

L'emoperfusione diretta con Polimixina-B (PMX-DHP) nel trattamento della sepsi da gram negativi

A.F. Perego¹, S. Morabito², G. Graziani³, G.P. Casella⁴, O. Parodi⁵

¹ Nefrologia e Dialisi, A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

² Nefrologia e Dialisi, Azienda Policlinico Umberto I, Roma

³ I.R.C.C.S. Humanitas, Rozzano (MI)

⁴ Unità di Terapia Intensiva, A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

⁵ Istituto di Fisiologia Clinica CNR, Sezione di Milano, A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Polymyxin-B direct hemoperfusion (PMX-DHP) in gram negative sepsis

Severe sepsis and septic shock have a mortality rate that may range between 28 and 50%. It is estimated that approximately 200,000 patients die per annum in the USA as a consequence of sepsis. The reduction of plasma endotoxin levels to achieve a favourable outcome for septic patients has been previously demonstrated but the effectiveness of treatments targeting single inflammatory mediators during established sepsis has been disappointing. Furthermore, some clinical study clinically showed valuable reduction in cytokine levels by hemofiltration alone. The prompt removal of endotoxins could be an effective way to reduce the immunological activation and the amount of NO produced by endotoxin-activated inducible NO-synthase in many tissues and cells. The polymyxin B cartridge is an extracorporeal hemoperfusion device (PMX-DHP) known to remove circulating endotoxins. Open-label clinical trials testing PMX-DHP have demonstrated its safety in the septic shock treatment while the overall survival rate significantly improved in comparison with the control groups. The purpose of this study was to investigate the effects of PMX-DHP on redox status, inflammatory cytokine profile, monocytes and PMN leukocyte activation in Gram-negative sepsis. Prospective study: six patients, 2 males and 4 females 60.5±24.5 years old, in ICU for severe Gram-negative sepsis (emergency surgery for intra abdominal infection). Two PMX-DHP runs, at T0 and T1; 2 hours each; the first within 24 hours from sepsis diagnosis or 12 hours after emergency surgery, the first PMX-DHP at T0, the second after 24 hours.; APACHE II score at T0: 20.1±3.7; SOFA score 14.2±2.5; organ failure: 3±1.5; norepinephrine (Ne) in 1 patient; Ne + dopamine (DA) in 4 patients; DA in 1 patient only. Mean dosage: Ne 0.24 mcg/kg/min; DA 8.9 mcg/kg/min. Four patients in CRRT (continuous veno-venous hemofiltration, AN69 hemofilter) for the entire length of the study. QB 100±10 ml/min. Pre and post PMX-DHP, plasma endotoxins as well as anti-IL1-beta, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF-alpha, GM-CSF, IFN-gamma levels were measured. Expression of CD64 on monocytes and PMN leukocytes and IL-2r CD25 on CD4+ T cells by flow cytometry. Total and reduced plasma cysteine, homocysteine, glutathione (GSH); plasma glutathione peroxidase (GSH-Px) and reductase (GSH-Rx); erythrocyte GSH (eGSH), eGSH-Px and eGSH-Rx; NADP and NADPH and their ratio assessed pre and post PMX-DHP, all compared with 15 age and gender-matched healthy subjects for complete REDOX characterization.

Results: We observed a significant reduction of endotoxin levels post PMX-DHP; CD 64 monocytes and PMN leukocytes over expression returned to normal; pro-inflammatory cytokines IL6, IL10 and TNF-alpha were significantly reduced. We detected no differences in plasma levels of anti-IL1-beta, IL2, IL4, IL5, IL8, GM-CSF, IFN-gamma pre versus post PMX-DHP. SOFA score from 14.2±2.5 to 8.9±2.1 post PMX-DHP runs. Four out of six patients survived and were discharged; mortality was 33% versus the anticipated 51%.

Conclusion: PMX-DHP reduces circulating endotoxins, down-activates monocytes and PMN leukocytes, reduces pro-inflammatory cytokines and corrects the redox environment imbalance preventing oxidative damage to endothelial cells and the metabolic and functional microvascular derangements that usually lead to multi-organ failure and septic shock. (*G Ital Nefrol* 2006; 23 (suppl 36): S94-102)

KEY WORDS: Sepsis, Endotoxins, Cytokines, Redox status, Polymyxin-B, PMX-DHP

PAROLE CHIAVE: Sepsis, Stato redox, Endotossine, Citochine, Polimixina-B, PMX-DHP

Introduzione

La sepsi severa e lo *shock* settico hanno una mortalità variabile tra il 28.6 ed il 50%. Ogni anno circa 200.000 pazienti muoiono di sepsi negli USA (1, 2).

La terapia antibiotica è la pietra angolare nella gestione clinica delle batteriemie e della sepsi. Tuttavia, essa non può invertire l'andamento della cascata fisiopatologica della sepsi iniziata dall'attivazione di macrofagi e polimorfonucleati, indotta dal complesso lipopolisaccaride (LPS)-LPS *binding protein* con rilascio sistemico di citochine pro-infiammatorie aventi come bersaglio la cellula endoteliale, con conseguenti alterazioni microvascolari, metaboliche e funzionali, guidate da un anormale rilascio di ossido nitrico (NO). Alcuni antibiotici, peraltro, inducono la produzione di citochine (3) e quindi un effetto sfavorevole può essere così dovuto a stimolo indiretto di TNF-alfa ed altre citochine.

