze recenti indicano che l'eme è un forte attivatore con trend dose-dipendente del complemento attraverso l'attivazione della via alternativa, inducendo uno stato protrombotico importante nel sangue intero umano a causa dell'interazione tra TLR/CD14.¹³³

IL RUOLO DEL PARACETAMOLO NELLA SEPSI

L'induzione della febbre è mediata dal rilascio di citochine pirogeniche, queste sono coinvolte nell'attivazione immunologica e nella reazione contro i patogeni. I trattamenti per l'iperpiressia possono essere utilizzati per ridurre il tasso metabolico e quindi la domanda di ossigeno. La riduzione della febbre però, potrebbe ridurre la capacità del paziente di sviluppare un'efficace risposta e questo equilibrio, tra danno e beneficio, deve essere preso in considerazione ogni volta che decidiamo di trattare o no la febbre.⁹

L'effetto antipiretico non è l'unico effetto del paracetamolo che a normali concentrazioni terapeutiche, è un potente inibitore della perossidazione lipidica mediata dall'eme. Questo avviene grazie alla sua capacità di ridurre il radicale ferril-protoporfirina generato dal rilascio di emoproteine nella circolazione. In studi sperimentali sui ratti, il paracetamolo è risultato molto efficace nella prevenzione del danno ossidativo e dell'insufficienza renale dovuta alla rhabdomiolisi¹³⁴. Adamzik e colleghi hanno osservato che in una piccola coorte di 20 pazienti, ai quali è stata eseguita l'analisi degli isoprosteni F2, un marker di stress ossidativo, i pazienti che hanno ricevuto paracetamolo avevano un livello significativamente più basso di isoprosteni F2 con un trend di tipo dose-dipendente.¹³² Successivamente Janz e colleghi hanno proposto prima uno studio osservazionale retrospettivo e poi uno studio randomizzato controllato con placebo sul paracetamolo per la riduzione del danno ossidativo nei pazienti settici. Nello studio osservazionale retrospettivo, i pazienti deceduti presentavano un livello più elevato di emoglobina libera, mentre in quelli che hanno ricevuto paracetamolo, sembra che il farmaco sia un fattore protettivo nei confronti della mortalità in ospedale. La somministrazione di paracetamolo è stata associata in modo indipendente a una diminuzione della mortalità ospedaliera.¹¹ Nel piccolo studio randomizzato controllato, i pazienti che hanno ricevuto il paracetamolo, presentavano un picco piretico inferiore e il livello di isoprosteni F2 si è ridotto al giorno 2. La creatinina, utilizzato come marker della funzione renale, era inferiore al 3° giorno nel gruppo di trattamento. Queste osservazioni di Janz e colleghi hanno suggerito che negli adulti con grave sepsi e emoglobina libera rilevabile nel plasma, il trattamento con paracetamolo entro 24 ore dall'ammissione in terapia intensiva può ridurre lesioni ossidative e migliorare la funzione renale.¹³⁵

I POLIMORFISMI DEL PARACETAMOLO

Polimorfismi genetici potrebbero predisporre alcuni individui a sviluppare ALF. Nello studio di Court e colleghi sono state individuate le prevalenze dei genotipi tra i pazienti che avevano sviluppato ALF da sovradosaggio di paracetamolo per diverse cause. I polimorfismi includevano quelli dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel metabolismo del paracetamolo, quindi: UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B15, SULT1A1, CYP2E1 e CYP3A5.¹⁴

Sappiamo che le isoforme enzimatiche coinvolte nella glucuronidazione sono UGT1A6 per basse concentrazioni e la UGT1A1 e UGT1A9 per concentrazioni tossiche. I fenotipi UGT1A1 codificati da alleli di tipo wild (C/C) sono classificati come glucuronidatori veloci in base ai livelli plasmatici di paracetamolo glucuronidato. Mentre i soggetti con alleli omozigoti mutanti (G/G, T/T) sono stati identificati come fenotipo lento. Gli individui con alleli eterozigoti sono stati classificati come glucuronidatori intermedi.¹³⁶ In uno studio non è stata rilevata un'associazione tra il rapporto metabolico e il livello sierico di bilirubina sostenendo che non ci sia correlazione tra la capacità di glucuronidazione del paracetamolo, e il livello sierico della bilirubina.¹³⁷ A sostegno di ciò, La prevalenza di UGT1A1 è stata significativamente inferiore nei pazienti con insufficienza epatica acuta per overdose accidentale di paracetamolo rispetto ai pazienti con insufficienza epatica acuta dovuta ad altre cause o a una popolazione di razza o etnia simili.¹³⁸

Un altro polimorfismo, UGT2B15, è stato identificato come determinante di una minor clearance del paracetamolo mediante glucuronidazione e concentrazioni del metabolita in circolo più elevate in tutte le etnie.¹³⁹

Uno studio più recente di Court e colleghi i valori di clearance totale o dei metaboliti del paracetamolo non differivano tra i sessi, anche se sono stati osservati valori di emivita plasmatica più brevi (dell'11-14%; P, 0,01) per paracetamolo, paracetamolo glucuronide e paracetamolo solfato nelle donne rispetto agli uomini. Rispetto le differenze etniche invece, la clearance totale di paracetamolo e clearance metabolica parziale mediante glucuronidazione e la solfatazione sono simili. Tuttavia, l'etnia africana presenta un metabolismo del paracetamolo mediante ossidazione più lenta rispetto all'etnia europea. Questa differenza potrebbe essere parzialmente spiegato dal polimorfismo CYP2E1, più diffuso in questa etnia.¹³⁹

Negli studi sulla prevalenza dei genotipi tra i pazienti che avevano sviluppato ALF da sovradosaggio di paracetamolo di Court e colleghi gli individui che presentavano CYP3A5 erano molto rappresentati, scoperta coerente con la bioattivazione avanzata del paracetamolo da parte dell'enzima CYP3A5. Di conseguenza richiedono ulteriori approfondimenti in quanto potenziali marcatori genomici del rischio aumentato di ALF indotto da paracetamolo.¹⁴

MATERIALI E METODI

DISEGNO DI STUDIO

Lo studio clinico prospettico osservazionale “Emoglobina libera circolante e microcircolo dopo somministrazione di paracetamolo nel paziente settico febbrile” si colloca all’interno di un Progetto Strategico di Ateneo, interdisciplinare, che prevede la collaborazione di differenti competenze, non solo cliniche, ma anche farmacologiche e biologiche-biochimiche.

DURATA STUDIO

La fase di reclutamento è iniziata a Luglio 2017 e terminata a Giugno 2019

NUMEROSITÀ CAMPIONE

50 pazienti affetti da sepsi o shock settico ricoverati in Unità di Terapia Intensiva.

CRITERI INCLUSIONE

- Pazienti con sepsi o shock settico (secondo le definizioni Sepsis-2¹, del *Secondo consensus* ²¹)
- Febbrili (temperatura corporea superiore a 38°C)
- Necessitano di somministrazione di paracetamolo a scopo antipiretico, secondo giudizio clinico.

I pazienti devono inoltre presentare un monitoraggio invasivo in continuo della pressione arteriosa e un catetere venoso centrale in sede.

CRITERI DI ESCLUSIONE

- Età < 18 anni
- Gravidanza
- Emodialisi
- Emolisi franca del campione ematico
- Uso del paracetamolo nelle 12 ore precedenti

- Condizioni che pregiudicano la possibilità di ottenere un monitoraggio del microcircolo
- sublinguale come gravi traumi maxillo-facciali, impossibilità alla sublussazione della
- mandibola, abbondanti perdite ematiche o secrezioni dal cavo orale.
- Elevati indici di danno epatico

SETTING

Clinica di Anestesia e Rianimazione Generale, Respiratoria e del Trauma Maggiore della Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona.

ASPETTI ETICI

Questo studio osservazionale è condotto nel rispetto dei principi della dichiarazione di Helsinki (ultima revisione: Edimburgo, ottobre 2000) e non prevede procedure che non facciano parte della comune pratica clinica. la Dichiarazione di Helsinki come dichiarazione di principi etici per la ricerca medica che coinvolge soggetti umani, compresa la ricerca su materiali e dati umani identificabili.

CONSENSO INFORMATO

La procedura di consenso informato scritto viene sottoposta all'attenzione di tutti i pazienti nei quali sono presenti i criteri di inclusione allo studio e non sono evidenziabili criteri di esclusione.

Nel caso in cui le condizioni cliniche del paziente non consentano la comprensione delle informazioni e la richiesta diretta del consenso scritto, una volta determinato lo stato d'emergenza ed in assenza di volontà contraria precedentemente espressa dal paziente, il consenso viene ottenuto interpellando un rappresentante legale o, in mancanza di questo e laddove la tempestività di intervento lo renda necessario, da altri soggetti legalmente riconosciuti come tali che possano tempestivamente ricoprire tale ruolo con una presa d'atto (in accordo alla normativa vigente, alle GCP ed alle Linea guida CNB del 28/09/2012). In questi casi, è prevista una procedura di "Consenso differito" da parte del paziente.

I pazienti hanno la possibilità di astenersi dall'essere sottoposti a test genetici pur

partecipando alla parte non genetica della sperimentazione, l'informativa riguardante il sottostudio di genetica e la rispettiva richiesta di consenso informato sono presentate in moduli separati.

Il disegno dello studio prevede il reclutamento di 50 pazienti affetti da sepsi o shock settico e in stato febbrile, che richiedano su giudizio clinico la somministrazione di paracetamolo a scopo antipiretico. Verificati i criteri di esclusione e accertati i criteri di inclusione, ottenuta la presa d'atto dell'avente diritto oppure firmato il consenso informato da parte del paziente o del suo legale rappresentante, si procedeva con l'attuazione del protocollo di studio.

La fase di reclutamento prevede la valutazione di parametri clinici e macroemodinamici, del microcircolo e della perfusione tissutale a tre diversi timepoint:

- T0 (pre-somministrazione di paracetamolo),
- T1 (a 30 minuti dalla fine della somministrazione),
- T2 (a due ore dalla fine dell'infusione).

RACCOLTA DATI

Per ciascun paziente reclutabile, si raccolgono dati anagrafici, clinici ed anamnestici e si calcolano i principali score clinici Glasgow Coma Scale(GCS), Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score, Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation(APACHE) II all'ingresso in terapia intensiva.

Nel dettaglio:

- Età;
- Peso;
- Sesso;
- Comorbidità acute e croniche;
- Sede dell'infezione, nota o sospetta;
- Esiti degli esami microbiologici;

PROCEDURE AI DIVERSI TIMEPOINT

Al Reclutamento si registrano:

- Emocromo completo;
- Indici di funzionalità e necrosi epatica;
- Indici di funzionalità renale e diuresi;
- Procalcitonina e terapia antibiotica in atto.

Ad ogni timepoint, si registrano:

- Temperatura
- Principali parametri emodinamici come Pressione arteriosa sistolica(PAS), Pressione arteriosa diastolica(PAD), Pressione arteriosa media(PAM), Frequenza Cardiaca(FC):
 - Si indica inoltre l'eventuale sostegno del circolo con vasopressori e la presenza di un monitoraggio emodinamico, specificandone i parametri quali:
 - Cardiac Index [CI],
 - Global End Diastolic Index [GEDI],
 - Extra vascular Lung Water Index [ELWI],
 - Systemic Vascular Resistance Index [SVRI],
 - Stroke Volume Variation [SVV]).
- Positive end-expiratory pressure (PEEP) e FiO2 nei pazienti con Ventilazione meccanica.

