



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE
MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

Ruolo del paracetamolo contro gli effetti
dell'emoglobina libera nel paziente settico
febbrile, indagato mediante analisi del
microcircolo,
della perfusione tissutale
e dei marcatori di danno endoteliale:
studio prospettico osservazionale

Relatore: Chiar.mo
Prof. Abele Donati

Tesi di Laurea di:
Lara Pantaleoni

Indice

Introduzione	4
1. La sepsi	6
1.1. Definizione	6
1.1.1. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	6
1.1.2. Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (Cars)	
1.1.3. L'evoluzione nella definizione di sepsi	7
1.2. Epidemiologia della sepsi	12
1.3. Fisiopatologia della sepsi	13
1.3.1. Le infezioni	14
1.3.2. L'attivazione della risposta infiammatoria innata	16
1.3.3. Il ruolo delle citochine	18
1.3.4. Attivazione dell'immunità adattativa	19
1.3.5. L'alterazione della funzione mitocondriale	21
1.3.4. Il Ruolo dell'Ossido Nitrico fisiologico e nella sepsi e la Poli-ADP Ribosio-Polimerasi	24
1.3.7. Alterazioni a carico dell'endotelio, del glicocalice e della coagulazione	27
1.4. Clinica e diagnosi	29
1.5. Cenni di terapia	32
2. Il microcircolo	37
2.1. Anatomia e fisiologia del microcircolo	37
2.2. Il ruolo del microcircolo nella sepsi	40
2.3. Tecniche di valutazione del microcircolo	45
2.4. Lo studio del microcircolo e i parametri microcircolatori	49

2.5. NIRS	52
3. Il ruolo dell'emoglobina libera nella sepsi	57
4. Il paracetamolo	62
4.1. Meccanismo d'azione	62
4.2 Il ruolo del paracetamolo nella sepsi	64
4.1 Caratteristiche del farmaco	66
4.2. Farmacocinetica	66
4.3. Effetti avversi e interazioni farmacologiche	66
4.4. Metabolismo	66
5. La correlazione tra acetaminofene, microcircolo, ed emoglobina libera	68
6. Obiettivi dello studio	71
7. Materiali e metodi	73
7.1. L'analisi del microcircolo	75
8. Analisi statistica	76
9. Risultati	77
10. Discussione	89
11. Conclusione	97
Bibliografia	98
Ringraziamenti	108

Introduzione

La sepsi è una sindrome clinica determinata da una risposta immunitaria deregolata, scatenata da un insulto infettivo [1]. E' annoverata tra le emergenze mediche [2].

A causa dell'instabilità del suo quadro clinico, il paziente settico necessita di essere trattato in terapia intensiva, dove riceve supporto delle funzioni vitali e terapia antibiotica mirata.

La rilevanza epidemiologica della sepsi (più di 700.000 casi all'anno), il tasso elevato di mortalità (un paziente settico su 5 va incontro ad exitus) ed infine la prognosi tempo-dipendente, costituiscono lo stimolo alla ricerca riguardante le cause di tale fenomeno, nonché il reperimento di terapie sempre più efficaci.

Negli ultimi anni, numerosi studi sperimentali hanno permesso di chiarire alcuni meccanismi fisiopatologici che determinano l'insorgenza della sepsi. In particolare, è stato evidenziato il ruolo centrale svolto dall'insufficienza d'organo [3] dall'alterazione della risposta immunitaria e dalla disfunzione microcircolatoria.

Nello studio preso in considerazione da questa tesi, è contemplato il ruolo dell'emoglobina libera, ovvero quella extracellulare, localizzata nel circolo ematico a causa dell'emolisi eritrocitaria che si verifica in corso di sepsi.

Il distacco del gruppo eme dal complesso proteico, all'interno del torrente circolatorio, conduce alla formazione di radicali liberi, responsabili di danno ossidativo in vari distretti dell'organismo [5].

Questo comporta molteplici ulteriori complicazioni del quadro clinico: vi è un aumento della risposta infiammatoria sistemica, un peggioramento della disfunzione d'organo (soprattutto a livello renale), vasocostrizione secondaria al massivo sequestro di NO da parte dell'emoglobina, riduzione della densità vascolare microcircolatoria, [7] e, di conseguenza, una generalizzata riduzione della perfusione tissutale [6].

Alcuni lavori, tra cui uno condotto da D.Janz et al., hanno messo in luce il possibile effetto protettivo della somministrazione di paracetamolo come inibitore di danno ossidativo eme-

mediato in pazienti settici con livelli plasmatici di emoglobina libera rilevabili [9].

Questo risultato costituisce il punto di partenza per il progetto *“Emoglobina libera circolante e microcircolo dopo somministrazione di paracetamolo nel paziente settico febbrile”*, protagonista di questa tesi.

L’obiettivo di questo studio è stato quello di verificare è la risposta alla somministrazione di paracetamolo a scopo antipiretico nel paziente settico febbrile, ricercando in particolar modo eventuali modificazioni del microcircolo sublinguale e tissutale e dei i livelli ematici di molecole di danno endoteliale e cellulare. Si tratta di un progetto strategico di Ateneo che ha coinvolto in maniera multidisciplinare, oltre alla Clinica di Anestesia e Rianimazione, anche il dipartimento di Farmacologia, dedito allo studio della risposta metabolica al paracetamolo ed allo studio dei polimorfismi genetici, ed il Dipartimento di Pneumologia, che si è occupato dello studio riguardante i recettori PD1 e PDL1 e la loro correlazione con il quadro respiratorio nei pazienti settici.

1. La sepsi

1.1 Definizione

Si tratta di una condizione clinica piuttosto complessa, la cui definizione è stata soggetta a molteplici sviluppi, i quali hanno determinato notevoli ripercussioni sia sull'aspetto diagnostico che su quello terapeutico. Al fine di agevolare la comprensione di tale fenomeno, si introducono di seguito i concetti che ne costituiscono i capisaldi.

1.1.1. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Il termine SIRS identifica una condizione clinica sistemica manifestatasi in seguito ad un insulto infiammatorio aspecifico e caratterizzata dalla presenza di almeno due dei seguenti parametri: [10]

- Temperatura corporea superiore a 38°C o inferiore a 36°C;
- Tachipnea, con frequenza respiratoria superiore a 20 atti al minuto, oppure iperventilazione, contraddistinta da una PaCO₂ inferiore a 32 mmHg;
- Frequenza cardiaca superiore a 90 battiti al minuto;
- Alterazioni leucocitarie nel prelievo di sangue periferico:
 - livelli di leucociti maggiori di 12000 cellule/mm³ o minori di 4000/mm³;
 - percentuale di leucociti immaturi superiore al 10%.

A differenza della sepsi, la sirs, indentificandosi come uno stato di deregolazione della risposta infiammatoria, può essere scatenata anche da un processo non infettivo (pancreatiti, ischemie, politraumi, shock emorragico, traumi, ustioni, ...) [10].

1.1.2. Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS)

Indicata come una down regolazione del sistema immunitario, correlata pertanto ad immunodepressione e, in base a ciò che è emerso in recenti studi, ad un peggioramento

dell'outcome per il paziente in sepsi [45]. I parametri che definiscono tale condizione sono i seguenti:

- alterazioni linfocitarie:
 - Riduzione della proliferazione linfocitaria
 - Apoptosi linfocitaria
- Rilascio di TGF- β
- Rilascio di IL-10, citochina antiinfiammatoria;
- Rilascio di PGE2.
- riduzione dell'espressione di MHC-II nei monociti periferici;

Un peggioramento dell'outcome è stato riscontrato soprattutto in pazienti in cui i livelli di IL-10 e *TNF α* permanevano costantemente alti [11].

1.1.3. L'evoluzione nella definizione di sepsi

Nel 1992 la definizione di sepsi venne delineata da *Consensus Conference Committee* della *American College of Chest Physicians (ACCP)* e della *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* come uno stato di Sindrome da risposta infiammatoria sistemica, ovvero *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)* associata alla presenza di un'accertata o sospetta infezione [10].

Tale assemblea introdusse inoltre il concetto di sepsi severa, ovvero un quadro clinico caratterizzato da:

1. sepsi
2. MODS, ovvero insufficienza di più organi (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*), con impossibilità di mantenere l'omeostasi in assenza di intervento [12], distinta in primaria (se concomitante al quadro di sepsi ma indipendente da esso) e secondaria (se conseguente alla SIRS o all'infezione)
3. Ipoperfusione, identificata dalla presenza di:
 - Acuta alterazione dello stato di coscienza
 - Acidosi lattica

- Oliguria oppure ipotensione (contraddistinta da valori di pressione sistolica inferiori a 90mmHg oppure da una loro riduzione di 40mmHg rispetto alla normalità, non spiegata da altre cause)

In tale circostanza, fu inoltre definito lo shock settico, identificato da:

- sepsi
- Ipotensione non risolubile con adeguato riempimento volemico

Nel 2001, l'*International Sepsis Definition Conference* in collaborazione con l'*European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), l'*American Thoracic Society* (ATS) e la *Surgical Infection Society* (SIS) divulgò una nuova definizione di sepsi, simile alla precedente, descrivendola come una sindrome clinica caratterizzata dalla contemporanea presenza sia di un'infezione che di una risposta infiammatoria sistemica. Questa confermava la centralità della sirs nella patogenesi della sepsi (sebbene già allora alcuni studi [13] avessero messo in discussione tale concetto) [15].

Nella medesima occasione, infine, furono introdotti due strumenti utili all'inquadramento diagnostico del paziente settico:

- il *Sequential Organ Failure Assessment score* (SOFA score) (ideato nel 1994) [14], per l'identificazione e il grado delle insufficienze d'organo nel paziente con sepsi severa in modo quantitativamente e il più oggettivamente possibile (tabella)
- e la scala PIRO: *Predisposing condition, Insult, Response, Organ dysfunction*, ideata al fine di discriminare i differenti livelli di gravità nell'ambito della sepsi per poi correlarli con differenti quadri terapeutici e prognostici. Questa prende in considerazione: le condizioni predisponenti del paziente (*P = Predisposing conditions*), la natura e il grado dell'insulto, ovvero dell'infezione (*I = insult*), l'entità della risposta dell'ospite (*R = response*) e la gravità della disfunzione d'organo (*O = organ dysfunction*) [15].

Score	Variables	Point
Predisposition	Comorbidities (chronic obstructive pulmonary disease or immunocompromise)	1
	>70 yrs	1
Insult	Bacteremia	1
	Multilobar opacities in chest radiograph	1
Response	Shock	1.1
	Severe hypoxemia	
Organ dysfunction	Acute renal failure acute respiratory distress syndrome	1.1
	Score range	0-8

PIRO, predisposition, insult, response, and organ dysfunction.

Figura 1. PIRO Score: Predisposition, Insult, Response and Organ Dysfunction

Nel 2016 un articolo di Singer et al. [1], pubblicato su *JAMA* riportò le conclusioni emerse da una *Task Force* di 19 esperti tra intensivisti, infettivologi, chirurghi e pneumologi che la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) e la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) avevano riunito nel 2014.

La sepsi fu dunque definita una condizione di insufficienza d'organo, che minaccia la vita del paziente, provocata da una deregolata attivazione del sistema immunitario secondaria ad insulto infettivo [1].

Come è evidente da tale definizione, furono in quella circostanza messi in luce tre aspetti fondamentali del fenomeno:

- la gravità della condizione, che necessita di una precoce identificazione e di un tempestivo trattamento,
- l'importanza dell'alterazione nella risposta all'infezione, ovvero di una attivazione non omeostatica del sistema immunitario.
- la sua potenziale letalità, enormemente superiore rispetto a quella causata da una semplice infezione

Questa fondamentale presa di coscienza determinò dunque l'accantonamento del termine sepsi severa, che perse di significato.

Inoltre, il concetto di SIRS fu separato da quello di sepsi, restando confinato all'ambito di identificazione clinica del fenomeno della sepsi [1].

L'efficacia diagnostica del SOFA score venne confermata, poiché fu messo in luce come un punteggio superiore a 2 ottenuto con tale sistema corrispondesse ad una mortalità del 10%. [1] ed un suo aumento di 2 punti in acuto sia indicativo di sepsi in pazienti con infezione nota, in cui la diagnosi potrebbe essere più difficoltosa a causa delle comorbidità sottostanti e delle relative terapie in corso.

SOFA score	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg)	> 400	301–400	201–300	101–200	≤ 100
(kPa)	> 5.3)	(4.1–5.3)	(2.8–4.0)	(1.4–2.7)	≤ 1.3)
Coagulation					
Platelets (x10 ³ /mm ³)	> 150	101–150	51–100	21–50	≤ 20
Liver					
Bilirubin (mg/dl)	< 1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	≥ 12.0
(μmol/l)	< 20)	(20–32)	(33–101)	(102–204)	≥ 204)
Cardiovascular					
Hypotension	No hypotension	MAP < 70 mmHg	Dopamine ≤ 5 or dobutamine (any dose)*	Dopamine > 5	Dopamine > 15
Central nervous system					
Glasgow coma score	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Renal					
Creatinine (mg/dl)	< 1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9	> 5.0
(μmol/l)	< 110)	(110–170)	(171–299)	(300–440)	> 440)
or urine output				< 500 ml/day	< 200 ml/day

* adrenergic agents administered for at least 1 h (doses given are in μg/kg/min)

Figura 2. Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA score)

Fu inoltre elaborato un ulteriore strumento diagnostico, il *quick SOFA* (qSOFA, finalizzato alla precoce identificazione dei pazienti settici a rischio di un peggior outcome in reparti differenti da quello di Terapia intensiva, nei quali ha mostrato un potere predittivo positivo maggiore rispetto al Sofa score [16].

Questo score prende in considerazione alcuni criteri clinici: stato neurologico alterato con un GCS < 15, pressione arteriosa sistolica ≤ 100 mmHg e frequenza respiratoria ≥ 22 atti/minuto.

Una positività di due tra i tre criteri identifica un paziente con infezione nota o sospetta a rischio di avere una prognosi peggiore.

Questa tecnica ha il vantaggio di permettere una valutazione rapida, poiché non richiede

test di laboratorio, e con essi l'inizio di eventuali approfondimenti diagnostici finalizzati alla ricerca di disfunzioni d'organo, agevolando così un tempestivo avvio della terapia.

Infine, fu riformulato anche il concetto di shock settico, in base al *Delphi methodology*, descritto come una condizione clinica caratterizzata da disfunzioni circolatorie, cellulari e metaboliche, associata ad una mortalità superiore rispetto al quadro di sepsi isolata [1]

i criteri diagnostici prevedono:

- *Ingente rischio di exitus del paziente*
- Ipotensione persistente che richiede una terapia vasopressoria di supporto al mantenimento di una Pressione Arteriosa Media (PAM) superiore a 65 mmHg;
- Livelli di lattati costantemente maggiori di 2mmol/l nonostante adeguato riempimento volêmico.

La *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock* delineò un algoritmo diagnostico che fosse di aiuto nell'individuare precocemente la situazione potenzialmente fatale del paziente settico e nell'avviare un altrettanto precoce trattamento [16].

Gli ultimi "*Sepsis-Bundles*" del 2018 confermano l'importanza di questa azione, sottolineando l'importanza della "hour-1 bundle" ovvero la prima ora, entro la quale iniziare il trattamento della sepsi [17]. Il tempo zero, corrispondente all'inizio della "1hour bundle" è identificato nel momento del triage nel dipartimento di emergenza, in cui si verifica la prima annotazione clinica completa di tutti gli elementi indicativi di sepsi [17].

Il recente lavoro di Gül e colleghi prende in considerazione le progressive evoluzioni della definizione di sepsi, mettendone in luce alcune problematiche:

- l'insufficienza d'organo può essere presente in maniera indipendente dalla condizione di sepsi, pertanto risulta difficoltoso individuare, nel paziente settico, quali disfunzioni d'organo siano responsabili del coinvolgimento settico sistemico.
- qualora la presenza di insufficienza d'organo sia accertata e si sospetti la concomitanza di un'infezione, è difficile escludere un quadro di sepsi;
- la presenza di infezione rientra tra le componenti fondamentali del quadro di sepsi,

sebbene le diagnosi di sepsi con esami colturali negativi costituiscano un cospicuo gruppo.

- Si auspica che l'ulteriore indagine scientifica circa i meccanismi molecolari ed immunologici possa in futuro condurre all'utilizzo della ricerca di biomarker cellulari per definire a condizione di sepsi [48].

1.2. Epidemiologia della sepsi

I dati epidemiologici riguardanti la sepsi evidenziano come tale fenomeno abbia rilevanza mondiale e perché sia ritenuta una emergenza medica.

La sepsi colpisce ogni anno 750,000 pazienti negli Stati Uniti, ed è la più frequente causa di morte in pazienti critici, mietendo annualmente 210,000 vittime. Il 15% delle sepsi evolve in shock settico, che costituisce il 10% dei ricoveri in terapia intensiva ed ha un tasso di mortalità del 50%.

Negli USA l'incidenza della sepsi tra il 2000 ed il 2008 ha subito un raddoppiamento [2], probabilmente a causa della maggiore frequenza di malattie croniche correlate all'invecchiamento della popolazione, insieme con l'affermarsi delle antibiotico resistenze, l'aumento nell'utilizzo di procedure invasive, di farmaci immunosoppressivi e di chemioterapici.

La spesa associata alle cure per la sepsi negli stati uniti è stimata intorno a \$20.3 miliardi di dollari all'anno [103].

Il *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP)*, uno studio multicentrico comprendente diverse terapie intensive europee, ha mostrato come il 35% dei pazienti ricoverati presenti un quadro di sepsi già al momento del ricovero, oppure la sviluppi durante la sua permanenza in terapia intensiva. La mortalità per sepsi è intorno al 27% [12].

Inoltre, l'incidenza della sepsi è ritenuta in aumento, verosimilmente in ragione dell'invecchiamento della popolazione con più comorbidità, dell'aumento dei pazienti immunodepressi, dell'affermarsi delle resistenze agli antibiotici, nonché della maggiore consapevolezza riguardo a tale patologia.

1.3. Fisiopatologia della sepsi

Come precedentemente detto, alla base del complesso fenomeno della sepsi vi è una deregolazione della risposta immunitaria, che si può verificare a causa di qualsiasi tipo di infezione.

L'alterata risposta dell'ospite implica a sua volta molteplici conseguenze che si ripercuotono in vari ambiti, quali lo stress ossidativo, l'attivazione della cascata della coagulazione, alterazioni al glicocalice, nonché, con preponderante importanza, sull'alterazione del microcircolo [23].

Non meno importanti sono, inoltre, i ruoli dell'ossido nitrico, della disfunzione mitocondriale, dell'alterazione dell'endotelio.

Costituendo dunque il punto di partenza per comprendere tutti i successivi fenomeni che in scala maggiore vanno poi a determinare le criticità del paziente settico, la fisiopatologia della sepsi, a partire dall'attivazione della risposta immunitaria, merita pertanto un breve accenno in questa trattazione.

Pertanto, verranno presi in considerazione i seguenti punti:

- 1.3.1. Le infezioni;
- 1.3.2. L'attivazione della risposta immunitaria innata;
- 1.3.3. Il ruolo delle citochine
- 1.3.4. L'attivazione della risposta immunitaria adattiva e CARS;
- 1.3.5. L'alterazione mitocondriale;
- 1.3.6. Il ruolo dell'Ossido Nitrico fisiologico e nella sepsi e della Poli-ADPRibosio-Polimerasi;

1.3.1. Le infezioni

La sede di infezione più rappresentata tra le cause di sepsi è quella polmonare; a seguire vi sono le infezioni polidistrettuali, le infezioni addominali e infine quelle delle vie urinarie. I tessuti molli rappresentano un numero piuttosto esiguo di focolai di partenza della sepsi, mentre le emocolture positive costituiscono il 20% dei casi [44].

Per quanto riguarda le tipologie di patogeni responsabili, sono presenti in primo luogo i Batteri Gram negativi, rilevati nel 62% dei pazienti settici con monoinfezioni. In questo gruppo di patogeni, i più rappresentati sono: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Acinetobacter spp*. Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni condotte dai suddetti microrganismi, si possono annoverare le ustioni, la presenza di cateteri venosi centrali, procedure invasive e tossicodipendenza [24].

Vi sono poi i Batteri Gram positivi, presenti nel 47% dei pazienti settici con monoinfezione. Il loro ruolo è diventato sempre più preponderante negli ultimi dieci anni, in particolare lo *Staphylococcus Aureus* è ritenuto l'agente scatenante nel 20% dei casi di sepsi.

La presenza di diabete mellito, malattie linfoproliferative, cirrosi, procedure invasive, neutropenia da chemioterapia [24] può favorire la presenza di infezioni sostenute da questi microrganismi.

Il maggior numero di pazienti con immunodepressione acquisita o indotta a causa della terapia, è correlato ad un aumento anche delle infezioni sostenute da funghi, ed in particolare da *Candida* che esitano poi nel 19% delle sepsi da monoinfezione [49].

Queste ultime sono inoltre correlate ad una prognosi peggiore [25].

Infine, le infezioni polimicrobiche causano il 4,7% delle sepsi, mentre i batteri anaerobi l'1% [25].

Dal punto di vista molecolare, ciascun differente microrganismo responsabile di infezione (virus, batteri, o funghi) presenta trigger antigenici specifici, che prendono il nome di

PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). I principali sono:

- Il Lipopolisaccaride (LPS), componente della parete cellulare dei Batteri Gram negativi. Esso viene sequestrato dalla LBP (*proteina legante l'LPS*). Il complesso così formatosi, riconosciuto da CD14, viene presentato al *Toll-like receptor-4* (TLR-4), il quale, insieme al recettore transmembrana MD2, attiva la cascata di trasduzione del segnale intracellulare mediata dalle proteine MAPK, che a sua volta determina la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NFκB.

Questo porta alla produzione di citochine e altre molecole proinfiammatorie. Nei monociti, l'LPS porta all'attivazione di regioni geniche diverse e pertanto di una risposta attivatoria differente mediante utilizzo dei *Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1 e 2*.

- l'AcidoLipoteicoico (LTA) ed altre componenti del peptidoglicano e della parete cellulare dei Batteri gram positivi. Anch'essi determinano l'attivazione del TLR2
- flagelli, DNA batterico
- endotossine: alcuni studi hanno inoltre ipotizzato che alcune tossine come la *Toxic Shock Syndrome Toxin* (TSST) potrebbero agire da *superantigene* portando ad una rapida attivazione del *T-CellsReceptor* (TCR) linfocitario.

In presenza di uno stimolo infettivo comune, l'attivazione linfocitaria avviene invece grazie al riconoscimento dell'antigene presentato dalle APC (Antigen Presenting Cell) mediante il *Major Histocompatibility Complex* (MHC). La precoce attivazione del TCR e la conseguente attivazione massiva simultanea di tutti i linfociti T dell'organismo è dunque ritenuta responsabile della deregolazione della risposta infiammatoria che si può rilevare in un quadro di sepsi.

- I meccanismi di attivazione del sistema immunitario in presenza di altri patogeni sono ancora in fase di studio. Se per quanto riguarda i funghi, la secrezione di citochine pro infiammatorie è sempre presente, il discorso è differente per quanto riguarda i virus, i quali, riconosciuti dai TLR endosomiali, possono determinare risposte variabili [49] a causa dell'alterazione nel pattern secretivo del TNF-α.

1.3.2. L'attivazione della risposta immunitaria innata

Oltre ai sopracitati stimoli infettivi, ovvero gli antigeni appartenenti ai vari microrganismi patogeni, vi sono poi i *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), molecole cellulari danneggiate: a causa dell'azione diretta da parte dei patogeni, ma anche da insulti termici, chimici, o dai radicali liberi scatenati dalla risposta immunitaria stessa nei confronti dei patogeni. Esempi di DAMPs sono: ATP, acido ialuronico, DNA mitocondriale, HSP (Heat Shock Protein), proteina S100.

Questi due tipi di pattern molecolari vengono riconosciuti da recettori di membrana presenti sulla superficie di tutte le cellule del sistema immunitario, detti *Pattern recognition receptors* (PPRs).

Di questo ampio gruppo fanno parte: i *Toll-like receptor* (TLR), tra cui i maggiormente rappresentati in questa situazione sono il TLR4 e il TLR2; i recettori della lectina di tipo C (CLRs)(18a), i retinoic acid inducible gene 1-like receptors, e i nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs) [26].

Il legame tra queste due strutture determina una cascata di trasduzione del segnale intracellulare che porta alla attivazione di regioni genomiche volte alla produzione di TNF- α e IL-1 β (in particolare nella prima ora in corso di sepsi da parte di macrofagi e linfociti CD4⁺. Queste citochine, a loro volta, inducono la produzione di ulteriori molecole che portano ad una amplificazione e massimizzazione della risposta immunitaria [27].

La proteina *High-mobility group-B protein* (HMGB1), una *nuclear binding protein* rilevata nella sepsi endotossino-correlata, è annoverata tra i DAMPs, poiché viene rilasciata dalle cellule in corso di necrosi, oltre che dai macrofagi durante l'attivazione della risposta immunitaria innata. La sua interazione con i *Receptors for advanced glycation end products* (RAGE) e con i TLR-2 e TLR-4 porta all'attivazione di NF-kB, il quale a sua volta, oltre a favorire una ulteriore produzione di mediatori dell'infiammazione, incentiva il reclutamento macrofagico.

Oltre alla via di NF-kB, la segnalazione mediata dai PPRs, conduce all'attivazione intracellulare dell'inflammosoma, un complesso multiproteico che regola il rilascio di

citochine pro infiammatorie come IL1 β , IL-8 e la via delle caspasi-1, responsabile dell'avvio del fenomeno della piroptosi, un tipo di morte cellulare programmata.

