

Effekten av C1-inhibitor på *E.coli*- og LPS-indusert "tissue factor" i humant fullblod

Anne Landsem

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell

Innlevert: Mai 2012

Hovedveileder: Berit Johansen, IBI

Medveileder: Ole-Lars Brekke, NLSH, Bodø
Hilde Fure, NLSH, Bodø
Tom Eirik Mollnes, NLSH, Bodø

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Innhold

Innhold	I
Forord.....	IV
Forkortelser	V
Sammendrag	VIII
1. Introduksjon	1
2. Teori og bakgrunn	2
2.1 Hva er sepsis?.....	2
2.1.1 Nye terapeutiske muligheter	2
2.2 Medfødt immunitet.....	3
2.2.1 Reseptorer	4
2.2.2 Monocytter og nøytrofile granulocytter.....	4
2.3 Inflammatoriske mediatorer.....	5
2.3.1 Cytokiner.....	5
2.3.2 Lang Pentraxin 3 (PTX3).....	6
2.4 Komplement- og koagulasjonssystemene.....	7
2.4.1 Komplement.....	7
2.4.2 Koagulasjon og kallikrein-kininsystemet.....	10
2.4.3 Antikoagulasjonsmekanismer	11
2.4.5 Sammenheng mellom komplement- og koagulasjons-systemene.....	13
2.5 TF	15
2.5.1 TF og koagulasjon	15
2.5.2 Inflammasjonsmediert ekspresjon av TF	15
2.5.3 TF og PAR	16
2.6 C1-INH	16
2.6.1 C1-INH som akutfaseprotein.....	16
2.6.2 C1-INH som proteasehemmer	17
2.6.3 C1-INH og komplementsystemet	17
2.6.4 C1-INH og koagulasjonssystemet	17
2.6.5 C1-INH og kallikrein-kininsystemet	18
2.6.6 Andre biologiske effekter av C1-INH	19
2.6.7 Proteolytisk nedbrytning av C1-INH	19
2.6.8 Nye terapiområder for C1-INH?	20

2.7 Compstatin.....	20
2.7.1 Compstatin som terapi?.....	21
2.8 Prosjektets hypoteser.....	21
2.8.1 Hovedhypotese: C1-INH vil ha en hemmende effekt på koagulasjonsaktivering.	21
2.8.2 Underhypotese: Koagulasjonsaktivering er induert av komplementaktivering.	22
2.9 Prosjektets modell: Fullblodsmodell.....	22
3. Materiale og metode.....	23
3.1 Forstudie: Tidsstudie av TF.....	23
3.1.1 Hensikt.....	23
3.1.2 Gjennomføring.....	23
3.2 Fullblodsmodell.....	23
3.2.1 Begrensninger ved metoden.....	24
3.2.2 Fordeler med fullblodsmodellen.....	25
3.3 Reagenser og utstyr.....	25
3.4 ELISA, enzym bundet immunosorbent analyse.....	25
3.4.1 Protrombin faktor 1+2.....	26
3.4.2 Det terminale komplementkomplekset (TCC).....	27
3.4.3 Lang pentraxin 3 (PTX3).....	27
3.5 Cytokin analysing på Multiplex teknologi.....	27
3.6 Analysing av TF mRNA.....	28
3.6.1 Lysering av celler.....	28
3.6.2 Ekstraksjon.....	28
3.6.3 Konsentrasjonsmåling av RNA.....	28
3.6.4 cDNA.....	28
3.6.5 RT-qPCR.....	29
3.7 Kvantitering av TF på celleoverflaten ved hjelp av flowcytometri.....	31
3.8 TF funksjon i plasma mikropartikler.....	32
3.9 Statistikk.....	32
4. Resultater.....	32
4.1 Resultater fra forstudien.....	32
4.2 Resultater fra hovedstudien.....	33
5. Diskusjon.....	34
Referanser.....	40
Manuskript til artikkel.....	53

Forord

Forskningsarbeidet bak denne *E. coli* oppgaven ble gjennomført på Forskningslaboratoriet, Somatisk Forskningsssenter ved Nordlandssykehuset i perioden mellom februar 2010 og juni 2012. Det er blitt mange timer på laboratoriet og foran datamaskinen. Det har vært en spennende, men krevende tid. Det hadde ikke vært mulig å gjennomføre dette prosjektet uten støtte fra alle dere som har hjulpet meg. Dette gjelder både planlegging og gjennomføring av selve oppgaven, men også engasjement og oppmuntring underveis.

Forskningsgruppen jeg har jobbet sammen med har vært engasjerte, positive og hjelpsomme medarbeidere. Tusen takk til Hilde Fure som har veiledet det praktiske arbeidet. Hun har stilt villig opp og bistått med opplæring. Hun har vært en god støtte i hele prosjektet. Tusen takk til Ole-Lars Brekke som har vært hovedveileder for oppgaven. Han har bidratt med ekspertise kunnskap på TF og koagulasjon. Dessuten har han gitt opplæring i statistiske hjelpemidler og gitt nyttige innspill på oppbygging og struktur av både artikkel og oppgave. Tusen takk til Erik Waage Nielsen som har vært en god kilde til kunnskap spesielt på C1-inhibitor. Han har i tillegg vært min dataekspert. Tusen takk til Tom Eirik Mollnes som i tillegg til å bidra med sin enorme kunnskap innenfor komplementsystemet har vært en positiv inspirator med et glødende engasjement. Takk til Dorte Christiansen som har bidratt med betydelig erfaring og kompetanse innenfor flowcytometri. Takk til Judith Krey Ludviksen og Grethe Bergseth som også har bidratt med både opplæring og gjennomføring av analyser, selv om de formelt ikke har vært veiledere for meg. Takk til Berit Johansen ved NTNU som hjalp meg med det praktiske ved gjennomføringen av studiet i Bodø. Takk til Bjarne Østerud ved Universitetet i Tromsø som sørget for å få analysert TF funksjon, da dette ikke utføres i Bodø. Det har vært mange veiledere i dette prosjektet. Alle har gitt av sin tid og kunnskap for å hjelpe meg til å nå målet. Jeg er dypt takknemlig og vil igjen rette en hjertelig takk til dere alle!

Tusen takk til mamma og pappa, som har bidratt med motivasjon når det toppet seg med utfordringer og det hele så uoverkommelig ut. Takk til Gøril, min kjære søster som sørget for at jeg også i de hektiske periodene av studietiden har hatt ett sosialt liv. Hun har dessuten bidratt med oppmuntring og gode råd.

Takk til både ledelse og kollegaer ved Avdeling for Laboratorie Medisin som har vist interesse for prosjektet og velvilje for tilrettelegging av mine behov for redusert arbeidstid.

Anne Landsem, Bodø, mai 2012

Forkortelser

a	Aktivert koagulasjonsfaktor
AMD	Aldersrelatert makuladegenerasjon
ANOVA	Analyse av varians mellom grupper
APC	Aktivert protein C
Arg	Arginin
AT	Antitrombin
C	Komplementfaktor
C1-INH	C1-hemmer
CD	Gruppe av differensieringer
C5aR	C5a reseptor
cDNA	Komplementært DNA
CRP	C-reaktivt protein
DAMP	Fare-assosiert molekylært mønster
DIC	Disseminert intravaskulær koagulasjon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPCR	Endotel protein C reseptor
FITC	Fluorescein isothiocyante
FPR1	Formyl peptid reseptor 1
FSAP	Factor VII aktiverende protease
F + romertall	Koagulasjonsfaktor
GAG	Glykosaminoglykaner
HAE	Arvelig angioødem

HMWK	Høymolekylært kininogen
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysakkarid
MAC	Membran angrepskompleks
MASP	MBL assosiert serin protease
MBL	Mannosebindende lektin
MFI	Median fluorescens intensitet
mRNA	Budbringer RNA
NF- κ B	Nukleær faktor kappa B
PAI	Plasminogen aktivator hemmer
PAMP	Patogen assosiert molekylært mønster
PAP	Plasmin-alfa-2-antiplasmin kompleks
PAR	Protease aktivert reseptor
PE	Phycoerythrin
PNH	“Paroxysmal nocturnal hemoglobinuri”
PRR	Mønster gjenkjenningsreseptor
PTX3	Pentraxin 3
qPCR	Kvantitativ real-time PCR
REK	Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
rhTFPI	Human rekombinant vevsfaktor aktiveringsvei hemmer
ROI	Reaktive oksygen intermediater
RT-qPCR	Kvantitativ real-time PCR

SAP	Serum amyloid P komponent
SIRS	Systemisk inflammatorisk respons syndrom
TAFI	Trombin aktiverende fibrinolyse hemmer
TAT	Trombin/antitrombin kompleks
TCC	Terminalt komplement kompleks C5b-9
TF	”Tissue factor”, vevstromboplastin, vevsfaktor
TFPI	Vevsfaktor aktiveringsvei hemmer
Thr	Threonin
TIR	Toll/interleukin-1 reseptor
TLR	Toll like reseptor
TM	Trombomodulin
TNF- α	Tumor nekrose faktor alfa
t-PA	Vevsplasminogen aktivator

Sammendrag

Sepsis er fortsatt en alvorlig tilstand med høy mortalitet, til tross for mange år med intens forskning. Ved sepsis er det en systemisk inflammasjonsreaksjon som involverer komplement, koagulasjons- og kallikrein-kininsystemet. Den økte prokoagulante tilstanden som blant annet skyldes økt uttrykk av vevsfaktor (TF) vil bidra til disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC) og organsvikt. Det ble i denne studien undersøkt hvilken effekt C1-inhibitor (C1-INH) har på koagulasjonsaktiveringen ved Gram-negativ sepsis i en human fullblodsmodell. C3 hemmeren compstatin ble brukt for å sammenligne effekten av C1-INH med en ren komplementhemmer. Dette gjorde det mulig å studere om koagulasjonsaktiveringen i modellen er komplementmediert.

Det ble benyttet en godt etablert human fullblodsmodell med *E. coli* og rensket lipopolysakkarid (LPS) fra *Escherichia coli* (*E. coli*) som stimuli. Antikoagulanten lepirudin ble benyttet. Denne har ingen innvirkning på komplementaktiveringen og hemmer koagulasjonsaktiveringen ved å hemme trombin direkte. Prøvene ble inkubert med stimuli og hemmere i 60 eller 120 minutter. Koagulasjonsaktiveringen ble målt som protrombin faktor 1 og 2 (protrombin F1+2) med ELISA. Relativ ekspressjon av TF mRNA ble bestemt ved hjelp av RT-qPCR. Det ekstracellulære TF uttrykket på bla. monocytter ble målt ved hjelp av flowcytometri. Aktiviteten av TF i plasma mikropartikler ble bestemt med en enzymatisk metode. Det terminale komplement komplekset (TCC) og lang pentraxin 3 (PTX3), en inflammatorisk mediator, ble målt med ELISA. En rekke (27) cytokiner i plasma ble analysert med multiplex teknologi.

Både C1-INH og compstatin hemmet effektivt koagulasjonsaktiveringen målt som protrombin F1+2 etter tilsetning av *E. coli* og LPS i humant fullblod. Både *E. coli* og LPS stimuli ga økt nivå av membranbundet TF på overflaten av monocytter, TF mRNA og TF funksjon i plasmamikropartikler. Denne økningen av TF ble effektivt redusert av C1-INH. Compstatin hemmet til sammenligning TF mRNA oppregulering og TF uttrykket på monocytt-overflaten, men ga en ikke-signifikant hemming av TF funksjon i plasmamikropartikler. *E. coli* induert komplementaktivering målt som TCC ble også effektivt redusert både av C1-INH og compstatin. C1-INH reduserte syntesen av PTX3 og cytokiner, mens compstatin til sammenligning kun reduserte IL-8 nivået. Inaktivert C1-INH reduserte også *E. coli* og LPS-indusert koagulasjonsaktivering.

Resultatene viser at C1-INH i høye konsentrasjoner kan redusere *E. coli* og LPS-indusert oppregulering av TF og koagulasjonsaktivering. Compstatin reduserte også *E. coli* og LPS-indusert oppregulering av TF uttrykk og koagulasjonsaktivering. Dette kan indikere at komplementaktivering spiller en viktig rolle for koagulasjonsaktiveringen under en Gram - negativ sepsis.

1. Introduksjon

Det er et stort behov for dypere forståelse av de patologiske prosessene ved sepsis (blodforgiftning) for å bedre prognosen. Letaliteten ved sepsis er fortsatt 20- 40 % til tross for antibiotikabehandling [1]. Det er gjort flere forsøk på å bedre dagens behandling, uten at dette har gitt en signifikant reduksjon av letaliteten ved sepsis. Det er vist at komplement-systemet, kallikrein-kininsystemet og koagulasjonssystemet er aktivert ved sepsis. Det er uklart om koagulasjonsaktivering som noen ganger oppstår ved sepsis skyldes en inflammasjonsprosess og i hvilken grad komplementsystemet bidrar. Det er gjort forsøk i ulike in vitro studier og dyremodeller på å hemme komplementaktivering, cytokinsyntesen og koagulasjonsaktivering på ulike måter, bla. ved bruk av antikoagulasjonsmekanismer.

C1-INH er en viktig regulator av komplementsystemet, men har også en regulerende rolle innenfor kallikrein-kininsystemet og den indre koagulasjonsaktivering. Dessuten har det vist seg at C1-INH har flere andre anti-inflammatoriske egenskaper som reduksjon av proinflammatoriske cytokiner, direkte binding til endotoksin (LPS) og Gram-negative bakterier. C1-INH bremser også leukocyttenes rulling og forflytning til inflammasjonsstedet [2]. Det er også gjort studier både i dyremodeller og i mennesker som viser at C1-INH reduserer mortaliteten ved sepsis [3;4]. Det er uklart hvilke mekanismer eller egenskaper ved C1-INH som er årsak til denne positive effekten. En mulighet er at C1-INH har en regulerende effekt også på koagulasjonssystemet ved sepsis. Arvelig angioødem (HAE) er en dominant arvelig tilstand med nedsatt C1-INH konsentrasjon og funksjon. Flere studier har vist at det ved HAE anfall skjer en aktivering av koagulasjonssystemet [5;6]. Dersom tilført C1-INH kan forhindre koagulasjonsaktivering ved en systemisk immunaktivering, vil en kunne redusere mortaliteten ved å redusere forekomsten av komplikasjoner som DIC og multiorganskade. TF blir ansett for å være hovedfaktoren for sepsisindusert DIC [7].

I denne studien valgte vi å undersøke effekten av C1-INH og komplementhemmeren compstatin på LPS- og *E. coli*-indusert TF oppregulering, ettersom TF trolig er sentral i koagulasjonsaktivering ved sepsis. TF aktiverer den ytre koagulasjonsaktiveringsveien og uttrykkes av aktiverte monocytter og endotelceller. TF er trolig en av flere forbindelser mellom komplement- og koagulasjonskaskadene. Hele *E. coli* bakterier og ultrarensset LPS ble tilsatt til ferskt humant fullblod. Effekten av C1-INH på TF oppregulering ble sammenlignet med den velkjente komplementhemmeren compstatin, som hemmer C3 konvertasen direkte.

TF mRNA, TF uttrykk på monocytter og TF funksjon i plasma mikropartikler ble målt i ustimulerte, stimulerede og prøverør tilsatt hemmere. TF genekspressjon på mRNA nivå ble målt med sanntids PCR. TF protein uttrykt ekstracellulært på monocyttene ble målt med væskestrømscytometri og TF funksjon av plasma mikropartikler ble målt med en enzymatisk metode. Protrombin F1+2 ble målt med ELISA som mål på koagulasjonsaktivering. I tillegg ble en rekke cytokiner og langt pentraxin 3 (PTX3) analysert med immunoassay.

Vi postulerte at C1-INH og compstatin har en effekt på LPS- og *E. coli*-indusert TF uttrykket og også på koagulasjonsaktivering. Sammenligningen mellom C1-INH og compstatin ble gjort bla. for å undersøke om aktiveringen av koagulasjonen er komplementmediert. Prosjektets hovedhypoteser er:

-C1-INH hemmer LPS- og *E. coli*-indusert koagulasjonsaktivering

-Koagulasjonsaktivering ved sepsis er indusert av komplementsystemet.

2. Teori og bakgrunn

2.1 Hva er sepsis?

I de fleste tilfeller av sepsis er årsaken bakteriemi, men sepsis kan også skyldes sopp eller virus. Diagnosen sepsis stilles fortsatt hovedsakelig ut fra kliniske kriterier på puls, respirasjonsfrekvens, blodtrykk osv. [8]. Sepsis er en tilstand der infeksjonen har spredt seg til blodsirkulasjonen og komplement, koagulasjon og kallikrein-kininsystemet vil være aktivert [9;10]. Immunresponsen akselererer og forårsaker fysiske endringer i homeostasen, som blodtrykk og væskevolum. Multiorgan svikt og død er de alvorligste konsekvensene av et inflammatorisk system i ubalanse [11;12].

Systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) er karakterisert av en systemisk immunrespons, der spesifikke endringer i temperatur, hjerterefrekvens, respirasjonsfrekvens og leukocyt antallet i fullblod er kriterier på SIRS. Diagnosen stilles dersom minst to av SIRS-kriteriene innfris. Dersom immunresponsen er forårsaket av en infeksjon diagnostiseres tilstanden som sepsis [13].

2.1.1 Nye terapeutiske muligheter

Tradisjonell behandling av sepsis med antibiotika, vasopressor og intravenøs væske er i mange tilfeller ikke tilstrekkelig. Det er fremdeles høy mortalitet ved sepsis [14]. Den prokoagulante tilstanden ved sepsis skyldes trolig flere forhold, som oppregulering av TF,

svekkelse av antikoagulante mekanismer som vevsfaktor aktiveringsvei hemmer (TFPI), protein C og antitrombin. Dessuten vil fibrinolytiske mekanismer være nedregulert [12]. Det er gjort flere forsøk på å finne en optimal måte å hemme økt koagulasjonsaktivering ved sepsis. Aktivering av koagulasjon kan gi alvorlige konsekvenser som DIC og multiorgan svikt. DIC er en tilstand med utbredt trombedannelse, og ofte påvises lavt antall blodplater og lavt fibrinogen som sammen med høyt forbruk av koagulasjonsfaktorer kan medføre økt blødningsrisiko. Fibrinavleiring i årene kan også bidra til utvikling av organsvikt [15].

Det er gjort flere studier med endogene antikoagulanter som tilleggsbehandling for sepsis, bla. med aktivert protein C (APC). APC er en viktig antikoagulant, som i tillegg har antiinflammatoriske og antiapoptotiske egenskaper. Forsøk med APC som behandling for sepsis viste en lett redusert mortalitet, men økte risikoen for blødninger for pasienter med predisponible forhold [16]. Den reduserte mortaliteten er ikke blitt bekreftet i nyere studier. Preparatet Xigris som består av rekombinant humant aktivert protein C, er derfor blitt trukket tilbake fra markedet [17].

Rekombinant vevsfaktor aktiveringsvei hemmer (rhTFPI) gav i museforsøk med *Streptococcus pneumoniae*-indusert pneumoni redusert koagulasjonsaktivering. Behandling uten antibiotika viste at rhTFPI hemmet inflammasjon og bakterievekst [18]. rhTFPI reduserte imidlertid ikke mortaliteten hos pasienter med alvorlig sepsis og høy INR [19].

Det er også gjort forsøk på å hemme dannelsen av kompleks TF-faktor VIIa (TF-FVIIa) ved hjelp av monoklonale antistoff mot TF. Antistoffet vil blokkere for binding mellom FVII og TF som starter den ytre koagulasjonsaktiveringsveien. Dette reduserte de letale effektene av *E. coli* sepsis i en dyremodell med bavian [20].

Flere studier viser at C1-INH har en regulerende rolle i koagulasjonsaktiveringen. C1-INH har også vist seg å ha flere antiinflammatoriske effekter [21]. C1-INH omtales nærmere i avsnittet 2.6.

2.2 Medfødt immunitet

Immunforsvaret består av to hovedsystemer. Det medfødte (innate immunity) og det ervervede (adaptive immunity) immunsystem. I dette prosjektet ble bare det medfødte immunsystem studert og det beskrives derfor nærmere. Det medfødte immunsystem utgjør førstelinjeforsvaret til organismen, da det reagerer raskt på patogene inntrengere. Systemet inkluderer fysiske, kjemiske og cellulære barrierer. De fysiske barrierene er blant annet hud,

flimmerhår og slimhinner som beskytter organismen mot omgivelsene. Eksempler på kjemisk barrierer er magesyre og løselige molekyler som har antimikrobiell effekt. Når patogene organismer trenger gjennom den fysiske barrieren vil det cellulære forsvaret aktiveres. Dette skyldes aktivering av reseptorer som gjenkjenner ulike patogene strukturer. Det medfødte immunsystem sørger for å identifisere og merke inntrengerne slik at disse fjernes ved hjelp av komplementsystemet, fagocytterende celler eller av det ervervede immunsystemet ved hjelp av antistoffer [22]. Komplementsystemet vil bli omtalt nærmere i avsnitt 2.4.1.

2.2.1 Reseptorer

Mønster-gjenkjenningsreseptorer eller "Pattern Recognition Receptors" (PRR) gjenkjenner alarminer og bevarte patogen-assosierte molekulære mønster eller "Pathogen Associated Molecular Patterns" (PAMP). Alarminer er molekyler som produseres som følge av stress eller ødeleggelse av vev. Dette kan skyldes brannskader, traumer eller andre forhold som endrer homeostasen. Fareassosierte molekulære mønster eller "Danger Associated Molecular Patterns" (DAMPs) er en samlebetegnelse for PAMP, eksogene molekyler fra mikroorganismer og alarminer, endogene molekyler [23]. De to viktigste PRR familiene er toll like reseptor (TLR) og NOD like reseptor (NLR). Reseptorene gjenkjenner ulike patogene strukturer og binding til disse reseptorene medfører aktivering av immunforsvaret. Det er i tillegg beskrevet 11 ulike "Toll-like Receptors" (TLR) hos mennesket [24]. Disse ligner hverandre i oppbygging, men har forskjellig ligand spesifisitet og er lokalisert på ulike steder i cellen. TLR4 er en transmembranreseptor med spesifisitet for LPS, og vil derfor være aktivert ved sepsis [25;26]. Aktivering av TLR4 vil medføre aktivering av transkripsjonsfaktorer som for eksempel NF- κ B. Dette medfører oppregulering av gener som er viktige i en inflammasjonsprosess, som adhesjonsmolekyler eller cytokiner som TNF- α og IL-6 [24]. NLR er intracellulære reseptorer som er lokalisert i cytoplasmaet. Disse reseptorene er involvert i detektering av alarminer og PAMP som har klart å komme seg inn i cellen [11].

2.2.2 Monocytter og nøytrofile granulocytter

Det er mange celler som er involvert i det medfødte immunsystem. Monocytter, makrofager, dendritiske celler, nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter tilhører dette systemet. I tillegg inkluderes naturlig dreper celler og mastceller. I dette prosjektet ble det jobbet med monocytter og nøytrofile granulocytter, det vil derfor følge en nærmere beskrivelse av disse cellene.

