



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

CORSO DI DOTTORATO IN MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE

XXXI CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Microtrombosi sinusoidale epatica indotta dal
lipopolisaccaride: ruolo protettivo della simvastatina in un
modello murino di endotossiemia**

ELEONORA LIGUORI

MATRICOLA R11222

TUTOR: Chiar.mo Prof. Francesco Salerno

Correlatore: Dott. Vincenzo La Mura

Coordinatore del Dottorato: Chiar.mo Prof. Emilio Berti

Anno Accademico

2017/2018

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	4
2. DISFUNZIONE ENDOTELIALE: DALLA PERDITA DEL CONTROLLO VASOMOTORIO A QUELLO EMOCOAGULATIVO DEL MICROCIRCOLO.....	7
2.1 <i>Coagulazione come meccanismo di danno epatico.....</i>	9
3. LE STATINE.....	12
3.1. <i>Chimica e farmacocinetica.....</i>	13
3.2. <i>Farmacodinamica e studi clinici.....</i>	16
3.3. <i>Effetti Pleiotropici.....</i>	17
4. COAGULOPATIE	20
5.1. <i>Fase Vascolare dell'emostasi.....</i>	25
5.2. <i>Fase Piastrinica dell'emostasi.....</i>	27
5.3. <i>Fase plasmatica dell'emostasi.....</i>	29
5.4. <i>Fibrinolisi.....</i>	30
5. IPOTESI E OBIETTIVI.....	35
5.1. <i>Ipotesi.....</i>	35
5.2. <i>Obiettivi.....</i>	36
6. DISEGNO DELLO STUDIO.....	37
6.1. <i>Condizioni Sperimentali.....</i>	37

7. MATERIALI.....	38
7.1. Modelli Animali.....	38
7.2. Farmaci/Sostanze.....	38
7.3. Esposizione a LPS/Veicolo.....	39
7.4. Trattamenti con SIMVASTATINA.....	39
8. METODI.....	40
10.1. Inclusioni in Paraffina.....	40
10.2. Colorazione Ematossilina/Eosina.....	41
10.3. Western Blot.....	43
10.4. Microscopia Elettronica.....	44
10.5. ROTEM.....	45
9. RISULTATI.....	48
9.1. Il sangue intero dei ratti esposti a LPS ha un minor potere coagulante contrastato dal pretrattamento con simvastatina.....	49
9.2. L'endotossitemia causa microtrombosi sinusoidale in parte prevenuta dalla simvastatina.....	49
9.3. L'LPS riduce la espressione endoteliale sinusoidale di TM e causa necrosi epato-cellulare: la simvastatina difende il microambiente antitrombotico e ritarda l'evoluzione del danno indotto da LPS.....	51
10. DISCUSSIONE.....	60
11. BIBLIOGRAFIA.....	66

ABSTRACT

Background: Liver dysfunction is one of the earliest high-risk markers for multi-organ failure (MOF) in patients with sepsis. In a recent study, using a murine model, we demonstrated that lipopolysaccharide (LPS) injection provokes hepatic microvascular dysfunction, associated with marked endothelitis in perisinusoidal areas. Furthermore, endothelial dysfunction drives vascular derangement and organ failure associated with sepsis. However, the consequences of sepsis on liver sinusoidal endothelial function are unknown. Statins might improve microvascular dysfunction in sepsis. The present study explores liver vascular abnormalities and the effects of statins in a rat model of endotoxemia.

Methods: For this purpose, lipopolysaccharide (LPS) or saline was given to: (1) rats treated with placebo; (2) rats treated with simvastatin (25 mg/kg, orally), given at 3 and 23 hours after LPS/saline challenge; (3) rats treated with simvastatin (25 mg/kg/24 h, orally) from 3 days before LPS/saline injection. Liver microvascular function was assessed by molecular studies and liver function tests.

Results: At 24 h, LPS induced liver endothelial dysfunction, as shown by a decreased of thrombomodulin and a increase of fibrin. Treatment with simvastatin from 3 days before LPS prevented the increase of fibrin.

Conclusions: LPS administration induces intrahepatic endothelial dysfunction that might be prevented by simvastatin, suggesting that statins might have potential for liver protection during endotoxemia

1.INTRODUZIONE

Il fegato è uno dei principali organi coinvolti durante una sepsi.¹ Si stima infatti che circa la metà dei pazienti con sepsi sviluppino una compromissione di quest'organo.² La comparsa di disfunzione epatica, inoltre, è un marcatore clinico di alto rischio per lo sviluppo di MOF (multi-organ failure) nei pazienti con sepsi. Nei soggetti non affetti da malattie epatiche croniche, in seguito ad ospedalizzazione per uno stato settico, un aumento della bilirubina nelle prime 48 ore dall'ingresso è un predittore indipendente di elevata mortalità.¹

In questo contesto, l'integrità del microcircolo gioca un ruolo importante nel mantenimento della perfusione e delle funzioni del parenchima epatico.³ L'endotossemia, dall'altro lato, è causa di disfunzione endoteliale, sia nei vasi di conduttanza che in quelli di resistenza, ossia nel microcircolo, con possibile compromissione degli organi fino ad un quadro di MOF.⁴ La somministrazione intraperitoneale di lipopolisaccaride (LPS) è considerato un affidabile modello murino di endotossemia. Ratti esposti a LPS sviluppano disfunzione endoteliale intraepatica che migliora con la somministrazione di simvastatina o inibendo la attività della ossido-nitrico sintasi inducibile (iNOS).^{5,6}

L'endotelio è il primo e più importante bersaglio degli eventi fisiopatologici indotti dalla sepsi⁷

In condizioni fisiologiche, le cellule endoteliali prevengono l'adesione piastrinica e l'attivazione della cascata coagulativa e regolano il tono e la permeabilità vascolare. Una attivazione o un danno dell'endotelio da parte di citochine o altri mediatori infiammatori conduce, al contrario, ad un'alterazione delle normali funzioni fisiologiche e modificazione della superficie cellulare in senso procoagulante (aumentata espressione di molecole di adesione ed aumentata sintesi di mediatori infiammatori, agenti chemiotattici e sostanze vasoattive).⁸

L'attivazione delle cellule endoteliali da parte di molteplici stimoli infiammatori (tra cui tumor necrosis factor α : TNF α) determina inoltre il rilascio del vWF accumulato all'interno dei corpi di Weibel-Palade (all'interno dei quali sono immagazzinati come forme ad alto peso molecolare, ULvWF, ultralarge von Willebrand factor). Il vWF ha un ruolo protrombotico e la sua funzionalità è tanto maggiore quanto più elevato è il suo peso molecolare. In condizioni fisiologiche, il ULvWF viene rapidamente clivato da ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs 13), minimizzando i suoi effetti proemostatici. Durante la sepsi, al contrario, si assiste ad un aumento dei livelli di ULvWF, potenzialmente legato ad aumento della sua sintesi e rilascio, oppure a diminuzione del suo catabolismo o ad entrambi i meccanismi.

Sebbene in corso di sepsi i livelli di ADAMTS-13 siano ridotti al 20-40% rispetto ai valori normali, valori inferiori al 10% di ADAMTS-13 sono sufficienti in condizioni basali a prevenire il manifestarsi delle complicanze microangiopatiche.^{9,10,11,12}

Nonostante ciò, i livelli di ADAMTS-13, anche se non così drasticamente diminuiti, potrebbero non essere sufficienti a bilanciare l'aumento di ULvWF che si verifica durante una sepsi. Dunque, sia la diminuzione di ADAMTS-13 che lo sbilanciamento tra la secrezione di ULvWF e l'attività di ADAMTS-13 potrebbero essere associati alla trombosi microvascolare a cui si assiste in corso di sepsi. Il rapporto ULvWF/ADAMTS-13, meglio espresso come vWF-pp/ADAMTS-13, è proporzionale alla severità della sepsi o dello shock settico e predice il rischio di sviluppo di insufficienza multiorgano.¹³ (vWF-pp: propeptide. Derivato dalla maturazione intracellulare del pro-vWF, viene accumulato nei corpi di Weibel-Palade insieme a ULvWF con rapporto 1:1)

Queste ripercussioni sulla coagulazione indotte dallo stato settico costituiscono il substrato clinico per promuovere studi atti a meglio descrivere il ruolo del microcircolo epatico nel determinare ipoperfusione di organo.

Lo squilibrio pro-trombotico, indotto dalla sepsi, potrebbe ulteriormente impattare in modo negativo la storia naturale del paziente cirrotico, già soggetto ad un fragile equilibrio emostatico (come conseguenza in sé della cirrosi).

.

2. LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE: DALLA PERDITA DEL CONTROLLO VASOMOTORIO A QUELLO EMOCOAGULATIVO DEL MICROCIRCOLO

L'endotelio svolge un ruolo importante nella regolazione della normale omeostasi e funzionalità d'organo. La fisiologia endoteliale si può semplificare in tre principali meccanismi, ovvero la regolazione della funzione vasomotoria, immunitario/infiammatoria ed emostatica, ognuna delle quali è in stretto rapporto con le altre.¹⁴

La disfunzione endoteliale comporta una perdita di queste funzioni e viene misurata come alterata compliance del letto vascolare all'aumento di dosi crescenti di acetilcolina. Può essere causata dalla cronica esposizione a stimoli chimici o fisici che vanno ad inficiare la fisiologica omeostasi dell'endotelio, ovvero creando uno squilibrio tra stimoli vasocostrittori e vasodilatatori, fattori promuoventi e inibenti la crescita, fattori pro e anti-aterogenici e fattori pro e anticoagulanti.¹⁵

Caratteristicamente la disfunzione endoteliale si associa anche a mancato controllo della coagulazione a livello del microcircolo. La trombomodulina è una proteina trans-membrana la cui espressione è segno di endotelio sano ¹⁶ e costituisce il principale meccanismo di controllo della emostasi a livello del microcircolo in condizioni di ipercoagulabilità plasmatica. In alternativa, una sua

ridotta espressione, può essere, di per sé, la causa di abnorme trombosi microvascolare con il conseguente risultato di una ridotta perfusione di organo, ischemia e necrosi tissutale.

2.1. Coagulazione come meccanismo di danno epatico

L'importanza della coagulazione come meccanismo di danno epatico ha visto negli ultimi anni un notevole impulso. Cerini et al hanno dimostrato, in modelli animali di fibrosi epatica (esposizione a CCl₄ e legatura della via biliare), che la somministrazione di eparina a basso peso molecolare si associa a diminuzione del grado di fibrosi (diminuendo l'attivazione delle cellule stellate da parte della trombina)¹⁷ e stimola la produzione di NO (ossido nitrico) da parte di eNOS, con effetto benefico sul tono vasomotorio sinusoidale. L'eparina a basso peso molecolare diminuisce, quindi, complessivamente le resistenze intraepatiche sia per quanto riguarda la componente meccanica legata alla fibrosi, sia per quanto riguarda la componente funzionale legata alla produzione di NO, e alla capacità dell'endotelio di accomodare le resistenze sinusoidali al flusso portale.¹⁸

Questa importante osservazione pre-clinica ha un corrispettivo anche da parte di studi clinici. Villa et al. hanno dimostrato che pazienti con cirrosi scompensata che ricevevano enoxaparina in monosomministrazione avevano una ridotta incidenza di trombosi portale de novo e, in parallelo, avevano un vantaggio in termini di outcome clinico¹⁹. A sostegno di tale osservazione La Mura et al. e Kalambokis et al. hanno dimostrato che lo squilibrio emostatico pro-coagulante misurato mediante test in vitro di generazione di trombina (endogenous thrombin potential, ETP) o mediante il rapporto tra FVIII, potente pro-coagulante, proteina C, potente anticoagulante, si associa a una peggiore prognosi nei pazienti cirrotici.^{20,21}

Recentemente il nostro gruppo ha anche dimostrato che pazienti cirrotici con trombosi portale che risolvono completamente il trombo dopo aver ricevuto terapia anticoagulante orale mediante antagonisti della vitamina K hanno un vantaggio in termini di sopravvivenza che è indipendente dal grado di severità della cirrosi stabilito dalle classi di rischio secondo lo score di Child-Pugh.