Dopo 16 ore dalla stimolazione costituita dalla presenza di LPS, si riscontrano in corso di sepsi aumentati livelli ematici di HMGB1 [30], più tardivamente rispetto ai livelli di TNF α , IL-1, le cui concentrazioni si innalzano rispettivamente dopo 60-90 e 180 minuti.

Uno studio ha messo in relazione questa molecola, in modelli murini, con un aumento della permeabilità capillare con sviluppo di edema interstiziale ed aumento della traslocazione batterica [45].

Il *Migration Inhibitory Factor* (MIF), è un altro mediatore dell'infiammazione, prodotto da macrofagi, monociti, linfociti T e cellule ipofisarie. Si trova all'interno di vacuoli citoplasmatici, pronto per essere tempestivamente riversato all'esterno in risposta al segnale. Esso partecipa all'amplificazione della risposta pro infiammatoria, incentivando le cellule T attivate e i macrofagi a rilasciare ulteriori mediatori pro infiammatori, in particolare TNF α , il quale a sua volta, con un meccanismo a feedback positivo, induce un maggior rilascio di MIF. Il rilascio di questa citochina avviene non appena si verifica l'attivazione dei macrofagi e monociti, e i suoi livelli plasmatici sembrano essere correlati con la gravità dell'infezione [30].

Due ore dopo l'inizio del processo infettivo settico, su stimolo dell'attivazione dei recettori di risposta al danno (i sopracitati PPRs e TLRs) si verifica anche un notevole aumento dei livelli ematici di molecole del complemento, in particolare delle anafilotossine C3a e C5a [29].

Infine, la risposta immunitaria innata coinvolge anche i neutrofili. Questi, grazie alla *NADPHossidasi* che produce anione superossido (O₂⁻), producono ROS, come perossido di idrogeno e acido ipocloroso, che accumulano nei loro granuli insieme ad enzimi litici.

La degranolazione dei polimorfonucleati (PMN) è rivolta alla distruzione delle strutture vitali dei patogeni (specialmente dei batteri) ma anche di alcune strutture dell'organismo, a loro volta alterate da questi ultimi (ad esempio cellule che esprimono molecole di membrana come i DAMPs); tuttavia questo processo porta anche ad un cospicuo danneggiamento dei tessuti dell'ospite, in particolare dell'endotelio.

1.3.3. Il ruolo delle citochine

Rappresentando i fondamentali messaggeri e regolatori (sia in senso amplificativo che inibitorio) della risposta infiammatoria, la quale in corso di sepsi subisce una sostanziale disregolazione, tali molecole meritano uno studio approfondito. Introduremo pertanto, brevemente, di seguito, le citochine maggiormente rilevanti ai fini della trattazione.

Il TNF- α è un pirogeno endogeno sintetizzato da vari tipi di cellule, come monocito-macrofagi, cellule dendritiche e PMN. Dal punto di vista molecolare, il suo ruolo è quello di stimolare la produzione di altri mediatori dell'infiammazione: citochine, eicosanoidi, ossido nitrico sintasi, *Platelets-Activating Factor* (PAF) e chemochine [30].

L'azione del TNF- α sul suo recettore (TNF-R1) attiva una cascata di trasduzione del segnale che si conclude con l'apoptosi della cellula [30].

Dal punto di vista tissutale, questa citochina è associata a: riduzione delle resistenze vascolari periferiche, aumento della capillarità vascolare e depressione della funzionalità miocardica [27].

Il rilascio di TNF- α avviene nei primi 30-90 e determina cachessia, anoressia, rialzo febbrile, calo delle resistenze vascolari sistemiche, depressione dell'attività miocardica, aumento della permeabilità vasale [27].

L'IL-1 è rilasciata da macrofagi, monociti, linfociti, astrociti e dall'endotelio.

Esistono 7 isoforme di Interleuchina1: le principali sono l'IL-1 α e l'IL-1 β , la quale esplica la sua azione mediante il legame con due tipi di recettori: IL-1 tipo 1 e tipo 2, dall'attività simile a quella del TNF. L'interleuchina 1 determina l'attivazione di macrofagi e linfociti, l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione e la produzione di proteine di fase acuta.

Anche l'interleuchina-6 è un pirogeno endogeno, presente in elevate concentrazioni in pazienti con infezione, tuttavia essa non determina gli stessi effetti sistemici del TNF- α , svolgendo talvolta un'azione parzialmente antinfiammatoria con riduzione della sintesi di TNF- α , chemochine e IL-1 β . Essa è secreta dai linfociti T e B e dall'endotelio; stimola la

proliferazione dei linfociti stessi e la produzione di proteine di fase acuta, inducendo al tempo stesso una riduzione dei livelli ematici di trombomodulina e dell'albumina [30].

Anche l'IFN- γ ha un ruolo pro infiammatorio. Tra le molecole antinfiammatorie, invece, si possono annoverare: l'interleuchina-10, il TGF- β , l'IL-4 e IL-13, nonché i recettori solubili per il TNF- α e per IL-1 [11].

1.3.4. Attivazione dell'immunità adattativa e sviluppo della CARS

Lo sviluppo della risposta immunitaria adattativa implica l'attivazione dei linfociti T-helper di tipo 1 (Th1), che a loro volta incentivano ulteriormente la risposta immunitaria innata, e attivano la risposta umorale anticorpo-mediata.

Sebbene la esatta sequenza degli eventi sia ancora da chiarire del tutto, è stato dimostrato [30] che la produzione di molecole proinfiammatorie da parte delle varie popolazioni cellulari si accompagna ad una contemporanea secrezione di citochine antiinfiammatorie, le quali determinano cambiamenti nell'espressione fenotipica dei linfociti T. Questi possono maturare quindi come T helper 2 (Th2), caratterizzati da attività preminentemente antinfiammatoria; oppure T-regolatore (Treg), con funzione inibitoria, CD4⁺ e CD25⁺.

Anche la presenza dei linfociti Th17 è ridimensionata, e di conseguenza lo sono anche i livelli di IL-7 circolanti, mentre i macrofagi possono diventare di tipo M2, acquisendo la capacità di secernere IL-10 e TGF.

L'IL-10, a sua volta, induce una riduzione della produzione di TNF- α ed una riduzione della proliferazione linfociti T [32].

Partecipano al massivo rilascio di IL-10, producendo anche INF γ e IL-2, anche alcune popolazioni di polimorfonucleati immaturi che in corso di sepsi si possono riscontrare nel sangue periferico. Oltre alla alterazione secretoria, queste cellule presentano inoltre minore efficacia nella diapedesi e nella migrazione nel sito d'infiammazione [33].

Tutti i meccanismi antinfiammatori appena elencati appartengono alla Sindrome da Risposta Antiinfiammatoria Compensatoria, ovvero la Compensatory Anti-Inflammatory

Response Syndrome (CARS), che abbiamo già precedentemente descritto, in cui si manifestano: una generale diminuzione del rilascio di citochine ad opera dei monociti e dell'espressione dell'HLA-DR sulla loro superficie, un calo dei linfociti circolanti ed un aumento delle citochine pro infiammatorie [32].

La componente antinfiammatoria della risposta immunitaria implica anche un calo dell'espressione di Human Leukocyte Antigen-Antigen D-related (HLA-DR) sulla superficie delle cellule APC (Antigen Presenting Cells), a causa dell'attivazione del pathway della β -catenina/TCF4 [34] che determina una riduzione della capacità di presentazione dell'antigene, di fagocitosi e di segnalazione molecolare pro infiammatoria [33].

È presente inoltre un aumento della segnalazione proapoptotica [36], in particolare dell'espressione della Programmed Cell Death Protein (PD-1) e del suo ligando (PD-L1) sulla superficie delle Antigen Presenting Cells (APC). Questo determina una importante riduzione dei linfociti CD4+, CD8+, dei linfociti B e delle cellule dendritiche.

L'espressione di queste due molecole risulta inoltre maggiore in concomitanza con un aumento dei livelli di ROS, nonché correlata al grado di severità della sepsi [47].

La riduzione di linfociti Nk dovuta al deficit di $\text{INF}\gamma$ può condurre alla riattivazione di infezioni virali latenti, come quelle da Citomegalovirus [33].

L'immunodepressione che ne deriva, messa in evidenza dalla cospicua riduzione della conta linfocitaria [36] determina, nei pazienti settici (che presentano una deregolazione globale della risposta infiammatoria, e quindi anche della sua componente inibitoria), un aumento dei tempi di degenza, un maggiore tasso di complicanze, una riduzione della capacità di eradicazione dell'infezione primaria ed infine un aumento delle sovrainfezioni da parte di patogeni opportunisti, in particolare da *Candida* spp, [37] oppure da CMV [33].

Alcuni lavori hanno messo in luce il ruolo del sistema nervoso nella risposta antinfiammatoria.

In particolare è stato studiato come il nervo vago risponda alla stimolazione infiammatoria periferica: esso induce, a partire dal ganglio celiaco ed attraverso il nervo splenico, il rilascio di norepinefrina nella milza. Questo segnale, a sua volta, promuove la produzione di acetilcolina, la quale, agendo sui recettori colinergici $\alpha 7$ dei macrofagi della polpa rossa, determina una riduzione della sintesi di citochine proinfiammatorie [38].

1.3.5. L'alterazione della funzione mitocondriale

In condizioni fisiologiche, all'interno dei mitocondri, la fosforilazione ossidativa produce cospicue quantità di ATP, NADH, FADH ridotti, pronti per esser riutilizzati nelle altre tappe della respirazione cellulare, quali la glicolisi e il ciclo di Krebs, nonché piccole quantità di ROS, qualora ci sia un disaccoppiamento tra i complessi I e III del citocromo c. Queste molecole fungono da segnalatori per il mantenimento del tono vascolare e per il rilevamento dei livelli di ossigeno. In condizioni fisiologiche, il possibile danno scatenato dai radicali liberi è contenuto entro livelli non nocivi dagli enzimi *glutathione ossidasi* e *manganese superossido dismutasi* (SOD2).

Al fine di garantire il turnover cellulare ed aumentare le proprie risorse in momenti di maggiore fabbisogno energetico, il mitocondrio è in grado di produrre nuove proteine a partire dal genoma mitocondriale; questo fenomeno prende il nome di *biogenesi*.

Altri ruoli dei mitocondri in aggiunta rispetto alla produzione di ATP comprendono: la termoregolazione, la genesi di calore, il controllo del Calcio intracellulare, la biosintesi dell'eme e dei complessi ferro-zolfo; essi sono inoltre il bersaglio dell'azione della triiodotironina e degli estrogeni.

Oltre alla CO₂, il mitocondrio produce anche ossido nitrico, monossido di carbonio e acido solfidrico, tutti implicati nella segnalazione mitocondriale [39].

Inoltre questi organelli contribuiscono all'innescare di processi di morte cellulare: sia per quanto riguarda quello di necrosi, qualora diminuiscano eccessivamente le concentrazioni di ATP, sia per quanto riguarda quello di apoptosi, con il rilascio di citocromo C mitocondriale nel citoplasma.

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) è un (regolatore trascrizionale) modulatore della trascrizione, che, interagendo con il *Mitochondrial Transcription factor A* (TfAm) [40], regola l'espressione genica mitocondriale e quindi la produzione di enzimi, in funzione di stimoli stressogeni che si accaniscono sulla cellula. Questo processo contribuisce alla risposta omeostatica mitocondriale (*ormesi mitocondriale o biogenesi mitocondriale*) [40] che si verifica in caso di un aumento della necessità di energia nella cellula, e che consiste in un aumento del numero di organelli e della loro funzionalità.

La globale disregolazione delle funzioni organiche, che si verifica in corso di sepsi, va ad inficiare anche l'attività mitocondriale mediante molteplici meccanismi.

In primo luogo, l'alterazione della perfusione, correlata alla perdita di fluidi, la depressione miocardica, la perdita del tono vascolare e la conseguente redistribuzione del flusso a livello micro vascolare concorrono allo sviluppo di una condizione di ipossia tissutale [39]. Sebbene il complesso IV sia in grado di svolgere la propria funzione anche a basse concentrazioni di ossigeno, quando si verifica un drastico calo di questo gas, la produzione di ATP e ADP è impedita. Il deficit di ATP induce a sua volta l'avvio del processo di necrosi cellulare.

In secondo luogo, l'importante aumento nelle concentrazioni di NO, monossido di carbonio, acido solfidrico e altri ROS, come i perossinitriti, supera la capacità del sistema antiossidante, costituito dagli enzimi catalasi, superossido dismutasi, glutatione perossidasi e perossiredoxina, e va a danneggiare direttamente i lipidi di membrana e le proteine mitocondriali, tra cui in particolare il complesso I, inibito irreversibilmente.

Inoltre, data la responsività dei mitocondri all'azione degli enzimi tiroidei, la sindrome da basso T3 o *sick euthyroid syndrome*, caratterizzata da riduzione degli ormoni tiroidei circolanti, che si verifica nelle fasi più tardive della sepsi, contribuisce a down regolare l'attività mitocondriale.

Vi è poi una riduzione dell'attività della piruvato deidrogenasi, in corso di sepsi, che ha come conseguenza un calo dell'efficacia del ciclo di Krebs. Ciò si traduce in un aumento dei livelli di acetil-CoA e dei lattati nel citosol [41].

Infine, in una condizione di massiva attivazione della risposta infiammatoria, (simulata in uno studio con una somministrazione di endotossina batterica in volontari sani) ha dimostrato una riduzione delle proteine codificate dal DNA mitocondriale [39].

Le suddette alterazioni mitocondriali, insieme con una riduzione della biogenesi, determinano una complessiva deplezione delle risorse energetiche cellulari. Questo conduce ad un aumento della glicolisi, con conseguente aumento dei lattati, oppure ad una condizione definita *metabolic down-regulation cellulare*, o *ibernazione cellulare*, causata dalla diminuzione dell'attività della *citocromo ossidasi*. Tale fenomeno, denominato *ipossia citopatica*, [40] porta all'impossibilità di utilizzare adeguatamente l'ossigeno nonostante i valori di pO₂ siano sufficienti.

Tuttavia, questo non implica un totale arresto nella produzione di energia, ma una riduzione di quest'ultima a livelli, sebbene insufficienti per lo svolgimento delle normali funzioni fisiologiche della cellula, non tali da innescare il processo di necrosi cellulare.

A tale proposito, è stata recentemente avanzata l'ipotesi che questo fenomeno possa spiegare la correlazione tra la rilevazione clinica e biochimica di disfunzione d'organo e l'assenza di danno istologico importante. Si ritiene inoltre che l'entità della compromissione mitocondriale possa essere correlata alla severità del quadro clinico nel paziente settico [39].

Un interessante lavoro di Mastraghi et al. [40] ha voluto mettere in relazione gli effetti di questa condizione nei leucociti (nei quali prende il nome di *immunoparalisi*) e nelle cellule della muscolatura scheletrica con l'outcome respiratorio dei pazienti, studiandone il recupero della funzionalità respiratoria spontanea e il tasso di infezioni respiratorie in ICU.

Sono state rilevate una iperespressione di geni pro-apoptotici (*Bim*, *Bid*, *Bak*), ed una ipo-espressione di geni inibenti l'apoptosi (*Bcl-2*, *Bcl-xl*), nonché una alterazione del riflesso della tosse e della clearance glottica [40].

1.3.6. Il Ruolo dell'Ossido Nitrico fisiologico e nella sepsi e la Poli-ADPRibosio-Polimerasi

L'Ossido Nitrico (NO) è una piccola molecole con breve emivita, responsabile di molteplici funzioni di segnalazione intercellulare.

Il ruolo fisiologico del monossido di azoto prevede:

- ❖ L'induzione del ripristino della permeabilità capillare e a livello enterocitario
- ❖ La promozione della proliferazione di cellule muscolari
- ❖ L'induzione dell'aggregazione/adesione piastrinica e della chemiotassi dei polimorfonucleati.
- ❖ L'inibizione dell'adesione e della degranulazione leucocitaria
- ❖ L'attività di "scavenger" nei confronti dei radicali liberinitrico inibisce

Esso viene prodotto dall'enzima Ossido Nitrico Sintasi (NOS), presente in tre isoforme:

- nNOS, neuronale che regola il rilascio di NO a livello del cuore,
- eNOS, endoteliale, presente in cellule endoteliali, piastrine e cardiomiociti. Esso è inoltre calcio dipendente.

Questi due enzimi producono NO finalizzato all'azione di neurotrasmettitore, responsabile della modica vasodilatazione presente nei soggetti normali in risposta all'attività fisica.

- iNOS, l'isoforma inducibile, calcio-indipendente; attivato in condizioni patologiche su stimolo dell'attivazione di NF-kB (come nella sepsi) in numerosi tipi di cellule (macrofagi, neutrofili, cellule endoteliali, fibroblasti, neuroni, cellule muscolari lisce). Questo isoenzima è responsabile della produzione di grandi quantità di NO a partire dalla L-arginina (indipendentemente dalla concentrazione intracellulare di calcio), le quali determinano, in corso di sepsi, la vasodilatazione tipica dello shock settico. La produzione di ossido nitrico sintasi inducibile può essere innescata o dalle endotossine o dalle citochine come il TNF α , l'Il-1 o il PAF [30].

Il meccanismo molecolare di trasduzione del segnale alla base di quest'ultimo fenomeno

prevede: l'attivazione della guanilatociclasa da parte dell'NO, con conseguente produzione di grandi quantità di cGMP, che attiva la protein-chinasi GMPC-dipendente (PKG) [43]. Quest'ultima è responsabile del rilassamento della muscolatura liscia della parete vasale e capillare mediante due meccanismi:

- fosforilazione di recettori dell'IP3 (Inositolo trifosfato) localizzati sulla superficie del reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari lisce e sul reticolo endoplasmatico delle cellule endoteliali, con impedimento del legame dell'IP3 e mancato input al rilascio di calcio dall'SR o dall'ER. Pertanto, la concentrazione di questo ione nel citoplasma si riduce, con conseguente apertura dei canali del potassio ATP-dipendenti e dunque cessazione dell'attività contrattile.
- fosforilazione di proteine contrattili e strutturali della cellula, con conseguente riorganizzazione delle strutture citoscheletriche e riduzione della loro sensibilità alla presenza di ioni calcio, necessari alla contrazione, e della sensibilità alla stimolazione catecolaminergica [43], secondo un fenomeno definito vasoplegia [39].

Lo shock settico presenta una drammatica riduzione delle resistenze vascolari, complicato da una mancanza di risposta a sostanze vasopressorie, aumento della permeabilità vascolare, nonché depressione della funzione miocardica [43].

In passato sono state studiate alcune terapie volte alla riduzione di questa vasodilatazione massiva e dannosa:

- uso di antagonisti alla L-arginina, che inducono un blocco dei 3 isoenzimi dell'ossido nitrico sintetasi. Alcuni studi hanno mostrato un miglioramento della pressione, ma al tempo stesso una riduzione della gittata cardiaca, con un aumento della mortalità. Una riduzione dei livelli fisiologici di NO si correla inoltre con un calo della sua attività di scavenger dei radicali liberi.
- bloccanti della produzione di cGMP, come il blu di metilene, il quale tuttavia può legarsi all'emoglobina e determinare metaemoglobinemie. A livello emodinamico questo farmaco ha un effetto positivo: non influenza il preload, lascia costante la gittata cardiaca e può determinare modesti innalzamenti dei valori pressori. Utilizzato in bolo, ha un effetto di 2h. Sono stati inoltre condotti alcuni studi sull'infusione, tuttavia i risultati ancora non sono sufficienti alla dimostrazione di una reale efficacia di tale modalità. Può essere

impiegata come rescue therapy.

Oltre alla vasodilatazione generalizzata, la massiva produzione di NO in corso di sepsi, determina:

- ❖ Reazione con l'ossigeno con generazione di N_2O_3
- ❖ Reazione con il superossido ($\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONO}_2^-$) con generazione di perossinitrito (ONOO^-), responsabile della necrosi cellulare mediante:
 - Perossidazione lipidica, con danneggiamento delle membrane cellulari, che implica il rilascio nell'ambiente circostante di detriti cellulari in grado di innescare e promuovere l'infiammazione
 - danno mitocondriale (che sarà trattato in seguito) con importanti alterazioni della catena respiratoria mitocondriale [39].
 - Rotture nel DNA, che richiedono l'attivazione massiva e addirittura sregolata dell'enzima PoliADPribosio sintasi (PARP), che utilizza ingenti quantità di NAD^+ (oltre che di ATP) per funzionare, sottraendo tale preziosa molecola ai processi di glicolisi e ciclo di Krebs, e rendendoli quindi inefficaci nel produrre energia per la cellula. I livelli di ATP si riducono fino a superare il valore soglia oltre il quale si innesca il pathway della necrosi, incentivata anche dalla promozione dell'infiammazione da parte della PARP tramite l'attivazione di NF- κ B.

Responsabile del danno ossidativo che si verifica in corso di sepsi è anche l'enzima NADPHossidasi, che produce l'anione superossido (O_2^-) come difesa dagli agenti patogeni. Da questo radicale libero, data la saturazione dei sistemi scavenger, si formano altre specie, come il perossido di idrogeno e l'acido ipocloroso, che portano ad un aumento del danno tissutale per mezzo della perossidazione lipidica.

Correlata alla massiva attivazione della risposta infiammatoria è infine la produzione di NETs (*neutrophil extracellular traps*), ovvero la formazione di reti di DNA di polimorfonucleati disperse nel torrente ematico finalizzate all'intrappolamento dei microrganismi. Queste strutture contengono mieloperossidasi e altre sostanze antimicrobiche [29], le quali, producendo a loro volta ROS, incentivano la condizione di generalizzato stress ossidativo.

1.3.7. Alterazioni a carico dell'endotelio, del glicocalice, e della coagulazione

Il danneggiamento delle cellule endoteliali, e con esso l'alterazione della segnalazione che in condizioni fisiologiche esse regolano, rappresenta uno dei fattori fondamentali nel quadro di sepsi, ed è causato dalla tempesta citochinica proinfiammatoria.

In ugual modo, l'azione dei ROS e di alcune citochine, tra cui il $\text{TNF}\alpha$, determina un deterioramento del glicocalice, il delicato strato di polisaccaridi, proteoglicani, glicosamminoglicani e glicoproteine dello spessore di 0,2-0,5 μm , che riveste la superficie endoteliale. In condizioni fisiologiche, esso è responsabile del controllo dell'adesione piastrinica e leucocitaria, e dell'emostasi. È inoltre protettivo nei confronti della parete capillare.

Tali alterazioni determinano l'innescò di una serie di reazioni che conduce ad uno squilibrio del sistema emostatico in direzione procoagulativa o antifibrinolitica. Si verificano infatti eventi di trombosi micro vascolare, la quale, a sua volta, può condurre prima a disfunzione d'organo, ed in seguito, se massiva e generalizzata, a coagulazione intravascolare disseminata (CID), riscontrata tra il 30% e il 50% dei pazienti con sepsi o shock settico [29].

I fenomeni che inducono la suddetta perdita di omeostasi, concatenati tra loro, sono i seguenti:

1. Innanzitutto, è riscontrabile un aumento del rilascio di Fattore tissutale in circolo da parte dell'endotelio danneggiato e dei monociti attivati dalla tempesta infiammatoria, su stimolo dell'LPS e del $\text{TNF}\alpha$ [29].
2. Questa molecola, legandosi con il fattore VIIa, induce l'attivazione del fattore X avviando la via estrinseca della cascata coagulativa, che porta rapidamente al clivaggio della protrombina in trombina ed all'aggregazione di molecole di fibrina con la formazione di un coagulo intravascolare.

3. È stata rilevata inoltre la formazione di agglomerati del fattore di vonWillebrand causati dalla inibizione da parte degli alti livelli di TNF-alfa, IL-8 e IL-6 di ADAMTS-13, responsabile della loro eliminazione
4. L'inibizione dell'attività fibrinolitica comprende (in primo luogo) l'innalzamento dei livelli plasmatici di dell'inibitore di tipo 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), fenomeno correlato ad outcome sfavorevole; nonché un aumento dell'inibitore di tipo 1a della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAF1a)
5. In corso di sepsi è stato constatato un deficit nell'attività anticoagulante, con riduzione della sintesi di eparansolfato, trombomodulina e dell'*endothelial protein C receptor (EPCR)*, a causa della tempesta citochimica [29], vi è altresì una riduzione dell'attività dell'inibitore del pathway del fattore tissutale(TFPI), dell'antitrombina III e della proteina C attivata.

Infine, il fattore tissutale ed il fattore Xa si legano con i *Protease-activated receptors (PARs)*, in particolare con l'isoforma PAR1, più frequentemente riscontrata nello stato iperinflammatorio della sepsi [26].

In condizioni fisiologiche PAR1 è responsabile dell'attivazione di differenti vie intracellulari finalizzate ad una regolazione della permeabilità della membrana basale, su stimolo del legame sia con la trombina, sia con la proteina C attivata [26].

Il suddetto aumento di produzione di trombina e la concomitante riduzione dei fenomeni fibrinolitici determinano, nella trasduzione del segnale mediata da PAR1, la sola attivazione del pathway che conduce ad incremento di permeabilità della membrana basale [26]. Tale effetto a sua volta facilita l'accesso dei leucociti allo spazio extravascolare. A ciò concorre anche il fenomeno del *capillary leak*, dovuto alla rottura e disfunzione del glicocalice.

