

Indice

Capitolo 1 - LA SEPSI	3
1.1 EPIDEMIOLOGIA	3
1.2 DEFINIZIONI	4
1.3 BASI FISIOPATOLOGICHE DELLA SEPSI	6
1.4 LA COAGULOPATIA NELLA SEPSI	13
1.5 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE : SIC e DIC SCORE	16
1.6 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE: ANALISI STANDARD	18
1.7 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE: TROMBOELASTOGRAFIA	20
1.8 RUOLO DELL'ENDOTELIO	23
1.9 IL MICROCIRCOLO	28
1.10 MICROCIRCOLO E OSSIGENAZIONE TISSUTALE	29
1.11 IL MICROCIRCOLO NEL PAZIENTE SETTICO	34
1.12 VALUTAZIONE DEL MICROCIRCOLO: METODICHE DI VALUTAZIONE DIRETTA	37
1.13 VALUTAZIONE DEL MICROCIRCOLO: METODICHE DI VALUTAZIONE INDIRETTA	39
Capitolo 2 - IPOTESI ED OBIETTIVI DELLO STUDIO	43
Capitolo 3 - MATERIALI E METODI	44
Capitolo 4 - RISULTATI	51
Capitolo 5 - DISCUSSIONE e CONCLUSIONE	62
RINGRAZIAMENTI	64
BIBLIOGRAFIA	65

Capitolo 1 - LA SEPSI

1.1 EPIDEMIOLOGIA

La sepsi è una malattia comune nelle Unità di Terapia Intensiva accompagnata da morbilità e mortalità rilevanti. Ad oggi non esiste una terapia specifica per la sepsi, solo una diagnosi precoce e un rapido intervento terapeutico possono migliorare l'esito dei pazienti.

La sepsi è un importante problema di salute pubblica la cui elevata incidenza fa sì che rimanga una delle principali cause di morte a livello globale.

La maggior parte dei dati che descrivono l'incidenza della sepsi provengono da paesi ad alto reddito, dove 2,8 milioni di decessi all'anno sono attribuibili alla sepsi. Nel Regno Unito la prevalenza riportata di sepsi nelle Unità di Terapia Intensiva è del 27%, mentre negli Stati Uniti è del 12%; questa differenza nei dati è, in parte, spiegata dal numero sostanzialmente maggiore di letti disponibili in terapia intensiva negli Stati Uniti rispetto al Regno Unito e, in parte, dai diversi modelli di triage e ammissione nelle Unità Intensive.

L'incidenza della condizione settica è in continuo aumento, ciò sembra legato all'invecchiamento della popolazione, al largo uso di antibiotici che ha condotto allo sviluppo di patogeni multi-resistenti, all'aumento della sopravvivenza di pazienti affetti da patologie croniche e al costante miglioramento delle tecniche di supporto alle funzioni vitali (cateteri a permanenza, ventilazioni meccaniche molto spesso fonti esse stesse di infezione).

L'incidenza, quindi, continuerà ad aumentare ma, nonostante ciò, si pensa che la portata del problema sia molto più ampia di quella riportata in letteratura.

La principale causa eziologica, 60% dei casi, è legata ad infezioni batteriche o fungine che, di norma, non causerebbero alcuna risposta sistemica in soggetti immunocompetenti. Gli agenti patogeni più comunemente rilevati sono Gram- quali *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Klebsiella*; anche i Gram+ seppur in percentuale minore possono essere iniziatori del processo settico, fra di essi ricordiamo lo *Staphylococcus Aureus*, lo *Staphylococcus Epidermidis*, lo *Streptococcus Pneumoniae*. Sussiste un 40% di casi in cui l'agente eziologico è sconosciuto oppure si

ritiene che il processo infiammatorio sistemico sia legato a trauma o lesione di altra origine.

I siti più comuni in ordine di frequenza da cui parte l'infezione sono: polmoni (64%), cavità addominale (20%), infezioni primitive del circolo ematico (15%) e tratto genito-urinario (14%). [1] [2]

1.2 DEFINIZIONI

La sepsi viene definita come una disfunzione d'organo pericolosa per la vita causata da una disregolata risposta dell'ospite all'infezione.

Questa definizione è resa clinicamente operativa mediante l'utilizzo del punteggio SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) il quale quantifica l'insufficienza d'organo.

L'insufficienza d'organo non dovrebbe essere vista come un fenomeno "tutto o nulla", bensì come un continuum di alterazioni con vari gradi di severità, la disfunzione d'organo è infatti un processo dinamico che può variare nel tempo. Il SOFA score permette una valutazione regolare della funzione degli organi così da riuscire a seguire l'andamento della malattia nel tempo mediante l'utilizzo di variabili semplici e specifiche per l'organo analizzato.

Il SOFA valuta sei sistemi di organi e attribuisce a ciascuno di essi un punteggio che va da 0 a 4, la somma dei sei punteggi determina il SOFA score totale. Esso prende in considerazione la funzione respiratoria (PaO_2/FiO_2), la coagulazione (conta piastrinica), la funzionalità epatica (bilirubina), la funzione cardiovascolare (PAM ed eventuale somministrazione di vasopressori), lo stato del sistema nervoso centrale (Glasgow Coma Scale) e la funzionalità renale (creatinina e diuresi delle 24h).

In particolare si parla di disfunzione d'organo quando il punteggio SOFA è aumentato di 2 o più punti rispetto al basale (il basale è pari a 0 nei pazienti senza alcuna disfunzione d'organo precedentemente nota). [4]

SOFA score					
	0	1	2	3	4
Funzione respiratoria (PaO ₂ / FiO ₂)	>400	≤400	≤300	≤200 con supporto respiratorio	≤100 con supporto respiratorio
Coagulazione (Piastrine x 10 ³ /mm ³)	>150	≤150	≤100	≤50	≤20
Funzione epatica (Bilirubina in mg/dl o μmol/l)	<1,2 <110	1,2-1,9 20-32	2,0-5,9 33-101	6,0-11,9 102-204	>12,0 >204
Funzione cardiovascolare	No ipotensione	MAP <70mmHg	Dopamina ≤5μg/kg/min o Dobutamina (qualsiasi dose)	Dopamina >5μg/kg/min o Adrenalina ≤0,1μg/kg/min o Noradrenalina ≤0,1μg/kg/min	Dopamina >15μg/kg/min o Adrenalina >0,1μg/kg/min o Noradrenalina >0,1μg/kg/min
Sistema nervoso centrale (Glasgow Coma Scale)	15	13-14	10-12	6-9	<6
Funzione renale (Creatinina in mg/dl o in μmol/l o Output urine in ml/24h)	<1,2 <110	1,2-1,9 110-170	2,0-3,4 171-299	3,5-4,9 300-440 <500	>5,0 >440 <200

Lo shock settico è, invece, un sottogruppo della sepsi in cui anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche sono associate a maggior rischio di mortalità; nella sepsi il tasso di mortalità ospedaliera si aggira intorno al 40%. In questi pazienti la concentrazione sierica di lattato è elevata, superiore a 2 mmol/l e, nonostante un adeguato riempimento volemico, necessitano dell'utilizzo di un vasopressore per mantenere una PAM di 65 mmHg o superiore. [3]

In ambiente non intensivo (extra-ospedaliero, reparto ospedaliero generale o pronto soccorso) si può utilizzare il qSOFA (quick SOFA) per identificare i pazienti con sospetta infezione ad alto rischio di mortalità. Si definisce ad alto rischio un paziente che soddisfa almeno due dei tre seguenti criteri: alterazione dello stato mentale, frequenza respiratoria maggiore di 22 atti/min, pressione arteriosa sistolica di 100 mmHg o inferiore.

I pazienti che rispettano almeno due dei criteri sopra proposti hanno maggior rischio di ricovero in ICU e di mortalità intraospedaliera. [5]

1.3 BASI FISIOPATOLOGICHE DELLA SEPSI

L'infiammazione è la risposta che i tessuti connettivi vascolarizzati attuano in condizioni di danno con lo scopo di limitare e contenere la causa del danno stesso. La risposta viene innescata da tre tipi di segnali: la presenza di agenti infettivi o loro prodotti, il danno cellulare e tissutale con rilascio di segnali di allarme, il dismetabolismo con accumulo anomalo di molecole endogene. Il significato, quindi, della risposta infiammatoria è quello di difendersi dal patogeno, favorire un riparo tissutale e promuovere il ritorno a condizioni omeostatiche. A bilanciare la risposta infiammatoria è l'attivazione di meccanismi antiinfiammatori, essenziali nell'evitare l'insorgenza di danni eccessivi a carico dell'ospite.

La sepsi si sviluppa quando la risposta iniziale e appropriata dell'ospite a un'infezione o a un danno tissutale viene amplificata e, successivamente, si disregola.

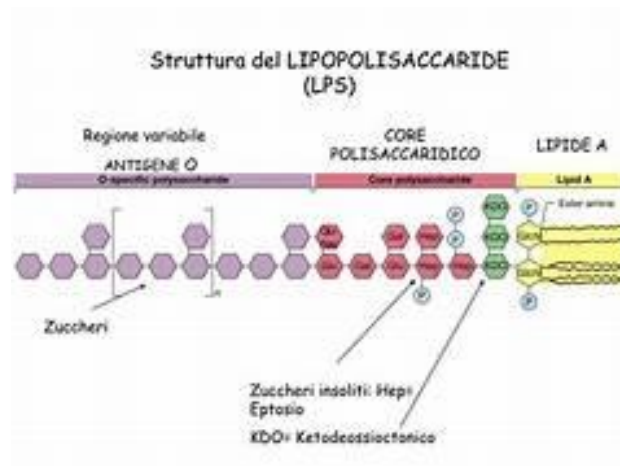
Un'interruzione dell'equilibrio infiammatorio è vista come la caratteristica più critica nella patogenesi della sepsi, vi è una risposta immunitaria complessa che cambia nel

tempo attraverso meccanismi pro-infiammatori e antinfiammatori che si susseguono senza uno schema preciso. In passato si pensava che il decorso temporale della sepsi consistesse in uno stato iper-infiammatorio iniziale che passava a uno stato ipo-infiammatorio portando, infine, a un'immunosoppressione prolungata e significativa. In termini di parole accoppiate, la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) e la sindrome da risposta antinfiammatoria compensativa (CARS) simboleggiavano questo paradigma. Ad oggi, studi recenti hanno dimostrato che l'infiammazione e l'immunosoppressione si verificano contemporaneamente e non in sequenza.

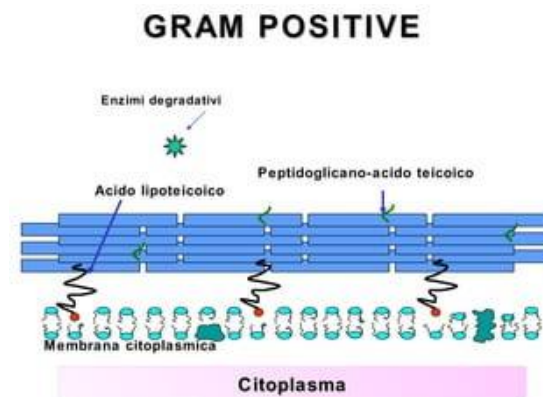
Si approfondiscono, quindi, quali sono i pilastri dei meccanismi pro-infiammatori e antinfiammatori.

Ci sono componenti strutturali batteriche condivise da diverse classi microbiche responsabili dell'avvio del processo infiammatorio; esse vengono riconosciute dal sistema immunitario innato e vengono chiamate PAMPs (Pathogen- Associated Molecular Patterns).

Nei batteri Gram negativi il lipopolisaccaride LPS ha il ruolo di PAMP, esso si trova sul foglietto esterno della membrana esterna di questa classe batterica, l'LPS è una grande molecola costituita da tre porzioni: il lipide A fulcro della bioattività dell'LPS, un core oligosaccaridico e la catena polisaccaridica costituente l'antigene O.



Nei batteri Gram positivi il peptidoglicano e l'acido lipoteicoico possono legare i PRR (approfonditi in seguito) comportandosi come agenti pro-infiammatori.



Quando l'organismo deve fronteggiare un agente infettivo o un danno ai tessuti mette in atto meccanismi di difesa mediati dall'immunità innata, il cui paradigma funzionale è rappresentato da sistemi di molecole recettoriali PRR (Pattern Recognition Receptors). Questi recettori riconoscono la presenza di patogeni o di tessuti danneggiati in comparti diversi: nei liquidi biologici (mediante recettori solubili), nel contesto delle membrane plasmatiche (mediante recettori di membrana), nel citoplasma (mediante sensori citoplasmatici), nei fago-lisosomi.

Nel dettaglio:

- I recettori solubili dell'immunità innata comprendono fattori della cascata del complemento (in particolare C3), la proteina legante il mannosio MBP (il mannosio è un residuo presente della membrana di molte specie batteriche), le proteine A e D del surfactante rispettivamente SP-A e SP-D, le ficoline (specifiche nell'attivazione del complemento contro i Gram+) e le pentrassine.

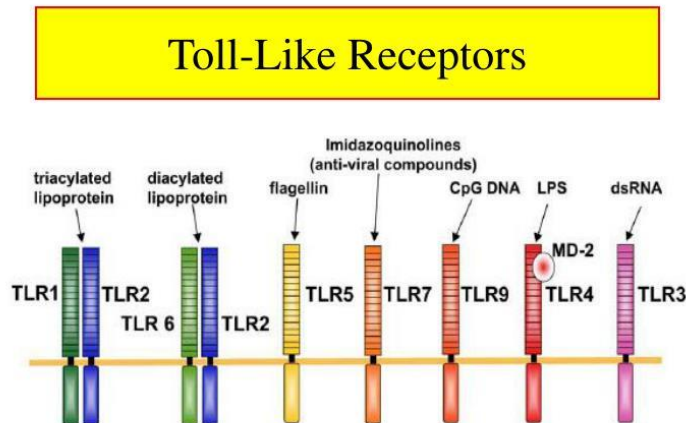
L'SP-A e SP-D sono presenti nel liquido che riveste gli alveoli polmonari già in condizioni fisiologiche, ma aumentano di molto durante la risposta infiammatoria facendo parte delle proteine di "fase acuta", così come aumentano i livelli di MBP in caso di infezione batterica e i livelli di Proteina C Reattiva (PCR) una pentrassina corta prodotta dal fegato.

Queste molecole funzionano come anticorpi primitivi, perciò vengono chiamate anche "ante-antibodies". Oltre a riconoscere componenti di strutture microbiche che rappresentano il non-self, ci sono proteine come le

pentrassine corte e lunghe che riconoscono il self come cellule apoptotiche e materiale nucleare di cellule morte facilitandone l'eliminazione.

In ogni caso, dopo il riconoscimento dell'antigene, questi recettori mediano il processo dell'opsonizzazione e successiva fagocitosi. L'attivazione del complemento si traduce nel rilascio di piccoli frammenti di attivazione noti come anafilatossine, in particolare C3a e C5a, che hanno potenti effetti pro-infiammatori quali: il reclutamento e l'attivazione di leucociti, cellule endoteliali e piastrine. Sebbene l'attivazione del complemento sia una componente essenziale dell'immunità protettiva, l'attivazione incontrollata del complemento può causare danni ai tessuti e insufficienza d'organo.

- I recettori di membrana dell'immunità innata e dell'infiammazione sono strutturalmente eterogenei e appartengono a famiglie molecolari diverse. I recettori della famiglia Toll (TLR = Toll Like Receptors) costituiscono la classe più importante di recettori; nell'uomo sono stati identificati dieci TLR che formano omo o eterodimeri, tutti caratterizzati da un dominio citoplasmatico TIR (Toll/IL-1 Receptors Domain).



- Eterodimeri costituiti da TLR2-TLR6 o TLR1-TLR2 riconoscono i proteoglicani della parete dei Gram+, costituenti dei funghi, micoplasmi, micobatteri e spirochete.

- I TLR5 riconoscono la flagellina, componente proteica del flagello batterico.

- TLR3 riconosce l'RNA a doppia elica tipico delle infezioni virali.

-TLR7 e TLR8 riconosce RNA microbico.

-TLR9 riconosce DNA batterico con isole CpG.

-Il TLR4 coopera con il CD14 e con la proteina accessoria MD2 riconoscendo l'LPS, come pure l'acido lipoteicoico dei Gram-positivi e componenti self come la proteina di Shock termico HSP 60.

Il CD14 è un recettore dell'immunità innata che è presente sia in forma libera nei liquidi biologici sia associata alla membrana. Il CD14 non è, però, una proteina integrale di membrana, bensì è legato ad essa mediante un'ancora di GPI, esso riconosce le componenti microbiche grazie all'azione di altre molecole: LPS è riconosciuto dall'LBP (LPS Binding Protein); LBP presenta LPS al CD14 che fa parte del complesso recettoriale costituito da TLR4, elemento chiave nella trasduzione del segnale intracellulare.

Il CD14 è presente solo sulla membrana dei fagociti, tuttavia nella sua forma libera solubile è capace di presentare LPS ai recettori TLR4 presenti sull'endotelio. In questo modo, l'endotelio vascolare diventa responsivo a prodotti microbici e ciò è il fulcro della risposta infiammatoria locale e, in particolar modo, di quella sistemica.

- PRR citoplasmatici riconoscono patogeni intracellulari e molecole di danno. Le prime identificate furono le molecole NOD costituite da un dominio LRR (regione ricca di leucine che riconosce il ligando), un dominio NATCH di oligomerizzazione di più recettori, un dominio effettrice TIR. Nel dettaglio si parla di "segnalosoma di NOD" che lavora in modi diversi in base al tipo di dominio effettrice, in particolare si riconoscono 3 sottofamiglie: NLRB (dominio BIR), NLRC (dominio CARD), NLRP (dominio Pyrin).

Se l'unità effettrice è CARD: LRR riconosce i prodotti di degradazione batterica, NATCH oligomerizza più recettori NOD e CARD recluta le chinasi come RIP2 essenziale nell'attivazione di NF-KB portando alla produzione di IL-1 e TNF.

Se l'unità effettrice è PYRIN, tipica di NOD1 e NOD2: LRR riconosce la componente patogena e NATCH dimerizza due unità NOD con dominio

Pyrin. Ogni effettore Pyrin richiama una molecola ASC costituita a sua volta da un dominio Pyrin e uno CARD, il quale richiama la Procaspasi-1 anch'essa costituita da un dominio CARD. Si forma così l'inflammosoma. Nel momento in cui la pro-caspasi-1 si lega al complesso, grazie ad un taglio proteolitico, libera la caspasi1 che a sua volta attiva l'IL-1.

Il danno tissutale, il riconoscimento di patogeni, l'attivazione cellulare da parte di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 e TNF conducono alla liberazione di NF-KB. Come modello si considera il TLR4 attivato dall'LPS per capire come viene indotto un programma genetico pro-infiammatorio. L'attivazione del TLR4 porta al reclutamento di diverse molecole adattatrici ad opera del dominio TIR. La più importante proteina adattatrice è MyD88 che è reclutata da tutti i membri della famiglia TLR e da tutti i recettori della famiglia IL-1 (perciò la cascata di trasduzione mediata da TLR e da IL-1R è simile). MyD88 è, a sua volta, costituito da un dominio TIR e da un secondo dominio DD capace di reclutare alcune chinasi denominate IRAK. Le IRAK reclutate fosforilano un secondo adattatore, TRAF6, il quale media la liberazione di due chinasi complessate con NEMO. Queste due chinasi (IKK1 e IKK2) effettrici fosforilano IKB liberando p50 e p65, principali membri della famiglia NF-KB.

Il complesso p50- p65 migra nel nucleo dove si lega ai siti di consenso NF-KB situati a monte di diversi geni infiammatori: citochine e chemochine pro-infiammatorie, molecole di adesione endoteliale, enzimi che producono molecole effettrici (NO sintasi inducibile, COX di tipo II), molecole che avviano la cascata della coagulazione come il TF.