Tutte queste osservazioni, sperimentali e cliniche, sostengono l'idea che una attivazione emostatica in condizioni patologiche possa essere di per se stessa un meccanismo di danno epatico e sottolineano l'importanza di approfondire aspetti patogenetici legati al disturbo emocoagulativo in tutte le condizioni cliniche, acute e croniche, che possano coinvolgere il fegato.

Il limite degli studi fin qui citati, è che sono stati eseguiti nel contesto della cirrosi epatica e relazionati, da un punto di vista patogenetico con meccanismi di trombosi intraparenchimale/interstiziale responsabili dell'innescò di fibrosi su modelli cronici di malattia. Non è ancora ben noto invece quale sia il ruolo che la disfunzione endoteliale, e quindi la perdita delle proprietà anticoagulanti dell'endotelio sinusoidale, possa, di per sé, avere sul plasma, a livello del microcircolo, e conseguentemente sul danno necrotico da ipoperfusione in un contesto di insulto acuto come durante la endotossitemia in corso di sepsi. Sebbene infatti molti autori dedicati allo studio della sepsi parlino di trombosi del microcircolo (come nel corso di una CID, coagulazione intravascolare disseminata, o di qualsiasi altra forma di microangiopatia trombotica), rimangono ancora dei

quesiti aperti legati alla natura della trombosi in tali condizioni. Un quesito importante è per esempio la natura della trombosi nei termini classici di trombo bianco, coinvolgente in maniera preponderante la fase piastrinica, o di trombo rosso, coinvolgente principalmente la fase della cascata enzimatica emocoagulativa. Questa differenza può essere perseguita solo da un attento studio morfologico che vada a descrivere la precisa natura della trombosi, conosciuta la quale potrebbe essere più facile indirizzare strategie terapeutiche di tipo anticoagulante o antiaggregante a seconda del meccanismo maggiormente coinvolto nel fenomeno della ipoperfusione su base microtrombotica e della conseguente insufficienza di organo.

3. LE STATINE

Gli inibitori della 3-idrossi-3metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi (statine) sono farmaci ampiamente utilizzati per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari.

Le prime statine sono state isolate da una muffa, il *Penicillium Citrinium*.

Nel 1976 Endo e collaboratori riconobbero le statine come inibitori della sintesi di colesterolo. In particolare Brown et al., nel 1978, dimostrarono che l'azione delle statine nella sintesi di colesterolo era dovuta all'inibizione competitiva dell'enzima 3-idrossi-3metilglutaril coenzimaA (HMG-CoA) reduttasi. Quest'enzima porta alla formazione di mevalonato, una tappa limitante nella sintesi di colesterolo. Le statine in particolare si legano al sito attivo dell'enzima impedendo stericamente il legame del substrato naturale^{22,23}.

3.1 Chimica e farmacocinetica

La prima statina studiata nell'uomo fu la compactina, nota anche come mevastatina, che dimostrò il potenziale terapeutico di questa classe di farmaci, mentre la prima statina approvata per l'impiego nell'uomo fu la lovastatina. In seguito altre statine vennero approvate per l'utilizzo in terapia, come la pravastatina e la simvastatina. Queste quattro statine sono di derivazione naturale e hanno forti analogie strutturali²³.

Ora vi sono in commercio anche statine di derivazione sintetica come fluvastatina (la prima statina di origine interamente sintetica), atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. La cerivastatina è anch'essa di derivazione sintetica, ma dopo essere stata approvata, è stata ritirata dal mercato e non è attualmente disponibile per l'uso clinico.

L'elemento strutturale comune sia delle statine naturali, sia di quelle sintetiche è l'acido 3,5-diidrossi eptanoico o 3,5-diidrossi-2-eptenoico, a seconda che vi sia o meno un doppio legame in posizione 2. Questa catena può essere in forma aperta o ciclizzata lattonica, dove la funzione carbossilica e il gruppo idrossilico in 3 sono condensati. Le statine (come lovastatina e simvastatina) somministrate in forma lattonica sono profarmaci, necessitano cioè dell'idrolizzazione e dell'apertura dell'anello, che avviene nel tratto intestinale, per esplicare la funzione inibitoria; questa catena acida mima infatti il substrato dell'HMG-CoA reduttasi^{22,23}. Le

differenze strutturali tra le statine determinano le differenti caratteristiche nel rapporto lipofilia/idrofilia e nella potenza ²⁴. La somministrazione di una statina come lattone o come acido, cambia quindi la solubilità e la farmacocinetica del farmaco.

Le statine, infatti, per esplicare la loro azione, devono penetrare nella cellula attraversando la membrana plasmatica. Questo passaggio richiede una certa lipofilia del farmaco. Rosuvastatina e pravastatina non sono sufficientemente lipofile da riuscire a penetrare nella cellula, ma esplicano comunque la loro azione inibitoria a livello epatico in quanto sfruttano specifici sistemi di trasporto cellulare, come il trasportatore di anioni organici (OAT). Le differenze nell'attivazione, nella captazione, nonché nella possibile espulsione di questi farmaci dalla cellula, attraverso la proteina per la resistenza multipla ai farmaci (MDR-2), possono spiegare la variabilità degli effetti collaterali tessuto-specifici tra farmaci e individui ^{22,25}.

Le caratteristiche farmacocinetiche sono particolarmente importanti per spiegare l'attività farmacologica o valutare l'interazione con altri farmaci: ogni statina ha un profilo farmacocinetico peculiare, che ne caratterizza il profilo farmacodinamico.

L'assorbimento nella somministrazione per via orale varia da statina a statina e provoca un elevato metabolismo di primo passaggio nel fegato, che diminuisce la disponibilità plasmatica del farmaco al 5-20% della dose somministrata. Il legame alle proteine plasmatiche dei farmaci o dei metaboliti attivi è elevato (95%).

L'escrezione dei metaboliti avviene per il 70% a livello epatico con la bile. L'escrezione renale delle statine varia invece da statina a statina, da valori non valutabili, fino ad un 20-30% della pravastatina. L'emivita plasmatica è generalmente breve, ma questo non incide sull'effetto, poiché l'azione delle statine è svolta principalmente nel fegato, che viene raggiunto soprattutto grazie all'assorbimento enterico.

Recentemente è stata introdotta sul mercato una forma a rilascio prolungato di fluvastatina, che ne accentua l'effetto terapeutico, diminuendo la velocità di scomparsa del farmaco dall'organismo, che altresì si mantiene in concentrazioni efficaci per più tempo ^{22,23,25}.

3.2 Farmacodinamica e studi clinici

L'azione delle statine è legata in particolare alla diminuita sintesi di colesterolo nel fegato e al ridotto livello di colesterolo intracellulare negli epatociti, cui fa seguito una diminuita degradazione dei recettori per le LDL e soprattutto un aumento dell'espressione del gene per il recettore delle LDL attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione SREBP.

Questi eventi comportano l'aumento del numero di recettori per le LDL sulla superficie degli epatociti, con conseguente maggiore rimozione di LDL ed IDL dal sangue e diminuzione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL²³.

In questo modo le statine abbassano i livelli di LDL dal 20 al 70%, a secondo della dose, la quale correla linearmente con la diminuzione di colesterolo plasmatico. Le statine seguono la "regola del 5-7", cioè raddoppiando la dose, si ha un decremento dei livelli di LDL di un ulteriore 5-7%²⁵.

3.3 Effetti pleiotropici non colesterolo dipendenti

Le statine, secondo studi in vivo, migliorano la funzione endoteliale anche senza ridurre la colesterolemia: l'effetto pare mediato dalla stabilizzazione dell'mRNA e dall'attivazione post-trascrizionale della eNOS (nitrossido sintetasi endoteliale) che porta alla sintesi di NO e ad un aumentato flusso sanguigno. NO è responsabile di una serie di effetti quali vasodilatazione, inibizione dell'aterogenesi, inibizione dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica, attenuazione dell'apoptosi delle cellule endoteliali e promozione dell'angiogenesi. Sembra infatti che Rho sia un regolatore negativo della eNOS. Quindi una diminuita produzione di geranilgeraniolo a causa del blocco della sintesi del mevalonato potrebbe portare ad una diminuita attività di Rho, con conseguente aumento nell'attività di eNOS e aumentata produzione di NO.

Le statine agiscono sull'aumento dei livelli di antiossidanti naturali (glutazione, vitamina C, vitamina E), una ridotta produzione di ossigeno cellulare e una diminuita produzione di radicali liberi da parte di macrofagi e cellule endoteliali.

Anche in questo effetto il blocco della sintesi di mevalonato pare essere un fattore essenziale. Infine, anche l'effetto ipolipemizzante delle statine può ridurre

l'ossidabilità delle LDL, dal momento che LDL in circolo da più tempo risultano più suscettibili alla modificazione ossidativa^{22,23,24}.

Le statine esercitano anche un effetto antinfiammatorio a livello della placca sui monociti e macrofagi, riducendo l'espressione di molecole di adesione solubili nelle cellule endoteliali. Viene diminuito il rilascio di citochine, chemochine e di interleuchine infiammatorie e proaterogene, insieme ad una diminuzione di espressione e produzione di ciclossigenasi-2, che produce eicosanoidi infiammatori come prostaglandine e trombossani. Le statine si sono inoltre dimostrate in grado di ridurre i livelli di proteina C reattiva un marker di infiammazione sistemica, correlata con aumentato rischio per patologie coronariche, prodotto dal fegato in risposta a citochine come l'inteleuchina 6. L'mRNA e la stessa proteina C reattiva sono stati trovati anche in macrofagi e in cellule muscolari lisce. Rimane da stabilire se la proteina C reattiva sia solo un marker infiammatorio o se contribuisca alla patogenesi dell'aterosclerosi. Un'evidenza di quest'ultima ipotesi deriva da uno studio in cui la proteina C reattiva attiva i monociti favorendo l'adesione endoteliale. Le statine hanno svariati effetti, che non correlano con la diminuzione di colesterolo, su fattori protrombotici come il fattore tissutale, gli

inibitori del fattore tissutale, l'aggregazione piastrinica, la viscosità del sangue, il fibrinogeno e gli inibitori del plasminogeno; in particolare è stato notato un aumento della fibrinolisi in seguito al trattamento con statine. Inoltre il sangue di pazienti trattati con statine, ha dimostrato una riduzione nella formazione di trombi piastrinici ²²⁻²⁷. Vi sono infine prove di un'azione angiogenica delle statine ²⁸. Sappiamo dalla letteratura epatologica che la simvastatina, attraverso il Kruppel-like factor 2 (KLF-2) regola i geni dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) e della trombomodulina (TM)²⁹.