Per quanto riguarda le rilevazioni strumentali e i prelievi da vie invasive già presenti:

- Al T0 si esegue generalmente un prelievo ematico che servirà per la successiva analisi genomica.
- A T0 prima della somministrazione del farmaco, T1 a 30 minute dalla somministrazione, T2 a 2 ore dalla somministrazione:
 - Parametri microcircolo in vivo
 - prelievo di sangue arterioso per il dosaggio dei livelli di paracetamolo.
 - Near Infrared Spectroscopy (NIRS) con vascular occlusion test (VOT)
 - Dosaggio farmaci vasoattivi
 - Emogas Analisi(EGA) arteriosa e venosa

- Durante i T0 e T2 si raccolgono due campioni di sangue arterioso per le successive analisi della concentrazione della FreeHb e dei marker di danno endoteliale.

GESTIONE DEI CAMPIONI PRELEVATI

T0						T1			T2				
PARACETAMOLO	GENETICA	PLASMA	SIERO	EGA ART	EGA VEN	PARACETAMOLO	EGA ART	EGA VEN	PARACETAMOLO	PLASMA	SIERO	EGA ART	EGA VEN

1. Il prelievo ematico che serve per l'analisi genomica viene prelevato a T0
2. Il prelievo di siero, per la rilevazione della concentrazione di emoglobina libera e marker endoteliali viene prelevato in due tempi (T0 e T2), immediatamente centrifugati a 4000 giri per 15 minuti.
3. Il prelievo di plasma, per la rilevazione della concentrazione di emoglobina libera e marker endoteliali, viene prelevato in due tempi (T0 e T2), immediatamente centrifugati a 4000 giri per 10 minuti.

I campioni ematici relativi allo studio farmacogenetico dei polimorfismi indagati vengono conservati a -80°C presso la Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università Politecnica delle Marche per un totale di 5 anni dal termine dello studio.

ESTRAZIONE DNA E POLIMORFISMI

L'analisi dei polimorfismi genetici è possibile solo dopo estrazione del DNA. Questa viene eseguita secondo il protocollo del Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen) e prevede 4 fasi:

- lisi delle cellule del campione,
- legame del DNA genomico del lisato cellulare alla membrana del kit,
- lavaggio della membrana,
- eluizione del DNA genomico.

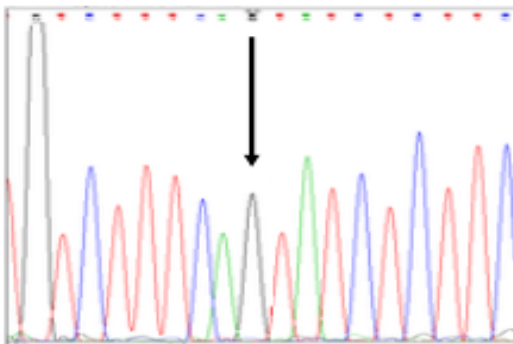
Il DNA estratto viene dapprima quantificato mediante spettrofotometro Nanodrop e successivamente amplificato. L'amplificazione viene eseguita con due metodiche:

1. tecnica rt-PCR : metodica biologia molecolare che opera cicli di amplificazione
2. sequenziamento diretto: richiede la progettazione di un primer specifico per l'intorno del polimorfismo che si vuole studiare

Genotipizzando i polimorfismi in esame, è possibile osservare le varianti alleliche dei geni di nostro interesse (eterozigosi o omozigosi) osservabili come:

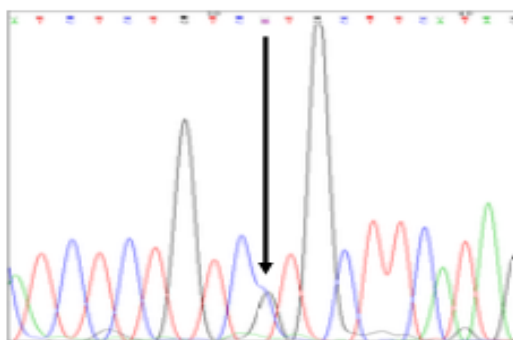
- Genotipo wt (wild type) in omozigosi è visibile un solo picco in corrispondenza di ciascun nucleotide.

Nell'esempio: omozigosi wt GG del CYP3A4



- Genotipo mutato in eterozigosi si può osservare una sovrapposizione di due picchi differenti in corrispondenza del nucleotide mutato.

Nell'esempio: eterozigosi CG del UGT1A



Nel nostro lavoro sono stati presi in esame due polimorfismi:

- CYP3A5 (rs:776746) che consiste nella sostituzione di una guanina con una adenina. Il genotipo in eterozigosi presenta una maggiore attività metabolica

ossidativa, con riduzione dell'emivita plasmatica del paracetamolo e maggiore formazione del metabolita epatotossico NAPQI.

- UGT1A1 (rs:8330) che prevede la sostituzione di una citosina con una guanina all'UTR al 3'; la via metabolica di glucuronidazione risulta maggiormente attivata, ed essendo questa il pathway principale del metabolismo del paracetamolo, quando assunto a concentrazioni terapeutiche, l'effetto atteso è quello di diminuzione dell'emivita e di una maggiore riduzione nei livelli del farmaco tra i vari tempi rispetto ai soggetti wildtype.

DOSAGGIO EMOGLOBINA LIBERA PLASMATICA

I livelli plasmatici di emoglobina libera plasmatica sono analizzati con la metodica della cianometemoglobina, che prevede l'impiego del reagente Drabkin's. La metodica consta di tre step:

1. Si aggiungono 20µl di plasma di ciascun campione (2 campioni per singolo paziente, rispettivamente "plasma al T0" e "plasma al T1") a 5ml della soluzione del reagente, il quale è in grado di convertire la metaemoglobina in cianometemoglobina in una reazione foto sensibile di 15 minuti.
2. Per ognuna delle soluzioni ottenute si prelevano delle aliquote, successivamente pipettate sulla piastra. Questa viene quindi posta nello spettrofotometro e si esegue una lettura alla lunghezza d'onda di 540 nm.
3. I valori di assorbanza così ottenuti vengono convertiti in valori concentrazione plasmatica di FreeHb espressi in mg/ml, grazie alla costruzione di una curva di riferimento.

Quest'ultima è ottenuta attraverso la formazione di soluzioni a diluizione crescente dello standard emoglobinico.

ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica della popolazione in studio sono stati utilizzati i pacchetti software Graphpad Prism, versione 6.0 ed il software IBM SPSS statistic, Versione 17.0. Sono state quindi applicate metodiche analisi descrittiva ed inferenziale scelte sulla base della numerosità campionaria e delle modalità di distribuzione delle variabili in studio. Le variabili qualitative sono state espresse con un numero (%). Le variabili quantitative, sulla base della distribuzione gaussiana o non gaussiana delle stesse, sono espresse in media (Standard Deviation, SD) o mediana (Interquartile Range, IqR).

L'analisi univariata delle variabili dipendenti nei confronti della variabile indipendente sono stati eseguiti attraverso test U di Mann-Whitney, mentre nel confronto temporale per misure ripetute è stato eseguito un Test di Friedman della varianza per ranghi con Dunn's post hoc test, considerata la distribuzione non normale delle variabili interessate. $P < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative

RISULTATI

Lo studio ha previsto l'arruolamento di 50 pazienti nell'intervallo temporale da Luglio 2017 a Giugno 2019, ricoverati presso Clinica di Anestesia e Rianimazione Generale, Respiratoria e del Trauma Maggiore della Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, raggiungendo la numerosità campionaria finale prevista. Nella tabella (Tab. 9) sotto sono presenti le caratteristiche del campione.

Età (anni)	57,59 ±15,95
Peso (kg)	90,90 ±19,41
Maschi (n°)	40 (80%)
Diagnosi principale	
Politrauma	23 (46%)
Sepsi	8 (16%)
Respiratorio	7 (14%)
Neurologico (emorragico/ischemico)	7 (14%)
Arresto cardio-circolatorio	2 (4%)
Altro	3 (6%)
SAPS score	47 [36-50]
APACHE II score	16 [11-23]
SOFA score	10 [7-11]

Tab. 9 : Descrittiva della popolazione di studio: principali parametri valutati all'ingresso in ICU. Dati riportati come media (± SD), numero (%), mediana [IqR] ; Diagnosi all'ingresso come frequenza (%); sede dell'infezione come frequenza (%); SAPS II = Simplified Acute Physiology Score II; APACHE :Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation; SOFA:Sequential Organ Failure Assessment.

Il campione consta di 50 pazienti, di questi, 40 (80%) sono uomini e 10 (20%) donne. Al momento dell'ingresso in terapia intensiva la media dell'età era di 57 anni (±15,95). Il peso all'ingresso dei pazienti raggiungeva i 90,90 (± 19,41). Le diagnosi d'ingresso prevalenti sono politrauma (46%), Seps (16%), Insufficienza Respiratoria (14%).

Gli score clinici di danno d'organo riportati nei pazienti indicano un SOFA score di 10 [7-11], SAPS score 47 [36-50] e APACHE II score 16 [11-23].

Al momento del reclutamento, i pazienti presentavano un SOFA score 9 [8-11]. Di questi 31 (62%) con infezione nota e 19 (38%) con infezione sospetta. Le sedi prevalentemente interessate dall'infezione sono: l'apparato respiratorio (46%) e genito-urinario (16%). Le sedi addominale ed ematica (entrambe al 4%) sono state meno rappresentate. Nel 28% dei pazienti la sede dell'infezione non era nota. Da un

punto di vista microbiologico il 28% dei pazienti presentava microbiologia negativa. La presenza di infezione sia polimicrobica che di germi multiresistenti era del 18%, in entrambi i casi. Della popolazione dello studio solo il 4% dei pazienti presentavano infezione virale.

Sede dell'infezione	
Respiratoria	23 (46%)
Addominale	2 (4%)
Genito-urinaria	8 (16%)
Ematica	2 (4%)
Altro	1 (2%)
Sconosciuta	14 (28%)

Tab. 10: Sede dell'infezione come frequenza (%)

LIVELLI DI PARACETAMOLO

È stata calcolata la mediana e il range interquartile (IqR) del dosaggio plasmatico di paracetamolo e della temperatura corporea rilevata ai 3 tempi, riportati in tabella (Tab.10).

	T0	T1	T2
Dosaggio plasmatico di paracetamolo, mcg/ml	1,04 [0,00-2,02]	11,85 [9,30-16,20]	7,55 [5,05-8,42]
Temperatura, °C	38,30 [38,10-38,80]	38,15 [37,95-38,60]	37,93 [37,50-38,32]

Tab. 11 : Concentrazione plasmatica di paracetamolo e temperatura corporea ai tempi T0, T1, T2. Dati riportati come mediana [i.q.r.]. mcg/ml= microgrammo per millilitro, °C = gradi Celsius.

L'intervallo plasmatico di normalità del paracetamolo è tra 10,00 e 20,00 mcg/ml e i pazienti hanno ricevuto un dosaggio prokg di paracetamolo di 11,11 mg [10,00-12,71].