Focalizzando l'attenzione sul ruolo che hanno le citochine pro-infiammatorie IL-1 e TNF si può comprendere come il processo infiammatorio locale si amplifichi e diventi un processo sistemico con genesi di un danno tissutale e iperinfiammazione sostenuta.

IL-1 è prodotta da monociti e macrofagi sotto stimolo pro-infiammatorio (come visto in precedenza), ma è anche sostenuta dall'IL-1 stessa e dal TNF che innescano un meccanismo di amplificazione del processo.

Il-1 agisce nella differenziazione in senso leucocitario delle cellule emopoietiche; è un pirogeno endogeno che agisce a livello ipotalamico in maniera indiretta (producendo prima IL-6); è una citochina ad azione anoressizzante sul SNC; a livello ipotalamico

stimola i releasing factors inducendo ACTH con successiva produzione di ormoni glucocorticoidi capaci di spegnere la risposta infiammatoria; infine a livello endoteliale IL-1 induce la produzione di chemochine che facilitano il reclutamento leucocitario, sintetizza PGI₂ e NO con azione vasodilatatoria, il TF con azione pro trombotica, inibisce la Proteina C e la trombomodulina. Si può quindi concludere che l'IL-1 ha azione pro-trombotica oltre che pro-infiammatoria .

Esistono anche dei meccanismi che antagonizzano l'azione di IL-1 come:

- Il falso recettore anche detto “decoy-receptors” che lega IL-1 in fase liquida o alla membrana, nel primo caso lo sequestra riducendone la concentrazione in circolo, nel secondo caso evita la trasduzione di qualsiasi segnale.
- Antagonista recettoriale IL-1ra (receptor antagonist) che viene prodotto dalle stesse cellule che producono IL-1 e mima l'azione di questa citochina legando l'IL-1R ma senza indurre alcun pathway intracellulare.

Fra le altre citochine con meccanismo antiinfiammatorio è bene ricordare l'IL-10, la sua produzione è stimolata da IL-4, IL-13, glucocorticoidi. L'IL-10 è prodotta dalle stesse cellule e dagli stessi stimoli che inducono la produzione di IL-1 e TNF con la piccola differenza che viene prodotto tardivamente rispetto a questi. IL-10 ha lo stesso scopo di spegnere la produzione di IL-1B, TNF e IL-6.

Anche il TGF- β ha azione antiinfiammatoria limitando la proliferazione dei linfociti e l'attività di altri leucociti. [6] [7]

Riepilogando, se la risposta dell'ospite a un agente patogeno in moltiplicazione ha successo, ne consegue una risposta immunitaria equilibrata che elimina l'infezione. Tuttavia, in alcuni casi gli agenti patogeni possono eludere i meccanismi di difesa immunitaria e il crescente carico di agenti patogeni può sopraffare i PRR già attivati e sbilanciare la risposta dell'ospite. Di conseguenza, i PRR sono costantemente stimolati e i meccanismi infiammatori protettivi e antinfiammatori diventano distruttivi, portando a lesioni tissutali e sepsi. L'infiammazione nella sepsi è guidata principalmente da leucociti, citochine (si parla di “tempesta citochinica”), radicali dell'ossigeno, cellule endoteliali attivate e sistema del complemento. Nello specifico approfondiremo il ruolo svolto dal sistema della coagulazione nel processo settico.

1.4 LA COAGULOPATIA NELLA SEPSI

Esiste una complessa relazione tra infiammazione e coagulazione.

Le anomalie della coagulazione vanno da un semplice calo della conta piastrinica fino alla coagulazione intravascolare disseminata (DIC), entrambe sono un evento comune nel paziente settico e sono state associate ad un aumento della mortalità. Nella sepsi c'è un'importante attivazione della coagulazione da parte del Fattore Tissutale (TF) e una contemporanea depressione dei meccanismi inibitori della coagulazione nonché del sistema fibrinolitico. Se dapprima questo processo è un fenomeno locale volto a contenere il patogeno, presto si trasforma in un fenomeno disseminato sistemico con formazione di trombi microvascolari che disturbano il microcircolo e che promuovono la disfunzione d'organo.

Il sistema di coagulazione vede come protagonista il TF, esso complessato con il fattore VIIa e con gli ioni Ca^{++} risulta enzimaticamente attivo. Questa tenasi estrinseca non solo attiva il fattore X, ma promuove anche la conversione del fattore IX in fattore IXa generando, così, un co-stimolatore dell'attivazione del fattore X. Infatti il fattore IXa complessato con il fattore VIIIa (esso è attivato dalla trombina, non ha alcuna attività enzimatica ma è un essenziale cofattore) sono capaci di attivare il fattore X.

Ora che il fattore X è attivato, si forma il complesso pro-trombinasico dove il fattore V, che viene attivato da quote fisiologicamente disciolte di trombina, adatta il fattore Xa sui fosfolipidi di membrana. A questo punto avviene la conversione della protrombina in trombina con successiva formazione di fibrina a partire dal fibrinogeno. La trombina attiva anche il fattore XIII, che stabilizza il coagulo di fibrina grazie alla formazione di legami crociati che lo rendono maggiormente resistente alla degradazione mediata dalla plasmina.

Un altro fattore importante nella stabilizzazione del coagulo è la TAFI, l'inibitore della fibrinolisi attivato dalla trombina; questa proteina limita l'attività della plasmina mediante la rimozione di alcuni amminoacidi nel contesto della fibrina essenziali per far aderire e funzionare la plasmina stessa.

Generalmente la plasmina si forma a partire dal plasminogeno, ad attivare questo zimogeno sono proteasi come l'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA) prodotto da cellule endoteliali e l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (u-PA),

che è il principale attivatore in sede extracellulare (ad esempio negli alveoli). Il t-PA ha bassa affinità per il plasminogeno in fase liquida ma alta affinità quando il t-PA è legato alla fibrina. Ricordiamo che questo sistema può essere inibito in due modi:

- mediante PAI-1 che è l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno, esso si lega a t-PA e u-PA, è prodotto dalle cellule endoteliali e dal sistema monocitico-macrofagico in condizioni pro-infiammatorie.
- mediante alfa2-antiplasmina che lega la plasmina.

L'inizio e la successiva amplificazione della coagulazione sono strettamente regolati dai sistemi anticoagulanti. La fase di avvio è principalmente regolata dal TFPI, mentre la fase di amplificazione è moderata dall'Antitrombina AT e dalla Proteina C attivata.

Il Tissue Factor Pathway Inhibitor TFPI inibisce il complesso TF/fattore VIIa prima che venga prodotto abbastanza fattore Xa. Se lo stimolo per produrre trombina è sufficiente, TFPI ritarda semplicemente il processo di formazione della trombina che avviene comunque, indipendentemente dalla presenza di TFPI. Se, invece, il TF è assente o presente in quantità limitate non avviene alcuna produzione di trombina.

L'AT, invece, inibisce fattori pro-coagulanti come la trombina, i fattori Xa, IXa, VIIa e XIIa; essa è un'alfa-globulina la cui azione è migliorata da specifiche parti di pentasaccaridi acidi che si trovano sugli eparinoidi come i GAG presenti sulle membrane endoteliali o quelli presenti sull'eparina esogena.

La proteina C attivata (PCR) svolge un'azione anticoagulante. Tutto ha inizio grazie al recettore di membrana endoteliale per la proteina C (EPCR), molecola capace di legare la Proteina C in modo tale che questa possa essere attivata dalla trombina, a sua volta, legata dalla trombomodulina. L'APC interagisce con la proteina S catalizzatore dell'inattivazione dei fattori Va e VIIIa, impedendo così la formazione della trombina.

Il collegamento che sussiste fra questi processi appena descritti e l'infiammazione non sono ancora completamente compresi, è noto però che il processo coagulativo non solo porta all'attivazione piastrinica e alla deposizione di fibrina ma provoca anche l'attivazione delle cellule endoteliali e dei leucociti. Viceversa, i microrganismi e le loro componenti (ad esempio l'LPS) legano i PRR di monociti e macrofagi inducendo la cascata di NF-KB con successiva esposizione di TF, avviando così la coagulazione.

A supporto di ciò diverse evidenze sottolineano come i leucociti si trovano a concentrazioni elevate nei trombi venosi; al contempo la trombina può attivare sia le piastrine che l'endotelio inducendo l'espressione di P-selectina mediatore fondamentale nel rolling leucocitario; in aggiunta si è osservato come le citochine pro-infiammatorie e l'LPS inibiscano l'espressione di GAG e TM, bloccando quindi, da un lato, l'azione dell'AT e, dall'altro, la formazione di APC.

Non bisogna dimenticare che il processo settico è un forte induttore di danno tissutale, con successivo rilascio di DAMPs (istoni, DNA, DNA mitocondriale, HMGB1, HSP) che non solo contribuiscono a reiterare e aggravare il processo infiammatorio, ma danno anche inizio all'attivazione emostatica, all'aggregazione piastrinica, all'inibizione dei sistemi fibrinolitici.

Table 1 Coagulation abnormalities in sepsis. Refer to text for references. (*PAP* plasmin-antiplasmin complexes)

	Sepsis	Septic shock	Non-survivors ^a
<i>Initiation</i>			
TF	↑	↑	- ^b
Factor VII	↓	↓	-
<i>Amplification</i>			
TAT	↑	↑	-
F 1+2	↑	↑	-
<i>Fibrinolysis</i>			
D-dimer	↑	↑	-
t-PA	↑	↑	Higher
Plasminogen	↓	↓	Lower
PAI-1	↑	↑	Higher
α_2 -antiplasmin	Normal	Normal	Lower
PAP	↑	↑	-
<i>TFPI</i>			
Plasma	↑	No data	-
Membrane ^c	↓	No data	-
AT	↓	↓	Lower
APC	↓	↓	Lower
Protein S	Normal	↓	-

In aggiunta, durante l'infiammazione, i neutrofili rilasciano il NET, ampia rete di materiale nucleare neutrofilico (DNA, istoni, enzimi antibatterici) che ha lo scopo di intrappolare e uccidere microrganismi, ma ha anche la capacità di iniziare il processo di DIC. La trombocitopenia nel paziente settico è riconducibile non solo al consumo, ma anche al fatto che le piastrine attivate aderiscono ai neutrofili sotto stimolo del NET.

L'attivazione della coagulazione nella sepsi può essere dimostrata dall'aumento dei livelli di TF e dai bassi livelli di FVII, indicativo del consumo avvenuto di questo fattore. Inoltre, si notano bassi livelli di AT, consumata nel tentativo di limitare l'iperproduzione di trombina e spesso distrutta da parte di proteasi leucocitarie.

I livelli di proteina C sono ridotti a causa non solo del loro consumo ma anche della riduzione dei livelli di TM sulla superficie cellulare.

L'attivazione della trombina è solitamente seguita dalla formazione di fibrina che viene poi degradata dalla plasmina con aumento dei livelli di D-dimero. La plasmina è attivata dal t-PA il cui aumento è stato documentato in corso di sepsi sebbene il suo effetto sia controbilanciato dall'aumento dei livelli di PAI-1. Quindi la fibrinolisi sebbene attivata non è sufficiente a contrastare la formazione di fibrina, anzi l'aumento di fibrina e la fibrinolisi compromessa contribuiscono sia al danno d'organo che alla mortalità nella sepsi.

È frequente in un paziente settico avere una funzionalità epatica anormale, ciò influenza la coagulazione: diminuisce la clearance dei fattori attivi, vi sono difetti piastrinici qualitativi e quantitativi, nonché riduzione dei fattori plasmatici proteina C e proteina S. [8] [9]

1.5 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE : SIC e DIC SCORE

Engelmann e Massberg hanno coniato il termine di “immunotrombosi” per sottolineare questo stretto rapporto fra coagulazione e sistema immunitario innato nel paziente settico; questo evento conduce alla DIC (coagulazione intravascolare disseminata) definita come una sindrome acquisita caratterizzata da un'attivazione intravascolare della coagulazione con perdita di localizzazione. Essa si manifesta fondamentalmente con due fenotipi: più frequentemente si ha un'evoluzione verso un atteggiamento pro-coagulante, che con più facilità determina fenomeni trombotici; oppure possono presentarsi alcune forme asintomatiche in cui il paziente manifesta un'improvvisa emorragia massiva.

Lo stato della coagulazione cambia dinamicamente in base alla progressione della malattia sottostante. Il DIC associato alla sepsi è una condizione dinamica che parte dal

disturbo della coagulazione, può avanzare alla coagulopatia indotta dalla sepsi (SIC) e infine al disturbo della coagulazione scompensato (DIC overt)

La SIC “Sepsis Induced Coagulopathy” è una condizione che si manifesta più precocemente rispetto alla DIC. Un segno distintivo della SIC è l’eccessiva soppressione della fibrinolisi associata al PAI-1; al contrario tale soppressione è raramente osservata nella DIC associata a traumi o chirurgia, di conseguenza la disfunzione d’organo si manifesta nelle DIC indotte da sepsi a causa della ridotta perfusione tissutale. Il sanguinamento sistemico è quindi una caratteristica più comune del DIC non settico dove la fibrinolisi ha piena espressione.

Basandoci su queste considerazioni, si sono sviluppati dei criteri per definire la SIC che prendono in considerazione: conta piastrinica, PT standardizzato (INR) e punteggio SOFA.

Si cerca mediante questo punteggio di ottenere una precoce diagnosi di coagulopatia sepsi indotta

Il DIC score, invece, include quattro criteri di laboratorio per fare diagnosi di DIC: livelli elevati di marcatori legati all’attività fibrinolitica come il D-dimero, ridotta conta piastrinica, tempo prolungato di protrombina e diminuzione dei livelli di fibrinogeno
.[10]

		ISTH overt DIC	SIC
ITEM	SCORE	RANGE	RANGE
Conta piastrinica x10 ⁹ /l	2	<50	<100
	1	≥50, <100	≥100, <150
FDP/D-dimero	3	>4000ng/ml	-
	2	400-4000ng/ml	-
Tempo di Protrombina (PT ratio)	2	≥6s (>1,7)	 (>1,4)
	1	≥3s (1,3-1,7)	 (>1,2; ≤1,4)
Fibrinogeno (g/ml)	1	<100	-
SOFA score	2	-	≥2
	1	-	1
Total score DIC o SIC		≥5	≥4

[9]

1.6 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE: ANALISI STANDARD.

Mentre per l'emostasi primaria viene comunemente eseguita una conta piastrinica (in un adulto sano è di circa 150000-400000 piastrine per microlitro di sangue), la valutazione della cascata coagulativa si basa su tre test di analisi standard:

- Il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT): è un test che valuta la via intrinseca e quella comune della coagulazione. Questo test si esegue aggiungendo un attivatore di superficie e fosfolipidi (chiamati "tromboplastina parziale" per l'assenza del fattore tissutale) al plasma. Si incuba il preparato per un tempo sufficiente a permettere l'attivazione dei fattori di contatto

(chininogeno ad alto peso molecolare, precallieina, fattore XII e fattore XI), viene aggiunto il calcio e viene misurato il tempo di formazione del coagulo. Il range di valori fisiologici è compreso fra 20 e 40 secondi. In alcune fasi della sepsi, specialmente nelle fasi iniziali, l'ipercoagulabilità può essere dominante, con un'aumentata attività trombinica e una potenziale riduzione dell'aPTT. Nei pazienti con una DIC conclamata vi è un prolungamento dell'aPTT per riduzione dei fattori della coagulazione.

- Tempo di protrombina (PT): questo test studia la via estrinseca e la via comune. Tale test misura il tempo necessario alla formazione del coagulo di fibrina quando al plasma del paziente viene aggiunto calcio e un reagente tromboplastinico che contiene fattore tissutale. Si misura il tempo di formazione del coagulo che fisiologicamente è compreso fra i 10 e i 14 secondi. Essendo i valori di PT diversi fra i vari laboratori in dipendenza del reattivo utilizzato, per standardizzare il PT si ricorre all'INR. Esso è definito come il rapporto fra il PT del paziente in esame sulla media di una serie di valori di PT misurati in pazienti sani nello stesso laboratorio e con lo stesso reagente, il tutto elevato all'esponente ISI (indica la sensibilità della tromboplastina in uso). $INR = (PT \text{ del paziente} / PT \text{ media dei controlli})^{ISI}$, il cui valore normale è compreso tra 0,87 e 1,12. Nei pazienti settici con DIC conclamata vi è un consumo diffuso di fattori di coagulazione, portando a un aumento dell'INR.
- Fibrinogeno: è una glicoproteina sintetizzata dagli epatociti nota come fattore I della coagulazione. La trombina è in grado di scindere le catene polipeptidiche formanti il fibrinogeno, i monomeri di fibrina che ne risultano vanno incontro a polimerizzazione formando un coagulo insolubile di fibrina. Il dosaggio di fibrinogeno viene eseguito aggiungendo una soluzione di trombina al campione di plasma citrato da esaminare: va valutato il tempo di comparsa del primo filamento di fibrina e da questo siamo in grado di risalire direttamente alla concentrazione di fibrinogeno nel campione. I valori normali sono compresi fra 200 e 450 mg/dl. Va ricordato che il fibrinogeno è una proteina di fase acuta e la sua concentrazione può aumentare sensibilmente in condizioni di flogosi o danno tissutale. Nelle fasi avanzate della sepsi, quando si sviluppa una DIC può

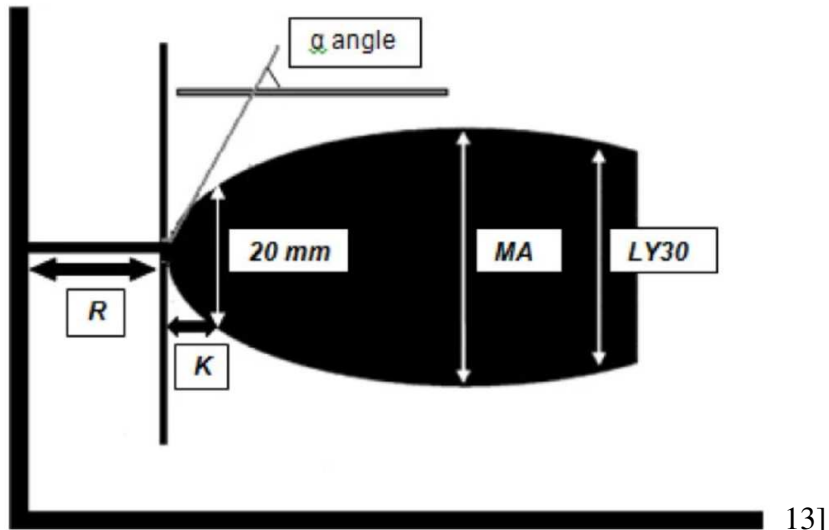
esserci un consumo eccessivo di fibrinogeno con successiva diminuzione dei suoi livelli ematici. [11]

1.7 VALUTAZIONE DELLA COAGULAZIONE: TROMBOELASTOGRAFIA

La tromboelastografia, spesso abbreviata come TEG, rappresenta una sofisticata metodologia diagnostica per l'esplorazione delle proprietà coagulative del sangue. Essa è stata sviluppata dal ricercatore Hartet ad Heidelberg durante Seconda guerra mondiale, precisamente nel 1948. Questo esame si concentra specificatamente sulla rilevazione delle variazioni viscoelastiche che il sangue manifesta nel corso del suo processo coagulativo. Attraverso la tromboelastografia, si possono ottenere dati dettagliati riguardanti la fase iniziale della cascata coagulativa, la formazione del coagulo, la sua successiva stabilizzazione e, infine, la forza del coagulo stesso. Questo test, eseguibile al letto del paziente, si distingue per la sua semplicità di utilizzo e la rapidità dei risultati, permettendo di ottenere un quadro completo dello stato coagulativo del paziente in un arco temporale di circa 30 minuti. Va sottolineato che la formazione del coagulo è un fenomeno estremamente dinamico. I test coagulativi tradizionalmente impiegati, come il tempo di tromboplastina parziale attivata e l'analisi quantitativa delle piastrine, tendono a fornire valutazioni focalizzate su singole fasi del processo emostatico, senza garantire una proiezione accurata del loro impatto complessivo sul processo coagulativo. Il vantaggio del TEG risiede nella sua capacità di esaminare l'interazione tra le varie componenti essenziali del sistema coagulativo (le piastrine, la fibrina, i fattori coagulativi, la trombina) e apporta informazioni circa la qualità intrinseca del coagulo formatosi.