Ridurre gli effetti sistemici di questi mediatori è obiettivo della terapia della sepsi. Danner (4) ha segnalato l'importanza della riduzione dei livelli plasmatici di endotossine per ottenere risultati favorevoli nel paziente settico. L'efficacia dei trattamenti farmacologici che hanno posto i singoli mediatori infiammatori come bersaglio di una terapia della sepsi è stata peraltro deludente (5) e nessuno studio clinico ha mostrato una riduzione significativa e clinicamente importante dei livelli circolanti delle citochine ottenuta solo con emofiltrazione (6).

La rimozione rapida di endotossine potrebbe essere efficace nel ridurre il grado di attivazione immunologica e quindi la quantità di NO prodotto per attivazione della "Nitric-oxide synthase" a livello tissutale e cellulare (7).

La Polimixina-B è un antibiotico polipeptidico con attività battericida verso i batteri Gram- ed è in grado di legarsi specificamente con le endotossine, inattivandole. Numerosi studi hanno dimostrato che la cartuccia di polimixina-B per emoperfusione può eliminare le endotossine circolanti in pazienti con sepsi grave, *shock* settico o *shock* "refrattario" (8, 9).

La cartuccia di Polimixina-B (PMX-F) è un dispositivo extracorporeo per emoperfusione sviluppato nel 1984, costituito da Polimixina-B legata a fibre di polistirene-chloroacetamide-metilico e chimicamente immobilizzata nella fibra attraverso legami covalenti (10).

La capacità di inattivare le endotossine circolanti fu il razionale sufficiente per iniziare a trattare pazienti con sepsi grave o *shock* settico con emoperfusione diretta con Polimixina-B (PMX-DHP) e le prime esperienze in letteratura comparvero nel 1997: Kodama pubblicò i risultati del primo studio multicentrico, giapponese, della durata di 2 anni, condotto su 42 pazienti con sepsi dimostrando significativa capacità di PMX-DHP nel ridurre i livelli circolanti di endotossine e nello stabilizzare l'emodinamica dei soggetti trattati (11).

Nel 1998 Tani (12), in 37 pazienti trattati con PMX-DHP

per sepsi grave con *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS), osservò una sopravvivenza più elevata rispetto al gruppo di controllo dei non trattati (54% vs 36.4%). Il risultato era ancora migliore nel gruppo di pazienti che presentavano all'inizio dell'osservazione lo *score* di gravità di malattia più grave (35% di sopravvissuti vs 14% dei non trattati con PMX). Nel 2001 ancora Tani, con uno studio multicentrico, dimostrò, in 88 pazienti con sepsi grave (*score* APACHE II 24.2±1.0) trattati con PMX-DHP, una sopravvivenza del 51.1% a due settimane e significative riduzioni dei livelli plasmatici di TNF-alfa, IL-6, IL-10, PAI-1 (13) mentre Nemoto, con uno studio prospettico, aperto e randomizzato, ottenne una sopravvivenza del 40% in pazienti trattati con PMX-DHP per sepsi grave (APACHE II 20-29) vs 11% nei non trattati (14). Nakamura, nel 2003, presentò uno studio prospettico, randomizzato e controllato su circa 300 pazienti, 200 trattati con PMX-DHP e 100 nel gruppo controllo, con una sopravvivenza a 4 settimane nei trattati con PMX-DHP del 68% vs 32.4% (15).

Tali casistiche, caratterizzate da sopravvivenze decisamente favorevoli per i pazienti trattati, soprattutto se paragonate ai gruppi controllo, indussero molti ricercatori a studiare il meccanismo d'azione della PMX-DHP, non riconducibile in particolare ad una mera riduzione dei livelli di endotossine. Si scoprì che nella sepsi indotta sperimentalmente la Polimixina-B riduceva, *in vitro*, i livelli circolanti di endotossine e di citochine con minore attivazione del fattore nucleare di trascrizione NF-kB e minore produzione di TNF-alfa nei monociti (16). *In vivo*, inoltre, la PMX-DHP conduce ad una stabilizzazione emodinamica del paziente con miglioramento della pressione arteriosa, dell'indice cardiaco (CI), del "left ventricular stroke work index" (LVSWI), dell'indice di disponibilità dell'ossigeno (DO₂I) (17).

In letteratura, i cannabinoidi endogeni, in particolare l'anandamide di derivazione macrofagica ed il 2-arachidonilgliceride di derivazione piastrinica, sono stati considerati in grado di indurre ipotensione nelle fasi precoci dello *shock* settico (18) e la PMX-DHP si è dimostrata in grado di adsorbire, neutralizzandone gli effetti, l'anandamide (19). Peraltro, è stato dimostrato che la PMX-DHP induce variazioni nello stato di attivazione leucocitaria con riduzione nell'espressione di CD16 ed aumento dell'espressione monocitaria di HLA-DR dopo trattamento (20).

Per quanto riguarda lo sviluppo di uno squilibrio critico della microcircolazione in pazienti con *shock* settico, un ruolo chiave è giocato dal rilascio di NO per la presenza di una isoforma calcio-indipendente (NOS3) della NO-synthase, indotta nelle cellule endoteliali dalle endotossine, che induce la produzione di citochine. La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) indotta da alcune citochine, ad esempio il TNF-alfa, sembra essere collegata con l'attività cellulare mitocondriale, quindi il ruolo dei mitocondri nell'effetto tossico prodotto da mediatori citochinici sembra essere rilevante (21). La produzione mitocondriale

TABELLA I - CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ALL'INIZIO DELLO STUDIO