4. Coagulopatie

La fisiopatologia del sistema coagulativo e fibrinolitico è stata caratterizzata e definita negli ultimi due decenni. I vari pathways studiati hanno permesso di evidenziare molteplici alterazioni genetiche che hanno reso sempre più evidente il ruolo svolto dal sistema emostatico nella patogenesi delle malattie tromboemboliche e delle complicanze emocoagulative della sepsi. Di pari passo anche la diagnostica di laboratorio si è andata affinando, fino a proporre validi tests di "prima istanza", specifici algoritmi diagnostici e di monitoraggio terapeutico, dosaggi molecolari dei difetti genetici.

Le piastrine, l'endotelio vascolare, i processi biochimici che portano alla trombinogenesi e quelli che controllano la plasminogenesi e la fibrinolisi rappresentano le componenti cellulari e molecolari del sistema emocoagulativo.

La funzione delle piastrine è di costituire il trombo, nella sua fase di organizzazione iniziale, attraverso l'adesione mediata da GPIb/IX col fattore von Willebrand e la fibrina e la successiva modificazione di forma con l'esposizione del complesso GPIIb-IIIa, con funzione di integrina ed ad attività recettoriale per il fibrinogeno,

suo ligando bivalente specifico. L'internalizzazione del fibrinogeno precede immediatamente l'aggregazione irreversibile e la secrezione delle sostanze contenute nei granuli. Si possono distinguere induttori fisiologici, farmacologici e patologici dell'attivazione piastrinica: tra i primi trombina, collagene (I, III, IV), ADP, adrenalina, prostaglandine e trombossani, NO, PAF, tra i secondi gli immunocomplessi circolanti. Questi fattori rappresentano segnali di membrana che sono tradotti nel citoplasma cellulare provocando il rilascio degli ioni-Calcio, la sintesi delle prostaglandine (PGI₂) e del trombossano A₂, la fosforilazione di proteine per effetto della PKC, la comparsa di specifici recettori sulla membrana. I fenomeni biologici associati all'aggregazione piastrinica sono, in modo sequenziale, rappresentati da:

- aumento del Calcio intra-citoplasmatico
- modificazione conformazionale
- elevata affinità di legame di GpIIb-GpIIIa
- produzione di Trombossano A₂
- fosforilazione di proteine

- rilascio del contenuto dei granuli e dei lisosomi
- induzione dell'attività coagulante
- comparsa sulla membrana cellulare di proteine
- aggregazione piastrinica secondaria

L'integrità dell'endotelio rappresenta uno dei fattori principali di regolazione dell'equilibrio coagulazione-fibrinolisi. Le proprietà procoagulanti sono svolte dalle cellule endoteliali attraverso la sintesi del Fattore tissutale, del Fattore V e del Fattore von Willebrand. Le proprietà anticoagulanti, dalla capacità di sintetizzare Antitrombina (AT), TFPI, Proteoglicani tra i quali eparansolfato, e di attivare il sistema Proteina C-S attraverso la trombomodulina e il recettore della proteina C.

Le cellule endoteliali contribuiscono a regolare il sistema fibrinolitico grazie alla capacità di sintetizzare il principale attivatore fisiologico del plasminogeno, l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), ed il suo inibitore (PAI). In modo altrettanto efficace regolano la funzionalità piastrinica attraverso la prostaciclina, ad attività antiaggregante, ed il PAF, ad attività aggregante.

Il processo coagulativo vero e proprio è costituito da tutta quella serie di reazioni biochimiche autoregolate, che su un substrato rappresentato dai fosfolipidi di membrana delle cellule (piastrine, endotelio) danno luogo alla formazione controllata e, normalmente, mai esuberante di trombina. La coagulazione è iniziata quando il danno endoteliale espone il sangue al fattore tissutale prodotto costitutivamente dalle cellule sottoendoteliali. Il fattore VIIa, presente nel plasma, lega il fattore tissutale e questo complesso consente la produzione di limitate quantità di fattore X e fattore IX. Assieme alla comparsa del fattore Xa, diventano manifesti gli effetti regolatori-inibitori del TFPI sul complesso proconvertinico e, in tal modo, è prevenuta l'eccessiva produzione di fattore Xa. Tramite la via alternativa, che implica l'attività dei fattori VIIIa e IXa, si ottiene ulteriore necessaria produzione di fattore Xa e, quindi, di trombina, con un immediato innesco di un meccanismo di automantenimento che sarà successivamente controllato. Oltre alle piastrine ed alle cellule endoteliali, possono scatenare il processo coagulativo le cellule del sistema monocito-macrofagico, le cellule neoplastiche. le cellule endoteliali alla presenza di macromolecole attivanti (endotossine, immunocomplessi, citochine). I meccanismi di controllo della

coagulazione possono essere distinti in aspecifici, di autocontrollo e specifici. Quelli aspecifici limitano la formazione della trombina e sono costituiti dalla normale e costante velocità del flusso ematico e dall'adsorbimento della trombina sulla fibrina. I meccanismi specifici di controllo della coagulazione sono rappresentati dagli inibitori fisiologici della coagulazione: Antitrombina III, Proteina C/S, Cofattore Eparinico II.

Il sistema della Fibrinolisi contribuisce, anch'esso in maniera controllata, alla trasformazione del plasminogeno in plasmina e, quindi, alla scissione enzimatica del fibrinogeno e della fibrina.

Esistono degli attivatori (t-PA) e degli inibitori (PAI, alfa2-antiplasmina) fisiologici ed altri farmacologici della degradazione del plasminogeno in plasmina e, quindi, del processo fibrinolitico.

La plasmina induce caratteristiche modificazioni enzimatiche a carico della molecola del fibrinogeno con la formazione dei prodotti di degradazione del fibrinogeno (PDF, frammenti D ed E) e della fibrina con la formazione del D-dimero.

4.1. FASE VASCOLARE DELL'EMOSTASI

Il primo evento che si verifica in seguito alla soluzione di continuo di un vaso è rappresentato dalla contrazione vasale. Questo fenomeno tende di per sé ad arrestare il flusso ematico e a determinare l'emostasi: esso è tuttavia insufficiente per l'emostasi permanente a causa della sua transitorietà. Il fenomeno della contrazione vasale è legato a riflessi di tipo neurovegetativo, i quali sono innescati probabilmente dalla lesione endoteliale ed alla liberazione di sostanze vasoattive (serotonina, catecolamine) contenute nelle piastrine. L'attività procoagulante delle cellule endoteliali è correlata innanzi tutto alla loro capacità di sintetizzare:

- 1) Fattore tissutale, fosfolipoproteina che nelle cellule stimulate può essere espressa per oltre il 70% sulle membrane.
- 2) Il fattore V, che, attivato da minime quantità di trombina, può formare, per azione del complesso fattore tissutale + fattore VII o dal complesso VIIIa + IXa + PL +Ca⁺⁺, il complesso Xa + Va + PL +Ca⁺⁺

3) Fattore di von Willebrand, che, legandosi alla glicoproteina piastrinica GPIb, permette l'adesione piastrinica, e per ulteriore legame con la GPIIb/IIIa potenzia l'aggregazione.

Le cellule endoteliali posseggono inoltre i recettori per i fattori IX e IXa e per il complesso $Xa+Va+PL+Ca^{++}$. L'intervento in senso procoagulante delle cellule endoteliali è bilanciato dalle loro attività di tipo anticoagulante. Queste cellule producono sia AT, sia alcuni proteoglicani, quali il dermatansolfato, condroitinsolfato, eparansolfato. L'eparansolfato, in particolare, possiede una capacità superiore di circa 5 volte superiore all'eparina di legare AT. Così la cellula endoteliale, con i suoi proteoglicani e AT, può neutralizzare immediatamente la trombina eventualmente formatasi.

4.2. FASE PIASTRINCA DELLA EMOSTASI

Le strutture alle quali le piastrine aderiscono sono il collagene sottoendoteliale, microfibrille e altre strutture sottoendoteliali. Subito dopo l'adesione le piastrine producono trombassano A₂ (potente sostanza vasocostrittrice attivante le proteine) e secernono (release reaction) vari costituenti endocellulari fra i quali l'adenosidifosfato (ADP), il quale favorisce il successivo processo di aggregazione piastrinica che consiste nell'unione delle piastrine tra loro fino a formare il cosiddetto tappo piastrinico, occludente la breccia vasale. Oltre all'ADP, le piastrine attivate liberano molte sostanze contenute nei loro granuli, quali la serotonina (vasocostrittrice), proteine adesive (fibrinogeno, fattore di von Willebrand, fibronectina). Inoltre le piastrine attivate espongono sulla loro superficie fosfolipidi di membrana, i quali fungono da superficie di appoggio per le reazioni della fase della coagulazione che interviene subito dopo la fase piastrinica. Il fenomeno della aggregazione piastrinica è comunque un processo reversibile, poiché le piastrine tendono a disperdersi con ripresa secondaria dell'emorragia, se non interviene la fase coagulativa. La fase piastrinica ha quindi un'importanza

notevole nel determinismo dell'emostasi primaria, ma non è sufficiente per l'emostasi definitiva.

4.3. FASE PLASMATICA DELL'EMOSTASI

E' la più importante fase dell'emostasi, che in condizioni normali porta ad arresto permanente dell'emorragia. La coagulazione avviene per opera della trasformazione del fibrinogeno in fibrina per azione della trombina, alla cui formazione si giunge attraverso l'attivazione di alcuni fattori, che sono trasformati da zimogeni ad enzimi attivi (proteasi seriniche), e di altri cofattori non enzimatici (fattore V e VIII). Importante è anche l'intervento degli ioni calcio e dei fosfolipidi di membrana cellulare (ad es. l'attivazione del fattore X e della protrombina si verificano a livello delle membrane cellulari).

Il meccanismo della coagulazione in vivo risulta dalla complessa interazione tra i meccanismi estrinseco, intrinseco, comune, in cui i fini meccanismi di feedback portano all'amplificazione del segnale iniziale, che deriva dalla interazione tra il fattore tissutale, presente sulla superficie di molte linee cellulari, e i suoi ligandi, il fattore VII, il fattore VIIa. Non tutti i fattori della coagulazione agiscono con meccanismo enzimatico; alcuni, ad esempio, i fattori VIII e V agiscono come cofattori catalizzanti.