Monocyttene dannes i beinmargen og oppholder seg i blodbanen en kort tid før de vandrer ut i vevet og differensieres til makrofager. Monocyttene kan uttrykke TF som følge av ulike stimuli [27]. Makrofager er i en hvilende tilstand før de aktiveres av ulike stimuli. På celleoverflaten har de flere reseptorer der noen binder cytokiner utskilt fra andre celler, mens TLR gjenkjenner ulike patogene strukturer. Ved aktivering med bakterier vil makrofagene få økt fagocytisk aktivitet og utskille en rekke inflammatoriske mediatorer, bla. cytokiner. IL-1 β , TNF- α , og IL-6 er noen av cytokinene som produseres av makrofager [22]. Makrofagene utgjør en viktig forbindelse mellom de to immunsystemene. Aktivering øker ekspressjon av MHC klasse II molekyler, som igjen fører til økt antigenpresentasjon til T_H-celler. Aktiverte makrofager produserer også reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser som er antimikrobielle substanser. Komplementproteiner produseres i leveren, men noen slike proteiner kan også syntetiseres av makrofager.

Nøytrofile granulocytter er de første cellene som ankommer infeksjonsstedet etter å ha forlatt blodårene og vandret gjennom vevet [22]. Nøytrofile granulocytter kan fagocyttere bakterier, i tillegg til å produsere og frigjøre lytiske enzymer, antimikrobielle peptider og reaktive oksygenintermediater (ROI). Den fagocytterende evnen forbedres betraktelig dersom den patogene strukturen har bundet antistoff og/eller komplement [22]. I cellemembranen har de flere ulike PRR, som TLR, formyl peptid reseptor 1 (FPR1) og andre reseptorer for å detektere patogene strukturer [28].

Aktiverte endotelceller uttrykker selektiner og andre adhesjonsmolekyler som er avgjørende for transmigrasjon av nøytrofile granulocytter. Granulocyttene ruller deretter med lavere hastighet langs åreveggen, slipper gjennom endotelet og trenger inn til inflammasjonsstedet. E- og P-selektiner har viktige roller i starten av denne prosessen [29].

2.3 Inflammatoriske mediatorer

2.3.1 Cytokiner

Cytokiner er peptider med lav molekylvekt [30]. Cytokiner utskilles fra leukocytter og andre celler ved ulike stimuli. De kan virke autokrint, målcellen er da den samme som produsenten eller parakrint, målcellen er da en celle som er i nærheten av cellen som skiller ut cytokinet. De færreste cytokinene virker endokrint, mottakercellen ligger som oftest fjernt fra cellen som har produsert cytokinet. Cytokinene fraktes da via blodbanen eller andre kroppsvæsker. Cytokinenes halveringstiden er kort, men reseptorene til de ulike cytokinene har høy affinitet til cytokiner og selv konsentrasjoner på pikogramnivå vil ha biologisk effekt. Binding av

cytokiner til reseptorene vil trigge en signaloverføring og dette vil endre det genetiske uttrykket til cellen. Cytokinene er blant annet med og kontrollerer cellulær proliferasjon og differensiering. De er involvert i induksjon av inflammatoriske prosesser og utviklingen av cellulære og humorale immunresponser [22]. Proinflammatoriske cytokiner som TNF- α , IL-1 β , IL-12 og IFN- γ øker inflammasjonen. IL-8 er også et viktig proinflammatorisk kjemokin. Til sammenligning reduserer IL-4, IL-10 og IL-13 inflammasjonsprosessen og produksjon av proinflammatoriske cytokiner. Proinflammatoriske cytokiner kan også hemmes av løselige hemmere som IL-1 reseptor antagonist (IL-1ra) og IL-1 reseptorer. De fleste celler uttrykker reseptorer for cytokiner [13].

2.3.2 Lang Pentraxin 3 (PTX3)

PTX3 er et akutfaseprotein som tilhører pentraxin familien. CRP (C reaktivt protein) og SAP (serum amyloid P komponent) er korte pentraxiner, mens PTX3 er et langt pentraxin protein. Genet for PTX3 er plassert på kromosom 3, q24-q26 [31]. PTX3 er strukturelt relatert til de korte pentraxinene, CRP og SAP, ved den karboksyterminale delen av molekylet. Den 174 aminosyrelange terminale delen av PTX3 skiller seg derimot fra de andre to og det er ingen homogenitet mellom denne delen av PTX3 og andre kjente proteiner [31;32]. PTX3 er et glykoprotein med molekylvekt på 45kD, proteinet danner et stort multimer kompleks. Komplekset er sammenbundet med disulfid bindinger [33].

CRP produseres av hepatocytter, mens PTX3 produseres av flere ulike celler. Dendritiske celler og mononukleære fagocytter er blant cellene som produserer PTX3 [34;35]. Studier har vist at nøytrofile granulocytter ikke selv produserer PTX3, men har granula med monomer PTX3 som i ekstracellulært miljø danner multimer PTX3 [36]. PTX3 er et multifunksjonelt protein som blant annet er involvert i immunforsvaret, oppbygging av den ekstracellulære matriksen og kvinnelig befruktningsevne [37;38]. Det vil her fokuseres på rollen til PTX3 i immunforsvaret.

Konsentrasjonen av PTX3 i serum ligger normalt under 2 ng/ml, mens nivået ved infeksjon, inflammasjon, sepsis eller endotoxin sjokk kan øke til 200-800 ng/ml [32]. Denne økningen skjer raskt og korrelerer ikke med CRP-stigningen. Nivået av PTX3 korrelerer i noen tilfeller med alvorlighetsgrad eller sykdomsaktivitet [39]. PTX3 induseres av proinflammatoriske stimuli som LPS, IL-1 β og TNF- α [31;35].

PTX3 ser ut til å spille en dobbelrolle i beskyttelse mot patogener og kontroll av autoimmunitet. PTX3 bidrar til fjerning av patogener ved fagocytose. Ved opsonisering av

sopp, virus og utvalgte bakterier øker fagocytoseaktiviteten [32]. PTX3 hindrer inflammatorisk opptak av seint apoptotiske celler, og forhindrer dermed antigen presentasjon av selv-proteiner for antigen presenterende celler som dendritiske celler. Dette kan gi en beskyttelse mot autoimmune reaksjoner [40].

PTX3 øker transkripsjon av TF

Napoleone et al. viste i 2002 at endotelceller som ble stimulert med PTX3 i tillegg til andre stimuli som LPS, IL- β eller TNF- α fikk økt uttrykk av TF [41]. Transkripsjonsfaktoren til TF er c-Rel/p65. Denne er inaktiv så lenge den er bundet til I κ B α . Dersom LPS bindes til reseptorer på monocyttenes cellemembran aktiveres en protein kinase kaskade. Denne aktiveringen fører til at I κ B α fosforyleres. Dermed aktiveres c-Rel/p65 og transkripsjonsfaktoren kan fritt forflytte seg til nucleus og bindes til promotor for TF [42]. Forsøk med inkubering av LPS sammen med PTX3 har gitt en økt fosforylering av I κ B α , og en økt transkripsjon av TF i monocytter [43].

Interaksjoner mellom PTX3 og MBL

Nylige studier har vist at PTX3 er involvert i kommunikasjonen mellom klassisk og lektin komplementaktiveringsvei. Mannosebindende lektin (MBL) binder seg til patogene strukturer som LPS. PTX3 bindes til MBL og i nærvær av C1q øker komplementaktivering via klassisk komplementaktiveringsvei [44].

2.4 Komplement- og koagulasjonssystemene

2.4.1 Komplement

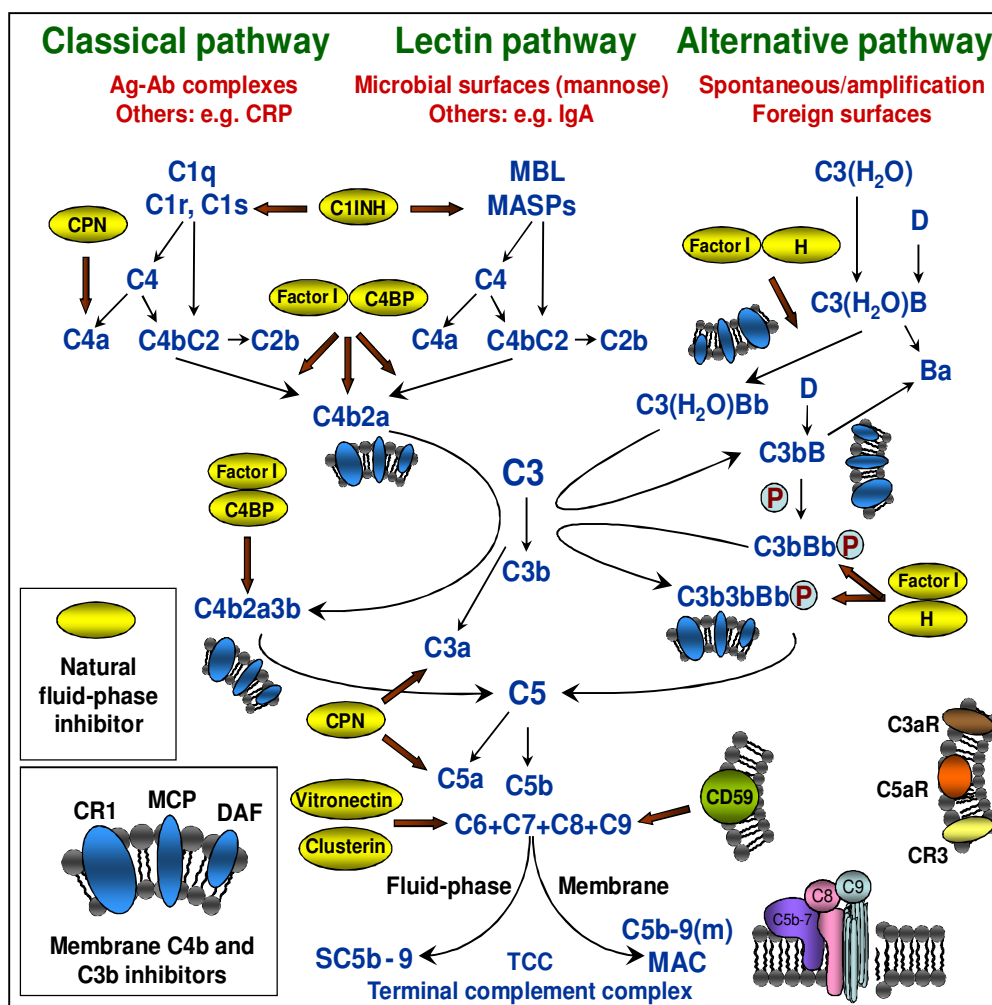
Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet. Dette systemet har flere mekanismer for å forsvare organismen mot bla. infeksjon.

- Oponisering av mikrober.
- Kjemotakse, hovedsakelig via C5a, som aktiverer og rekrutterer celler til inflammasjonsstedet.
- Lysering av bakterier og celler ved hjelp av det terminale komplementkomplekset C5b-9 som penetrerer membraner.
- Fjerning av immunkomplekser fra sirkulasjonen ved opsonisering og opptak i milt og lever.
- Regulering av celler i immunforsvaret ved binding til spesifikke komplement reseptorer. [45].

Komplementsystemet består av over 30 proteiner i plasma og på celleoverflater [45]. Aktiveringsproduktene omfatter anafylatoksinene C3a, C4a, C5a og dannelsen av et kompleks som kan angripe membranen [46]. Betegnelsen terminalt komplementkompleks (TCC) benyttes både for komplekser som er løselig og membranbundne. Det membranbundne komplekset kalles også membran angrepskompleks (MAC). TCC er et kompleks av komplementfaktorene C5b-C9 og kan medføre lysing av cellen eller bakterien. Komplementkomponenter vil også opsonisere patogene strukturer som igjen kan fagocytteres av makrofager og nøytrofile granulocytter. Anafylatoksinene vil virke kjemotaktisk og rekruttere leukocytter til inflammasjonsstedet. Dessuten vil komplementsystemet regulerer den adaptive immunresponsen. Den immunologiske hukommelsen og produksjonen av antistoff økes ved at C3b og C4b bindes til komplementreseptorer på follikulære dendritiske celler, B-celler og andre fagocytterende celler. Komplementsystemet vil også fjerne immunkomplekser og apoptotiske celler [45].

Komplementsystemet er delt inn i tre aktiveringsveier, der de ulike gjenkjenningmolekylene aktiveres av spesifikke ligander [47]. Klassisk aktiveringsvei initieres ved at C1q binder seg til et immunkompleks, antistoff bundet til antigen, CRP, PTX3 eller døde celler [48]. Lektin aktiveringsvei startes derimot ved binding av mannosebindende lektin (MBL) eller fikoliner til spesifikke karbohydratstrukturer på patogener [45]. Alternativ aktiveringsvei aktiveres spontant og av patogene strukturer, men hemmes av faktor H og faktor I.

C3 er en sentral komponent i komplementsystemet. Når C3 spaltes av C3-konvertaser vil α -kjeden i C3 kuttes og C3a spaltes av. En intern thioester på C3b blir tilgjengelig for kovalent binding til hydroksyl- eller aminogrupeer på biologiske overflater [46]. Ved klassisk og lektin aktiveringsvei vil C3-konvertasen bestå av C4b2a. Alternativ aktiveringsvei vil danne C3-konvertase ved at C3b bundet til en overflate bindes til faktor B, som er spaltet av faktor D, og C3bBb dannes. C3-konvertasene vil spalte C3-molekyler og danne C5-konvertase ved binding av ett C3b molekyl til C3-konvertasen. Properdin vil stabilisere C3-konvertasen C3bBb slik at C5-konvertasen dannes [47]. C5-konvertasen spalter C5 til anafylatoksinet C5a og C5b som utgjør starten på dannelsen av TCC, som i membranbundet form kan lysere cellen eller bakterien [47].



Adapted from Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. *Trends Immunol* 2002; 23:61-63

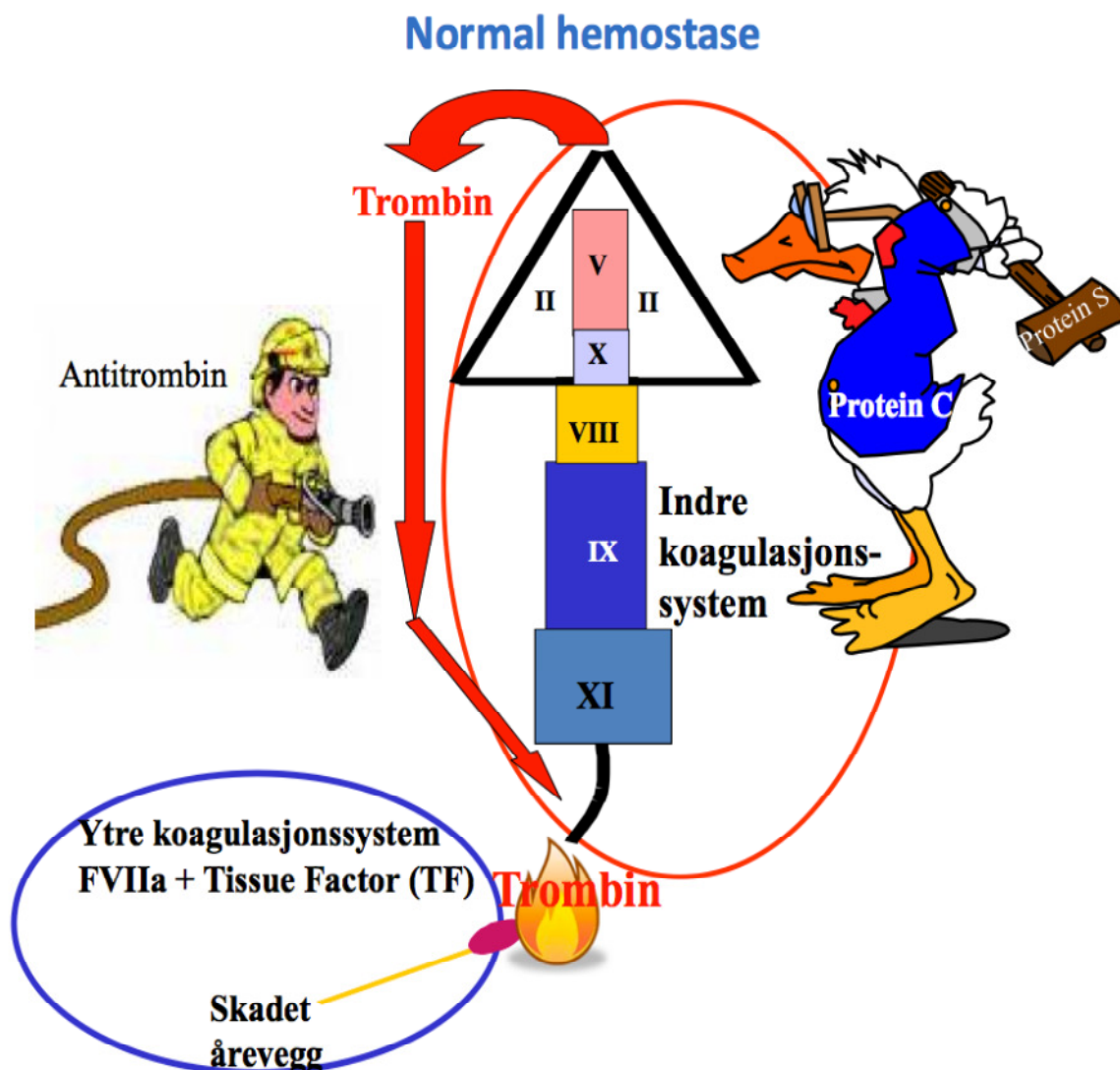
Figur 1. Oversikt over komplementsystemet med aktiveringsveier og regulatorer. CPN; carboksy petidase N, P; properdin, CR1; komplement reseptor 1, MCP; membran kofaktor protein, DAF; “decay acceleration factor”, C4BP; C4 bindende protein, C5aR/C3aR; C5a/C3a reseptor. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier.

Faktor H fungerer som kofaktor for faktor I som inaktiverer C3b. Dersom faktor H ikke kan bindes på overflaten av bakterier, vil den alternative aktiveringsveien fortsette uforhindret [46]. Den alternative aktiveringsveien vil akselerere komplementaktivering som skyldes aktivering fra andre aktiveringsveier [49]. Komplementsystemet reguleres av flere komplementhemmere, da det er viktig at patogene strukturer angripes, mens reaksjoner mot eget vev bør unngås. Ukontrollert komplementaktivering kan medføre vevsskade på grunn av inflammasjonsprosessen med anafylatoksinfrigjørelse, rekruttering av celler og økt vaskulær permeabilitet [50]. C1-INH regulerer aktivering av alle tre aktiveringsveiene. Dette er omtalt under avsnitt 2.6.3.

2.4.2 Koagulasjon og kallikrein-kininsystemet

Koagulasjonssystemet består av serinproteaser som fører til trombin dannelse og deretter dannelse av fibrin. Fibrin dannelse medvirker bla. til å stoppe blødning ved vevsskade i årveggene. Tradisjonelt er koagulasjonssystemet inndelt i to veier, ytre og indre aktiveringsvei. TF er hovedinitiatoren til den ytre koagulasjonskaskaden [51]. TF uttrykkes normalt ikke av endotelceller og andre celler som er i kontakt med sirkulerende blodceller. Dersom årveggen skades blir TF fra dypere liggende bindevev og årveggen tilgjengelig for FVII. Komplekset TF-FVIIa katalyserer omdannelsen av FIX og FX til FIXa og FXa. FIXa øker aktiviteten til FX, mens FXIa øker aktiviteten til protrombin. FXa omdanner protrombin til trombin. Trombin omdanner fibrinogen til fibrin som danner et fibrinnettverk på skadestedet og blødningen kan stoppes [52]. FVII kan også aktiveres direkte av FXII uten TF [53].

Den indre koagulasjonsaktiveringsveien startes ved aktivering av FXII. FXII har *in vivo* trolig mest betydning for fibrinolyse og en mangel på FXII vil kunne gi trombose. Studier viser at FXII ved sepsis er involvert i hypotensjon og vasodilatasjon [54]. FXII er viktig i aktiveringen av kallikrein-kinin systemet og dannelse av bradykinin. Opprinnelig besto kontaktsystemet av proteiner som aktiveres ved kontakt med negativt ladde eksogene overflater. FXII, FXI, plasma prekallikrein og høymolekylært kininogen (HMWK) utgjør hovedkomponentene i dette systemet [55].



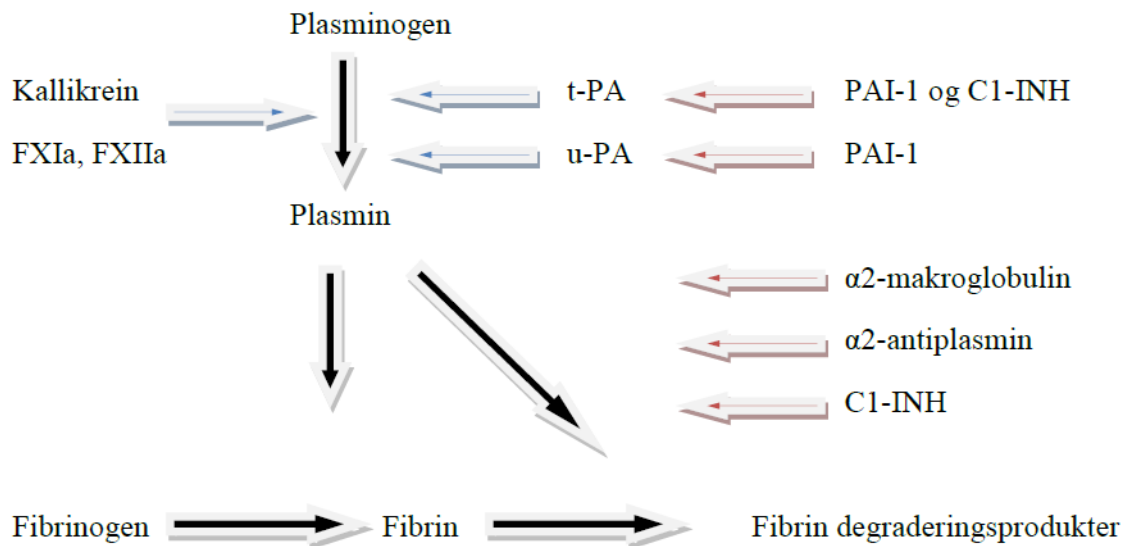
Figur 2. Koagulasjonssystemet. Romertallene er forkortelser for koagulasjonsfaktorene. Antitrombin og protein C med kofaktor protein S hemmer koagulasjonsaktiveringen. Figuren er gjengitt etter tillatelse fra Frank Brosstad, ved Universitetssykehuset i Oslo. Figuren er lastet ned fra <http://presenter.qbrick.com/?pguid=1fed7d06-b475-4ec1-bdf8-dd1d0e18cdd5>.

2.4.3 Antikoagulasjonsmekanismer

Det er fire antikoagulasjonsmekanismer som regulerer koagulasjonsaktiveringen. Det er det fibrinolytiske system, TFPI, antitrombin (AT) og protein C-trombomodulin systemet.