Paziente	Età	Sesso	Malattia	APACHE II score	SOFA score
1	77	f	Peritonite secondaria a perforazione	20	11
2	76	f	Ascesso pelvico, resezione retto e sigma e anastomosi colon sx	23	11
3	45	f	Ferita da arma da fuoco, emoperitoneo, sindrome compartimentale addominale	17	10
4	18	m	Trauma cranico, coma, colecistite secondaria	25	19
5	81	f	Peritonite da perforazione del sigma	17	8
6	66	m	Peritonite post-chirurgica, ascesso addominale	19	8

di ROS causa la diffusione di fenomeni perossidativi che innescano la malattia infiammatoria vascolare endoteliale. L'espressione aumentata di NOS3, la generazione di perossinitriti e l'ossidazione lipidica ROS correlata sono responsabili di citotossicità endoteliale, di permeabilità aumentata e di lesioni strutturali delle membrane cellulari. La generazione mitocondriale di H_2O_2 , in condizioni metabolicamente normali, è convertita nella produzione di acqua per azione catalitica della glutatione-perossidasi (GSHPx) che usa il glutatione (GSH) come substrato. A causa del ruolo regolatore svolto dalla GSHPx nei livelli mitocondriali di ROS, il contenuto tissutale di GSH svolge un ruolo critico nello sviluppo degli eventi di danno cellulare originati da un grave *stress* ossidativo innescato da citochine liberate da granulociti e da monociti attivati dal complesso LPS-LPS binding protein, Toll Like Receptor (TLR), CD14. Il contenuto di GSH (eGSH) nell'eritrocita, espressione della concentrazione intracellulare di GSH, rappresenta dunque un indicatore efficace della capacità di protezione antiossidante delle strutture cellulari mitocondriali. La vitamina C e la E, normalmente consumate nei processi ossidativi, sono risparmiate dall'attività del GSH; pertanto, anche il contenuto plasmatico di queste vitamine quindi è un indicatore importante della condizione *redox in vivo* (22-24).

Al fine di caratterizzare gli effetti sullo stato redox del trattamento di emoperfusione diretta con Polimixina-B (PMX-DHP) nella sepsi da Gram-negativi, abbiamo condotto uno studio pilota su pazienti con sepsi grave e/o *shock* settico da Gram-negativi. In particolare, sono stati valutati numerosi parametri biochimici, immunologici, metabolici e clinici per allargare la conoscenza sugli effetti terapeutici di questa tecnica extracorporea.

Metodi

Studio pilota; prospettico

I trattamenti convenzionali, compresi la rianimazione, gli antibiotici ed il supporto d'organo sono stati mantenuti in

tutti i pazienti oggetto dello studio e sono rimasti invariati rispetto ai protocolli usuali di trattamento di tali pazienti. Sono stati trattati con PMX-DHP pazienti ricoverati in Unità di Terapia Intensiva per sepsi a partenza dalla cavità addominale e che mostravano sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) ed insufficienza di almeno 2 organi.

Sono stati reclutati 6 pazienti, 2 maschi e 4 femmine, età media 60.5 ± 24.5 anni. La Tabella I descrive le caratteristiche dei pazienti all'entrata nello studio. Lo *score* APACHE II al tempo zero era 20.1 ± 3.7 ; la mortalità prevista era 51%; il numero di organi insufficienti era 3 ± 1.5 .

Tutti i pazienti erano in trattamento endovenoso con amine simpaticomimetiche ad alto dosaggio: norepinefrina (Ne) in 1 paziente, Ne + dopamina (DA) in 4 pazienti, DA in 1 paziente (dose media infusa: Ne 0.24 mcg/kg/min; DA 8.9 mcg/kg/min) per instabilità emodinamica grave da *shock* settico. La terapia sostitutiva extracorporea continua della funzione renale (CRRT), laddove in corso, è stata mantenuta in 4 pazienti. I pazienti arruolati erano stati ammessi all'ospedale per infezione intra-addominale richiedente chirurgia di emergenza o con quadro clinico di sepsi severa. I trattamenti con PMX-DHP dovevano avere inizio *rigorosamente* entro 24 ore dalla diagnosi di sepsi severa e/o entro 12 ore dalla conclusione di un intervento di chirurgia addominale.

I pazienti sono stati trattati con PMX-DHP due volte, al giorno 0 ed al giorno 1; il secondo trattamento è stato iniziato entro 24 ± 4 ore dalla conclusione del trattamento precedente. Tutti i trattamenti di PMX-DHP sono stati condotti in Unità di Terapia Intensiva.

Ogni trattamento con PMX-DHP era di 2 ore; il flusso ematico in ingresso nella cartuccia di PMX-F era 100 ± 10 mL/min; per l'anticoagulazione durante il trattamento con PMX-DHP è stata usata eparina non frazionata (dose di attacco: eparina sodica 2000 UI; ad ogni ora successiva 18 ± 2 UI/kg). I dati emodinamici e respiratori così come i gas del sangue sono stati misurati; gli indici di gravità di malattia APACHE II e SOFA sono stati calcolati e registrati per ogni paziente.