4.4. FIBRINOLISI

La cascata coagulativa è finemente regolata da sistemi di controllo endogeni. Quello più importante è legato alla antitrombina (AT) e al sistema della proteina C. Nell'emostasi interviene un'altra componente, la fibrinolisi, la quale in realtà è una componente antiemostatica in quanto la sua attivazione determina la dissoluzione del coagulo di fibrina. Tuttavia è importante considerare anche la fibrinolisi nel contesto dell'emostasi proprio perché una sua alterazione può essere responsabile di diatesi emorragiche. Prodotto finale di questo meccanismo è la produzione di plasmina, enzima proteolitico capace di lisare la fibrina. La plasmina è generata a partire da un precursore plasmatico inattivo, il plasminogeno, attraverso 3 sistemi: attivazione intrinseca mediante il fattore XIIa, la callicreina e il chininogeno ad alto peso molecolare; attivazione estrinseca mediante azione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) rilasciato dalla parete vasale dopo vari stimoli; ed infine attivazione esogena con urochinasi e streptochinasi.

Le attivazioni intrinseca ed estrinseca sono a loro volta regolate dalla presenza di inattivatori plasmatici (inibitore dell'attivazione del plasminogeno) e della presenza di inibitori capaci d'inattivare la plasmina circolante (α 2-antiplasmina e

α 2-macroglobulina, antitrombina, α 1-antitripsina, inibitore della C1-esterasi e antichimotripsina). La fibrinoformazione, oltre che dal sistema fibrinolitico è regolata anche da un sistema di anticoagulanti naturali.

L'antitrombina è il principale inibitore fisiologico delle proteasi seriniche generate durante l'attivazione del sistema coagulativo. Essa inattiva la trombina e i fattori Xa, IXa, XIa, XIIa, questa inattivazione è accelerata notevolmente dall'eparina.

La Proteina C (PC) è una glicoproteina plasmatica che, nella sua forma attiva, inattiva i fattori Va e VIIIa. Un ruolo fondamentale è svolto dalla trombomodulina, il cui meccanismo di controllo dell'endotelio dipende da una inappropriata attivazione della cascata coagulativa. La trombomodulina, è il recettore della trombina. La trombina è un enzima proteolitico operante la conversione del fibrinogeno in fibrina, staccando dalla molecola del fibrinogeno i fibrinopeptidi A e B. Quello che rimane della molecola del fibrinogeno rappresenta il monomero di fibrina. La trombina una volta legata alla trombomodulina diventa l'attivatore del sistema della proteina C e della proteina S che sono un meccanismo endogeno anticoagulante³⁰. La PC-attivata, il recettore endoteliale per la PC (EPCR), la PS e la trombomodulina sono criticamente coinvolti nella regolazione della coagulazione,

dell'infiammazione, e della risposta immunitaria innata. La via della PC dà una forte evidenza dell'interazione tra coagulazione e infiammazione / immunità innata, e sottolinea l'importanza di delineare queste interazioni per lo sviluppo di nuove terapie. Disturbi trombotici sono associati ai difetti di PC e PS e alla resistenza del fattore Va alla PC attivata. La PC ha diversi modi con i quali attenua l'infiammazione: inibisce l'espressione del TF e il rilascio di citochine proinfiammatorie da parte dei monociti, blocca l'espressione delle molecole di adesione leucocitarie, inibisce la chemiotassi neutrofila ed è citoprotettiva. La PC attivata è anche protettiva nei confronti della barriera endoteliale, un effetto che sembra essere mediato dal PAR-1 e dall'EPCR. Quando legato all'EPCR, la PC attivata trasmette i suoi segnali antinfiammatori. Così, EPCR è un interruttore molecolare per la PC attivata nel determinare se quest'ultimo funzionerà come anticoagulante o molecola antiinfiammatoria. Un nesso tra il complemento e la coagulazione può essere anche suggerito dall'utilizzo efficace della PC attivata ricombinante durante la sepsi.^{31,32}

La Proteina S è il cofattore della proteina C, essenziale alla sua azione anticoagulante.

Difetti qualitativi o quantitativi congeniti di questi inibitori fisiologici della coagulazione comportano un grave rischio di tromboembolismo venoso (trombosi ereditarie). Cofattore eparinico II, per lungo tempo ritenuto una funzione della antitrombina III (o cofattore eparinico), in realtà esso rappresenta un sistema specifico d'inibizione della trombina, che si differenzia completamente dall'antitrombina III. Dal punto di vista funzionale si differenzia dall'AT perché la trombina ne è inibita, non inattivata. Per esplicare la sua azione sulla trombina, essa richiede la presenza di tracce di eparina, il cofattore eparinico II è inattivo sul fattore Xa.

PARTE SPERIMENTALE

5. IPOTESI ED OBIETTIVI

5.1. IPOTESI

L'endotossiemia causa un aggravamento della disfunzione endoteliale (ED) intra-epatica con concomitante riduzione della trombomodulina (TM) e trombosi intraepatica caratterizzata da aumentati depositi di fibrina a livello sinusoidale. Tale danno microtrombotico si associa a maggiore sofferenza parenchimale.

La capacità della simvastatina in corso di endotossiemia è di:

- incrementare l'espressione di TM
- diminuire i depositi di fibrina intrasinusoidale
- diminuire il danno parenchimale indotto dalla microtrombosi

5.2. OBIETTIVI

Determinare, in fegati estratti da ratti esposti a LPS, l'efficacia della simvastatina nel migliorare la ED e lo squilibrio pro-trombotico.

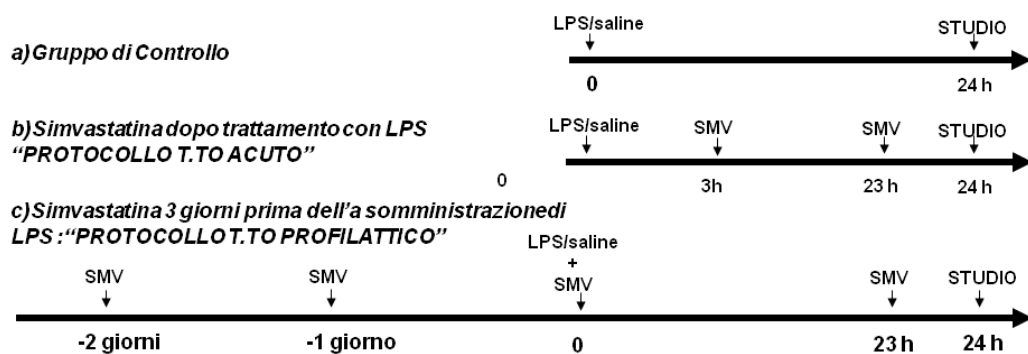
- ✓ Valutare se la iniezione intraperitoneale di LPS causa perdita del fenotipo antitrombotico dell'endotelio sinusoidale (espressione TM) e causa depositi di fibrina intrasinusoidale associata a maggiore sofferenza parenchimale (eosinofilia cellulare e necrosi parenchimale).

- ✓ Valutare l'efficacia della simvastatina nel proteggere il fenotipo anticoagulante delle cellule endoteliali sinusoidali nei fegati esposti a LPS e, di conseguenza, nel ridurre i depositi di fibrina intrasinusoidale e la necrosi epatica ad essi associata.

6. Disegno dello studio:

6.1 Condizioni sperimentali

- Condizione 1-placebo: ratti esposti a LPS/sol.salina
- Condizione 2-trattamento: ratti esposti a LPS/sol.salina in presenza di simvastatina



7. Materiali

7.1. Modelli Animali

Tutti gli esperimenti con gli animali sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti (D.L. 116/92). Per tutta la durata degli esperimenti gli animali hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua e sono stati mantenuti a temperatura costante di 20°C e con cicli luce/buio di 12 ore. La stabulazione è stata mantenuta presso lo stabulario dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano. Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti, Sprague-Dawley, maschi dal peso 325-350 grammi di 5-6 settimane. Il numero di animali scelti è il minor numero possibile compatibilmente con l'ottenimento di risultati scientificamente accettabili e significativi.

7.2 Farmaci/Sostanze:

- LPS: 5mg/Kg per via intraperitoneale in una unica somministrazione
- Simvastatina: 25mg/Kg via gavage n=1 somministrazione/die tre giorni prima della somministrazione di LPS/sol. Salina + 1 dose 1 ora prima del sacrificio per prelievo di campioni di plasma e fegato.

7.3. *Esposizione a LPS/Veicolo*

L'LPS è stato disciolto in soluzione salina. Il dosaggio è stato di 5mg/kg di peso corporeo del ratto in una unica dose per via intraperitoneale.

7.4. *Trattamento con Simvastatina*

La simvastatina è stata somministrata per via gavage alla dose di 25mg/kg secondo gli schemi di trattamento nel disegno dello studio.

8. Metodi

8.1. Inclusione in paraffina

I campioni prelevati (fegato, milza) sono stati processati per l'inclusione in paraffina. Al prelievo è seguita la riduzione in pezzi di piccole dimensioni e la fissazione per almeno 24 ore in soluzione di formalina al 4% in acqua milliQ. Al termine della fissazione i pezzetti sono stati sciacquati in acqua distillata per eliminare i residui di formalina che potevano interferire con la successiva colorazione e quindi disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di etanolo ed acqua distillata a concentrazioni crescenti. In particolare sono stati eseguiti passaggi di un'ora in etanolo al 96%, per due volte; un'ora in etanolo al 100%.

La diafanizzazione è avvenuta mediante due passaggi di un'ora in soluzione di xilene. Al termine della disidratazione i campioni sono stati posti in paraffina preriscaldata a 60°C per almeno un'ora al fine di impregnare tutto il tessuto di paraffina e quindi inclusi e lasciati raffreddare a temperatura ambiente per tutta la notte.

Al microtomo sono state ottenute sezioni dello spessore di 8 µm, che sono state fatte aderire su vetrini portaoggetti.

8.2. Colorazione Ematossilina/Eosina

Sulle sezioni di 8 µm ottenute al microtomo è stata eseguita la colorazione ematossilina-eosina secondo i comuni protocolli. Le sezioni sono state preventivamente deparaffinate tramite due passaggi in xilene, ciascuno di 10 minuti e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di concentrazioni di etanolo in acqua distillata: etanolo assoluto, etanolo 100%, etanolo, 96 % ed etanolo 75%. L'idratazione si è conclusa quindi con un passaggio di almeno 5 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con il colorante ematossilina che colora di blu-violetto i nuclei per 1 minuto, lavata sotto acqua di fonte per 5 minuti, poi in acqua distillata.

Quindi è seguito il trattamento con eosina per 4 minuti e lavata ancora velocemente in acqua di distillata.

Il montaggio è stato eseguito con Histochoice® Mounting Media (Amresco) previa disidratazione con passaggi rapidi in etanolo 75%, 96%, 100% e due passaggi di 5 minuti in xilene.

Per ogni animale sono state valutate 3 sezioni diverse e di ogni sezione sono stati valutati tutti i campi rappresentativi. È stata quindi effettuata in cieco l'analisi semiquantitativa per definire l'entità della sofferenza parenchimale in termini di eosinofilia cellulare e/o danno necrotico da parte di due operatori distinti. La scala di valutazione è stata stabilita arbitrariamente da un punteggio minimo pari a - (nessun danno) ad un massimo di +/++/+++ (basso/intermedio/alto).

8.3. Immunoistochimica

Sulle sezioni paraffinate di 8 μm è stata quindi effettuata analisi immunoistochimica. Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- Fibrina (diluizione 1:400; Nordic-MUBio)
- Trombomodulina(1:20; R&D Systems)

La reazione immunoistochimica è stata eseguita secondo la metodica standard per l'amplificazione del segnale con biotina-streptavidina adattata alle caratteristiche del tessuto epatico.