Il termine "tromboelastografia" viene utilizzata per indicare il tracciato ottenuto attraverso l'analisi dei cambiamenti viscoelastici dal sangue. Questa terminologia ha trovato ampia diffusione nella letteratura scientifica a partire dalla sua prima introduzione. Tuttavia, è importante annotare che, nel 1996, il termine "TEG" ha subito una transizione semantica, diventando un marchio di fabbrica esclusivo della Hemoscope corporation. Da quel momento in poi, tale acronimo ha assunto una connotazione specifica, identificando il test di coagulazione effettuato utilizzando gli

apparecchi specifici prodotti da questa azienda. Parallelamente, un dispositivo di analisi coagulativa alternativo, proposto sul mercato dalla società Pentapharm GmbH, ha adottato la terminologia "tromboelastogramma" per descrivere il protocollo di misurazione impiegato, mentre la dizione "ROTEM" è stata scelta per riferirsi sia all'equipaggiamento utilizzato sia alla rappresentazione grafica dei risultati ottenuti. [12]



Graficamente il TEG è formato da cinque principali parametri :

- Reaction Time “R”: si riferisce all'intervallo temporale che intercorre fra l'avvio del processo coagulativo e la formazione dei primi filamenti di fibrina indicati nel grafico dal punto in cui il tracciato consegue un'ampiezza di 2 mm. Questo dato dà informazioni in merito alla cinetica di generazione della trombina. Si può notare un prolungamento di questo tempo in presenza di condizioni quali un deficit dei fattori della coagulazione o in seguito all'assunzione di specifici anticoagulanti, quali l'eparina o il Warfarin. Contrariamente, un valore di "R reaction time" ridotto può suggerire una condizione di ipercoaguabilità, pur non fornendo dettagliate informazioni riguardo alla sua eziologia.
- Clot Formation Time “K”: graficamente è rappresentato dal momento in cui si formano i primi filamenti di fibrina fino a quando il grafico non raggiunge i 20 mm; rappresenta la formazione del coagulo ed è strettamente connesso con la funzione piastrinica, i fattori plasmatici e il fibrinogeno. Un valore di k aumentato è indicativo di un rallentamento nella formazione del coagulo, mentre un valore ridotto è segno di ipercoaguabilità.

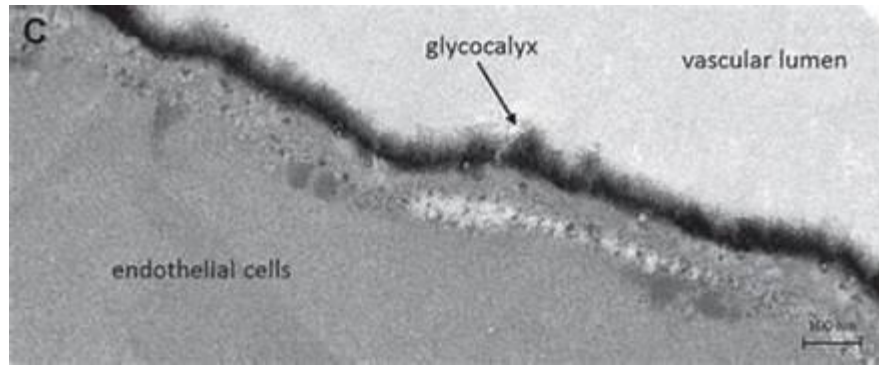
- Alpha Angle: rappresenta la rapidità con cui si forma il coagulo. Esso si forma tra la linea di base orizzontale e una tangente tracciata sull'ascesa iniziale della curva del TEG, proprio dopo il tempo di reazione (R), che rappresenta l'inizio della formazione del coagulo. Questo angolo riflette la velocità con cui fibrina e piastrine interagiscono e stabilizzano il coagulo in formazione. Essenzialmente descrive la cinetica di formazione del coagulo. Valori maggiori di ampiezza dell'angolo alpha indicano una formazione del coagulo più rapida suggerendo una formazione piastrinica e del fibrinogeno efficace. Al contrario, un angolo alpha ridotto indica una formazione del coagulo più lenta, che potrebbe essere dovuta a fattori come un deficit di fibrinogeno, una funzione piastrinica compromessa o la presenza di anticoagulanti.
- Maximum amplitude "MA": rappresenta la massima ampiezza o escursione del grafico. La MA fornisce informazioni cruciali sulla forza e stabilità del coagulo formatosi: la forza è determinata dall'interazione fra piastrine e fibrina, un numero adeguato di piastrine funzionanti contribuirà ad una maggiore ampiezza; livelli elevati di fibrinogeno possono portare a una MA aumentata, mentre livelli bassi possono ridurla. Una MA elevata indica un coagulo più forte e potrebbe suggerire un rischio di trombosi. Una MA bassa indica un coagulo più debole, suggerendo un potenziale rischio emorragico.
- Clot lysis index "LY": si riferisce alla capacità del coagulo di resistere alla fibrinolisi, ovvero al processo attraverso il quale il coagulo viene successivamente degradato e risolto. Il LY misura la percentuale di ampiezza residua del coagulo a un determinato intervallo di tempo (es. 30 min "LY30") dopo aver raggiunto la MA. Un LY che si avvicina al 100% indica una minima o nessuna attività fibrinolitica, suggerendo che il coagulo rimane intatto e stabile. Un LY significativamente inferiore al 100% indica una maggiore attività fibrinolitica, il che potrebbe essere un segno di un potenziale stato di iperfibrinolisi, in cui il coagulo si degrada troppo rapidamente. [12]

Alcuni studi hanno dimostrato come l'indice di lisi della tromboelastometria risulti aumentato nei pazienti con sepsi rispetto ai soggetti in condizioni fisiologiche, suggerendo che la funzione del sistema fibrinolitico è marcatamente inibita durante il processo settico. Quindi, la fibrinolisi ridotta nella sepsi probabilmente riduce l'invasione e la diffusione dei batteri ma favorisce la coagulazione intravascolare disseminata, portando all'ischemia d'organo e alla insufficienza multiorgano [14]. Altri studi hanno riscontrato una marcata ipocoagulazione nei pazienti con DIC manifesta: la cinetica di formazione del coagulo risulta ritardata rispetto agli individui sani, così come la solidità del coagulo risulta ridotta rispetto ai pazienti con sepsi senza DIC manifesta. [15]

1.8 RUOLO DELL'ENDOTELIO

Le cellule endoteliali rivestono il lato luminale del sistema vascolare di tutti gli organi, esse hanno sia un ruolo di barriera emato-tissutale, sia di organo endocrino. Le cellule endoteliali, infatti, regolano il rilassamento vasale, modulano lo stravasamento di fluidi, soluti e macromolecole, nonché ormoni e cellule infiammatorie. L'endotelio influenza la fluidità del sangue, l'adesione e l'aggregazione piastrinica, mantiene un equilibrio fra coagulazione e fibrinolisi, consente il rolling leucocitario e la tras migrazione dei leucociti.

L'endotelio è arricchito dalla presenza del glicocalice, che lo ricopre formando uno strato gel-like e conferendo proprietà antitrombotiche e antiinfiammatorie. Il glicocalice è composto di tre strutture, tutte e tre con funzione fisiologica essenziale: il proteoglicano che ancora il glicocalice alla membrana endoteliale ha ruolo di meccanolettore, i GAG coniugati ad un core di proteoglicano apportano un ampio contributo antitrombotico e le proteine plasmatiche come albumina e antitrombina regolano la permeabilità del vaso e regolano il processo di coagulazione (a seguire un approfondimento su questo tema).



Lo stress fisiologico più importante sulla parete dei vasi sanguigni è la forza di attrito tangenziale del sangue che scorre sul vaso: parliamo di “shear stress” SS. I normali livelli di SS hanno un potente effetto omeostatico grazie ai meccanismi di meccano-trasduzione che coinvolgono il glicocalice. I ruoli principali svolti dallo SS sono:

- a) garantire proliferazione, sopravvivenza e apoptosi delle cellule endoteliali;
- b) mantenere un corretto tono della muscolatura liscia vascolare;
- c) attività antitrombotica della cellula endoteliale;
- d) produrre fattori di crescita e citochine;
- e) interagire con i leucociti.

Quindi in condizioni fisiologiche la cellula endoteliale regola il flusso, quando in corso di sepsi gli agenti patogeni distruggono il glicocalice anche la cellula endoteliale diviene disfunzionale con amplificazione delle cascate infiammatorie e pro-coagulative.

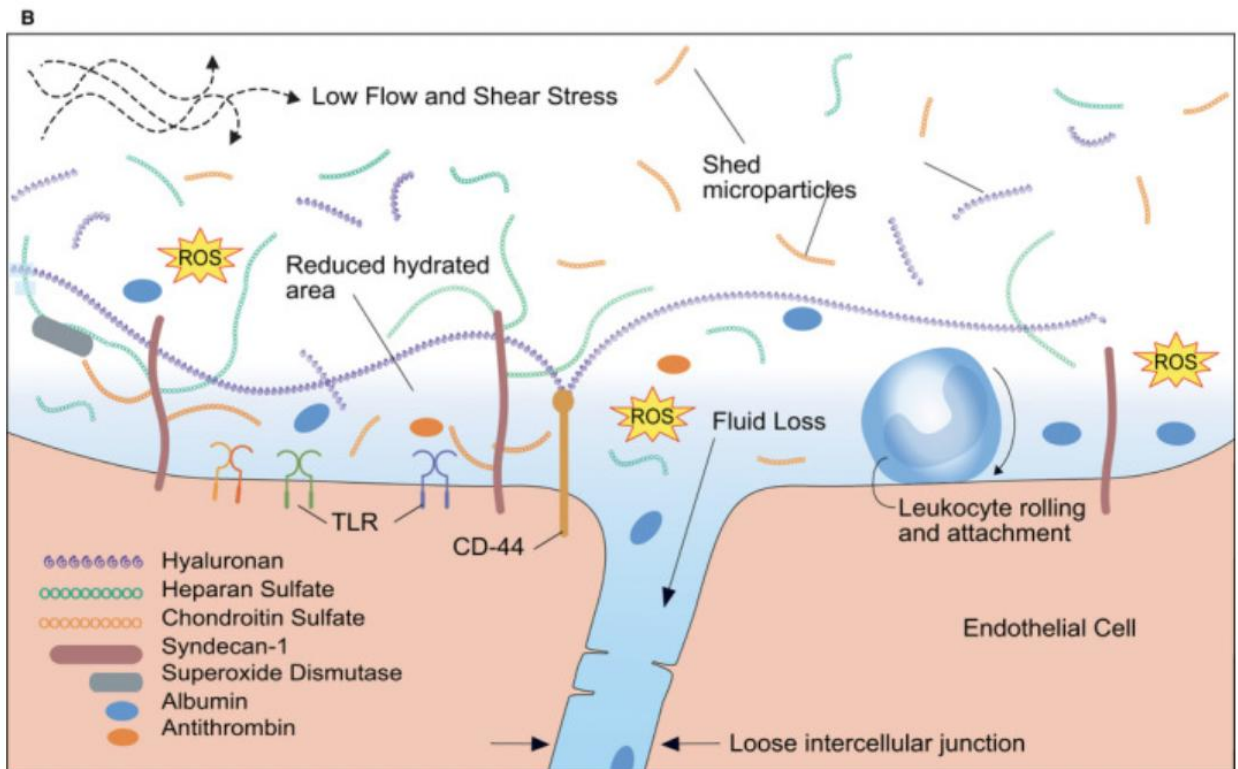
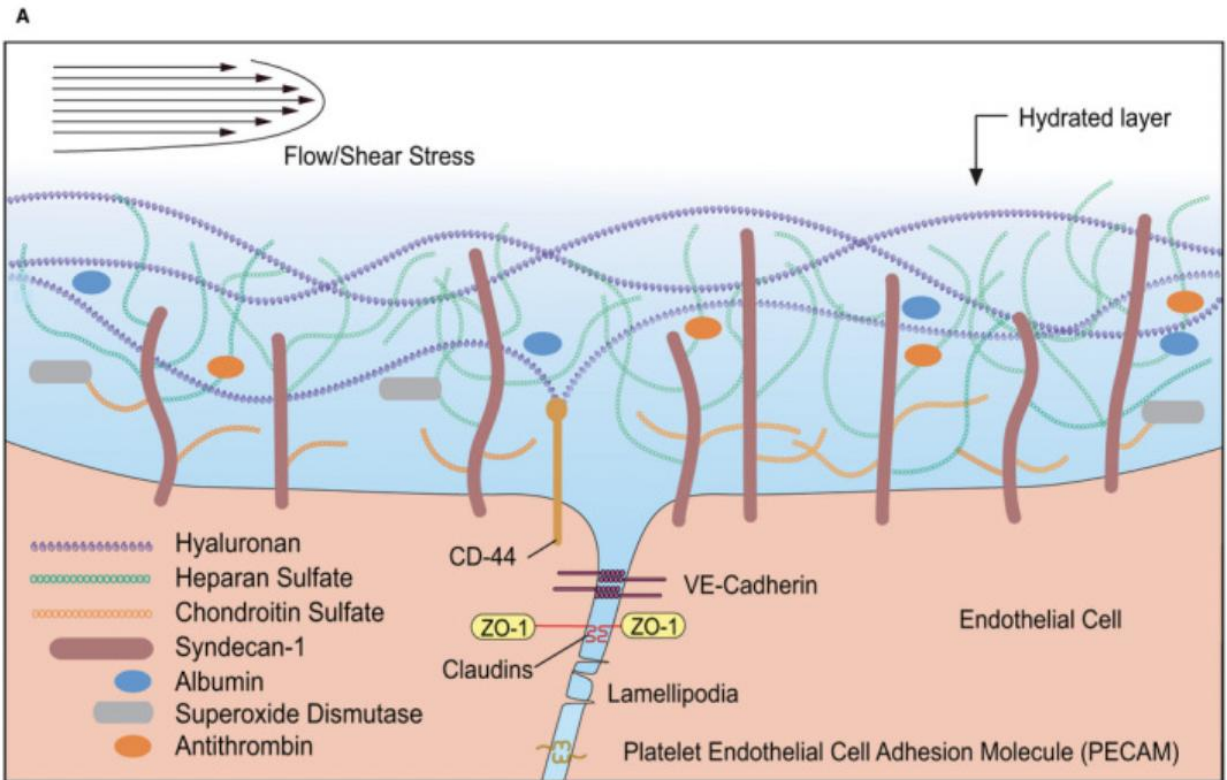
Durante il processo settico, in particolare in concomitanza della “tempesta citochinica”, il TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-17 innescano l’espressione di molecole di adesione come le E/P selectine da parte dell’endotelio. Il questo modo si avvia il fenomeno di rolling leucocitario facilitato dalla vasodilatazione e dalla riduzione del flusso ematico con marginazione dei leucociti e successivo legame a bassa affinità con le selectine. Solo in un secondo momento l’espressione di chemochine endoteliali permettono legami ad alta affinità con le integrine espresse dai leucociti. L’adesione dei leucociti alla parete del vaso è normalmente impedita dalla downregulation della cascata di NF-KB grazie al ruolo protettivo di un fisiologico SS. Uno shear stress non adeguato come durante il processo settico promuove ulteriormente la segnalazione infiammatoria. In condizioni infiammatorie vi è una maggiore produzione endoteliale del von

Willebrand factor, collante essenziale per rendere stabile il legame con le piastrine (mediato da Gp1b) e garantire i successivi processi di attivazione piastrinica e aggregazione. Le forze emodinamiche regolano il vWF: in condizioni fisiologiche mantiene una struttura “coiled”, ma in caso di lesione endoteliale aderisce al collagene sottoendoteliale e si “srotola” favorendo così i processi coagulativi.

Da quanto descritto emerge il ruolo chiave svolto dal glicocalice nel garantire l'integrità e la corretta funzionalità endoteliale. Nelle immagini sottostanti vengono descritti e comparati due differenti endoteli, il primo è un endotelio sano (A), il secondo è un endotelio durante le prime fasi del processo settico (B). L'endotelio sano (A) è sottoposto ad un adeguato SS: c'è un equilibrio perfetto fra la sintesi del glicocalice e la sua degradazione. Il glicocalice è composto da proteoglicani, glicosamminoglicani (GAGs) e glicoproteine derivanti da plasma o dalle cellule endoteliali. I GAGs sono rappresentati da dermatan solfato (DS), eparan solfato (HS), condroitin solfato, keratan solfato e acido ialuronico; si tratta di polimeri lineari di disaccaridi con grado di solfatazione variabile, responsabile della loro carica negativa. A livello del glicocalice endoteliale i GAGs maggiormente rappresentati sono DS e HS, quest'ultimo rappresenta il 50-90% di tutti i GAGs. Il glicocalice che ricopre l'endotelio vascolare svolge un ruolo protettivo nei confronti di quest'ultimo e tale meccanismo protettivo sembra essere svolto, appunto, da proteoglicani e GAGs. Uno dei ruoli principali svolti dal glicocalice è quello di evitare l'extravasazione di colloidali e fluidi e l'accesso di determinate molecole/cellule all'endotelio vasale. Questa funzione viene svolta sia in base alle dimensioni e all'ingombro sterico delle molecole sia in base alla loro carica elettrostatica; infatti, il glicocalice ha una carica fortemente negativa e ciò è determinato dalla presenza dei GAGs.

Nella figura B si nota come nella fasi precoci di sepsi il glicocalice può essere danneggiato o rimosso a causa di reazioni enzimatiche o stress da attrito. Considerato il ruolo protettivo del glicocalice e i numerosi siti di legame in esso contenuti, modificazioni anche lievi della sua composizione (ad es. del grado di solfatazione dei GAGs) possono avere importanti conseguenze funzionali. Alterazioni nella quantità e/o composizione di GAGs e/o proteoglicani possono determinare alterazioni della carica elettrica del glicocalice, aumento della permeabilità endoteliale, l'adesione di cellule

infiammatorie e di molecole pro-infiammatorie e pro-trombotiche. In particolare, ci sono proteine anticoagulanti associate al glicocalice come il TFPI che è legato proprio all'eparansolfato, l'antitrombina AT e la Trombomodulina TM. Di tutte è stato descritto il ruolo essenziale nel regolare il processo coagulativo, il loro funzionamento è strettamente rilegato al corretto funzionamento e alla corretta anatomia del glicocalice. Il TFPI è diminuito in corso di sepsi a causa della degradazione da parte di sistemi proteolitici o da parte delle elastasi neutrofiliche; così come è compromessa funzionalmente l'AT dal momento che il glicocalice vede dispersa la sua componente di GAG; infine la Trombomodulina TM non svolge più la sua funzione dal momento che l'endotelio è danneggiato, l'EPCR disfunzionale e la Proteina S ridotta. I PAMP e i prodotti infiammatori mediano la rottura della barriera cellulare glicocalice\endotelio. La successiva ipotensione e la bassa velocità di taglio riducono lo SS a livelli non fisiologici con conseguenti spargimento del glicocalice e perdita dell'integrità dell'eparansolfato. La scomposizione della giunzione intercellulare e la perdita di molecole adesive aumenta la filtrazione non solo dei liquidi ma anche di proteine come l'albumina che andando nello spazio interstiziale ne aumenta la pressione osmotica esacerbando l'edema. Questa disfunzione glicocalice\endotelio raggiunge il suo culmine nel processo settico dal momento in cui vi è totale incapacità di rigenerazione, questa disfunzione diventa irreversibile. La degradazione del glicocalice svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'ipoperfusione microcircolatoria durante l'evoluzione della sepsi contribuendo all' insufficienza multiorgano e alla morte.[16]



1.9 IL MICROCIRCOLO

La funzione principale del sistema circolatorio è quella di fornire, attraverso il sangue, ossigeno e nutrienti agli organi in misura adeguata alle loro necessità e di rimuovere da questi ultimi i prodotti metabolici e di secrezione; inoltre il microcircolo garantisce una stabilità emodinamica in termini di pressione arteriosa e ritorno venoso.