TABELLA II - PRINCIPALI PARAMETRI CLINICI PRE E POST-TRATTAMENTO DI EMOPERFUSIONE DIRETTA CON POLIMIXINA-B (PMX-DHP) NEI 6 PAZIENTI SETTICI

Pz	PMX-DHP	PAM (mmHg)	Noradrenalina ($\mu\text{g/kg/min}$)	Dopamina ($\mu\text{g/kg/min}$)	FC (bpm)	PaO ₂ /FiO ₂ ratio (mmHg)	T (°C)	Diuresi (mL/h)	Leucociti (mm ³)
1	pre	77.3	0.09	13	99	300	35.2	15	5900
	post	89.7	0.033	6.6	92	362.5	37	150	6500
2	pre	53.3	0.04	5.8	108	174	37.5	69	3400
	post	78	0.016	8	93	161	37	107	2000
3	pre	88	0.3		85	342.5	34.5	170	24400
	post	96	0.0		77	175.5	36.9	344	14800
4	pre	85.7	1		131	153	39.6	300	3700
	post	92	0.04		99	382.5	38.3	226	21300
5	pre	101	0.24	0.08	110	123.3	37.5	65	15600
	post	106	0.0	0.0	90	186	37	98	3300
6	pre	80.7		8	85	223	36	350	21000
	post	112		0.0	113	185	37.3	440	10200
Variazione % media		+20%	-82%	-50%	-7%	+25%		+185%	
DS		18%	19%	64%	20%	70%		353%	
p =		0.05	0.05	0.38	0.16	0.34		0.06	

Le endotossine e le concentrazioni plasmatiche di citochine (IL-1-beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa, GM-CSF, IFN-gamma) come pure l'espressione di CD64 in monociti e polimorfonucleati (PMNs) sono state misurate prima e dopo ogni trattamento con PMX-DHP.

Gli indicatori biochimici dello stato *redox*: tioli (omocisteina, cisteina, GSH, *cysteinylglycina*), vitamine antiossidanti (vitamina C ed E), eGSH e malondialdeide (MDA), prima e dopo il trattamento con PMX-DHP, sono stati valutati per caratterizzare gli effetti del trattamento sullo stato *redox* nello shock settico.

L'analisi per il dosaggio in multiplex delle citochine è stata condotta con la piattaforma Luminex-100. È stato usato il kit di misura di citochine 10-PLEX, progettato per la piattaforma Luminex-100 da BioSource (Camarillo, CA, USA). L'analisi dell'attivazione di monociti e polimorfonucleati per misurare l'espressione quantitativa del Fc-gamma *receptor* CD64 sui monociti e polimorfonucleati è stata condotta con citometria a flusso su *FACSCalibur cytometer* (Becton Dickinson, San José, CA, USA). La valutazione dei livelli circolanti di endotossina è stata condotta con il batch 3L2690 del kit fornito da CAMBREX (BioWhittaker).

Determinazioni stato *redox*: campioni di sangue venoso

sono stati analizzati per i nucleotidi, tioli, vitamina ed enzimi di GSH, subito dopo la raccolta di ogni campione. Il ciclo di GSH è stato valutato completamente con determinazione di NADP e NADPH, perché NADPH è un co-substrato dell'attività antiossidante della GSH-Perossidasi ed il rapporto NADP/NADPH costituisce un indice ulteriore di condizione del ciclo di GSH. I livelli di NADP e di NADPH sono stati determinati usando un metodo ad alto rendimento di cromatografia HPLC come descritto (25).

I livelli plasmatici totali e ridotti dei tioli (cisteina, *cysteinylglycina*, omocisteina e GSH) sono stati determinati secondo i metodi convalidati nel nostro laboratorio (26) mentre la vitamina E del plasma è stata analizzata tramite la separazione isocratica di HPLC, come precedentemente descritto (22). I livelli di GSH-Perossidasi (GSH-Px) e di GSH-Reduttasi (GSH-Rx) sono stati condotti su eritrociti sedimentati e quindi lisati secondo metodiche descritte in letteratura (23, 24).

I parametri dello stato *redox* come pure l'espressione del CD 64 dei sei pazienti settici studiati sono stati paragonati a quelli di un gruppo di 15 soggetti, paragonabili per età e sesso.

I risultati sono espressi come scarto quadratico medio del \pm medio (deviazione *standard*) per tutti i dati raccolti. Il test

TABELLA III - EFFETTI DELLA EMOPERFUSIONE DIRETTA CON POLIMIXINA-B (PMX-DHP) SUI LIVELLI CIRCOLANTI DI ENDOTOSSINE, SUI LIVELLI PLASMATICI DI CITOCHINE E SULL'ESPRESSIONE DI CD64

Paziente		Endotossine (EU/mL)	IL-6 (µg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF-alfa (pg/mL)	CD64
1	pre	0.72	0.82	0	2.88	4300
	post	0.48	0.45	0	2.7	3400
2	pre	1.57	6.7	257.5	16.5	17400
	post	0.53	1.83	88	9.7	14200
3	pre	0.8	0.42	219	8.2	6300
	post	0.61	0.1	74	3.4	4400
4	pre	2.1	1.97	213	5.99	36000
	post	1.2	0.05	18	4.15	12000
5	pre	1.6	0.1	23	3	6070
	post	0.9	0.1	19	2.6	3700
6	pre	0.94	0.66	41	4.5	4228
	post	0.69	0.21	28	3.5	3600
Variazione % media		-42%	-59%	-45%	-29%	-32%
<i>DS</i>		16%	37%	38%	21%	19%
p =		0.00077	0.00372	0.01186	0.00720	0.00503

non parametrico di Wilcoxon per i campioni relativi è stato usato per valutare la variazione dei differenti parametri pre e post trattamento con PMX-DHP.

Risultati

I risultati sono riportati in Tabella II. La Tabella mostra, per ogni paziente, i parametri clinici pre e post trattamento con PMX-DHP (giorno 0 - giorno 2) con la percentuale media di variazione ed il risultato del *test* statistico. È interessante osservare che PMX-DHP ha una certa influenza nel riportare a valori fisiologici sia la temperatura che il conteggio delle cellule della serie bianca.