Le sezioni epatiche, a seguito della sparaffinatura sono state incubate con H_2O_2 per 20 minuti in stufa a 37 gradi; due lavaggi con PBS 1X e poi sottoposte a smascheramento antigenico mediante la Proteinasi K (diluizione 1:20) e incubata in stufa a 37 gradi.

Gli anticorpi primari sono stati incubati overnight a 4°C e legati poi al loro anticorpo secondario specifico biotinilato per un'ora a temperatura ambiente.

La rilevazione della reazione è stata effettuata mediante incubazione con 3-3' diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, UK) per 1-2 minuti a temperatura ambiente. Dopo il blocco della reazione in acqua distillata, i nuclei sono stati contrastati mediante colorazione con ematossilina per 1 minuto a temperatura ambiente. È seguita la disidratazione e il montaggio dei vetrini come precedentemente descritto.

Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità).

8.4. Western Blot

I fegati di ratti, conservati a -80 °C, sono stati lisati con un buffer di lisi costituito da:

- Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- NaCl 150 mM
- EDTA 5mM
- triton x-100 1%
- inibitori proteasi
- sodio ortovanadato 2 mM

Gli omogenati sono stati poi centrifugati a 2000 X g, per 10 minuti. Alle proteine è stato aggiunto un buffer di riduzione con l'aggiunta del β mercaptoetanololo e sono state denaturate a 100°C. L'elettroforesi è stata fatta con un gel al 10% di poliacrilammide e sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state poi incubate overnight a 4°C con i vari anticorpi primari:

- Trombomodulina diluizione 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (R&D System);

Le bande sono state rivelate mediante un KIT Opti- 4CN substrate (Amplified Opti-4CN; BioRad, Milan, Italy)

8.5. Microscopia Elettronica

La stessa porzione del fegato di ciascun animale è stata rapidamente asportata e immersa in una soluzione fissativa contenente il 2% di formaldeide e il 2% di glutaraldeide in tampone di cacodilato di sodio 0,1 M (pH 7,3). Dopo circa 4-12 ore di fissazione i campioni sono stati lavati in tampone cacodilato e dopo fissati a 0 ° C per 1,5 h in tetrossido di osmio al 2% nello stesso tampone. I campioni sono stati lavati in acqua distillata, colorati in blocco in acetato di uranile acquoso al 2%, disidratati attraverso una serie crescente di etanolo, incorporati nella resina di Epon-Araldite e orientati per la classica sezione trasversale del lobulo.

Sezioni semitrasparenti (0,5 µm), ottenute con un ultramicrotomo LKB III da ciascun campione, sono state colorate con 0,5% di toluidina blu in borato di sodio all'1% e esaminate al microscopio ottico (Zeiss Axiophot Photomicroscope) per verificare la qualità della fissazione. E' stato utilizzato solo il tessuto meglio conservato.

Le sezioni ultrasottili saranno esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (Zeiss EM 10)

8.6. ROTEM

La tromboelastometria rotazionale (ROTEM, rotational thromboelastometry) che descrive in tempo reale la cinetica e la forza di formazione e risoluzione del coagulo. Esso è stato eseguito su un campione di sangue prelevato dalla vena cava dell'animale (1 mL) posto in una provetta di polimetilmetacrilato, definita cuvette, al cui interno si trova un perno rotante, opportunamente calibrato in modo da compiere una rotazione di $4^{\circ}75'$ ogni 6 secondi. Al campione vengono aggiunte dei reagenti in grado di attivare il burst trombinico (fattore tissutale e attivatori della fase di contatto); possono essere aggiunti, inoltre, diversi additivi a seconda del tipo di analisi che si vuole ottenere (ad esempio studi selettivi soltanto di una fase della coagulazione). Il test viene eseguito a 37°C , a distanza di poche ore se la provetta contiene anche del citrato.

Con l'inizio e il progredire del processo coagulativo si vengono a formare sempre più tralci di fibrina che, ponendosi "a ponte" tra la provetta e il perno centrale, costituiscono un vero e proprio ostacolo meccanico alla rotazione del perno stesso. Le variazioni del momento meccanico, indotte dal progressivo formarsi del coagulo, sono registrate da un sistema ottico ed espresse in forma grafica (tromboelastogramma).

Inizialmente, prima della formazione dei tralci di fibrina, le forze vigenti tra provetta e perno sono minime e il tracciato presenta due linee rette, perfettamente sovrapposte. Quando il sangue inizia a coagulare, le due linee

cominciano progressivamente a divergere fino a raggiungere un momento di massima ampiezza che identifica la forza del coagulo. Conseguentemente, come risultato del processo fibrinolitico, le linee iniziano nuovamente a convergere.

Dal tracciato tromboelastometrico possono essere derivati cinque parametri principali che identificano i diversi step del processo coagulativo:

ROTEM	Misura	Significato
<i>Clotting time (CT)</i>	Tempo necessario affinché il coagulo raggiunga un'ampiezza di 2 mm	Fornisce informazioni sulla generazione di trombina (analogo al PT). Un suo prolungamento si associa a carenza di fattori della coagulazione e presenza di anticoagulanti
<i>Clot formation time (CFT)</i>	Tempo intercorso tra 2 mm e 20 mm di ampiezza del coagulo	Rappresenta una stima a livello visivo della velocità di formazione del coagulo. Dipende da diversi fattori, tra cui piastrine, trombina e fibrinogeno
<i>Angolo α</i>	Angolo formato dalla retta tangente alla curva e passante per il punto iniziale di divergenza delle rette	Significato simile al CFT ma più preciso, in quanto può essere determinato anche senza che il coagulo raggiunga 20 mm di ampiezza
<i>Maximal clot firmness (MCF)</i>	Maggior ampiezza raggiunta dal tracciato	Rappresenta la massima estensione del coagulo. Influenzata principalmente dal livello di piastrine e di fibrinogeno
<i>LY30 e LY60</i>	Percentuale di riduzione di MCF misurato a 30 e 60 minuti	Quantifica la fibrinolisi

Rispetto ad altri test viscoelastici, il ROTEM permette di valutare contemporaneamente quattro campioni e utilizza un sistema di pipettamento automatizzato.

5.7. *Analisi statistica.*

Il confronto tra gruppi per variabili continue sarà realizzato mediante test non-parametrico che confronti l'effetto della esposizione LPS verso soluzione salina in ogni condizione di esperimento (placebo e trattamento). Mediante analisi fattoriale si confronteranno i cambiamenti indotti da LPS fra differenti gruppi sperimentali di trattamento. La correlazione tra parametri continui e semi-quantitativi istologici sarà verificata mediante test di Spearman. I risultati saranno considerati statisticamente significativi per una $p < 0.05$.

9. Risultati

Qui di seguito sono riportati i valori morfometrici dei ratti sacrificati che sono paragonabili per peso e misure nelle varie condizioni sperimentali. (Tabella 1)

	PLACEBO		SIMVASTATINA	
	Sol. salina	LPS	Sol. salina	LPS
Numero	6	4	6	4
Peso ratto (gr)	311.0+/-28.0	308.0+/-78.5	332.3+/-24.0	326.3+/-7.9
Fegato (gr)	12.9+/-6.5	10.3+/-4.0	15.8+/-2.5	12.2+/-1.0
Milza (gr)	1.17+/-0.62	0.90+/-0.29	1.12+/-0.28	1.0+/-0.07
Milza (cm)	3.73+/-1.91	3.73+/-0.33	4.15+/-0.42	3.88+/-0.25

9.1. *Il sangue intero dei ratti esposti a LPS ha un minor potere coagulante contrastato dal pretrattamento con simvastatina*

I dati ROTEM nelle diverse condizioni sperimentali sono sintetizzati nella Tabella 2 e la figura 1 riporta alcuni tra i tracciati ROTEM più esemplari.

Tabella 2

	PLACEBO			SIMVASTATINA		
	Sol. salina	LPS	p	Sol. salina	LPS	p
CT	52.1+/-7.7	59.3+/-9.3	0.413	53.3+/-11.5	53.7+/-10.5	1.000
CFT	27.5+/-3.6	190.8+/-115.0	0.016	28.2+/-3.4	78.7+/-51.0	0.700
MCF	76.3+/-4.3	39.4+/-3.2	0.016	77.2+/-3.0	62.3+/-18.3	0.700
MCF-t	1543+/-549	3330+/-152	0.016	1707+/-261	2361+/-966	0.700
alfa	84.8+/-0.6	77.3+/-1.6	0.016	84.3+/-0.8	81.7+/-3.8	0.700
Max-V	48.9+/-5.7	19.5+/-2.7	0.016	47.3+/-6.9	34.2+/-20.7	0.700
MaxV-T	78.0+/-9.7	70.5+/-17.6	0.413	75.0+/-8.0	64.7+/-8.9	0.200
AUC	7560+/-441	3925+/-300	0.016	7619+/-308	7618+/-4277	0.700

Legenda:

CT	clotting time
MCF	Maximum Clot Firmness
MCF-t	Maximum Clot Firmness
alfa:	misura la rapidità di formazione della rete di fibrina ed il legame con le piastrine
Max-V	massima velocità di formazione coagulo
Max-V-T	Tempo di massima velocità di formazione coagulo
AUC	area sotto la curva

Prendendo come riferimento i valori medi di CT (clotting time), CFT (clotting formation time) ed MCF (Maximum Clot Firmness) come parametri di studio, i primi due, del potere del sangue intero di innescare l'inizio della coagulazione (reattività), il terzo, della massima ampiezza del coagulo (quantità), i dati in tabella mostrano una tendenza a una riduzione globale del potere coagulante in vitro del sangue dei ratti esposti a LPS vs sol. salina in condizioni placebo. Le modifiche indotte da LPS sono molto più attenuate se i ratti vengono pre-trattati con simvastatina diventando le differenze registrate tra i parametri CT, CFT ed MCF non statisticamente significative.

9.2. L'endotossiemia causa microtrombosi sinusoidale in parte prevenuta dalla simvastatina

L'analisi morfologica dei fegati rileva alla immunoistochimica depositi di fibrina all'interno dei sinusoidi nei campioni trattati con LPS (Figura 2). Le immagini istologiche e lo score quantitativo della fibrina mostrano che tali depositi sono notevolmente attenuati nei campioni di fegato procedenti da ratti pretrattati con simvastatina. La microscopia elettronica evidenzia a livello dei sinusoidi dei ratti esposti a LPS la preponderanza di un trombo caratterizzato da globuli rossi stipati in una maglia elettrondensa che presenta il periodismo tipico della fibrina (Figura 3).

E' interessante notare che i parametri di sangue periferico, MCF e CFT, che nei ratti esposti a LPS davano un risultato associato a un profilo di ridotto potere coagulante, correlano significativamente con lo score di deposito di fibrina. Nello specifico, il CFT presenta una correlazione diretta con la fibrina ($R=0.702$, $p=0.004$), l'MCF una correlazione inversa ($R=-0.712$, $p=0.003$) (Figura 4). Tale dato suggerisce che i parametri ROTEM su sangue periferico possano essere interpretati come una coagulopatia da consumo innescata dall'LPS, infatti maggiori i depositi di fibrina intrasinusoidali, minore il potere coagulante del sangue in periferia.