Il microcircolo adempie queste funzioni mediante vasi di diametro inferiore a 100 micrometri; esso è formato dai rami finali dell'albero arterioso che con le arteriole terminali genera i capillari che, a loro volta, convogliano nelle venule. Le arteriole sono chiamate anche "vasi di resistenza" poiché possiedono, oltre che l'endotelio e l'avventizia, un importante strato di muscolatura liscia capace di regolare il flusso di sangue che giungerà ai diversi distretti corporei, per fare ciò esse sono responsive a stimoli vasopressori e vasodilatatori. A livello capillare, poi, avviene un rapido scambio di acqua e soluti con formazione di liquido interstiziale, nonché il rilascio di ossigeno; ciò è possibile grazie alla struttura capillare fatta di un singolo strato endoteliale rivestito da membrana basale; il flusso di sangue che transita nei capillari è regolato dalla contrazione delle arteriole, dai fattori nervosi, umorali e metabolici locali. Poi le venule (principale reservoir a bassa pressione capace di contenere il 75% del volume sanguigno) drenano il sangue proveniente dai capillari per convogliarlo nel restante sistema venoso che ha lo scopo di riportare il sangue al cuore. Si comprende, quindi, come una massiva vasodilatazione venosa possa inficiare l'emodinamica del paziente risultando in una ridotta gittata cardiaca. Le venule sono, inoltre, la principale sede di processi infiammatori quali l'aumento della permeabilità vascolare e la marginazione leucocitaria. Il microcircolo è stato a lungo studiato a partire dalle osservazioni di August Krogh il quale riteneva che l'ossigenazione tissutale fosse garantita esclusivamente dal letto capillare e che le arterie e le venule fossero semplicemente dei condotti capaci di trasportare ossigeno senza essere, però, permeabili allo stesso. Ne risulta secondo questa teoria che la pO₂ contenuta nei vasi diminuisce in maniera lineare nel suo transito lungo il sistema capillare partendo da valori arteriosi e arrivando sino a valori venosi. Si è arrivati, poi, mediante recenti dimostrazioni non solo a delineare meglio la struttura del

microcircolo ma anche a comprendere i reali meccanismi di trasporto di ossigeno a livello tissutale. La diffusione di ossigeno avviene preferenzialmente dalle arteriole verso il tessuto, verso le vene parallele, verso i capillari trasversi. Infine, il microcircolo ad oggi studiato sembra essere così strutturato: esso è formato da arteriole con diametro compreso fra 30 e 50 μm che si suddividono almeno cinque volte per dare origine alle arteriole terminali con diametro di 7-10 μm . A loro volta dalla parte finale di queste arteriole si distaccano due-quattro capillari, dando origine al letto capillare, essi sono i vasi più piccoli della microcircolazione con diametro di 4-6 μm . Il calibro dei vasi torna ad aumentare con le venule dove raggiungiamo i 15-25 μm . [17]

1.10 MICROCIRCOLO E OSSIGENAZIONE TISSUTALE

Uno dei ruoli principali svolti dal microcircolo è il trasporto di ossigeno ai tessuti. Il bilancio netto fra la disponibilità di ossigeno, la richiesta di ossigeno e il consumo di ossigeno determinano l'ossigenazione tissutale. In base al fabbisogno metabolico di ogni tessuto avremmo una specifica densità capillare e una particolare anatomia del microcircolo, la perfusione di questo dipende poi dal flusso sanguigno e dalla pervietà capillare. Grazie a processi di convezione e diffusione l'ossigeno viene trasportato dall'aria ambiente ai mitocondri dove viene poi utilizzato nella formazione di ATP: l'ossigenazione inizia, quindi, a livello polmonare dove sono fondamentali una corretta funzione ventilatoria e una corretta funzione respiratoria, quest'ultima dipende strettamente dall'integrità della barriera alveolo-capillare, dalla frazione di O_2 contenuto nell'aria inspirata e dal corretto flusso capillare polmonare. Una volta passata la membrana alveolo capillare l'ossigeno si dirige verso i tessuti, affinché ciò avvenga la gittata cardiaca deve essere ottimale e il microcircolo non deve essere compromesso né dal punto di vista della densità, né per quanto riguarda la perfusione. Il contenuto arterioso di O_2 non dipende tanto dalla PaO_2 quanto più dalla saturazione dell'Hb e dal contenuto ematico di questa; pertanto, si hanno grandi capacità di riserva anche di fronte ad un'eventuale alterazione della funzione respiratoria, ciò fa comprendere come la quantità di O_2 che arriva ai tessuti non sia direttamente proporzionale alla funzione respiratoria. Infine, il sangue arriva ai tessuti, qui le cellule sono capaci di utilizzare O_2

mediante un corretto funzionamento delle vie metaboliche cellulari che vanno dalla glicolisi, passano per il ciclo di Krebs ed, infine, arrivano alla fosforilazione ossidativa. [17]

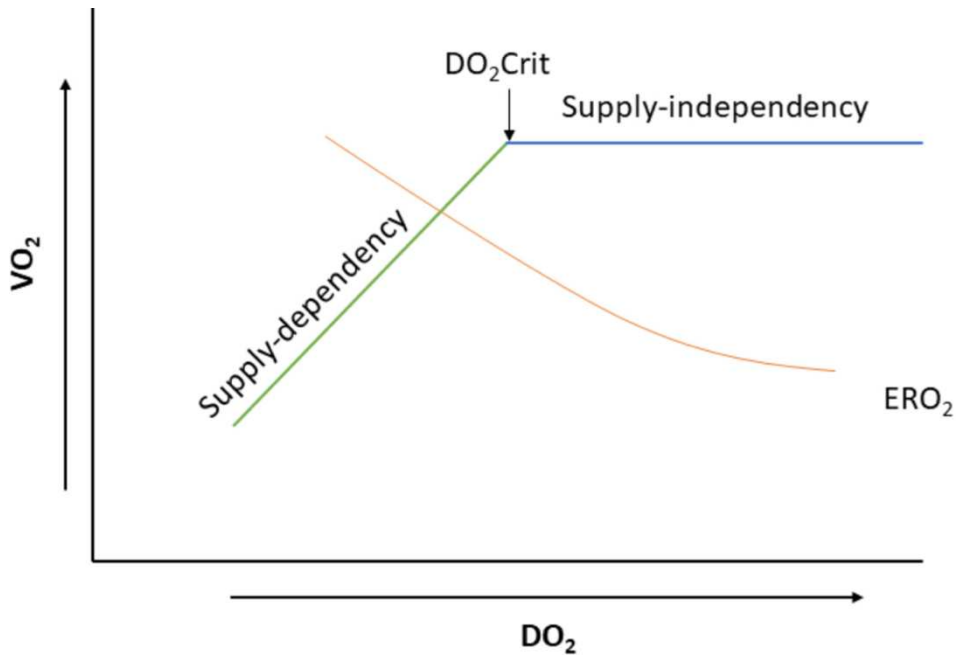
Se anche una di queste fasi risulta compromessa, avremmo una carenza di ossigeno in periferia, in particolare, nel caso della patologia settica, si parla di “ipossia citopatica” dove l’acceptore finale di ossigeno non è più in grado di utilizzarlo per produrre energia, vi sono, infatti, significative alterazioni delle subunità mitocondriali.[18]

La regolazione della perfusione tissutale avviene nel microcircolo, dove le arteriole controllano il flusso di sangue che arriva ai capillari mediante un meccanismo di vasodilatazione e vasoconstrizione. Le variazioni di diametro sono dovute all’attività del muscolo liscio vasale che risponde a vari stimoli, fra cui:

- La stimolazione pressoria, anche detta miogena: la distensione di un vaso indotta da un aumento pressorio costituisce uno stimolo fondamentale per la contrazione delle fibrocellule muscolari, in questo modo il microcircolo riesce a mantenere costante il flusso ematico nonostante le variazioni della pressione sistemica. Questo meccanismo costituisce la cosiddetta “autoregolazione” che è presente in tutti i tessuti e gli organi come cervello, rene e miocardio. Il flusso resta costante in un intervallo che va da 150 a 50 mmHg; quindi l’autoregolazione viene garantita non solo per condizioni di ipertensione ma anche in caso di ipotensione dove la dilatazione arteriolare che ne consegue garantisce una perfusione d’organo.
- Metabolico: le arteriole rispondono agli stimoli metabolici che si generano nei tessuti, man mano che aumenta il metabolismo tissutale si accumulano prodotti catabolici come ioni H^+ , K^+ , fosfato, CO_2 , adenosina, lattati questi garantiscono una redistribuzione del flusso verso i tessuti con aumentata domanda.
- Stimolazione nervosa: il sistema nervoso simpatico innerva le arteriole più piccole fino a quelle terminali, qui l’adrenalina e la noradrenalina agendo sui recettori α e β garantiscono un corretto tono arteriolare.
- Stimolazione ormonale: si pensi al ruolo vasoconstrictore dell’ATII o a quello dell’ADH sui recettori V1.

- Stimolazione endoteliale: come visto in precedenza, il ruolo dell'endotelio nel microcircolo è molto complesso. Un ruolo di grande importanza è svolto dall'NO, esso viene principalmente prodotto sotto stimolazione del glicocalice da parte di un fisiologico SS; la liberazione di eNOS induce la sintesi di ossido nitrico. Esso attiva una guanilatociclastasi solubile che sostiene la formazione di cGMP nelle cellule muscolari lisce vascolari. Il risultato finale è la riduzione dei livelli intracellulari di calcio con rilascio della muscolatura e vasodilatazione. L'NO garantisce non solo una vasodilatazione quando necessario, ma ha anche un'azione immunitaria inibendo l'adesione e la degranolazione leucocitaria, ripristina la permeabilità capillare, promuove la proliferazione di cellule muscolari lisce, ha attività scavenger nei confronti dei radicali liberi.

Grazie a questi meccanismi di regolazione appena citati, il microcircolo è in grado di rispondere alle richieste metaboliche tissutali garantendo un apporto di O₂ sufficiente a coprire il consumo tissutale. Assicurando, infatti, un corretto flusso di sangue, si garantisce un ottimale rilascio di O₂. La disponibilità di ossigeno DO₂ dipende dal contenuto arterioso di ossigeno e dalla gittata cardiaca $DO_2 = CO \times CaO_2$ dove il contenuto arterioso di ossigeno CaO₂ dipende dalla quantità di ossigeno disciolta nel plasma e dalla quantità legata all'emoglobina secondo la seguente formula $CaO_2 = (SaO_2 \times 1,34 \times Hb) + (PaO_2 \times 0,0031)$. Il consumo di ossigeno VO₂ è inteso come la velocità con cui l'ossigeno viene prelevato dal sangue e consumato dai tessuti, esso viene calcolato moltiplicando la gittata cardiaca per la differenza arterovenosa del contenuto di O₂: $VO_2 = (CaO_2 - CvO_2) \times CO$. L'estrazione di ossigeno è intesa come la quantità di ossigeno che il nostro organismo estrae dal sangue arterioso per i propri fabbisogni $O_2ER = VO_2/DO_2$. In condizioni fisiologiche viene estratto il 25% dell'O₂ che si ha a disposizione.



Se la DO_2 scende come, ad esempio, nello scompenso cardiaco o nell'ipossia anemica, il VO_2 rimane costante perché aumenta l' O_2ER , è una condizione di "VO₂-DO₂ INDIPENDENCY" dove il consumo non dipende dalla disponibilità di O₂ poiché ad aumentare è l'estrazione. È solo quando il DO_2 scende al di sotto di un valore criticamente basso (DO_2 critico) che il VO_2 inizia a diminuire dipendentemente dall'offerta, si parla di VO_2 DO_2 dependency.

Al DO_2 critico il metabolismo cellulare si sposta verso l'anaerobiosi con conseguente aumento di lattati; alcuni autori parlano di "shock criptico" per indicare questo momento come l'on-set dello shock dove la PA è ancora normale ma i lattati sono aumentati per via della DEPENDENCY.

L'aumento dell'estrazione è possibile solo grazie all'attivazione concomitante di meccanismi di compenso sia centrali che locali. Quando un tessuto ha una ridotta PtO_2 l'organismo risponde con una vasocostrizione generalizzata e una ri-distribuzione del sangue negli organi che più ne hanno bisogno. Contemporaneamente fattori locali causano un aumento della densità dei capillari all'interno dei tessuti in sofferenza tramite vasodilatazione.

Prendendo come esempio una condizione di shock ipovolemico, come quello emorragico, quando viene perso almeno il 20% di sangue circolante si instaura una

riduzione della PAM a cui segue, grazie al baroriflesso, un aumento del rilascio di adrenalina e noradrenalina; l'attività simpatica e l'ipotensione stessa stimolano il rilascio di renina che aumenta i livelli di angiotensina capace di sostenere le resistenze arteriose e di aldosterone utile nella ritenzione idrosalina finalizzata al mantenimento della volemia; viene stimolato, inoltre, il rilascio di ADH essenziale anch'esso nel mantenimento della volemia. Viene, quindi, ri-distribuito il flusso di sangue agli organi metabolicamente più attivi impedendo così una sovra-perfusione di organi con fabbisogno di ossigeno più basso. Anche se il flusso sanguigno va agli organi giusti in proporzione alle loro esigenze, non c'è alcuna garanzia che il letto capillare riceva questo sangue secondo i requisiti tissutali, ecco qui che entra in gioco il microcircolo con i suoi meccanismi di autoregolazione precedentemente elencati. Quella che avviene è una vasodilatazione metabolica che si oppone al tono vasocostrittore simpatico, la distribuzione locale del flusso è determinata a valle dagli sfinteri precapillari. In risposta all'ipossia tissutale locale, il reclutamento capillare può ridurre gli spazi intercapillari, permettendo così ai tessuti di estrarre efficacemente l'ossigeno riducendo la distanza di diffusione capillare-cellula.

In situazioni di ipossia tissutale le cellule generano elevate quantità di metaboliti come lattato, ioni idrogeno, adenosina, ioni potassio che si accumulano nel tessuto e portano, come visto, ad un rilassamento del muscolo liscio vasale, tuttavia questo suggerisce che le cellule devono sperimentare un certo grado di ipossia prima che il flusso sanguigno dell'organo sia cambiato, ecco quindi che la cellula endoteliale gioca un ruolo chiave nel percepire e rispondere precocemente alla diminuzione di pO₂ rilasciando NO, PGI₂, e il fattore iperpolarizzante dipendente dall'endotelio tutti e tre con azione vasodilatatoria. [19]

In condizioni normali la distribuzione del flusso è finemente regolata sulla base delle richieste di O₂ cellulari e il microcircolo risponde all'ipossia e al basso flusso reclutando capillari precedentemente non perfusi. Nel paziente settico la grave disfunzione endoteliale non permette l'avvio di un corretto processo di autoregolazione. Ne risulta un mismatch fra perfusione e necessità metaboliche.

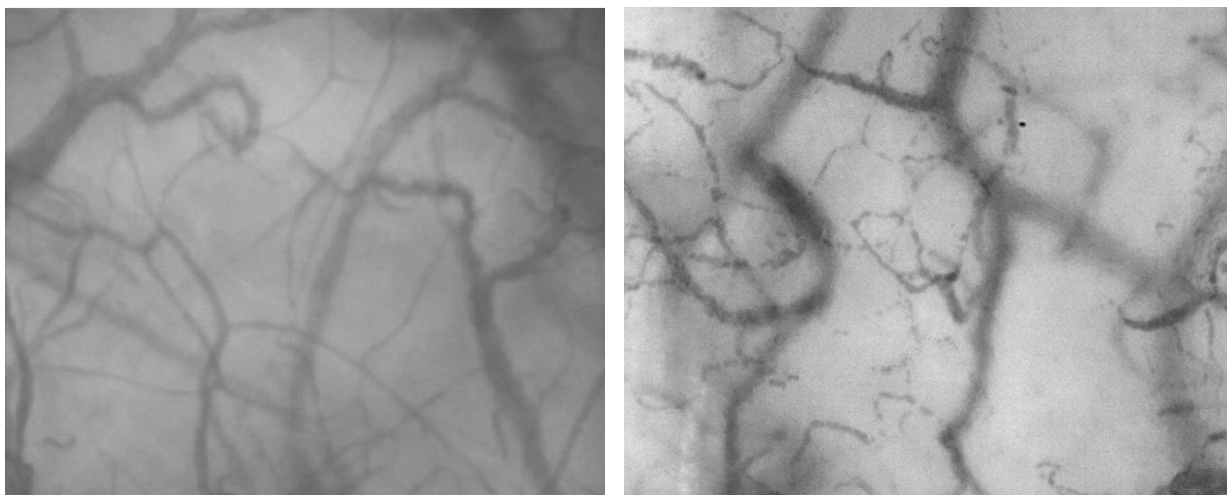
1.11 IL MICROCIRCOLO NEL PAZIENTE SETTICO

Nei pazienti settici sono state identificate alterazioni della perfusione microvascolare, esse sono implicate nello sviluppo della disfunzione d'organo e correlano con l'outcome del paziente. Mentre in un'emorragia acuta vi è una riduzione omogenea della perfusione microvascolare, nel paziente settico spicca una profonda eterogeneità del microcircolo. L'eterogeneità della perfusione ha importanti implicazioni nel monitoraggio macro-emodinamico: la gittata cardiaca (CO), la pressione arteriosa media (PAM), la pressione venosa centrale (PVC), la saturazione venosa mista di O₂ (SvO₂), il lattato sierico non sono in grado di rilevare le alterazioni microcircolatorie anche quando l'eterogeneità del flusso è presente in quantità significative. Negli stati di shock l'ipossia tissutale può persistere e può verificarsi un'insufficienza d'organo nonostante l'ottimizzazione dei parametri emodinamici, ciò è dovuto infatti alla compromissione del microcircolo. Oltre al danno endoteliale e alla perdita di autoregolazione, discussi in precedenza, a giocare un ruolo centrale è l'espressione eterogenea della "ossido nitrico sintetasi inducibile" iNOS che in alcune sedi porta all'apertura di shunt patologici del flusso sanguigno bypassando il microcircolo e causando ipossia nelle unità microcircolatorie ipoperfuse. Si alternano, quindi, aree ipoperfuse ad aree normalmente perfuse o addirittura iperperfuse. Altri fattori che contribuiscono all'eterogeneità del microcircolo sono i globuli rossi che divenendo meno deformabili formano emoaggregati con alterazione dell'emoreologia. Si parla di "perdita di coerenza emodinamica" fra macro e microcircolo: la disfunzione microcircolatoria crea un debito di ossigeno ostacolando il matching fra domanda e offerta; in queste condizioni le terapie mirate al miglioramento dei parametri macro- emodinamici possono non riuscire ad indurre un miglioramento parallelo della perfusione microvascolare. Ecco perché nel monitoraggio emodinamico è bene integrare ai parametri sistemici il monitoraggio della perfusione microvascolare e dell'ossigenazione.