Det fibrinolytiske system spalter fibrinogen til fibrin og deretter til fibrin degraderingsprodukter. Plasminogen, et inaktivt zymogen omdannes til plasmin. Vevsplasminogen aktivator (t-PA) og urokinase er aktivatorer for denne reaksjonen.

Hemmere av fibrinolysen er plasminogen aktivator inhibitor 1 og 2 (PAI-1 og PAI-2). I tillegg regulerer trombin aktiverende fibrinolyse hemmer (TAFI) fibrinolysen. TAFI aktiveres av trombin-trombomodulin komplekset. Hemmere av trombin vil derfor også hemme TAFI. TAFI har vist seg å være hovedhemmeren til C5a [56].



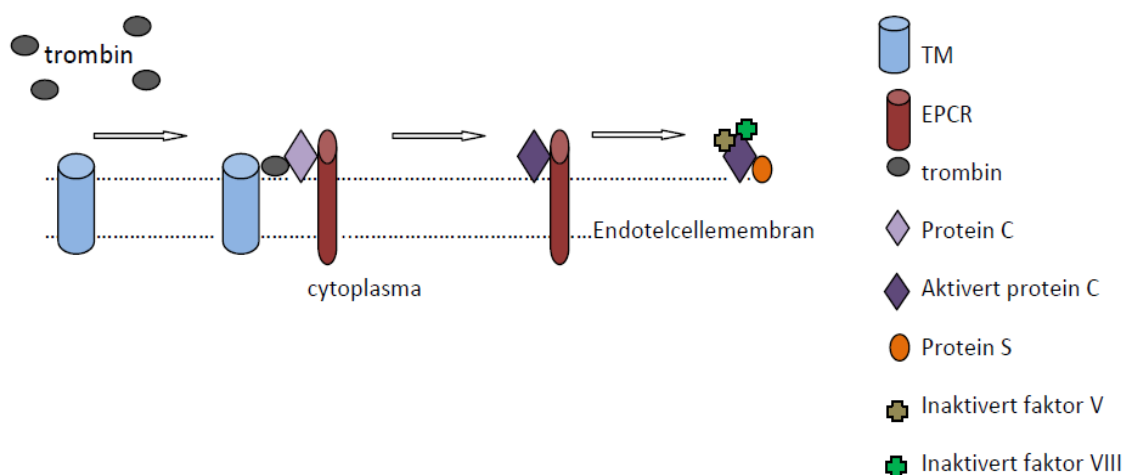
Figur 3. Fibrinolysen. Røde piler indikerer hemming, mens blå indikerer aktivatorer.

TFPI hemming av TF-indusert koagulasjon kan beskrives som to trinn. Først binder TFPI seg til FXa. Deretter binder TFPI-FXa komplekset seg til TF-FVIIa og inaktiverer den katalytiske aktiviteten. Genotypen TFPI^{-/-} for mus er letal, dette viser nødvendigheten av proteinet [57]. Elastase er den mest effektive hemmeren av TFPI [58]. Andre hemmere for TFPI er APC, FSAP, plasmin, trombin og FXa [58].

Antitrombin (AT) er hovedhemmeren til trombin og FXa. Heparin som kofaktor øker aktiviteten til AT minst tusen ganger. Under en systemisk inflammasjonsprosess vil AT reduseres som følge av økt forbruk, redusert syntese og proteolytisk nedbrytning ved elastase fra nøytrofile granulocytter [15].

Trombin bindes til trombomodulin (TM), et membranbundet protein på endotelet. Dette er nødvendig for at fibrinogen skal omdannes til fibrin. TM som er bundet til trombin er også i stand til å spalte protein C, til aktivert protein C (APC). Protein C er lokalisert ved endotel

protein C reseptor (EPCR). Protein S fungerer som kofaktor for APC. APC kan nå inaktivere FVa og FVIIIa. Trombindannelsen blir på denne måten begrenset til skadestedet [59].



Figur 4. Protein C aktiveres ved binding til trombin-trombomodulin komplekset og EPCR. Protein S er kofaktor for protein C. Aktivert protein C inaktiverer FVa og FVIIIa.

2.4.5 Sammenheng mellom komplement- og koagulasjons-systemene

Inflammasjons-prosesser som har innvirkning på koagulasjonsaktiveringen

Det er mange forbindelser mellom koagulasjon og inflammasjon. Her vil det kort gjøres greie for enkelte av forbindelsene.

TF spiller en viktig rolle i inflammasjonsmediert koagulasjonsaktivering [60]. Ved sepsis vil aktiverte monocytter uttrykke TF, dette vil gi FVII mulighet til å binde seg til TF og koagulasjonsprosessen vil starte. Bakterier kan bindes til TLR på feks. monocytter. Dette vil aktivere cellen, som vil friggi proinflammatoriske cytokiner og uttrykke TF. TF uttrykket vil dessuten økes som en følge av cytokiner. Dette er omtalt under avsnittet 2.5.

Cytokinene TNF- α og IL-1 β kan påvirke endotelceller til å redusere produksjonen av glykosaminglykaner. Glykosaminglykanene virker som heparinlignende kofaktorer til antitrombin (AT). Resultatet blir færre bindingssteder for AT og den antikoagulerende funksjonen til AT blir svekket [61]. TNF- α og IL-1 β vil også redusere uttrykket av TM på

endotelceller og dermed føre til at trombin fremmer både koagulasjon og inflammasjonsprosessen [62].

Nivået av aktivert protein C i plasma reduseres ved sepsis [63]. Dette skyldes blant annet de proinflammatoriske cytokinene TNF- α og IL-1 som øker TF ekspresjonen [64;65]. Nawroth viste dessuten at TNF- α nedregulerer trombomodulin som igjen reduserer mengden aktivert protein C [66]. En effekt av økt TF uttrykk vil være redusert uttrykk av trombomodulin på endotelcellene [67]. Endotel protein C reseptor (EPCR) nedreguleres ved sepsis, dette vil også redusere effekten til protein C [66].

Ved sepsis kan TFPI nedreguleres eller brytes ned av elastase som en følge av aktiveringen av TLR på immuncellene. Dette vil øke mengden av tilgjengelig TF og fremme videre inflammasjon og koagulasjonsaktivering [52;68].

C1-INH er et protein med mange funksjoner, som vil omtales under avsnitt 2.6. C1-INH er en viktig forbindelse mellom inflammasjon og koagulasjon. Komplementaktiveringen hemmes av C1-INH. Dessuten er C1-INH en hemmer både for det indre koagulasjonssystemet og fibrinolytiske reaksjoner.

Koagulasjonsprosesser som har innvirkning på inflammasjonsaktiveringen

APC har anti-inflammatorisk effekter på monocytter og granulocytter i tillegg til å fungere som en viktig antikoagulant. Tilførsel av APC resulterte i redusert TNF- α syntese i rotter stimulert med LPS [69]. Indirekte vil APC hemme inflammasjonsprosessen ved å inaktivere FVa og FVIIIa som igjen forhindrer trombin i binding til protease aktiverte reseptorer (PAR-1 og PAR-4) [70]. APC vil ved binding til EPCR kunne beskytte endotelbarrieren via signaloverføring ved PAR1 [71].

FXa, trombin og fibrin kan aktivere monocytter og endotelceller slik at disse syntetiserer IL-6 og/eller IL-8 [30]. Trombin kan også fungere som en C5 konvertase og spalte av C5a direkte fra C5 [72]. Trombin kan også påvirke endotelbarrieren via PAR1. Ved lav konsentrasjon vil permeabiliteten reduseres. Høy konsentrasjon vil øke permeabiliteten og altså redusere barrieren [73].

PAR er G-proteinkoblede reseptorer for aktiverte proteaser. PAR2 aktiveres ikke av trombin i motsetning til PAR1, PAR3 og PAR4. Kompleks med FVIIa og dets kofaktor TF kan enten aktivere PAR2 direkte eller indirekte via TF/FVIIa-FXa [74]. PAR har innvirkning på uttrykk

av adhesjonsmolekyler og bevegeligheten av leukocytter. Cytokinsyntesen vil også kunne reguleres av PAR [75].

2.5 TF

2.5.1 TF og koagulasjon

TF er initiatoren for den ytre koagulasjonsvei. TF betegnes også som koagulasjonsfaktor III, tromboplastin eller CD142. Genet er lokalisert på kromosom 1, og består av seks ekson skilt av fem intron [76]. TF er et membranbundet protein på 47 kDa. Det ekstracellulære området består av 219 aminosyrer, 23 aminosyrer utgjør det transmembrane området mens det intracellulære området består av 21 aminosyrer. Proteinet kan glykosyleres på tre ulike steder på det ekstracellulære området. Disulfidbindinger mellom to cysteinaminsyrer stabiliserer TF [77]. TF uttrykkes på flere celletyper, de aller fleste er celler som normalt ikke er i kontakt med blod. TF er uttrykt i alle blod-vev barrierer. TF ser ut til å danne en hemostatisk beskyttelse der koagulasjonssystemet aktiveres dersom barrieren ødelegges [78]. TF fungerer som reseptor og kofaktor for FVII [51]. Dersom TF blir tilgjengelig for FVII som sirkulerer i blodbanen danner disse et kompleks (TF-FVIIa) som starter koagulasjonskaskaden der sluttproduktet er fibrindannelse og reparasjon av skaden [79]. Komplekset TF-FVII kan være biologisk inaktivt, såkalt kryptert TF. Prosessen som omdanner det til et biologisk aktivt kompleks er nært knyttet til det cytosoliske kalsiumnivået og cellemembranens fosfolipidasymmetri [80]. Carmeliet et.al viste ved hjelp av TF^{-/-} muse embryo at fravær av TF ikke var forenelig med liv [81].

2.5.2 Inflammasjonsmediert ekspresjon av TF

Ved en inflammasjon vil uttrykket av TF øke. Endotelceller, dendritiske celler og monocytter aktiveres under en inflammasjonstilstand og dette medfører økt syntese og uttrykk av TF. I tillegg til endotoxin vil cytokinene TNF- α og IL-1 øke TF uttrykket på endotelceller [64;65]. C5a vil også gi økt uttrykk av TF på endotelceller [82]. Endotoxin, TNF- α og IL-1 vil dessuten øke TF uttrykket på monocytter [43].

TF kan også induseres direkte fra NF- κ B aktivering ved en binding mellom PAMP og PRR [11]. Dessuten vil integriteten av endotelcellene reduseres og øke tilgjengeligheten av TF uttrykk fra dypereliggende celler [15].

En tredje faktor som er av betydning er avsondring av mikropartikler med TF fra aktiverte blodplater eller apoptotiske monocytter, og disse mikropartilklene kan tas opp av andre celler

[27;83]. Mikropartiklenes størrelse er mellom 0,1 og 1,0 μm . De har en membran av fosfolipider. Opphavscellen kan bestemmes ut fra antigener som uttrykkes i membranen. Det diskuteres i fagmiljøene hvilke celler som kan avsondre TF positive mikropartikler. Det er nå antatt at nivået av TF positive mikropartikler kan ha en prognostisk verdi for pasienter med vaskulære tromber [84].

Samspillet mellom aktiverte trombocytter, leukocytter og endotelceller vil medføre en ytterlig økning av TF uttrykket på monocytterne [85]. Warr et al. viste i 1990 at økt TF uttrykk sannsynligvis er årsaken til sepsismediert DIC [7].

Anti-inflammatoriske cytokiner som IL-4, IL-10 og IL-13 kan hemme inflammasjons-indusert TF syntese. Dette viser noe av samspillet mellom inflammasjon og koagulasjon [30].

2.5.3 TF og PAR

TF-FVIIa komplekset kan signalisere både via PAR1 og PAR2 [74]. Det antas at PAR2 har en proinflammatorisk rolle [86]. Aktivering av PAR2 vil medføre mobilisering av L-selektiner på overflaten av nøytrofile granulocytter. Dette fremmer leukocyttnigrasjon i den ekstracellulære matriksen og vil dermed føre til aktivering og rekruttering av leukocytter til inflammasjonsstedet. PAR2 signal fører blant annet til økt sekresjon av cytokinene IL-6, IL-8 og IL-1 β fra både monocytter og nøytrofile granulocytter. Signal via PAR1 vil også gi økt dannelse av cytokiner [75].

TF uttrykkes på kreftceller og spiller en viktig rolle i kreft og metastaseutvikling. Forsøk med mus har vist at hemming av TF-FVIIa komplekset reduserte størrelsen av tumoren. En sannsynlig årsak kan være at TF-FVIIa komplekset hindres i binding til PAR2. Andre forsøk med mus har vist at effekter av TF-FVIIa-PAR2 kan ha betydning for skadeomfanget ved hjerteinfarkt [60].

2.6 C1-INH

2.6.1 C1-INH som akutfaseprotein

C1-INH ble tidligere benevnt som C1-esterase inhibitor og tilhører serpin superfamilien. Serpin superfamilien består av hemmere som hemmer serinproteaser. C1-INH ble første gang beskrevet i 1957 [87]. Genet for C1-INH er plassert på kromosom 11 (p11.2-q13) [88] og proteinet er et 105 kD polypeptid [89]. Det består av en karboksylidel som utgjør proteaserekogniseringsområdet og en svært glykolysert aminoterminalende. En unit - 1U, tilsvarer C1-INH innholdet i 1 mL citratplasma fra en frisk person. Konsentrasjonen av C1-

INH i blod er under normale forhold ca. 0,25 g/L [90]. C1-INH er et akutfaseprotein og kan derfor øke til det dobbelte under en ukomplisert bakteriell inflammasjon [91]. IFN- γ stimulerer til syntese av C1-INH, men også andre cytokiner som TNF- α , IL-6 og M-CSF kan i mindre grad påvirke syntesen [92]. C1-INH produseres hovedsakelig av hepatocytter, men kan også lages av andre celler som monocytter [93].

2.6.2 C1-INH som proteasehemmer

Serpiner inaktiverer proteaser ved en to-trinns prosess. Serpin etterligner substansen som er målet for proteasen. Proteasen bindes til det reaktive setet til serpinet og peptidbindingen Arg444-Thr445 spaltes [94]. Dette medfører en molekylær rearrangering og serpin og protease blir irreversibelt bundet til hverandre med en kovalent binding mellom det aktive setet av proteasen og serpinet. Proteasen blir dermed inaktivert [95;96]. Glykosaminoglykaner (GAG) vil påvirke den hemmende funksjonen til enkelte serpiner. Når det gjelder C1-INH øker ikke GAG den hemmende effekten generelt, men for enkelte proteaser som C1s og FXIa. Effekten av C1-INH på FXIIa og kallikrein vil ikke påvirkes av GAG [97]. Kompleksene av C1-INH og proteasene bindes til serpin-enzym kompleks reseptorer på monocytter og hepatocytter og fjernes raskt fra blodsirkulasjonen [98]. Halveringstiden for C1-INH i plasma er 35.5 timer [99].

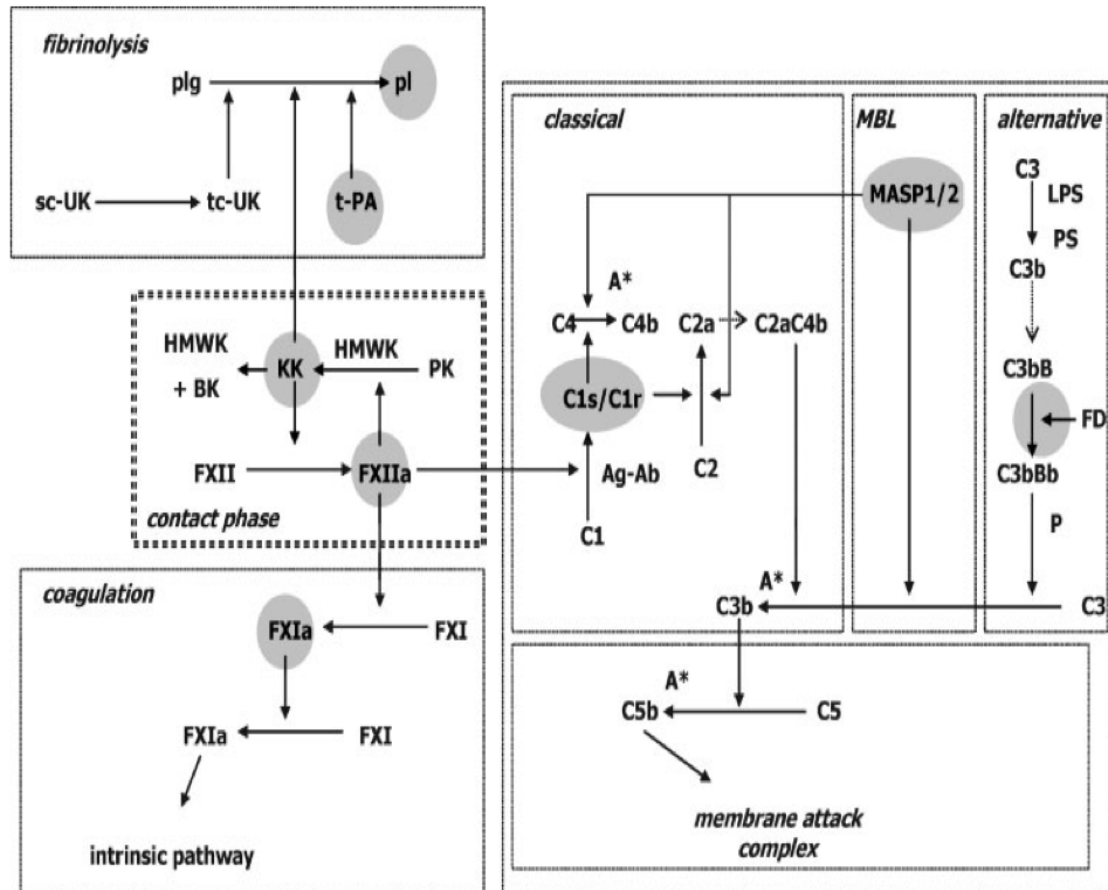
2.6.3 C1-INH og komplementsystemet

C1-INH er den eneste hemmeren som regulerer proteasene i den klassiske komplementaktiveringsveien [100]. C1-INH binder og inaktiverer C1r og C1s og komplekset C1rC1s(C1-INH)₂ blir dannet [101]. Dette forhindrer autoaktivering av C4 og C2, som igjen hemmer dannelsen av C3 konvertase. C1-INH stabiliserer også C1 komplekset uten å binde seg kovalent til komplekset [102]. C1-INH er dessuten en generell komplementhemmer, da den også har en viss regulerende effekt på de andre aktiveringsveiene. Lektin komplementaktiveringsvei hemmes ved at C1-INH reagerer med mannosebindende lektin-assosiert serin protease (MASP) 1 og 2 [103]. Alternativ komplementaktiveringsvei kan også hemmes ved en nonkovalent binding mellom C1-INH og C3b, fordi denne bindingen forhindrer binding av faktor B til C3b [104].

2.6.4 C1-INH og koagulasjonssystemet

C1-INH er hovedhemmeren for faktor VII aktiverende protease (FSAP) [97]. Proteasen FXI i den indre aktiveringsveien i koagulasjonen inaktiveres også av C1-INH. Det fibrinolytiske system påvirkes også av C1-INH, da C1-INH kan inaktivere FXII, plasmin og

vevspasminogen aktivator (t-PA) [55]. Enkelte mener at disse effektene ved høy C1-INH-dose kan være skadelig for pasienten ved å gi en prokoagulant tilstand med økt risiko for trombedannelse [105].



Figur 5. Oversikt over effekt av C1-INH på de ulike kaskadene fibrinolyse, kallikrein-kinin, koagulasjon og komplement. De grå sirklene indikerer at dette er en protease som kontrolleres av C1-INH. Plg, plasminogen; pl, plasmin; sc-UK, enkelkjedet urokinase; tc-UK, to kjedet urokinase; t-PA, vevspasminogen aktivator; HMWK, høymolekylært kininogen; BK, bradykinin; KK, kallikrein; PK, prekallikrein; F, faktor; C, komplement faktor; A*, anafylatoksiner; Ag-Ab, antigen-antistoff kompleks; LPS, lipopolysakkarid; PS, bakterielle polysakkarider. Figuren er gjengitt fra referanse 97 (Zeerleder S., C1-Inhibitor: More Than a Serine Protease. *Semin.Thromb.Hemost.* 2011; 37:362-74) etter tillatelse fra Thieme Medical and Scientific Publishers.

2.6.5 C1-INH og kallikrein-kininsystemet

C1-INH inaktiverer FXII og plasmakallikrein, som er proteaser i kallikrein-kinin systemet. Arvelig angioødem (HAE) er en tilstand med redusert nivå av funksjonelt C1-INH. Ved HAE type 1 er det redusert produksjon og konsentrasjon av C1-INH. Ved HAE type 2 er produksjonsnivået av C1-INH normal, men proteinet fra det syke genet virker ikke [97]. Det vil ved HAE være økt spontanaktivering av C4 og C2. C3 konvertasen C4bC2a vil ikke

dannes, da C4b inaktiveres raskt i væskefase av faktor I. C4-bindende protein er kofaktor for faktor I [47]. Ved HAE-anfall vil pasienten få ødemer i hud og slimhinner. Det kan bli kritisk for pasienten dersom hevelsen skjer i øvre del av luftveiene. Anfall som angriper mage og tarm gir magesmerter, oppkast og diaré [106]. Omdannelsen av prekallikrein til kallikrein vil ikke reguleres tilstrekkelig dersom C1-INH mangler. Dette fører til økt bradykinindannelse. Bradykinin gir økt vaskulær permeabilitet som medfører ødemer [107]. Det er dessuten gjort studier som viser at det under anfall hos HAE-pasienter er økt koagulasjonsaktivering med økt nivå av FVIIa og trombin [5;6]. HAE behandles med tilførsel av C1-INH. C1-INH-behandlingen viser at C1-INH spiller en viktig rolle i reguleringen av væskepermeabilitet og kontroll av trombindannelse.

2.6.6 Andre biologiske effekter av C1-INH

C1-INH har vist seg å ha flere effekter som ser ut til å være uavhengig av proteasedelen av molekylet.

C1-INH binder seg bla. til komponenter i ekstracellulær matriks. Denne mekanismen kan bidra til økt C1-INH-konsentrasjon på inflammasjonsstedet. C1-INH reagerer med E- og P-selektiner på endotelcellene og dette undertrykker leukocytrulling og transmigrasjon. Cai og Davis har vist at C1-INH har sialyl Lewis^x sakkarider på den N-glykane delen av C1-INH. Det kan være årsaken til at C1-INH binder seg til selektiner [2]. Caccia et al. har gjort forsøk som kan tyde på at C1-INH-binding til selektiner på endotelceller kan hemme trombinaktiviteten [108]. Komplementaktiveringen via alternativ aktiveringsvei vil reduseres av C1-INH uavhengig av den proteasehemmende effekten. C1-INH bindes til C3 med en ikke-kovalent binding [104]. C1-INH vil også kunne bindes direkte til Gram-negative bakterier og dermed kunne bremse utviklingen av sepsis [21]. C1-INH binder seg dessuten også direkte til LPS [109].