A 30 minuti(T1) dal termine dell'infusione

- 17 pazienti (34%) aveva dosaggio plasmatici inferiori a 10,00 mcg/ml,
- 27 pazienti (54%) aveva adeguati dosaggi plasmatici,
- 6 pazienti (12%) avevano dosaggi plasmatici superiori a 20,00 mcg/ml.

Dei 50 pazienti, solo il 26% (13 pazienti) ha raggiunto la defervescenza($t^{\circ} \leq 37.5^{\circ}C$) a 2 ore dal termine della somministrazione. La percentuale di defervescenza non è differente tra chi aveva livelli plasmatici di paracetamolo in range (7 pazienti, -25.9%), sotto-range (4 pazienti, -23,5%), sopra il range (2 pazienti, -33,3%).

Tuttavia, è lievemente maggiore in chi ha ottenuto livelli plasmatici >20 mcg/ml.

L'assetto epatico nei 50 pazienti, al momento del reclutamento è stato riportato in

INR	1,31 [1,20-1,40]
BILIRUBINA TOTALE (mg/dL)	1,1 [0,6-2,5]
AST (IU/L)	45,5 [31,5-83,7]
ALT (IU/L)	38,0 [22,5-64,7]
LDH (IU/L)	252,0 [212,0-316,0]

Tab. 12: Assetto epatico al momento del reclutamento; international normalized ratio (INR); aspartato aminotransferasi (AST); alanina aminotransferasi (ALT); lattato deidrogenasi (LDH)

tabella(Tab.11).

Secondo il Mann-Whitney U test, i valori di INR osservati erano significativamente più alti nei pazienti con livelli plasmatici tra 10 e 20 mcg/ml; 1,35 [1,25-1,44] nel gruppo con livello plasmatico in range versus 1,26 [1,16- 1,23] nel gruppo con dosaggio plasmatico al

di sotto del range terapeutico e 1,23 [1,16-1,48] nel gruppo con dosaggio plasmatico al di sopra del range, con p=0.033.

Lo stesso è stato osservato per LDH: 292 IU/L [225-403] nei pazienti con livelli plasmatici tra 10 e 20 mcg/ml vs 228 IU/L [103-294] nei pazienti con livelli di paracetamolo al di sotto del range terapeutico vs 232 IU/L [140-458] nei pazienti con dosaggio al di sopra del range plasmatico del farmaco, con p=0.044, secondo Mann-Whitney U test.

Al momento del reclutamento, 34 pazienti (68%) non avevano in terapia farmaci che interferiscono con i livelli plasmatici di paracetamolo. Tra i restanti (32%) invece, ricevevano levetiracetam,(di questi 1 anche carbamazepina) o clonazepam in terapia. Questi tre farmaci diminuiscono i livelli plasmatici paracetamolo, ne aumentano il metabolismo e la formazione dei metaboliti tossici.

La maggior parte dei pazienti (58%) non fanno farmaci induttori o inibitori di CYP3A5. Il 30% dei pazienti in terapia avevano farmaci inibitori: amlodipina, ciprofloxacina, fluconazolo, valproato sodico, claritromicina. Solo il 12% riceveva farmaci induttori: desametasone, metilprednisolone e fenitoina, di questi 2 (4%) in concomitanza con inibitori (1 paziente claritromicina e 1 paziente valproato di sodio)

POLIMORFISMI GENETICI

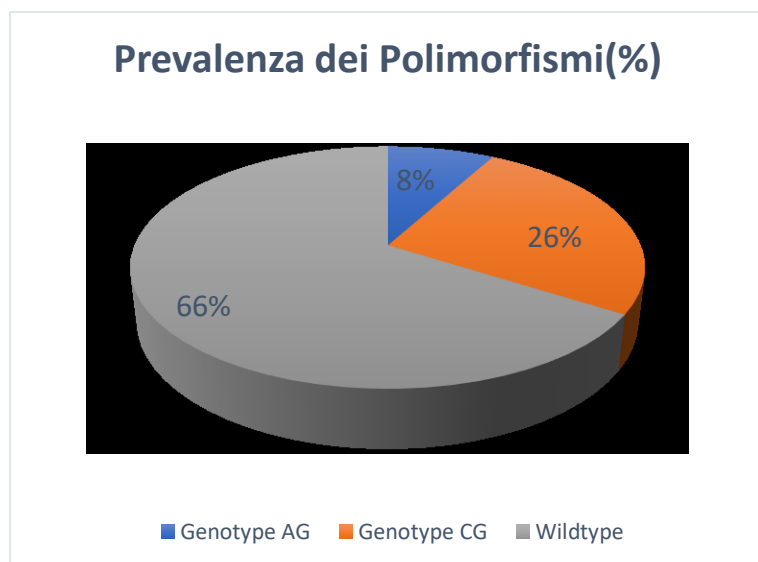


Fig. 13: Prevalenza dei polimorfismi; CYP3A5p(AG); UGT1A1p(CG)

La prevalenza dei polimorfismi (Fig.13) era del 36% per UGT1Ap e dell'8% per CYP3A5p. Non si sono verificati casi nei quali fossero presenti entrambi i polimorfismi in contemporanea.

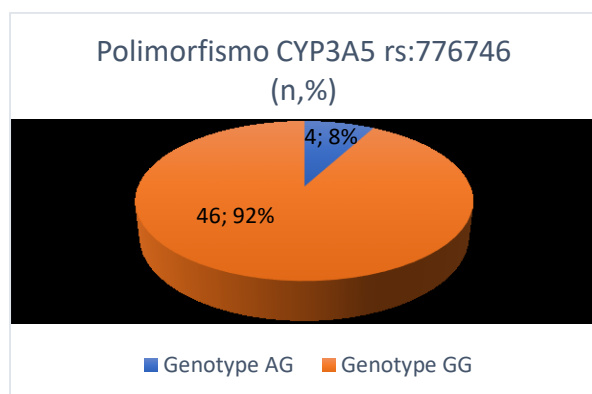


Fig. 14: Polimorfismo CYP3A5

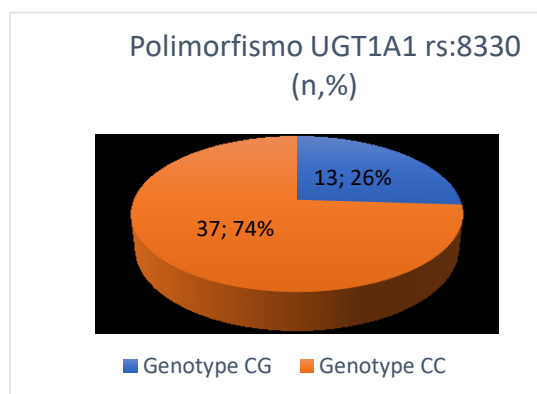


Fig. 15: Polimorfismo UGT1A

Il genotipo A-G, del CYP3A5 è meno rappresentato rispetto al genotipo G-G nella popolazione del nostro studio (4 pazienti [8%] vs 46 pazienti [92%]), mentre i genotipi del UGT1A1 il genotipo C-G è meno rappresentato del C-C (13 pazienti [26%] vs 37 pazienti [74%]).

Nel grafico si osservano i livelli plasmatici di paracetamolo nei diversi tempi in base all'assetto genetico dei pazienti (Fig. 16).

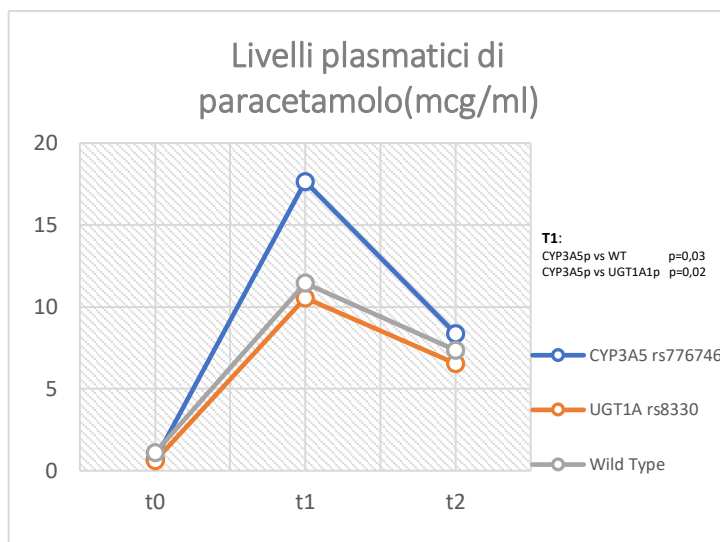


Fig. 16 : Livelli plasmatici di paracetamolo mcg/ml nei tempi T0 vs T1 vs T2 in base al genotipo

I livelli plasmatici nei pazienti con CYP3A5p erano superiori al wild type (WT) e rispetto a UGT1A1p a T1 (17,6 mcg/ml [16,2-21,7] vs 11,4 mcg/ml [9,1-14,3] e 10,5 mcg/ml [9,3-13,1]; con $p=0,03$ e $p=0,02$ rispettivamente). L'eterozigosi per il CYP3A5 si associa ad un livello plasmatico di paracetamolo significativamente maggiore che nel paziente

omozigote con una $p=0.017$ e una mediana di 17,7 [16,2-21,7] contro 11,2 [9,3-13,9] (Mann-Whitney U test). I tre gruppi hanno ricevuto una dose pro kg uguale di paracetamolo.

La differenza di temperatura (Fig. 17) corporea a 30 minuti e a 2 ore dal termine della somministrazione non è statisticamente significativa, ma è comunque presente un trend in riduzione a 2 ore nel gruppo in eterozigosi 37,6°C [37,3-38,6] contro 38,0°C [37,6-38,3].

I pazienti portatori di CYP3A5p hanno mostrato un effetto più pronunciato sulla temperatura corporea rispetto a WT e UGT1A1p con un ΔT °C di -0,85 [-1,65—0,02] contro ΔT °C di -0,40 [-0,80—0,05] e ΔT °C di -0,45 [0,65—0,10]

rispettivamente, ma non raggiunge un significato statistico. Solo il 50% dei pazienti raggiunge una temperatura minore di 38,0 °C a T2 e solo il 20% scende al di sotto dei 37,5 °C.

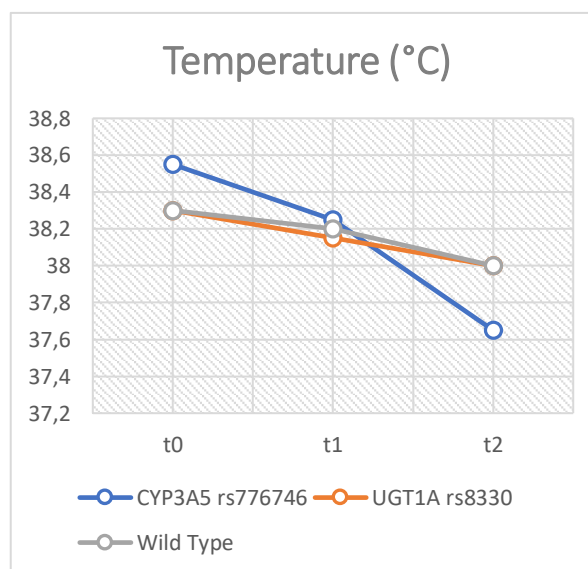


Fig. 17 : Andamento della temperatura(°C) a T0, T1, T2 rispetto all'assetto genetico.