Alterazioni del flusso microvascolare possono essere monitorate in maniera diretta o in maniera indiretta. Fra le metodiche dirette spicca la *videomicroscopia* con tecnica a campo scuro incidente (IDF) che può essere applicata al letto del paziente grazie ad un dispositivo portatile. Con questa metodica viene indagato principalmente il microcircolo

sublinguale di cui è fondamentale conoscere la densità e l'eterogeneità di perfusione. La valutazione dell'ossigenazione tissutale è, invece, una valutazione indiretta della perfusione di un tessuto; *la spettroscopia nel vicino infrarosso NIRS* utilizza la luce nel vicino infrarosso per misurare l'ossiemoglobina e la desossiemoglobina dei tessuti nonché la saturazione di O₂ del tessuto StO₂.

In videomicroscopia la normale microcircolazione è caratterizzata da una fitta rete di capillari perfusi la cui eterogeneità è minima, vi è un adattamento del microcircolo alle esigenze metaboliche dei tessuti modulando gli sfinteri precapillari sulla base di fattori sistemici e locali. *Durante la sepsi è evidente una eterogeneità nella distribuzione del sangue: capillari non perfusi sono in stretta prossimità di capillari perfusi, il flusso risulta alterato, rallentato, intermittente o a tratti assente.*



Si ponga l'attenzione su questi due fermo immagine: nella prima foto viene rappresentato il microcircolo di un paziente sano dove si vede facilmente la ricca densità di capillari perfusi e si intuisce la presenza di un flusso continuo. Nella seconda foto, invece, presa da un paziente arruolato nello studio, la densità capillare è fortemente ridotta, alcuni vasi non sono perfusi e altri presentano un flusso discontinuo. [20]

Nel paziente settico vi è una ridotta VO₂ con SvO₂ elevata a fronte di una DO₂ normale. Ciò è spiegato dalle due teorie seguenti:

- Se il flusso è eterogeneo, nonostante la DO₂ sia conservata, le cellule vicine ai capillari perfusi con flusso continuo consumano una normale quota di O₂, mentre le cellule lontane non ricevono sufficiente O₂ e vanno incontro ad ipossia. Il tessuto cerca di limitare l'impatto dato da un'ipoperfusione riducendo il suo metabolismo e riducendo quindi la sua VO₂. Questo spiega perché nella sepsi la SvO₂ risulta tipicamente elevata. [21]
- Una delle caratteristiche della sepsi è la ridotta capacità di estrarre O₂ dal sangue: l'ATP è la molecola energetica chiave nei più importanti processi cellulari, il processo aerobico che porta alla formazione di ATP avviene nei mitocondri attraverso la fosforilazione ossidativa, questa è una reazione complessa (alimentata dal gradiente protonico attraverso la membrana interna mitocondriale) che vede protagonista la catena di trasporto di elettroni il cui accettore finale è l'ossigeno. Pertanto, affinché venga generata l'energia necessaria alle funzioni cellulari l'apporto di ossigeno deve essere costante. Se la disponibilità di ossigeno è limitata o l'utilizzo di ossigeno da parte della cellula è alterato, il consumo di ossigeno cellulare può diminuire e l'ipossia tissutale è un buon substrato per lo sviluppo di una disfunzione d'organo. Nel paziente settico (oltre ad avere una profonda alterazione del microcircolo con un mismatch fra domanda e offerta di O₂) quello che succede è una compromissione intrinseca della respirazione cellulare che contribuisce alla scarsa produzione di ATP nonostante i valori normali di PO₂ intorno ai mitocondri, all'interno delle cellule. Questo meccanismo è chiamato ipossia citopatica. L'ipossia citopatica nella sepsi vede molti meccanismi che partecipano congiuntamente alla sua genesi ma il principale sembra legato all'NO: macrofagi, neutrofilo, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule muscolari lisce producono iNOS (NO sintasi inducibile), questo enzima produce grandi quantità di NO il quale entra nelle cellule dei vasi, attiva la guanilatociclastasi che, a sua volta, produce grandi quantità di cGMP responsabili di una massiva vasodilatazione. Nella sepsi e nello shock settico l'NO causa una perdita di tono e di reattività vascolare; l'NO reagisce con il superossido (O₂⁻ + NO → ONO₂⁻) generando perossinitrito responsabile della necrosi cellulare mediante rottura di DNA, perossidazione di

lipidi, *inibizione e danno al mitocondrio*. Questo meccanismo è il principale responsabile dell'ipossia citopatica. [22]

1.12 VALUTAZIONE DEL MICROCIRCOLO: METODICHE DI VALUTAZIONE DIRETTA

La seconda consensus conference sulla valutazione del microcircolo sublinguale nei pazienti critici mirava a fornire linee guida sull'utilizzo di microscopi vitali portatili (HVM) al letto del paziente e ad aiutare nell'interpretazione delle immagini relative al microcircolo sublinguale. La prima generazione di tali dispositivi HVM si è basata sull'imaging spettrale ortogonalmente polarizzato (OPS), la seconda generazione si è basata sull'imaging sidestream dark-field (SDF), recentemente è stato introdotto un dispositivo di terza generazione che si basa su una modalità alternativa di microscopia chiamata imaging a campo scuro incidente (IDF) con una migliore risoluzione ottica che ha dato una migliore qualità dell'immagine e ha permesso la visualizzazione di più capillari rispetto ai dispositivi di generazione precedente. La seguente tabella riassume le principali differenze fra le varie metodiche [23]

Table 1 Comparison between SDF/IDF technical specifications

From: [Second consensus on the assessment of sublingual microcirculation in critically ill patients: results from a task force of the European Society of Intensive Care Medicine](#)

	Microscan (Microvision Medical, Amsterdam, Netherlands)	Capiscope HVCS (KK technology, Honiton, UK)	Capiscope HVCS-HR ^a (KK technology, Honiton, UK)	Cytocam (Braedius Medical, Huizen, Netherlands)
Type	SDF	SDF	SDF	IDF
Image size (pixels)	NTSC: 720 × 480 PAL: 720 × 576	752 × 480	1280 × 1024	2208 × 1648
Resolution (µm/pixel)	1.45 (horizontal) 1.55 (vertical) ^b	0.92	0.81	0.66 ^c
Field of view (µm)	1044 × 758 (NTSC)	692 × 442	1037 × 829	1457 × 1061
Frame rate (frames/s)	NTSC: 30 PAL: 25	Up 87 ^d	25 ^d	25
Illumination time (ms)	10	0.5–2 ^d	0.5–2 ^d	2

[23]

L'imaging Citocam-IDF (Braedius Medical, Huizen, Paesi Bassi) consiste in una illuminazione "Incident Dark Field" avente caratteristiche ottiche e tecniche perfezionate per la visualizzazione della microcircolazione sulle superfici degli organi. Questa metodica utilizza l'illuminazione incidente del campo scuro con LED ad alta luminosità aventi un tempo di impulso di illuminazione molto breve di 2 ms.

L'acquisizione dell'immagine e il sensore sono sotto il controllo del computer e vengono sincronizzati con gli impulsi di illuminazione. Questa funzione, in combinazione con un set specializzato di lenti, proietta immagini su un sensore controllato dal computer. Tutto ciò si traduce in una visualizzazione nitida del microcircolo che mostra il flusso di globuli rossi e bianchi. Il dispositivo è costruito in alluminio e titanio, risultando quindi uno strumento leggero (120 g) e simile a una penna (lunghezza 220 mm, diametro 23 mm). La fotocamera è completamente digitale con un sensore ad alta risoluzione, con una dimensione del fotogramma di 3,5 megapixel. La combinazione di un fattore di ingrandimento ottico di 4 e l'ampia area dell'immagine del sensore fornisce un campo visivo di $1,55 \times 1,16$ mm, circa tre volte più grande del campo visivo dei dispositivi precedenti. La fotocamera è collegata a un controller del dispositivo installato su un computer utilizzato per l'archiviazione e l'analisi delle immagini. Il controller del dispositivo include un microprocessore dedicato al controllo della fotocamera con la possibilità di regolare la messa a fuoco [24]

Un prerequisito per valutare la funzione del microcircolo utilizzando l'imaging HVM è garantire che vengano effettuate misurazioni prive di artefatti quali: artefatti di pressione, di illuminazione, di messa a fuoco, di contenuto (saliva, bolle, sangue). L'artefatto più comune è l'applicazione di un'eccessiva pressione che mima uno stato di basso flusso, la presenza di tali artefatti viene riconosciuta nel caso in cui sia presente un flusso impedito nei vasi più grandi di $20 \mu\text{m}$. Per cogliere l'eterogeneità del microcircolo è bene attuare una misurazione in più siti, vengono raccomandate almeno 3 aree differenti di indagine: questo è necessario perché l'attuale generazione di HVM ha un campo visivo significativamente più ampio. La registrazione minima consigliata in ogni area è di 4s fino ad un massimo di 20s. Quello che si deve valutare della microcircolazione è la sua capacità di perfondere i tessuti. Le due componenti che descrivono questa funzione fisiologica sono il *flusso* dei globuli rossi attraverso i capillari e la *densità* dei capillari perfusi. Considerando queste due proprietà fisiologiche e tenendo conto delle tipiche alterazioni riscontrate in corso di malattia critica come la sepsi, cioè l'eterogeneità della perfusione, sono state sviluppate diverse misure funzionali allo studio del microcircolo. Le immagini vengono analizzate grazie ad un software chiamato "AVA" Automated Vascular Analysis (AVA, Microvision Medical, Amsterdam, NL) e le variabili analizzate sono le seguenti:

- Proportion of Perfused Vessel% PPV: parametro volto a delineare la qualità della perfusione. L'immagine analizzata viene divisa in 3 linee orizzontali e 3 linee verticali equidistanti, viene poi calcolata la percentuale di vasi perfusi che attraversano le linee sul totale dei vasi che incrociano la griglia.
- De Backer score (n/mm): parametro indicativo della densità dei vasi. Viene calcolato dividendo il numero totale dei vasi che incrociano la griglia per la lunghezza della griglia stessa.
- Microvascular flow index MFI: parametro che ci informa sulla qualità di perfusione; l'immagine viene divisa in quattro quadranti, un numero è assegnato ad ogni quadrante sulla base del flusso predominante (0= nessun flusso; 1=intermittente; 2= rallentato; 3= continuo). L'MFI è la media dei valori di ogni singolo quadrante.
- Total Vessel Density (TVD) mm/mm²: viene calcolata come la lunghezza totale dei vasi diviso la superficie totale dell'area analizzata.
- Perfused Vessel Density (PVD) mm/mm²: PPV x TVD
- Heterogeneity Index (HI): vengono valutati dai tre ai cinque siti, FHI è il risultato della differenza fra l'MFI più alto e l'MFI più basso diviso l'MFI medio, in questo modo calcolo l'eterogeneità di perfusione
- Space-time diagram STD (mm/s): misura l'esatta velocità di scorrimento dei globuli rossi.

1.13 VALUTAZIONE DEL MICROCIRCOLO: METODICHE DI VALUTAZIONE INDIRETTA

La saturazione tissutale StO₂ può essere valutata con la metodica non invasiva Near Infrared Spectroscopy (NIRS). Questa tecnologia sfrutta le proprietà di assorbimento differenziale fra l'emoglobina ossigenata e deossigenata per valutare l'ossigenazione del muscolo scheletrico. La luce del vicino infrarosso (680-800 nm) attraversa facilmente i tessuti biologici e viene assorbita esclusivamente dall'emoglobina, dalla mioglobina e dal citocromo ma, essendo il contributo di questi ultimi due minimo nell'attenuazione del segnale, quello che ne risulta è principalmente il segnale dell'emoglobina presente

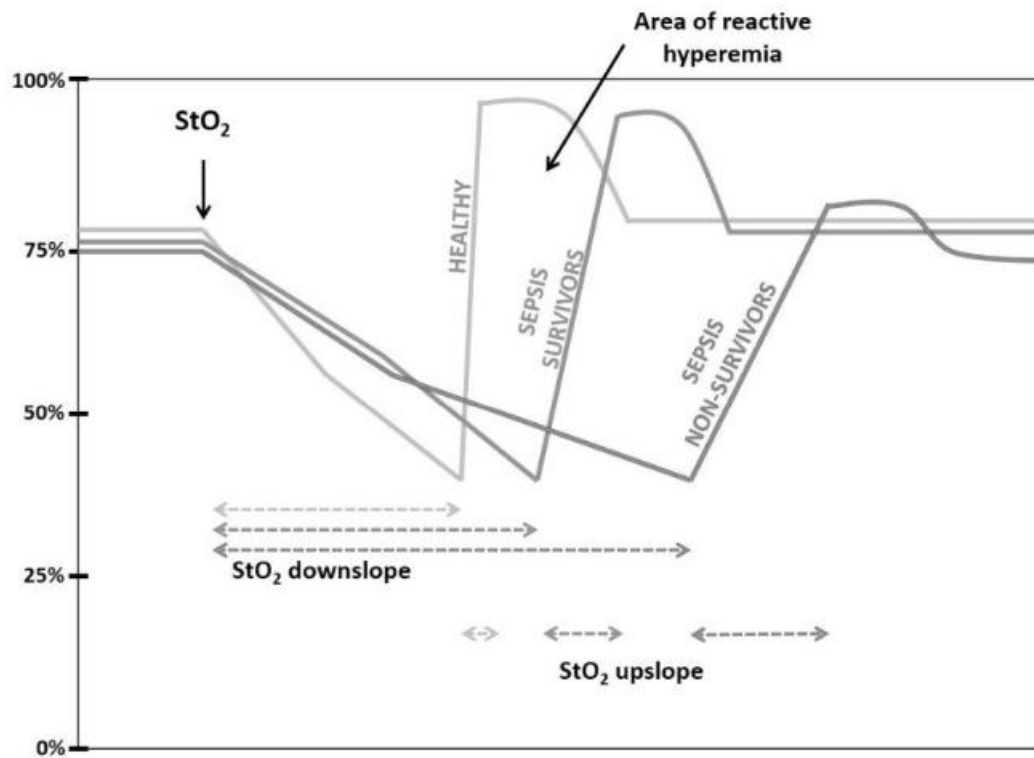
all'interno del volume di tessuto attraversato dalla luce nel vicino infrarosso. L'apparecchiatura necessaria per un sistema NIRS è costituita da una sorgente luminosa, fasci ottici (optodi) per l'emissione e la ricezione della luce, un processore e un sistema di visualizzazione. La distanza tra il punto di entrata e di uscita della luce determina l'entità del tessuto campionato. Come precedentemente annunciato, gli spettri di assorbimento dell'ossi- e della desossi-emoglobina differiscono, le loro concentrazioni relative possono essere rilevate misurando le variazioni dell'intensità della luce quando la luce passa attraverso e viene riflessa dal tessuto, fornendo così una stima della StO₂. Inoltre, il segnale NIRS deriva principalmente dall'emoglobina contenuta all'interno dell'albero vascolare e principalmente nei vasi con un diametro <1 mm (arteriole, capillari e venule) perché l'alta concentrazione di sangue nelle arterie e nelle vene rende improbabile l'emergenza di fotoni dai vasi di grosse dimensioni. [25] Questa tecnica è stata proposta nella quantificazione della disfunzione microvascolare nel paziente settico; aggiungendo infatti un test di occlusione vascolare (VOT) è possibile misurare il consumo di ossigeno e la reattività del microcircolo. Introdurre una sfida ischemica, al contrario di una valutazione statica di StO₂, consente di valutare la risposta del tessuto ad una perturbazione fisiologica e la capacità di riserva di questo. Nei pazienti critici è stato, infatti, dimostrato che lo studio con NIRS associato a VOT consente l'identificazione di alterazioni nella capacità di estrazione dell'ossigeno da parte del tessuto e anomalie nella reattività microvascolare che possono avere un valore predittivo di mortalità. [26]

Per eseguire la suddetta indagine si procede posizionando il sensore NIRS sull'eminanza tenar o sull'avambraccio registrando, quindi, la StO₂ basale (le misurazioni di StO₂ derivate dal segnale NIRS potrebbero essere alterate da fattori locali come l'edema e lo spessore del tessuto adiposo, alcuni autori hanno proposto l'eminanza tenar come un sito affidabile, meno soggetto a variabilità inter- e intra-individuali [29]). Si utilizza generalmente un bracciale sfigmomanometro che viene apposto sul braccio e insufflato fino a raggiungere una pressione 50 mmHg superiore rispetto alla sistolica del paziente, questa condizione viene mantenuta per il tempo necessario affinché venga raggiunta una StO₂ di almeno 40%: si induce in questo modo un'ischemia stagnante transitoria. Dopodiché viene rilasciato lo sfigmomanometro e si assiste ad una fase di iperemia post-ischemica con aumento dei livelli di StO₂ [27]

Analizzando il grafico che deriva da una misurazione NIRS si trova:

- StO₂: in condizioni basali sane, il segnale NIRS riflette prevalentemente l'ossigenazione venosa poiché si stima che il 75% del sangue presente nel muscolo scheletrico si trova nel compartimento venoso. La StO₂ riflette l'equilibrio fra l'apporto e il consumo di ossigeno locale e qualsiasi cambiamento misurato di StO₂ potrebbe essere interpretato in entrambe le direzioni: cambiamenti nel flusso microcircolatorio locale e/o cambiamenti nel consumo locale di O₂.
- Downslope: la pendenza iniziale indica la progressiva deossigenazione dell' Hb (espressa come % nel tempo) in una situazione di "zero-flow", viene, pertanto, considerato un marcatore di estrazione locale di ossigeno. Maggiore è la pendenza della retta di Downslope più veloce è la formazione di deossiHb e, quindi, migliore è la capacità del tessuto di estrarre ossigeno.
- Upslope: la pendenza indica la riossigenazione dell'Hb (espressa come % nel tempo) una volta rilasciata l'occlusione vascolare. Pertanto, questa fase riflette la risaturazione dell'Hb, e questo dipenderà direttamente dall'afflusso di sangue e dal reclutamento capillare dopo lo stimolo ipossico.
- AUC: area di iperemia reattiva. Per iperemia reattiva si intende l'aumento di flusso ematico che segue ad un periodo di arresto del flusso. Dopo un'occlusione di almeno 20s le piccole arteriole si dilatano in maniera massiva e questa dilatazione è accompagnata da una meno pronunciata dilatazione delle arteriole di diametro maggiore, dei vasi di resistenza e delle vene, con un picco a 120s dalla disostruzione del circolo. Nella fase di ripristino del flusso ematico si osserva anche un'attiva componente miogena che costringe le arteriole e impedisce un aumento eccessivo della pressione arteriosa a livello dei capillari. [17] Nel suo recupero, la StO₂ assoluta può aumentare temporaneamente rispetto ai valori basali iniziali, ciò indica la vasodilatazione post-ischemica e il reclutamento capillare.

Figure 1. NIRS measurements in healthy volunteers and septic patients.