2.6.7 Proteolytisk nedbrytning av C1-INH

C1-INH kan inaktiveres av elastase frigitt fra nøytrofile granulocytter. Brower et al. viste at elastase kan hydrolysere C1-INH i tre ulike regioner av molekylet. Binding til C1s blir da ikke lenger mulig [110]. Det er hos pasienter med sepsis funnet et høyere nivå av C1-INH enn hva det funksjonelle nivået av C1-INH skulle tilsi. Dette tyder på tilstedeværelse av inaktivert C1-INH. Nivået av proteolytisk inaktivert C1-INH har ifølge studier av Nuijens prognostisk verdi, ettersom et høyere nivå er assosiert med økt mortalitet blant sepsispasienter. Plasmin og andre proteaser fra bakterier gir også proteolytisk inaktivering av C1-INH [90].

2.6.8 Nye terapiområder for C1-INH?

Det forskes stadig på nye bruksområder for C1-INH. Det har vist seg at infusjon av C1-INH før eller ved hjerteinfarkt gir positive effekter. C1-INH reduserer størrelsen på infarkt, forhindrer infiltrering av nøytrofile granulocytter i myokard og reduserer økningen av kreatinin og troponin i dyremodeller [55]. Det er også utført enkelte kliniske studier på mennesker. Resultatene viste redusert komplementaktivering og et lavere nivå av infarktparametrene troponin T og CK-MB [99]. C1-INH-tilførsel i musemodeller med hjerne-reperfusjonsskade reduserte både volumet av det iskemiske området og leukocytinfiltreringen i det skadede området [111].

Det er gjort forsøk med bruk av C1-INH i xenotransplantasjoner. Det er forhåpninger om at C1-INH skal hindre komplementaktivering og andre patologiske prosesser involvert i avstøtningsreaksjoner. Nyre fra gris som ble perfundert med humant blod tilsatt høye C1-INH konsentrasjoner ga en lavere klassisk komplementaktivering, redusert aktivering av leukocytter og trombocytter og forlenget levetid av nyret sammenlignet med perfusjon av humant blod uten ekstra C1-INH [112].

Sepsis er en kompleks tilstand der mange systemer er aktivert. C1-INH er regulator både for komplementkaskadene, kallikrein-kininsystemet og det indre koagulasjonssystem som er av stor betydning for sepsis utviklingen. Dette i tillegg til de ovenfor nevnte effektene av C1-INH kan gjøre C1-INH til en interessant komponent i behandlingen av sepsis. Igonin et al. har nylig publisert en studie der en gruppe pasienter med sepsis ble behandlet med C1-INH-infusjon i tillegg til tradisjonell behandling. Kontrollgruppen fikk behandling etter vanlig prosedyre. Resultatene tyder på at tilførselen av C1-INH medførte en nedregulering av den systemiske inflammasjonsresponsen og mortaliteten av sepsis ble redusert [3].

2.7 Compstatin

Peptidet compstatin ble funnet ved en screening av en klon fra et tilfeldig "phage-displayed" bibliotek for C3b bindende protein [113]. Compstatin består av 13 aminosyrer:



Det er en disulfidbro mellom cystein 2 og 12. Strukturen på peptidet er syklisk og molekylvekten er på 1551 Da [114]. Compstatin er en effektiv komplementhemmer. Den bindes til β -kjeden på C3, og hemmer C3 konvertasen [115].

Det er og blir fremdeles gjort flere forsøk på endringer av molekylet som ville forbedre egenskapene til compstatin [116].

2.7.1 Compstatin som terapi?

Compstatin er nyttig i forskningsøyemed ettersom det kan gi indikasjoner på om en bestemt prosess er komplementavhengig. I fullblodsmodellen med *E. coli* har compstatin redusert den oksidative burst til granulocytter og monocytter og syntesen av cytokinet IL-8 ble redusert [117]. Compstatin kan derfor bli et viktig behandlingsmiddel av sykdommer der patogenesen skyldes komplementaktivering. Det er gjort studier med compstatin på aldersrelatert makulær degenerasjon (AMD) hos aper. Compstatin injisering resulterte i at krystallene som trigget den inflammatoriske responsen forsvant noe som gir forhåpninger om mulig behandling for AMD [118]. Det er også gjort forsøk i bavian der effekten av compstatin på *E. coli*-indusert sepsis ble studert. Resultatene viste at en reduksjon av trombocyt og leukocyt infiltrering i vev ble redusert. I tillegg ga behandlingen en reduksjon av mikrovaskulær trombedannelse og lavere grad av organskade. Compstatin reduserte også den prokoagulante aktiviteten og bidro til å bevare endotelets antikoagulante egenskaper. Behandling med compstatin kan derfor i framtiden være aktuell som en del av terapien ved sepsis [119].

2.8 Prosjektets hypoteser

2.8.1 Hovedhypotese: C1-INH vil ha en hemmende effekt på koagulasjonsaktiveringen.

Sepsis er en kompleks tilstand med aktivering av flere kaskadesystem. Koagulasjonssystemet aktiveres for å avgrense infeksjonen. Dersom infeksjonen blir systemisk vil koagulasjonsaktiveringen være uheldig for individet. Aktiveringen medfører trombedannelse og fare for utvikling av DIC. Dette kan igjen føre til multiorgansvikt. Det er forsket mye på nye behandlingsmetoder, som i tillegg til tradisjonell behandling kan bedre prognosen og redusere mortaliteten, uten at noen nye behandlingsprinsipper er kommet i klinisk bruk.

C1-INH har en regulerende funksjon i kallikrein-kininsystemet, den indre koagulasjonsaktiveringsvei og i komplementsystemet. Det er dessuten flere forbindelser mellom koagulasjon og komplement-systemene. Davis og Liu har gjennom flere forskningsarbeider vist at C1-INH kan ha anti-inflammatoriske egenskaper, og disse kan være uavhengige av den proteasehemmende effekten av C1-INH.

Det er under HAE anfall påvist økt koagulasjonsaktivering [5;6]. Vi vil derfor anta at C1-INH også kan ha en hemmende effekt på koagulasjonssystemet. Denne effekten kan være årsaken

til de positive resultatene C1-INH behandling gir ved sepsis i dyremodeller og som tilleggshandling til tradisjonell behandling i klinikken [3;4].

TF er trolig et sentralt molekyl ved sepsisutvikling og en viktig forbindelse mellom komplement og koagulasjonsaktivering. Aktiverte monocytter vil uttrykke TF. TF ekspresjon vil initiere den ytre koagulasjonsaktiveringsveien. Vi har derfor studert effekten av C1-INH på LPS og *E. coli*-indusert TF. Protrombin F1+2 er det siste produktet i koagulasjonsprosessen før trombin som hemmes av lepirudin. Lepirudin blir benyttet som antikoagulant i fullblodsmodellen ettersom den ikke påvirker komplement-aktivering [117]. Nivået av protrombin F1+2 i tillegg til analyse av TF mRNA, TF funksjon i plasma mikropartikler og ekstracellulær TF ekspresjon på monocytter vil kunne belyse eventuelle effekter C1-INH har på koagulasjonskaskaden. Dersom C1-INH kan hemme TF uttrykk på mRNA nivå og TF uttrykk på monocyttoverflaten vil det sannsynligvis kunne forhindre utvikling av DIC og multiorgansvikt ved sepsis. Det er tidligere vist at TF er ansvarlig for utvikling av DIC ved sepsis, ved bruk av et blokkerende anti-TF immunglobulin G i en kanin modell [7].

2.8.2 Underhypotese: Koagulasjonsaktiveringen er induert av komplementaktiveringen.

I forsøkene ble det benyttet en spesifikk C3 konvertasehemmer, nemlig compstatin som hemmer komplementaktivering fra alle de tre aktiveringsveiene. Resultatene fra disse forsøkene gjør det mulig å studere sammenhengen mellom komplement- og koagulasjonsaktivering i en human fullblodsmodell for sepsis. Det antas at koagulasjonsaktivering er en følge av komplementaktivering ved sepsis.

2.9 Prosjektets modell: Fullblodsmodell

Fullblodsmodellen som beskrives senere under avsnitt 3.2 er blitt brukt i alle forsøkene. En alternativ metode er å isolere cellene enten før eller etter stimulering. Ved bruk av isolerte celler kan en lettere studere cellulære mekanismer og bestemme mRNA nivået av utvalgte proteiner i de ulike celletypene. En fordel med fullblodsmodellen er likevel at alle celltyper og kaskadesystemer i blod får medvirke i reaksjonene. Resultatene kan derfor lettere overføres til sannsynlige resultater *in vivo*. Det cellulære opphavet for mRNA nivået som blir målt i fullforsøkene kan ikke bestemmes så lenge denne modellen benyttes. Monocytterne har større mRNA produksjon, men er færre i antall sammenlignet med granulocytter. Det ekstracellulære uttrykket av TF kan bestemmes for de enkelte leukocyttopulasjonene ved hjelp av flowcytometri.

Ved bruk av lepirudin hemmes koagulasjonen før trombindannelse. For å studere koagulasjonsaktivering kan en analysere protrombin F1+2. Dette utgjør det siste trinnet i koagulasjonsaktivering før trombindannelse. Bruk av antikoagulant er nødvendig da det ikke vil være mulig å gjennomføre analysene i koagulert blod.

3. Materiale og metode

3.1 Forstudie: Tidsstudie av TF

3.1.1 Hensikt

I forkant av hovedprosjektet ble det gjennomført et pilotprosjekt. Dette besto av tre tidsstudier der TF mRNA ble målt etter stimulering med LPS i to ulike konsentrasjoner og med ulike inkubasjonstid. Målet var å finne den best egnede konsentrasjonen av LPS og passende inkubasjonstid for videre forsøk.

3.1.2 Gjennomføring

En nærmere beskrivelse av metodene følger senere, her vil det kun kort bli beskrevet hvordan pilotprosjektet ble gjennomført. Fullblodsmodellen ble benyttet med tre ulike inkuberingstider i tillegg til T0. T0 prøven ble kun tilsatt PBS og reaksjonen i røret ble stoppet umiddelbart. Inkuberingstidene var 15, 30, 60 og 120 minutter. Det ble inkubert tre rør for hver inkuberingstid, og til disse ble det tilsatt PBS, og ultrarensset LPS i konsentrasjonene 100 ng/ml og 1000 ng/ml. Leukocyttopulasjonene ble skilt ved hjelp av Lymphoprep. Prøvene ble analysert på flowcytometer for å analysere det ekstracellulære uttrykket av TF. RNA ble ekstrahert fra prøvene og konsentrasjonen ble målt på et spektrofotometer. Deretter ble det utført en revers transkripsjon for å syntetisere cDNA. Det relative innholdet av TF mRNA i prøvene sammenlignet med T0 prøven ble analysert med qPCR.

3.2 Fullblodsmodell

En human fullblodsmodell for sepsis, med antikoagulant lepirudin ble benyttet. Fordelen med lepirudin sammenlignet med tradisjonelle antikoagulanter som EDTA og citrat er at lepirudin ikke påvirker komplementsystemet [117]. Lepirudin er en trombinhemmer som gjør at alle kaskadereaksjonene kan fungere tilnærmet som *in vivo* helt til koagulasjonsprosessen stanses ved å hemme trombin.

Det ble benyttet ferskt blod fra friske blodgivere (n=15). Alle hadde gitt informert samtykke og prosjektet er godkjent av REK. Rørene som ble benyttet ved prøvetaking var 4.5 ml

polypropylen rør fra Nunc. Rørene ble korket med korken fra prøvetakingsrør (BD Vactainer Z, 5 ml) uten tilsetning. Alt utstyr som ble benyttet i fullblodsmodellen var endotoksinfritt. Hetteglass med 50 mg Refludan ble løst opp i 20 mL steril PBS med kalsium og magnesium, slik at konsentrasjonen ble 2.5 mg/mL. Røret ble tilsatt 80 µL lepirudin (Refludan 50 mg, Pharmion) som antikoagulant (final konsentrasjon 50 µg/mL). Vakuum ble skapt ved å trekke ut 19 mL luft med en steril sprøytespiss og en 20 mL sprøyte. Vacutaineren vil da trekke ut 4 mL blod.

Blodprøvetakingen ble gjennomført rett før fullblodsforsøkene. Rørene ble blandet godt og satt i varmeblokk. Det ble tilsatt hemmere eller PBS i rekken av Nunc rør som skulle benyttes i forsøket, også alle rørene ble satt i en varmeblokk (37°C). Forholdet mellom PBS/hemmer, blod og PBS/aktivator er alltid 1:5:1. Deretter ble det tilsatt blod pipettert med 15-20 sekunders intervall og rørene ble blandet forsiktig. Etter 8 minutter preinkubering ble deretter PBS eller aktivator (LPS eller *E. coli*) tilsatt. Rørene ble blandet på vortexmikser og intervallet mellom pipetteringene var det samme som ved pipettering av blod. Dersom inkuberingstiden oversteg 15 minutter ble rørene lagt på vippe i varmeskap ved 37 °C. Etter fullført inkuberingstid ble røret blandet forsiktig på vortexmikser og prøvemateriale til de ulike analysene ble tatt ut med 15-20 sekunders intervall. Til flowcytometri av TF ble det avpipettert blod til polypropylen rør tilsatt citrat. Rørene til plasmaanalyser ble satt på is og tilsatt EDTA (10 mM final konsentrasjon) for å stanse komplementaktivering. Rørene ble deretter sentrifugert i 15 minutter ved 4°C (2500 x g). Supernatanten (plasma) ble avpipettert til et Nunc rør. Det gjenværende innholdet i rørene, cellepellet, ble benyttet til RNA analyser.

3.2.1 Begrensninger ved metoden

Ved å benytte plastrør i fullblodsmodellen vil det skje en lavgradig komplementaktivering. Dette er en reaksjon som skjer spontant ved at C3b bindes til proteiner som har festet seg til overflaten av røret [120]. Det blir i denne modellen benyttet polypropylen rør.

Blodcellene ble ikke isolert i de ulike cellepopulasjonene før mRNA analyse. Derfor kan ikke mRNA nivået for de enkelte celletypene bestemmes. Dette er også kommentert tidligere under avsnittet 2.9.

Hemming av trombin med antikoaglant lepirudin medfører at reaksjonene stanses her. Det er derfor ikke mulig å studere effektene av trombin i denne modellen. Dersom koagulasjonen ikke hemmes blir det vanskelig eller umulig å gjennomføre de ønskede analysene.

3.2.2 Fordeler med fullblodsmodellen

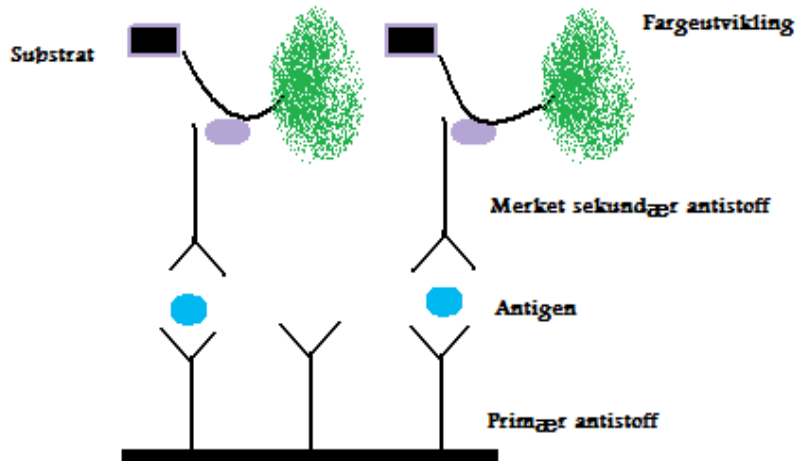
I fullblodsmodellen kan en studere hvordan de ulike kaskadesystemene komplement, koagulasjon og kallikrein-kininsystemet innvirker på hverandre. Dette er mulig da lepirudin som antikoagulant bare hemmer trombin uten å innvirke på komplementsystemet, i motsetning til de andre tradisjonelle antikoagulantene EDTA, heparin og citrat [117].

3.3 Reagenser og utstyr

Disse er omtalt i det vedlagte manuset til Landsem et al. Det oppløste C1-INH reagenset ble kontrollert med hensyn til konsentrasjon og funksjon. Det ble dessuten utført kontroll av LPS nivået i iC1-INH oppløsningen. Resultatene av testene gav tilfredsstillende verdier.

3.4 ELISA, enzym bundet immunosorbent analyse

ELISA er en analyseteknikk som benyttes for å detektere tilstedeværelse og/eller mengden av et antigen eller antistoff i prøvematerialet. Ved "sandwich" ELISA brukes det et antistoff som er festet til en fast fase, for eksempel en mikrotiterbrønn. Uspesifikke bindinger kan gi bakgrunnsstøy, derfor har en del metoder et blokkeringstrinn, før prøvematerialet tilsettes. Antigenet en er interessert i bindes deretter til antistoffet. Ubundet prøvematerialet vaskes så bort og det tilsettes et enzymmerket sekundærantistoff. Det dannes et kompleks bestående av antistoff-antigen-antistoff, et såkalt "sandwich" kompleks. En vaskeprosedyre gjennomføres og ubundne substanser fjernes. Substrat tilsettes og enzymet på sekundærantistoffet danner et avlesbart produkt som er proporsjonalt med mengden antigen i prøven. Metoden som brukes for å kvantitere produktet kan være spektrofotometri, fluorescens og luminescens. Det finnes også mange varianter av ELISA. Ved konkurrerende metoder vil produktet være omvendt proporsjonalt med mengden antigen i prøven [121]. Konsentrasjonen i prøven avleses mot en standardkurve som genereres etter analysering av en standardrekke. Positive og negative kontroller analyseres også for å kvalitetssikre analysen.



Figur 6. ELISA. Figuren viser "sandwich" teknikk der antigenet omsluttet av antistoff. Sekundær antistoffet er merket med enzym som ved tilsats av substrat forårsaker en fargeutvikling som kan avleses fotometrisk. Fargeutviklingen vil være proporsjonal med konsentrasjonen av antigenet.

3.4.1 Protrombin faktor 1+2

Protrombin, også kalt faktor II er et K-vitaminavhengig zymogen til trombin. Trombin er en serinprotease som er sentral i koagulasjonsprosessen. Proteinets molekylvekt er 72 kDa. Det humane genet er lokalisert på kromosom 11 p11-q12. Protrombin består av fragment 1+2 (fragment 1 og fragment 2) og pretrombin 2. Protrombin aktiveres av FXa ved en proteolytisk spaltning av to bindinger og trombin dannes [122].

Protrombin F1+2 ble målt i plasma for å bestemme graden av koagulasjonsaktivering. Etersom antikoagulanten lepirudin hemmer trombindannelse kunne mengden trombin-antitrombin kompleks ikke brukes som mål på koagulasjonsaktivering. Det ble benyttet et kit, Enzygnost®F1+2 (monoclonal) fra Dade Behring (Dade Behring Marburg GmbH, Tyskland). Dette er en "sandwich" ELISA teknikk som er basert på et monoklonalt museantistoff for

deteksjon av humant protrombin fragement faktor 1+2. Den vedlagte prosedyren til kitet ble fulgt [123]. Absorbansen ble målt ved 450 nm på en plateleser.

3.4.2 Det terminale komplementkomplekset (TCC)

Det terminale komplementkomplekset ble målt i væskefasen. TCC består av C5b, C6, C7, C8 og C9. TCC er ikke lytisk i væskefase. Konsentrasjonen av TCC gir i de fleste tilfeller et godt mål på graden av komplementaktivering.

TCC kvantiteres ved en ELISA metode der et av de monoklonale antistoffene er rettet mot en neoepitop på C9. Dette er et antigen som dannes i det komplekset samles og som ikke eksisterer i de opprinnelige komponentene. Den originale metoden er beskrevet i Mollnes et al. [124], men metoden er senere blitt modifisert [125]. Mikrotiterplaten ble dekket med det monoklonale antistoffet aE11. Prøvemateriale ble tilsatt. TCC i prøven ble bundet til antistoffet i brønnene. Etter vaskeprosedyrer ble et biotinyleret merket monoklonalt sekundærantistoff mot C6 tilsatt. Streptavidin peroxidase ble benyttet som konjugat. Fargeutviklingen etter tilsats av acetatbuffer var proporsjonal med konsentrasjonen av TCC i prøven. Absorbansen ble målt ved 405 nm, med et referansefilter på 490 nm.

3.4.3 Lang pentraxin 3 (PTX3)

Lang pentraxin 3 er omtalt under avsnittet som omhandler inflammatoriske mediatorer. Måling av PTX3 utføres ved hjelp av en kommersielt kit fra R&D Systems (katalog nummer DPTX30, Minneapolis MN, USA)[126] [123]. Dette er en kvantitativ "sandwich" immunoassay. Prosedyren som var vedlagt kitet ble fulgt. Brønnene i platen var fra fabrikanten dekket med streptavidin. Det ble tilsatt biotinyleret monoklonalt antistoff mot PTX3. PTX3 i prøvematerialet ble bundet til dette antistoffet. Ubundne komponenter ble vasket bort. Enzytbundet konjugat spesifikt for PTX3 ble tilsatt. Fargeutviklingen som ble målt etter tilsats av substratløsning var proporsjonal med nivået av PTX3 i prøven. Absorbanmåling ble utført på 450 nm.

3.5 Cytokin analysering på Multiplex teknologi

Bio-Plex Cytokine Assay fra Bio Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ble benyttet for å kvantitere nivået av 27 ulike cytokiner. Cytokiner er omtalt i avsnitt 2.3.1.

Analysene ble utført i samsvar med kitets prosedyre [127]. Metoden er designet som en "sandwich" immunoassay. Polystyren kulene på 5.6 µm er farget med en spesifikk farge for hver analytt. Kulene har bundet spesifikke antistoff for hver analytt som ønskes analysert.

Cytokinene i prøven bindes deretter til antistoffene på kulene. Flere påfølgende vaskeprosesser fjerner ubundet protein. Deretter ble biotinyleret antistoff mot spesifikke epitoper på cytokinene tilsatt. Streptavidin-phycoerythrin ble tilsatt og dette ble bundet til det biotinylerede sekundære antistoffet. Et flowcytometer med to lasere detekterte bindingene mellom cytokiner fra prøvematerialet og kulene. Flowcytometret identifiserte og kvantifiserte bindingene på kulene ved hjelp av kulens farge og intensiteten av fluorescensen. En høyhastighets digital prosessor behandlet raskt alle dataene som ble produsert av flowcytometret. Resultatene ble beregnet ved hjelp av en standardkurve som ble generert etter analyseringen av en standardrekke med rekombinante cytokiner.

3.6 Analysering av TF mRNA

3.6.1 Lysering av celler

Cellefraksjonen ble benyttet videre til mRNA analyse. Cellene ble lysert ved å tilsette 1x Nucleic Acid Purification Lysis solution (Applied Biosystems, Warrington, UK). Prøvene ble oppbevart på is under lysering og lagret i -80°C fryser inntil de ble behandlet videre.

3.6.2 Ekstraksjon

RNA innholdet i prøvene ble isolert ved hjelp den halvautomatiske ekstraktoren AB6100 Nucleic Acid Prep station (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Programmet for RNA fra fullblod ble valgt og reagenser fra Applied Biosystems ble benyttet.