1.4. Clinica e diagnosi

Dal momento che la sepsi è una condizione sistemica, essa è caratterizzata per definizione da manifestazioni che coinvolgono l'intero organismo. Esse variano da un paziente all'altro in base al sito iniziale di infezione, al patogeno responsabile, all'entità della disfunzione d'organo, nonché alle comorbidità presenti.

I sintomi iniziali possono essere molto variabili: correlati all'infezione iniziale e quindi localizzati in un organo o apparato; oppure dapprincipio sistemici ed aspecifici.

In linea generale, tra le caratteristiche del paziente settico rientrano:

- Febbre, con temperatura corporea maggiore di 38 °C. la presenza di brividi è correlata alla febbre: si tratta di contratture della muscolatura assiale finalizzate alla produzione di calore ed all'elevazione della temperatura corporea.

Tuttavia, il 10% dei pazienti, in particolare anziani, immunodepressi, neonati e bambini al di sotto di un anno di età, può presentare ipotermia [19]. Quest'ultima espone ad una maggiore probabilità di complicanze e mortalità [74].

- leucocitosi con valori della conta leucocitaria superiori a 12.000/mm³ oppure leucopenia, caratterizzata da un numero di linfociti inferiore a 4000/ mm³ o neutrofili immaturi > 10%;
- tachipnea, con frequenza respiratoria superiore a 20 atti/min. L'iperventilazione con un'alcalosi respiratoria è un riscontro frequente nel paziente settico. Può inoltre essere presente dispnea
- tachicardia, con frequenza cardiaca superiore a 90 bpm;
- astenia;
- alterazione dello stato mentale con confusione e/o agitazione, specialmente nei pazienti anziani;
- lesioni cutanee:
 - petecchie o porpora possono essere indicative di una sepsi da *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *Rickettsia rickettsii* (febbre bottonosa delle Montagne Rocciose);

- l'ectima gangrenoso (lesione vescicolo-pustolosa circondata da edema, con evoluzione necrotico emorragica centrale) è solitamente causato da *Pseudomonas aeruginosa*
- l'eritroderma generalizzato è invece correlato ad infezione da *S. Aureus* o *S. Pyogenes*.

Possono inoltre essere presenti: affaticamento e/o malessere, nausea e vomito.

Nel paziente anziano possono mancare la febbre e la leucocitosi.

La valutazione clinica e la diagnosi si effettuano, come da linee guida, mediante l'utilizzo del sofa score, nonché altri dei seguenti segni e sintomi:

- riduzione del punteggio nel *Glasgow Coma Scale* (GCS) per valutare eventuale presenza di delirio o ottundimento del sensorio, spie di una disfunzione del sistema nervoso centrale.
- tachipnea sia in caso di coinvolgimento polmonare, che compensatoria nei confronti dell'acidosi e dell'aumento dei lattati ematici.
- ileo paralitico
- incremento degli indici di necrosi epatica
- iperglicemia o ipoglicemia
- ipocortisolismo da diminuzione della funzione surrenalica
- trombocitopenia fino all'evolversi di un quadro di CID

una eventuale successiva evoluzione verso lo shock settico implica una disfunzione del sistema cardiocircolatorio (trattasi infatti di uno shock distributivo) identificabile a causa di:

- ❖ Ipotensione persistente con Pressione arteriosa media inferiore a 65 mmHg, che necessita supporto vasopressorio.
- ❖ Livelli di lattati maggiori di 2 mmol/l a discapito di adeguata terapia con *fluid resuscitation*.

Tra le complicanze della sepsi, le più frequenti e caratterizzate da maggiore severità sono

l'ARDS, la CID e l'insufficienza renale acuta.

L'ARDS, complicanza più frequente nella sepsi, è presente nel 18% nei pazienti con shock settico. È caratterizzata da una mortalità del 50%, ed implica distress respiratorio acuto ed insufficienza respiratoria acuta, con conseguente ipossiemia grave. Possono altresì essere presenti febbre e leucocitosi. Tale sindrome, inoltre, può determinare un prolungamento nel ricovero in terapia intensiva ed un maggiore rischio di polmoniti associate a ventilatore, nonché di altre complicanze infettive.

L'insufficienza renale acuta si riscontra nel 40-70% dei casi ed è correlata ad un generale peggioramento dell'outcome, mentre la CID si verifica nel 40% dei pazienti con shock settico.

Dal momento che non è possibile delineare un profilo clinico caratteristico per la sepsi, si sono affermati alcuni studi finalizzati all'individuazione di criteri clinici e diagnostici il più possibile indicativi di un quadro di sepsi. Ad esempio, il lavoro di Seymour et al. [16] dimostra l'efficacia dell'uso del SOFA per i pazienti in ICU. In alternativa ad esso è possibile utilizzare il *Logistic Organ Dysfunction System* (LODS).

Nei reparti esterni alla terapia intensiva è invece consigliato il *qSOFA*, che non richiede l'uso di esami strumentali o laboratoristici, ma si serve dell'osservazione clinica. esso comprende:

- deterioramento della coscienza e funzioni cognitive, con riduzione del punteggio GCS,
- pressione sistolica minore o uguale a 100 mmHg,
- frequenza respiratoria superiore a 22 atti/min

Il suddetto studio ha inoltre preso in considerazione l'associazione dei lattati sia al SOFA che al *qSOFA*, senza tuttavia mostrare un'efficacia di tale indagine [16], (tanto che i lattati non sono più considerati un parametro affidabile di ipoperfusione) [21].

Nell'iter diagnostico è altresì compresa la valutazione dei possibili fattori predisponenti allo sviluppo di un quadro di sepsi, ovvero: età avanzata, stato di immunosoppressione, una storia di trapianto d'organo, diabete mellito, trauma, precedenti viaggi in anamnesi, contatti con animali, uso di droghe endovena o abuso di alcool.

Una componente importante nella diagnosi e successiva terapia della sepsi è anche l'identificazione della sede di partenza dell'infezione, mediante colture di tutti i fluidi corporei potenzialmente responsabili del quadro di sepsi e almeno due set di emocolture sia per aerobi che per anaerobi, di cui almeno una da catetere intravascolare, qualora il paziente ne sia portatore da più di 48h e non presenti altri segni di infezione in altri siti.

Inoltre, è importante un esame obiettivo approfondito finalizzato all'indagine del possibile focolaio di infezione. Va dunque ricercata la presenza di:

- segni di meningismo, come rigidità nucale, fotofobia, alterazioni del sensorio;
- ottusità alla percussione toracica e rumori bronchiali all'auscultazione, indicativi di infezione polmonare
- soffi di nuova insorgenza, nel sospetto di endocarditi, specialmente se correlati a *devices* cardiaci o ad una storia di tossicodipendenza
- distensione e/o dolorabilità addominale, alla palpazione superficiale o profonda, nonché l'assunzione di posizioni antalgiche
- congestione nasale, eritema o essudato faringeo, edema localizzato presso la membrana timpanica o infine il riscontro di stridore laringeo e di linfadenopatia laterocervicale nel sospetto di un'infezione del distretto testa-collo.

1.5. Cenni di terapia

La sepsi e lo shock settico vengono trattate come emergenze mediche, come sono state definite dal CDC di Atlanta. Pertanto, debbono essere trattate in maniera tempestiva ed adeguata.

Le ultime linee guida emanate sono quelle del 2017 [21], esse prevedono in primo luogo l'*Initial resuscitation*:

- somministrazione di 30 ml/kg di cristalloidi endovena entro le prime 3 ore.

A seguire, possono essere somministrati ulteriori volumi di fluidi a seconda dello stato emodinamico del paziente, stabilito mediante la valutazione clinica (ovvero: colore e

temperatura della cute, frequenza cardiaca e respiratoria, stato mentale, saturazione arteriosa dell'ossigeno, tempo di riempimento capillare, pressione arteriosa, output urinario). Anche eventuali monitoraggi emodinamici invasivi sono utili: in particolare è indicata l'analisi di parametri dinamici come: variazione dello *Stroke volume* PPV (*Pulse pressure variation*), nonché il *leg raises test*; mentre è sconsigliato l'impiego della Pressione Venosa Centrale (CVP), poiché si tratta di una variabile statica, nello studio della risposta ai fluidi.

- Supporto vasopressorio (se necessario) con target: pressione arteriosa media maggiore od uguale di 65 mmHg.

Si procede dunque alla somministrazione della terapia antibiotica:

- Da iniziare quanto prima (possibilmente entro 1 ora) ed in seguito al prelievo di campioni di fluidi biologici: è stato dimostrato infatti che, qualora questa analisi venga effettuata dopo l'inizio della terapia antibiotica, anche pochi minuti dopo, essa può mostrare risultati negativi (campioni sterili) [22].
- Inizialmente è indicato l'uso di un antibiotico ad ampio spettro, empirico, ovvero scelto sulla base del tipo di infezioni più frequenti: la più diffuse sono quelle da Batteri Gram Negativi, a seguire vi sono i Gram Positivi ed infine le infezioni multi batteriche. La terapia empirica prevede pertanto l'impiego di un carbapenemico o di una penicillina protetta o cefalosporine di III/IV generazione.
- In seguito, può essere adottato un farmaco più specifico in base ai risultati delle colture, all'antibiogramma, ed alle variazioni cliniche.
- A guidare la scelta del farmaco concorrono inoltre le seguenti condizioni:
 - Età, comorbidità e fattori di rischio (HIV, neutropenia, splenectomia, diabete, presenza di cateteri intravascolari,..);
 - tipologia dell'infezione: comunitaria o nosocomiale (la quale è spesso causata da MRSA ed *Enterococchi* vancomicina-resistenti);
 - Sito di infezione;
 - Farmacodinamica: è indicato l'abbinamento tra due farmaci di classi differenti al fine di garantire una copertura antibiotica ottimale, ad esempio nel caso in cui si sviluppino resistenze;

- eventuale presenza di resistenze di alcuni microrganismi a determinate classi di antibiotici, ad esempio è bene tenere in considerazione la crescente resistenza ai carbapenemici che i batteri Gram negativi stanno sviluppando, sia a livello nosocomiale che comunitario. C'è dunque indicazione all'aggiunta nel piano terapeutico di macrolidi, aminoglicosidi, o fluorochinoloni, qualora l'infezione sia sostenuta da *Pseudomonas* o *Acinetobacter*. Contro le resistenze dei MRSA sono invece impiegate vancomicina o teicoplanina.
- farmacocinetica: le penicilline, avendo un meccanismo d'azione tempo-dipendente, necessitano di una somministrazione continua, al fine di mantenere la concentrazione sopra la MIC per un periodo di tempo sufficiente; mentre gli antibiotici dose-dipendenti come aminoglicosidi e fluorchinoloni prevedono una singola somministrazione.

Tuttavia la terapia combinata dovrebbe essere indicata solo per gli stadi di shock settico.

La durata della terapia è solitamente di circa 7-10 giorni; può essere maggiore qualora sia presente una condizione di immunodeficienza (nella quale rientra anche la condizione di neutropenia) oppure in caso di infezione sostenuta da *S.Aureus* o da funghi o virus.

Nel momento in cui le condizioni del paziente migliorano (si verifica quindi un abbassamento dei livelli di Procalcitonina, sebbene il suo ruolo nella valutazione della risposta alla terapia è in corso di revisione) oppure si risolve lo stato di shock, è indicata la graduale riduzione della terapia.

L'inserimento di echinocandine nel piano terapeutico è indicato qualora siano presenti fattori di rischio per un'infezione fungina invasiva, ovvero: immunosoppressione, nutrizione parenterale totale, la presenza di device vascolari come cateteri per l'emodialisi, un recente intervento di chirurgia maggiore (ed in particolare addominale), ospedalizzazione protratta, terapia prolungata con antibiotici, recenti infezioni fungine.

In associazione alla terapia antibiotica è indicato il *source control*: controllo e clearance del focolaio infettivo, se necessario anche mediante asportazione chirurgica.

È altresì fondamentale la somministrazione di fluidi cristalloidi, la quale va effettuata tenendo conto dei seguenti punti:

- è utile una periodica *fluid challenge*, qualora la somministrazione di fluidi sia protratta.
- L'uso di soluzioni saline può portare ad acidosi ipercloremica.
- La somministrazione di albumina è efficace al fine di ripristinare il volume proteico depleto.

Le norme che regolamentano la gestione farmacologica del supporto emodinamico sono:

- In primo luogo, c'è indicazione all'impiego di noradrenalina come farmaco vasopressorio di prima linea, al quale se necessario aggiungere vasopressina o adrenalina.
- È possibile utilizzare dobutamina in caso di permanenza di segni di ipoperfusione oppure di una condizione emodinamica inadeguata o insufficiente. -considerazione in caso di ridotto Cardiac Output-
- L'aggiunta di corticosteroidi va effettuata unicamente nel caso in cui la terapia vasopressoria e fluidica non sia efficace. 200 mg/giorno di idrocortisone endovena, debole raccomandazione).
- l'uso di dopamina è indicato solo in alcuni pazienti (ovvero nei bradiaritmici) e non deve essere correlato alla protezione renale;

Per quanto riguarda le alterazioni dell'emopoiesi, le linee guida prescrivono:

- trasfusione di piastrine in caso di:
 - livelli ematici inferiori a 10000 unità/mm³ (indicazione assoluta)
 - livelli piastrinici inferiori alle 20000 unità/mm³ con rischio accertato di sanguinamento (indicazione relativa)
 - livelli piastrinici inferiori a 50000 unità/mm³ in caso di procedure invasive programmate
- somministrazione di emazie concentrate se i livelli di emoglobina sono inferiori a 7 g/dl,

meglio se leucodeplete (è stata dimostrata una loro maggiore efficacia nell'outcome microcircolatorio)

- uso di eparina a basso peso molecolare come profilassi contro la trombosi venosa profonda;
- non sono presenti indicazioni per l'uso di filtri di purificazione del sangue emoadsorbenti
- non è indicata la somministrazione di antitrombina come anticoagulante, sebbene i suoi livelli in corso di sepsi siano bassi, e sebbene questo sia associato all'evoluzione della CID

le indicazioni per il supporto respiratorio prevedono:

- Ventilazione meccanica con un *tidal volume* (V_t) di 6 ml per kg di peso corporeo ideale, con *pressione di plateau* massima di 30 cmH₂O e PEEP più elevata, allorché oltre alla sepsi vi sia anche ARDS.
 - pronazione del paziente, come nella terapia dell'ARDS, in caso di *ratio* PaO₂/FiO₂ minore di 150;
 - con la ventilazione meccanica, la sedazione intermittente è preferita a quella continua.
- Inoltre, i pazienti settici ventilati meccanicamente devono avere il capo mantenuto tra i 30° e i 45° per limitare l'aspirazione ed evitare VAP.

È consigliata l'introduzione di nutrizione enterale il prima possibile, tuttavia, qualora questa fosse inattuabile, la somministrazione di nutrizione parenterale deve avvenire almeno dopo sette giorni dalla diagnosi di sepsi, al fine di ridurre il rischio di ulteriori infezioni o disseminazione della infezione primaria.

La gestione della glicemia in ICU prevede la sospensione della terapia antidiabetica del paziente, il suo periodico monitoraggio e la pianificazione di una terapia insulinica nel momento in cui i livelli ematici di glucosio superino i 180 mg/dl. L'uso dello stick glicemico si è rivelato non adeguatamente efficace nel rilevare la glicemia, pertanto i prelievi arteriosi o venosi rappresentano il metodo migliore per definire questo parametro.

È controindicata la somministrazione di bicarbonati nel caso di acidosi lattica dovuta all'ipoperfusione, con $Ph \geq 7,15$.

È inoltre raccomandato l'uso di inibitori di pompa protonica per la prevenzione dell'ulcera da stress, che può verificarsi in corso di sepsi a causa dell'aumento della secrezione acida gastrica.

Il supporto della funzione renale può avvalersi dell'emodialisi, sia che essa venga effettuata in modalità intermittente che continua, sebbene quest'ultima risulti correlata ad una più efficace stabilità emodinamica [21].

2. Il microcircolo

Definito da Ince il motore della sepsi [3], il ruolo del microcircolo merita una adeguata trattazione all'interno di questa tesi.

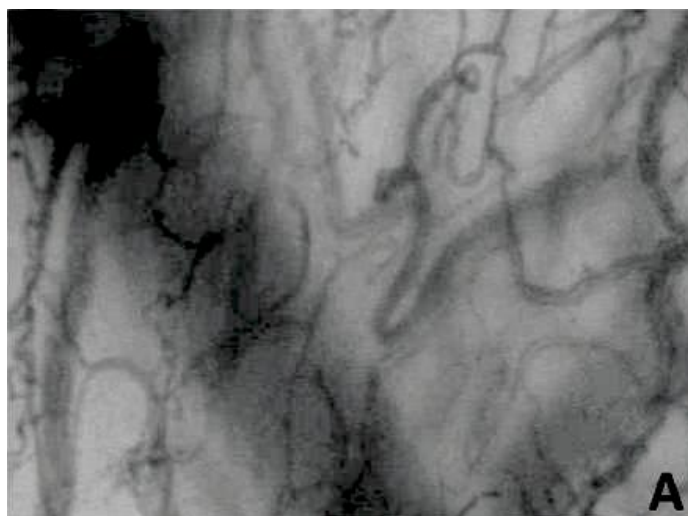


Figura3. immagine di microcircolo di soggetto sano

2.1. Anatomia e fisiologia del microcircolo

Il microcircolo costituisce la componente tissutale che garantisce la distribuzione di ossigeno, nutrienti, e molecole deputate alla segnalazione biochimica alle cellule, nonché la rimozione di CO₂, e l'arrivo delle cellule del sistema immunitario nei vari distretti, per la protezione dell'organismo.

Esso è costituito da arteriole, capillari e venule, ovvero da vasi di calibro 100 μm , a loro volta suddivisi in base al calibro:

- Grosso calibro, intorno ai 100 μm . Questo gruppo comprende arteriole e venule.
- Medio calibro, compreso tra 50 e 20 μm , all'interno di questo gruppo rientrano arteriole precapillari e venule postcapillari
- Piccolo calibro, ovvero sotto i 20 μm , costituito soprattutto da capillari (calibro 5 μm) e prime venule postcapillari [67]

Le arteriole sono vasi di resistenza, e la loro parete presenta, esternamente allo strato endoteliale, una tonaca media, costituita da fibrocellule muscolari lisce che regolano il tono vascolare, responsive alle sostanze vasoattive. Insieme con l'attività degli sfinteri precapillari, il tono muscolare delle arteriole terminali regola l'afflusso al letto capillare, i cui componenti sono unicamente costituiti da endotelio, lamina basale, e talvolta, periciti.

La struttura dei capillari differisce in base al tipo di tessuto in cui si trovano ed alla funzione da essi svolta.

Vi sono infatti:

- ❖ capillari detti continui, localizzati nel connettivo, nel tessuto nervoso e muscolare, che presentano lamina basale continua e cellule endoteliali adese le une alle altre;
- ❖ capillari fenestrati, caratterizzati da lamina basale continua e pori di 50-100 nm di diametro tra le cellule endoteliali. Questi sono stati rilevati nel glomerulo renale, nelle ghiandole endocrine, nell'intestino e nel pancreas.
- ❖ Sinusoidi, presenti nel fegato, nel midollo osseo, nella milza e in altri organi linfatici, ed appartenenti al sistema reticolo endoteliale. Il loro endotelio è dotato di ampi spazi di 30-

40 micron di diametro e anche la lamina basale è discontinua. Questo consente il passaggio di eritrociti, leucociti e proteine del siero.

A seguire, sono presenti le venule, in cui il sangue transita con minore velocità consentendo la diffusione di diverse sostanze e l'adesione leucocitaria. Le venule convergono a valle in vene di calibro sempre maggiore, dotate di parete priva di componente muscolare e, pertanto, in grado di dilatarsi accogliendo ingenti quantità di sangue. (il circolo venoso, infatti, può accogliere il 75% del volume plasmatico circolante, con ripercussioni sulla gittata cardiaca e su altri parametri emodinamici.)

Vi sono inoltre delle regioni prive di letto capillare, in cui l'arteriola converge direttamente nella venula, denominate appunto *shunt artero-venosi*.

Le ultime ricerche in campo di fisiologia microcircolatoria hanno mostrato come una porzione considerevole della diffusione dell'ossigeno si svolga presso le arteriole precapillari. L'ossigeno, oltre che a livello capillare, diffonde in parte anche attraverso la parete delle venule postcapillari. La concentrazione di questo gas al loro interno si pone così in equilibrio con quella tissutale [77].

I vari tessuti differiscono tra loro sia per la distribuzione del microcircolo, strutturata in base alle caratteristiche anatomiche e funzionali dell'organo [68] che per la differente richiesta di ossigeno, la cui estrazione è pertanto influenzata da fenomeni di autoregolazione locale nella quale il ruolo centrale è svolto dalla segnalazione perpetrata dall'endotelio [42]. Essa contribuisce inoltre alla modulazione del tono muscolare e del reclutamento capillare, insieme con altri fattori: la pressione arteriosa, il tono arteriolare e sfinteriale, la pervietà capillare, all'emoreologia o viscosità ematica.

Questa fine regolazione permette un consumo di ossigeno tissutale (VO_2) sufficiente anche in condizioni di una sua minore disponibilità. (DO_2) [69].

L'autoregolazione microcircolatoria comprende i seguenti meccanismi:

- Miogenico: (*sensing strain* e *stress* adattamento mediato da stimoli di stiramento

meccanico delle cellule endoteliali;

- Metabolico: esso si compie a causa della variazione di concentrazioni locali di O_2 , CO_2 , lattati e H^+ , la quale stimola una redistribuzione del circolo;
- Neurormonale: adattamento mediato da stimoli autocrini e paracrini delle cellule ad attività neurormonale [3].

L'estrazione dell'ossigeno (O_2ER) si calcola mediante il rapporto tra VO_2 (consumo) e DO_2 (disponibilità). In condizioni non patologiche, il suo valore si colloca tra 0.24 e 0.28, ed è correlato ad una SvO_2 (saturazione venosa dell'ossigeno) di 70-75%.

Il mantenimento di questo parametro entro tale intervallo, qualora i livelli ematici di ossigeno diminuiscano, è permesso da un aumento nella desaturazione dell'emoglobina (con spostamento della curva di saturazione a destra), nonché da fenomeni di autoregolazione propri del microcircolo stesso. Questo è possibile fino a quando il consumo di ossigeno (VO_2) è indipendente dalla sua disponibilità (VO_2/DO_2 -*independency*). Qualora questa condizione venga a mancare, con l'instaurarsi della VO_2/DO_2 -*dependency*, la riduzione nell'utilizzo di ossigeno intracellulare comporta l'avvio del metabolismo aerobio, riscontrabile a causa dell'aumento dei livelli ematici di lattati [70].

2.2. Il ruolo del microcircolo nella sepsi

L'assetto microcircolatorio, e con esso la capacità tissutale di estrazione dell'ossigeno, varia in base alla patologia presente.

De Backer et al. hanno per primi descritto il ruolo del microcircolo nell'ambito della sepsi [50].

In questa circostanza patologica, alla concentrazione di O_2 nel sangue arterioso (CaO_2) garantita dall'aumento della gittata cardiaca, con l'instaurarsi di un quadro iperdinamico, si contrappone una diminuzione dell'Estrazione di Ossigeno O_2ER . Ne consegue, pertanto, un calo della Saturazione venosa dell'Ossigeno SvO_2 [69].

Questo fenomeno è stato definito da Singer *paradosso della sepsi* [71], e si ritiene che a causarlo concorrano molteplici fattori.

Sicuramente la disfunzione mitocondriale gioca un ruolo preponderante in questo processo, [71] insieme con la disfunzione microcircolatoria, tanto che recenti studi hanno definito tali alterazioni *microcirculatory and mitochondrial distress syndrome* (MMDS) [3].

Si ritiene che il microcircolo, in questo contesto, perda la propria capacità di autoregolazione [3] e di adattamento, anche in conseguenza di altri fattori, quali:

- Aumento dell'espressione di molecole di adesione, che porta ad alterazione dell'endotelio, incentiva il rolling leucocitario e con esso l'attivazione dei polimorfo nucleati, con produzione di ROS [54] ed ulteriore danneggiamento [69].
- Disfunzione nella segnalazione endoteliale [8].
- Iperespressione di iNOS e rilascio massivo di NO.
- Inappropriata attivazione della cascata coagulativa con formazione di microtrombi di piastrine e fibrina, che occludono i capillari che possono portare alla CID(38c).
- Riduzione della responsività delle cellule muscolari lisce alla segnalazione vasomotoria, in particolare quella catecolaminergica [73].
- Aggregazione eritrocitaria (*rouleaux*), perdita di deformabilità e di idoneità eritrocitaria al trasporto dell'ossigeno [52]; questo determina anche l'aumento della viscosità ematica.
- *capillary leakage*.
- Rotture del glicocalice e danni alle giunzioni intercellulari, con formazione di edema [3].

L'esito delle suddette alterazioni consiste in una perdita di uniformità della perfusione tissutale, e quindi anche dell'ossigenazione.

Ciò che caratterizza il microcircolo in questa circostanza è pertanto l'eterogeneità nella perfusione, che comporta l'incapacità di una adeguata estrazione dell'ossigeno.

Una riduzione generalizzata ma armonica della perfusione, infatti, determina una maggiore estrazione tissutale di O₂, e quindi un adeguato apporto cellulare.

In altre parole, il calo uniforme della DO₂ porta ad un aumento di O₂ER, con mantenimento di VO₂ entro valori fisiologici e costanti. La SvO₂ presenta quindi una

cospicua riduzione.