[28]

Come si evidenzia nel grafico, pazienti settici rispetto ad individui sani presentano una ridotta pendenza della curva di Downslope e di Upslope. Le alterazioni nella fase di deossigenazione dell'Hb, rappresentate da tassi di deossigenazione più bassi, sono state associate a una prognosi sfavorevole. La deossigenazione riflette il consumo locale di ossigeno e sembra ragionevole ipotizzare che i pazienti con estrazione limitata di ossigeno svilupperanno gradi più elevati di insufficienza d'organo. Questa limitazione del consumo locale di ossigeno può essere dovuta a due meccanismi diversi ma cumulativi: (a) un'alterazione fra domande e offerta di ossigeno dettata dalla disregolazione e alterazione del microcircolo tipica del paziente settico; (b) una bassa estrazione di ossigeno a livello cellulare a causa di disfunzione mitocondriale e/o alterazione della diffusione dell'ossigeno (edema interstiziale) [29]. Il tasso di estrazione di O₂ è nettamente ridotto nei pazienti critici rispetto ai soggetti sani; come si osserva nel grafico è stato evidenziato che una ridotta pendenza della curva di Downslope nella fase ischemica tardiva nei pazienti settici correla con una ridotta sopravvivenza. [28]

Capitolo 2 - IPOTESI ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

IPOTESI

L'ipotesi su cui si basa questo studio è che i pazienti che svilupperanno una coagulopatia sepsi-indotta presentino una più grave alterazione del microcircolo al momento della diagnosi di sepsi.

OBIETTIVO PRINCIPALE DELLO STUDIO

Valutare se esiste una differenza al tempo basale tra il microcircolo (valutato in termini di densità dei vasi perfusi –PVD) dei pazienti settici che svilupperanno SIC e quelli che non la svilupperanno.

OBIETTIVI SECONDARI DELLO STUDIO

Gli obiettivi secondari dello studio sono:

- valutare se esiste una differenza al tempo basale negli altri parametri microcircolatori tra i pazienti che svilupperanno SIC e quelli che non la svilupperanno;
- valutare se esiste una correlazione tra i parametri microcircolatori e i parametri emocoagulativi;
- valutare se esiste una correlazione tra l'ossigenazione tissutale e i parametri emocoagulativi;
- valutare se esiste una correlazione tra gli indici di danno del glicocalice endoteliale e i parametri emocoagulativi.

Capitolo 3 - MATERIALI E METODI

In questo studio osservazionale prospettico monocentrico, si prevede di reclutare pazienti adulti con sepsi ricoverati presso la “SOD Clinica di Anestesia e Rianimazione Generale, Respiratoria e del Trauma Maggiore, Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche”, a partire dal giugno 2023. Ad oggi marzo 2023 sono stati reclutati 13 pazienti e in questa tesi vengono discussi i risultati preliminari raccolti su di essi. I partecipanti vengono considerati idonei al reclutamento se presentano tutti i criteri di inclusione e nessun criterio di esclusione. Sono quindi reclutati, secondo i criteri di inclusione, tutti i pazienti con diagnosi di sepsi da non più di 24 ore, definita come presenza di almeno una disfunzione d'organo minacciosa per la vita causata da una disregolata risposta dell'ospite ad una infezione. La disfunzione d'organo viene identificata da una variazione acuta del SOFA score \geq di 2 punti. I criteri di esclusione sono: pazienti con età inferiore ai 18 anni; pazienti con coagulopatia da altre cause (insufficienza epatica, uso cronico di anticoagulanti orali/antiaggreganti; neoplasie ematologiche; anomalie congenite della coagulazione; uso di contraccettivi orali); condizioni inficianti la possibilità di ottenere un monitoraggio del microcircolo sublinguale (gravi traumi maxillo-facciali, abbondanti perdite ematiche o secrezioni dal cavo orale); diniego del consenso informato; pazienti legalmente interdetti. I pazienti che presentano i criteri di inclusione e nessuno dei criteri di esclusione vengono valutati per l'arruolamento fino al raggiungimento della dimensione campionaria prevista. Considerando il rischio minimo derivante dalla seguente sperimentazione e considerando che il paziente non è in grado di esprimere il proprio consenso poiché sedato, in assenza di volontà contraria precedentemente espressa, è possibile acquisire il consenso informato e le informazioni relative alla sperimentazione dopo la decisione di includere il soggetto nella sperimentazione. I familiari vengono adeguatamente informati e viene consegnata loro apposita informativa contenente la descrizione delle principali caratteristiche e degli obiettivi che lo studio si propone. Si procede, quindi, al momento del reclutamento ad annotare età, sesso, comorbidità, body mass index (BMI), diagnosi ed esami colturali all'ingresso, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II e Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II

score all'ingresso e al momento dell'inclusione nello studio. Al momento del reclutamento e per ogni tempo dello studio vengono annotati parametri clinici, emodinamici, respiratori, di laboratorio e microbiologici nonché la terapia con farmaci analgesici e sedativi, inotropi/vasopressori, anticoagulanti, antimicrobici e/o steroidei in atto, con relativi dosaggi. Viene, inoltre, registrata, se effettuata, la terapia sostitutiva renale. Giornalmente viene calcolato il SOFA score e vengono raccolti i seguenti dati degli esami di laboratorio prelevati giornalmente: conta leucocitaria, conta piastrinica, INR, PTT, fibrinogeno, antitrombina III, D-dimero, procalcitonina. Ogni giorno per i primi 5 giorni successivi alla diagnosi di sepsi, vengono calcolati il SIC score e il DIC score, come descritti in letteratura e come riportato nella tabella seguente.[9]

		ISTH overt DIC	SIC
ITEM	SCORE	RANGE	RANGE
Conta piastrinica x10 ⁹ /l	2	<50	<100
	1	≥50, <100	≥100, <150
FDP/D-dimero	3	>4000ng/ml	-
	2	400-4000ng/ml	-
Tempo di Protrombina (PT ratio)	2	≥6s (>1,7)	(>1,4)
	1	≥3s (1,3-1,7)	(>1,2; ≤1,4)
Fibrinogeno (g/ml)	1	<100	-
SOFA score	2	-	≥2
	1	-	1
Total score DIC o SIC		≥5	≥4

Inoltre tutti i giorni per i primi 5 giorni dalla diagnosi di sepsi la coagulazione viene valutata tramite tecnica viscoelastica (TEG o ROTEM) e vengono calcolati e registrati i seguenti parametri sulle tracce INTEM, EXTEM, FIBTEM, APTEM: coagulation time (CT), clot formation time (CFT), alfa angle, maximum clot firmness (MCF), maximum

lysis (ML), clot lysis index a 30 e a 60 min (CLI30, CLI60). Il microcircolo sublinguale e l'ossigenazione tissutale sono valutati al momento del reclutamento (T0), al momento della positivizzazione al SIC o al DIC score e all'ultimo giorno di studio (T4). Al tempo T0 vengono prelevati due campioni ematici, uno viene centrifugato a 4000 giri per 10 minuti così da ottenere plasma che viene poi aliquotato in 2 provette, l'altro viene centrifugato sempre a 4000 giri per 15 minuti in modo da poter aliquotare siero in altre 2 provette. Le 4 provette vengono stoccate in congelatore a -80 °C, per la misurazione dei livelli di eparan solfato, acido ialuronico e syndecan-1, come indici di danno del glicocalice endoteliale .

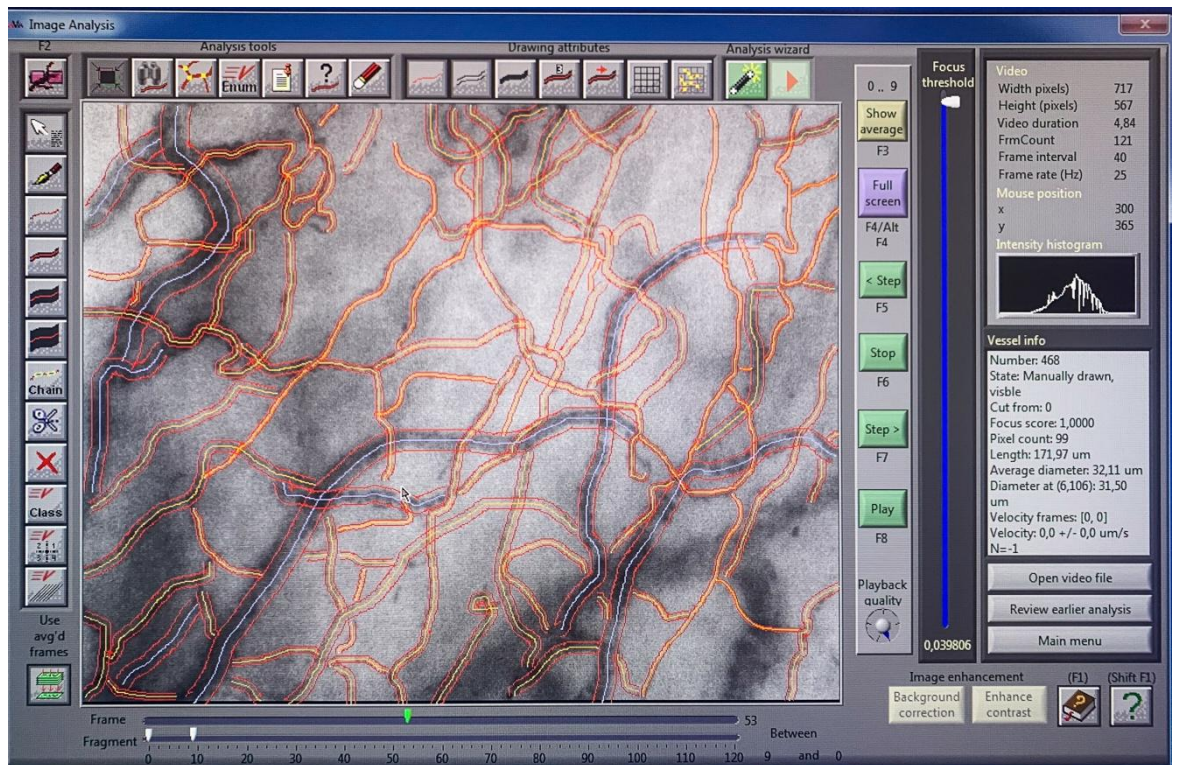
Per l'acquisizione delle immagini del microcircolo sublinguale lo strumento utilizzato è il CYTOCAM (Braedius Medical, Amsterdam, The Netherlands) il cui funzionamento è incentrato sulla tecnica "Incident Dark Field Imaging" IDF già precedentemente illustrata. Ci si avvicina con lo strumento al letto del paziente e, previa pulizia del cavo orale da saliva ed eventuali secrezioni mediante garza imbevuta di fisiologica, lo strumento viene delicatamente applicato sulla mucosa sublinguale senza esercitare eccessiva forza. Vengono registrate almeno 3 sequenze di 10s ciascuna in zone diverse del cavo orale cercando di mantenere una posizione quanto più ferma possibile così da limitare artefatti da movimento. Successivamente le 3 immagini di migliore qualità vengono analizzate offline con l'ausilio del Software AVA:

- Il primo Step consiste nella stabilizzazione della sequenza di frames acquisiti

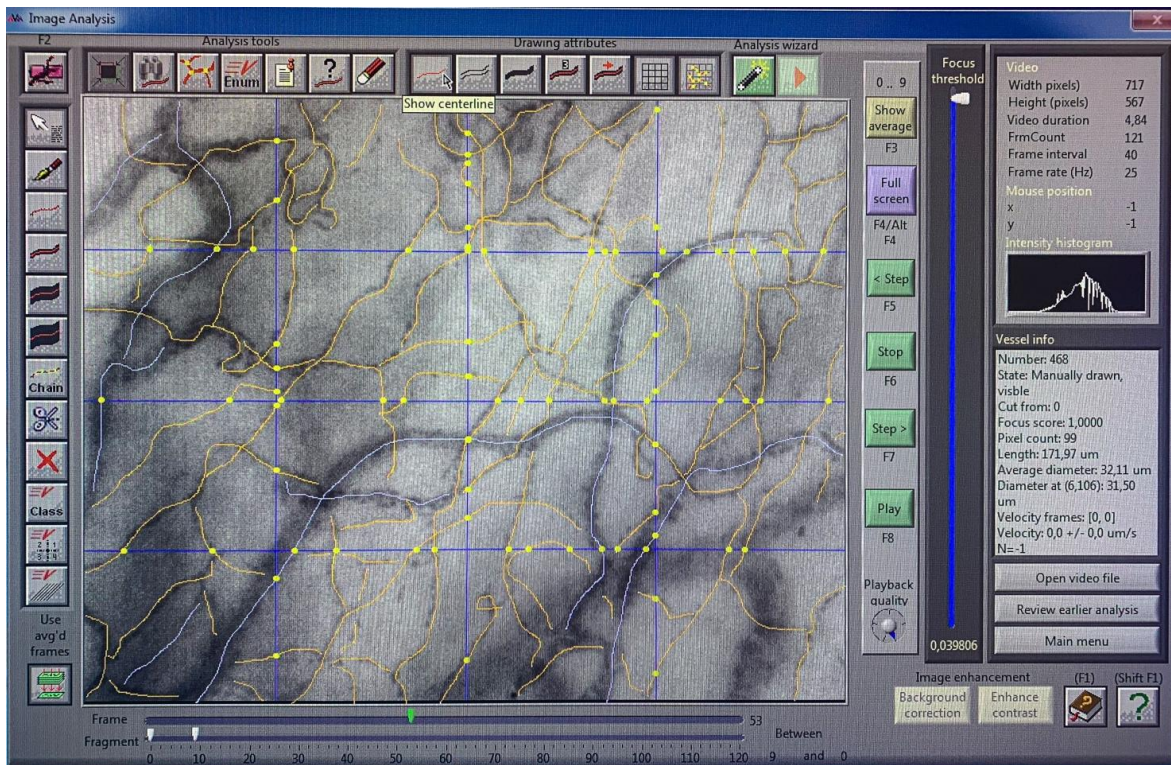


con lo scopo di ottenere immagini più ferme e più nitide.

- Il secondo step consiste nella delineazione manuale (con il puntatore del mouse) dei singoli vasi, valutandone il diametro: sono evidenziati in giallo i vasi di piccolo calibro, inferiori a 20 micron, in blu i vasi di medio calibro fra 20 e 50 micron e in verde i vasi di grande calibro superiori a 50 micron



- Si procede poi al calcolo dei parametri di densità vascolare TVD, PVD, De Backer score, dei parametri di perfusione PVV, MFI, e dell'eterogeneità del flusso FHI. Per farlo si divide l'immagine in 16 quadranti mediante 3 linee verticali e 3 linee orizzontali, i "dot" gialli visibili nell'immagine sottostante indicano gli incroci dei singoli vasi con la griglia preposta. Si può calcolare, a questo punto, il De Becker score (dividendo il numero dei vasi che incrociano la griglia per la lunghezza della griglia stessa) indicativo della densità dei vasi. La perfusione dei vasi viene valutata ad occhio nudo e viene definita: continua se il flusso è presente; assente se non è visualizzabile alcun flusso; intermittente se il flusso è presente per il 50% del tempo di visualizzazione dell'immagine.



Si passa, poi, al calcolo dell'MFI dividendo l'area analizzata in 4 quadranti e valutando in ciascun quadrante il flusso predominante per ogni tipo di vaso (piccoli, medi e grandi):

- flusso assente 0pt;
- flusso intermittente 1pt;
- flusso rallentato 2pt;
- flusso continuo 3pt.

L'MFI finale è la media dei valori ottenuti nei 4 quadranti.

Dalle immagini del microcircolo sublinguale, vengono inoltre conteggiati i Rolling Leukocytes (RL) nelle venule post-capillari (vasi di diametro $> 20 \mu\text{m}$) utilizzando il programma Virtual Dub che permette di mandare il video in slow motion. Per il conteggio sono stati selezionati spezzoni di video di 60 frames. I RL sono leucociti "attivati" che aderiscono e "rotolano" sull'endotelio vascolare. L'endotelio, come visto

in precedenza; è fisiologicamente rivestito dal glicocalice endoteliale, uno strato di glicosamminoglicani, fondamentale per il mantenimento dell'emoreologia micro circolatoria. In caso di danneggiamento del glicocalice, come nella sepsi, vengono ad essere esposti sulla superficie endoteliale dei recettori per i leucociti, questo determina un aumento delle interazioni tra endotelio e leucociti con rallentamento/alterazione del flusso ematico. Inoltre al glicocalice sono normalmente legate molecole antiaggreganti, come l'ATIII, un suo danneggiamento provoca l'attivazione della cascata coagulativa.

Per quanto riguarda il monitoraggio indiretto si utilizza il PortaMon (Artinis Medical Systems B.V. The Netherlands) che sfrutta la tecnica NIRS.



- Per prima cosa si connette via Bluetooth la sonda al computer su di cui è installato il programma Oxysoft. Si sceglie poi quali dei parametri rilevati vengono riportati nei grafici: TSI%; O₂Hb; HHb.

- In secondo luogo, si posiziona il PortaMon sull'avambraccio del paziente in maniera non invasiva.

- Si attendono circa 3 minuti per la stabilizzazione del segnale così da ottenere un valore attendibile di StO₂ basale.

- Si procede al Test di Occlusione Vascolare e si aspetta che il valore di StO₂ arrivi a 40%

- Si sgonfia il bracciale e si aspetta la risalita della StO₂ fino al ritorno, dopo un

periodo di iperemia reattiva, ai livelli di StO₂ basale.

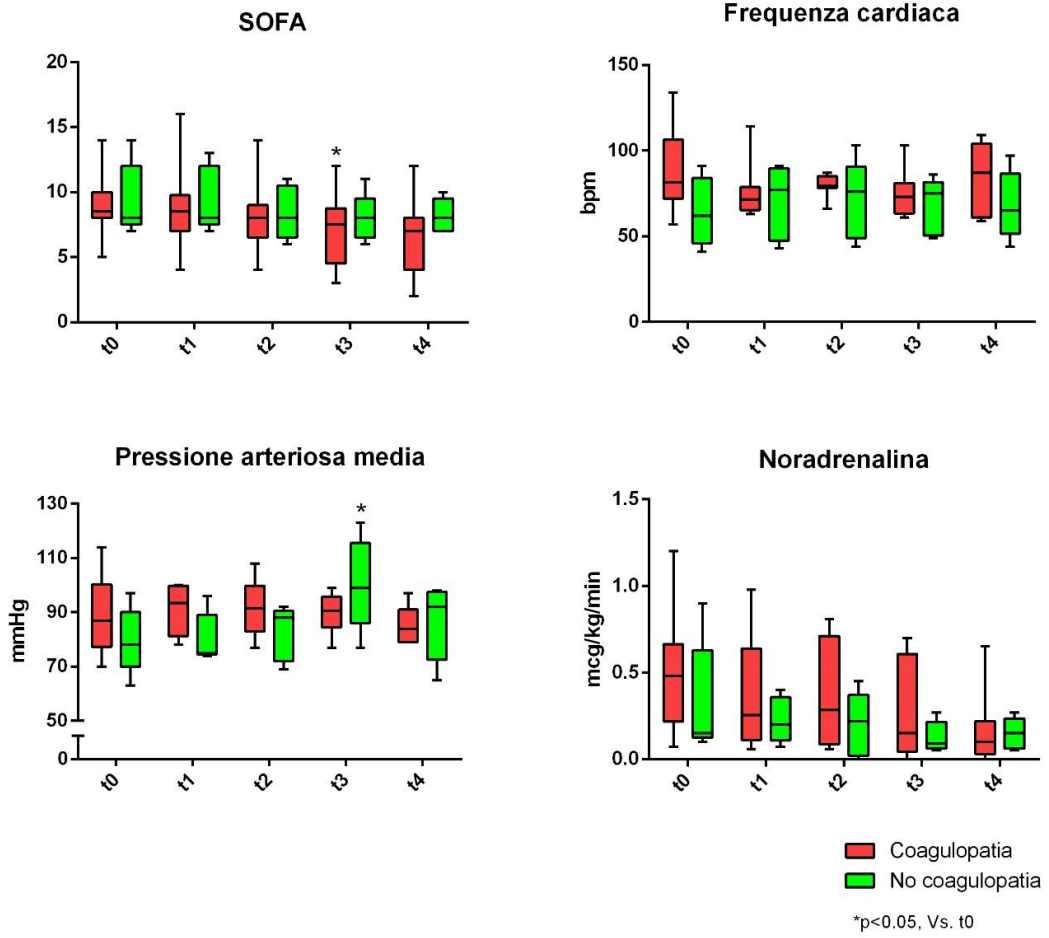
L'analisi dei grafici viene eseguita con il programma OxySoft. Si procede selezionando la fascia temporale desiderata corrispondente all'inizio e alla fine di ogni tratto del grafico di cui si vuole studiare la pendenza o l'AUC.