L'emodinamica dei pazienti, rispetto al T zero, ha mostrato un cambiamento significativo verso i valori normali dopo la terapia con PMX-DHP. I miglioramenti dell'emodinamica erano associati, nella popolazione trattata, ad un significativo incremento della diuresi/ora.

Il SOFA *score* dei pazienti studiati era 11.16±4.07 a T zero. Nei superstiti, lo stesso SOFA era 14.2±2.5 all'entrata nello studio e si riduceva significativamente a 8.9±2.1 il terzo giorno (p=0.008).

Nessun evento avverso si è presentato con il trattamento PMX-DHP con eccezione della coagulazione della cartuccia da emoperfusione 20 minuti prima della conclusione del primo trattamento con PMX-DHP nel paziente # 6, a causa di un dosaggio molto basso di eparina (per grave rischio di complicanza emorragica addominale).

Effetti di PMX-DHP sulle endotossine e sui livelli plasmatici di citochine

I livelli circolanti di endotossine, IL-6, IL-10 e TNF-alfa sono stati ridotti con PMX-DHP con significatività statistica (Tab. III). Al contrario, i livelli plasmatici di IL-1-beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, GM-CSF, IFN-gamma non erano dosabili né prima né dopo PMX-DHP; lo stesso per l'espressione di IL-2 *receptor* CD25 sulle cellule T CD4+.

Stato redox

La condizione *redox* di base dei pazienti settici ha mostrato una riduzione evidente delle forme plasmatiche, totale e ridotta, di GSH, di eGSH, dell'attività di GSH-Rx e di GSH-Px e delle concentrazioni di NADPH rispetto ai soggetti di controllo. I livelli plasmatici delle vitamine C ed E erano ridotti ugualmente nei pazienti settici (Tab. IV).

Dopo il secondo trattamento di PMX-DHP (giorno 2) si osservava un aumento statisticamente significativo dei livelli plasmatici di vitamina E (13.5±5.3 vs 10.1±2.9 µmol/L, p=0.043) e di cisteina totale (247.7±155.3 vs 204.5±133.9 µmol/L, p=0.014) mentre l'aumento dei livelli plasmatici di NADPH e di GSH-Px non assumeva significatività statistica (12.5±3.0 vs 10.3±7.1 µmol/L e 9.86±1.83 vs 7.41±3.1 U/g Hb, rispettivamente) (Tab. V).

TABELLA IV - STATO REDOX DI BASE NEL GRUPPO DI CONTROLLO E NEI PAZIENTI SETTICI

	Gruppo di controllo (n=15)	Pazienti con sepsi (n=6)	p
rGSH plasmatico, µmol/L	5.82 (2.38, 6.33)	1.57 (0.74, 3.98)	0.049
eGSH, µmol/L	762 (631, 882)	427 (287, 599)	0.009
tGSH plasmatico, µmol/L	6.73 (5.71, 7.42)	2.92 (1.65, 3.39)	0.0001
Ascorbic acid, µmol/L	56.1 (32.3, 65.5)	8.1 (5.8, 23.3)	0.001
Vitamin E, µmol/L	19.1 (17.8, 23.0)	9.5 (8.3, 17.4)	0.01
GSH-Px, IU/g Hb	12.98 (10.73, 19.75)	6.85 (5.33, 11.34)	0.03
GSH-Rx, IU/g Hb	4.98 (4.25, 5.82)	1.94 (1.17, 2.77)	0.0001
NADPH, µmol/L	26.5 (22.0, 31.8)	12.2 (4.9, 16.1)	0.0001

Dati espressi come mediana e range interquartile (I, III).

rGSH: glutazione ridotto; eGSH: glutazione eritrocitario; tGSH: glutazione totale; GSH-Px: glutazione perossidasi; GSH-Rx: glutazione riduttasi.

TABELLA V - MODIFICAZIONI DELLO STATO REDOX NEI 6 PAZIENTI SETTICI TRATTATI CON EMOPERFUSIONE DIRETTA CON POLIMIXINA-B (PMX-DHP)

	Giorno 0	Giorno 2	p
Cisteina totale plasmatica*	204.5±133.9	247.7±155.3	0.014
Vitamin E*	10.1±2.9	13.5±5.3	0.043
NADPH*	10.3±7.1	12.5±3.0	ns
GSH-Px**	7.41±3.1	9.86±1.83	ns

*Dati espressi come µmol/L; **Dati espressi come U/g Hb; GSH-Px: glutazione perossidasi.

Analisi quantitativa dei CD64

All'inizio dell'osservazione, la valutazione quantitativa con citometria a flusso dell'espressione di CD64 da parte di monociti e granulociti ha dimostrato, rispetto ad una popolazione normale del pannello di controllo, una *up-regulation* nell'espressione di CD64 nei pazienti settici. L'espressione di CD64 è stata ricondotta alla normalità dopo la terapia con PMX-DHP (Fig. 1).

Discussione

Il trattamento PMX-DHP nella sepsi da Gram-negativi controbilancia lo squilibrio microcircolatorio alimentato dalla cascata settica in primo luogo riducendo i livelli circolanti di endotossine e quindi ristabilendo uno stato *redox* corretto con conseguenze importanti sulla condizione biochimica delle cellule endoteliali e sulla macro e microcircolazione.

Le cellule batteriche Gram-negative lisate liberano LPS che si lega alla proteina legante LPS. Il complesso LPS+proteina legante LPS attiva monociti e polimorfonucleati con attivazione di NF-kB ed induzione di infiammazione attraverso la produzione di citochine (TNF-alfa, IL-1,

IL-6, IL-12, IFN-gamma) quindi disfunzione endoteliale con espressione aumentata della frazione inducibile della NO *synthase* endoteliale.