Qualora alcuni capillari presentino un azzeramento dell'apporto ematico, ovvero si verifichi una condizione di shunt artero-venoso funzionale [75], una overestrazione di O₂ nei vasi rimanenti non è possibile [77]. In questi ultimi, infatti, il valore di DO₂ è normale, e i tessuti da essi irrorati, di conseguenza, utilizzano una normale quantità di ossigeno.

I distretti non adeguatamente irrorati, e pertanto ipossici, riducono quindi il proprio metabolismo, e con esso l'utilizzo di ossigeno e dunque il VO₂, al fine di evitare l'avvio dei processi di morte cellulare (innescati da ridotti livelli di atp intracellulare).

La mancata utilizzazione dell'ossigeno a livello capillare si traduce in un aumento della sua concentrazione all'interno della circolazione venosa; si verifica, in altre parole, un aumento della SvO₂ complessiva, la quale risulta anche maggiore della la pressione parziale microcircolatoria dell'ossigeno (μ pO₂).

Questa disparità definisce la severità della condizione di shunt funzionale, ed è denominata "pO₂gap" [3] e dal punto di vista clinico si manifesta con un aumento dei livelli di lattati ematici e della PO₂venosa.

Qualora si manifesti un ulteriore riduzione del flusso ematico su un microcircolo già interessato dalle suddette disomogeneità, si verificherà un'incremento di O₂ER a livello dei capillari perfusi, con conseguente calo della SvO₂ complessiva.

Coerentemente con quanto detto finora, a causa della sua variabilità, la SvO₂ non è utilizzata per la determinazione del grado di disfunzione del microcircolo.

Numerosi studi hanno dimostrato come le alterazioni del microcircolo siano implicate nell'affermarsi di un quadro di insufficienza d'organo, condizione che a sua volta è inclusa nella definizione di sepsi [79] [80] [81] [27]. Altri lavori, invece, hanno messo in evidenza la connessione tra mortalità intraospedaliera e disfunzione microcircolatoria [50]. E' inoltre stato rilevato un miglioramento dei parametri microcircolatori in pazienti con prognosi favorevole; non riscontrato in coloro che già inizialmente presentavano prognosi infausta [55].

In particolare, in questo specifico contesto, si parla di insufficienza funzionale, caratterizzata, come precedentemente descritto, da riduzione del consumo tissutale di ossigeno, e non da alterazioni anatomiche. In base a quanto riportato da Levy et al., alla base di questo tipo di disfunzione, si colloca *metabolic down regulation* [65] o ibernazione cellulare, dovuta alla disfunzione mitocondriale a sua volta scatenata dalla carenza di ossigeno conseguente alla disomogeneità microcircolatoria. I mitocondri producono una quantità di ATP inferiore alle condizioni normali, ma superiore alla soglia che innescerebbe i fenomeni di morte cellulare, anche un incentivo ad una maggiore produzione di energia potrebbe andare a scompensare il quadro a causa dell'aumento di produzione di ROS [41].

Un lavoro di Ince et al. ha introdotto il concetto di Hemodynamic Coherence (coerenza emodinamica) tra macrocircolo e microcircolo, nell'ambito dello studio della risposta del paziente alla terapia. Essa è definita come la condizione in cui le procedure rianimatorie e la correzione delle variabili emodinamiche sistemiche risultano efficaci nel correggere la perfusione regionale e microcircolatoria ed il rifornimento di ossigeno alle cellule parenchimali, permettendo loro di svolgere la loro attività di supporto alla funzionalità d'organo [58].

Un mancato ripristino della normale perfusione microcircolatoria in risposta alle manovre rianimatorie, come l'infusione di fluidi o la somministrazione di farmaci vasoattivi in base alla gravità del paziente, identifica una situazione di perdita di coerenza emodinamica.

Le situazioni che possono determinare questo tipo di alterazione sono:

- I. Eterogeneità del microcircolo, in cui si verifica la presenza di capillari non perfusi affiancati a regioni normalmente irrorate. Questa circostanza si verifica tipicamente in corso di sepsi, ed implica un peggioramento della prognosi [56].
- II. Riduzione del passaggio di O₂ alle cellule a causa di un incremento della distanza tra eritrociti ed endotelio, conseguente ad un aumento della componente liquida del sangue. Questo avviene ad esempio nei pazienti cardiocirurgici, sottoposti a idratazione

endovenosa importante che può dare emodiluizione. (Vi è inoltre riduzione dello shear stress e della segnalazione indotta dal contatto tra eritrociti ed endotelio.)

III. Vasocostrizione, che può comportare ischemia a livello del microcircolo, oppure un importante incremento della pressione venosa, con conseguente tamponamento. Entrambe le circostanze determinano ipossia tissutale. Questa situazione può verificarsi ad esempio a causa della terapia vasopressoria, come dimostrato da studi condotti su pazienti settici trattati con noradrenalina [59] [60].

IV. Edema tissutale conseguente all'aumento di permeabilità capillare (capillary leak) L'imbibizione tissutale preclude la diffusione dell'ossigeno alle cellule. Concorrono all'affermarsi di tale situazione anche il danno relativo al glicocalice e quello endoteliale, in particolare dovuto al danneggiamento delle giunzioni aderenti ed occludenti. In concomitanza con questo quadro microcircolatorio possono manifestarsi segni sistemici di ipovolemia, che richiedono una ulteriore infusione di liquidi, con conseguente aggravamento della condizione di edema tissutale sottostante e disfunzione d'organo

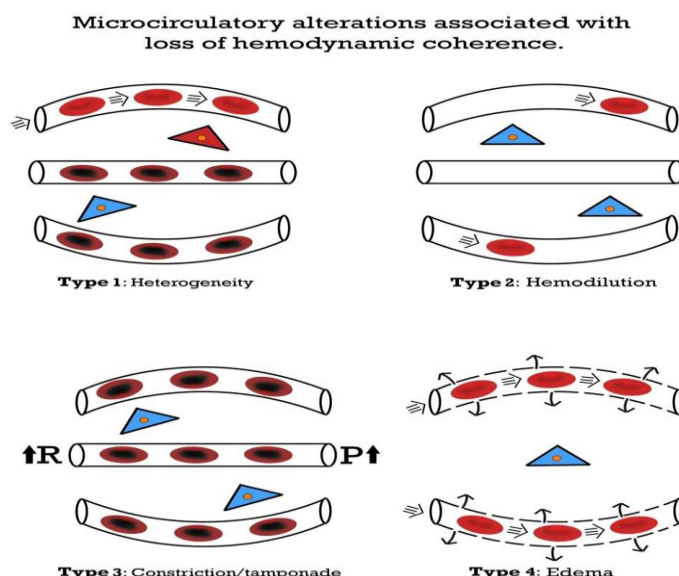


Figura 4: Perdita di coerenza emodinamica.

Molteplici studi sperimentali hanno descritto le caratteristiche delle alterazioni microcircolatorie nella sepsi: sia quantitative (è presente una generale rarefazione della densità vasale) che qualitative (con alterazioni nell'erogazione del flusso ematico, che può essere: rallentato, intermittente, oppure assente). Esse sono state riscontrate: a livello epatico, diaframmatico, intestinale, presso la muscolatura scheletrica e nel microcircolo sublinguale [69].

Il monitoraggio effettuato di routine sul paziente critico in Terapia Intensiva è focalizzato sul controllo delle variabili emodinamiche sistemiche, nell'impossibilità di rilevare le disfunzioni del microcircolo.

Le manovre rianimatorie dovrebbero mirare ad una corretta perfusione d'organo, la quale dipende da tre fattori che sono macroemodinamica, microemodinamica e funzionalità cellulare. Infatti, garantire il solo trasporto di ossigeno ai tessuti controllando i parametri macroemodinamici, esporrebbe il paziente ad una possibile perdita di coerenza microemodinamica, con incapacità da parte dei tessuti di beneficiare della ricezione di ossigeno [58]. Allo stesso modo, una adeguata delivery tissutale di ossigeno non è garanzia di apporto sufficiente di ossigeno, qualora la cellula, a causa della disfunzione mitocondriale, non sia capace di recepirlo ed utilizzarlo [58].

Dal momento che alcuni studi hanno mostrato come l'analisi del microcircolo, a prescindere dai parametri emodinamici sistemici (ovvero pressione venosa centrale, pressione arteriosa media, diuresi, saturazione venosa centrale di O₂, livelli ematici di lattati), possa predire l'outcome del paziente settico e la futura risposta a alle procedure di rianimazione come fluid resuscitation, trasfusioni di sangue e somministrazione di vasopressori [60] [61] [62] e dal momento che le migliorie apportate di recente alle tecniche di valutazione di questo distretto rendono queste ultime più facilmente utilizzabili rispetto al passato, si auspica una loro prossima introduzione nella pratica clinica e nelle valutazioni effettuate di routine sul paziente settico.

2.3. Tecniche di valutazione del microcircolo

Le tecnologie che permettono di ottenere un'immagini videomicroscopiche in vivo sono la *Orthogonal Polarization Spectral Imaging* (OPS), il *Side-stream Dark Field Imaging* (SDF) e l'IDF (Incident Dark Field Illumination), recentemente modificate in modo tale da essere impiegate anche al letto del paziente, OPS e SDF si attengono agli stessi principi di imaging.

Esse hanno consentito di confermare sull'uomo i risultati degli studi microcircolatori effettuati precedentemente su animali [82]. Entrambe le tecnologie permettono di visualizzare il microcircolo su tessuti in cui esso si trova molto superficialmente, rivestito da un sottile strato epiteliale. Possono essere studiati quindi: la mucosa sublinguale, rettale, e vaginale, come pure le ileostomie e le colostomie.

La OPS(*Orthogonal Polarization Spectral – Dark Field*), (Cytometrics, Philadelphia, PA, USA) prevede l'emissione di una luce polarizzata verso l'oggetto dell'analisi, che viene assorbita dall'emoglobina eritrocitaria. I tessuti superficiali riflettono la luce polarizzata, la cui successiva proiezione verso lo schermo è preclusa da uno specifico filtro. Giungendo più in profondità, i raggi incontrano svariati ostacoli che determinano la perdita della polarizzazione. Gli elementi situati più in profondità, pertanto, riflettono una luce non più polarizzata, che può oltrepassare il filtro ed essere rilevata sullo schermo [83]. Il prodotto di questa tecnologia prende il nome di OPS-DF (*Orthogonal Polarization Spectral – Dark Field*).

La SDF imaging (*Sidestream Dark Field*), più recente, ha preso il posto della OPS [84], di cui rappresenta un'evoluzione, grazie all'applicazione al device portatile *Microscan* (*Microvision Medical B.V.Amsterdam, The Netherlands*) dal 2007. In questo strumento, che detiene il primato in campo sperimentale, è presente un anello di LEDs che emette luce verde pulsata in grado di attraversare i tessuti per uno spessore di 3 mm visualizzandone il contenuto.

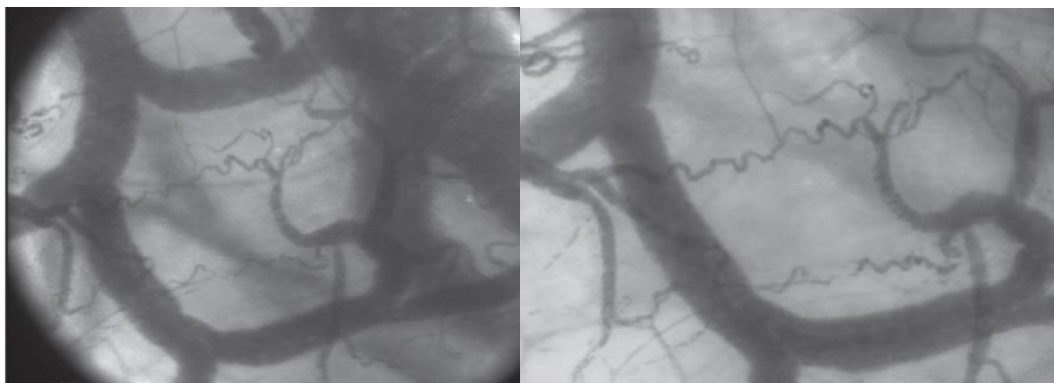


Figura 5 la stessa area microcircolatoria visualizzata con Orthogonal Polarization spectral imaging (sopra) e Side stream Dark field imaging (sotto)

La luce ha lunghezza d'onda di 530 nm, che rientra nello spettro di assorbimento dell'emoglobina eritrocitaria, sia ossigenata, che ridotta. Pertanto, a prescindere dal loro livello di ossigenazione, gli eritrociti vengono individuati come piccole masse grigio scuro; i leucociti possono invece risultare simili a sagome rifrangenti.

Centralmente all'anello di LEDs è situato un sistema di lenti che rileva la luce riflessa dalle varie strutture scansionate. Dal momento che gli strati superficiali emettono luce con direzione perpendicolare all'anello di leds e dunque anche alle lenti, quest'ultima non viene captata e non va ad inficiare la visione degli elementi sottostanti [84].

L'immagine ricevuta può essere in seguito ingrandita da 5 a 10 volte, per poi essere analizzata successivamente al computer. L'ingrandimento 5x è considerato ottimale in termini di definizione, al fine di evitare che, con ingrandimenti maggiori, sia maggiormente difficoltoso analizzare accuratamente le qualità del flusso [84].

I vantaggi della SDF rispetto alla OPS sono:

- minore influenza delle strutture vascolari dei piani più superficiali, con riduzione della conseguente perdita di luminosità e contrasto dell'immagine
- maggiore precisione nello studio del distretto capillare, in cui è possibile individuare con maggior definizione e (nitidezza) gli eritrociti
- maggiore nitidezza (qualità) dell'immagine, dovuta alla riduzione degli artefatti, causati

nella OPS dal fatto che la direzione della luce riflessa coincide con quella della luce emessa.

- Minor consumo di energia grazie alla possibilità di avvalersi di un dispositivo portatile a batteria, il quale consente anche maggior praticità nella rilevazione delle immagini, potendolo utilizzare al letto del paziente.

Una ulteriore evoluzione rispetto alla SDF è rappresentata dal *CytoCam* (*Braedius Medical B.V., Huizen, the Netherlands*), che utilizza una tecnologia IDF-DV.

Si tratta di una telecamera ultraleggera di alluminio e titanio che utilizza 12 LEDs che emettono luce ad alta intensità con pulsazioni di 2ms, la quale viene rilevata da lenti acromatiche ad alta risoluzione che permettono un ingrandimento 4x.

Il campo di indagine è 3 volte maggiore rispetto alle tecnologie precedenti, comprendendo un'area di 1.55 x 1.16 mm. Vi è poi un sensore di immagini ad alta densità di pixel sincronizzato con l'illuminazione LEDs, che permette una risoluzione di 0,66 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Questo device produce 25 frames per secondo (pertanto con una frequenza pari a 25 Hz).

Potendo collegare la telecamera al computer ed utilizzando un software specifico, l'operatore può inoltre regolare il fuoco e la luminosità dell'immagine, al fine di ottenere una qualità d'immagine ancora migliore [84].

CytoCam Tools è un altro software (di acquisizione ed analisi dei video) associato a questo dispositivo, in grado di analizzare automaticamente i parametri microcircolatori in pochi secondi, con importanti guadagni in termini di tempo dedicato alla successiva analisi offline. Ciononostante, necessitando di una definitiva validazione della sua affidabilità, tale programma non è ancora utilizzato unitamente al *CytoCam*.

Il confronto dei video effettuati con le due differenti tecniche SDF e IDF, condotto da Aykut et al. su 25 volontari sani ha dimostrato la maggiore risoluzione della IDF, nonché un incremento del 30% nella visualizzazione dei capillari nello stesso distretto e sullo stesso soggetto [84].

Alla base di questo risultato, si ritiene vi siano: la differente conformazione della fonte luminosa, che nella IDF garantisce un aumento della risoluzione, del contrasto, e del focus; la maggiore risoluzione del rilevatore (in termini di maggiore densità di pixel, ovvero 3,6

megapixel); nonché l'utilizzo di lenti multiple, che conferisce maggior definitezza e nitidezza all'immagine [84].

Non è tuttavia ancora stato indagato se i miglioramenti apportati influenzeranno significativamente gli esiti degli studi, e neppure se sarà più difficile il confronto tra studi condotti utilizzando le due tecniche differenti.

Nonostante i continui miglioramenti apportati nel tempo alle varie tecnologie, alcune problematiche sono tuttora presenti: la pressione dello strumento sulla mucosa può modificare le caratteristiche del flusso conducendo ad una rilevazione errata; i movimenti del paziente possono determinare instabilità del campo di acquisizione dell'immagine, e pertanto video di qualità inferiore o impossibili da analizzate da parte del software

2.4. Lo studio del microcircolo e i parametri microcircolatori

Il distretto corporeo prescelto per lo studio del microcircolo è rappresentato dalla mucosa sublinguale, in quanto dotata di epitelio sottile e pertanto adeguata ai requisiti sopracitati, nonché facilmente accessibile dall'operatore. L'irrorazione di questa regione origina dall'arteria carotide esterna e dalle arterie linguale e sublinguale.

Il microcircolo sublinguale è inoltre ritenuto un buon indice della perfusione splancnica, in primo luogo perché con i visceri condivide l'origine embriogenetica e di conseguenza l'architettura tissutale; ed in secondo luogo in base ai risultati di alcuni studi: un lavoro di J. Creteur, D. De Backer [86], ad esempio, ha mostrato una correlazione tra la capnometria sublinguale e la tonometria gastrica [86].

Un altro studio [87] ha rilevato una correlazione tra immagini provenienti dalla mucosa sublinguale e da stomie intestinali in condizioni di sepsi addominale, dopo intervento chirurgico e ripristino della normale irrorazione intestinale [87]. Tale corrispondenza è stata riscontrata nelle diverse rilevazioni effettuate dallo stesso operatore, ma anche tra operatori differenti [88].

Sulla base del concetto di coerenza emodinamica introdotto da C. Ince e dei suddetti lavori, l'analisi del microcircolo sublinguale è stata inserita all'interno di ulteriori studi condotti in ICU su pazienti settici, che ne valutano le modificazioni in risposta alle terapie intraprese [89] [90] [91].

I parametri che definiscono la funzionalità del microcircolo, e che vanno tenuti in considerazione a tal proposito, stabiliti nel 2007 ad Amsterdam da una commissione di esperti [92], sono:

- *Total Vessels Density* (TVD, ovvero la densità vasale nel campo preso in considerazione);
- *Perfused Vessel Density* (PVD, ovvero la densità dei capillari perfusi);
- *La Proportion of Perfused Vessels* (PPV, percentuale dei vasi perfusi);
- *Il Microcirculatory Flow Index* (MFI, indice della qualità del flusso microcircolatorio);
- *Il Flow Heterogeneity Index* (FHI, indice della eterogeneità del flusso, condizione che si verifica sovente in corso di sepsi) [67] [92].

La cattura delle immagini ed il computo dei dati qualitativi/semiquantitativi richiede tempi lunghi ed operatori specializzati; i software deputati all'analisi rapida dei parametri sono in corso di validazione e non possono essere ancora impiegati nella pratica clinica.

Un video di buona qualità, ovvero in grado di fornire dati affidabili, la cui acquisizione dipende sia dalle caratteristiche dello strumento che dalla competenza dell'operatore, può essere definito tale in base alle seguenti caratteristiche fondamentali [67]:

- Pressione, responsabile degli artefatti più limitanti nel contesto dell'analisi del microcircolo. Una sproporzionata pressione dello strumento sulla mucosa può determinare un temporaneo arresto del flusso, che può essere erroneamente identificato come una alterazione patologica. Sebbene l'esperienza e delle tecniche dedicate possano essere d'aiuto nella distinzione tra un arresto del flusso patologico ed uno da artefatto, la pressione costituisce una delle più importanti fonti di errore nella acquisizione di immagini del microcircolo.

- Stabilità; che rientra tra le prerogative più difficili del campionamento per via dell'instabilità dello strumento presso la mucosa e dei movimenti del paziente, specialmente se sveglio o scarsamente collaborante. Per soddisfare questo requisito, sono necessari almeno 60 frames con una deviazione in seguito riportata sugli assi xy dal software inferiore al 20%
- Fuoco: una ottimale messa a fuoco dell'immagine permette una corretta individuazione delle strutture capillari, una valida stima dei diametri dei vasi e della natura del flusso;
- Luminosità: deve essere calibrata tenendo conto che la mucosa sublinguale presenta solitamente basso contrasto e che gli artefatti che possono essere eventualmente generati rendono difficoltoso distinguere i capillari all'analisi visiva offline, sottostimando la densità vasale;
- Contenuto: dovrebbero essere escluse: bolle di saliva, secrezioni, lesioni ematiche superficiali, nonché vasi a struttura *looped*, tipici della mucosa buccale e non sublinguale, e pertanto non idonei all'analisi in questione. Si auspica inoltre una visione del microcircolo nella sua interezza, e pertanto completo di arteriole, capillari, venule.
- Durata: dovrebbe essere tale da permettere di rilevare eventuali artefatti da pressione. Dapprincipio è stata raccomandata la acquisizione di video in cui l'attenzione si soffermi per almeno 10 secondi sullo stesso sito di registrazione; mentre più di recente è stato stabilito che 3-5 secondi siano sufficienti [93].

Mediante la valutazione di questi parametri, vengono identificati i video che presentano una qualità sufficiente per essere analizzati. Essi sono in seguito trasferiti presso un software dedicato (*AVA 3.0, Automated Vascular Analysis, Microvision Medical, Amsterdam, The Netherlands*) che effettua un'accomodazione automatica di luminosità e contrasto, nonché una suddivisione in frammenti, che saranno in seguito presi in esame dall'operatore. Quest'ultima mansione consiste nella evidenziazione manuale del profilo di ogni vaso visibile, del quale vengono definiti lunghezza e calibro. Si tratta di un

incombenza piuttosto lunga e laboriosa, che scoraggia l'impiego dell'analisi del microcircolo nella pratica clinica quotidiana.

Segue dunque la suddivisione dell'immagine in quattro quadranti, a ciascuno dei quali viene attribuito un punteggio in base alla tipologia di flusso in esso rilevata: 0 = flusso assente, 1 = flusso intermittente, 2 = flusso rallentato, 3 = flusso continuo.

Il *Microcirculatory Flow Index* (MFI, indice della qualità del flusso microcircolatorio) è calcolato facendo la media dei quattro valori stabiliti.

Un valore maggiore o uguale a 2 indica un vaso perfuso, mentre i restanti parametri vengono automaticamente definiti da un software e riportati in un file scritto, utilizzabile per l'analisi statistica [93].

Nel 2018 una nuova round table si è riunita al fine di aggiornare le linee guida in accordo con le evidenze più recenti [63]. La fase di raccolta dati di questo studio si sia basata sulle linee guida del 2007; sono riportate in figura le differenze principali introdotte nel 2018 [63].

Topic	<i>Critical Care De Backer (2007) [53]</i>
Choice of microvascular variables	We recommended a full description of all available variables present in the non-experimental literature
Type of microvascular assessment	We recommended a full computer-assisted off-line analysis under all circumstances
Image quality	We recommended to avoid pressure artifacts, elimination of secretions, adequate focus, contrast adjustment, and high-quality recording
Type of vessel	We recommended to include all vessels with a diameter < 20 µm
Number of areas	We recommended a minimum of 3–5 different areas of interest per measurement
Hyperdynamic flow	Recommendations with respect to hyperdynamic flow were not included

Figura 6. Linee guida 2007 per la valutazione del microcircolo

Topic	<i>Intensive Care Medicine Ince 2018</i>
Choice of microvascular variables	We recommend a specific set of variables according to the pathophysiologic mechanism (Tables 6 and 7) or type of intervention (Table 8)
Type of microvascular assessment	We recommend using a grid-based point-of-care tool for the time-limited selection of patients and evaluation of clinical interventions. We recommend performing an (additional) dedicated off-line analysis under all circumstances
Image quality	We recommend to include a specific scoring sheet (including a cutoff value) that addresses all aspects of image quality
Type of vessel	We recommend selecting types of vessels (capillaries, venules) for analysis according to the pathophysiology of interest (Tables 6 and 7). Definitions of each vessel type are provided
Number of areas	We recommend to use single-spot measurements during interventions whenever feasible to enhance discriminative power. Under all other circumstances, a minimum of 3–5 different areas of interest is recommended
Hyperdynamic flow	We recommend restricting indices of hyperdynamic red blood cell velocity to specific pathophysiologic situations and to limit assessment to space–time–frame-derived exact red blood cell velocity

Figura 7. Linee guida 2018 per la valutazione del microcircolo

2.5. Near-InfraRed Spectroscopy o NIRS

La Near-InfraRed Spectroscopy consiste in una tecnica non invasiva che permette di valutare l'ossigenazione del microcircolo, che si rende necessaria dal momento che i parametri emodinamici comunemente utilizzati, ovvero pressione arteriosa media e cardiac output, come pure come la saturazione venosa centrale dell'ossigeno e i livelli dei lattati, indici di ossigenazione globale, non risultano efficaci nel definire lo stato di perfusione d'organo [94] [95].

Nel paziente settico si presenta infatti spesso una disparità tra la condizione microcircolatoria e la macroemodinamica.

Lo strumento utilizzato si chiama *InSpectra StO₂Tissue Oxygenation Monitor (model 650, Hutchinson Technology, Hutchinson, MN, USA* e prevede l'utilizzo di una sonda posizionabile sulla zona da indagare, della quale va a rilevare la saturazione tissutale di ossigeno e la reattività microcircolatoria.