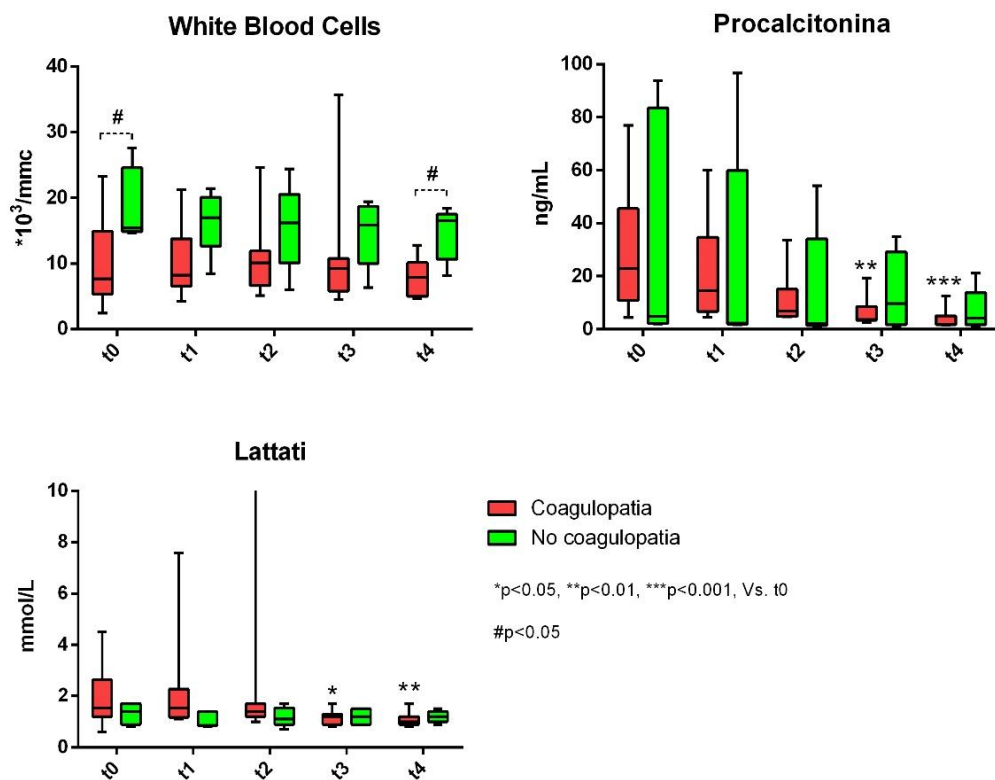
L'analisi statistica è stata condotta tramite il software GraphPad Prism vers. 6. La normalità di distribuzione dei dati è stata testata con il test di Kolmogorov Smirnov. I dati sono espressi come mediana e [1-3 quartile]. Per il confronto dei dati tra i tempi è stato usato il test di Mann Whitney. Per il confronto tra i tempi sono stati usati il test di Wilcoxon o il test Friedman per misure ripetute. Per valutare la presenza di correlazioni tra le variabili è stato usato il test di Spearman. Un valore di $p < 0.05$ è stato usato per indicare la significatività statistica.

Capitolo 4 - RISULTATI

Sono stati reclutati finora 13 pazienti con diagnosi di sepsi da non più di 24 ore, di cui 6 di sesso maschile e 7 di sesso femminile. L'età mediana dei partecipanti è di 58 anni [30-71]. La diagnosi di ammissione in Terapia Intensiva è di *insufficienza respiratoria* in 3 pazienti, di *politrauma* in 3 paziente e in 7 pazienti la diagnosi è di *sepsi*. L'origine della sepsi che ha interessato i partecipanti è *di tipo respiratorio* in 5 di essi, in 4 pazienti *addominale*, in 1 paziente *urinaria*, in 1 paziente *ematogena* (endocardite) e in 2 pazienti a partire dai *tessuti molli*. Al momento del reclutamento il *Simplified Acute Physiology Score II SAPSII* mediano è di 45 [30-64] e l'*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II APACHE II* mediano è di 14 [5-23]; il SOFA score mediano al T0 è di 8 [8-10]. Dei 13 pazienti reclutati 2 rispecchiavano i criteri diagnostici di shock settico. Tutti i pazienti sono ventilati meccanicamente e tutti risultano analgosedati: 9 di loro con propofol e 4 di loro con midazolam. Tutti ricevevano remifentanil in infusione. Tutti tranne 2 pazienti hanno ricevuto anticoagulanti (eparina a basso peso molecolare o calcieparina) a dosaggio profilattico. Tutti i pazienti tranne 1 sono sopravvissuti almeno per tutta la durata dello studio, mentre un paziente è deceduto al giorno 3. Dei 13 pazienti, 8 hanno sviluppato una coagulopatia sepsi-indotta al momento del reclutamento con SIC score positivo (≥ 4), 5 pazienti non hanno sviluppato coagulopatia. Solo 2 pazienti hanno risposto ai criteri di DIC al momento del reclutamento. Al giorno 5 (T4), la coagulopatia si è risolta in 10 pazienti, 2 hanno presentato ancora coagulopatia, 1 paziente è deceduto.

Di seguito sono mostrati i dati emodinamici e laboratoristici nei singoli pazienti. I pazienti con coagulopatia sepsi-indotta sono indicati con il colore rosso, i pazienti senza coagulopatia sono indicati con il colore verde.

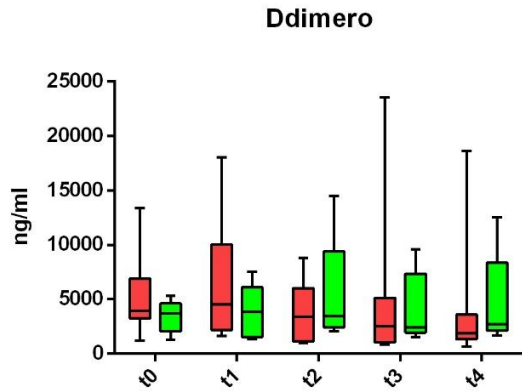
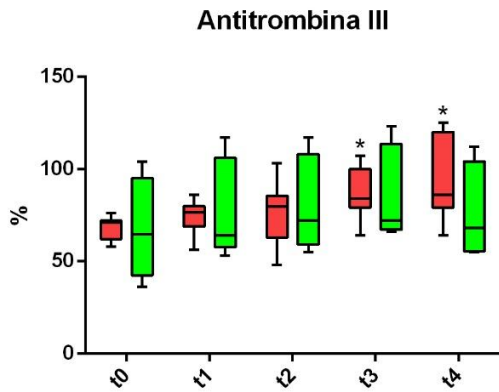
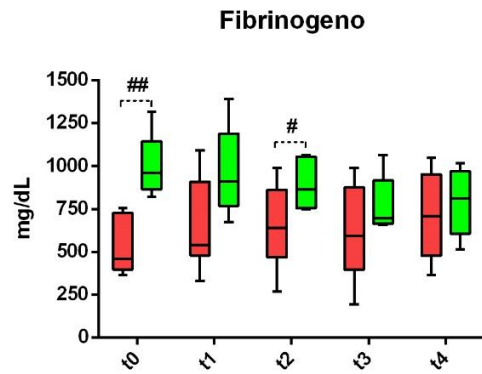
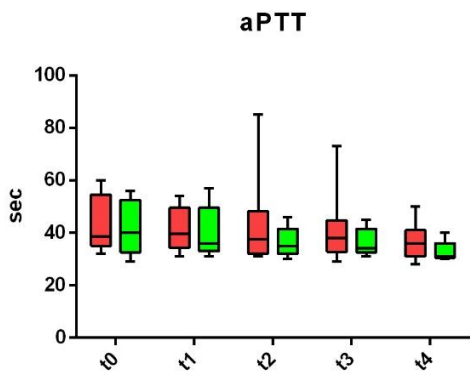
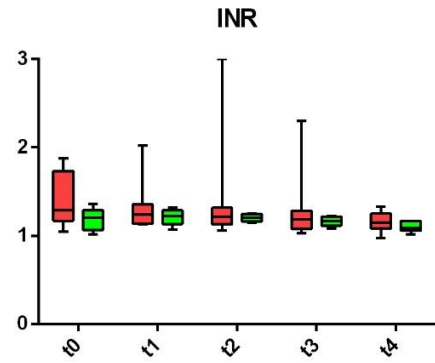
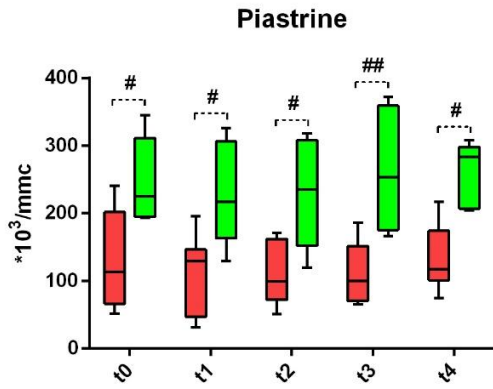




DATI COAGULATIVI

Come si può evincere dai grafici, i pazienti senza coagulopatia hanno WBC più alti rispetto ai pazienti con coagulopatia, mentre non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi per gli altri parametri.

I pazienti senza coagulopatia presentano livelli di piastrine e fibrinogeno più alti, mentre nessuna differenza significativa è riscontrata per gli altri parametri, anche se i livelli di D-dimero tendono ad essere più alti in presenza di coagulopatia.



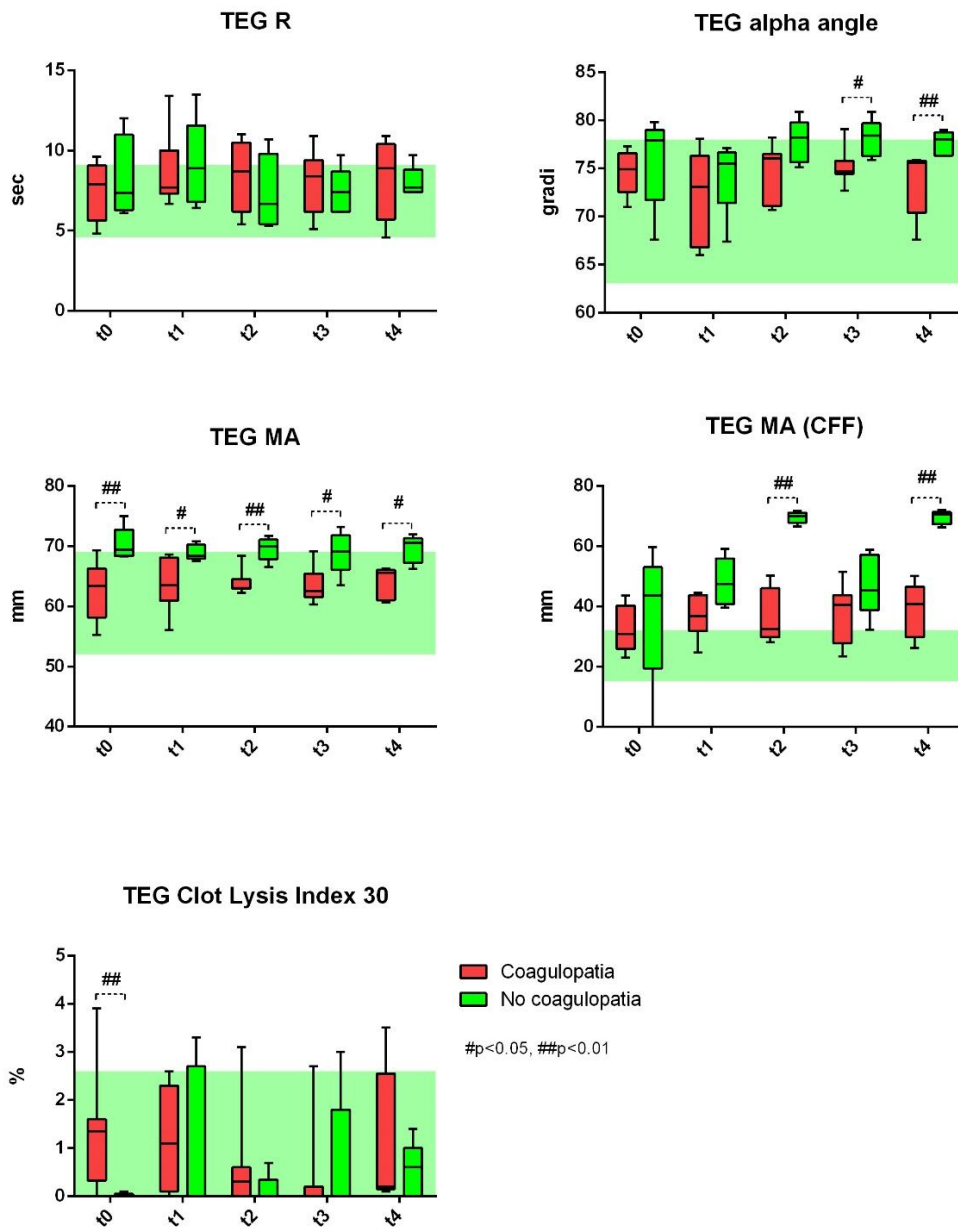
■ Coagulopatia
■ No coagulopatia

#p<0.05, ##p<0.01

*p<0.05, Vs. t0

TEG

All'interno del nostro schema di riferimento, il colore verde è utilizzato per demarcare il range entro cui si possono considerare come normali i valori specifici di ogni parametro. In generale, tutti i pazienti presentano valori di MA in CFF al di sopra del range di normalità (fibrinogeno funzionale – stato di ipercoagulabilità comune nella sepsi soprattutto nelle prime fasi). Questo parametro, così come il parametro MA in CK, è significativamente più elevato nei pazienti senza coagulopatia nei vari tempi. Il Clot Lysis Index è significativamente più alto nei pazienti con coagulopatia a t0. Questi dati potrebbero suggerire uno stato di ipercoagulabilità più accentuato tra i pazienti con SIC score positivo, con consumo maggiore del fibrinogeno (questo è coerente con i livelli più bassi di piastrine riscontrati nello stesso gruppo di pazienti).

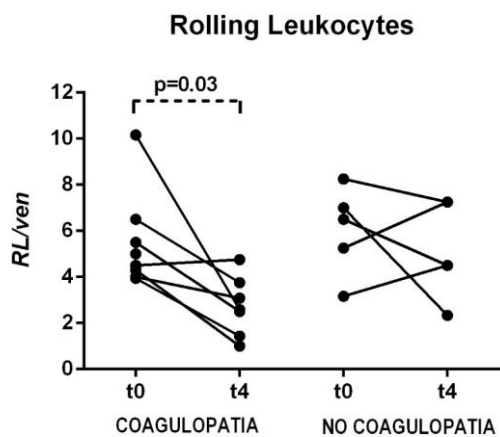


MICROCIRCOLO

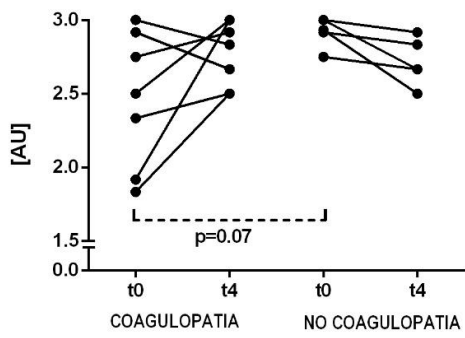
Di seguito sono riportati i parametri relativi al microcircolo sublinguale e all'ossigenazione tissutale (NIRS). I pazienti con coagulopatia tendenzialmente presentano una qualità del flusso microcircolatorio peggiore a t0 (MFI e PPV più bassi) e valori di StO2 significativamente più bassi a t0.

	Coagulopathy (n=8)	No coagulopathy (n=5)	p
Total vessel density (mm/mm²)			
t0	18.9 [17.2-23.0]	17.3 [15.0-21.1]	0.410
t4	19.0 [14.2-23.7]	19.7 [17.9-26.0]	0.268
Perfused vessel density (mm/mm²)			
t0	16.0 [15.4-20.3]	17.0 [14.2-19.4]	0.617
t4	18.1 [12.3-21.9]	17.8 [15.8-23.7]	0.525
De Backer score (n/mm)			
t0	12.7 [11.1-15.0]	12.2 [9.9-14.0]	0.410
t4	12.5 [10.5-13.3]	13.9 [12.7-16.2]	0.106
Percentage of Perfused Vessels (%)			
t0	91.9 [75.5-93]	94.1 [90.2-97.7]	0.171
t4	92.1 [89.6-96.5]	90.1 [87.1-94.1]	0.412
Microvascular Flow Index [AU]			
t0	2.6 [2.0-2.9]	2.9 [2.8-3.0]	0.075
t4	2.8 [2.5-3.0]	2.7 [2.6-2.9]	0.590
Heterogeneity Flow Index [AU]			
t0	0.11 [0.02-0.42]	0.07 [0.0-0.18]	0.254
t4	0.09 [0.00-0.37]	0.19 [0.13-0.29]	0.721
Rolling leukocytes (RL/venule)			
t0	4.7 [4.1-6.2]	6.5 [4.2-7.6]	0.456
t4	2.6 [1.4-3.7]	4.5 [3.4-7.2]	0.094

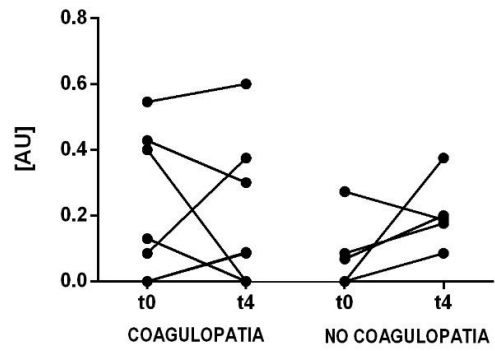
	Coagulopathy (n=8)	No coagulopathy (n=5)	p
StO2 (%)			
t0	59 [54-64]	67 [62-68]	0.016
t4	67 [65-68]	66 [59-71]	0.845
StO2 Downslope 1 (%/min)			
t0	-3.5 [-5.0, -2.7]	-3.5 [-8.9, -1.9]	0.848
t4	-5.9 [-7.8, -3.9]	-2.3 [-8.5, -1.0]	0.268
StO2 Downslope 2 (%/min)			
t0	-2.0 [-3.1, -0.5]	-3.0 [-7.5, -1.0]	0.420
t4	-4.1 [-5.9, -0.8]	-1.4 [-7.0, -0.4]	0.429
Delta Downslope (%/min)			
t0	0.9 [0.4-3.6]	0.6 [-0.8, 2.3]	0.420
t4	1.5 [0.7-1.9]	1.5 [0.3-1.6]	0.502
StO2 Upslope (%/min)			
t0	71 [38-81]	79 [54-113]	0.460
t4	67 [28-111]	29 [11-76]	0.146



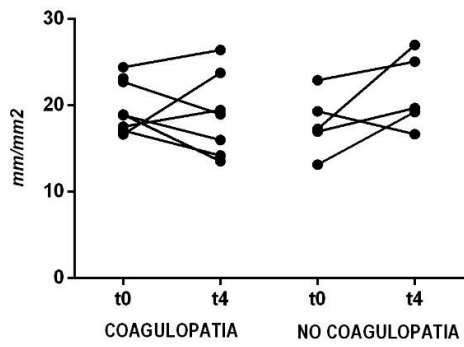
Microvascular Flow Index (small)