9.3. L'LPS riduce la espressione endoteliale sinusoidale di TM e causa necrosi epato-cellulare: la simvastatina difende il microambiente antitrombotico e ritarda l'evoluzione del danno indotto da LPS

L'analisi western blot della TM su fegato intero non mostra alcuna differenza tra fegati esposti o meno a LPS nelle due condizioni sperimentali, placebo e simvastatina (Figura 5, pannello A). Tuttavia, l'analisi immunohistochimica (Figura 5 pannello B) rivela, nella condizione placebo, che l'LPS si associa a ridotta espressione sinusoidale della TM mentre continua a trovarsi segnale di colorazione all'interno del parenchima (Figura 5 pannello B, frecce). Di contro, il pretrattamento con simvastatina permette di mantenere un segnale di espressione a livello sinusoidale anche nei fegati esposti a LPS (Figura 5 pannello B). Ciò suggerisce che la simvastatina preserva l'ambiente antitrombotico sinusoidale in condizioni di endotossiemia.

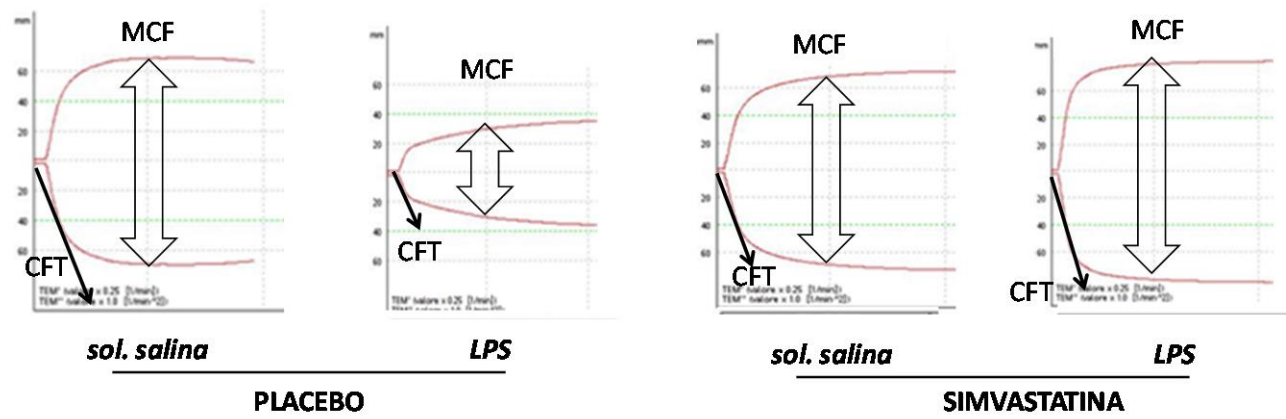
I segni di sofferenza epatica dei ratti esposti a LPS assumono l'aspetto morfologico di una spiccata eosinofilia cellulare e di vera e propria necrosi parenchimale (Figura 6). L'analisi morfologica in cieco è stata concorde nel visualizzare una prevalenza del danno eosinofilo nella condizione di trattamento con simvastatina e una prevalenza di danno necrotico nella condizione placebo come riassunto in Tabella 3.

Tabella 3

		necrosi	eosinofilia
PLACEBO	Sol.salina	-	+/-
	LPS	++/+++	+
SIMVASTATIN	Sol.salina	-	+/-
	LPS	+	+ / ++

Tali dati mostrano che la simvastatina ritarda l'evoluzione della sofferenza parenchimale sottolineata dalla eosinofilia cellulare verso un danno parenchimale di tipo necrotico. Come mostrato in figura 7, le zone di necrosi sono caratteristicamente marcate con fibrina e TM alla immunoistochimica suggerendo che le proprietà antitrombotiche della simvastatina possano essere una strategia farmacologica efficace a ridurre o ritardare il danno necrotico parenchimale in corso di endotossemia.

Figura 1



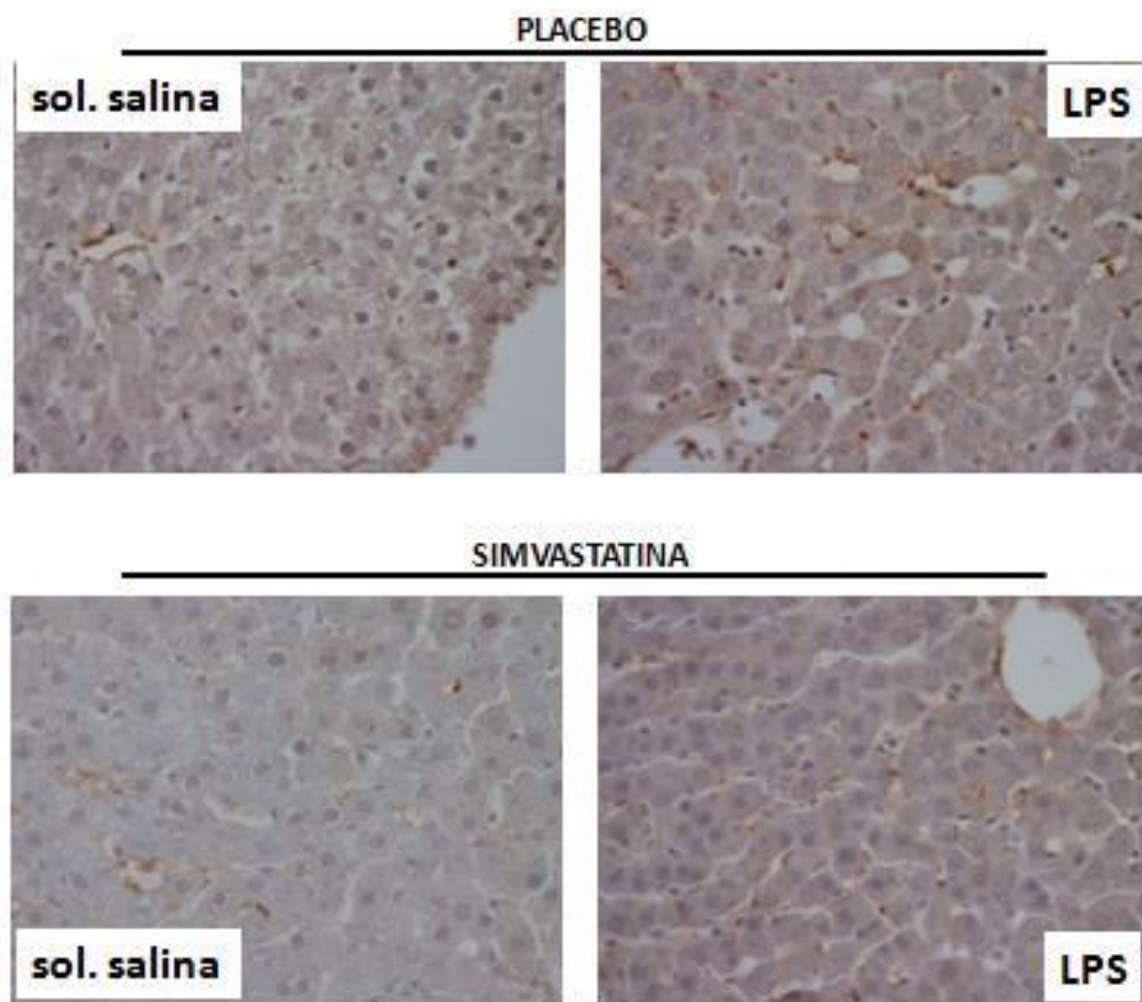
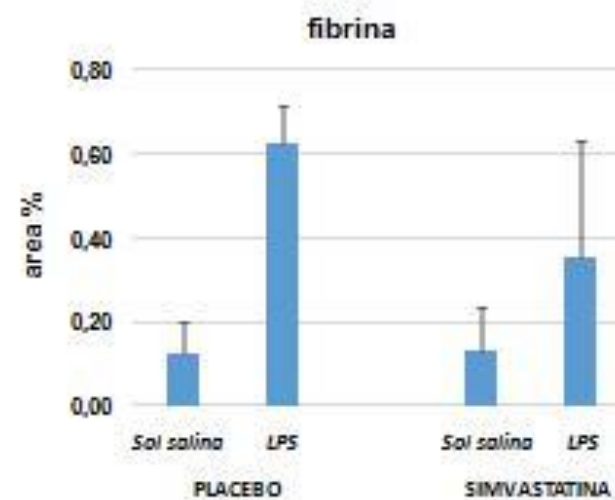


Figura 2



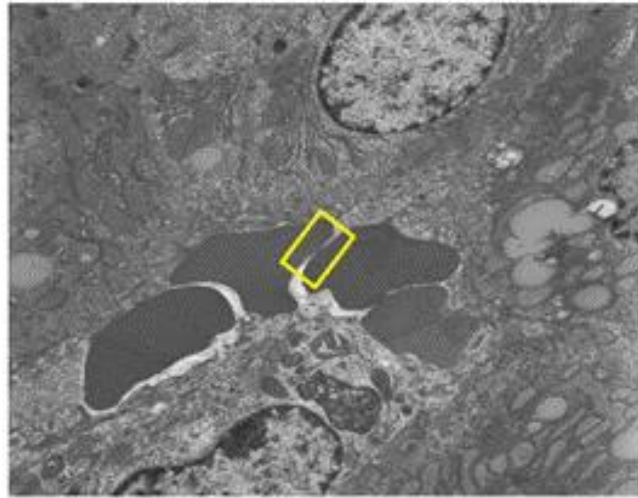
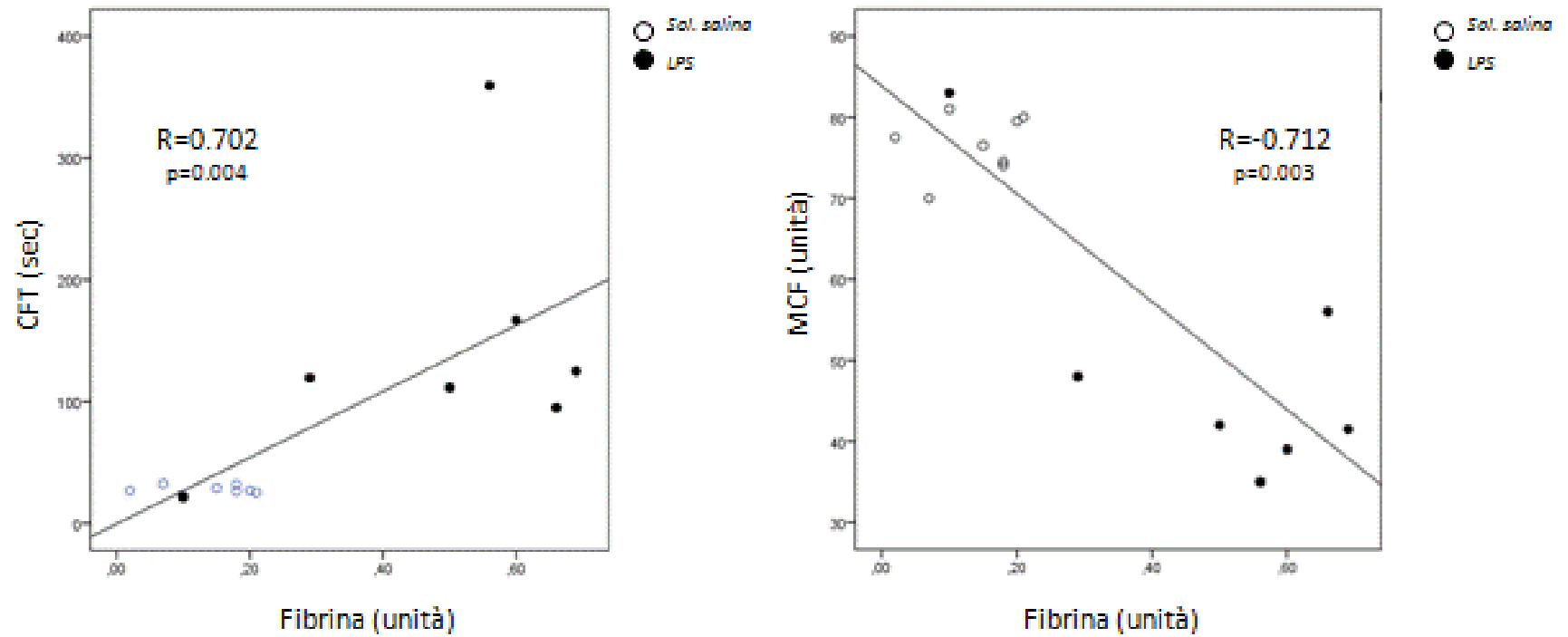
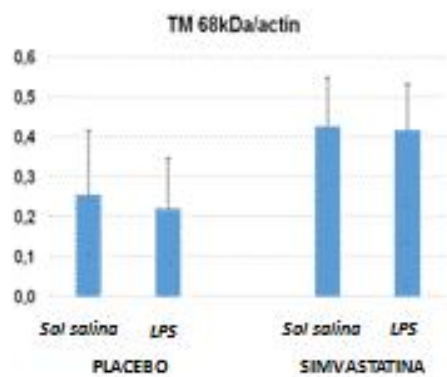