3.6.3 Konsentrasjonsmåling av RNA

Etter isolering av RNA ble det gjennomført absorbansmåling for å finne RNA konsentrasjonen. Dette for å sikre at samme mengde RNA fra hver prøve ble brukt i den videre prosessen. Spektrofotometret Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) ble bbrukt og prøvene ble analysert i duplikat. Absorbansverdien ble automatisk beregnet til $\mu\text{g/mL}$, som tilsvarer $\text{ng}/\mu\text{L}$.

3.6.4 cDNA

Til den videre behandlingen var det ønsket 50 ng RNA. Ved hjelp av Excel ble det beregnet volum av isolert RNA og nukleasefritt vann. Totalvolumet ble satt til 50 μL . For å gjennomføre revers transkripsjon ble det benyttet High Capacity cDNA Reverse transcription kit og Thermal cycler (Applied Biosystems) [128]. Denne prosessen omdanner RNA til komplementært DNA. Ved hjelp av revers transkriptase ble det syntetisert enkelttrådet DNA kopi av RNA. Dette var nødvendig da RNA ikke kan brukes direkte i qPCR. cDNA er

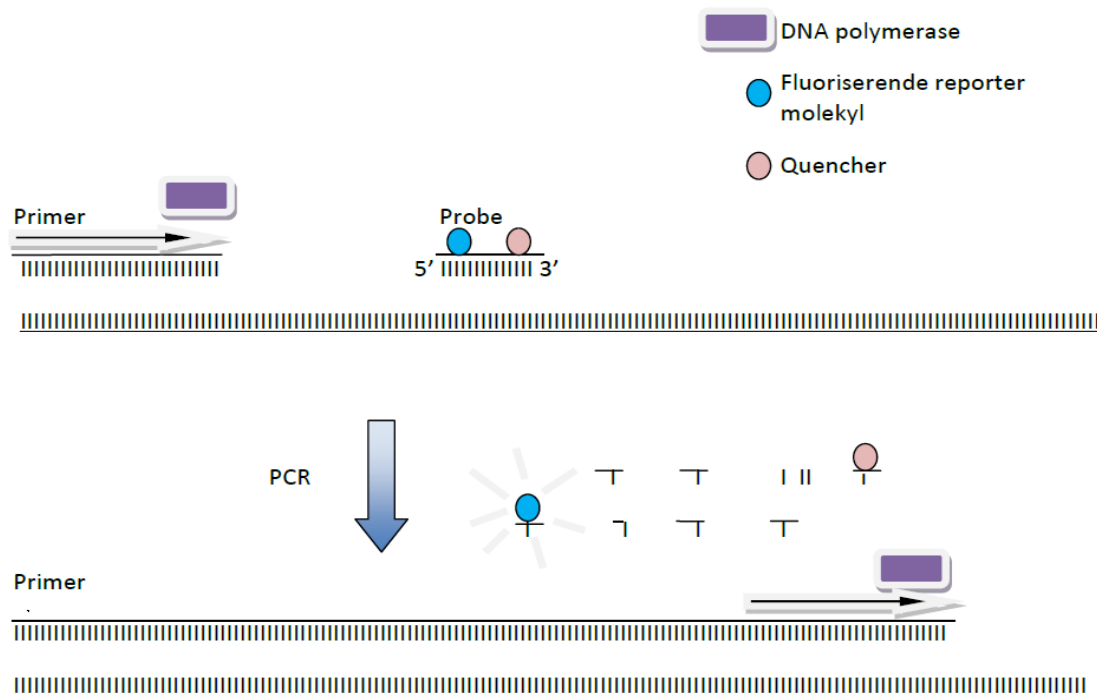
dessuten mer stabilt enn RNA som lett brytes ned av RNase. Reagensene ble benyttet ihht. protokollen fra Applied Biosystems (High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol). Reagens per prøve:

10 x RT buffer	2,0 μL
25 x dNTP mix	0,8 μL
10 x RT Random primers	2,0 μL
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	1,0 μL
Nuklease-free H ₂ O	4,2 μL

Dette er mastermikts for et totalvolum på 20 μL , dette ble skalert opp til et totalvolum på 100 μL .

3.6.5 RT-qPCR

I denne studien ble det benyttet real time kvantitativ PCR (RT-qPCR). Dette er en mer sensitiv metode enn tradisjonell PCR. Dessuten er den både hurtigere og mer spesifikk. Ved RT-qPCR unngår en tidkrevende gelelektroforese og reagensene er mindre helseskadelige. Til analysen kreves det to primere, polymerase, DNA prøvemateriale og en probe merket med en reporter fluorescende farge på 5'enden og en "quencher" på 3'enden. Proben binder seg til en spesifikk sekvens for genet en vil analysere. "Quencher" forhindrer at fluorescens frigis, dette gjøres ved at "quencher" fanger opp lysenergien fra reporteret molekylet og ikke sender dette videre. Når polymerasen arbeider seg langs DNA tråden, vil proben som er festet til den spesifikke sekvensen destrueres. Quencher kan ikke lenger forhindre fluorescens. Dette detekteres og det dannes et diagram over målt fluorescens i syklusene. Det er tre faser, i den første er det eksponensiell vekst, antall kopier av DNA tråden dobles for hver syklus. Den neste er lineær, tilgangen på reagenser er mindre. Den siste fasen er platåfasen der det ikke lenger er reagenser og reaksjonene stanser. Målinger foretas i den første fasen, da dette gir den beste presisjon og nøyaktighet av resultatet. Terskellinjen ("Threshold line") oppnås når intensiteten av fluorescens overstiger bakgrunnsstøyen, og C_T-verdien defineres som antall sykluser som er gjennomført før denne fluorescens intensiteten oppnås. En lav C_T-verdi indikerer en høy konsentrasjon av det aktuelle mRNA i prøven.



Figur 7. Prinsipp bak TaqMan probe. Fluorokrommet vil ikke frigi fluorescens så lenge det er i nærheten av quencher molekylet. Når DNA polymerase bryter ned proben som er spesifikt bundet til en gensekvens, splittes reporter og quencher molekylene og fluorescens frigis.

I denne studien ble det benyttet multiplex RT-qRNA. Flere spesifikke DNA sekvenser kan detekteres ved hjelp av ulike fluorogene fargestoffer. Humant beta -2-mikroglobulin (B2M, assay ID 4326319E, fra Applied Biosystems) ble benyttet som referanseggen og TF (Hs00175225_ml) målgenet ble analysert i samme mikrotiterbrønn. Referanseggen og målgen fikk like forutsetninger og reagensforbruket ble halvert. B2M proben var VIC farget, mens TF proben var FAM merket. Det ble blandet en mastermiks for ønsket antall prøver. Dette er reagensbehovet per prøve:

TaqMan Fast Reagens (Applied Biosystems, USA)	5,0 µL
Endo/Target Primer	0,5 µL
Nukleasefritt vann	1,0 µL

Det ble tilsatt 3µL cDNA til hver brønn.

Prøvene ble analysert i triplikat på et 7500 Real time PCR system fra Applied Biosystems. Resultatene ble vanligvis sammenlignet med C_T verdien i T0 prøven, som ble satt til 1 og brukt som kalibrator. Den relative konsentrasjonen av TF mRNA ble funnet ved hjelp av

”delta-delta C_T ” metoden. Denne metoden sammenligner C_T verdien for TF og referansegenet som er et gen som er likt uttrykt i alle prøvene ved hjelp av formelen $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Metoden analyserer de relative endringene i genuttrykket til referansegenet og målgenet, under forutsetning av at PCR av målgenet og referansegenet har samme effektivitet [129].

3.7 Kvantitering av TF på celleoverflaten ved hjelp av flowcytometri

Ekstracellulært TF uttrykk på monocytter ble analysert ved hjelp av flowcytometri på et BD LSR II flowcytometer (Becton Dickinson). Citrat ble tilsatt i forholdet 1:9, til blod som var inkubert i 2 timer. Det ble benyttet 12,5 μL citratblod til analysen. Et FITC-konjugert monoklonalt antistoff mot humant TF (produksjonsnummer 4508CJ, American Diagnostica Inc, Stamford, CT, USA) ble brukt i en final konsentrasjon på 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etter tilsats av 500 μL filtrert deionisert vann til 0,1 mg/mL og 500 μL PBS med 1 % BSA.

Prøvene ble tilsatt 2,5 μL FITC merket anti-TF og 2,5 μL anti-CD14 PE (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Til hver prøve ble det også analysert en gammakontroll. Gammakontrollen besto av 12,5 μL citratblod tilsatt 2,5 μL IgG1 FITC (BD 345815) og 2,5 μL CD14 PE (BD 345785).

Prøvene med FITC konjugert antistoff ble inkubert mørkt i 15 minutter ved romtemperatur. Polypropyl-MTB (BD 353263) rør ble benyttet. Deretter ble det tilsatt 250 μL Easylyse (S2364, DakoCytomation, Glostrup Danmark) som var fortynnet 1:20 med destillert vann. Dette lyserte erytrocyttene etter 15 minutters inkubering i mørke ved romtemperatur. Deretter ble det gjennomført en vaskeprosedyre med med 0,1 % BSA (PBS tilsatt 0,1 % bovint serum albumin) etterfulgt av sentrifugering ved 300 x g i 5 minutter. PBS (250 μL) ble tilsatt og prøvene var klar til analysering på flowcytometret.

Granulocytter og monocytter vil plassere seg på ulike steder i plottet med ”fremover” spredning (FSC) langs x-aksen og side spredning (SSC) på y-aksen. FSC skiller mellom relative forskjeller i størrelse av celler eller partikler. SSC skiller mellom kompleksitet eller granularitet. Når fluorescensmerkede antistoff utsettes for lyset fra laserstrålen, vil den tilførte energien føre til at fluorkrommet eksiteres. Når det eksiterte molekylet faller tilbake til grunntilstanden vil energien emitteres som lys. Dette kalles fluorescens. FITC absorberer blått lys og emitterer grønt lys ved 530 nm. PE emitteres som gult lys ved 575 nm [130]. Resultatene ble angitt i middelerdi for fluorescens intensitet (MFI). MFI for gamma kontrollen ble trukket fra MFI for TF uttrykk i prøven. Antistoffet vil ikke kunne bindes til

kryptert TF eller TF som er bundet TFPI. Det er kun eksponert TF som detekteres i denne analysen.

3.8 TF funksjon i plasma mikropartikler

Etter 2 timers inkubering ble plasma først sentrifugert for å få et platefritt plasma. Prøvene ble så frosset ved -80°C og sendt frosset til samarbeidspartner prof. Bjarne Østerud (Institutt for Medisinsk Biologi, Univ. i Tromsø). TF funksjon i plasma mikropartikler ble så analysert vha. av en enzymatisk metode i laboratoriet til prof. Østerud ihht. Engstad et al. [131]. Først ble mikropartiklene fra plasma isolert vha. ultrasentrifugering ($40000 \times g$, 90 min) ved $+4^{\circ}\text{C}$. Mikropartiklene ble så etter ultrasentrifugeringen resuspendert i 0,15 M NaCl og frosset ved -70°C . Prøvene ble deretter tint og TF funksjon analysert vha. en to stegs enzymatisk metode. Metoden er basert på evnen TF har til å øke den FVIIa medierte aktiveringen av FX, etterfulgt av FXa mediert omdanning av protrombin til trombin i nærvær av FVa [131].

3.9 Statistikk

Resultatene ble bearbeidet i statistikkprogrammet Graph Pad Prism versjon 5.03 (GraphPad Software, Inc. California). Det ble benyttet enveis ANOVA for repeterte målinger. ANOVA for repeterte målinger ble valgt da det var blod fra samme blodgiver som gjennomgikk ulike behandlinger. Dunnett's posttest ble brukt og i denne testen sammenlignes middelerdiene av hver gruppe mot middelerdien i en kontrollgruppe. Dette gjøres uten at de andre gruppene sammenlignes mot hverandre [132]. I denne studien ble rørene med *E. coli* eller LPS tilsatt kun PBS og uten tilstedeværelse av hemmer sammenlignet mot de øvrige gruppene. For å kunne bruke denne testen må tallene være normalfordelte. Dersom tallseriene ikke var normalfordelt ble tallene transformert logaritmisk. I noen få tilfeller ble slengere (outliers) fjernet fra tallmaterialet hvis verdien lå $>$ eller $<$ 3 standardavvik fra gjennomsnittet av de 5 andre tallene og dette tallet ble deretter erstattet med middelerdien av de resterende tallene for serien. Dersom $P < 0,05$ ble forskjellen karakterisert som statistisk signifikant.

4. Resultater

4.1 Resultater fra forstudien

LPS konsentrasjon på 100 ng/mL ga tilstrekkelig målbart uttrykk av TF ekstracellulært på monocytter og økning av TF mRNA inne i cellene. Inkubasjonstidene ble derfor satt til 120 minutter for måling av TF uttrykt ekstracellulært. Økning i TF mRNA viste seg å være detekterbar allerede etter 60 minutter. For å finne den relative mengden av mRNA inne i

cellene ble det derfor utført RT-PCR etter både 60 og 120 minutter. Tidligere forsøk gjennomført ved forskningsgruppen her ved Nordlandssykehuset har vist at cytokinfrigjøringen først stiger etter 120 minutters inkubering. Derfor ble det besluttet at cytokin-analysene i EDTA-plasma skulle utføres på prøver som var inkubert i 120 minutter.

4.2 Resultater fra hovedstudien

Det vil her kun i korthet nevnes hovedfunnene fra prosjektet. Alle resultatene er ellers omtalt i artikkelen til Landsem et al., som er en del av oppgaven.

- *E. coli* og LPS ga økt TF mRNA nivå og økt ekstracellulært proteinuttrykk av TF på monocytter sammenlignet med PBS kontrollen. Begge stimuli økte også TF funksjon i plasma mikropartikler. Koagulasjonsaktivering målt som protrombin F1+2 og komplementaktivering målt som TCC økte også etter tilsetning av *E. coli* og LPS til fullblod. Dessuten økte i betydelig grad de inflammatoriske mediatorer som cytokiner og PTX3.
- C1-INH i alle de benyttede konsentrasjonene reduserte signifikant både *E. coli* og LPS induert protrombin F1+2 nivået i humant fullblod. Komplementhemmeren compstatin ga også en statistisk signifikant reduksjon av protrombin F1+2 for begge stimuli.
- C1-INH reduserte TF mRNA ekspresjon, ekstracellulært TF uttrykk på monocytter og TF funksjon i plasma mikropartikler. Compstatin reduserte også TF mRNA og TF ekspresjon på monocytter, men oppnådde ikke en statistisk signifikant reduksjon for TF funksjon i mikropartikler.
- C1-INH reduserte PTX3 nivået tilbake til T0 nivå. Compstatin reduserte PTX3 tilbake til nivået i den spontane kontrollen.
- C1-INH hemmet frigjøringen av flere cytokiner. Compstatin hadde ikke noen hemmende effekt på cytokinsyntesen, med unntak av IL-8 syntesen.
- Kontrollforsøkene med iC1-INH viser at iC1-INH hemmer koagulasjonsaktivering målt som protrombin F1+2. iC1-INH hadde ikke samme effekt som C1-INH på de andre målte analyttene.
- Det var kun den høyeste konsentrasjonen C1-INH som reduserte den *E. coli*-induserte komplementaktivering statistisk signifikant. Compstatin som er en spesifikk C3 konvertasehemmer, hemmet som forventet TCC nivået signifikant.

5. Diskusjon

Sepsis er en kompleks og sammensatt diagnose med aktivering av mange kaskadesystemer. Til tross for moderne antibiotikabehandling krever sepsis fortsatt mange liv [1]. TF er viktig i patogenesen ved denne tilstanden ettersom TF aktiverer den ytre koagulasjonsvei som kan bidra til utvikling av DIC [7;76]. I tillegg er koagulasjonsaktiveringen trolig også involvert i komplementaktivering bla. via trombin [72]. Denne studien har vist at C1-INH og compstatin reduserte LPS- og *E. coli*-stimulert TF målt som mRNA, ekstracellulært uttrykk på monocytter og TF funksjon i plasmamikropartikler. C1-INH og compstatin reduserte dessuten koagulasjonsaktiveringen målt som protrombin F1+2, noe som kan tyde på at C1-INH og C3 hemming kan redusere koagulasjonsaktivering ved en Gram-negativ sepsis. Resultatene tyder på at en del av koagulasjonsaktiveringen ved sepsis er komplementmediert.

Nye terapeutiske behandlingsstrategier ved sepsis

Graden av komplementaktivering er korrelert til dødeligheten ved Gram-negativ sepsis [133]. Komplementaktivering vil bla. bidra til å gi aktiverte monocytter som uttrykker TF. Det er flere innfallsvinkler for å stanse denne aktiveringen. I denne studien er det i tillegg til C1-INH også benyttet compstatin som er en generell hemmer av komplementsystemet. Compstatin hemmer C3 og dermed alle de tre aktiveringsveiene. En økt mottakelighet for andre infeksjoner kan være en uønsket bivirkning ved denne typen blokkering av komplementaktivering. Dette bla. fordi blokkeringen gir redusert opsoniseringen og dermed redusert fagocytose [50]. Behandling ved sepsis vil imidlertid vanligvis være av relativt kort varighet og foregå på sykehus der pasienten overvåkes. En annen mulighet er å hemme de enkelte komplementaktiveringsveiene spesifikt. Dette forutsetter at aktiveringsveien som er involvert i det enkelte tilfelle er kjent, og det reduserer trolig potensialet til denne strategien i betydelig grad. Alternativ aktiveringsvei sørger bla. for økt komplementaktivering mediert av de andre aktiveringsveiene. Hemming av faktor B og D vil dempe denne komplementaktivering [134]. Det er også flere muligheter for å hemme C5 og anafylatoksinet C5a. C5aR antagonist eller antistoff mot C5a er to av mulighetene [135]. Dannelse av C5a er også involvert i *Neisseria meningitidis*-indusert TF [136]. Soliris er et medikament som består av et monoklonalt immunoglobulin som bindes til C5 og hindrer spaltning til C5a og C5b [137]. Disse vil hemme virkningene av C5a og dannelse av TCC, men effektene før C5a vil ikke hemmes. Effektene av C3a vil fremdeles være tilstede. Hemming

av C5 og C5a er vist å bedre overlevelsen ved sepsis i flere dyremodeller [138]. En studie av solirisbehandling av ”paroxysmal nocturnal hemoglobinuri” (PNH) pasienter viser at hemming av C5-aktivering også vil resultere i redusert trombindannelse [139]. Mekanismene bak denne effekten er ukjent. En annen strategi er en kombinert hemming av komplement og CD14. CD14 er en viktig LPS reseptor. Forsøk med anti-C2, anti-faktor D og anti CD14 opphevet nesten fullstendig den *E. coli* induerte inflammatoriske responsen i fullblod [140]. Studier på kombinasjon av både komplement og CD14 hemming er fortsatt et viktig forskningsområde med hensyn til blant annet sepsis [141]. Denne studien gir sterke indikasjoner på at LPS og *E. coli* induert koagulasjonsaktivering er komplementmediert. Dette støtter teorien om at komplementhemming fortsatt kan være en god tilnærming mot utvikling av tilleggsbehandling for sepsis.

Koagulasjonsaktiveringen er en viktig prosess ved sepsis. Det vil oppstå en prokoagulant tilstand ved sepsis på grunn av aktiverte immunceller og endotelceller, som medfører økt uttrykk av TF. I tillegg vil de naturlige antikoagulanssystemene være nedregulert. Dette vil gi økt trombetendens og blødningsrisiko på grunn av økt forbruk av koagulasjonsfaktorer. For å gjenopprette balansen mellom koagulasjon og antikoagulasjon, har en strategi vært å øke nivået av naturlige antikoagulanter. Rekombinant protein C behandling har vært benyttet også på mennesker, men på grunn av manglende effekt er dette preparatet nå trukket tilbake fra markedet [17]. Effekten av rekombinant TFPI tilførsel ved sepsis er også blitt undersøkt. Hemming av TF uttrykk ved hjelp av antistoff er en tredje strategi. Dette er omtalt under avsnitt 2.1.1. Utfordringen er å gjenopprette den riktige balansen mellom koagulasjon og fibrinolyse ved sepsis, for å forhindre økt risiko for tromber eller blødning.

Cytokinsyntesen er betydelig økt ved sepsis og bidrar trolig til aktivering av andre kaskadesystem som bla. koagulasjon og komplement. Cytokinene vil i tillegg aktivere bla. endotelceller og nøytrofile granulocytter som øker uttrykket av adhesjonsmolekyl. Nivået av proinflammatoriske cytokiner har vist seg å korrelere med alvorligheten og mortaliteten av sepsis [142]. Hemming av cytokinfrigjørelse har vært undersøkt ved bruk av blant annet anti-TNF antistoff, men dette har imidlertid ikke gitt ønskede effekter verken in vivo eller in vitro [143]. Flere nye tilnærminger for å redusere cytokinstormen ved sepsis er under utprøving [14]. I vår studie er det gjort forsøk på å hemme kaskader som stimulerer til økt

cytokinsyntese. Komplementaktivering gir bla. økt nivå av anafylatoksiner som igjen medfører økt frigjørelse av cytokiner [144].

C1-INH er en proteasehemmer. Det er mulig at også andre proteasehemmere kan bli aktuelle kandidater for behandling av sepsis. Mange av de aktive komponentene i kaskadesystemene er proteaser. Det er blitt vist at alfa-1 antitrypsin kan hemme cytokinsyntese i humant fullblod [145]. Alfa-1 antitrypsin hemmer også proteasen elastase som frigis fra aktiverte nøytrofile granulocytter [110]. Elastase bryter ned C1-INH og TFPI [68;110].

C1-inhibitor som mulig behandling ved sepsis

Det er nylig publisert resultater fra en klinisk studie på pasienter med sepsis som viser at C1-INH reduserte mortaliteten signifikant da dette ble gitt i tillegg til tradisjonell behandling [3]. Forsøkene som ble gjennomført i vår studie kan tyde på at effekten C1-INH har på TF uttrykk og koagulasjonsaktivering kan være en del av forklaringen på disse funnene. Det er tidligere vist at C1-INH er en mindre effektiv komplementhemmer enn compstatin [146]. Dette ble bekreftet ved TCC-resultatene i denne studien. C1-INH i høye doser ga imidlertid en reduksjon av alle de målte parametrene. Dette skyldes sannsynligvis ikke bare den komplementhemmende effekten, men også andre effekter ved C1-INH. C1-INH tilhører serpin familien og er en kjent regulator av flere prosesser som er relevant i denne sammenhengen. I tillegg til å være en viktig hemmer for komplementaktivering via klassisk, lektin og alternativ aktiveringsvei, har den også en regulerende rolle innenfor indre koagulasjonsaktiveringsvei og kallikrein-kininsystemet [97]. Det har inntil nylig vært fokusert på proteinets proteasehemmende effekter og binding til proteaser. Flere studier har vist at C1-INH også har andre egenskaper som er uavhengige den proteasebindende funksjonen. Noen av disse effektene har vist seg å være anti-inflammatoriske [21]. To av effektene som er uavhengig den proteasebindende effekten til C1-INH er binding til LPS og *E. coli* [21;109]. Dette vil gi redusert aktivering av monocytterne og dermed lavere uttrykk av TF.