Il tessuto che viene preso in esame è abitualmente l'eminanza tenar, poiché agevolmente accessibile e dotata di tessuto adiposo fibrocutaneo che limita la formazione di edema. Qui viene innanzitutto posizionata una sonda che emette luce con una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 1100 nm, assorbibile dall'emoglobina sia ossigenata che deossigenata, nonché dalla mioemoglobina e dai citocromi. Il valore rilevato viene considerato come saturazione basale dell'emoglobina (StO₂), ed inseguito alla sua stabilizzazione, che deve essere mantenuta per 3 minuti, viene effettuato il test di ischemia.

Questo prevede che venga gonfiato un manicotto a livello del gomito del paziente fino a pressioni di 50 mmHg superiori rispetto alla pressione arteriosa sistolica del paziente; e che venga mantenuto fino a che la rilevazione dell'ossigenazione tissutale presso l'eminanza tenar non raggiunga un valore della StO₂ pari al 40% del basale precedentemente certificato. A questo punto, il bracciale viene sgonfiato, permettendo la riperfusione dell'arto. La StO₂ è continuamente monitorata durante questa fase, fino a che il suo valore

non va nuovamente a stabilizzarsi. [94]

In seguito, i dati registrati durante la procedura, vengono elaborati dal software *version 3.03 InSpectra Analysis Program, Hutchinson Technology Inc*, e mostrano un grafico composto da una fase baseline pre VOT, una fase ischemica, una fase di riperfusione, una fase iperemica ed un ritorno al baseline.

Fanno riferimento ai valori basali individuati all'inizio, la StO₂(i valori normali a livello del

muscolo si aggirano intorno all'87%, ne valutano il metabolismo basale) e il THI (*Tissue Haemoglobin Index*), indicatore del volume ematico microcircolatorio presente nell'area studiata.

Sulla base del grafico registrato durante la fase di ischemia, è rilevato il StO₂ downslope (%/minuto), un indice di estrazione tissutale dell'ossigeno, che definisce il metabolismo muscolare in condizioni di ischemia.

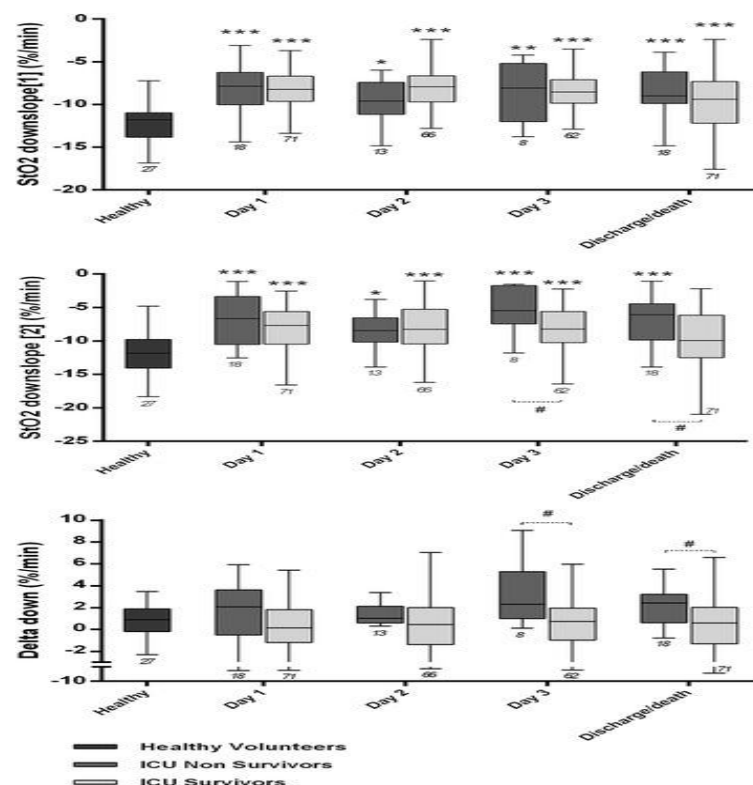


Figura 8. Confronto tra le due componenti del downslope e la loro differenza

Recenti studi [94] [95] hanno messo in evidenza due fasi all'interno della durata del test di ischemia, differenti per la pendenza della curva di desaturazione, e definite pertanto downslope 1 e 2. Il confronto dei valori delta-downslope, risultante dalla differenza tra la prima e la seconda porzione della curva, ha mostrato valori maggiori nei pazienti con outcome peggiore, ovvero con tassi maggiori di mortalità al 90° giorno [95].

Sono indici di reattività micro vascolare l'StO₂ upslope (%/minuto) misurata dal 40% della StO₂ baseline, valutata durante la fase di riperfusione, e l'area sotto la curva (AUC StO₂) sempre riferita all'upslope.

Quest'ultima è calcolata mediante l'integrale della curva post riossigenazione, (upslope) ovvero quella compresa tra il picco di StO₂ sopra al baseline ed il baseline successivamente riguadagnato. Il picco di StO₂ supera il baseline nella fase post ischemica in quanto si verifica una iperemia reattiva postischemica, con vasodilatazione e reclutamento di capillari. Questo indice, pertanto, definisce la reattività micro vascolare al'ischemia [96].

Recenti studi condotti mediante questo dispositivo sui pazienti settici hanno riportato le seguenti evidenze:

- sono stati rilevati valori inferiori di AUC StO₂ (correlato all'upslope) in pazienti settici rispetto a volontari sani.
- è presente un nesso tra un peggioramento dell'outcome clinico in pazienti in stato di sepsi o shock settico e anomalie nel recupero del valore basale di StO₂ [97].
- in concomitanza con uno stato di sepsi o shock settico, si registra un deficit nella fase iperemica, definito dalla riduzione della pendenza della curva di StO₂ (sia per quanto riguarda la fase di downslope che quella di upslope) si associa inoltre ad un decremento del valore di VO₂ tissutale, di consumo di ossigeno tissutale che rispecchia la ridotta capacità di utilizzo tissutale di ossigeno che si verifica in questa condizione patologica [98].
- l'StO₂ upslope o recovery slope rappresenta il parametro correlato in misura maggiore con il sopraggiungere di quadri di disfunzione d'organo e morte [28].

3. Il ruolo dell'emoglobina libera nella sepsi

L'emoglobina umana è la proteina deputata al trasporto dell'ossigeno nell'organismo; essa si trova negli eritrociti, di cui occupa il 30% del volume. È costituita da quattro subunità globiniche, due di tipologia α e due β nell'isoforma adulta, ciascuna delle quali è in grado di legare l'ossigeno mediante un gruppo prostetico detto eme, composto da un atomo di Ferro allo stato ferroso (Fe^{2+}) legato ad un anello di proto porfirina IX. I valori medi di emoglobina circolante si attestano intorno a 14-18 g/dl nei maschi adulti e 12-16 g/d nelle femmine. Ciascun grammo di emoglobina può trasportare 1,34 ml di ossigeno.

Normalmente, la piccola quota di emolisi fisiologica che si verifica quotidianamente, unitamente all'emocateresi splenica volta all'eliminazione dei globuli rossi ormai disfunzionali, liberano nel plasma una ridotta quantità di emoglobina extracellulare, che viene prontamente allontanata dal circolo ematico grazie ad un sistema scavenger dedicato.

Dopo la dissociazione in gruppo eme e metaemoglobina, quest'ultima è rapidamente legata dall'aptoglobina, che ne favorisce l'eliminazione epatica.

In seguito, il complesso emoglobina-aptoglobina viene riconosciuto dall'*hemoglobin scavenger receptor*, il CD163, presente sulla superficie dei macrofagi. Questo legame stimola nel leucocita la produzione di IL-10 e HO-1, l'endocitosi del complesso, ed avvia la sua degradazione.

Il gruppo eme viene requisito dell'emopexina plasmatica mediante un legame ad alta affinità con lo ione ferrico; questo impedisce l'eventuale danno da radicali liberi che lo ione potrebbe causare. Questa proteina ne determina il trasporto a livello epatico, dove l'eme ossigenasi-1 (HO-1) lo converte in biliverdina e Fe^{2+} . Lo ione metallico viene in seguito ossidato a Fe^{3+} e sequestrato dalla ferritina; in questa reazione viene inoltre liberato del monossido di carbonio, che esercita sui tessuti circostanti un'azione vasodilatatoria, antiproliferativa, antinfiammatoria ed antiossidante.

Infine la biliverdina è convertita in bilirubina dall'enzima biliverdina reduttasi.

Tuttavia, una concentrazione eccessiva di emoglobina extracellulare dispersa in circolo, può portare a saturazione del sistema scavenger, in primo luogo perché l'aptoglobina viene degradata e risintetizzata, e quindi la possibilità di utilizzarla è limitata dalla riserva di tale proteina presente nell'organismo e dal tempo di sintesi della stessa [6].

La presenza di emoglobina libera in circolo (Hb), ovvero non legata all'aptoglobina rispecchia l'entità dell'insufficienza dei sistemi di clearance dell'emoglobina, ed è connessa ad un danneggiamento tissutale da radicali liberi a causa di quantità eccessive di eme libero nel plasma. Viceversa, quando presente in concentrazioni fisiologiche, ha attività antiossidante.

Le condizioni che possono portare a questa situazione sono quelle che presentano emolisi intravascolare massiva, come le crisi emolitiche correlate a deficit della piruvato chinasi, sferocitosi, nonché in presenza di emoglobinuria parossistica notturna, talassemie, anemia falciforme, anemia emolitica microangiopatica, o emolisi da valvola meccanica [6].

Anche nella sepsi è stato riscontrato un aumento dell'emolisi extravascolare, il quale, unitamente alla deregolazione del sistema scavenger, determina un innalzamento dei livelli di emoglobina libera [31]. Come possibile causa del fenomeno sono stati individuati i seguenti fattori:

- Danneggiamento del eritrociti o alterazione delle proteine di membrana e della deformabilità del corpuscolo a causa delle tossine batteriche come l'LPS.
- Emolisi microangiopatica con formazione di schistociti conseguente all'ipercoagulabilità che si manifesta in corso di sepsi.
- Emodialisi [64].
- Presenza in circolo di emazie conservate per tempi prolungati e poi trasfuse al paziente settico.

Il danno perpetrato dell'emoglobina libera circolante in corso di sepsi coinvolge molteplici aspetti fisiopatologici:

3.1. Il ruolo dell'NO

In primo luogo, in essa reagisce con il NO in modo rapido ed irreversibile; da questa reazione si generano ione nitrato e metaemoglobina. Ciascuna sub unità proteica è in grado di coinvolgere 4 molecole di NO; pertanto, minime concentrazioni di emoglobina plasmatica libera comportano cospicue riduzioni delle quantità di NO, con conseguente danneggiamento endoteliale. (6)

L'eventuale emolisi che si può verificare in corso di sepsi, induce l'accumulo di 'emoglobina extracellulare nel compartimento sub endoteliale ed il rilascio dell'enzima eritrocita arginasi, deputato alla conversione di L-arginina in ornitina, sottraendo l'amminoacido all'ossido nitrico sintetasi per la sintesi di NO. Si verifica quindi vasocostrizione acuta/massiva a causa della rapida deplezione di tale vasodilatatore dovuta sia al suo legame con la free Hb, direttamente proporzionale all'entità dell'emolisi, sia all'impedimento nella produzione della molecola [53].

Il drammatico calo dei livelli di NO nel microcircolo determina una serie di eventi concatenati tra loro: importante vasocostrizione, anche causata da una maggiore produzione dell'endotelina-1, un potente vasocostrittore, indotta dall'emoglobina libera stessa.

Valori ridotti di Total Vessel Density, un indice di disfunzione microcircolatoria, sono stati rilevati in pazienti settici che avevano ricevuto emotrasfusioni e che presentavano livelli maggiori di emoglobina libera [7].

Si verifica dunque una condizione di ischemia, con danno ossidativo e disfunzione endoteliale, seguita dall'attivazione dei fenomeni infiammatori e dell'aggregazione piastrinica.

3.2. L'aggregazione piastrinica

Il deficit di NO implica infatti una riduzione sia della concentrazione tissutale di *cyclic guanine monophosphate (cGMP)*, inibitore dell'aggregazione piastrinica, sia dell'inibizione dell'attività del fattore VIII, con aumento della formazione dei coaguli di fibrina e della loro stabilità.

Inoltre, l'emoglobina libera stimola la produzione endoteliale di prostaglandina F2-alfa, vasocostrittore e aggregante piastrinico.

A ciò si aggiunge l'effetto procoagulante causato dalla riduzione dell'attività di ADAMTS13, dose dipendente, messa in atto dall'emoglobina libera.

Questi fenomeni portano ad una riduzione dell'ossigenazione del microcircolo, alla quale corrispondono manifestazioni cliniche variabili in base alla gravità del quadro. Vi possono essere dolori colici correlati alle contrazioni spasmodiche della muscolatura liscia, oppure, in quadri più severi, ipertensione arteriosa sistemica e polmonare.

Come è già stato accennato, una delle principali cause di nocimento correlate alla saturazione del sistema di smaltimento dell'emoglobina libera è il danno ossidativo al quale prendono parte il Ferro bivalente, le molecole di emoglobina libera, l'anello di protoporfirina IX. Le reazioni radicali che vengono dunque innescate, ne avviano a loro volta altre, con un effetto a catena che esita nella perossidazione lipidica, nella modifica a carico della struttura delle proteine e del DNA; nelle lesioni a carico del glicocalice, e nell'attivazione di cascate intracellulari di trasduzione del segnale pro infiammatorie. Questi effetti sono rilevabili grazie all'innalzamento dei livelli plasmatici di F2-isoprostani e di isofurani, markers di danno ossidativo derivati dalla perossidazione lipidica. Il ferro libero, inoltre, può favorire la crescita di batteri [51].

3.3. L'innescò dei fenomeni infiammatori

L'eme circolante induce inoltre un aumento dell'espressione di molecole di adesione come VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, con aumento del rolling leucocitario, nonché una maggiore

attivazione dei TLR, ed una maggior produzione dell'IL-6,IL-8, favorita anche dall'emoglobina libera stessa. Questi effetti partecipano all'amplificazione della risposta infiammatoria.

3.4. L'effetto citotossico dell'eme

È stato dimostrato un fenomeno chiamato “heme sensitization to programmed cell death”, che attribuisce all'eme la capacità di incentivare i processi di morte cellulare programmata se in un ambiente già influenzato da altre citochine pro-infiammatorie (TNF α) o fattori proapoptotici. In questo contesto, si ipotizza che l'attivazione del nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin 3 (NLRP3), in grado di attivare l'inflammosoma dei macrofagi, possa svolgere un ruolo decisivo [18]. Si ritiene inoltre che l'eme sia responsabile di danno cellulare diretto mediante la via del *high mobility group box 1* (HMGB1) [35].

Per concludere, alcuni studi hanno preso in considerazione le attività svolte dagli enzimi adibiti allo smaltimento dell'emoglobina libera e dell'eme.

Uno studio ha infatti dimostrato una correlazione tra ridotti livelli di emopessina e sepsi severa in presenza di infezioni con alta carica patogena. La somministrazione di tale enzima ha mostrato una riduzione del danno tissutale e della letalità del quadro settico; pertanto è stato ipotizzato di inserirla nella terapia della sepsi.

Inoltre, una induzione dell'enzima HO-1 da parte dell'infezione, si correla con una più precoce risoluzione del quadro patologico. Differenti polimorfismi di questo enzima, associati a variabilità nel suo funzionamento, inoltre, determinano differenze nell'outcome clinico [31].

Questi eventi si verificano anche all'interno di un quadro di sepsi, determinando situazioni caratterizzate da gravità crescente, fino al danno multi organo [53].

Concentrazioni aumentate di emoglobina libera sono correlate ad un peggioramento dell'outcome e ad un aumento della mortalità [31].

4. Il paracetamolo

Grazie al suo effetto analgesico, antipiretico e lievemente anti-infiammatorio ed alla vasta esperienza nella pratica clinica a suo riguardo, l'acetaminofene o N-acetil-p-aminofenolo (APAP) o paracetamolo (PARA) è uno dei farmaci più usati al mondo. È utilizzato anche in età pediatrica ed in gravidanza per la sua sicurezza e scarsità di effetti collaterali, purché assunto a dosi terapeutiche (fino a 4g/die per gli adulti; 50-75mg/Kg/die per i bambini).

Somministrato alla dose terapeutica consigliata (1-2g/die negli adulti), è impiegato al fine di ridurre la febbre ed alleviare le sintomatologie dolorose lievi o moderate, determinate da cefalea e dolore post-operatorio. A differenza dei FANS, l'acetaminofene non svolge anche una attività antinfiammatoria né antiaggregante piastrinica, ma agisce prevalentemente a livello del SNC.

4.1. Meccanismo d'azione

L'azione principale svolta da questa molecola consiste nell'inibizione non selettiva delle cicloossigenasi COX-1 (l'isoforma costitutiva) e COX-2, ovvero l'isoforma la cui attività è indotta da stimoli infiammatori. Quest'ultimo enzima è responsabile di un'aumentata produzione di eicosanoidi (come le prostaglandine e i trombossani) in condizioni di infiammazione acuta e cronica. Recenti studi hanno inoltre preso in considerazione una possibile inibizione selettiva dell'isoforma COX-3, localizzata nelle cellule neuronali, da parte dell'acetaminofene.

Il substrato naturale delle COX è l'acido arachidonico, che viene convertito in prostaglandina G₂, a seguire, mediante attività perossidasi, in PH₂, la quale a sua volta subisce delle trasformazioni da parte delle sintasi tessute specifiche dando origine a prostanoidi attivi, come prostaglandine, prostacicline e trombossani, ed in particolare PGF₂alfa, PGI₂, PGE₂, PGD₂, TXA₂.

La COX-1 è costitutiva, e garantisce la produzione basale di prostaglandine, prostacicline e

trombossani necessari al trofismo ed alla protezione gastrica; alla regolazione del flusso ematico renale e della filtrazione glomerulare, e coinvolti nell'induzione dell'aggregazione piastrinica in condizioni fisiologiche.

La COX-2 (inducibile) si trova prevalentemente in macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali, e si attiva qualora stimolata da mediatori dell'infiammazione.

Citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6, TNF- α inducono un aumento della trascrizione sia di COX1 che di COX2, e di conseguenza dei livelli di prostaglandine.

Queste ultime molecole favoriscono la vasodilatazione ed un aumento della permeabilità vasale e della sensibilità dei recettori periferici nocicettivi, con conseguente iperalgesia. Esse incentivano inoltre l'aggregazione piastrinica e fungono da pirogeni endogeni.

A livello ipotalamico PGE₂ e la PGD₂, rilasciate in risposta a pirogeni esogeni come l'LPS, innalzano il setpoint di termoregolazione, che a sua volta induce l'attivazione dei meccanismi di termogenesi, ovvero vasocostrizione periferica e ridotta dispersione di calore, nonché la contrazione simultanea della muscolatura scheletrica assiale finalizzata alla termogenesi (brivido). questi fenomeni conducono infine ad un innalzamento della temperatura corporea e quindi al fenomeno della febbre.

È stato inoltre recentemente delineato un meccanismo pirogenico che coinvolge le ceramidi. Esso prevede una attivazione della sfingomielinasi da parte della citochina IL-1 β . questo enzima provoca un aumento della concentrazione neuronale di ceramidi nell'area preottica ipotalamica, che collabora all'innalzamento del setpoint termoregulatorio.

Il fenomeno della febbre, definita da una temperatura corporea maggiore o uguale a 38,3°C, [78] determina una riduzione della proliferazione batterica e della replicazione virale e induce una maggiore reattività nelle cellule del sistema immunitario: contribuisce pertanto alla difesa dell'organismo [85].

Il paracetamolo si lega alla porzione superiore del sito catalitico dell'enzima, impedendo il

legame dell'acido arachidonico, che non viene più convertito in prostaglandine, prostacicline e trombossani.

Il processo di inibizione delle COX da parte del paracetamolo è tuttavia molto ridotto in presenza di perossidi, i cui livelli sono particolarmente elevati nel sito infiammatorio, ma quasi nulli nel SNC. Pertanto, l'azione del farmaco è inferiore come antinfiammatorio rispetto ai fans (che non subiscono inibizione da perossidi) e si esplica a livello centrale, sul centro di termoregolazione dell'ipotalamo.

Qui, il calo nella produzione di mediatori dell'infiammazione e ceramidi indotto dall'acetaminofene, provoca la ristabilizzazione del sistema di regolazione della temperatura endogena, con conseguente vasodilatazione periferica, sudorazione, e aumentata dissipazione del calore. Questo conduce infine alla normalizzazione della temperatura corporea [74].

4.2. Il ruolo del Paracetamolo nella sepsi

Sebbene la sua validità ed affidabilità sul paziente settico non siano state ancora dimostrate, come pure l'utilità di una terapia antipiretica, il paracetamolo viene tuttora utilizzato in terapia intensiva.

Un innalzamento della temperatura superiore a 38,3°C, ma inferiore a 39,5°C [78], non è infatti associato a maggiore mortalità in un paziente critico [77], a differenza di una condizione di ipotermia (con temperatura corporea inferiore a 36,5°C) [19] [20].

Tuttavia, in condizioni di sepsi, un innalzamento della temperatura corporea può comportare diversi effetti nocivi per il paziente: maggior consumo di O₂, con incremento dello stress ossidativo per la produzione di ROS, aumento del metabolismo basale, della frequenza respiratoria, possibile comparsa di aritmie o convulsioni con conseguenti lesioni neurologiche.

Studi condotti su modelli animali hanno messo in luce il ruolo protettivo di tale farmaco contro il danno ossidativo e nei confronti delle lesioni renali correlate ad alti livelli di emoglobina libera e rabdomiolisi [65]. In questi esperimenti, infatti, in seguito al trattamento con acetaminofene, si riscontrava un calo nei livelli ematici di F2-Isoprostano e creatinina ed un miglioramento della clearance renale [65].

Si ritiene che ciò avvenga grazie alla azione inibitoria sulle ciclossigenasi (COX), che induce una riduzione della sintesi di Prostaglandina I₂ (PGI₂, con attività antiaggregante e vasodilatatoria) ma non di tromboxanoA₂ (TXA₂ - potente vasocostrittore e pro-trombogeno [66].

Questo effetto può determinare un disequilibrio dell'omeostasi endovascolare con aumento della vasocostrizione e dell'aggregazione piastrinica [57].

Tuttavia, si ritiene che l'azione vasodilatatoria dell'NO, la cui sintesi aumenta grazie alla stimolazione del paracetamolo nei confronti della Ossido Nitrico sintetasi Inducibile, possa compensare lo sbilanciamento [66].

Sono state successivamente studiati in modo simile anche le variazioni dei livelli di F2-isoprostani e la funzionalità renale in uno studio [72] condotto in doppio cieco su pazienti settici febbrili dopo trattamento con paracetamolo per tre giorni. I marker ossidativi presentavano una riduzione durante il secondo giorno di osservazione, seguita da un ritorno ai livelli precedenti; mentre la funzionalità renale manteneva il miglioramento acquisito anche in seguito al termine della terapia studiata. Questo avvalora l'ipotesi di un effetto antiossidante di questo farmaco, seppure temporaneo.

Ulteriori studi hanno rilevato una correlazione tra livelli elevati di emoglobina libera circolante ed aumento della mortalità, la quale risultava invece ridotta in un altro gruppo di pazienti nei quali un trattamento con paracetamolo aveva determinato un calo nei livelli ematici di di F2-isoprostano (marker di stress ossidativo) [72].

4.3. Caratteristiche del farmaco

Farmacocinetica

L'emivita del paracetamolo è circa 1,5 a 2,5 ore negli adulti, maggiore in bambini e neonati, il volume di distribuzione è di circa 0,8 l/kg.

La massima concentrazione plasmatica (C_{max}) del farmaco si verifica 30-60 minuti dopo somministrazione per os, ed al termine dell'infusione endovenosa che dura 15 minuti (T_{max} = 0,25h). il legame della molecola alle proteine plasmatiche si aggira intorno al 10%-25%, raggiungendo il 40% qualora la concentrazione ematica del farmaco sia elevata oltre il range terapeutico, ovvero in caso di intossicazione.

L'eliminazione dei metaboliti glucoronidati e solfatati, prodotti a livello epatico avviene per la maggior parte per via urinaria, in seguito all'immissione nel torrente ematico per mezzo dei *solute carrier transporters (SLC)*, e successivamente al trasporto mediante ABCC3 (*ATP-binding cassette*) transporter che li veicola fino al rene; ed in misura minore tramite la bile, grazie ai carriers ABCC2 and ABCG2. È stato rilevato un aumento dei trasportatori di efflusso in situazioni di intossicazione da paracetamolo.

Effetti avversi e interazioni farmacologiche

Dosi superiori a 4g/die inducono saturazione delle vie metaboliche di espulsione del farmaco, con conseguente deficit di glutathione, accumulo di NAPQI, e quindi danneggiamento degli epatociti.

Un considerevole aggravamento dell'epatotossicità si verifica in concomitanza con l'assunzione di altri farmaci induttori del CYP3A4, come fenitoina, fenobarbitale, isoniazide.

Metabolismo

Coinvolgendo prevalentemente il distretto epatico, eliminazione del paracetamolo si verifica soprattutto mediante coniugazione, che permette l'aumento dell'idrofilicità del metabolita e pertanto ne facilita l'espulsione attraverso la via urinaria. Questo processo

metabolico comprende la glucuronidazione(che coniuga il 52%-57% del farmaco presente nell'organismo a concentrazioni terapeutiche), e la solfatazione(30%-40%). Una piccola quota di farmaco(5%-10%) viene processata tramite deacetilazione oppure ossidazione. Quest'ultima è attuata dalla famiglia dei CYP450, con formazione di N-acetilbenzochinonemina o NAPQI. In condizioni di sovradosaggio del farmaco, ovvero a dosi superiori rispetto a 4g/die, si verifica saturazione del processo di solfatazione, e potenziamento della glucuronidazione e dell'ossidazione, con diminuzione della quantità netta eliminata di farmaco.