La differenza è indipendente dal dosaggio prokg di paracetamolo ricevuto che non è statisticamente differente tra i due gruppi.

I parametri epatici non differiscono in maniera significativa tra i due gruppi.

La presenza del secondo polimorfismo (UGT1A1 rs:8330) non si è associata a nessuna variazione importante, ne in termini di livelli plasmatici di paracetamolo, ne di temperatura corporea.

IMPATTO EMODINAMICO

La somministrazione di paracetamolo ha evidenziato un'associazione con modificazioni emodinamiche nei pazienti. Le pressioni, anche se mostravano un trend in riduzione, non hanno però richiesto variazioni significative del supporto aminico.

La variazione di dosaggio della noradrenalina invece nel Friedman per RM non risulta statisticamente significativo ($p=0.2$).

Utilizzando il test di Friedman per misure ripetute, si è osservato che la Pressione arteriosa media (PAM, Tab.12) si è ridotta in maniera statisticamente significativa: 86 mmHg [77 - 94] a T0 vs 80 mmHg [74 - 89] a T1 vs 83 mmHg [73 - 91] a T2, con $p=0.022$

Pressione Arteriosa Media(mmHg)		
T0	86,00	[76,75-94,25]
T1	80,00	[74,25-89,25]
T2	83,00	[73,00-91,25]

Tab. 13 : Pressione arteriosa media(mmHg) in riduzione in T0,T1 e T2. Friedman test T0 vs T1 vs T2, $p=0,022$

La significatività della variazione (Fig. 18) è da attribuire prevalentemente alla variazione tra T0 e T1(86 mmHg [77 - 94] vs 80 mmHg [74 - 89]), con $p=0.021$ (Dunn's post hoc test).

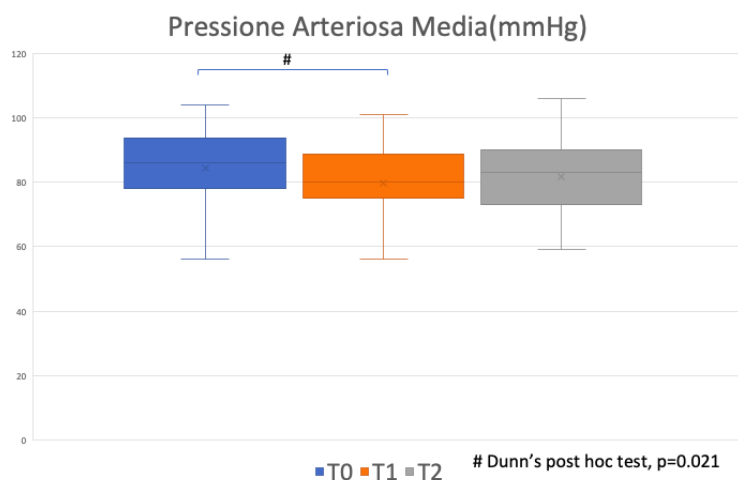


Fig. 18: Rappresentazione grafica della variazione della Pressione Arteriosa Media (mmHg) nei tre tempi di studio; Dunn's post hoc test T0 vs T1, $p=0.021$

Lo stesso vale per la frequenza cardiaca (FC, Tab.13) che si è ridotta in modo significativo T0 vs T1 vs T2 (90 bpm [77 - 106] vs 82 bpm [71 – 97] vs 85 bpm [70 – 94]), con $p<0.001$ (Test di Friedman).

Frequenza Cardiaca(bpm)		
T0	89,50	[76,75-105,75]
T1	81,50	[71,00-96,50]
T2	84,50	[69,75-93,50]

Tab. 14: Riduzione della Frequenza cardiaca (bpm) (test di Friedman, $p<0.001$)

Dunn's post hoc mostra che la significatività(Fig. 19) tra T0 e T1(70 bpm [77 - 106] vs 82 bpm [71 – 97]) è pari a $p=0.001$, e ugualmente tra T0 e T2(90 bpm [77 -106] vs 85 bpm [70 – 94]), $p=0.001$.

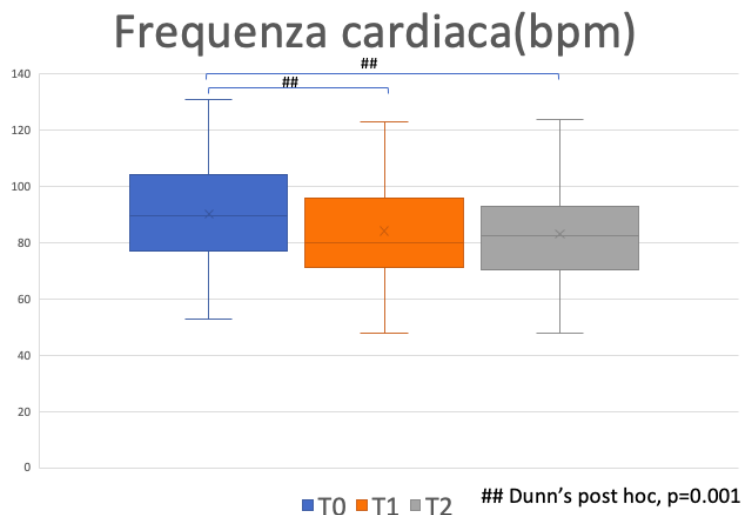


Fig. 19: Riduzione Frequenza cardiaca(bpm) nei tre tempi dello studio; ## Dunn's post hoc T0 vs T1 e T0 vs T2, $p=0.001$

Solo alcuni pazienti avevano un monitoraggio emodinamico (14 pazienti), ma non risulta differenza statisticamente significativa di Cardiac Index dopo la somministrazione di paracetamolo.

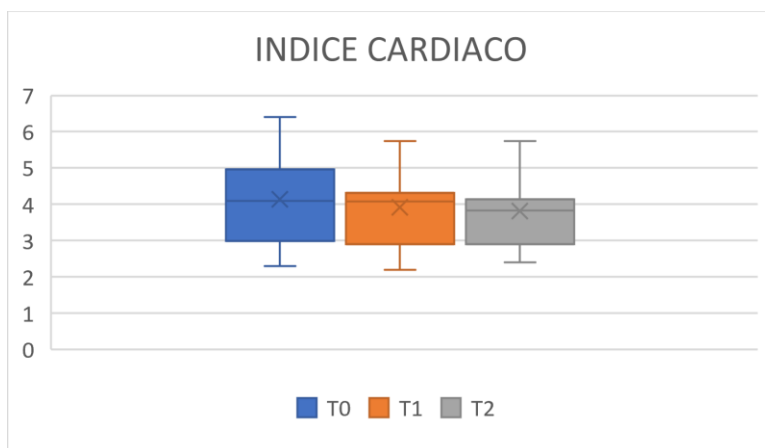


Fig. 20: Rappresentazione grafica delle variazioni dell'indice cardiaco nei tre tempi, non significativo

Non ci sono state variazioni statisticamente significative nel dosaggio plasmatico di lattati, né nella ScvO₂.

Dividendo i pazienti tra chi presenta o meno eterozigosi per CYP3A5, la variazione nel tempo di FC quindi la variazione di FC tra T0, T1 e T2 resta significativa sia in chi ha omozigosi che in chi ha eterozigosi (in entrambi i gruppi la FC è in discesa).

La riduzione di PAM è significativa (test di Friedman, $p=0.01$) solo nel gruppo omozigosi (Wild Type) e non nel gruppo con la mutazione in eterozigosi ($p=0.82$).

Pressione Arteriosa Media (mmHg) Polimorfismo Wildtype		
T0	86,00	[78,50-94,25]
T1	80,00	[74,25-87,50]
T2	83,00	[73,00-91,25]

Tab. 15: Pressione arteriosa media(mmHg) nel gruppo del polimorfismo WT nei tempi studiati in riduzione con $p=0.01$, Friedman test

Pressione Arteriosa Media (mmHg) Polimorfismo Eterozigosi		
T0	78,50	[56,00-92,75]
T1	84,00	[65,25-93,00]
T2	83,00	[66,25-90,75]

Tab. 16: Pressione arteriosa media(mmHg) nel gruppo del polimorfismo in eterozigosi nei tempi studiati in aumento

Anzi nel gruppo in eterozigosi la PAM tende a salire, senza necessità di variazioni significative della noradrenalina.

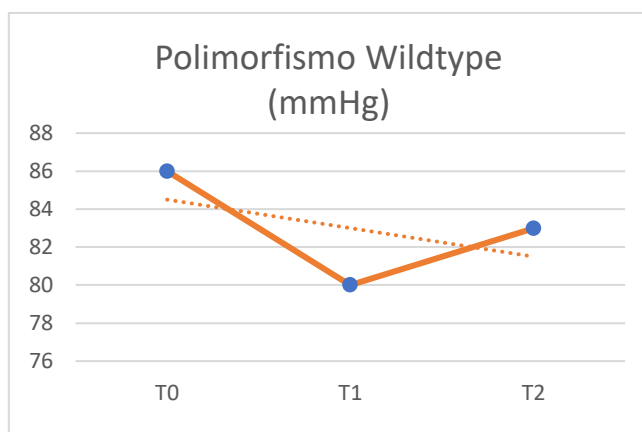


Fig. 21: Pressione arteriosa media (mmHg) in T0, T1 e T2 nel genotipo wildtype, $p=0.01$ con test di Friedman

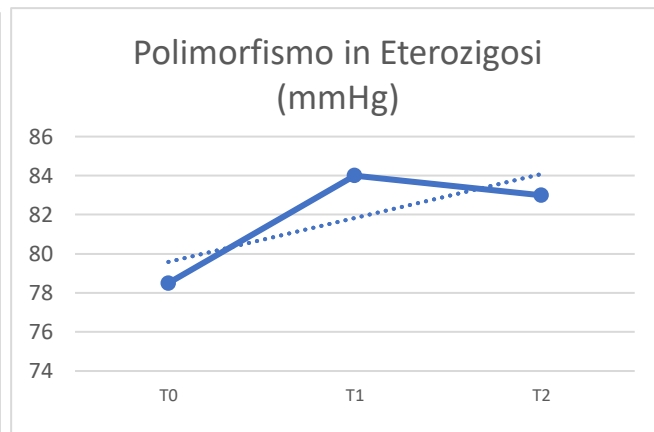


Fig. 22 : Pressione arteriosa media(mmHg) in T0, T1 e T2 nel genotipo in eterozigosi

DOSAGGIO DI NORADRENALINA($\mu\text{g/kg/min}$)

POLIMORFISMO <i>wild type</i>	T0	0,136	[0,000-0,300]
	T1	0,147	[0,000-0,305]
	T2	0,110	[0,000-0,301]
POLIMORFISMO <i>eterozigosi</i>	T0	0,136	[0,000-0,300]
	T1	0,147	[0,000-0,300]
	T2	0,110	[0,000-0,295]

Tab. 17 : Variazioni del Supporto vasopressorio con Noradrenalina($\mu\text{g/kg/min}$) tra il polimorfismo in eterozigosi e il genotipo wildtype di CYP3A5 a T0, T1, T2 non significativo

DISCUSSIONE

Il lavoro esposto rappresenta un'analisi dei dati raccolti alla conclusione dello studio clinico prospettico osservazionale "Emoglobina libera circolante e microcircolo dopo somministrazione di paracetamolo nel paziente settico febbrile", dopo raggiungimento della numerosità campionaria. Nello specifico, l'attenzione di questa analisi è stata incentrata sulla descrizione degli effetti del paracetamolo nel paziente settico febbrile, valutando la risposta alla somministrazione del farmaco in termini di defervescenza e variazione dei parametri emodinamici. Si è voluto approfondire l'assetto farmacogenetico degli individui reclutati nello studio, e la variabilità in questi della risposta antipiretica al paracetamolo.