Figura 3

Figura 4



A



B

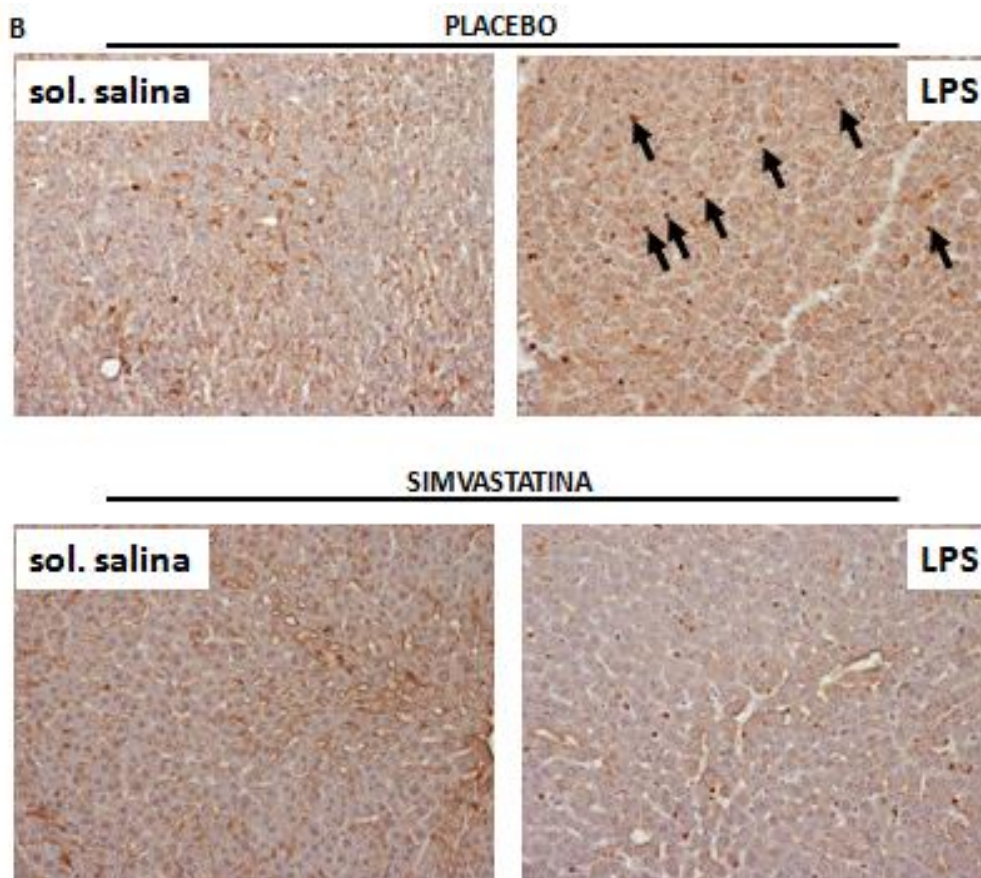


Figura 5

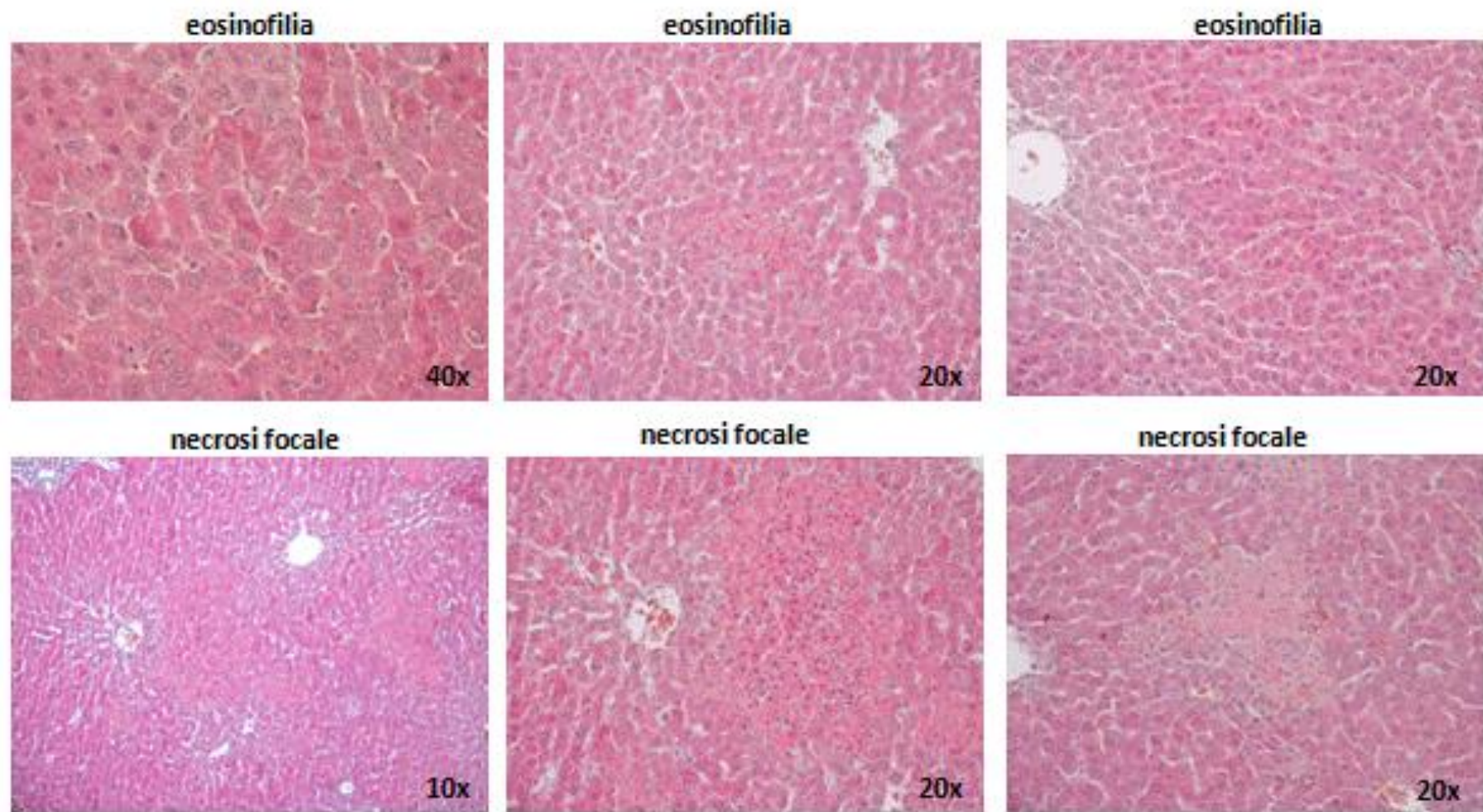
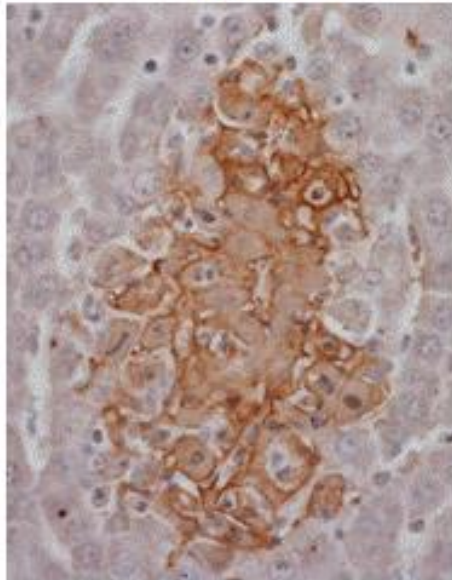


Figura 6

fibrina



trombomodulina

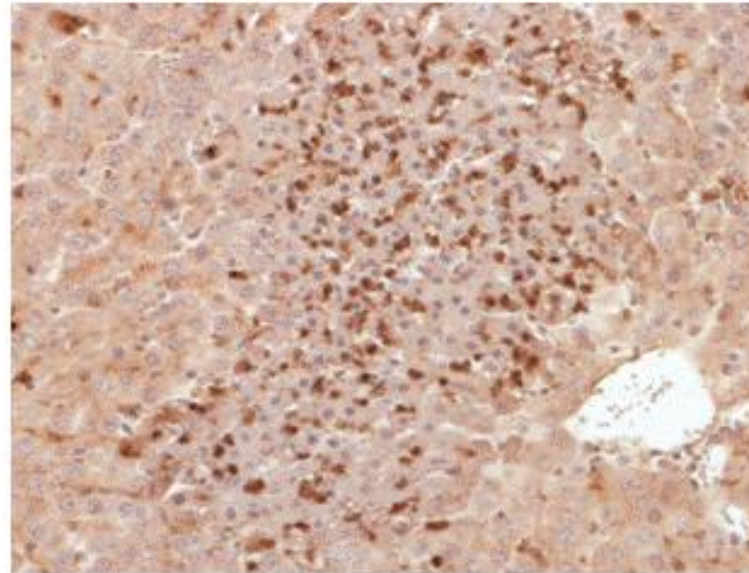


Figura 7

10. DISCUSSIONE

La tesi fin qui esposta sostiene che l'LPS causa una perdita della funzione antitrombotica dell'endotelio sinusoidale mediante riduzione della espressione di trombomodulina. Ciò determina trombosi del microcircolo epatico e necrosi epato-cellulare. La simvastatina, noto farmaco efficace nel trattamento della disfunzione endoteliale, è in grado di attenuare il danno microtrombotico indotto da LPS mediante il mantenimento della espressione di trombomodulina da parte delle cellule sinusoidali epatiche. Ciò si traduce in un minore deposito di fibrina a livello intravascolare e a una minore sofferenza parenchimale.