Det er flere proteasebindende effekter som er viktig for koagulasjonsaktivering. C1-INH hemmer proteasen FSAP [97]. FSAP hemmer TFPI, som er en viktig TF hemmer [58]. C1-INH vil derfor kunne redusere TF uttrykket ved hemming av FSAP. Det er nylig publisert

en studie som viser at MASP-1, som er en protease i lektin komplementaktiveringsvei, også påvirker koagulasjonen. MASP-1 kan aktivere protrombin, FXIII og TAFI uavhengig av trombin [147]. MASP-1 er en protease som hemmes av C1-INH [103]. Dessuten er det beskrevet at FXII direkte kan aktivere FVII. C1-INH hemmer FXII, og kontaktaktivering vil derfor kunne reduseres, noe som trolig forklarer hvorfor C1-INH reduserer protrombin F1+2 til nivå under den spontane PBS kontrollen.

Cytokinsyntesen ble med unntak av IL-8, ikke påvirket av compstatin. C1-INH hemmet derimot cytokinsyntesen. Flere av de proinflammatoriske cytokinene bidrar til økt TF ekspresjon noe som kan forklare den mer uttalte effekten C1-INH har på TF oppreguleringen. TF er avgjørende for koagulasjonsaktivering og vil derfor ha stor betydning for protrombin F1+2 resultatene [53]. Da iC1-INH også gir reduksjon av koagulasjonsaktivering tyder dette på at noen av effektene ved koagulasjonshemmingen er uavhengig C1-INH proteasebindende funksjon. Effekten C1-INH hadde på TF oppreguleringen og koagulasjonsaktivering skyldes mest sannsynlig ikke bare en enkelt mekanisme. Det er heller et resultat av de mange proteasehemmende og anti-inflammatoriske egenskaper som C1-INH innehar.

C1-INH i suprafysiologiske konsentrasjoner gir god hemming av inflammasjonsprosessen ved sepsis. Både komplement og koagulasjonsaktivering blir hemmet ved høye C1-INH konsentrasjoner. I praksis kan det være et problem å oppnå slike høye C1-INH konsentrasjoner i blodbanen ved sepsis. I tidligere sepsisstudier er det ved intravenøs infusjon oppnådd konsentrasjoner av C1-INH som er opptil 3-5 ganger høyere enn den fysiologiske konsentrasjonen [148;149]. I denne studien er den høyeste konsentrasjonen (5 mg/ml) som ble brukt 20 ganger høyere enn den fysiologiske konsentrasjonen, mens den laveste benyttede konsentrasjonen (1,25 mg/ml) er 5 ganger høyere enn den fysiologiske konsentrasjonen. Ettersom C1-INH (1,25 mg/ml) ga en betydelig hemming av LPS- og *E. coli*-indusert koagulasjonsaktivering målt som protrombin faktor 1+2, er det sannsynlig at lavere C1-INH konsentrasjoner også kan ha stor effekt på koagulasjonsaktivering. Dette gjenstår å undersøke i videre studier.

Studier har indikert at høye C1-INH doser kan gi uheldige bivirkninger som økt tromberisiko [105]. Dette ble begrunnet i effekten C1-INH har på fibrinolytiske hemmere. Et redusert nivå av plasmin vil kunne redusere fibrinolysen. Nedbrytningen av trombin vil dermed bli ufullstendig. Risikoen for utvikling av tromber kan derfor bli økt. Horstick et al. anbefalte derfor at det ikke burde benyttes høyere C1-INH doser enn 100 eller 200 IU/kg. Studien ble gjennomført som en følge av en rapport der C1-INH behandling av nyfødte ble sannsynliggjort som årsak for at 9 av 16 døde av trombedannelse [105]. Heparin øker effekten av C1-INH når det gjelder enkelte effekter [150]. Horstick benyttet derfor ikke heparin i forsøket. Hack mener dette kan være årsaken til den protrombotiske effekten Horstick finner ved bruk av C1-INH [151]. Denne risikoen blir også tilbakevist av Relan et al. som ved studier på HAE pasienter kunne vise til at nivået av trombin-antitrombin kompleks (TAT), D-dimer og PAP-komplekset var uendret etter tilførsel av rekombinant human C1-INH (rhC1-INH). D-dimer nivået er avhengig av pågående koagulasjon og fibrinolyse. De bekreftet sitt funn ved å vise til at hovedhemmerne for plasmin og t-PA er henholdsvis alfa-2-antiplasmin og PAI-1. C1-INH har liten innvirkning på hemming av fibrinolysen i forhold til disse. Relan konkluderer med at rhC1-INH opptil 100 U/kg ikke gir økt risiko for trombedannelse [152].

Framtidsvisjoner

På et tidlig stadium av sepsisutviklingen kan den mikrobiologiske årsaken være ukjent. Det vil derfor være gunstig å undersøke effekten av C1-INH også på Gram-positive bakterier. Det er flere studier underveis på dette feltet. Dessuten utgjør endotelet en viktig del i patogenesen ved sepsis. Endotelcellene aktiveres ved en inflammasjonsprosess og er viktige både for væskebalanse, prokoagulans, rekruttering og infiltrering av leukocytter til vevet. Effekten av C1-INH på endotelcellene kan studeres *in vitro* i cellekulturer eller *in vivo* i dyremodeller.

De effektene vi har funnet av C1-INH på LPS- og *E. coli*-indusert TF er lovende, men konsentrasjonene er høye. C1-INH reduserer imidlertid enkelte av de målte parametrene så kraftig at en lavere dose av C1-INH sannsynligvis kan gi en tilstrekkelig hemmende effekt, bla. på koagulasjonsaktivering. Dette må imidlertid undersøkes med nye forsøk der lavere C1-INH konsentrasjoner benyttes. Resultatene fra denne studien gir uansett nytt innblikk i sammenhengen mellom komplement- og koagulasjonsaktivering ved Gram-negativ sepsis.

Dessuten gir resultatene grunn til videre forskning på komplementhemming som potensiell støttebehandling ved sepsis.

Referanser

1. 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.
2. Cai S, Davis AE, III. Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. *J.Immunol.* 2003; 171:4786-91.
3. Igonin AA, Protsenko DN, Galstyan GM et al. C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis*. *Crit Care Med.* 2012; 40:770-7.
4. Liu D, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE, III. C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J.Immunol.* 2007; 179:3966-72.
5. Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema. *Scand.J.Immunol.* 1996; 44:185-92.
6. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B et al. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 1997; 89:3213-8.
7. Warr TA, Rao LV, Rapaport SI. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 1990; 75:1481-9.
8. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008; 36:296-327.
9. Namas R, Zamora R, Namas R et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *J.Crit Care* 2011.
10. Oehmcke S, Herwald H. Contact system activation in severe infectious diseases. *J.Mol.Med.(Berl)* 2010; 88:121-6.
11. Chong DL, Sriskandan S. Pro-inflammatory mechanisms in sepsis. *Contrib.Microbiol.* 2011; 17:86-107.
12. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterr.J.Hematol.Infect.Dis.* 2010; 2:e2010024.

13. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand.J.Immunol.* 2009; 69:479-91.
14. Matsuda A, Jacob A, Wu R et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J.Nihon Med.Sch* 2012; 79:4-18.
15. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie.* 2010; 30:10-6.
16. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344:699-709.
17. Mitka M. Drug for severe sepsis is withdrawn from market, fails to reduce mortality. *JAMA* 2011; 306:2439-40.
18. Van Den Boogaard FE, Brands X, Schultz MJ et al. Recombinant human tissue factor pathway inhibitor exerts anticoagulant, anti-inflammatory and antimicrobial effects in murine pneumococcal pneumonia. *J.Thromb.Haemost.* 2011; 9:122-32.
19. Abraham E, Reinhart K, Opal S et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290:238-47.
20. Taylor FB, Jr., Chang A, Ruf W et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ.Shock* 1991; 33:127-34.
21. Davis AE, III, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb.Haemost.* 2010; 104:886-93.
22. Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. *Kuby Immunology.* New York: W. H. Freeman and Company, 2007, ISBN 978-1-4292-0211-4
23. Anas A, van der Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Crit Care* 2010; 14:209.
24. Slotwinski R, Slotwinska S, Kedziora S, Balan BJ. Innate immunity signaling pathways: links between immunonutrition and responses to sepsis. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 2011; 59:139-50.
25. Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282:2085-8.
26. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J.Immunol.* 1999; 162:3749-52.

27. Osterud B, Bjorklid E. Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci.(Elite.Ed)* 2012; 4:289-99.
28. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2011; 11:519-31.
29. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011; 16 Suppl 1:S11-S21.
30. van der Poll T, de JE, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin.Thromb.Hemost.* 2001; 27:639-51.
31. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J.Biol.Chem.* 1992; 267:22190-7.
32. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J.Clin.Immunol.* 2008; 28:1-13.
33. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J.Biol.Chem.* 1997; 272:32817-23.
34. Doni A, Peri G, Chieppa M et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2003; 33:2886-93.
35. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Inrona M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 1994; 84:3483-93.
36. Jaillon S, Peri G, Delneste Y et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J.Exp.Med.* 2007; 204:793-804.
37. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu.Rev.Immunol.* 2005; 23:337-66.
38. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 2004; 131:1577-86.

39. Muller B, Peri G, Doni A et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2001; 29:1404-7.
40. Rovere P, Peri G, Fazzini F et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 2000; 96:4300-6.
41. Napoleone E, di SA, Bastone A et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002; 22:782-7.
42. Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J.Exp.Med.* 1994; 179:503-12.
43. Napoleone E, di SA, Peri G et al. The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J.Leukoc.Biol.* 2004; 76:203-9.
44. Ma YJ, Doni A, Skjoedt MO et al. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. *J.Biol.Chem.* 2011; 286:3405-17.
45. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344:1058-66.
46. Rodriguez de CS, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de JE, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol.Immunol.* 2004; 41:355-67.
47. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol.Lett.* 2011; 138:35-7.
48. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur.J.Immunol.* 2003; 33:465-73.
49. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin.Exp.Immunol.* 2004; 138:439-46.
50. Mollnes TE, Kirschfink M. Strategies of therapeutic complement inhibition. *Mol.Immunol.* 2006; 43:107-21.
51. Nemerson Y, Bach R. Tissue factor revisited. *Prog.Hemost.Thromb.* 1982; 6:237-61.

52. Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood* 2009; 114:2367-74.
53. Nielsen EW, Morrissey J, Olsen JO, Osterud B. Factor VIIa in patients with C1-inhibitor deficiency. *Thromb.Haemost.* 1995; 74:1103-6.
54. Pixley RA, De La Cadena R, Page JD et al. The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J.Clin.Invest* 1993; 91:61-8.
55. Davis AE, III, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol.Immunol.* 2008; 45:4057-63.
56. Leung LL, Nishimura T, Myles T. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). *Adv.Exp.Med.Biol.* 2008; 632:61-9.
57. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2008; 28:233-42.
58. Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, Broze G, Etscheid M. Factor VII-activating protease promotes the proteolysis and inhibition of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2012; 32:427-33.
59. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J.Thromb.Haemost.* 2007; 5 Suppl 1:102-15.
60. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J.Thromb.Haemost.* 2009; 7 Suppl 1:136-9.
61. Kobayashi M, Shimada K, Ozawa T. Human recombinant interleukin-1 beta- and tumor necrosis factor alpha-mediated suppression of heparin-like compounds on cultured porcine aortic endothelial cells. *J.Cell Physiol* 1990; 144:383-90.
62. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; 24:1374-83.
63. Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Kleiss AJ. Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982; 60:261-4.
64. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 1986; 163:740-5.
65. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of

- procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J.Exp.Med.* 1984; 160:618-23.
66. Faust SN, Levin M, Harrison OB et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N.Engl.J.Med.* 2001; 345:408-16.
 67. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J.Clin.Invest* 1987; 79:124-30.
 68. Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ, Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1992; 79:1712-9.
 69. Hancock WW, Tsuchida A, Hau H, Thomson NM, Salem HH. The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy. *Transplant.Proc.* 1992; 24:2302-3.
 70. Sarangi PP, Lee HW, Kim M. Activated protein C action in inflammation. *Br.J.Haematol.* 2010; 148:817-33.
 71. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005; 105:3178-84.
 72. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat.Med.* 2006; 12:682-7.
 73. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc.)* 2002; 67:75-84.
 74. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97:5255-60.
 75. Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J.Leukoc.Biol.* 2008; 83:1309-22.
 76. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28:1755-62.
 77. Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin.Thromb.Hemost.* 2006; 32:24-32.
 78. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am.J.Pathol.* 1989; 134:1087-97.

79. Egorina EM, Sovershaev MA, Hansen JB. The role of tissue factor in systemic inflammatory response syndrome. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 2011; 22:451-6.
80. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006; 26:456-61.
81. Carmeliet P, Mackman N, Moons L et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383:73-5.
82. Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J.Innate.Immun.* 2010; 2:439-45.
83. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb.Haemost.* 2009; 101:439-51.
84. Lechner D, Weltermann A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb.Res.* 2008; 122 Suppl 1:S47-S54.
85. Petaja J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb.Res.* 2011; 127 Suppl 2:S34-S37.
86. Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 2005; 100 Suppl 1:177-80.
87. Ratnoff OD, Lepow IH. Some properties of an esterase derived from preparations of the first component of complement. *J.Exp.Med.* 1957; 106:327-43.
88. Bock SC, Skriver K, Nielsen E et al. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986; 25:4292-301.
89. Schapira M, de AA, Schifferli JA, Colman RW. Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: current issues. *Complement* 1985; 2:111-26.
90. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC et al. Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J.Clin.Invest* 1989; 84:443-50.
91. Kalter ES, Daha MR, ten CATE JW, Verhoef J, Bouma BN. Activation and inhibition of Hageman factor-dependent pathways and the complement system in uncomplicated bacteremia or bacterial shock. *J.Infect.Dis.* 1985; 151:1019-27.
92. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the

- treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol.Rev.* 2000; 52:91-112.
93. Yeung Laiwah AC, Jones L, Hamilton AO, Whaley K. Complement-subcomponent-C1-inhibitor synthesis by human monocytes. *Biochem.J.* 1985; 226:199-205.
 94. Salvesen GS, Catanese JJ, Kress LF, Travis J. Primary structure of the reactive site of human C1-inhibitor. *J.Biol.Chem.* 1985; 260:2432-6.
 95. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000; 407:923-6.
 96. Bos IG, Hack CE, Abrahams JP. Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiology* 2002; 205:518-33.
 97. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin.Thromb.Hemost.* 2011; 37:362-74.
 98. Perlmutter DH, Glover GI, Rivetna M, Schasteen CS, Fallon RJ. Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; 87:3753-7.
 99. de ZC, Kleine AH, Diris JH et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur.Heart J.* 2002; 23:1670-7.
 100. Sim RB, Reboul A, Arlaud GJ, Villiers CL, Colomb MG. Interaction of 125I-labelled complement subcomponents C-1r and C-1s with protease inhibitors in plasma. *FEBS Lett.* 1979; 97:111-5.
 101. Ziccardi RJ, Cooper NR. Active disassembly of the first complement component, C-1, by C-1 inactivator. *J.Immunol.* 1979; 123:788-92.
 102. Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J.Immunol.* 1982; 128:2505-8.
 103. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J.Immunol.* 2000; 165:2637-42.
 104. Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM. Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J.Exp.Med.* 2001; 194:1609-16.
 105. Horstick G, Berg O, Heimann A et al. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* 2001; 104:3125-31.

106. Levy JH, Freiburger DJ, Roback J. Hereditary angioedema: current and emerging treatment options. *Anesth.Analg.* 2010; 110:1271-80.
107. Shoemaker LR, Schurman SJ, Donaldson VH, Davis AE, III. Hereditary angioneurotic oedema: characterization of plasma kinin and vascular permeability-enhancing activities. *Clin.Exp.Immunol.* 1994; 95:22-8.
108. Caccia S, Castelli R, Maiocchi D, Bergamaschini L, Cugno M. Interaction of C1 inhibitor with thrombin on the endothelial surface. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 2011; 22:571-5.
109. Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE, III. C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 2003; 171:2594-601.
110. Brower MS, Harpel PC. Proteolytic cleavage and inactivation of alpha 2-plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J.Biol.Chem.* 1982; 257:9849-54.
111. De Simoni MG, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Echart C, Bergamaschini L. The powerful neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am.J.Pathol.* 2004; 164:1857-63.
112. Fiane AE, Videm V, Johansen HT, Mellbye OJ, Nielsen EW, Mollnes TE. C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology* 1999; 42:231-43.
113. Sahu A, Kay BK, Lambris JD. Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J.Immunol.* 1996; 157:884-91.
114. Morikis D, Assa-Munt N, Sahu A, Lambris JD. Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sci.* 1998; 7:619-27.
115. Soulika AM, Holland MC, Sfyroera G, Sahu A, Lambris JD. Compstatin inhibits complement activation by binding to the beta-chain of complement factor 3. *Mol.Immunol.* 2006; 43:2023-9.
116. Katragadda M, Magotti P, Sfyroera G, Lambris JD. Hydrophobic effect and hydrogen bonds account for the improved activity of a complement inhibitor, compstatin. *J.Med.Chem.* 2006; 49:4616-22.
117. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M et al. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* 2002; 100:1869-77.

118. Chi ZL, Yoshida T, Lambris JD, Iwata T. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2010; 703:127-35.
119. Silasi-Mansat R, Zhu H, Popescu NI et al. Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2010; 116:1002-10.
120. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol.Immunol.* 2007; 44:82-94.
121. Burtis C.A., Ashwood E.R. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 1996, ISBN 0-7216-3763-9
122. Halkier T. *Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system.* New York: Cambridge University Press, 1991, ISBN 978-0-521-07183-3
123. Enzygnost®F1+2 (monoclonal). 2010.
<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=0203145d70&view=att&th=1374a8d001689281&attid=0.2&disp=safe&zw>
124. Mollnes TE, Lea T, Froland SS, Harboe M. Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against a neoantigen of the complex. *Scand.J.Immunol.* 1985; 22:197-202.
125. Mollnes TE, Redl H, Hogasen K et al. Complement activation in septic baboons detected by neoepitope-specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC). *Clin.Exp.Immunol.* 1993; 91:295-300.
126. Human Pentraxin 3/TSG-14 from R&D Systems. 2010.
<http://www.rndsystems.com/pdf/dptx30.pdf>
127. Bio-Plex Cytokine Assay fra Bio Rad 2006.
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110004F.pdf>
128. High Capacity cDNA Reverse transcription kit. 2010.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generalddocuments/cms_042557.pdf
129. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-8.

130. BD™ LSR II flow cytometer usermanual. 2007.
<http://ccmi.salk.edu/docs/BD%20LSRII%20Users%20Guide.pdf>
131. Engstad CS, Lia K, Rekdal O, Olsen JO, Osterud B. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 1995; 58:575-81.
132. Motulsky H. *Intuitive Biostatistics*. New York: Oxford University Press, 2010, ISBN 978-0-19-973006-3
133. Brandtzaeg P, Hogasen K, Kierulf P, Mollnes TE. The excessive complement activation in fulminant meningococcal septicemia is predominantly caused by alternative pathway activation. *J.Infect.Dis.* 1996; 173:647-55.
134. Emlen W, Li W, Kirschfink M. Therapeutic complement inhibition: new developments. *Semin.Thromb.Hemost.* 2010; 36:660-8.
135. Guo RF, Ward PA. C5a, a therapeutic target in sepsis. *Recent Pat Antiinfect.Drug Discov.* 2006; 1:57-65.
136. Lappégard KT, Christiansen D, Pharo A et al. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; 106:15861-6.
137. Smith SG, Watson B, Clark G, Gauvreau GM. Eculizumab for treatment of asthma. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 2012; 12:529-37.
138. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; 4:133-42.
139. Weitz IC, Razavi P, Rochanda L et al. Eculizumab therapy results in rapid and sustained decreases in markers of thrombin generation and inflammation in patients with PNH independent of its effects on hemolysis and microparticle formation. *Thromb.Res.* 2012.
140. Brekke OL, Christiansen D, Fure H et al. Combined inhibition of complement and CD14 abolish *E. coli*-induced cytokine-, chemokine- and growth factor-synthesis in human whole blood. *Mol.Immunol.* 2008; 45:3804-13.
141. Barratt-Due A, Thorgersen EB, Lindstad JK et al. *Ornithodoros moubata* complement inhibitor is an equally effective C5 inhibitor in pigs and humans. *J.Immunol.* 2011; 187:4913-9.
142. Carlstedt F, Lind L, Lindahl B. Proinflammatory cytokines, measured in a mixed population on arrival in the emergency department, are related to mortality and severity of disease. *J.Intern.Med.* 1997; 242:361-5.
143. Barratt-Due A, Thorgersen EB, Lindstad JK et al. Selective inhibition of TNF-alpha or IL-1 beta does not affect *E. coli*-induced inflammation in human whole blood. *Mol.Immunol.* 2010; 47:1774-82.

144. Okusawa S, Dinarello CA, Yancey KB et al. C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. *J.Immunol.* 1987; 139:2635-40.
145. Pott GB, Chan ED, Dinarello CA, Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J.Leukoc.Biol.* 2009; 85:886-95.
146. Nielsen EW, Waage C, Fure H et al. Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Mol.Immunol.* 2007; 44:1819-26.
147. Hess K, Ajjan R, Phoenix F, Dobo J, Gal P, Schroeder V. Effects of MASP-1 of the Complement System on Activation of Coagulation Factors and Plasma Clot Formation. *PLoS.One.* 2012; 7:e35690.
148. Dorresteijn MJ, Visser T, Cox LA et al. C1-esterase inhibitor attenuates the inflammatory response during human endotoxemia. *Crit Care Med.* 2010; 38:2139-45.
149. Birnbaum J, Klotz E, Spies CD et al. The combinations C1 esterase inhibitor with coagulation factor XIII and N-acetylcysteine with tirilazad mesylate reduce the leukocyte adherence in an experimental endotoxemia in rats. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 2008; 40:167-76.
150. Wouters D, Wagenaar-Bos I, van HM, Zeerleder S. C1 inhibitor: just a serine protease inhibitor? New and old considerations on therapeutic applications of C1 inhibitor. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 2008; 8:1225-40.
151. Hack CE, de ZC, Hermens WT. Safety of C1-inhibitor for clinical use. *Circulation* 2002; 106:e132.
152. Relan A, Bakhtiari K, van Amersfoort ES, Meijers JC, Hack CE. Recombinant c1-inhibitor: effects on coagulation and fibrinolysis in patients with hereditary angioedema. *BioDrugs.* 2012; 26:43-52.