L'intervallo plasmatico di normalità del paracetamolo è tra 10 e 20 mcg/ml. Nella popolazione in esame, i pazienti hanno mostrato un'ampia variazione interindividuale nei livelli di paracetamolo rilevati al T1 e al T2, a parità di dose somministrata (1g in infusione endovenosa in 20 min). Quanto osservato è verosimilmente ascrivibile alla variabilità della farmacocinetica dell'acetaminofene, già descritta in letteratura nel paziente critico.¹⁴⁰ In generale, la farmacocinetica del paracetamolo è lineare fino a 2 g dopo singola somministrazione. In accordo con la farmacocinetica della molecola, i livelli plasmatici più elevati di paracetamolo sono stati ottenuti a T1. Considerando la via di somministrazione endovenosa che dovrebbe garantire il massimo assorbimento, abbiamo ricercato altre possibili cause di variazioni del livello plasmatico. Il paracetamolo non si lega ampiamente alle proteine plasmatiche e alla luce della media del peso ($90,90 \text{ Kg} \pm 19,41$) abbiamo valutato il dosaggio prokg di paracetamolo ricevuto dai pazienti ($11.11 \text{ mg [10.00-12,71]}$), supponendo che ricevessero una dose non adeguata di farmaco in base al loro peso, ma questa variabile non è risultata in realtà significativa. La permeabilità capillare potrebbe influire sui livelli circolanti del farmaco. In uno studio di Allegaert e colleghi, età e terapia intensiva erano associati ad una variabilità nella distribuzione del paracetamolo nel paziente critico. Nello specifico il paziente in terapia intensiva mostravano un aumento del volume di distribuzione periferico.¹⁴¹ L'aumento del volume di distribuzione è assai frequente nel paziente critico e può essere dovuto a vasoplegia, all'aumento della permeabilità di membrana, o a sequestro nel terzo spazio. Questo succede a maggior ragione, nei pazienti settici dove la risposta infiammatoria delle cellule endoteliali, determina un incremento della permeabilità

vascolare, quindi tali fenomeni potrebbero, almeno in parte, spiegare il mancato raggiungimento a T1 del range terapeutico di riferimento. Infatti, a 30 minuti dal termine dell'infusione solo il 54% aveva adeguati dosaggi plasmatici, mentre il 34% aveva un dosaggio plasmatico inferiore alla soglia minima. Tuttavia, dei 50 pazienti, solo il 26% ha raggiunto la defervescenza a 2 ore dal termine della somministrazione, intesa come raggiungimento di una $T^{\circ} \leq 37.5^{\circ}C$.

Nello studio di Parker e colleghi il paracetamolo presenta volumi di distribuzione e clearance molto variabili. Questo risultato può spiegare in parte l'assenza di effetti nella riduzione del picco febbrile. La percentuale di defervescenza non è differente tra chi aveva o meno livelli plasmatici ottimali, ma seppur non in maniera statisticamente significativa, è lievemente maggiore in chi presentava livelli plasmatici >20 mcg/ml. Alla luce di ciò i pazienti potrebbero beneficiare di dosi maggiori, in linea con le osservazioni di Parker e colleghi che associano la variabilità farmacocinetica ad un diverso volume di distribuzione.

Altra ipotesi invece si basa sul metabolismo del farmaco, nello studio di Giamarellos-Bourboulis e colleghi condotto su una popolazione di pazienti febbrili, ma non settici. I dati raccolti mostrano che al termine dell'infusione il 50,7% dei soggetti reclutati ha richiesto almeno un'ulteriore somministrazione di paracetamolo. Dosando i livelli plasmatici dei metaboliti del paracetamolo (APAP-Glu) dei pazienti non-responders, gli autori hanno osservato che questi erano superiori rispetto a quelli dosati nei pazienti responders. Sugerendo che i soggetti non-responders presentassero un metabolismo più veloce del farmaco, evidenziando per la prima volta la correlazione tra l'efficacia clinica del paracetamolo ed il suo metabolismo. I polimorfismi osservati erano riconducibili al UGT1A6.¹⁴² Nel nostro campione però, la presenza del secondo polimorfismo (UGT1A1 rs:8330) non si è associata a nessuna variazione importante, né in termini di livelli plasmatici di paracetamolo, né di temperatura corporea o alterazioni della funzionalità epatica di base. La velocità con cui il farmaco viene metabolizzato potrebbe però determinare la sua tossicità oltre che interferire con l'effetto terapeutico atteso. Nei soggetti cosiddetti "metabolizzatori veloci" l'emivita della molecola è minore, di conseguenza anche la sua farmacodinamica ne sarà influenzata, con riduzione dell'attività del farmaco.

È stato dimostrato che il farmaco non presenta fenomeni di accumulo né sono state rilevate alterazioni degli indici di funzionalità epatica nel caso in cui la terapia antipiretica iniziasse con una dose da 2 g per via endovenosa di paracetamolo

seguita da tre successive somministrazioni di 1 g ogni sei ore, fino ad un totale di 5g nelle prime 24 ore.¹⁴³ Tali osservazioni auspicano l'approfondimento con ulteriori studi volti a valutare l'effetto di somministrazioni multiple o a dosaggio superiore di paracetamolo nella risoluzione dello stato piretico del paziente settico.

I polimorfismi degli enzimi coinvolti nel metabolismo del paracetamolo sono relativamente comuni nella nostra popolazione. La prevalenza dei polimorfismi nel nostro studio era del 26% per UGT1A1p e dell'8% per CYP3A5p. Non si sono verificati casi nei quali fossero presenti entrambi i polimorfismi in contemporanea e i parametri epatici non differiscono in maniera significativa tra i due gruppi. Entrambe le mutazioni promuovono l'attività dell'enzima, incentivando quindi il metabolismo del paracetamolo. L'effetto atteso consiste nella riduzione dell'emivita plasmatica del farmaco, con maggiore riduzione dei livelli plasmatici nei due timepoint. La variante allelica CYP3A5 (rs:776746) consiste nella sostituzione di una guanina con una adenina. Quando il genotipo si presenta in eterozigosi manifesta una maggiore attività metabolica ossidativa, con riduzione dell'emivita plasmatica del paracetamolo e maggiore formazione del metabolita epatotossico NAPQI. Mentre nel polimorfismo UGT1A1 (rs:8330) che prevede la sostituzione di una citosina con una guanina all'UTR al 3', la via metabolica di glucuronidazione risulta maggiormente attivata, ed essendo questa la pathway principale del metabolismo del paracetamolo, quando assunto a concentrazioni terapeutiche, l'effetto atteso è quello di diminuzione dell'emivita e di una maggiore riduzione nei livelli del farmaco nei vari tempi. Tenendo in considerazione il fatto che i tre gruppi hanno ricevuto una dose pro kg uguale di paracetamolo, il picco plasmatico nei pazienti con CYP3A5 in eterozigosi erano superiori al wild type (WT) e rispetto a UGT1A1p a T1. Nello specifico tra gli alleli, quello in eterozigosi per il CYP3A5 si associa ad un livello plasmatico di paracetamolo significativamente maggiore che nel paziente omozigote ($p=0.017$). Tuttavia, questa differenza non è stata significativa in T2 per nessuno dei polimorfismi.

Il trend della temperatura risulta essere in riduzione a 30 e 120 minuti dalla somministrazione, seppur non statisticamente significativa, in maniera concorde a quanto riportato in letteratura, con diminuzione costante dei valori mediani nel tempo. I pazienti portatori di CYP3A5p hanno mostrato un effetto più pronunciato sulla temperatura corporea rispetto a WT e UGT1A1p con ΔT° in riduzione, ma che

non raggiunge significatività statistica. Solo il 50% dei pazienti raggiunge una temperatura < 38,0°C a T2 e solo il 20% raggiunge una temperatura < 37,5°C.

In riferimento alle interazioni farmacologiche, quelle ben definite e riportate in letteratura riguardano i farmaci induttori o inibitori del CYP3A4, ma data l'elevata sovrapposizione dei substrati metabolizzati dal CYP3A4 e CYP3A5, anche l'attività di quest'ultimo può essere modulata dagli stessi. Il Levetiracetam è un altro farmaco per cui è stato descritto un effetto regolatorio sul metabolismo del paracetamolo, pur non agendo direttamente sul citocromo; una cosomministrazione dei due farmaci determina sia diminuiti livelli plasmatici di paracetamolo, probabilmente per induzione del metabolismo, sia maggiore produzione del metabolita tossico. Sarebbe interessante approfondire il meccanismo d'interazione tra questi due farmaci nei pazienti critici, essendo il levetiracetam frequentemente prescritto ai pazienti in terapia intensiva come profilassi antipilettica.

Inoltre, il metabolismo del paracetamolo a livello epatico non dipende solo dai polimorfismi analizzati. Il primo enzima microsomiale identificato nel metabolismo ossidativo del paracetamolo è stato il CYP2E1, il CYP2E1 sembra essere indotto nei pazienti obesi ed esso influisce sul metabolismo del paracetamolo in particolare influisce sulla clearance e sulla produzione del metabolita tossico. CYP2E1 può portare alla produzione delle specie reattive dell'ossigeno inducendo un processo ossidativo che inibisce la morte apoptotica delle cellule, e favorisce la necrosi cellulare per perossidazione lipidica.¹⁴⁴

Pur essendo auspicabile valutare un aggiustamento della posologia in base alle insufficienze d'organo, in particolare epatica e renale, nella nostra popolazione non erano stati riscontrati valori basali rilevanti di danno epatico o renale. L'assetto epatico nei 50 pazienti, al momento del reclutamento, era ottimale, poiché rappresentavano in primis un criterio di esclusione al momento della selezione dei pazienti. Gli unici valori leggermente, ma significativamente più elevati nei pazienti con livelli plasmatici tra 10 e 20 mcg/ml rispetto agli altri due gruppi erano quelli di INR ($p=0.033$), così come le LDH ($p=0.044$). Tra le cause di aumento dell'INR si annoverano oltre alla terapia anticoagulante anche l'assenza, scarsa attività, ridotta sintesi o eccessivo consumo dei fattori della coagulazione I, II, V, VII e X e carenza di vitamina K per ridotto apporto alimentare, in particolare in caso di dieta ipolipidica. Mentre un aumento di LDH può essere osservato in presenza di anemia emolitica o sepsi, ma questo non spiega il perché siano i pazienti nel range terapeutico a

mostrare un aumento significativo rispetto agli altri due gruppi, a maggior ragione se non sono state osservate discrepanze nell'assetto epatico dei pazienti con polimorfismo. I dati a nostra disposizione non sono in grado di discriminare il ruolo del paracetamolo o dell'emoglobina libera su questa differenza riscontrata, appunto perché non sufficienti a determinare il ruolo delle numerose variabili.