A dosaggi maggiori, anche il processo di glucuronazione subisce un arresto, a causa della deplezione di glutathione disponibile nella cellula. In condizioni normali, infatti, questo antiossidante, nella sua versione ridotta GSH, viene coniugato dalla *glutathione-S-transferases (GSTs)* con l'acetamnofene, ed in seguito ossidato (GSSG) permettendo il legame dell'acetaminofene con una molecola di Cisteina (APAP-cys), con la quale viene espulso. Venendo a mancare questo ultimo meccanismo descritto, l'unico processo di metabolizzazione del farmaco è quello ossidativo, che produce NAPQI, altamente reattivo, il quale si combina con i gruppi cisteinici delle proteine mitocondriali e dei canali ionici, causandone un cospicuo danneggiamento. Questo porta all'alterazione della catena respiratoria mitocondriale, con deplezione di energia, nonché ad alterazioni elettrolitiche intracellulari, fino alla citonecrosi epatocellulare. Anche obesità, steatosi epatica e digiuno prolungato possono favorire la preponderanza di questa via metabolica. La somministrazione di precursore del glutathione, l'N-acetilcisteina, rappresenta l'antidoto al sovradosaggio di paracetamolo [74].

5. La correlazione tra acetaminofene, microcircolo ed emoglobina libera

Lo stress ossidativo rappresenta una delle componenti fondamentali della disfunzione microcircolatoria all'interno della sepsi, come recenti evidenze scientifiche mettono in luce e come è stato più dettagliatamente esposto all'interno della trattazione riguardante la fisiopatologia della sepsi.

Nel contesto dello stress ossidativo, la funzione dell'emoglobina libera circolante ha recentemente acquisito sempre più importanza, sia per quanto concerne la gravità di tale disfunzione, sia per ciò che riguarda la clinica, nonché all'interno della fisiopatologia della sepsi stessa e della prognosi del paziente settico.

La presenza in circolo di tale molecola comporta infatti molteplici effetti che vanno a peggiorare l'assetto microcircolatorio e metabolico del paziente settico. In particolare, si riscontrano: un calo della disponibilità di NO [6], importante vasodilatatore, con conseguente vasocostrizione e peggioramento dell'irrorazione tissutale da vasocostrizione secondaria; un aumento dei fenomeni infiammatori eme correlati [18], la presenza di danno cellulare diretto [35] nonché, all'aumentare delle concentrazioni di free Hb, danno multi organo[53] [5], peggioramento dell'outcome ed aumento della mortalità [31], specialmente se associati ad un deficit di aptoglobina ed emopexina, due proteine coinvolte nella rimozione della emoglobina libera e dell'eme dal circolo periferico [5].

È stato pertanto preso in considerazione un utilizzo del dosaggio plasmatico dell'emoglobina libera come indicatore dell'entità del danno ossidativo microcircolatorio e, di conseguenza, del grado di disfunzione microcircolatoria.

Sono già presenti alcuni studi che avvalorano tale intuizione: ad esempio, uno studio condotto su pazienti che avevano ricevuto emotrasfusioni, mostra una associazione tra un aumento dei livelli plasmatici di emoglobina libera circolante ed una notevole riduzione della Total Vessel Density, indicatore della densità di perfusione microcircolatoria (e pertanto della disfunzione microcircolatoria) [7].

Un altro studio ha inoltre associato la presenza di elevati livelli plasmatici di emoglobina libera con un *outcome* più sfavorevole e con un aumento della mortalità intraospedaliera [5].

In seguito a questi studi, di conseguenza, è stato ipotizzato l'uso nella pratica clinica del dosaggio dell'emoglobina plasmatica come fattore prognostico indipendente di sopravvivenza nel paziente settico [8].

Parallelamente al danno ossidativo causato dall'emoglobina libera, è stato studiato il ruolo potenzialmente antiossidante del paracetamolo.

In particolare, sono state studiate le variazioni dei livelli di marcatori di danno ossidativo in relazione alla somministrazione di paracetamolo in pazienti settici [72].

La riduzione dei livelli di tali molecole, strettamente correlata alla presenza del farmaco in circolo (in quanto i suoi livelli si innalzavano nuovamente in seguito alla sospensione della terapia [72]), e la riduzione della mortalità di tale coorte di pazienti, costituiscono un punto di partenza per ulteriori studi riguardanti le proprietà antiossidanti del farmaco.

È stato inoltre ipotizzato un possibile effetto protettivo della somministrazione di paracetamolo come inibitore di danno ossidativo eme-mediato.

Tale riscontro è stato osservato in pazienti settici con livelli plasmatici di emoglobina libera rilevabili, ed esposto in un lavoro di Janz et al. [9]:

Lo studio di cui tratta questa tesi prende dunque in considerazione la capacità antiossidante del paracetamolo: il miglioramento (o la variazione in termini di outcome clinico e prognostico) apportato ad un quadro di sepsi da parte del paracetamolo è valutato mediante l'osservazione dei parametri strumentali microcircolatori, ed in primo luogo della densità di vasi perfusi, nonché dei livelli di free Hb, assunti come indicatori dell'entità del danno ossidativo e della disfunzione microcircolatoria.

Il suddetto studio utilizzerà i principali parametri di analisi del microcircolo sublinguale e quelli ottenuti mediante Near Infrared Spectroscopy (NIRS).

Le valutazioni sono state effettuate a trenta minuti e a due ore dalla somministrazione di paracetamolo nei pazienti con sepsi o shock settico febbrile, e comprendono la ricerca di variazioni cliniche, laboratoristiche e microcircolatorie.

Lo studio su cui verte questa tesi prende inoltre in considerazione, tra gli obiettivi secondari, il dosaggio di PD-1/PD-L1 e la correlazione tra l'espressione di PD-1/PD-L1 e lo sviluppo di danno d'organo polmonare. Tale ipotesi è sorta in seguito al riscontro di un aumento delle molecole coinvolte nella immunodepressione e trasmissione di segnali di morte cellulare programmata PD -1/PD-L1 (Programmed Death-1 related molecole) associata ad un aumento nei livelli di ROS. Questo ha permesso di ipotizzare un possibile utilizzo di questo marker come indice di severità della sepsi, nonché un suo coinvolgimento nel danno d'organo polmonare sepsi indotto [104-106].

Il suddetto studio include inoltre l'indagine riguardante i polimorfismi genetici degli enzimi responsabili del metabolismo del paracetamolo, correlati alla variabilità individuale nella risposta al farmaco in termini di farmacocinetica e farmacodinamica.

Questa tesi verterà principalmente sui risultati microcircolatori, sugli aspetti macrodinamici e sul dosaggio laboratoristico dei markers di stress ossidativo della intera coorte di 50 pazienti reclutati

6. Obiettivi dello studio

Lo studio è incentrato sulla ricerca di variazioni nei principali parametri di analisi del microcircolo sublinguale nei pazienti settici febbrili a 30 minuti e a due ore di distanza dalla somministrazione di paracetamolo. Lo studio si propone inoltre di valutare i livelli plasmatici di emoglobina libera e di marcatori di danno ossidativo nel paziente settico, pre e post infusione di un dosaggio terapeutico di paracetamolo (1 gr e.v. in infusione lenta) negli stessi pazienti.

Obiettivo primario

L'obiettivo primario è rappresentato dal miglioramento della Perfused Vessel Density (PVD) dopo 30minuti dal termine dell'infusione di paracetamolo.

Obiettivi secondari

Gli obiettivi secondari studiano invece gli effetti a 30 minuti e 2 ore dal termine della somministrazione di paracetamolo. Essi contemplano:

- la perfusione del microcircolo sublinguale, per cui sono stati analizzati parametri che indicano, oltre che la qualità del flusso, anche la quantità di vasi presenti, in termini di densità vasale totale (ovvero quanti vasi del microcircolo sono presenti nell'unità spaziale), densità dei vasi perfusi (ovvero quanti vasi con una buona qualità del flusso sono presenti nell'unità spaziale), percentuale dei vasi perfusi (quanti sono i vasi con una buona perfusione in termini percentuali), eterogeneità del flusso (misura della variabilità del flusso a seconda della zona analizzata) e qualità del flusso;

- l'ossigenazione tissutale e la reattività del microcircolo, studiate a livello dell'eminanza tenar della mano mediante tecnica NIRS. Essa prevede un test di occlusione vascolare effettuato gonfiando un bracciale a livello dell'avambraccio ed una successiva valutazione della curva di desaturazione tissutale a livello dell'eminanza tenar (indice della capacità di consumo di ossigeno dei tessuti a valle dell'occlusione). A seguire, e dopo un breve periodo di tempo, è previsto il ripristino del circolo a valle della cuffia ed un monitoraggio della

curva di risaturazione tissutale, che indica la reattività del microcircolo. Tale test è completamente non invasivo, privo di rischi e non doloroso per il paziente.

- l'andamento dei livelli plasmatici della free Hb

- il dosaggio di markers ossidativi come F2-isoprostano, F2-isoflurano e perossidi, markers di danno del glicocalice come sindecan-1, heparasulfate e acido ialuronico, markers del danno endoteliale come endotelina-1 e infine dosaggio plasmatico di NO, glutathione ridotto, aptoglobina ed emopexina.

- il glicocalice endoteliale, valutato a livello del microcircolo sublinguale.

- il dosaggio di PD-1/PD-L1 e la relazione tra espressione di PD-1/PD-L1 e sviluppo di danno d'organo polmonare;

- i livelli plasmatici del paracetamolo;

- la ricerca di polimorfismi genetici specifici atta ad identificare una variabilità individuale alla risposta al farmaco in termini di farmacocinetica e farmacodinamica.

Disegno dello studio

Studio prospettico osservazionale.

Durata dello studio

12 mesi

Criteri di inclusione

Pazienti con sepsi, sepsi severa o shock settico (seconda definizione di sepsi) con elevata temperatura corporea che, a giudizio clinico, necessitano di somministrazione di paracetamolo a scopo antipiretico.

Criteri di esclusione

- Età < 18 anni
- Gravidanza
- Emodialisi
- Emolisi franca del campione ematico
- Uso del paracetamolo nelle 12 ore precedenti
- Condizioni inficianti la possibilità di ottenere un monitoraggio del microcircolo sublinguale (gravi traumi maxillo-facciali, impossibilità alla sublussazione della mandibola, abbondanti perdite ematiche o secrezioni dal cavo orale)

Sede

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

Numero di pazienti

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

7. Materiali e metodi

La fase di reclutamento di questo studio prospettico osservazionale è iniziata a luglio 2017, e si è conclusa nel 2018.

I partecipanti allo studio sono stati reclutati, in base ai criteri di inclusione e di esclusione, tra i pazienti con sepsi o shock settico che, in base alla valutazione clinica, avrebbero beneficiato di trattamento con paracetamolo.

Dopo essere stati inclusi nello studio, i pazienti sono stati valutati clinicamente, mediante il calcolo dei principali score clinici, quali, SOFA, SAPS II, APACHE, necessari per i successivi calcoli statistici e per il paragone con le rilevazioni successive. Sono stati inoltre registrati i dati anagrafici ed anamnestici. Nel dettaglio:

- Età

- Sesso;
- Peso
- sede dell'infezione, nota o sospetta;
- risultati degli esami microbiologici
- Procalcitonina ed eventuale terapia antibiotica in atto.
- Emocromo completo;
- Indici di funzionalità e necrosi epatica;
- Indici di funzionalità renale e andamento della diuresi;
- Comorbidità acute e croniche;
- Eventuale presenza di supporto circolatorio con vasopressori
- presenza monitoraggio emodinamico, con indicazione dei parametri monitorati (Cardiac Index [CI], Globale End Diastolic Index [GEDI], Extravascular Lung Water Index [ELWI], Systemic Vascular Resistance Index [SVRI], Stroke Volume Variation [SVV]).

sono stati predefiniti tre timepoints di valutazione, rispettivamente nominati t0 (baseline, prima della somministrazione di paracetamolo), t1 (a distanza di 30 minuti dal termine dell'infusione del farmaco), t2 (a distanza di 2 ore dal termine dell'infusione). Per ognuno dei tre timepoints è stata effettuata la registrazione di:

- Temperatura
- Principali parametri emodinamici, ovvero:
 - pressione arteriosa sistolica, diastolica e media,
 - frequenza cardiaca,
 - Cardiac Index [CI],
 - Globale End Diastolic Index [GEDI],
 - Extravascular Lung Water Index [ELWI],
 - Systemic Vascular Resistance Index [SVRI],
 - Stroke Volume Variation [SVV])
- PEEP e FiO2 nei pazienti con VM.
- Microcircolo sublinguale attraverso metodica IDS;
- NIRS e VOT test;

- Livelli sierici di paracetamolo;
- Risultati dell'emogasanalisi arteriosa e venosa centrale;
- farmacofluidoterapia ed antibioticoterapia in atto.

Solo ai tempi T0 e T2, inoltre, sono stati prelevati dei campioni ematici, prontamente centrifugati a 4000 giri per 10 e 15 minuti rispettivamente per il campione plasmatico e per il campione sierico, conservati poi a -80°C. presso la Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università Politecnica delle Marche. é stato inoltre prelevato un unico campione di sangue intero per ogni paziente, anch'esso congelato a -80°C per lo studio dei polimorfismi genetici, che ha richiesto l'estrazione del DNA genomico dei campioni.

Il dosaggio plasmatico della Emoglobina libera è stato ottenuto attraverso metodica colorimetrica.

I marker di danno endoteliale ed ossidativo (sindecàn-1, glypican-3, NO, endotelina) e i livelli plasmatici del complesso PD1/PDl1 sono stati analizzati attraverso saggi immunologici eseguiti con tecnica ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) e lettura spettrofotometrica

7.1 L'analisi del microcircolo

In ciascun timepoint è stata effettuata la valutazione del microcircolo sublinguale dopo pulizia del cavo orale da residui di saliva e sangue. Sono stati effettuati video presso 3-5 differenti siti della mucosa sublinguale, di durata standardizzata, mediante IDF (CytocamTM, Braedius Medical, Huizen, The Netherlands).

A seguire, una volta scelti i 3 video più adeguati per ciascuna rilevazione, essi sono stati analizzati online grazie al software AVA 3.2 (Automated Vascular Analysis Software, Microvision Medical BV, Amsterdam, The Netherlands).

I parametri microcircolatori valutati, in accordo con quanto previsto dalla roundtable di esperti nel 2007, sono stati:

- De Backer score e Total Vessel Density (TVD), indici della densità vasale;
- Proportion of Perfused Vessels (PPV) e Perfused Vessel Density (PVD), indici rispettivamente della percentuale e della densità dei vasi perfusi.
- il Microvascular Flow Index (MFI) come indice della qualità del flusso;
- Flow Heterogeneity Index (FHI), indice dell'omogeneità della distribuzione del flusso.

È stata inoltre effettuata la valutazione della StO₂ mediante NIRS applicata sull'eminanza tenar; è stato utilizzato il device InSpectra™ Model 650, e, a seguire, per l'analisi dei dati, il software versione 3.03 InSpectra Analysis Program. In particolare, sono state prese in considerazione le seguenti variabili:

- StO₂ basale,
- THI,
- StO₂ downslope StO₂ upslope,
- AUC StO₂

8. Analisi statistica

Per l'analisi statistica della popolazione campione è stato utilizzato il software IBM SPSS statistic, Versione 17.0. Le rilevazioni di $p < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative.

È stata impostata una prima parte di statistica descrittiva del campione raccolto, sia in ingresso in terapia intensiva, che in fase di arruolamento nel protocollo di studio. Sono quindi stati introdotti metodi di statistica inferenziale adeguati alla numerosità del campione ed alle variabili dello studio. La distribuzione campionaria delle variabili di studio è stata valutata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov.

I risultati sono stati quindi presentati come media e Standard Deviation (SD) o mediana ed Inter Quartile Range (IQR) o numero e percentuale (%). È stata impostata una analisi univariata per confronto tra variabili indipendenti (test T di Student o Mann Whitney U test) e una analisi per misure ripetute per il confronto del medesimo parametro nei diversi

timepoints pre-determinati dal protocollo di studio (test di Friedman della varianza per ranghi con Dunn's post-hoc test). Per il confronto tra variabili nominali è stato utilizzato il test del χ^2

9. Risultati

Lo studio ha previsto l'arruolamento di 50 pazienti ricoverati presso la Clinica di Anestesia e Rianimazione Generale, Respiratoria e del Trauma Maggiore dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona nell'intervallo temporale compreso tra luglio 2017 ed agosto 2018.

L'età media della popolazione campione è di 57 anni (15,95), la maggior parte dei pazienti reclutati (40 su 50) è di sesso maschile (80%).

Parametri all'ingresso	Valore
Età, anni	57,59 $\pm$ 15,95
Peso, kg	90,90 $\pm$ 19,41
Maschi, n	40 (80%)

Tabella 1a 1. Descrittiva della popolazione in studio, con i principali parametri registrati all'ingresso in ICU. I dati sono riportati come media $\pm$ Deviazione Standard, numero %.

Il ricovero in Terapia intensiva si è verificato nel 46% dei pazienti (23) per politrauma, nel 16% dei pazienti (8) per sepsi, nel 14% dei casi per cause respiratorie e con uguale frequenza per cause neurologiche (emorragico ischemiche). Due pazienti sono stati ricoverati per Arresto cardiocircolatorio (4%); 3 pazienti per altre cause (6%). Inoltre, 36 pazienti presentavano comorbidità maggiori in concomitanza con la patologia per la quale erano ricoverati.

Diagnosi all'ammissione	Numero di pazienti-frequenza	Percentuale rispetto al campione totale
Politrauma	23	46%
Sepsi	8	16%
Respiratorio	7	14%
Neurologico (emorragico/ ischemico)	7	14%
ACC	2	4%
Altro	3	6%
Comorbidity maggiori	36	72%

Tabella 2 descrittiva della popolazione in studio: diagnosi all'ammissione in terapia Intensiva. Dati riportati come frequenza e valore percentuale. ACC: arresto cardiocircolatorio

All'ingresso, la mediana del SAPS II score registrato era pari a 47 [36-50], il valore mediano dell'APACHE score era equivalente a 16 [11-23] il SOFA score mediano 10 [7-11]

Score registrato	Mediana (range interquartile)
SAPS score	47 [36-50]
APACHE II score	16 [11-23]
SOFA score	10 [7-11]

Tabella 3 Descrittiva della popolazione in studio, con i valori degli score registrati all'ingresso dei pazienti in terapia intensiva. I valori sono indicati come mediana [IqR]. SAPS II = Simplified Acute Physiology Score II; APACHE = Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment.

Nel 62% dei pazienti è stata accertata la presenza di infezione (31 pazienti); nel 38% dei casi l'infezione era invece sospettata (19pz).

La sede d'infezione interessata nei pazienti del campione con maggiore frequenza è quella respiratoria, presente nel 46% dei pazienti (23). la seconda sede per frequenza interessata dall'infezione è quella genitourinaria (16%, con 8 pazienti interessati), nel 28% dei pazienti non è stato possibile identificare la sede di infezione;

Sede dell'infezione	Numero di pazienti- frequenza	Percentuale rispetto al campione totale
Respiratoria	23	46%
Addominale	2	4%
Genito-urinaria	8	16%
Ematica	2	4%
Altro	1	2%
Sconosciuta	14	28%

Tabella 4 descrittiva della popolazione in studio:, riguardante la sede d'infezione. I dati sono riportati come frequenza e valore percentuale.

Per quanto riguarda la tipologia dell'infezione, è stata riscontrata un'infezione polimicrobica in 9 pazienti (18%); un'infezione virale in 2 pazienti (4%), mentre gli esami microbiologici sono risultati negativi in 14 pazienti (28% del campione totale). In 9 pazienti (18%) è infine stata rilevata la presenza di germi multi resistenti.

	T0 baseline	T1 (a 30 minuti dal termine dell'infusione)	T2 (a 2 h dal termine dell'infusione)	P value test di Friedman	P value Dunn's post hoc test
PVDs	17,52 [14,88-19,35]	19,18 [16,94-21,03]	19,11 [16,79-21,25]	0,026	0,032 [t1-t0]
PVDt	18,59 [16,20-20,64]	20,16 [18,13-22,76]	20,20 [18,03-23,00]	0,009	0,007 [t1-t0]
TVDs	18,11 [16,37-20,21]	19,67 [17,31-21,97]	20,09 [17,26-22,60]		
TVDt	19,62 [17,50-21,78]	21,54 [18,68-23,35]	21,28 [18,46-24,09]		
DeBacker	11,17 [9,83-12,95]	12,09 [10,28-12,96]	12,08 [10,74-13,14]		
				<0,001	0,001 [t1-t0]
MFI _s	2,75 [2,58-2,91]	2,91 [2,75-3,00]	2,91 [2,75-3,00]		0,011 [t2-t0]
MFI _t	3,00 [3,00-3,00]	3,00 [3,00-3,00]	3,00 [3,00-3,00]		
PPVs	93,79 [90,51-97,45]	97,53 [95,38-98,83]	96,46 [94,01-98,68]	0,002	0,002 [t1-t0]
				0,001	<0,001 [t1-t0]
PPV _t	94,75 [90,63-97,57]	97,61 [95,70-98,94]	96,53 [94,39-98,76]		0,024 [t2-t0]

Tabella5. Descrittiva della popolazione in studio. Sono riportati i parametri microcircolatori valutati nei tempo t0, t1 e t2. I dati sono riportati come mediana [IqR]. Test di Friedman con Dunn's post-hoc test; significatività per $p < 0.05$. TVD = Total Vessel Density, MFI = Microvascular Flow Index, PVD = Perfused Vessel Density, PPV = Proportion of Perfused Vessels, TVD: total vessel density, s=small vessels; t=total vessels (small+medium)

La tabella 5 riassume i risultati dei principali parametri indagati a livello del microcircolo sublinguale. Al test di Kolmogorov-Smirnov, i parametri hanno mostrato una distribuzione campionaria prevalentemente non gaussiana. Pertanto i relativi dati vengono riportati come mediane e range interquartili [IqR].

Il confronto per misure ripetute, è stato per tale motivazione effettuato attraverso test di Friedman della varianza per ranghi con Dunn's post-hoc test nei 3 timepoints prescelti.

La densità vascolare totale, definita dai due parametri TVD of small and total vessels, ha mostrato un trend in lieve aumento tra t0, t1 e t2. Tale variazione non è risultata significativa al test di Friedman.

I valori relativi alla percentuale di vasi perfusi, misurati sui vasi di piccolo calibro, ovvero PVDs (Perfused Vessel Density) e PPVs (Proportion of Perfused Vessels) aumentano in modo statisticamente significativo dopo la somministrazione del farmaco.

Rispettivamente, PVD s ha mostrato una significatività al test di Friedman con $p=0.026$, con Dunn's post hoc test significativo nel confronto tra T1 e T0 con $p=0.032$. (PVDs a t1= 19,18 [16,94-21,03] mm/mm²) versus PVDs a t0=17,52 [14,88-19,35] mm/mm²).

PPVs ha dimostrato una significatività elevata nel confronto per misure ripetute con $p=0.002$ del test di Friedman, e Dunn's post-hoc test positivo nel confronto t1-t0 ($p=0.002$) (T1=17,52 [14,88-19,35]% versus T0=93,79 [90,51-97,45]%).

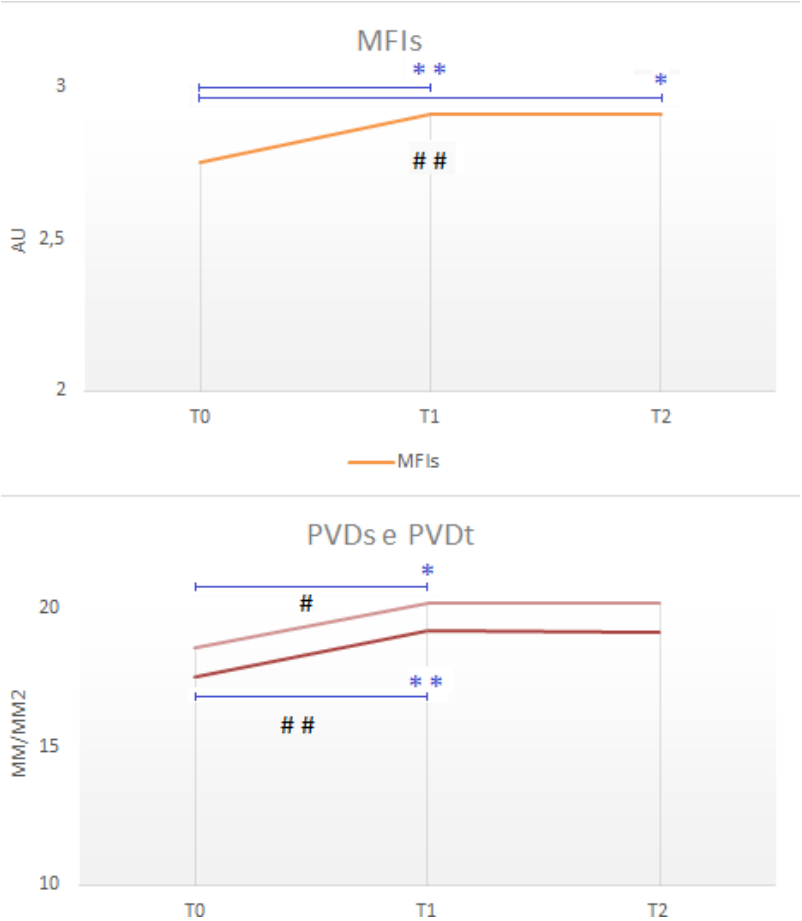
Allo stesso modo, è stato rilevato un aumento statisticamente significativo, dopo il trattamento con paracetamolo, del valore di MFI (Microcirculatory Flow Index, indice di flusso microcircolatorio, ovvero di qualità del microcircolo) relativo ai vasi di piccolo calibro. (T0=2,75 [2,58-2,91]; T1= 2,91 [2,75-3,00]; T2=2,91 [2,75-3,00]). Il test di Friedman applicato a tali misurazioni ne attesta la significatività statistica, con $p<0,001$; il Dunn's post-hoc test mostra significatività sia tra i valori tra t1 e t0, con $p=0,001$, sia tra t2 e t0, con $p=0,011$.