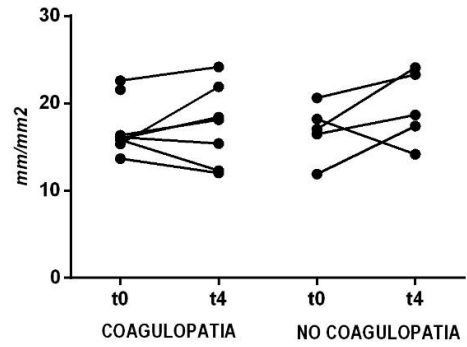
Heterogeneity Index



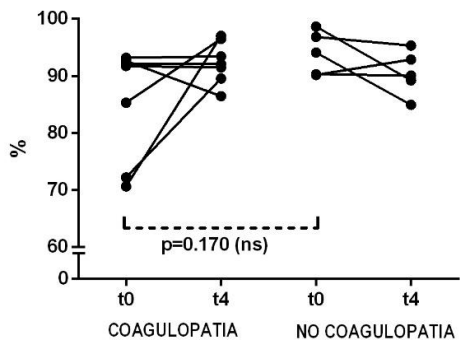
Total small Vessel Density



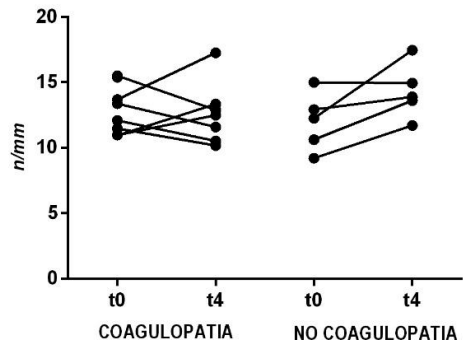
Perfused small Vessel Density

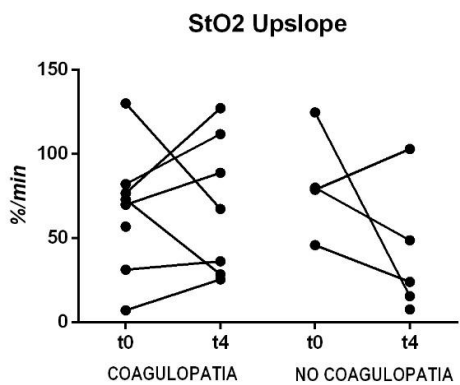
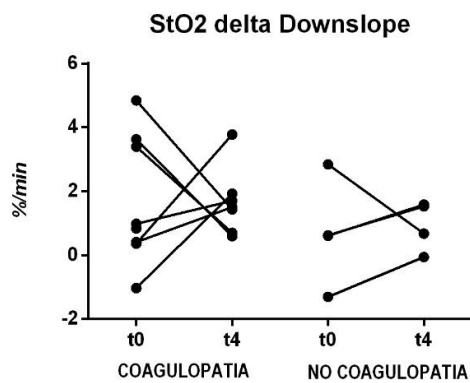
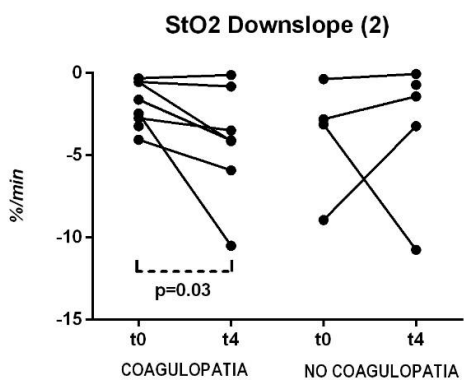
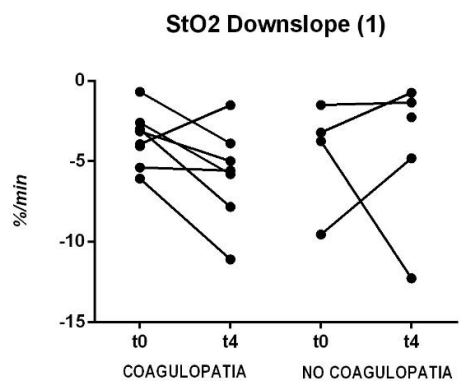
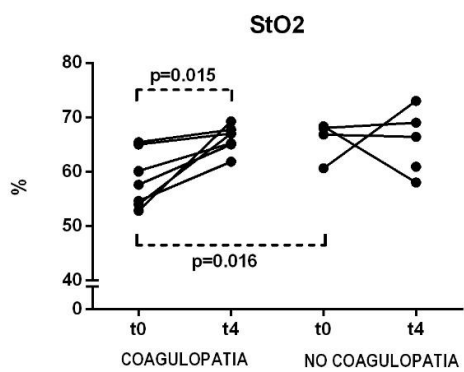


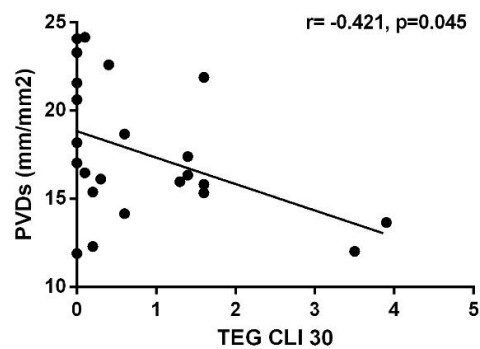
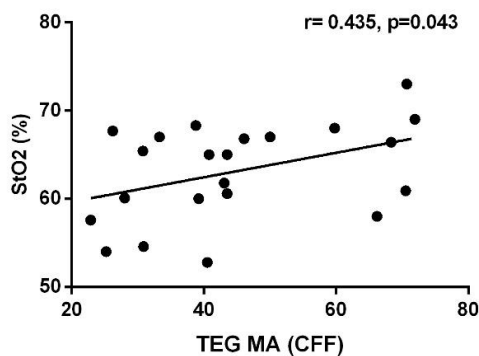
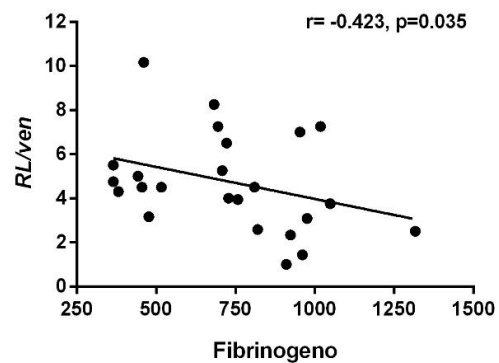
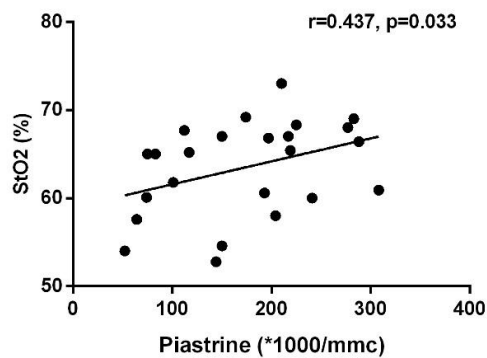
Percentage of Perfused small Vessels



De Backer score







CORRELAZIONI

I valori di StO2 correlano positivamente con la conta piastrinica e con i valori di MA (CFF). Al contrario, al ridursi dei livelli di fibrinogeno nel sangue i RL a livello del microcircolo tendono ad aumentare. Il Clot Lysis Index a 30 min correla negativamente con la densità dei vasi perfusi a livello del microcircolo. Questi dati suggerirebbero che i pazienti con coagulopatia (che sono quelli con ridotta conta piastrinica, livelli di fibrinogeno relativamente più bassi e segni di iperfibrinolisi secondaria) possono presentare alterazioni più importanti dell'ossigenazione tissutale, riduzione della densità microcircolatoria e aumento delle interazioni leucocito-endoteliali. Ad oggi, non sono state riscontrate altre correlazioni significative tra altri parametri microcircolatori (o NIRS) e parametri emocoagulativi, come ad esempio i livelli di Ddimero.

Capitolo 5 - DISCUSSIONE e CONCLUSIONE

L'obiettivo principale e centrale del nostro studio è l'indagine approfondita della possibile relazione tra le alterazioni del microcircolo e la capacità di predire l'insorgenza di una coagulopatia sepsi indotta. Questo tipo di coagulopatia correla con l'insufficienza d'organo e con un rischio aumentato di mortalità; pertanto, individuare l'esistenza di indizi precoci nel microcircolo potrebbe avere profonde implicazioni per la diagnosi e la gestione clinica.

Nel nostro studio è chiaramente osservabile come i pazienti che presentano una coagulopatia, definita in termini di un punteggio SIC positivo, manifestano condizioni microcircolatorie generalmente più compromesse rispetto a quei pazienti che non soddisfano i criteri per un punteggio SIC positivo. Queste osservazioni vengono a confermare, almeno parzialmente, le ipotesi che abbiamo precedentemente formulato. Da un'analisi dei dati raccolti durante il corso dello studio, emerge con una certa chiarezza che, al tempo T0, i pazienti con coagulopatia presentano una qualità del flusso al microcircolo peggiore, nello specifico in termini di MFI e PVV più bassi. Inoltre i pazienti senza coagulopatia presentano livelli di piastrine e fibrinogeno più alti rispetto ai pazienti con coagulopatia. Questo dato può essere collegato a un aumentato consumo, legato allo stato di ipercoagulabilità, e a un maggior "intrappolamento" di piastrine a livello dei NET (Neutrophil Extracellular Traps), che, a loro volta, attivano il processo coagulativo. E' noto, inoltre, che in condizioni fisiologiche lo spessore del glicocalice varia da 0,5 a 1,0 micrometri: una dimensione così inaspettatamente grande del glicocalice supera di parecchio le dimensioni dell'endotelio e delle molecole di adesione leucocitaria sostenendo, quindi, un ruolo protettivo verso il Rolling Leucocitario. [30] Oltre ad esercitare proprietà antiadesive un sano glicocalice regola la permeabilità endoteliale, agisce come mecano-trasduttore ed esercita attività antitrombotiche. Dati questi ruoli protettivi, è logico aspettarsi che la distruzione del glicocalice a causa di infiammazione e stress ossidativo possa compromettere l'emoreologia microvascolare. Infatti, si riscontra una degradazione del glicocalice in condizioni cliniche caratterizzate da disfunzione microvascolare ed endoteliale come il processo settico. La degradazione del glicocalice può, quindi, svolgere un ruolo chiave nello sviluppo dell'ipoperfusione microcircolatoria durante le malattie critiche, contribuendo all'insufficienza

multiorgano e alla morte. L'adesione dei globuli bianchi all'endotelio porta a un flusso sanguigno lento e potenzia l'attivazione dei leucociti e dell'endotelio con ulteriore produzione di mediatori infiammatori [31]. Queste evidenze confermate da altri studi, per ora, non sono supportate da una differenza statisticamente significativa nel contesto del nostro lavoro. Nell'analisi dei dati, sono state osservate significative alterazioni al TEG: i valori di MA in CK e in CFF sono più elevati nei pazienti senza coagulopatia nei vari tempi, mentre il Clot Lysis Index è più elevato nei pazienti con coagulopatia al tempo. Quest'ultimo dato correla con una fibrinolisi parzialmente inibita nei pazienti critici.

Queste evidenze sono coerenti con i dati di laboratorio: ridotti livelli di piastrine e fibrinogeno nei pazienti con SIC score positivo, che suggeriscono uno stato di ipercoagulabilità. Le alterazioni della coagulazione si riflettono sulla qualità del microcircolo e, di conseguenza, sugli scambi tissutali: questo è supportato da una StO₂ significativamente più bassa al t₀ nei pazienti con coagulopatia. e l'arruolamento di nuovi pazienti può far emergere nuove correlazioni anche esse statisticamente significative.

È fondamentale sottolineare che siamo di fronte ad un'analisi ancora in itinere. Questo è dovuto al fatto che il campione di pazienti finora analizzato non ha ancora raggiunto la quota prefissata. L'aspirazione è che, con la prosecuzione dello studio e, più specificamente, con il reclutamento dei 30 pazienti previsti, si possano effettuare comparazioni più significative e affidabili tra i due gruppi. Si potrebbe quindi avere un consolidamento del riscontro già positivo ottenuto dai dati preliminari: si può supporre che quei pazienti che manifestano coagulopatia nei giorni immediatamente successivi al momento dell'arruolamento, che corrisponde al giorno in cui viene diagnosticata la sepsi, potrebbero già mostrare alterazioni nel microcircolo nel momento esatto dell'arruolamento, cioè al tempo t₀.

RINGRAZIAMENTI

Era il 15 ottobre 2023, quando stavo studiando Emergenze, che Francesca, ora Dott.ssa Leli, mi chiede di ascoltare in anteprima la presentazione della sua tesi, che avrebbe dovuto esporre il giorno successivo davanti alla commissione. Durante la videochiamata sono rimasta colpita dalla chiarezza con cui è riuscita ad esporre un argomento così complesso. Il mio peregrinare alla ricerca di una tesi che mi appassionasse durava da circa un anno, ma in quel momento terminò; così Francesca mi propose di mettermi in contatto con la Dott.ssa Damiani per continuare lo studio. Una volta iniziata la frequenza tesi ho realizzato come i sei anni di studio sono una goccia in confronto al mare di complessità, che rappresenta la terapia intensiva. La prima volta che ho preso le misurazioni da sola è stato veramente sfidante. Poi giorno dopo giorno ho acquisito più sicurezza con la costante presenza di Elisa, anche a distanza, quando non di turno in ospedale. Spero di aver fatto un buon lavoro, da parte mia ho sempre cercato di dare il mio massimo. Ringrazio Francesca per avermi fatto conoscere questo reparto, Elisa per l'infinita disponibilità e pazienza, Erika e Roberta per la loro gentilezza, il Prof. Carsetti per aver accettato di presentarmi il giorno della laurea e il Prof. Donati per aver apprezzato la mia dedizione e il mio impegno.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bracht H, Hafner S, Weiß M. Sepsis-Update: Definition und Epidemiologie [Sepsis Update: Definition and Epidemiology]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* Jan; 54(1):10-20. 2019
- [2] Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet.* 7;392(10141):75-87. 2021
- [3] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama,* 315(8):801–810, 2016.
- [4] Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med.* Nov;26(11):1793-800. 1998
- [5] Tusgul S, Carron PN, Yersin B, Calandra T, Dami F. Low sensitivity of qSOFA, SIRS criteria and sepsis definition to identify infected patients at risk of complication in the prehospital setting and at the emergency department triage. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* Nov 3;25(1):108. 2017
- [6] Wiersinga WJ, van der Poll T. Immunopathophysiology of human sepsis. *EBioMedicine.* Dec;86:104363 2022
- [7] Mainiero- R. Misasi- M. Sorice "Fisiopatologia generale". Capitolo 7

- [8] Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med*; 30:1032-40. 2004
- [9] Iba T, Levy JH. Sepsis-induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Anesthesiology*. May;132(5):1238-1245. 2020
- [10] Iba T, Helms J, Connors JM, Levy JH. The pathophysiology, diagnosis, and management of sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care*. May 23;11(1):24. 2023
- [11] Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med*. Nov 8;48(4):295-313. 2017
- [12] Luddington RJ. "Thrombelastography/thromboelastometry". *Clin Lab Haematol*. Apr;27(2):81-90. 2005
- [13] Luz, L.T., Nascimento, B. & Rizoli, S. Thrombelastography (TEG®): practical considerations on its clinical use in trauma resuscitation. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **21**, 29. 2013
- [14] Adamzik M, Eggmann M, Frey UH, Görlinger K, Bröcker-Preuss M, Marggraf G, Saner F, Eggebrecht H, Peters J, Hartmann M. Comparison of thromboelastometry with procalcitonin, interleukin 6, and C-reactive protein as diagnostic tests for severe sepsis in critically ill adults. *Crit Care*.;14(5):R178. 2010
- [15] Sivula M, Pettilä V, Niemi TT, Varpula M, Kuitunen AH. Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Sep;20(6):419-26. 2009.
- [16] Lupu F, Kinasevitz G, Dormer K. The role of endothelial shear stress on haemodynamics, inflammation, coagulation and glycocalyx during sepsis. *J Cell Mol Med*. Nov;24(21):12258-12271. 2020

[17] Conti F. - "Fisiologia Medica"- Edi Ermes 2010

[18] Sibbald WJ, Messmer K, Fink MP. Roundtable conference on tissue oxygenation in acute medicine, Brussels, Belgium, 14-16 March 1998. *Intensive Care Med.* Jun;26(6):780-91. 2000

[19] Mallat J, Rahman N, Hamed F, Hernandez G, Fischer MO. Pathophysiology, mechanisms, and managements of tissue hypoxia. *Anaesth Crit Care Pain Med.* Aug;41(4):101087. 2022

[20] De Backer D, Durand A. Monitoring the microcirculation in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* Dec;28(4):441-51. 2014

[21] Goldman D, Bateman RM, Ellis CG. Effect of decreased O₂ supply on skeletal muscle oxygenation and O₂ consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun;290(6):H2277-85. 2006

[22] Mantzaris K, Tsolaki V, Zakyntinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev.* ;2017:5985209. 2017

[23] Ince C, Boerma EC, Cecconi M, De Backer D, Shapiro NI, Duranteau J, Pinsky MR, Artigas A, Teboul JL, Reiss IKM, Aldecoa C, Hutchings SD, Donati A, Maggiorini M, Taccone FS, Hernandez G, Payen D, Tibboel D, Martin DS, Zarbock A, Monnet X, Dubin A, Bakker J, Vincent JL, Scheeren TWL; Cardiovascular Dynamics Section of the ESICM. Second consensus on the assessment of sublingual microcirculation in critically ill patients: results from a task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* Mar;44(3):281-299. 2018

- [24] Aykut G, Veenstra G, Scorcella C, Ince C, Boerma C. Imaging Cytocam-IDF (incident dark field illumination) per il monitoraggio al capezzale della microcircolazione. *Terapia intensiva Med Exp.* dic;3(1):40. 2015
- [25] Creteur, J., Carollo, T., Soldati, G. *et al.* The prognostic value of muscle StO₂ in septic patients. *Intensive Care Med* **33**, 1549–1556 (2007).
- [26] Donati A, Damiani E, Domizi R, Scorcella C, Carsetti A, Tondi S, Monaldi V, Adrario E, Romano R, Pelaia P, Singer M. Near-infrared spectroscopy for assessing tissue oxygenation and microvascular reactivity in critically ill patients: a prospective observational study. *Crit Care.* Oct 1;20(1):311. 2016
- [27] Niezen CK, Massari D, Vos JJ, Scheeren TWL. The use of a vascular occlusion test combined with near-infrared spectroscopy in perioperative care: a systematic review. *J Clin Monit Comput.* Aug;36(4):933-946. 2022
- [28] Elisa Damiani¹, Roberta Domizi¹, Claudia Scorcella¹, Andrea Carsetti¹ and Abele Donati¹ .Evaluation of the microcirculation in critically ill patients.
- [29]. Mesquida J, Gruartmoner G, Espinal C. Skeletal muscle oxygen saturation (StO₂) measured by near-infrared spectroscopy in the critically ill patients. *Biomed Res Int.* 2013;2013:502194. doi: 10.1155/2013/502194. Epub 2013 Aug 21. PMID: 24027757; PMCID: PMC3763593.
- [30] Van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ES, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacol Rep.*;58 Suppl:75-80. 2006
- [31] Donati A, Damiani E, Domizi R, Romano R, Adrario E, Pelaia P, Ince C, Singer M. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res.* Nov;90:86-9. 2013