La somministrazione di paracetamolo si è associata ad impatto emodinamico che non ha però necessitato di variazioni significative del supporto aminico. L'inibizione dell'attività delle COX si riflette nel blocco a cascata della conversione dell'acido arachidonico in prostaglandina G2, dalla PG2 in PH2, ed in ultimo nel blocco della sintesi di prostaglandine, prostaciline e trombossani da parte di isomerasi tessuto specifiche.⁹ L'effetto antipiretico del paracetamolo è dovuto all'azione diretta sul centro di termoregolazione dell'ipotalamo, la ristabilizzazione del set point ai valori precedenti si traduce in vasodilatazione periferica, sudorazione e aumentata dissipazione del calore, che portano alla normalizzazione della temperatura corporea. La Pressione arteriosa media (PAM) si è ridotta in maniera statisticamente significativa ($p=0.022$) e la significatività della variazione è da attribuire prevalentemente alla variazione tra T0 e T1 ($p=0.021$, Dunn's post hoc test). La PAM corrisponde alla pressione che fornisce la perfusione degli organi e la sua regolazione è un elemento chiave del sistema cardiovascolare. Essa può diminuire per cause che influenzano direttamente output cardiaco, la frequenza cardiaca, o le resistenze periferiche. In fisiologia, una forte diminuzione di PAM è normalmente compensata dalla stimolazione simpatica, che porta alla tachicardia riflessa, ma quattro sono i meccanismi di autoregolazione riconosciuti come potenzialmente importanti e sono il riflesso miogenico (muscolatura liscia vasale), metabolico, endoteliale, e feedback tubulo-glomerulare. Questa capacità autoregolativa varia molto in base alla storia cardiovascolare di ogni paziente, l'organo considerato, la patologia, l'attività metabolica, e l'uso di vasodilatatori. Solo alcuni pazienti avevano un monitoraggio emodinamico (14 pazienti), ma non risulta differenza statisticamente significativa di Cardiac Index dopo la somministrazione di paracetamolo di conseguenza la pressione sanguigna presenta un trend in riduzione verosimilmente dovuta all'effetto antipiretico del paracetamolo. Anche la frequenza cardiaca risente dell'effetto del paracetamolo e in ragione di ciò, Krajčův e colleghi, che hanno studiato le ripercussioni sull'emodinamica della somministrazione endovenosa di paracetamolo, suggeriscono di preferire il ricorso a farmaci come

alpha e beta agonisti (efedrina) rispetto alla noradrenalina, nel trattare l'ipotensione paracetamolo-mediata.¹⁴⁵ Nel nostro caso, come anticipato, non è stato necessario implementare il dosaggio del vasopressore (noradrenalina, Friedman's test per RM, $p=0.2$).

La frequenza cardiaca nel nostro studio si è ridotta in modo significativo ($p<0.001$) sia tra T0 e T1, che T0 e T2. La frequenza cardiaca (FC) può variare anche essa in base alle condizioni cliniche del paziente, da squilibri acido-base, idro-elettrolitici, ipossia, e ipotermia. L'ipossia porta a una diminuzione della FC, poiché le reazioni metaboliche che alimentano la contrazione del cuore vengono limitate. Gli enzimi, essendo regolatori o catalizzatori praticamente di tutte le reazioni biochimiche, sono sensibili al pH e ne rimangono influenzati. Queste variazioni alterano il sito attivo dell'enzima riducendo la formazione del complesso enzima-substrato, e di conseguenza il tasso di molte reazioni enzimatiche, che possono avere effetti complessi sulla FC. Il decremento significativo da T0 a T1 osservato è riconducibile all'effetto antipiretico, è infatti noto che all'aumento di un grado di temperatura corporea corrisponde un rialzo della frequenza cardiaca di 10 bpm, e la stessa correlazione si verifica anche in senso opposto. La permanenza della significatività da T0 e T2 senza supporto vasoattivo in presenza di una PAM in calo può avere diverse interpretazioni. Il meccanismo fisiologico primario di questi cambiamenti emodinamici era vasodilatazione sistemica transitoria, piuttosto che una riduzione dell'indice cardiaco.¹⁴⁶ Non ci sono state variazioni statisticamente significative nel dosaggio plasmatico sia dei lattati, che nella ScvO₂.

Tornando ai polimorfismi, dividendo i pazienti tra chi ha e chi non ha eterozigosi per CYP3A5, la riduzione nel tempo di FC quindi tra T0, T1 e T2 resta significativa sia in chi ha omozigosi che in chi ha eterozigosi. La riduzione di PAM è significativa ($p=0.01$) solo nel gruppo omozigosi (Wild Type) e non nel gruppo con la mutazione in eterozigosi ($p=0.82$). Anzi nel gruppo in eterozigosi la PAM tende a salire, senza necessità di variazioni significative della noradrenalina.

Inoltre, nel gruppo in omozigosi la pressione arteriosa sistolica (PAS) si riduce, e anche la pressione arteriosa diastolica (PAD), mentre nel gruppo in eterozigosi la PAS aumenta e la PAD rimane invariata. Infatti, quando il genotipo si presenta in eterozigosi manifesta una maggiore attività metabolica ossidativa, con riduzione dell'emivita plasmatica del paracetamolo e verosimilmente ne riduce l'effetto vasodilatatorio a differenza del gruppo in omozigosi.

Questi dati potrebbero servire da base per ulteriori ricerche sulla farmacocinetica del paracetamolo in pazienti in condizioni critiche con noto volume aumentato di distribuzione che potrebbe influenzare l'efficacia clinica. Limiti dello studio potrebbero essere imputabili oltre che ad una inadeguata numerosità campionaria, che essendo stata calcolata sull'obiettivo primario dello studio non risulta idonea per l'obiettivo secondario, anche all'estrema variabilità della popolazione campione in termini di dati demografici, stadio di sepsi, comorbidità e diagnosi all'ingresso. Inoltre molti pazienti erano stati già trattati con paracetamolo prima del reclutamento, anche se a distanza maggiore di 12, e questo potenzialmente potrebbe influenzare la risposta al farmaco.

CONCLUSIONE

Il paracetamolo ha svolto il suo effetto terapeutico riducendo la temperatura corporea anche nel paziente settico febbrile, anche se la risposta si è rivelata molto eterogenea. I livelli plasmatici sono stati molto eterogenei sollecitando alla rivalutazione con studi adeguati della posologia del farmaco nel setting di terapia intensiva e a maggior ragione nei pazienti con sepsi.

L'impatto emodinamico a seguito della somministrazione non ha però necessitato di variazioni significative del supporto aminico. In particolare, il calo della pressione arteriosa media sembra essere dovuta all'effetto vasodilatatorio del paracetamolo. La frequenza cardiaca sembra invece mantenere un trend significativo in calo a prescindere dal polimorfismo genetico del paziente. Inoltre, la presenza molto frequente di polimorfismi genetici a carico degli enzimi deputati al metabolismo del paracetamolo nella popolazione studiata ha mostrato che l'eterozigosi per il CYP3A5 si associa ad un livello plasmatico di paracetamolo significativamente maggiore che nel paziente omozigote(wild type). La presenza del secondo polimorfismo UGT1A al contrario, non si è associata a nessuna variazione importante, ne in termini di livelli plasmatici di paracetamolo, ne di temperatura corporea o funzionalità epatica. Per quel che concerne l'impatto emodinamico la riduzione di pressione arteriosa media è significativa solo nel gruppo Wild Type con un trend di riduzione coerente di pressione arteriosa sistolica e pressione arteriosa diastolica, mentre nel gruppo in eterozigosi la pressione arteriosa media, come la pressione arteriosa sistolica, tende ad aumentare e la pressione arteriosa diastolica rimane invariata.

A causa dei limiti dello studio, per determinare la rilevanza clinica di quanto emerso è auspicabile indagare ulteriormente con potenza campionaria adeguata.

BIBLIOGRAFIA

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-150. doi:10.1056/NEJMra021333
3. Bhavani SV, Carey KA, Gilbert ER, Afshar M, Verhoef PA, Churpek MM. Identifying Novel Sepsis Subphenotypes Using Temperature Trajectories. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(3):327-335. doi:10.1164/rccm.201806-1197OC
4. Bar-Or D, Carrick MM, Mains CW, Rael LT, Slone D, Brody EN. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? *Redox Rep*. 2015;20(5):193-197. doi:10.1179/1351000215Y.0000000005
5. Damiani E, Adrario E, Luchetti MM, et al. Plasma free hemoglobin and microcirculatory response to fresh or old blood transfusions in sepsis. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0122655. doi:10.1371/journal.pone.0122655
6. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-3777. doi:10.1182/blood-2002-06-1887
7. Donadee C, Raat NJH, Kanias T, et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*. 2011;124(4):465-476. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.008698
8. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3409-3417. doi:10.1172/JCI25040
9. Chiumello D, Gotti M, Vergani G. Paracetamol in fever in critically ill patients-an update. *J Crit Care*. 2017;38:245-252. doi:10.1016/j.jcrc.2016.10.021
10. Schell-Chaple HM, Liu KD, Matthay MA, Sessler DI, Puntillo KA. Effects of IV Acetaminophen on Core Body Temperature and Hemodynamic Responses in Febrile Critically Ill Adults: A Randomized Controlled Trial. *Crit Care Med*. 2017;45(7):1199-1207. doi:10.1097/CCM.0000000000002340
11. Janz DR, Bastarache JA, Peterson JF, et al. Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and mortality in patients with sepsis: an observational study. *Crit Care Med*. 2013;41(3):784-790. doi:10.1097/CCM.0b013e3182741a54
12. Sakr Y, Dubois M-J, De Backer D, Creteur J, Vincent J-L. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(9):1825-1831. doi:10.1097/01.ccm.0000138558.16257.3f
13. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 2013;17(4):587-607, viii. doi:10.1016/j.cld.2013.07.005
14. Court MH, Peter I, Hazarika S, et al. Candidate gene polymorphisms in patients with acetaminophen-induced acute liver failure. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(1):28-32. doi:10.1124/dmd.113.053546

15. WSD 2019 — World Sepsis Day - September 13. Accessed April 30, 2020. <https://www.worldsepsisday.org/wsd2019>
16. Siaarti - SEPSI-UNA-BATTAGLIA-CONTRO-IL-TEMPO. Accessed April 30, 2020. <http://www.siaarti.it/News/SEPSI-UNA-BATTAGLIA-CONTRO-IL-TEMPO.aspx>
17. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin Chest Med*. 2016;37(2):165-179. doi:10.1016/j.ccm.2016.01.002
18. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20(6):864-874.
19. Bone RC. The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med*. 1996;17(2):175-181. doi:10.1016/s0272-5231(05)70307-5
20. Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *Journal of Critical Care*. 2017;40:229-242. doi:10.1016/j.jcrc.2017.04.015
21. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530-538. doi:10.1007/s00134-003-1662-x
22. Gül F, Arslantaş MK, Cinel İ, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. *Turk J Anaesthesiol Reanim*. 2017;45(3):129-138. doi:10.5152/TJAR.2017.93753
23. Braun D. A Retrospective Review of the Sepsis Definition after Publication of Sepsis-3. *Am J Med*. 2019;132(3):382-384. doi:10.1016/j.amjmed.2018.11.003
24. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707-710. doi:10.1007/bf01709751
25. Raith EP, Udy AA, Bailey M, et al. Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA*. 2017;317(3):290-300. doi:10.1001/jama.2016.20328
26. Friedman G, Silva E, Vincent J-L. Has the mortality of septic shock changed with time? *Critical Care Medicine*. 1998;26(12):2078–2086.
27. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1368-1377. doi:10.1056/NEJMoa010307
28. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(3):858-873. doi:10.1097/01.ccm.0000117317.18092.e4
29. Marshall JC, Dellinger RP, Levy M. The Surviving Sepsis Campaign: a history and a perspective. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010;11(3):275-281. doi:10.1089/sur.2010.024
30. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit Care Med*. 2014;42(3):625-631. doi:10.1097/CCM.0000000000000026

31. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200-211. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7
32. Chou EH, Mann S, Hsu T-C, et al. Incidence, trends, and outcomes of infection sites among hospitalizations of sepsis: A nationwide study. *PLoS ONE*. 2020;15(1):e0227752. doi:10.1371/journal.pone.0227752
33. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-1554. doi:10.1056/NEJMoa022139
34. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1244-1250. doi:10.1097/01.CCM.0000261890.41311.E9
35. Vincent JL. EPIC II: sepsis around the world. *Minerva Anestesiol*. 2008;74(6):293-296.
36. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. 2009;302(21):2323-2329. doi:10.1001/jama.2009.1754
37. Dobner J, Kaser S. Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(1):24-28. doi:10.1016/j.cmi.2017.02.013
38. Mewes C, Böhnke C, Alexander T, et al. Favorable 90-Day Mortality in Obese Caucasian Patients with Septic Shock According to the Sepsis-3 Definition. *J Clin Med*. 2019;9(1). doi:10.3390/jcm9010046
39. Pepper DJ, Demirkale CY, Sun J, et al. Does Obesity Protect Against Death in Sepsis? A Retrospective Cohort Study of 55,038 Adult Patients. *Crit Care Med*. 2019;47(5):643-650. doi:10.1097/CCM.0000000000003692
40. Vachharajani V, Vital S. Obesity and sepsis. *J Intensive Care Med*. 2006;21(5):287-295. doi:10.1177/0885066606290670
41. Pepper DJ, Sun J, Welsh J, Cui X, Suffredini AF, Eichacker PQ. Increased body mass index and adjusted mortality in ICU patients with sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2016;20(1):181. doi:10.1186/s13054-016-1360-z
42. Sepsis: pathophysiology and clinical management | The BMJ. Accessed May 2, 2020. <https://www.bmj.com/content/353/bmj.i1585>
43. Jekarl DW, Kim KS, Lee S, Kim M, Kim Y. Cytokine and molecular networks in sepsis cases: a network biology approach. *Eur Cytokine Netw*. 2018;29(3):103-111. doi:10.1684/ecn.2018.0414
44. Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P, Rabinovici R. Platelet-activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. *Shock*. 1997;7(6):391-404. doi:10.1097/00024382-199706000-00001
45. Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Critical Care*. 2008;12(1):R25. doi:10.1186/cc6801
46. Santos S, Brunialti MK, Rigato O, Machado F, Silva E, Salomao R. Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes. *Shock*. 2012;38(1):18-23. doi:10.1097/SHK.0b013e318257114e

47. Brunialti MKC, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, AND CD11C EXPRESSIONS ON MONOCYTES SURFACE AND CYTOKINE PRODUCTION IN PATIENTS WITH SEPSIS, SEVERE SEPSIS, AND SEPTIC SHOCK. *Shock*. 2006;25(4):351–357. doi:10.1097/01.shk.0000217815.57727.29
48. Santos SS, Carmo AM, Brunialti MKC, et al. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2016;4(1):5. doi:10.1186/s40635-016-0078-1
49. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell*. 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
50. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:5080843. doi:10.1155/2019/5080843
51. Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res*. 2000;460(1):1-15. doi:10.1016/s0921-8777(00)00016-1
52. Yu S-W, Andrabi SA, Wang H, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(48):18314-18319. doi:10.1073/pnas.0606528103
53. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S193-201. doi:10.1038/sj.bjp.0706458
54. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5(1):66-72. doi:10.4161/viru.26907
55. Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(8):1637-1642. doi:10.1097/01.ccm.0000132904.35713.a7
56. Okorie ON, Dellinger P. Lactate: biomarker and potential therapeutic target. *Crit Care Clin*. 2011;27(2):299-326. doi:10.1016/j.ccc.2010.12.013
57. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):617-625, viii. doi:10.1016/j.ccm.2008.06.010
58. Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol*. 1993;150(4):1205-1211.
59. Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess? *Eur J Surg Suppl*. 1999;(584):70-72. doi:10.1080/11024159950188600
60. Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*. 1996;22 Suppl 4:S474-481. doi:10.1007/bf01743727

61. Guisset O, Dilhuydy M-S, Thiébaud R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33(1):148-152. doi:10.1007/s00134-006-0436-7
62. Palmer JL, Tulley JM, Kovacs EJ, Gamelli RL, Taniguchi M, Faunce DE. Injury-induced suppression of effector T cell immunity requires CD1d-positive APCs and CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol.* 2006;177(1):92-99. doi:10.4049/jimmunol.177.1.92
63. MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol.* 1990;145(12):4167-4173.
64. O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol.* 1990;2(9):821-832. doi:10.1093/intimm/2.9.821
65. Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(4):L633-640. doi:10.1152/ajplung.00231.2004
66. De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):98-104. doi:10.1164/rccm.200109-016oc
67. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S13-19. doi:10.1186/cc3753
68. Schwarte LA, Fournell A, van Bommel J, Ince C. Redistribution of intestinal microcirculatory oxygenation during acute hemodilution in pigs. *J Appl Physiol.* 2005;98(3):1070-1075. doi:10.1152/jappphysiol.00861.2004
69. Ince C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. *Critical Care.* 2015;19(3):S8. doi:10.1186/cc14726
70. Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med.* 1999;5(10):1209-1212. doi:10.1038/13529
71. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care.* 2007;11(5):R101. doi:10.1186/cc6118
72. Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, Mathura KR, Oudemans-van Straaten HM, Zandstra DF. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet.* 2002;360(9343):1395-1396. doi:10.1016/s0140-6736(02)11393-6
73. Morelli A, Passariello M. Hemodynamic coherence in sepsis. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2016;30(4):453-463. doi:10.1016/j.bpa.2016.10.009
74. Bezemer R, Bartels SA, Bakker J, Ince C. Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill--where do we stand? *Crit Care.* 2012;16(3):224. doi:10.1186/cc11236
75. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007;49(1):88-98, 98.e1-2. doi:10.1016/j.annemergmed.2006.08.021

76. Edul VSK, Enrico C, Laviolle B, Vazquez AR, Ince C, Dubin A. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2012;40(5):1443-1448. doi:10.1097/CCM.0b013e31823dae59
77. Lima A, Jansen TC, van Bommel J, Ince C, Bakker J. The prognostic value of the subjective assessment of peripheral perfusion in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2009;37(3):934-938. doi:10.1097/CCM.0b013e31819869db
78. Lelubre C, Vincent J-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(7):417-427. doi:10.1038/s41581-018-0005-7
79. Samuels JM, Moore HB, Moore EE. Coagulopathy in Severe Sepsis: Interconnectivity of Coagulation and the Immune System. *Surg Infect (Larchmt)*. 2018;19(2):208-215. doi:10.1089/sur.2017.260
80. Coopersmith CM, De Backer D, Deutschman CS, et al. Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Sepsis and Septic Shock. *Crit Care Med*. 2018;46(8):1334-1356. doi:10.1097/CCM.0000000000003225
81. Barrier KM. Summary of the 2016 International Surviving Sepsis Campaign: A Clinician's Guide. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2018;30(3):311-321. doi:10.1016/j.cnc.2018.04.001
82. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(6):1605-1608. doi:10.1210/jcem.79.6.7989463
83. Müller B, White JC, Nylén ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1):396-404. doi:10.1210/jcem.86.1.7089
84. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):609-634. doi:10.1128/CMR.00016-12
85. Reinhart K, Meisner M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. *Crit Care Clin*. 2011;27(2):253-263. doi:10.1016/j.ccc.2011.01.002
86. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(5):426-435. doi:10.1016/S1473-3099(12)70323-7
87. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7):819-827. doi:10.1016/S1473-3099(16)00053-0
88. Claxton AJ, Thompson-Leduc P, Kirson NY, et al. Efficacy and Safety of Procalcitonin Guidance in Patients With Suspected or Confirmed Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis: Author Correction. *Crit Care Med*. 2018;46(9):1560. doi:10.1097/CCM.0000000000003308
89. Schuetz P, Bolliger R, Merker M, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy algorithms for different types of acute respiratory infections based on previous trials. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(7):555-564. doi:10.1080/14787210.2018.1496331
90. Spinetti T, Meisel C, von Gunten S, Schefold JC. Immune biomarker-based enrichment in sepsis trials. *Crit Care*. 2020;24(1):58. doi:10.1186/s13054-020-2774-1

91. A Randomized Trial of Protocol-Based Care for Early Septic Shock. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1683-1693. doi:10.1056/NEJMoa1401602
92. ARISE Investigators, ANZICS Clinical Trials Group, Peake SL, et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1496-1506. doi:10.1056/NEJMoa1404380
93. Mouncey PR, Osborn TM, Power GS, et al. Protocolised Management In Sepsis (ProMiSe): a multicentre randomised controlled trial of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of early, goal-directed, protocolised resuscitation for emerging septic shock. *Health Technol Assess*. 2015;19(97):i-150. doi:10.3310/hta19970
94. Baghdadi JD, Brook RH, Uslan DZ, et al. Association of a Care Bundle for Early Sepsis Management With Mortality Among Patients With Hospital-Onset or Community-Onset Sepsis. *JAMA Intern Med*. 2020;180(5):707-716. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0183
95. Moreira H, Sinert R. How Effective Is the Early Management Bundle for Severe Sepsis/Septic Shock? *JAMA Intern Med*. Published online April 6, 2020. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0180
96. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017;43(3):304-377. doi:10.1007/s00134-017-4683-6
97. Finfer S, Myburgh J, Bellomo R. Intravenous fluid therapy in critically ill adults. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(9):541-557. doi:10.1038/s41581-018-0044-0
98. Semler MW, Self WH, Wanderer JP, et al. Balanced Crystalloids versus Saline in Critically Ill Adults. *N Engl J Med*. 2018;378(20):1951. doi:10.1056/NEJMc1804294
99. Yunus NM, Bellomo R, Hegarty C, Story D, Ho L, Bailey M. Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA*. 2012;308(15):1566-1572. doi:10.1001/jama.2012.13356
100. Sterling SA, Miller WR, Pryor J, Puskas MA, Jones AE. The Impact of Timing of Antibiotics on Outcomes in Severe Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-analysis. *Crit Care Med*. 2015;43(9):1907-1915. doi:10.1097/CCM.0000000000001142
101. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med*. 2017;376(23):2235-2244. doi:10.1056/NEJMoa1703058
102. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, et al. Timing of Specimen Collection for Blood Cultures from Febrile Patients with Bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1381-1385. doi:10.1128/JCM.02033-07
103. Asfar P, Meziani F, Hamel J-F, et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2014;370(17):1583-1593. doi:10.1056/NEJMoa1312173
104. Holst LB, Haase N, Wetterslev J, et al. Lower versus higher hemoglobin threshold for transfusion in septic shock. *N Engl J Med*. 2014;371(15):1381-1391. doi:10.1056/NEJMoa1406617
105. Sprung CL, Annane D, Keh D, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2008;358(2):111-124. doi:10.1056/NEJMoa071366