Il valore totale di PPV (T0=94,75 [90,63-97,57]; T1= 97,61 [95,70-98,94]; T2=96,53 [94,39-98,76]), in maniera simile a quanto rilevato per i vasi di piccolo calibro, mostra un significativo aumento; il test di Friedman risulta positivo per tali valori, con $p=0.001$.

Il confronto tra i valori di PPVt tra t1 e t0 con Dunn's post-hoc test ne certifica la significatività statistica, con $p<0.001$, come pure il confronto tra t2-t0, correlato ad una $p=0.024$.

Il valore di PVD totale (comprendente sia i vasi di piccolo, che di medio calibro) (T0=18,59 [16,20-20,64]; T1=20,16 [18,13-22,76]; T2=20,20 [18,03-23,00]) mostra al Friedman test $p=0.009$, mentre al Dunn's post-hoc test per il confronto tra t1 e t0 mostra $p=0.007$.

Il valore dell’MFI dei vasi di medio e grosso calibro ed il De Backer score non risultano avere variazioni statisticamente significative nel tempo





- # Friedman for RM; $p < 0.05$
- ## Friedman for RM; $p < 0.01$
- * Dunn's post-hoc test; $p < 0.05$
- ** Dunn's post-hoc test; $p < 0.01$

	T0(baseline)	T1 (30 min dal termine dell'infusione)	T2 (2 ore dal termine dell'infusione)	P value Testdi Friedman	P value Dunn's post-hoc test
StO2	83,00 [76,00-89,00]	85,00 [79,00-89,00]	83,80 [78,00-87,00]		
Downslope totale	-9,26 ['-13,17; '-6,09]	-9,56 ['-12,13; '-4,90]	-9,08 [-12,26; '-5,75]		
Downslope 1	-9,88 ['-11,86; '-7,64]	-10,40 ['-11,43; '-7,54]	-9,71 ['-12,08; '-8,42]		
Downslope 2	-9,01 ['-14,95; '-2,31]	-7,65 ['-13,67; '-2,32]	-7,57 ['-12,86; '-3,36]		
Delta Downslope	0,03 ['-2,00; 3,32]	0,59 ['-2,44; 4,96]	1,86 ['-0,93; 4,90]		
Upslope	165,93 [112,50-212,18]	172,14 [118,36-227,14]	191,82 [141,27-232,50]	0,047	0,043 [t2-t0]
AUC StO2	11,60 [7,40-18,10]	10,30 [6,40-15,60]	11,20 [7,50-20,90]		
THI	10,40 [8,50-12,90]	10,70 [9,40-14,50]	10,60 [9,10-13,50]	0,003	0,004 [t2-t0] 0,028 [t1-t0]

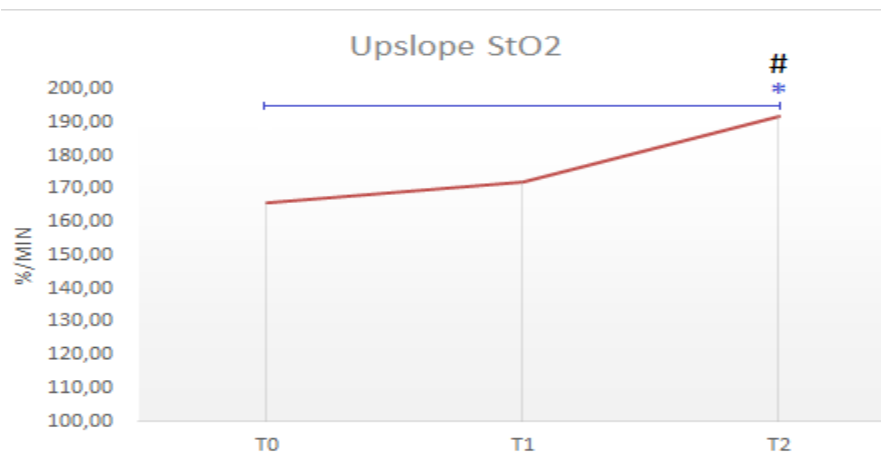
Tabella 6. Descrittiva della popolazione in studio. Principali parametri microcircolatori rilevati mediante studio con tecnica NIRS (Near InfraRed Spectroscopy) StO2 = saturazione tissutale di ossigeno, THI = tissue hemoglobin index, AUC = Area Under the Curve of StO2, mm/mm2 = millimetro su millimetro quadrato, 1/mm = unità su millimetro

La tabella 6 Mostra invece i risultati relativi all'analisi delle variabili ottenute attraverso studio NIRS con VOT (Vascular Occlusion Test).

I valori rilevati all'analisi condotta mediante tecnica NIRS mostrano in primo luogo un incremento significativo del'upslope STO2(t0=165,93 [112,50-212,18], t1=172,14 [118,36-227,14], t2=191,82 [141,27-232,50]), che presenta p=0,047 al test di Friedman e p=0,043 al Dunn's post-hoc test nel confronto trat2 e t0.

Inoltre, il valore di THI (Tissue Haemoglobin Index) (t0=10,40 [8,50-12,90], t1=10,70 [9,40-14,50], t2=10,60 [9,10-13,50]) presenta una variazione statisticamente significativa con p=0.003 e significatività pesata nel confronto t2-t0 (p=0.004) e tra t1 e t0 (p=0.028)

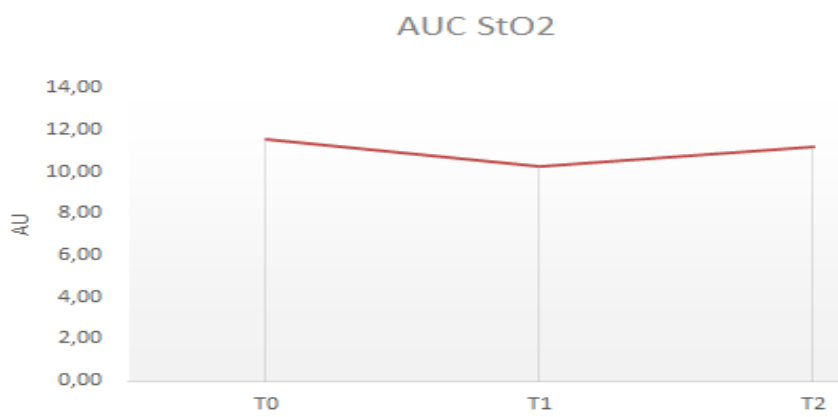
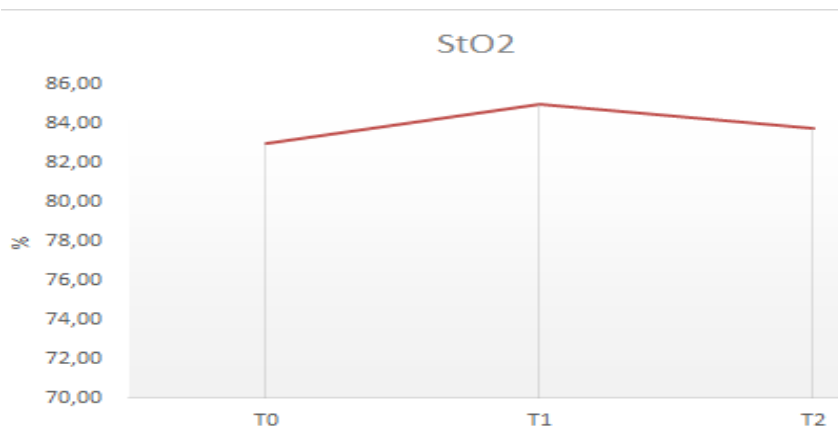
Al contrario, i parametri StO2, downslope StO2, AUC non vanno incontro a variazioni statisticamente significative nel confronto tra tempi

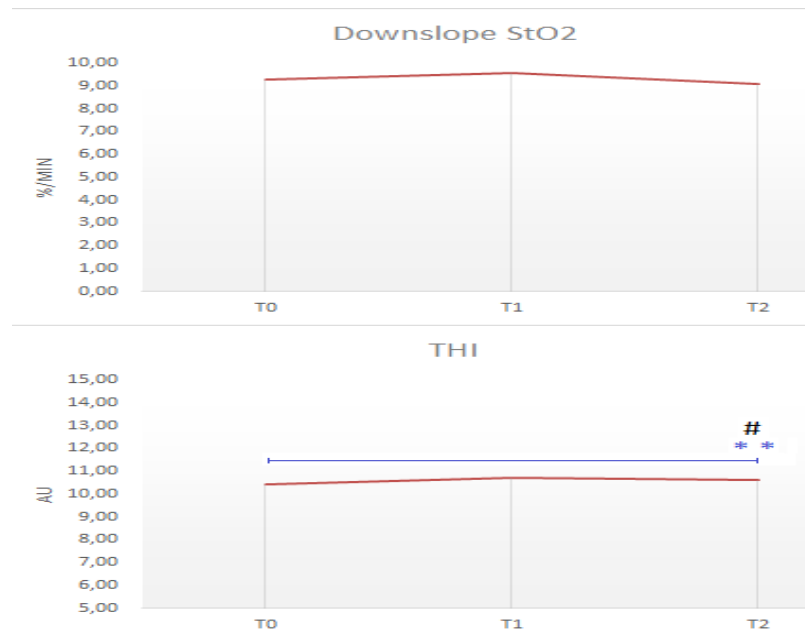


Friedman for RM; $p < 0.05$

* Dunn's post-hoc test; $p < 0.05$

** Dunn's post-hoc test; $p < 0.01$





L'analisi dei livelli dei marcatori sierici è stata effettuata dopo aver diviso i pazienti in base al raggiungimento dell'obiettivo primario, ovvero il miglioramento della PVD small a 30 minuti dalla iniziale somministrazione di paracetamolo.

	Pre somministrazione di paracetamolo	Post somministrazione
Free_Hb, mg/ml	1,74 [1,22-2,93]	2,01 [1,43-2,94]
Syndecan-1, ng/ml	1,53 [0,21-4,14]	1,60 [0,25-4,16]
Endotelina, pg/ml	20,64[5,03-35,91]	19,85 [4,19-35,13]
NO, µg/ml	50,87 [24,46-141,10]	67 [21,87-140,25]
Glypican-3, ng/ml	1,50 [0,32-4,09]	1,18 [0,42-3,81]
PD1/PD11, ng/ml	0,23 [0,07-0,70]	0,28 [0,07-0,67]

Tabella 7. descrittiva dei valori dei marcatori sierici misurati prima e dopo la somministrazione di paracetamolo

Nel gruppo di pazienti in cui è stato rilevato un miglioramento della PVDs, sono stati riscontrati valori plasmatici di free Hb a t2 (dopo 2 ore dalla iniziale somministrazione di paracetamolo) significativamente inferiori ($p=0.048$ al Mann Whitney U test) rispetto al gruppo in cui non era stato rilevato un miglioramento microcircolatorio dopo 30 minuti dall'infusione del farmaco. In quest'ultimo gruppo, inoltre, è stato rilevato un aumento della free Hb, tuttavia non statisticamente significativo al test di Friedman. Si tratta infatti di un numero ridotto di soggetti.

	Pre somministrazione di paracetamolo	Post somministrazione
Free_Hb PVD non migliorata in mg/ml	1,60 [1,05-3,63]	2,53 [1,92-3,49]
Free_Hb PVD migliorata in mg/ml	1,78 [1,27-2,87]	1,80 [1,17-2,49]

Tabella 8. descrittiva dei valori di emoglobina libera prima e dopo la somministrazione di paracetamolo e della relativa differenza (delta) nei due gruppi di pazienti in base alla risposta microcircolatoria

È stata in seguito calcolata la variazione dei livelli di ciascun marker (delta), sottraendo il valore rilevato in T2 a quello rilevato in T0, al fine di correlare tali risultati alle variazioni di PVDs dei due diversi gruppi.

	Pre somministrazione	Post somministrazione	Delta
Syndecan_PVDs non migliorata	1,42 [0,40-3,60]	1,40 [0,26-3,34]	-0,09 [-0,38;-0,05]
Syndecan_PVDs migliorata	1,53 [0,15-4,19]	2,14 [0,24-4,60]	0,09 [-0,11; 0,44]
NO_PVDs non migliorata	49,92 [28,21-114,62]	78,40 [35,68-152,48]	10,87 [-7,92; 37,86]
NO_PVDs migliorata	53,84 [23,42-173,68]	60,96 [20,14-122,50]	-4,00 [-33,41;18,91]
Endotelina_PVDs non migliorata	18,01 [9,84-33,95]	24,08 [5,20-32,59]	
Endotelina_PVDs migliorata	21,33 [4,73-37,43]	15,28 [3,23-38,30]	

Tabella 9. descrittiva dei valori dei marcatori sierici syndecan e NO prima e dopo la somministrazione di paracetamolo e della relativa differenza (delta) nei due gruppi di pazienti in base alla risposta microcircolatoria: PVDs non migliorata in modo statisticamente significativo e PVDs migliorata in modo statisticamente significativo

Dalla suddetta analisi sono emersi i seguenti risultati.

- Il syndecan tende ad aumentare nel gruppo in cui è stato riscontrato un miglioramento della PVD, mentre tende a diminuire nell'altro gruppo. Al confronto del delta tra i due gruppi la differenza è statisticamente significativa con $p=0.037$ al Mann Whitney U test, tuttavia il test di Friedman applicato ai due gruppi non risulta statisticamente significativo.
- Non sono presenti variazioni statisticamente significative dell'endotelina
- Per quanto riguarda l'NO, è possibile evidenziare un incremento del valore mediano di NO plasmatico a t2 rispetto a t0 ma tale variazione non risulta statisticamente significativa

Il confronto dei delta-NO tra i due gruppi di pazienti differenti in base alla variazione di PVD, mostra un trend in riduzione dell'NO plasmatico nel gruppo nel quale la PVD aumenta, e al contrario un aumento del livello di NO nel gruppo in cui la PVD si riduce (delta-NO -4,00 [(-)33,41-18,91] versus 10,87 [(-)7,92. 37,86]µg/ml), variazione non statisticamente significativa al Mann-Whitney U test

Confrontando le due variabili nominali PVDs e NO(aumento t2-t0 si/no) con un test del χ^2 i due parametri risultano inversamente correlati in modo statisticamente significativo con una $p=0.044$

10. Discussione

Il microcircolo è ritenuto il motore della sepsi.[3]

Le sue alterazioni fisiopatologiche, infatti, sono tra i fattori principali alla base della alterazione sistemica che si manifesta in tale condizione clinica.

Il quadro di disfunzione microcircolatoria è identificato da una perdita di coerenza emodinamica, ovvero da una mancata risposta in termini di miglioramento del microcircolo alle manovre rianimatorie, che si contrappone al ripristino delle variabili macroemodinamiche entro valori fisiologici [58].

Ciò comporta una disomogenea riduzione della perfusione [58] ed una redistribuzione del flusso a livello micro vascolare, con aree normalmente perfuse ed aree ischemiche, che vanno a peggiorare il danno d'organo già presente nel paziente settico [75].

Tra le cause della disfunzione microcircolatoria è presente lo stress ossidativo, dovuto ad una ingente presenza di radicali liberi [69] derivati dalle reazioni dell'NO (liberato massivamente dall'iNOs stimolata dalla disregolazione della risposta immunitaria tipica della sepsi) con l'ossigeno, dalla disfunzione mitocondriale conseguente all'ipossia, e dall'aumentata attivazione dei polimorfonucleati [54].

L'aumento dei livelli di ROS supera la capacità dei sistemi scavenger enzimatici e determina perossidazione lipidica, la quale, in concomitanza con la perdita di fluidi, la depressione miocardica, e la perdita del tono vascolare [43] causa una compromissione dell'efficacia dei meccanismi di regolazione del flusso ematico a livello del microcircolo [39].

Nel contesto del danno indotto dallo stress ossidativo in corso di sepsi, si è recentemente affermato il ruolo dell'emoglobina libera come probabile concausa di tale effetto.

In corso di sepsi, infatti, è stato riscontrato un aumento dell'emolisi intravascolare [31], la quale, correlata alla saturazione dei sistemi scavenger, tra cui in particolare quello dell'aptoglobina, determina un importante aumento dei livelli di emoglobina extracellulare [6].

Il distacco del gruppo eme dalla componente globinica, all'interno del torrente circolatorio,

provoca l'innesco di reazioni radicaliche, con formazione di specie reattive dell'ossigeno e perossidazione lipidica [5].

Inoltre, l'emoglobina interagisce in modo rapido e irreversibile con l'NO, determinando un'importante riduzione dei livelli di tale molecola [6]. Invece che un miglioramento in termini di riduzione dello stress ossidativo NO mediato, a ciò consegue una vasocostrizione massiva, la quale a sua volta implica danneggiamento endoteliale [35], danno multiorgano [5], peggioramento dell'outcome e aumento della mortalità [31].

Le suddette premesse inducono a ipotizzare che lo stress ossidativo causato dall'emoglobina libera possa danneggiare ulteriormente il microcircolo già severamente compromesso in corso di sepsi, ed addirittura la prognosi del paziente.

Tra le molecole potenzialmente in grado di contrastare il danno da radicali liberi presente in corso di sepsi, è stato recentemente preso in considerazione il paracetamolo.

Recenti studi hanno evidenziato un possibile effetto protettivo dell'acetaminofene contro l'azione dei radicali liberi in quadri caratterizzati da elevati livelli ematici di emoglobina libera circolante, come la sepsi, lo shock settico, ma anche il bypass cardiopolmonare e la rabdomiolisi [102].

Si ipotizza che il potere antiossidante del paracetamolo sia correlato ad una sua interazione con le COX [66] e dall'interazione con il sito catalitico dell'emoglobina ferrica [65].

Un lavoro di Botaud et al. ha identificato alcuni meccanismi mediante i quali questo farmaco sembra esplicare la sua azione antiossidante [65]. Dai risultati di tale studio emerge infatti che il farmaco è in grado di sequestrare i radicali ferrilici e globinici generati dall'emoglobina libera, prevenendo così la reazione a catena di perossidazione lipidica ed il danno ossidativo alle membrane cellulari.

Tuttavia le potenzialità del paracetamolo non si fermano alla riduzione dello stress ossidativo, ma sembrano comprendere molteplici ambiti fisiopatologici.

Si ritiene che il paracetamolo sia in grado di indurre un incremento dell'attività o dell'espressione dell'enzima Ossido Nitrico Sintetasi endoteliale [66], determinando così un aumento della disponibilità di NO, la quale andrebbe dunque a contrastare, bilanciare o

superare la riduzione dei livelli di tale mediatore causata dal sequestro da parte della emoglobina libera.

Visto il ruolo centrale dello stress ossidativo nella genesi della disfunzione microcircolatoria in corso di sepsi e constatata la presenza di molteplici studi suggestivi di una potenziale riduzione da parte del paracetamolo dello stress ossidativo causato dall'emoglobina libera, è stato ipotizzato che la somministrazione di tale farmaco in corso di sepsi possa associarsi ad un miglioramento del quadro microcircolatorio. Tale ipotesi è alla base dello studio oggetto di questa tesi, che è andato ad esaminare l'effetto del paracetamolo sul microcircolo.

L'obiettivo principale di questo studio prospettico osservazionale che ha incluso 50 pazienti adulti, ricoverati in ICU per sepsi, è stato quello di studiare se sia presente un miglioramento della Perfused Vessel Density of small vessels (PVDs) indice di qualità del microcircolo, a 30 minuti dal termine dell'infusione di paracetamolo, somministrato su giudizio clinico a scopo antipiretico in dose standard per tutti i pazienti. Sono stati inoltre studiati gli altri parametri microcircolatori.

Gli obiettivi secondari dello studio vertevano in primo luogo sull'ipotesi di un miglioramento dell'ossigenazione tissutale e della reattività del microcircolo analizzati mediante tecnica NIRS, con test di occlusione vascolare (VOT) effettuato a livello della muscolatura dell'eminanza tenar con bracciale sfigmomanometrico.

In secondo luogo, tra gli obiettivi secondari era presente anche lo studio dell'andamento dei livelli plasmatici dei marcatori di danno endoteliale ed ossidativo.

L'obiettivo primario dello studio è stato pienamente soddisfatto: infatti è stata dimostrata, perlomeno nella nostra popolazione campione, una variazione statisticamente significativa della PVD of small vessels, prevalentemente in termini di qualità di perfusione del microcircolo sublinguale (PVDs, MFIs, PPVs), dopo somministrazione di paracetamolo,

piuttosto che di densità vascolare totale dello stesso (identificata dal parametro Total Vessel Density for small vessels). Il lieve incremento di questa variabile riscontrato dopo l'infusione del farmaco, non risulta infatti statisticamente significativo.

Nell'ambito degli obiettivi secondari, il ripristino della perfusione distrettuale, dopo il test di occlusione vascolare, a parità di riserve di ossigeno e di risposta anaerobica, ha mostrato un aumento statisticamente significativo dell'upslope StO₂, che suggerisce che si sia verificato un miglioramento della reattività del microcircolo tissutale dopo somministrazione del paracetamolo.

Il miglioramento statisticamente significativo della perfusione microcircolatoria e della reattività micro vascolare post ipossica, potrebbero essere in primo luogo attribuiti all'azione vasodilatatoria del paracetamolo, componente fondamentale della capacità antipiretica del farmaco, per la quale esso è ampiamente utilizzato nella pratica clinica [66] [74].

Tuttavia, normalmente, tale azione si esplica a livello sistemico, con vasodilatazione generalizzata e con un aumento della perfusione di tutti i vasi. Pur non essendo presenti in letteratura dati definitivi sull'effetto di questo farmaco sul microcircolo sublinguale, è possibile ipotizzare che un effetto puramente vasodilatatorio andrebbe a modificare prevalentemente i due parametri di densità vascolare totale (TVD e De Backer score). Nel nostro studio, invece, dopo la somministrazione di paracetamolo, non si è riscontrato un aumento statisticamente significativo della perfusione totale, sebbene si sia registrato un trend in aumento della TVDs.

Questa discrepanza tra gli effetti sulla componente microcircolatoria e quella macrocircolatoria inducono a pensare che, oltre all'azione vasodilatatoria del farmaco, sicuramente presente anche a livello microvascolare, esso agisca su tale distretto anche mediante meccanismi differenti.

Nello studio retrospettivo osservazionale condotto dal gruppo di Janz et al., i pazienti trattati con paracetamolo hanno dimostrato sul piano clinico una minore mortalità,

associata sul piano laboratoristico ad una riduzione del marker di lipoperossidazione lipidica F2-isoprostano e non è stata riportata una effettiva variazione di emoglobina libera dopo la somministrazione del farmaco [9].

Lo studio randomizzato controllato di Janz et al. ha paragonato invece in maniera prospettica due gruppi di pazienti settici con livelli di emoglobina libera dosabile a livello ematico, di cui un gruppo ha ricevuto paracetamolo orale 1gr ogni 6 ore per un totale di tre giorni, mentre il secondo gruppo ha ricevuto soluzione placebo con lo stesso schema posologico.

I risultati di tale studio hanno mostrato, al secondo giorno, livelli di markers di danno ossidativo inferiori nel gruppo che aveva ricevuto il farmaco, rispetto all'altro [72].

Il riscontro di una riduzione dei marcatori di danno ossidativo dopo somministrazione di paracetamolo in presenza di livelli rilevabili di emoglobina libera, mostrato nei suddetti studi, ed il miglioramento del microcircolo rilevato dopo la somministrazione del medesimo farmaco, sempre in concomitanza con concentrazioni dosabili di emoglobina libera, registrato nel nostro studio, sembrano confermare l'ipotesi posta inizialmente, secondo la quale l'acetaminofene potrebbe essere in grado di apportare un miglioramento del microcircolo riducendo lo stress ossidativo causato dall'emoglobina libera.

Questo risultato sembra essere ulteriormente confermato dalla maggiore reattività tissutale post ipossica evidenziata al test di NIRS, in assenza di ulteriori variazioni della curva di desaturazione post VOT, né nella StO₂ al baseline.

Saranno sicuramente necessarie ulteriori indagini al riguardo, volte a confermare o approfondire tale risultato.

Anche nel nostro studio è stata condotta una prima analisi dei marcatori di danno ossidativo ed endoteliale, che ha evidenziato una estrema variabilità dei parametri, con il riscontro di trend di variazione degli stessi, senza tuttavia importanti significatività statistiche.