Manuskript til artikkel

C1-inhibitor efficiently inhibits *E. coli*-induced tissue factor mRNA up-regulation, monocyte tissue factor expression and coagulation activation in human whole blood

Anne Landsem,^{*} Erik Waage Nielsen^{†,‡}, Hilde Fure,^{*} Dorte Christiansen,^{*} Judith Krey Ludviksen,^{*} John D. Lambris,[¶] Bjarne Østerud,[§] Tom Eirik Mollnes^{*,‡,#} and Ole-Lars Brekke^{*,§}

C1-inhibitor efficiently inhibits *E. coli*-induced tissue factor mRNA up-regulation, monocyte tissue factor expression and coagulation activation in human whole blood

Anne Landsem,^{*} Erik Waage Nielsen^{†,‡}, Hilde Fure,^{*} Dorte Christiansen,^{*} Judith Krey Ludviksen,^{*} John D. Lambris,[¶] Bjarne Østerud,[§] Tom Eirik Mollnes^{*,‡,#} and Ole-Lars Brekke^{*,§}

^{}Department of Laboratory Medicine, Nordland Hospital, Bodø, Norway, [†]Department of Anesthesiology, Nordland Hospital, Bodø, Norway, [‡]Institute of Clinical Medicine, University of Tromsø, Norway, [¶]Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, PA, USA, [§]Institute of Medical Biology, University of Tromsø, Norway, [#]Department of Immunology, University of Oslo, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway*

Running title: Complement regulation of tissue factor

Keywords: C1-inhibitor, coagulation, complement, tissue factor, whole blood

Abbreviations: C1-INH, C1-inhibitor; *E. coli*, *Escherichia coli*; hr, hour; LPS, lipopolysaccharide; MFI, median fluorescence intensity; min, minute; PBS, phosphate buffered saline; PTF1+2, prothrombin factor 1+2; PTX3, long-pentraxin 3, RT-qPCR, reverse transcription quantitative real-time PCR; TF, tissue factor.

^{*}Corresponding author: Department of Laboratory Medicine, Nordland Hospital, N-8092 Bodø, Norway. Tel.:+47 75578365; fax: +47 75534735; E-mail address: ole.lars.brekke@nlsh.no

Summary

The complement system and tissue factor (TF), a key initiating component of coagulation, are activated in sepsis. There is crosstalk between complement and coagulation. C1-inhibitor (C1-INH) participates as regulator in both systems. Our aim was to study this crosstalk by investigating the effect C1-INH on *Escherichia coli* (*E. coli*)-induced hemostasis and inflammation. Fresh human whole blood anticoagulated with lepirudin was incubated with *E. coli* or ultrapurified *E. coli* LPS in the absence or presence of C1-INH or a protease inactivated C1-INH. C3 was blocked by compstatin, a specific C3 convertase inhibitor. TF mRNA was measured using RT-qPCR, and TF surface expression by flow cytometry. In plasma the terminal complement complex, prothrombin F1+2 (PTF1+2) and long-pentraxin 3 (PTX3) was measured by ELISA. Cytokines were analyzed using a multiplex kit. C1-INH (1.25 to 5 mg/ml) efficiently and dose-dependently reduced both LPS- and *E. coli*-induced activation of coagulation measured as a reduction of PTF1+2 in plasma ($P<0.05$). Both LPS and *E. coli* markedly upregulated TF mRNA and TF surface expression on whole blood monocytes. This was efficiently reduced by C1-INH ($P<0.05$). C1-INH reduced the synthesis of PTX3 ($P<0.05$) and virtually all of the cytokines ($P<0.05$). Complement activation was inhibited more efficiently with compstatin than with C1-INH. Nevertheless, C1-INH more efficiently inhibited most of the other readouts, consistent with effects on non-complement dependent mechanisms as well. The results indicate that complement plays a role in coagulation activation during sepsis and that C1-INH is a broad-spectered attenuator of the inflammatory and hemostatic responses.

Introduction

Sepsis is a serious condition with high lethality [1]. The invading microbes may harmfully over activate the immediate host inflammatory response, including several cascade systems like the complement-, kinin- and coagulation systems [2, 3]. In some cases, this leads to multiorgan failure and death. Therefore, there is an urgent need for new treatment regimens, which can reduce or block detrimental overshoot by the cascade systems.

Tissue Factor (TF) is the most important activator of coagulation [4]. *In vitro* stimulation with LPS and bacteria upregulates TF expression on the monocyte surface [4]. Several cytokines may also induce TF surface expression on monocytes [5]. TF is expressed on extravascular cells and is thereby involved in normal hemostasis [5]. TF is a transmembrane glycoprotein and is a receptor for FVII, which is converted to FVIIa upon binding. This further catalyzes the generation of limited amounts of FXa and FIXa during the initiation phase of coagulation [4]. Later on, the small amounts of thrombin generated by the TF bearing cell activates platelets, FV and dissociated FVII from von Willebrand factor, leading to activation of FXI and the amplification phase of coagulation. Napoleone et al. reported that long pentraxin 3 (PTX3) increased LPS-induced TF mRNA up-regulation [6]. PTX3 is produced by several cells including monocytes and do not bind to the classical pentraxin ligands except for complement component C1q [7].

The complement system is efficiently activated by whole Gram-negative bacteria, whereas pure LPS activate the complement system only at high concentrations [8]. *Escherichia coli* (*E. coli*) mainly activates the classical and alternative pathways [9]. Inhibition of complement component C3 has shown promising results in a baboon model of *E. coli* sepsis [10]. Complement activation leads to the release of the anaphylatoxin C5a with a number of effects during sepsis [11]. C5a is

also involved in the *Neisseria meningitidis*-induced TF surface expression on monocytes [12]. Interestingly, thrombin can also split C5 and participate in C5a generation [13].

C1-INH is a protease inhibitor in the serpin family [14]. C1-INH inhibits complement activation both through the classical pathway by blocking C1r and C1s activation [15] and lectin pathway by inhibiting MASP1 and MASP2 [16, 17]. In addition, C1-INH has an important regulatory effect on the kinin system [18]. C1-INH is used to treat angioedema in patients with hereditary C1-INH deficiency [19]. In addition, C1-INH has anti-inflammatory effects and several of these effects are not dependent on C1-INH protease inhibitory activity [20]. C1-INH efficiently reduced *E. coli*-induced complement activation and cytokine release in baboons [21]. Treatment with C1-INH has recently been reported to significantly reduce the lethality during human sepsis [22].

Several recent reports have indicated crosstalk between the coagulation and complement systems [23]. Since C1-INH participates as a regulator of both systems, we here investigated the role of C1-INH on *E. coli*- and LPS-induced effects on coagulation and complement, as well as on inflammatory biomarkers including PTX3 and cytokines in human whole blood.

Materials and methods

Inhibitors

Purified human C1-INH (Berinert® P C1 esterase inhibitor) was obtained from ZLB Behring GmbH, Germany. Inactivated C1-INH (iC1-INH) was produced as previously described [24] and dissolved in LAL Reagent Water (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, MD). The C3 convertase inhibitor compstatin HQ2039 [25] and a corresponding control peptide were provided by the coauthor J.D. Lambris.

Whole blood experiments

Experiments were performed with 10 different healthy blood donors (women and men) using fresh human whole blood as previously described [9]. Blood was obtained after informed consent according to guidelines from the local Ethics Committee. The study was approved of Regional Ethic committee in Health Region North. Whole blood samples were collected in 4.5 ml polypropylene tubes (Nunc, Roskilde, Denmark) with lepirudin (Refludan, Celgene, Great Britain, 50 mg/l), as anticoagulant. Aliquots of fresh whole blood were immediately distributed into polypropylene tubes containing PBS, inhibitors or control. A Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS), with or without calcium chloride and magnesium chloride was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All equipment such as tubes (Nalgene Nunc, Roskilde, Denmark), tips and solutions were endotoxin-free. After 8 minutes preincubation at 37°C, PBS, *E. coli* (1×10^7 /ml) or ultrapurified LPS (100 ng/ml) from *E. coli* 0111 (LPS-EB Ultrapure, Invivogen, Eugene, OR) was added. The *E. coli* strain LE392 (ATCC 33572) was obtained from American Type Culture Collection, Manassas, VA. The bacteria were grown and heat-inactivated as previously described [9]. The time zero sample (T0) was processed immediately, and the other samples were incubated on a rotator at 37°C for 60 or 120 minutes respectively. Immediately after the designated incubation periods, blood was distributed into three different

tubes. Citrate was added to samples prior to flow cytometric analysis. In the tubes for TF function analysis, no additive was used. For complement activation products and mRNA analysis, ethylenediaminetetraacetic (EDTA, 10 mM final concentration) was added to stop further complement activation. Both tubes with and without EDTA were centrifuged for 15 min at 3220 x g at 4°C. The plasma was kept in freezer at -80°C for later analysis. The pelleted cell fraction in the EDTA tubes was used for mRNA extraction. Cells were lysed using 1x Nucleic Acid Purification Lysis Solution (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the lysates were frozen at -80°C until analyzed.

RT-qPCR of TF mRNA expression

Total RNA was isolated using reagents from Applied Biosystems total RNA chemistry and the AB6100 Nucleic Acid Prep station (Applied Biosystems, Foster City, CA). The concentration of RNA was measured using the Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Reverse transcription was done using 50 ng total RNA, the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit and the 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Thermal cycle conditions were 25°C 10 min and 37°C 120 min. Samples of cDNA were frozen at -80°C. The relative concentrations of TF mRNA were measured using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Taq Man Fast Universal PCR Master Mix and predeveloped TaqMan® gene expression assays. The target gene TF (Hs00175225_m1) and the reference gene human beta-2-microglobulin (B2M, assay ID 4326319E, Applied Biosystems) were analyzed in a multiplex reaction with cycle conditions according to the manual. The candidate reference gene was chosen because it was stably expressed in this whole blood model. Ct values for multiplex reactions were comparable to Ct values for single reactions. RT-qPCR was performed using 3 µl cDNA (triplicate samples) and a final volume of 20 µl. The comparative delta Ct-method was

used to determine the relative concentration of TF mRNA. The different samples threshold cycle was compared to T0. The value for T0 was set to one and served as the calibrator for the assay.

Flow cytometric analysis of TF surface expression

Monocyte TF expression was analyzed using 12.5 µl whole blood, stained with FITC-conjugated anti-human TF antibody (American Diagnostica Inc, Stamford, CT) and anti-CD14 PE (Becton Dickinson, San Jose, CA). IgG1 FITC (BD 345815) was used as the isotype matched control. After 15 minutes incubation at room temperature protected from light, red cells were lysed with Easy Lyse (S2364, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) using 15 min incubation at room temperature. Cells were then washed (PBS with 0.1% Bovine Serum Albumin) and reconstituted with PBS. Acquisition was performed on BD LSR II flowcytometer (Becton Dickinson) with the threshold on forward scatter. Monocytes and granulocytes were gated in a PE/SSC-dotplot and the results were recorded as median fluorescent intensity (MFI).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Activation of coagulation was measured as the concentrations of prothrombin fragment 1+2 in plasma using the Enzygnost®F1+2 (monoclonal) kit from Dade Behring (Marburg GmbH, Germany). Human long Pentraxin 3 (PTX3) was analyzed using the kit for Human Pentraxin 3/TSG-14 from R&D Systems (Minneapolis, MN). The assays were performed according to the manufacturer's instructions. Activation of the terminal C5-C9 pathway was measured using the monoclonal antibody aE11, which is specific for a C9 neoepitope exposed in the sC5b-9 complex (TCC) as previously described [26]. Optical density was measured using a MRX microplate reader (Dynex Technologies, Denkendorf, Germany).

Cytokine Assays

For cytokine measurement the multiplex cytokine assay Bio-Plex, Human Cytokine 27-plex panel from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) was used. These cytokines were included in the assay: Interleukin (IL)-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , platelet derived growth factor (PDGF) bb, RANTES, TNF- α and VEGF. The analysis was performed according to the manufacturer's instruction, using the Luminex xMAP Technology and the instrument Bio Plex 200 System (Bio-Rad).

TF functional activity in plasma microparticles

Whole blood samples were centrifuged as described above. The TF functional activity in plasma microparticles from platelet-poor plasma was analyzed according to Engstad *et al.* [27]. In brief, microparticles were isolated by ultracentrifugation at 40,000 x *g* for 1 h 30 min at 4°C from previously isolated platelet-poor plasma. The microparticles were then resuspended in 200 μ l 0.15M NaCl and frozen at -70°C. Samples were then thawed and tested for TF activity in a two-stage amidolytic assay. The method is based on the ability of TF to accelerate the activation of FX by FVIIa, followed by the FXa conversion of prothrombin to thrombin in the presence of activated FV.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prizm version 5.0 from GraphPad Software (San Diego, CA) using one-way, repeated measurements ANOVA and multiple comparisons. The results were analyzed using *E. coli* or LPS as control. The data was transformed logarithmically if the normality test failed. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

C1-INH inhibited LPS- and *E. coli*-induced coagulation activation in human whole blood

We first examined the effect of C1-INH on LPS and *E. coli*-induced coagulation activation by analyzing PTF1+2 in plasma. The PTF1+2 levels only slightly increased from 0.19 nmol/l in the baseline sample T0 to 0.65 nmol/l in the spontaneous control after 2 h incubation with PBS (Fig. 1a). Incubation of whole blood with LPS (100 ng/ml) enhanced the PTF1+2 level 8.5-fold from 0.65 nmol/l to 5.6 nmol/l after 120 min incubation (Fig. 1a). C1-INH dose-dependently and significantly ($P<0.05$) reduced the LPS-induced coagulation activation to baseline levels (i.e. T0). The C3 convertase inhibitor compstatin also inhibited the LPS-induced coagulation activation extensively and significantly ($P<0.05$), to the level of the spontaneous PBS control.

Incubation with *E. coli* (1×10^7 /ml) significantly enhanced PTF1+2 levels 8.1-fold from 1.5 nmol/l in the spontaneous PBS control to 12.1 nmol/l after 120 min incubation (Fig. 1b). C1-INH dose-dependently and significantly ($P<0.05$) reduced *E. coli*-induced coagulation activation to baseline levels. In comparison, compstatin significantly ($P<0.05$) reduced the coagulation activation close to the level of the spontaneous PBS control, consistent with the LPS data describe above. These data indicate that the effect of C1-INH on coagulation activation was largely dependent on complement.

C1-INH inhibited LPS- and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation

Next, we examined the regulation of TF at the mRNA level using RT-qPCR. The TF mRNA level was expressed as relative quantity (RQ) to the TF mRNA level in the baseline T0 sample which was set to 1. The TF mRNA levels increased from 1 in the baseline sample T0 to 253 in the spontaneous control after 2 h incubation with PBS (Fig. 2a). Incubation with LPS (100 ng/ml) enhanced TF mRNA up-regulation from 253 RQ to 1715 and 802 RQ after 60 min and

120 min incubation, respectively (Fig. 2a,b). Incubation with *E. coli* (1×10^7 /ml) enhanced TF mRNA up-regulation from 241 RQ to 2389 and 2391 RQ after 60 and 120 min incubation, respectively (Fig. 2c, d). C1-INH dose-dependently and significantly ($P < 0.05$) reduced LPS and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation to the level in the spontaneous PBS control after 60 min incubation (Fig. 2a, c). Similar results were obtained after 120 min (Fig 2b, d). In comparison, compstatin significantly ($P < 0.05$) reduced LPS-induced TF up-regulation at both time points, but the effect on the *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation was seen only at 120 min. Thus, the inhibition of TF mRNA up-regulation by C1-INH in the highest concentration could not be fully explained by complement inhibition.

C1-INH inhibits LPS- and *E. coli*-induced TF cell surface expression on monocytes in whole blood

The TF surface expression only slightly increased from approximately 43 in the baseline sample T0 to 88 MFI in the spontaneous control after 2 h incubation with PBS (Fig. 3a). Incubation with LPS (100 ng/ml) significantly enhanced ($P < 0.05$) the cell surface TF expression on monocytes from 88 to 275 MFI after 120 min incubation (Fig. 3a). C1-INH (2.5 and 5.0 mg/ml) significantly ($P < 0.05$) reduced LPS-induced TF cell surface expression almost down to the baseline levels (i.e. T0) (Fig. 3a). Incubation with *E. coli* (1×10^7 /ml) significantly enhanced ($P < 0.05$) the cell surface TF expression on monocytes from 200 in the spontaneous controls to 1152 MFI, after 120 min incubation (Fig. 3b). Furthermore, C1-INH dose-dependently and significantly ($P < 0.05$) reduced *E. coli*-induced TF cell surface expression on monocytes to spontaneous levels (Fig. 3b). Compstatin significantly ($P < 0.05$) reduced both LPS- and *E. coli*-induced TF cell surface expression, but not to the same extent as C1-INH, suggesting that the C1-INH effect in highest concentration was not only dependent on complement inhibition.

C1-INH reduced LPS- and *E. coli*-induced TF functional activity in plasma microparticles

The TF functional activity only slightly increased from 0.04 mU/ml in the baseline sample T0 to 0.06 mU/ml in the spontaneous control after 2 h incubation with PBS (Fig. 4a). Incubation with LPS (100 ng/ml) significantly ($P<0.05$) enhanced TF functional activity in plasma microparticles from 0.06 to 0.47 mU/ml, after two hours incubation (Fig. 4a). C1-INH dose-dependently and significantly ($P<0.05$) reduced LPS-induced TF activity in plasma microparticles down to the level in the spontaneous control (Fig 4a). Incubation with *E. coli* (1×10^7 /ml) for two hours significantly ($P<0.05$) increased TF functional activity from approximately 0.1 in the spontaneous control to 0.81 mU/ml (Fig. 4b). C1-INH at 5 mg/ml also significantly ($P<0.05$) reduced *E. coli*-induced TF activity down to the level in the spontaneous control. In comparison, compstatin non-significantly reduced the TF functional activity in plasma microparticles to 0.30 mU/ml, suggesting that this effect could not be explained by complement inhibition alone.

C1-INH reduced LPS- and *E. coli*-induced PTX3 release

The PTX3 levels spontaneously increased from approximately 0.3 ng/ml in the baseline sample T0 to 3-4 ng/ml in the PBS control after 120 min incubation (Fig. 5a, b). Incubation with LPS (100 ng/ml) further increased the PTX3 levels to 7.5 ng/ml after 120 min incubation (Fig. 5a). Incubation with *E. coli* (1×10^7 /ml) increased the PTX3 levels to 6.8 ng/ml (Fig. 5b). C1-INH dose-dependently and significantly ($P<0.05$) reduced LPS- and *E. coli*-induced PTX3 release. The highest concentration of C1-INH (5.0 mg/ml) reduced the PTX3 concentrations below the spontaneous PBS control and almost down to the baseline sample T0. In comparison, compstatin significantly ($P<0.05$) reduced LPS- and *E. coli*-induced PTX3 release to the level of the spontaneous controls.

C1-INH reduced the LPS- and *E. coli*-induced production of cytokines

We next examined the effect of C1-INH on LPS- and *E. coli*-induced cytokines. The IL-17 levels spontaneously increased from 12 pg/ml in the baseline sample T0 to 42 pg/ml in the PBS control after 120 min incubation (Fig. 6a). LPS and *E. coli* enhanced the release of the pro-inflammatory cytokine IL-17 to 82 and 74 pg/ml, respectively (Fig. 6a and b). C1-INH dose-dependently reduced both LPS- and *E. coli*-induced IL-17 and the effect at 5 mg/ml was statistically significant ($P<0.05$). In comparison, compstatin slightly and non-significantly reduced IL-17 levels.

The levels of the anti-inflammatory cytokine IL-1ra increased from 59 pg/ml in the baseline sample T0 to 232 pg/ml in the PBS control after 120 min incubation (Fig. 6c). LPS and *E. coli* enhanced IL-1ra levels to 706 and 670 pg/ml, respectively (Fig. 6c and d). C1-INH at 5 mg/ml significantly reduced both LPS- and *E. coli*-induced IL-1ra ($P<0.05$), while compstatin had no effect.

PDGF bb is released from α -granula in activated platelets. The PDGF bb levels increased from 195 pg/ml in the baseline sample T0 to 1535 pg/ml in the PBS control after 120 min incubation (Fig. 6e). LPS and *E. coli* enhanced PDGF release to 2118 and 2880 pg/ml, respectively (Fig. 6e and f). C1-INH at 2.5 and 5.0 mg/ml dose-dependently and significantly ($P<0.05$) reduced LPS and *E. coli*-induced PDGF, whereas compstatin did not reduce PDGF.

The effects of the inactivated iC1-INH on LPS- and *E. coli*-induced PTF1+2, TF mRNA, TF expression on monocytes and IL-8 release

We then examined whether inactivated C1-INH (iC1-INH) affected LPS (100 ng/ml) and *E. coli* (1×10^7 /ml)-induced coagulation activation measured as PTF1+2 levels. iC1-INH markedly reduced LPS-induced PTF1+2 levels from 20.5 to 3.4 nmol/l, close to C1-INH, though

statistically not significant (Fig. 7a), while it significantly reduced *E. coli*-induced PTF1+2 (Fig. 7b). In contrast, iC1-INH enhanced LPS- and *E. coli*-induced TF mRNA levels (Fig. 7c and d). Similarly, iC1-INH increased LPS-induced TF surface expression while *E. coli*-induced surface expression was unaffected (Fig. 7e and f). In comparison, C1-INH significantly reduced LPS- and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation and TF surface expression levels, consistent with the previous data (Fig. 7c, d, e and f).

Next, we examined IL-8 synthesis. LPS (100 ng/ml) enhanced IL-8 release from 309 pg/ml in the spontaneous PBS control to 1933 pg/ml after 120 min incubation (Fig. 7g). In comparison, *E. coli*-induced enhanced IL-8 release to 3784 pg/ml after 120 min incubation (Fig. 7h). iC1-INH significantly ($P<0.05$) enhanced LPS-induced IL-8 release, while no effect was seen with *E. coli*. C1-INH significantly ($P<0.05$) reduced both LPS- and *E. coli*-induced IL-8 release to 290 and 942 pg/ml, respectively (Fig. 7g and h).

C1-INH reduced *E. coli*-induced complement activation

Finally, we examined *E. coli*-induced complement activation in the fluid phase. The TCC levels increased from 0.3 AU/ml in the baseline sample T0 to 6.3 AU/ml in the PBS control after 120 min incubation (Fig. 8). *E. coli* (1×10^7 /ml) significantly enhanced ($P<0.05$) the complement activation measured as TCC to 17 AU/ml (Fig. 8). C1-INH significantly ($P<0.05$) and dose-dependently reduced *E. coli*-induced TCC levels to 4.5 AU/ml, i.e. to approximately the same levels as in the spontaneous PBS control. As expected, the complement inhibitor compstatin efficiently abolished TCC formation ($P<0.05$), confirming the efficient effect of compstatin to inhibit complement as compared to C1-INH.

Discussion

This study found that supraphysiological concentrations of C1-INH efficiently inhibited LPS and *E. coli*-induced TF up-regulation and TF expression on monocytes, PTX3, PTF1+2 and several cytokines. With the exception of cytokines, the C3 convertase inhibitor compstatin showed that much of the effect of C1-INH could be explained by complement inhibition. Interestingly, however, for several of the readouts it seems that non-complement dependent mechanisms of C1-INH were responsible for the effects. This is in accordance with a number of recent studies highlighting C1-INH as a promiscuous molecule with modulating effects on e.g. LPS and P-selectin [28]. Notably, the effect of C-INH as a specific complement inhibitor when challenged by LPS or *E. coli* is not particularly efficient [24], as compared to specific inhibitors like compstatin.