106. Venkatesh B, Finfer S, Cohen J, et al. Adjunctive Glucocorticoid Therapy in Patients with Septic Shock. *N Engl J Med*. 2018;378(9):797-808. doi:10.1056/NEJMoA1705835
107. Annane D, Renault A, Brun-Buisson C, et al. Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N Engl J Med*. 2018;378(9):809-818. doi:10.1056/NEJMoA1705716
108. Domizi R, Adrario E, Damiani E, et al. IgM-enriched immunoglobulins (Pentaglobin) may improve the microcirculation in sepsis: a pilot randomized trial. *Ann Intensive Care*. 2019;9(1):135. doi:10.1186/s13613-019-0609-5
109. Briegel J, Möhnle P. [International guidelines from the Surviving Sepsis Campaign : 2016 update]. *Anaesthesist*. 2017;66(7):530-538. doi:10.1007/s00101-017-0299-z
110. Schaer DJ, Buehler PW. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(6). doi:10.1101/cshperspect.a013433
111. Alayash AI, Andersen CBF, Moestrup SK, Bülow L. Haptoglobin: the hemoglobin detoxifier in plasma. *Trends Biotechnol*. 2013;31(1):2-3. doi:10.1016/j.tibtech.2012.10.003
112. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;2(51):51ra71. doi:10.1126/scitranslmed.3001118
113. Vermeulen Windsant IC, de Wit NC, Sertorio JT, et al. Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study. *Crit Care*. 2012;16(3):R95. doi:10.1186/cc11359
114. Meegan JE, Shaver CM, Putz ND, et al. Cell-free hemoglobin increases inflammation, lung apoptosis, and microvascular permeability in murine polymicrobial sepsis. *PLoS ONE*. 2020;15(2):e0228727. doi:10.1371/journal.pone.0228727
115. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276-1284. doi:10.1182/blood-2012-11-451229
116. Woźnica EA, Inglot M, Woźnica RK, Łysenko L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(4):547-551. doi:10.17219/acem/68363
117. Marik PE. Fever in the ICU. *CHEST*. 2000;117(3):855-869. doi:10.1378/chest.117.3.855
118. Boulant JA. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*. 2000;31 Suppl 5:S157-161. doi:10.1086/317521
119. Clemmer TP, Fisher CJ, Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1992;20(10):1395-1401. doi:10.1097/00003246-199210000-00006
120. Young PJ, Saxena M, Beasley R, et al. Early peak temperature and mortality in critically ill patients with or without infection. *Intensive Care Med*. Published online January 31, 2012. doi:10.1007/s00134-012-2478-3
121. Kushimoto S, Abe T, Ogura H, et al. Impact of Body Temperature Abnormalities on the Implementation of Sepsis Bundles and Outcomes in Patients With Severe Sepsis: A Retrospective Sub-Analysis of the Focused Outcome Research on Emergency Care for Acute

- Respiratory Distress Syndrome, Sepsis and Trauma Study. *Crit Care Med.* 2019;47(5):691-699. doi:10.1097/CCM.0000000000003688
122. Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, et al. Monocyte Function and Clinical Outcomes in Febrile and Afebrile Patients With Severe Sepsis. *Shock.* 2018;50(4):381-387. doi:10.1097/SHK.0000000000001083
 123. Young PJ, Saxena MK, Bellomo R, et al. The HEAT trial: a protocol for a multicentre randomised placebo-controlled trial of IV paracetamol in ICU patients with fever and infection. *Crit Care Resusc.* 2012;14(4):290-296.
 124. FOGLIO ILLUSTRATIVO: INFORMAZIONI PER L'UTILIZZATORE PERFALGAN 10 mg/ml soluzione per infusione. Accessed June 7, 2020. https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_001401_035475_FI.pdf&retry=0&sys=m0b113
 125. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology.* 2005;42(6):1364-1372. doi:10.1002/hep.20948
 126. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17063-17068. doi:10.1073/pnas.0708160104
 127. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA.* 2005;293(13):1653-1662. doi:10.1001/jama.293.13.1653
 128. A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of Severe Sepsis - PubMed. Accessed May 15, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20881280/>
 129. Tam SC, Wong JT. Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med.* 1988;111(2):189-193.
 130. Simoni J, Simoni G, Hartsell A, Feola M. An improved blood substitute. In vivo evaluation of its renal effects. *ASAIO J.* 1997;43(5):M714-725.
 131. Hartmann M, de Groot H. Cell-Free Hemoglobin: A New Player in Sepsis Pathophysiology. *Critical Care Medicine.* 2013;41(8):e186. doi:10.1097/CCM.0b013e31828e92ac
 132. Adamzik M, Hamburger T, Petrat F, Peters J, de Groot H, Hartmann M. Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Crit Care.* 2012;16(4):R125. doi:10.1186/cc11425
 133. Thomas AM, Gerogianni A, McAdam MB, et al. Complement Component C5 and TLR Molecule CD14 Mediate Heme-Induced Thromboinflammation in Human Blood. *J Immunol.* 2019;203(6):1571-1578. doi:10.4049/jimmunol.1900047
 134. Boutaud O, Moore KP, Reeder BJ, et al. Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(6):2699-2704. doi:10.1073/pnas.0910174107
 135. Janz DR, Bastarache JA, Rice TW, et al. Randomized, placebo-controlled trial of acetaminophen for the reduction of oxidative injury in severe sepsis: the Acetaminophen for the Reduction of Oxidative Injury in Severe Sepsis trial. *Crit Care Med.* 2015;43(3):534-541. doi:10.1097/CCM.0000000000000718

136. Mehboob H, Tahir IM, Iqbal T, Saleem S, Perveen S, Farooqi A. Effect of UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A Polymorphism (rs8330 and rs10929303) on Glucuronidation Status of Acetaminophen. *Dose Response*. 2017;15(3):1559325817723731. doi:10.1177/1559325817723731
137. RauchsSchwalbe SK, Zühlsdorf MT, Wensing G, Kuhlmann J. Glucuronidation of acetaminophen is independent of UGT1A1 promoter genotype. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2004;42(2):73-77. doi:10.5414/cpp42073
138. Court MH, Freytsis M, Wang X, et al. The UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A polymorphism c.2042C>G (rs8330) is associated with increased human liver acetaminophen glucuronidation, increased UGT1A exon 5a/5b splice variant mRNA ratio, and decreased risk of unintentional acetaminophen-induced acute liver failure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;345(2):297-307. doi:10.1124/jpet.112.202010
139. Court MH, Zhu Z, Masse G, et al. Race, Gender, and Genetic Polymorphism Contribute to Variability in Acetaminophen Pharmacokinetics, Metabolism, and Protein-Adduct Concentrations in Healthy African-American and European-American Volunteers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;362(3):431-440. doi:10.1124/jpet.117.242107
140. Parker SL, Saxena M, Gowardman J, Lipman J, Myburgh J, Roberts JA. Population pharmacokinetics of intravenous paracetamol in critically ill patients with traumatic brain injury. *Journal of Critical Care*. 2018;47:15-20. doi:10.1016/j.jcrc.2018.05.016
141. the PACIA** study group, Allegaert K, Olkkola KT, et al. Covariates of intravenous paracetamol pharmacokinetics in adults. *BMC Anesthesiol*. 2014;14(1):77. doi:10.1186/1471-2253-14-77
142. Giamarellos-Bourboulis EJ, Spyridaki A, Savva A, et al. Intravenous paracetamol as an antipyretic and analgesic medication: the significance of drug metabolism. *J Pharmacol Sci*. 2014;124(2):144-152. doi:10.1254/jphs.13133fp
143. Gregoire N, Hovsepian L, Gualano V, Evane E, Dufour G, Gendron A. Safety and pharmacokinetics of paracetamol following intravenous administration of 5 g during the first 24 h with a 2-g starting dose. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(3):401-405. doi:10.1038/sj.clpt.6100064
144. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;569(1):101-110. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021
145. Krajčová A, Matoušek V, Duška F. Mechanism of paracetamol-induced hypotension in critically ill patients: a prospective observational cross-over study. *Aust Crit Care*. 2013;26(3):136-141. doi:10.1016/j.aucc.2012.02.002
146. Chiam E, Weinberg L, Bailey M, McNicol L, Bellomo R. The haemodynamic effects of intravenous paracetamol (acetaminophen) in healthy volunteers: a double-blind, randomized, triple crossover trial. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81(4):605-612. doi:10.1111/bcp.12841

RINGRAZIAMENTI

Questa tesi è il prodotto di tanti fattori di cui io personalmente rappresento sì e no l'1%. Studiare tutti questi anni mi ha insegnato l'importanza e il ruolo della statistica e dei numeri, ma anche che oltre all'1%, sul quale è più facile focalizzarsi ci sta un altro 99% che è sempre presente anche se silente. In questa parte della mia tesi voglio parlare di quel 99% che ha permesso il raggiungimento di questo traguardo.

Ringrazio il Professor Donati che, per noi studenti, è sempre un punto di riferimento presente e dedicato. Non esiste problema a cui non trovi una soluzione, e la sua dedizione all'insegnamento e alla ricerca ha permesso a me e ad altri, di abbracciare, e sentirci parte di questo mondo complesso con le spalle coperte.

Ringrazio Roberta e Claudia che nelle diverse fasi di approccio alla rianimazione oltre che allo studio condotto nella tesi sono state sempre presenti e disponibili per suggerimenti oltre che fonte di ispirazione: molto si impara guardandovi lavorare. È stato bello condividere momenti a tema anche al di fuori della rianimazione e della ricerca clinica nei giorni dedicati alla sensibilizzazione nei confronti della Sepsis.

Ringrazio Camilla che dal primo giorno è stata la mia mano dal cielo, non solo da un punto di vista pratico, ma soprattutto umano; lo stesso vale per Erika, anche se ci conosciamo meno. Ho avuto modo di creare dei legami forti che mi hanno arricchito molto e spero di mantenere intatti a prescindere dalle strade che ognuna di noi intraprenderà.

Ringrazio anche Alberto, Paolo e Andrea, con i quali nelle diverse fasi del lavoro si sono costruite amicizie che hanno reso i reclutamenti, l'analisi e la raccolta dati dei momenti di crescita e collaborazione, nonostante le festività e gli orari imprevedibili.

Infine, *“Chi Fa Può Sbagliare, Chi Non Fa Non Sbaglia Mai”* è stata una delle cose che ho imparato in questi due anni in rianimazione e se la prima parte tendeva a bloccarmi, gli infermieri, gli specializzandi e i medici della Clinica di Anestesia e Rianimazione Generale, Respiratoria e del Trauma Maggiore dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona mi hanno supportato e ancora più spesso sopportato con pazienza e interesse nel percorso di apprendimento. Grazie.