L'ossido nitrico è un vasodilatatore endogeno potente (27) e la sua produzione relativa alla frazione inducibile della NO *synthase* è aumentata all'interno delle cellule vascolari muscolari lisce e delle cellule endoteliali nello shock settico (28, 29). La sintesi anormale di ossido nitrico sostiene lo stato di *shock* vasodilatatorio e la resistenza ai vasopressori. Animali da esperimento senza il gene che codifica per la NO-*synthase* inducibile (30-32) non aumentano la sintesi di NO durante lo shock settico indotto da infusione di endotossine. I meccanismi responsabili dell'espressione aumentata della frazione inducibile della NO *synthase* sono sconosciuti ma parecchie citochine (IL-1, IL-6, TNF-alfa, IFN-gamma) sono probabilmente implicate (29, 33).

I risultati attuali indicano che PMX-DHP riduce il livello di attivazione del macrofago e dei PMN nel produrre citochine infiammatorie come dimostrato dai livelli di citochine e di espressione nel plasma dei CD64. Ulteriori risultati indicano che una profonda alterazione nello stato *redox* si presenta nella *shock* settico, come anche indicato in studi precedenti.

Le nostre osservazioni *redox* sono state focalizzate sul

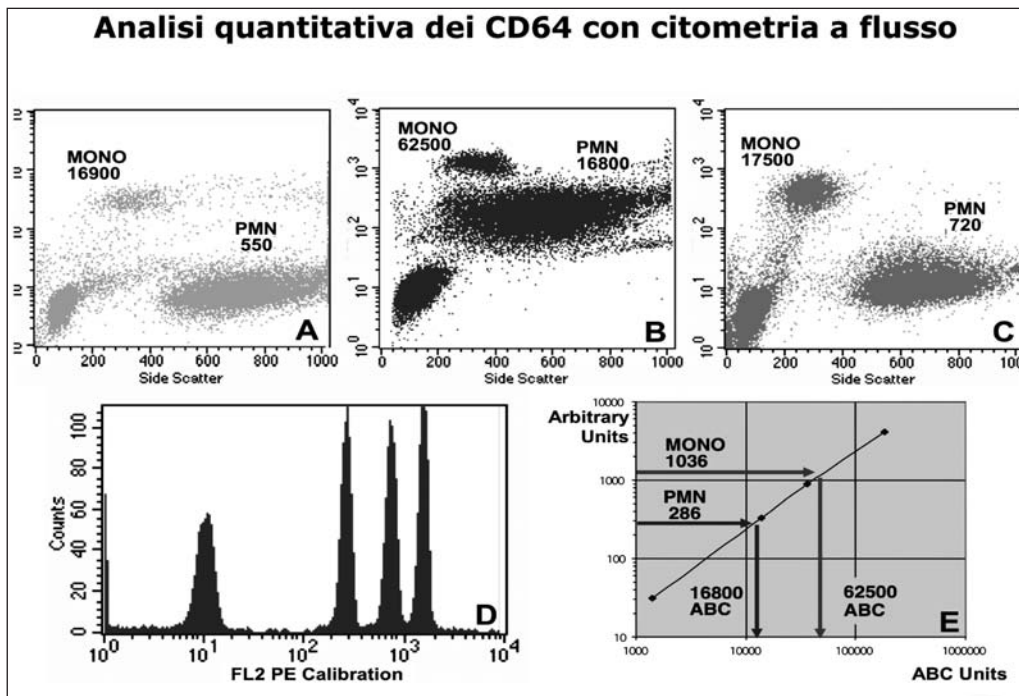


Fig. 1 - Espressione di CD64 (citometria a flusso) su monociti e polimorfonucleati: Parte superiore: I numeri indicano unità ABC: A) espressione grafica e numerica di CD64 in monociti (MONO) e polimorfonucleati (PMN) in un gruppo di soggetti sani, di controllo, in condizioni basali. B) quadro grafico e numerico dei pazienti settici esaminati, prima del trattamento con PMX-DHP: marcata espressione di CD64 sia MONO che PMN. C) dopo trattamento con PMX-DHP l'espressione di CD64 sia MONO che PMN ritorna a livello del gruppo di soggetti controllo.

Parte inferiore: D); E): linee di calibrazione per convertire unità citometriche arbitrarie in unità ABC (standard Phycoerythrin (PE) beads e media geometrica delle intensità di clusters cellulari alla fluorescenza di PE).

comportamento dei tioli, nucleotidi e *scavengers* non enzimatici (GSH, la vitamina E e C): un pannello di valutazione *redox* non precedentemente descritto in letteratura ma che presenta un'interazione importante con il ciclo del GSH e svolge un ruolo chiave nella protezione antiossidante.

L'attività ridotta di GSH-Px trovata nei pazienti settici rispetto al valore di riferimento precedentemente segnalato (34) suggerisce un'alterazione del GSH che contribuisce a provocare danno ossidativo cellulare, ed in particolare endoteliale, nella sepsi grave e nello *shock* settico.

L'aumento della *cysteinyglycine* nel plasma, un prodotto intermedio del catabolismo del GSH, dà valore a questa ipotesi suggerendo che il metabolismo del GSH, nel suo ciclo biochimico, è alterato nella sepsi grave.