Comprendere la fisiopatologia delle alterazioni epatiche in presenza di infezione batterica acuta può avere una importante ripercussione nell'ambito della salute pubblica permettendo di individuare nuove strategie terapeutiche per una condizione clinica associata ad elevato rischio di mortalità quale è la sepsi. La tesi segue l'ipotesi microtrombotica come meccanismo di danno d'organo andando a descrivere uno studio morfologico sul parenchima epatico in un modello murino di endotossiemia. I nostri dati dimostrano che il danno parenchimale epatico in tale condizione è principalmente sostenuto da una attivazione abnorme della

coagulazione per mancanza di un meccanismo chiave nella protezione del microcircolo da parte dell'endotelio, quello facente capo alla trombomodulina, e dimostra che la natura del trombo è prevalentemente di tipo rosso. Troviamo infatti, sia alla osservazione in microscopia ottica, sia in microscopia elettronica, emazie impilate in una maglia di fibrina che ostacolano così il flusso a livello del microcircolo generando sofferenza parenchimale. La simvastatina, agendo a livello della cellula sinusoidale è in grado di preservare il microambiente antitrombotico, tuttavia il vantaggio, in termini di sofferenza parenchimale, è solo in parte definitivo. In presenza infatti di simvastatina i fegati esposti a LPS continuano ad avere segni di sofferenza, ma, mentre la condizione placebo ha mostrato la prevalenza di un danno di tipo necrotico dopo esposizione a LPS, la condizione di trattamento con simvastatina ha mostrato la prevalenza di un danno iniziale caratterizzato da una spiccata eosinofilia cellulare che ancora non è evoluto in necrosi. Questo risultato sottolinea la complessità della genesi della insufficienza epatica in corso di sepsi. Il nostro studio non entra nel merito di danni sostenuti da altri possibili meccanismi come l'infiammazione, lo stress ossidativo, ben studiati e caratterizzati da altri autori. Tuttavia l'osservazione che le proprietà

antitrombotiche della simvastatina rallentano l'evoluzione del danno parenchimale, è, a nostro avviso, una informazione nuova che può avere un importante impatto di salute pubblica. Traslando i nostri dati in uno scenario clinico, la modulazione farmacologica della attività endoteliale potrebbe essere una strategia complementare a sostegno di quella convenzionale nella gestione dei pazienti con sepsi. La possibilità di ritardare il danno d'organo sostenuto dalla azione dell'LPS sull'endotelio potrebbe dilatare, infatti, la finestra temporale di azione di presidi fondamentali in corso di sepsi come il supporto delle funzioni cardio-vascolari e respiratorie nonché, soprattutto, di una adeguata e mirata terapia antibiotica che spesso tarda ad essere instaurata per un ritardato accesso alle cure ospedaliere, nonché per un ritardo diagnostico legato ai limiti intrinseci delle metodiche di accertamento microbiologiche di più ampio uso. In questo senso la simvastatina sarebbe complementare e non suppletiva della terapia di maggiore efficacia per la sepsi e potrebbe potenziare l'effetto della terapia convenzionale.

Tali osservazioni potrebbero essere particolarmente utili nel contesto dei pazienti epatopatici cronici, in particolare per i pazienti cirrotici in lista trapianto. In tale

sottogruppo di pazienti le infezioni batteriche sono la principale causa di uscita dalla lista e di mortalità in attesa di trapianto. A tale scopo alcuni autori suggeriscono introdurre una terapia antibiotica profilattica che si è mostrata vantaggiosa nel prevenire nuovi episodi infettivi, tuttavia, allo stesso tempo, l'esposizione cronica ad antibiotici ha dato lo svantaggio di aumentare la prevalenza di germi multi-resistenti con un più elevato rischio di mortalità per infezione e un importante impatto ambientale all'interno dei nostri nosocomi. In tal senso lo schema di trattamento preventivo adottato nel nostro disegno di studio è in linea con una strategia di trattamento profilattico che in qualche modo potrebbe preservare la riserva parenchimale e funzionale epatica nel corso di un evento di setticemia.

Ad oggi il trattamento cronico con simvastatina nella popolazione cirrotica è sostenuto da una serie di osservazioni pre-cliniche e cliniche che permettono di postulare una ormai prossima introduzione del farmaco nella gestione delle più comuni problematiche legate alla ipertensione portale. Abraldes et al. hanno dimostrato che il trattamento con simvastatina riduce la pressione portale e protegge in maniera significativa dal rischio di mortalità da risanguinamento se

aggiunto alla normale terapia di profilassi secondaria con beta-bloccanti non cardio-selettivi e legatura endoscopica ripetuta delle varici. Noi pensiamo che, al di là degli effetti vasomotori legati all'uso della simvastatina, i poteri antitrombotici partecipino alla spiegazione biologica di questi importanti risultati sulla sopravvivenza riscontrati in pazienti con una malattia cronica di fegato così avanzata. Ciò che ovviamente manca a un tale tipo di conclusione è la possibilità di testare tale ipotesi nel contesto di un trial clinico adeguatamente disegnato verso un obiettivo di miglioramento dell'outcome clinico dei pazienti cirrotici ricoverati per sepsi. I nostri dati potrebbero dare un impulso e un ulteriore substrato biologico in tal senso.

Lo studio al momento si limita a fare una descrizione del fenomeno trombotico endotelio-dipendente, ma non entra nel vivo dei meccanismi molecolari che insorgono prima che il danno si renda morfologicamente manifesto e che potrebbero essere il target molecolare della azione farmacologica della simvastatina. A tal proposito una curva dose risposta a dosi crescenti di LPS nonché un disegno di studio che preveda la raccolta di campioni biologici da analizzare a diverso tempo dalla esposizione all'LPS potrebbero ulteriormente

estendere le potenzialità informative dei nostri dati. Sarebbe anche interessante comprendere il ruolo che il von Willebrand factor, nota molecola di produzione endoteliale, possa avere nel determinare il danno trombotico fin qui descritto e soprattutto l'effetto che la simvastatina possa avere su questo mediatore biologico. Lo studio poi potrebbe essere esteso anche al rene, organo frequentemente coinvolto in corso di sepsi, ma, per quanto biologicamente plausibile che il danno nel microcircolo epatico possa corrispondere a un danno anche a carico del microcircolo renale, ad oggi non abbiamo da mostrare risultati in tal senso.

In definitiva, pur considerando i limiti sopradescritti, riteniamo che i nostri dati siano in linea con l'ipotesi di un danno epatico microtrombotico indotto dalla azione dell'LPS sull'endotelio sinusoidale. L'osservazione che la simvastatina possa controllare tale danno preservando l'ambiente antitrombotico del microcircolo epatico espande l'orizzonte farmacologico di questa classe di farmaci già di ampio interesse nell'ultimo decennio nel campo delle malattie acute e croniche di fegato.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Kramer, L. *et al.* Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. *Crit. Care Med.* **35**, 1099–104 (2007).
2. Flum, D. R., Dellinger, E. P., Cheadle, A., Chan, L. & Koepsell, T. Intraoperative cholangiography and risk of common bile duct injury during cholecystectomy. *JAMA* **289**, 1639–44 (2003).
3. Vollmar, B. & Menger, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol. Rev.* **89**, 1269–339 (2009).
4. Vallet, B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit. Care* **7**, 130–8 (2003).
5. La Mura, V. *et al.* Liver sinusoidal endothelial dysfunction after LPS administration: A role for inducible-nitric oxide synthase. *J. Hepatol.* **61**, 1321–1327 (2014).
6. La Mura, V. *et al.* Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* **57**, 1172–81 (2013).
7. Kremer Hovinga, J. a *et al.* ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2284–2290 (2007).
8. Hack, C. E. & Zeerleder, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit. Care Med.* **29**, S21–7 (2001).
9. Martin, K. *et al.* Decreased ADAMTS-13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure. *Crit. Care Med.* **35**, 2375–82 (2007).
10. Bockmeyer, C. L. *et al.* Inflammation-associated ADAMTS13 deficiency promotes formation of ultra-large von Willebrand factor. *Haematologica* **93**, 137–40 (2008).
11. Claus, R. A. *et al.* Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb. Haemost.* **101**, 239–47 (2009)

12. Rieger, M. *et al.* Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb. Haemost.* **95**, 212–20 (2006).
13. Fukushima, H. *et al.* Ratio of von Willebrand factor propeptide to ADAMTS13 is associated with severity of sepsis. *Shock* **39**, 409–14 (2013).
14. Marti, C. N. *et al.* Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1455–69 (2012).
15. Iwakiri, Y. & Groszmann, R. J. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J. Hepatol.* **46**, 927–34 (2007).
16. Owen W.G. Esmon C.T. Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C *J Biol Chem* **256**, 5532-5535 (1981).
17. Gaca, M. D., Zhou, X. & Benyon, R. C. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J.Hepatol.* **36**, 362–369 (2002).
18. Cerini, F. *et al.* Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **64**, 834–842 (2016).
19. Villa E, Cammà C, Marietta M, Luongo M, C *et al.* Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology.* Nov;**143**, 1253-1260 (2012).
20. La Mura V, Tripodi A, *et al.* Resistance to thrombomodulin is associated with de novo portal vein thrombosis and low survival in patients with cirrhosis. *Liver Int.* Sep;**36**, 1322-302016 (2016)
21. Kalambokis GN, Oikonomou A, Christou L *et al.* von Willebrand factor and procoagulant imbalance predict outcome in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *J Hepatol.* Nov;**65**,921-928 (2016)
22. Corsini A, Bellosta S *et al.* New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic

- properties of statins. *Pharmacol Ther.* Dec;**84**, 413-28 (1999)
23. Hardmann JG, Limbiro LE Goodmann Gilman A. Goodmann & Gilman - Le basi farmacologiche della terapia.; *McGraw-Hill*, Milano; pp. 923-928; 935-940(2003)
 24. Sowers JR. Effect of statins on the vasculature: implications for aggressive lipid management in the cardiovascular metabolic Syndrome. *Am J Cardiol.*; **91** (suppl): 14B-22B (2003)
 25. Wierzbicki AS et al., The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacology & Therapeutics.* 2003; **99**: 95-112
 26. Li AC and Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* **8**: 1235–1242, (2002)
 27. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* **352**: 1685–1695, (2005)
 28. Libby P and Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine*; **8**; 11: 1257-1262 (2002)
 29. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, et al. KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J.Exp Med*; **199**:1305–1315. (2004)
 30. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* Jul 14; **365**, :147-56 (2011)
 31. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*; **344**:699–709 (2001)
 32. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* **103**:1192–1201. (2004)