In linea con i risultati dei sopracitati lavori di Janz et al., era attesa una riduzione dei livelli

ematici dei markers di danno endoteliale in seguito alla somministrazione di paracetamolo. Al contrario, al Mann Whitney U test è stato riscontrato un significativo aumento di tale parametro nel gruppo in cui la PVDs risulta migliorata. Ciò potrebbe essere attribuibile ad un maggiore rilascio della molecola in circolo a partire dai vasi ripperfusi, piuttosto che ad un aumento del reale danno microvascolare, ovvero ad un incrementato rilascio di molecole prodotte precedentemente in un momento di maggiore criticità. Tuttavia, si auspicano ulteriori indagini a tale riguardo.

L'endotelina, un altro marcatore di danno endoteliale, non mostra variazioni statisticamente significative.

L'analisi di laboratorio riguardante l'NO mostra invece risultati sorprendenti, che danno adito ad ulteriori speculazioni e che dovranno essere successivamente approfonditi.

Esponiamo di seguito un conciso resoconto delle informazioni note finora derivate dalla letteratura scientifica sul conto di tale marcatore.

In corso di sepsi si verifica una iperproduzione di tale marcatore, dovuta alla iperespressione di iNOS causata dall'infiammazione [30], tale iperproduzione determina vasodilatazione generalizzata e stress ossidativo causato dalla reazione della molecola con l'ossigeno.

È altresì noto l'effetto scavenger dell'emoglobina libera nei confronti della molecola, azione che tuttavia non agisce riducendo la produzione di radicali liberi mediata dall' NO (o forse sì, ma tale riduzione è irrilevante nei confronti dell'importante quota di specie reattive dell'ossigeno causata dall'emoglobina libera), ma bensì si estrinseca in un importante antagonismo contro la vasodilatazione NO indotta, con conseguente vasospasmo [6] [53].

È stato inoltre dimostrato che il paracetamolo agisce nei confronti di iNOs, stimolando l'enzima a produrre maggiori quantità di NO [66]. Tale effetto è stato incluso tra i meccanismi che potrebbero spiegare l'azione vasodilatatoria del farmaco, ipotizzando che possa essere in grado di contrastare anche il vasospasmo indotto dall'azione antagonista

dell'emoglobina libera sui livelli della medesima molecola.

In un quadro di sepsi con disfunzione microcircolatoria e con presenza di emoglobina libera in cui venga somministrato paracetamolo, ci si potrebbe aspettare di rilevare un aumento della disponibilità di NO. Tuttavia dal nostro studio emerge una statisticamente significativa riduzione di tale molecola associata ad un miglioramento del microcircolo. Come spiegare tale risultato?

La prima ipotesi che emerge è quella secondo la quale il sequestro dell'NO da parte della free Hb sia molto maggiore rispetto all'aumento di disponibilità di NO causato dalla disfunzione microcircolatoria settica e dall'azione del paracetamolo. In altre parole sembra che l'azione del farmaco non sia sufficiente a superare l'effetto scavenger dell'emoglobina libera sull'NO, e quindi non sia in grado, al netto, di aumentarne la disponibilità.

Tuttavia nel gruppo in cui non c'è stata una risposta in termini di miglioramento microcircolatorio, è stato registrato un aumento dei livelli di NO, sebbene non statisticamente significativo.

Tale dato appare in contrasto con le evidenze scientifiche finora validate, ed incoraggia una futura ulteriore indagine a riguardo.

La modalità di prelievo dei campioni ematici, la preparazione e la conservazione degli stessi, l'analisi attraverso metodica immunoenzimatica risultano idonee agli obiettivi predefiniti dello studio, e è nostra opinione che non abbiano potuto intaccare la veridicità degli stessi. Non è possibile però escludere interferenze sui risultati dovute alla elevata labilità e degradabilità dei markatori non proteici come l'NO.

Prendiamo ora in considerazione i motivi che, all'interno del nostro studio, potrebbero aver determinato tale riscontro, nonché la mancanza di significatività statistica nelle misurazioni di laboratorio.

Innanzitutto è importante ricordare l'ampia variabilità della popolazione studiata dal punto di vista del gruppo demografico, della storia clinica, della tipologia, sede e fase di

infezione, nonché al fatto che la somministrazione di paracetamolo è stata effettuata mediante dose standard, e non indicizzata per ibm o superficie corporea.

In una futura e più approfondita valutazione di tali risultati, potrebbe essere utile separare i pazienti in base al tipo di patologia all'ingresso in terapia intensiva ed alla gravità clinica ed analizzare le casistiche all'interno di tali sottogruppi

In secondo luogo, è opportuno tenere in considerazione il fatto che i pazienti, essendo ricoverati in una rianimazione di terzo livello, sono probabilmente gravati da un altro bias clinico non modificabile: è ipotizzabile che sia stato selezionato un gruppo di pazienti più grave rispetto alla popolazione media di pazienti settici afferenti alle terapie intensive generali.

Inoltre, una parte dei pazienti inseriti dello studio, pur non avendo assunto paracetamolo nel lasso temporale delle precedenti 12 ore, era stata comunque trattata con il farmaco già precedentemente. Potrebbe essere ipotizzabile quindi che questo fattore abbia modificato la risposta microcircolatoria e sistemica al farmaco, rendendo meno evidenti (o comunque differenti) alcune delle risposte.

Infine, è possibile ipotizzare che si sia verificata una sottostima della numerosità campionaria della popolazione di studio, che era stata scelta sulla base dell'obiettivo primario (microcircolo sublinguale) e non dei livelli plasmatici di questi marcatori.

11. Conclusione

L'obiettivo primario dello studio era il riscontro di un miglioramento statisticamente significativo del parametro di Perfused Vessel Density for small vessels, PVDs, a 30 minuti dalla somministrazione di paracetamolo.

Tra gli obiettivi secondari dello studio vi erano un miglioramento della reattività tissutale post ipossica misurata mediante tecnica NIRSe l'analisi dei marcatori di stress ossidativo e danno endoteliale dopo somministrazione di paracetamolo. L'obiettivo primario è stato raggiunto, come pure quello secondario relativo all'analisi mediante NIRS. Si auspicano ulteriori ricerche riguardanti la correlazione tra l'andamento dei marcatori ematici di stress ossidativo, che all'interno di questo studio non hanno mostrato variazioni statisticamente significative, e la somministrazione di paracetamolo.

Bibliografia

1. M. Singer *et al.*, “The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)”, *JAMA*, vol. 315, no. 8, p. 801, Feb. 2016.
2. M. J. Hall, A. N. D. Williams, C. J. DeFrances, and A. Golosinskiy, “Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals”, *NCHS Data Brief*, no. 62, pp. 1–8, Jun. 2011.
3. C. Ince, “The microcirculation is the motor of sepsis”, *Critical Care*, vol. 9, no. Suppl4, pp. S13–S19, 2005.
4. Hartmann M, De Groot H. Cell-free hemoglobin: A new player in sepsis pathophysiology. *Critical Care Medicine*. 2013.
5. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;
6. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin A Novel Mechanism of Human Disease
7. Damiani E, Adrario E, Luchetti MM, Scorcella C, Carsetti A, Mininno N, et al. Plasma free hemoglobin and microcirculatory response to fresh or old blood transfusions in sepsis. *PLoS One*. 2015;10(5):1–15.
8. Vallet B. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. 2002;30(5):229–34
9. Janz DR, Bastarache JA, Peterson JF, Sills G, Wickersham N, May AK, et al. Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and mortality in patients with sepsis: An observational study. *Crit Care Med*. 2013;
10. IR. C. Bone *et al.*, “Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis”, *Chest*, vol. 101, no. 6, pp. 1644–1655, Jun. 1992.
11. C. A. Gogos, E. Drosou, H. P. Bassaris, and A. Skoutelis, “Pro- versus Antiinflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options”, *The Journal of Infectious Disease*, no. 181, Jan. 2000.
12. Robert A Balk “Systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Where did it come from and is it still relevant today?”, *Virulence*. Vol. 5(1), pag. 20–26, January 2014.
13. J. Vincent, “Dear Sirs, I’m sorry to say that I don’t like you”, *Critical Care Medicine*, vol. 25, no. 2, pp. 372–374, Feb. 1997.

14. F. L. Ferreira, D. P. Bota, A. Bross, C. Mélot, and J.-L. Vincent, “Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients”, *JAMA*, vol. 286, no. 14, pp. 1754–1758, Oct. 2001.
15. Levy M *et al.* “2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference”, *Intensive Care Med*, 29, pag. 530–538, March 2003.
16. C. W. Seymour *et al.*, “Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)”, *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 762–774, Feb. 2016.
17. The_Surviving_Sepsis_Campaign_Bundle__2018_Update.
18. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, Oliveira RB De. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. 2014;
19. Clemmer P. Terry *et al.* Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome.
20. Sunden-Cullberd J, Norrby-teglund A, Björk J, Inghammar M. Fever in the Emergency Department Predicts Survival of Patients With Severe Sepsis and Septic Shock Admitted to the ICU*. 2017;591–9.
21. A. Rhodes *et al.*, “Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016”, *Intensive Care Medicine*, vol. 43, no3, pp. 304–377, Mar. 2017.
22. R. Zadroga *et al.*, “Comparison of 2 Blood Culture Media Shows Significant Differences in Bacterial Recovery for Patients on Antimicrobial Therapy”, *Clin Infect Dis*, vol. 56, no. 6, pp. 790–797, Mar. 2013.
23. A. C, Uil D, Klijn E, Lagrand WK, Brugts JJ, Ince C, *et al.* The Microcirculation in Health and Critical Disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;51(2):161–70.
24. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;
25. Van Der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. 2008;8. Available from: <http://infection.thelancet.com>
26. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013;
27. J. Cohen, “The immunopathogenesis of sepsis”, *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp.885–891, Dec. 2002.
28. Shapiro NI, Arnold R, Sherwin R, O’Connor J, Najarro G, Singh S, *et al.* The association

- of near-infrared spectroscopy-derived tissue oxygenation measurements with sepsis syndromes, organ dysfunction and mortality in emergency department patients with sepsis *Crit Care*. 2011;15(5):R223.
29. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014
 30. Eddy Jean-Baptiste, MD, PhD, “ Cellular Mechanisms in Sepsis”, *J Intensive Care Med*., 22, pag.63-72, 2007
 31. Adamzik M, Hamburger T, Petrat F, Peters J, de Groot H, Hartmann M. Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Crit Care*. 2012;
 32. Nicholas S. Ward, MD Brian Casserly, MD and Alfred Ayala, PhD, “The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients”, *Clin Chest Med*, 29(4), pag.617, 2008.
 33. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2013.
 34. Kumar V. Dendritic cells in sepsis: Potential immunoregulatory cells with therapeutic potential. *Molecular Immunology*. 2018;
 35. Takamiya R, Hung C, Hall SR, Fukunaga K, Nagaishi T, Maeno T, et al. High-Mobility Group Box 1 Contributes to Lethality of Endotoxemia in Heme Oxygenase-1 – Deficient Mice. (17).
 36. R. S. Hotchkiss *et al.*, “Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction”, *Critical Care Medicine*, vol. 27, no. 7, pp. 1230–1251, Jul. 1999.
 37. A. M. Drewry, N. Samra, L. P. Skrupky, B. M. Fuller, S. M. Compton, and R. S. Hotchkiss, “Persistent Lymphopenia After Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality,” *Shock*, vol. 42, no. 5, pp. 383–391, Nov. 2014
 38. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014.
 39. Mervyn Singer, “The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure”, *Virulence*, 5:1, pag. 66-72, 2014.
 40. Q. Mastraghi *et al.*, “Skeletal Muscle and Lymphocyte Mitochondrial Dysfunctions in Septic Shock Trigger ICU-Acquired Weakness and Sepsis-Induced Immunoparalysis”,

Biomed. Res. Int., vol. 2017, 2017

41. Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. 2007;28(1):24–8.
42. T. W. Secomb and A. R. Pries, “The microcirculation: physiology at the mesoscale”, *Journal of Physiology*, vol. 589, no. Pt 5, pp. 1047–1052, Mar. 2011.
43. D. W. Landry and J. A. Oliver, “The Pathogenesis of Vasodilatory Shock”, *NewEngland Journal of Medicine*, vol. 345, no. 8, pp. 588–595, Aug. 2001.
44. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. 2001.
45. P. L. Sappington, R. Yang, H. Yang, K. J. Tracey, R. L. Delude, and M. P. Fink, “HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice”, *Gastroenterology*, vol. 123, no. 3, pp. 790–802, Sep. 2002.
46. H. G. Gomez *et al.*, “Immunological Characterization of Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome in Patients with Severe Sepsis: A Longitudinal Study”, *Critical Care Medicine*, vol. 42, no. 4, pp. 771–780, Apr. 2014
47. Zhao Y, Jia Y, Li C, Shao R, Fang Y. Predictive value of soluble programmed death-1 for severe sepsis and septic shock during the first week in an intensive care unit. 2016.
48. F. Gül, M. K. Arslantaş, İ. Cinel, and A. Kumar, “Changing Definitions of Sepsis”, *Turkish Journal of Anesthesiology and Reanimation*, vol. 45, no. 3, pp. 129–138, Jun. 2017
49. J.-L. Vincent *et al.*, “International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units”, *JAMA*, vol. 302, no. 21, pp. 2323–2329, Dec. 2009.
50. Backer D De, Creteur J, Preiser J, Dubois M, Vincent J. Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis. *Am J Respir Med Care*. 2002;166:98–104.
51. Tullius M V., Harmston CA, Owens CP, Chim N, Morse RP, McMath LM, et al. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc Natl Acad Sci*
52. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent J. Red blood cell rheology in sepsis. 2003;1052–61.
53. Gladwin MT, Kanas T, Kim-Shapiro DB. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2012. 74

54. Victor VM, Rocha M, De M. Immune cells : free radicals and antioxidants in sepsis. 2004;4:327–47.
55. Sakr Y, Dubois M, Backer D De, Creteur J, Vincent J. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. 2004;32(9):1825–31.
56. Backer D De, Donadello K, Sakr Y, Ospina-tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory Alterations in Patients With Severe Sepsis: Impact of Time of Assessment and Relationship With Outcome. (3):791–9.
57. Aronoff DM, Oates JA, Boutaud O, Arbor A. New insights into the mechanism of action of acetaminophen : Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H 2 synthases. :9–19.
58. Ince C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. Crit Care. 2015; 19 (Suppl3):S8. Available from: <http://www.ccforum.com/content/19/S3/S8>
59. Jhanji S, Stirling S, Patel N, Hinds CJ, Pearse RM. The effect of increasing doses of norepinephrine on tissue oxygenation and microvascular flow in patients with septic shock. 2009;37(6):1961–6.
60. Dubin A, Pozo MO, Casabella CA, Jr FP, Murias G, Moseinco MC, et al. Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow : a prospective study. 2009;13(3):1–8.
61. Koopmans M, Koetsier PM, Pilvinis V. Microcirculatory blood flow as a tool to select ICU patients eligible for fluid therapy. 2013;612–9.
62. Yasser Sakr et al. Microvascular response to red blood cell transfusion in patients with severe sepsis. 2007;35(7):1639–44.
63. Ince C, Boerma EC, Cecconi M, De Backer D, Shapiro NI, Duranteau J, et al. 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. 2018;44(3):281–99. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5070-7>
64. Meyer C, Heiss C, Drexhage C, Kehmeier ES, Balzer J, Mühlfeld A, et al. Hemodialysis-Induced Release of Hemoglobin Limits Nitric Oxide Bioavailability and Impairs Vascular Function. J Am Coll Cardiol. 2010;

65. Boutaud O, Moore KP, Reeder BJ, Harry D, Howie AJ, Wang S, et al. Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;
66. Trettin A, Böhmer A, Suchy M-T, Probst I, Staerk U, Stichtenoth DO, et al. Effects of Paracetamol on NOS, COX, and CYP Activity and on Oxidative Stress in Healthy Male Subjects, Rat Hepatocytes, and Recombinant NOS. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/212576>
67. M. J. Massey and N. I. Shapiro, “A guide to human in vivo microcirculatory flow image analysis”, *Critical Care*, vol. 20, no. 1, Dec. 2015.
68. C. A. den Uil *et al.*, “The Microcirculation in Health and Critical Disease”, *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 51, no. 2, pp. 161–170, Sep. 2008.
69. A. Donati, R. Domizi, E. Damiani, E. Adrario, P. Pelaia, and C. Ince, “From Macrohemodynamic to the Microcirculation”, *Crit Care Res Pract*, vol. 2013, 2013.
70. E. P. RIVERS *et al.*, “Early interventions in severe sepsis and septic shock: areview of the evidence one decade later”, *Minerva Anestesiologica*, vol. 78, no. 6, p.14, 2012.
71. M. Singer, “The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organfailure”, *Virulence*, vol. 5, no. 1, pp. 66–72, Jan. 2014.
72. Janz DR, Bastarache JA, Rice TW, Bernard GR, Warren MA, Wickersham N, et al. Randomized, placebo-controlled trial of acetaminophen for the reduction of oxidative injury in severe sepsis: The acetaminophen for the reduction of oxidative injury in severe sepsis trial. *Crit Care Med*. 2015;
73. S. A. Price, D. A. Spain, M. A. Wilson, P. D. Harris, and R. N. Garrison, “Subacute Sepsis Impairs Vascular Smooth Muscle Contractile Machinery and Alters Vasoconstrictor and Dilator Mechanisms”, *Journal of Surgical Research*, vol. 83, no.1, pp. 75–80, May 1999.
74. Mazaleuskaya LL, Sangkuhl K, Thorn CF, Fitzgerald GA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics*. 2015
75. D. Goldman, R. M. Bateman, and C. G. Ellis, “Effect of decreased O₂ supply on skeletal muscle oxygenation and O₂ consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 290, no. 6, pp. H2277–H2285, Jun. 2006.

76. C. Ince and M. Sinaasappel, "Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock", *Critical Care Medicine*, vol. 27, no. 7, pp. 1369–1377, Jul. 1999.
77. Young P, Saxena M, Bellomo R, Etal. Acetaminophen for Fever in Critically Ill Patients with Suspected Infection. 2016;1291–3.
78. Laupland K, Shahpori R, Kirkpatrick A, Al E. Occurrence and outcome of fever in critically ill adults. 2006;264–5.
79. Y. Sakr, M.-J. Dubois, D. De Backer, J. Creteur, and J.-L. Vincent, "Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock", *Critical Care Medicine*, vol. 32, no. 9, pp. 1825–1831, Sep. 2004.
80. E. Abraham and M. Singer, "Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction," *Critical Care Medicine*, vol. 35, no. 10, p. 2408, Oct. 2007.
81. J.-L. Vincent and D. De Backer, "Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis", *Critical Care*, vol. 9, no. Suppl 4, pp. S9–S12, 2005.
82. D. De Backer, J. Creteur, J.-C. Preiser, M.-J. Dubois, and J.-L. Vincent, "Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 166, no. 1, pp. 98–104, Jul. 2002
83. W. Groner *et al.*, "Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation", *Nat. Med.*, vol. 5, no. 10, pp. 1209–1212, Oct. 1999.
84. G. Aykut, G. Veenstra, C. Scorcella, C. Ince, and C. Boerma, "Cytocam-IDF(incident dark field illumination) imaging for bedside monitoring of the "microcirculation", *Intensive Care Medicine*, vol. 3, Jan. 2015.
85. Villar J *et al.* Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model.
86. J. Creteur, D. De Backer, Y. Sakr, M. Koch, and J.-L. Vincent, "Sublingual capnometry tracks microcirculatory changes in septic patients", *Intensive Care Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 516–523, Apr. 2006.
87. E. C. Boerma, P. H. J. van der Voort, P. E. Spronk, and C. Ince, "Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis", *Critical Care Med.*, vol. 35, no. 4, pp. 1055–1060, Apr. 2007.
88. E. C. Boerma, K. R. Mathura, P. H. J. van der Voort, P. E. Spronk, and C. Ince, "Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients:

- a prospective validation study”, *Critical Care*, vol. 9, no. 6, pp. R601-606, 2005.
89. E. C. Boerma, M. A. Kuiper, W. P. Kingma, P. H. Egbers, R. T. Gerritsen, and C. Ince, “Disparity between skin perfusion and sublingual microcirculatory alterations in severe sepsis and septic shock: a prospective observational study”, *Intensive Care Medicine*, vol. 34, no. 7, pp. 1294–1298, Jul. 2008.
 90. R. Bezemer, S. A. Bartels, J. Bakker, and C. Ince, “Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill - where do we stand?”, *Critical Care*, vol. 16, no. 3, p. 224, 2012.
 91. E. C. Boerma and C. Ince, “The role of vasoactive agents in the resuscitation of microvascular perfusion and tissue oxygenation in critically ill patients”, *Intensive Care Medicine*, vol. 36, no. 12, pp. 2004–2018, Dec. 2010.
 92. D. De Backer *et al.*, “How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference”, *Critical Care*, vol. 11, no. 5, p. R101, 2007.
 93. M. J. Massey *et al.*, “The microcirculation image quality score: Development and preliminary evaluation of a proposed approach to grading quality of image acquisition for bedside videomicroscopy”, *Journal of Critical Care*, vol. 28, no. 6, pp. 913–917, Dec. 2013.
 94. 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”, *Critical Care*, 20, 311, 2016.
 95. Donati, A. *et al.*, “Variations in near-infrared spectroscopy-derived oxygen downslope during a vascular occlusion test in critically ill patients: relationship with outcome.”, *Crit. Care*, 19, pag. 141, 2015.
 96. Lipcsey M, Woinarski NC, Bellomo R. Near infrared spectroscopy (NIRS) of the thenar eminence in anesthesia and intensive care. *Ann Intensive Care*. 2012;2(1):11.
 97. Creteur J, Carollo T, Soldati G, Buchele G, De Backer D, Vincent JL. The prognostic value of muscle StO₂ in septic patients. *Intensive Care Med*. 2007;33(9):1549–56.
 98. Skarda DE, Mulier KE, Myers DE, Taylor JH, Beilman GJ. Dynamic Near-Infrared Spectroscopy Measurements in patients With Severe Sepsis. *Shock*. 2007;27(4):348–53.

99. Shapiro NI, Arnold R, Sherwin R, O'Connor J, Najarro G, Singh S, et al. The association of near-infrared spectroscopy-derived tissue oxygenation measurements with sepsis syndromes, organ dysfunction and mortality in emergency department patients with sepsis. *Crit Care*. 2011;15(5):R223.
100. Aronoff DM, Oates JA, Boutaud O, Arbor A. New insights into the mechanism of action of acetaminophen : Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H 2 synthases. :9–19
101. Reiter CD, Wang X et al. Cell-free haemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Med*. 2002; :1383-1389
102. Vermeulen Windsant IC, Hanssen SJ et al. Cardiovascular surgery and organ damage: time to reconsider the role of hemolysis. *J Thor Card Surg* 2011; 142:1-11
103. Sepsis and septic shock: Guideline-based management
Siddharth Dugar, MD, Chirag Choudhary, MD, MBA and Abhijit Duggal, MD, MPH, MSc, FACP
Cleveland Clinic Journal of Medicine January 2020, 87 (1) 53-64; DOI: <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.18143>
104. Shao R, Fang Y, Yu H, et al. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3–4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Critical Care* 2016;20:124.
105. Tang L, Bai J, Chung CS et al. Active players in resolution of shock/sepsis induced indirect lung injury: immunomodulatory effects of Tregs and PD-1. *J Leukoc Biol*. 2014 Nov;96(5):809-20.
106. Monaghan S. F., Thakkar R. K., Heffernan D. S., Huang X., Chung C. S., Lomas-Neira J., Cioffi W. G., Ayala A. (2012) Mechanisms of indirect acute lung injury: a novel role for the coinhibitory receptor, programmed death-1. *Ann. Surg*. 255, 158–164
107. Krajcova A et al. Mechanism of paracetamol-induced hypotension in critically ill patients: a prospective observational cross-over study. 2013;26:136–41.
108. Figura 3 da: Donati, R. Domizi, E. Damiani, E. Adrario, P. Pelaia, and C. Ince, “From Macrohemodynamic to the Microcirculation”, *Crit Care Res Pract*, vol. 2013, 2013.
109. Figura 4: Perdita di coerenza emodinamica. Da Hemodynamic coherence and the

rationale for monitoring the microcirculation, Can Ince

110. Figura 5: la stessa area microcircolatoria visualizzata con Orthogonal Polarization spectral imaging (sinistra) e Side stream Dark field imaging (destra) da R. Bezemer, S. A. Bartels, J. Bakker, and C. Ince, "Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill - where do we stand?", *Critical Care*, vol. 16, no. 3, p. 224, 2012.
111. Figura 8: da 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", *Critical Care*, 20, 311, 2016.

Ringraziamenti

In primo luogo desidero ringraziare il Professor Donati per avermi permesso di frequentare il reparto di Anestesia e Rianimazione dell'ospedale di Torrette di Ancona e di svolgere questa tesi.

Un grande ringraziamento va inoltre alla Dottoressa Domizi, correlatrice di questa tesi, oltre che per le sue indicazioni tecniche, per la sua pazienza, per la sua gentilezza e per la sua disponibilità.

Ringrazio inoltre tutti i membri del personale della Clinica di Anestesia e Rianimazione, dai quali ho avuto il privilegio di apprendere moltissimo durante la mia permanenza in reparto.

Desidero altresì ringraziare i miei genitori, oltre che per avermi sostenuto moralmente ed economicamente durante il lungo percorso universitario, per avermi insegnato, con la loro visione realistica e razionale della vita, ad essere umile e non arrendermi mai.

Ringrazio inoltre mia sorella, le mie nonne, i miei parenti e tutti i miei amici per l'incoraggiamento e la fiducia che mi hanno sempre dimostrato.