Dopo terapia con PMX-DHP si sono osservati livelli plasmatici aumentati di vitamina E e di cisteina totale ($p=0.043$ e $p=0.014$ rispettivamente) ed un aumento significativo di GSH, con valori in avvicinamento a quelli del gruppo controllo. Questo incremento è stato associato con un aumento di cisteina nel plasma, il precursore del GSH, suggerendo un miglioramento del ciclo metabolico del GSH. I livelli di NADPH e l'attività di GSH-Px, inoltre, sono aumentati dopo il secondo trattamento con PMX-DHP, ma l'incremento non è statisticamente significativo.

Questi risultati suggeriscono che la terapia con PMX-DHP può fornire protezione antiossidante ai pazienti settici con ripristino della "competenza energetica" della cellula.

I parametri cardiovascolari dimostrano una modulazione interessante dell'emodinamica notoriamente compromessa nella "tempesta" settica: durante e dopo il trattamento con PMX-DHP, la pressione arteriosa media, l'indice cardiaco e

le resistenze vascolari periferiche sono migliori, con drastica riduzione della richiesta clinica di infusione di amine simpaticomimetiche per il mantenimento di condizioni accettabili di perfusione d'organo e periferica (17).

Secondo la Tabella II, è evidente la dipendenza temporale fra la conclusione del trattamento di PMX-DHP e la riduzione/sospensione di Ne infusa, diminuita da 0.24 mcg/kg/min a 0.016 mcg/kg/min (-82%; $\pm 19\%$ DS) alla fine di PMX-DHP.

Si sottolinea anche l'aumento relativo della diuresi, probabilmente dovuta al miglioramento della macro/micro-circolazione dopo PMX-DHP: l'aumento medio è stato del 185%, comprendendo sia i pazienti superstiti che i deceduti. In questo contesto, i valori medi sono ancor più interessanti considerando che 4 di 6 pazienti erano trattati con CRRT (emofiltrazione veno-venosa continua, con emofiltrati in AN 69).

La valutazione quantitativa della espressione di CD64 di granulociti e monociti si è dimostrata valida nell'evidenziare e nel monitorare uno stato settico grave (35, 36). La misurazione di markers caratterizzati da notevole rapidità nella loro *up-* o *down-regulation*, quali CD64 su granulociti e monociti e HLA-DR su monociti maturi, CD14 positivi, può essere la scelta migliore, in accordo con le conoscenze più recenti (20).

I nostri risultati suggeriscono che PMX-DHP riduce i livelli di attività di PMNs e macrofagi nella produzione di citochine infiammatorie, come dimostrato dai livelli plasmatici misurati di CD64 e citochine. Il trattamento con PMX-DHP sembra essere quindi una procedura terapeutica in grado di invertire il flusso della "cascata settica" non

soltanto eliminando le endotossine circolanti ma inibendo l'attivazione di PMNs e monociti con riduzione del numero di monociti e PMNs attivati circolanti (esaminando al microscopio elettronico le fibre PMX-F, dopo trattamento con PMX-DHP, si è evidenziata una notevole capacità di adsorbimento selettivo, sulla fibra stessa, di PMNs e monociti attivati; Shoji H, comunicazione personale). L'effetto finale di tali capacità della PMX-DHP è quindi la riduzione del danno metabolico endoteliale dovuto a stress ossidativo acuto con ripresa della corretta biochimica cellulare nel processo respiratorio e di produzione di energia e riduzione delle anomalie di perfusione vascolare di organi ed apparati.

Riassunto

La mortalità per sepsi grave o *shock* settico è tra il 28 ed il 50%. Negli USA 200.000 pz/anno muoiono per sepsi. Le endotossine dei Gram- (lipopolisaccaride, LPS) attivano monociti e granulociti, con produzione di citochine pro-infiammatorie, danno endoteliale e microvascolare per stress ossidativo da aumentata espressione di *Nitric Oxide Synthase 3* (NOS3), generazione mitocondriale di *Reactive Oxygen Species* (ROS), fenomeni di perossidazione con citotossicità, aumento di permeabilità, danno di membrana endoteliale ed insufficienza multiorgano.

La pronta rimozione di endotossine circolanti con PMX-DHP riduce l'attivazione mono-granulocitaria con conseguente riduzione di citochine pro-infiammatorie, di danno endoteliale con stabilità del microcircolo vascolare. Viene presentato uno studio pilota, prospettico.

Due pz maschi e quattro femmine, età 60.5 ± 24.5 in UTI per sepsi severa o post-chirurgia per infezione intra-addominale. Due sedute di PMX-DHP di 2 ore cadauna, flusso ematico 100 ± 10 ml/min, effettuate entro 24 ore da diagnosi di sepsi severa o entro 12 ore dalla fine di intervento di chirurgia addominale; la prima PMX-DHP al tempo zero (T0), la seconda dopo 24 ore.

APACHE II score al T0: 20.1 ± 3.7 ; SOFA score 14.2 ± 2.5 ; organi insufficienti: 3 ± 1.5 ; norepinefrina (Ne) in 1 pz.; in 4

pz. Ne + dopamina (DA); in 1 pz. solo DA. Dosaggio medio: Ne 0.24 mcg/kg/min; DA 8.9 mcg/kg/min. Quattro pazienti in CRRT (emofiltrazione veno-venosa continua, emofiltro AN69) per tutta la durata dello studio. Dosaggio pre e post PMX-DHP di: endotossine plasmatiche, anti-IL1-beta, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF-alfa, GM-CSF, IFN-gamma, attivazione monocitaria e granulocitaria (espressione di CD64) con citometro a flusso; valutazione del "*redox environment*" pre e post PMX-DHP con dosaggio di nucleotidi ossidati (NADP) e ridotti (NADPH), tioli, vitamina E, vitamina C; glutatione perossidasi (GSH-Px), Glutatione intraeritrocitaria (eGSH) e GSH reduttasi (GSH-Rx). Confronto di tutti i risultati con i medesimi di coorte di 15 soggetti sani. Registrazione degli usuali dati emodinamici e respiratori.

Risultati: Riduzione significativa dei livelli circolanti di endotossine; deattivazione di macrofagi e granulociti con CD64 a livelli di norma; riduzione di IL6, IL10 and TNF-alfa. Aumento di Vit. E e cisteina totale plasmatica; livelli di NADPH e GSH-Px migliorati.

Non variazioni di anti-IL1-beta, IL2, IL4, IL5, IL8, GM-CSF, IFN-gamma. SOFA score ridotto: 8.9 ± 2.1 ; incremento della pressione arteriosa media; riduzione supporto con amine; incremento diuresi. Mortalità effettiva 33% vs attesa del 51%.

Conclusioni: Nei pazienti esaminati PMX-DHP, riducendo i livelli circolanti di endotossine, ha ridotto la gravità della cascata settica come dimostrato dal grado di attivazione mono e granulocitaria, da ripresa di corretto metabolismo ossido-riduttivo con protezione cellulare endoteliale e del microcircolo e con miglioramento del quadro clinico e della sopravvivenza attesa.

Indirizzo degli Autori:

Dr. Angelo F. Perego

Nefrologia e Dialisi

A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda

20125 Milano

e-mail: angeloperego@hotmail.com

Bibliografia

- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
- Cavaillon JM. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines as Mediators of Gram-Negative Sepsis. In: *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*, edited by Kotb M and Calandra T, Totowa (NJ, USA), Humana Press, 2003, 33-57.
- Lepper PM, Held TK, Schneider EM, Bolke E, Gerlach H, Trautmann M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 2002; 28: 824-33.
- Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99: 169-75.
- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999; 340: 207-14.
- De Vriese AS, Colardyn FA, Philippe JJ, Vanholder RC, De Sutter JH, Lameire NH. Cytokine removal during continuous

- hemofiltration in septic patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 846-53.
7. Stuart-Smith K. Demystified. Nitric oxide. *Mol Pathol* 2002; 55: 360-6.
 8. Shoji H, Tani T, Hanasawa K, Kodama M. Extracorporeal endotoxin removal by Polymyxin-B immobilized fiber cartridge: designing and antiendotoxin efficacy in the clinical application. *Ther Apher* 1998; 2: 3-12.
 9. Cohen J, Aslam M, Pusey CD, Ryan CJ. Protection from endotoxemia: A rat model of plasmapheresis and specific adsorption with polymyxin B. *J Infect Dis* 1987; 155: 690-5.
 10. Hanasawa K, Tani T, Oka T, et al. Experimental study of endotoxin adsorption using polymyxin B immobilized fiber. *Jpn J Artif Organs* 1984; 13: 825-9.
 11. Kodama M, Tani T, Hanasawa K, et al. Treatment of sepsis by plasma endotoxin removal: hemoperfusion using a polymyxin-B immobilized column. *J Endotoxin Res* 1997; 4: 293-300.
 12. Tani T, Hanasawa K, Endo Y, et al. Therapeutic apheresis for septic patients with organ dysfunction: hemoperfusion using a polymyxin B immobilized column. *Artif Organs* 1998; 22: 1038-44.
 13. Tani T, Hanasawa K, Kodama M, et al. Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines, and plasminogen activator inhibitor-1 activities in septic patients. *World J Surg* 2001; 25: 660-8.
 14. Nemoto H, Nakamoto H, Okada, H et al. Newly developed immobilized polymyxin B fibers improve the survival of patients with sepsis. *Blood Purif*. 2001; 19:361-8.
 15. Nakamura T, Matsuda T, Suzuki Y, Shoji H, Koide H. Polymyxin B-Immobilized fiber hemoperfusion in patients with sepsis. *Dialysis & Transplantation* 2003; 32: 602-7.
 16. Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, Kodama M. Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res* 2001; 100: 127-34.
 17. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J, et al. A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock* 2005; 23: 400-5.
 18. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12: 1035-44.
 19. Maruyama I. Molecular basis of the polymyxin-B immobilized hemoperfusion column. *Jap J Apheresis* 2001; 20: 69-74.
 20. Ono S, Tsujimoto H, Matsumoto A, Ikuta S, Kinoshita M, Mochizuki H. Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg* 2004; 188: 150-6.
 21. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 70-6.
 22. Hultqvist M, Hegbrant J, Nilsson-Thorell C, et al. Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* 1997; 47: 37-46.
 23. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
 24. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-90.
 25. Stocchi V, Cucchiaroni L, Magnani M, Chiarantini L, Palma P, Crescentini G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem* 1985; 146: 118-24.
 26. Accinni R, Campolo J, Bartesaghi S, et al. High-performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. *J Chromatogr A* 1998; 828: 397-400.
 27. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-6.
 28. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
 29. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 437-55.
 30. Wei XQ, Charles IG, Smith A, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-11.
 31. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-50.
 32. Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 97: 10688-92.
 33. Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 2000; 13: 413-24.
 34. Winnefeld K, Schirrmeister W, Thiele R, Sperschneider H, Klinger G. Selenium and antioxidant status in various diseases. *Med Klin (Munich)* 1995; 90 (Suppl 1): S7-9.
 35. Fischer G, Schneider M, Moldawer LL, et al. CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2001; 27: 1848-52.
 36. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 258-65.