C1-INH efficiently reduced the LPS- and *E. coli*-induced coagulation activation and to a slightly greater extent than the pure complement blocker compstatin. We used PTF1+2 levels to evaluate coagulation activation since we used lepirudin as anticoagulant which selectively inhibits thrombin and affect the formation of thrombin-antithrombin complexes. The role of thrombin can therefore not be examined in this model. The efficacy of compstatin over C1-INH as a complement blocker was clearly documented in this study by analyzing soluble TCC in plasma. C1-INH efficiently hindered PTF1+2 generation comparable to the values in the baseline sample (T0) and below the spontaneous PBS control. The slightly increased PTF1+2 levels in the spontaneous control after 2 h compared to the baseline sample (T0) is most likely due to coagulation activation by the plastic surface *in vitro*. It is well documented that FXII in the coagulation system and the complement system is activated when blood meets the polypropylene plastic in the test tube [29]. The LPS- and *E. coli*-induced coagulation activation is most likely due to up-regulation of TF. However, the TF-induced coagulation activation can be modulated

by post-translational modifications of TF [30] and phosphatidylserine expression [31], highlighting the complex regulation of TF-induced coagulation activation.

Incubation with LPS and *E. coli* rapidly enhanced TF mRNA, TF surface expression on monocytes and TF functional activity in plasma microparticles. As TF expression is important for the development of disseminated intravascular coagulation (DIC) in sepsis, and DIC increases the tissue damage and may lead to organ failure and death, a treatment which reduces TF could be of great benefit in sepsis [32]. Interestingly, this study shows how the C3 convertase inhibitor compstatin and C1-INH efficiently reduce LPS and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation, and TF expression on monocytes. Cytokines released by LPS- and *E. coli*-stimulated immune cells also up-regulates TF expression [5]. C1-INH inhibited synthesis of several cytokines. This could be the reason for a more extended inhibition of TF mRNA compared with compstatin. Compstatin had no effect on *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation after 60 min suggesting that the initial TF mRNA up-regulation was not complement dependant. However, the effect of compstatin on TF mRNA up-regulation was delayed and more pronounced after 2 h. Thus, our data suggest that the *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation after 2 h is mainly complement dependent.

C1-INH significantly reduced the LPS- and *E. coli*-induced TF functional activity in plasma microparticles, while the effect of compstatin was not statistically significant. The plasma microparticles are most probably derived from activated platelets or apoptotic monocytes [33]. The results indicate that LPS- and *E. coli*-induced TF functional activity in plasma microparticles is not complement dependent. PDGF bb is stored in α -granula in platelets. The observation that C1-INH inhibits LPS- and *E. coli*-induced PDGF bb levels suggests that C1-INH affects the activation of platelets. The effect of C1-INH on TF functional activity in

plasma microparticles may in part be due to inhibitory effects on platelet activation [34], but this remains to be elucidated.

PTX3 has previously been reported to enhance the LPS-induced TF mRNA up-regulation in monocytes regulation [6]. Our data indicate that both LPS and *E. coli* stimulation increased PTX3 release. C1-INH and compstatin reduced LPS- and *E. coli*-induced PTX3 release indicating that the release is at least partly complement dependent. Recent studies have shown that PTX3 participates in the communication between the classical and lectin pathways. Mannose binding lectin (MBL) bind to pathogen associated molecular patterns including LPS. Thereafter, PTX3 may bind to MBL and enhance complement activation, if C1q is present [35]. Compstatin reduced both LPS- and *E.coli*-induced PTX3 release back to the level of the spontaneous control indicating that the PTX3 release is complement dependent. C1-INH further reduced the PTX3 release down to the levels of the baseline sample at blood sampling indicating that the effect may be due to a significant reduction of LPS- and *E. coli*-induced cytokines, as IL-1 β and TNF- α both stimulate PTX3 synthesis [36].

Cytokines are important mediators of inflammation and TF up-regulation [5]. IL-17 is important in the proinflammatory response in sepsis through induction of cytokines and accumulation of neutrophils at the infection site [37]. IL-17 may also play a role in monocyte TF production [38]. This report confirms that both LPS and *E. coli*-stimulates IL-17 release. However, our data indicate that the IL-17 release was only reduced by the highest C1-INH concentration suggesting that the inhibitory effect of C1-INH on TF can only partly be explained by effects on IL-17 release. The IL-17 release was not complement dependent since compstatin had no effect. This indicates that the effect of compstatin on TF was not mediated through reduced IL-17 release. Complement inhibition have been reported to increase the levels of the anti-inflammatory

cytokine IL-1ra [12]. The inhibitory effect on C1-INH on IL-1ra levels and the slightly enhanced IL-1ra levels found after incubation with compstatin, confirms that C1-INH and compstatin affect cytokine synthesis differently. We analyzed several other cytokines including IL-8 and IL-1 β since they have been reported to increase TF surface expression on monocytes [5, 6]. C1-INH reduced almost all analyzed cytokines, while compstatin only reduced LPS- and *E. coli*-induced IL-8 synthesis (data not shown) in line with previous findings [39]. The efficient reduction by C1-INH on cytokine release could possibly explain the more pronounced inhibition of TF surface expression on monocytes compared with compstatin. C1-INH efficiently reduced *E. coli*-induced cytokine synthesis in human whole blood using live *E. coli* bacteria [24] in line with this study, using heat-inactivated bacteria. However, iC1-INH neither reduced LPS- nor *E. coli*-induced IL-8 release or any of the other cytokines analyzed (data not shown). We speculate that the slight increase in IL-8 release is due to competition of iC1-INH with the normal C1-INH present in plasma.

The effect of C1-INH on TF up-regulation may be explained by several mechanisms. Firstly, the effect of C1-INH at high concentrations may be due to other effects of C1-INH than its protease-inhibitory effects since Davis et al. showed that C1-INH bound directly to Gram-negative bacteria [18]. In our study, however, iC1-INH neither reduced LPS- nor *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation and TF surface expression on monocytes indicating that TF was inhibited via C1-INH's protease inhibitory function. C1-INH and iC1-INH have been shown to directly bind LPS and inhibit LPS-induced TLR4 activation on the immune cells [40]. Since iC1-INH had no effect, the almost complete inhibition by C1-INH on LPS-induced TF mRNA up-regulation we found in our study is most likely via anti-protease effects. It is well known that LPS binds to CD14, MD2 and TLR4, the main receptor for LPS [41]. Surprisingly, our study shows that compstatin slightly reduced LPS-induced TF expression on monocytes. This may

suggest that LPS slightly activated complement, but the LPS-induced complement activation measured as TCC in plasma was very weak (data not shown). Both C1-INH and compstatin reduced monocyte TF expression significantly, indicating that TF expression on monocytes is at least partly complement dependent. However, C1-INH reduced TF expression down to the level in the spontaneous control suggesting that mechanisms in addition to complement inhibition also are involved. A mechanism could be factor VII activating protease (FSAP). FSAP blocks the TF pathway inhibitor. C1-INH binds and inhibits FSAP [42]. The result may be reduced TF and a possible explanation for the more efficient inhibition by C1-INH compared with compstatin.

C1-INH at supraphysiological concentrations at or above 1.25 mg/ml can only be achieved in experimental models or after intravenous or intraarterial injection of C1-INH [43,44]. In one study on acute myocardial infarction the levels of C1-INH, after intravenous infusion, reached a level equivalent to 3 times the physiological concentration [45]. The lowest C1-INH concentration in our study is equivalent to approximately 5 times the physiological concentration. Regional intraarterial administration of C1-INH directly into organs, however, can most likely reach a much higher level of C1-INH than an intravenous administration, and reach concentrations in the organ higher than in our study. Therefore, the high C1-INH doses we have used are clinically relevant. On the other hand, although we did not examine the effect of lower C1-INH concentrations, our data suggests that C1-INH lower than 1.25 mg/l will also inhibit coagulation activation since C1-INH at 1.25 mg/l efficiently reduced LPS-induced PT F1.2 levels by 97%. Interestingly, a recent report showed that intravenous injection of C1-INH significantly increased the survival of sepsis patients [22]. This indicates that C1-INH may be a potential therapeutic medication in sepsis patients.

In conclusion, our study shows for the first time that C1-INH reduced LPS- and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation, TF surface expression, coagulation activation and PTX3 release. The effects were partly, but not completely dependent on inhibition of complement. Our findings emphasize the broad-spectrum modulating effects of C1-INH in many of the harmful mechanisms contributing to development of sepsis.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Helse Nord RHF and The Odd Fellow Foundation.

Disclosure

The coauthor prof. J.D.L. is the inventor of several patent applications on complement inhibitors.

The other authors declare that they have no competing financial or other interest in relation to their work.

References

1. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006; 34:344-53.
2. Oehmcke S, Herwald H. Contact system activation in severe infectious diseases. *J.Mol.Med.(Berl)* 2010; 88:121-6.
3. Namas R, Zamora R, Namas R *et al.* Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *J.Crit Care* 2011.
4. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth.Analg.* 2009; 108:1447-52.
5. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J.Thromb.Haemost.* 2009; 7 Suppl 1:136-9.
6. Napoleone E, Di SA, Peri G *et al.* The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J.Leukoc.Biol.* 2004; 76:203-9.
7. Deban L, Jaillon S, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res.* 2011; 343:237-49.
8. Brekke OL, Christiansen D, Fure H, Fung M, Mollnes TE. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in E. coli-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. *J.Leukoc.Biol.* 2007; 81:1404-13.
9. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M *et al.* Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* 2002; 100:1869-77.
10. Silasi-Mansat R, Zhu H, Popescu NI *et al.* Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Blood* 2010; 116:1002-10.
11. Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J.Innate.Immun.* 2010; 2:439-45.
12. Lappegard KT, Christiansen D, Pharo A *et al.* Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; 106:15861-6.
13. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS *et al.* Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat.Med.* 2006; 12:682-7.
14. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin.Thromb.Hemost.* 2011; 37:362-74.

15. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol.Rev.* 2000; 52:91-112.
16. Nielsen EW, Waage C, Fure H *et al.* Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Mol.Immunol.* 2007; 44:1819-26.
17. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J.Immunol.* 2000; 165:2637-42.
18. Davis AE, III, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol.Immunol.* 2008; 45:4057-63.
19. Davis AE, III. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, III: mechanisms of hereditary angioedema. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100:S7-12.
20. Davis AE, III, Cai S, Liu D. C1 inhibitor: biologic activities that are independent of protease inhibition. *Immunobiology* 2007; 212:313-23.
21. Jansen PM, Eisele B, de Jong IW *et al.* Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J.Immunol.* 1998; 160:475-84.
22. Igonin AA, Protsenko DN, Galstyan GM *et al.* C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis*. *Crit Care Med.* 2012; 40:770-7.
23. Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood* 2009; 114:2367-74.
24. Thorgersen EB, Ludviksen JK, Lambris JD, Sfyroera G, Nielsen EW, Mollnes TE. Anti-inflammatory effects of C1-Inhibitor in porcine and human whole blood are independent of its protease inhibition activity. *Innate.Immun.* 2010; 16:254-64.
25. Morikis D, Assa-Munt N, Sahu A, Lambris JD. Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sci.* 1998; 7:619-27.
26. Mollnes TE, Redl H, Hogasen K *et al.* Complement activation in septic baboons detected by neopeptide-specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC). *Clin.Exp.Immunol.* 1993; 91:295-300.
27. Engstad CS, Lia K, Rekdal O, Olsen JO, Osterud B. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 1995; 58:575-81.
28. Davis AE, III, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb.Haemost.* 2010; 104:886-93.
29. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol.Immunol.* 2007; 44:82-94.

30. Egorina EM, Sovershaev MA, Osterud B. Regulation of tissue factor procoagulant activity by post-translational modifications. *Thromb.Res.* 2008; 122:831-7.
31. Ovstebo R, Dalsbotten Aass HC, Haug KB *et al.* LPS from *Neisseria meningitidis* is crucial for inducing monocyte- and microparticle-associated tissue factor activity but not for tissue factor expression. *Innate.Immun.* 2011.
32. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand.J.Immunol.* 2009; 69:479-91.
33. Lechner D, Weltermann A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb.Res.* 2008; 122 Suppl 1:S47-S54.
34. Coppola L, Guastafierro S, Verrazzo G, Coppola A, De LD, Tirelli A. C1 inhibitor infusion modifies platelet activity in hereditary angioedema patients. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2002; 126:842-5.
35. Ma YJ, Doni A, Skjoedt MO *et al.* Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. *J.Biol.Chem.* 2011; 286:3405-17.
36. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J *et al.* Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J.Biol.Chem.* 1992; 267:22190-7.
37. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J.Innate.Immun.* 2010; 2:422-30.
38. Benagiano M, Munari F, Ciervo A *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii* phospholipase D (CpPLD) drives Th17 inflammation in human atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2012; 109:1222-7.
39. Brekke OL, Christiansen D, Fure H *et al.* Combined inhibition of complement and CD14 abolish *E. coli*-induced cytokine-, chemokine- and growth factor-synthesis in human whole blood. *Mol.Immunol.* 2008; 45:3804-13.
40. Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE, III. C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 2003; 171:2594-601.
41. Dev A, Iyer S, Razani B, Cheng G. NF-kappaB and innate immunity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2011; 349:115-43.
42. Stephan F, Hazelzet JA, Bulder I *et al.* Activation of factor VII-activating protease in human inflammation: a sensor for cell death. *Crit Care* 2011; 15:R110.
43. Dorresteijn MJ, Visser T, Cox LA *et al.* C1-esterase inhibitor attenuates the inflammatory response during human endotoxemia. *Crit Care Med.* 2010; 38:2139-45.
44. Birnbaum J, Klotz E, Spies CD *et al.* The combinations C1 esterase inhibitor with coagulation factor XIII and N-acetylcysteine with tirilazad mesylate reduce the leukocyte

- adherence in an experimental endotoxemia in rats. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 2008; 40:167-76.
45. de Zwaan C, Kleine AH, Diris JH *et al.* Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur.Heart J.* 2002; 23:1670-7.

Legends to figures

Fig. 1. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced coagulation activation measured as PTF1+2 in human whole blood. (a) LPS (final concentration 100 ng/ml) and (b) *E. coli* (final concentration 1×10^7 /ml) was added to whole blood and incubated for 120 min. Prior to incubation, PBS, C1-INH (1.25, 2.5 and 5.0 mg/ml), the complement C3 inhibitor compstatin (Comp.) (20 μ M) or a control peptid (Ctrl.) (20 μ M) were added. PTF1+2 was analyzed in plasma by ELISA and expressed as nmol/l. T0 is the baseline sample at time zero. Values are means \pm SD (n=6) of separate experiments with different donors. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 2. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced TF mRNA up-regulation. (a,b) LPS (100 ng/ml) and (c,d) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 60 min (a,c) or 120 min (b,d). TF mRNA was analyzed using real-time RT-qPCR of whole blood total RNA. The TF mRNA level is expressed as relative quantity (RQ) to the TF mRNA level in the baseline T0 sample which was set to 1. The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. Values are given as means \pm SD (n=6) from separate experiments using different blood donors. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 3. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced TF surface expression on whole blood monocytes. (a) LPS (100 ng/ml) or (b) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. TF expression on monocytes was analyzed using flow cytometry and expressed as median fluorescence intensity (MFI). The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. Values are given as means \pm SD

(n=6) from single experiments with different blood donors. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 4. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced TF functional activity in plasma microparticles. (a) LPS (100 ng/ml) and (b) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. TF functional activity was analyzed in plasma microparticles using a chromogenic method and expressed as U/ml. The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. Values are given as means \pm SD (n= 6). * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 5. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced PTX3 release. (a) LPS (100 ng/ml) and (b) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. PTX3 in plasma was analyzed using ELISA and the results are expressed as ng/ml. Results are given as means \pm SD (n=6) from separate experiments with each blood donor. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 6. C1-INH efficiently reduced LPS- and *E. coli*-induced cytokine synthesis. (a,c,e) LPS (100 ng/ml) and (b,d,f) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. The concentrations of cytokines in the samples were measured using a multiplex cytokine assay measuring 27 cytokines. The results are expressed as pg/ml. Results are given as means \pm SD (n=6) from separate experiments with each blood donors. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 7. Inactivated C1-INH (iC1-INH) reduced LPS- and *E. coli*-induced PTF1+2, but not TF mRNA up-regulation, TF expression on monocytes or IL-8 release. (a,c,e,g) LPS (100 ng/ml) and (b,d,f,h) *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. C1-INH and iC1-INH were added at final concentrations of 5 mg/ml. (a,b) PTF1+2 in plasma was analyzed using ELISA and expressed as nmol/l. (c, d) TF mRNA up-regulation was analyzed using RT-qPCR and expressed as relative quantity (RQ) to the TF mRNA level in the PBS sample after 2 h which was set to 1. (e, f) TF surface expression on monocytes was analyzed by flow cytometry and given as median fluorescence intensity (MFI). (g, h) IL-8 was analyzed using multiplex ELISA and given as pg/ml. Results are given as means and SD (n=3-7) from separate experiments with each blood donor. * $P < 0.05$ compared to LPS or *E. coli* plus PBS, respectively.

Fig. 8. C1-INH reduced *E. coli*-induced complement activation in human whole blood, but less efficient than compstatin. *E. coli* (1×10^7 /ml) was added to human whole blood and incubated for 120 min. The concentrations of inhibitors and controls are indicated in the legend to Fig. 1. Complement activation measured as the terminal complement complex (TCC) in plasma was analyzed by ELISA. The results are expressed as AU/ml. Values are given as means \pm SD (n=6) from single experiments with different blood donors. * $P < 0.05$ compared to *E. coli* plus PBS.

Fig. 1

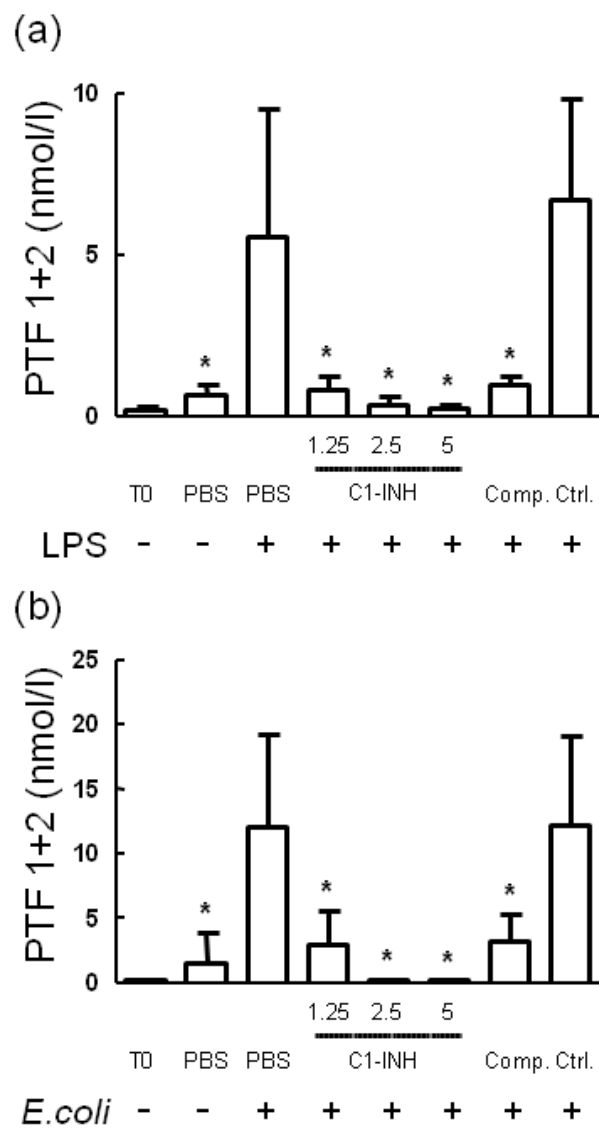


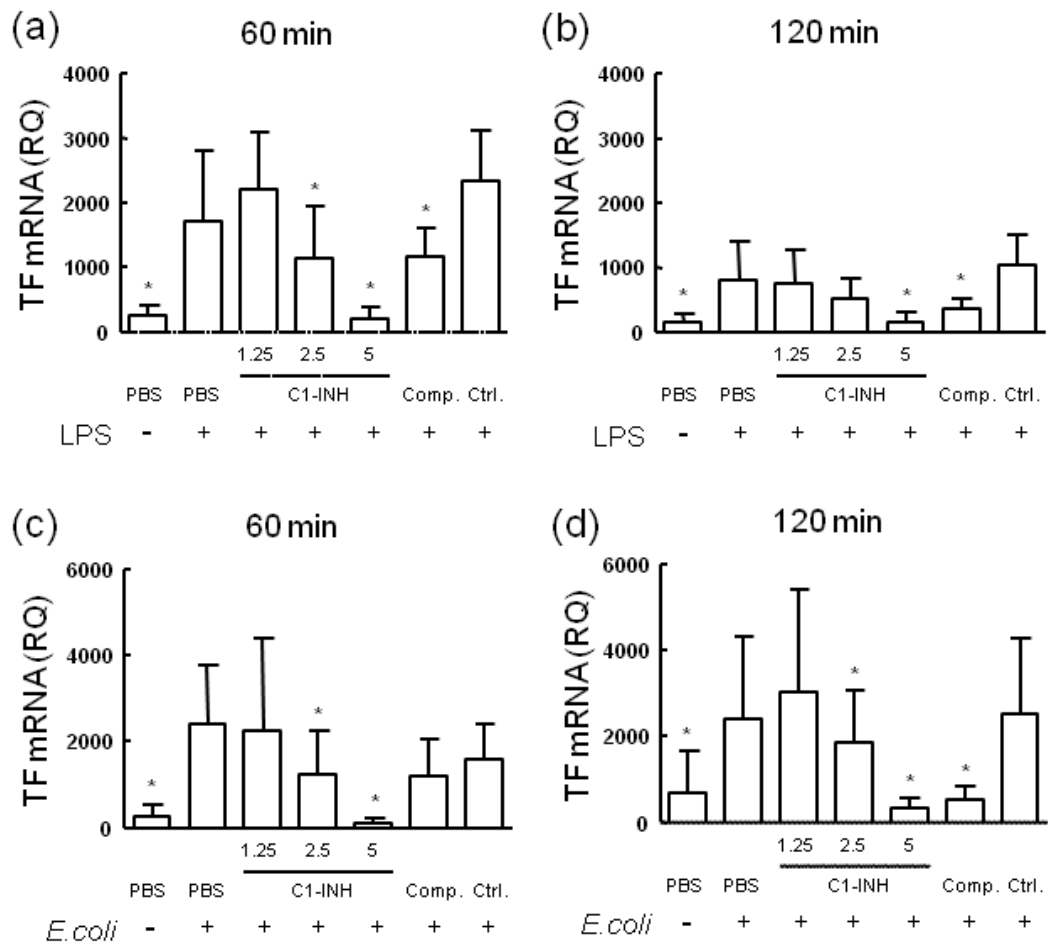
Fig. 2

Fig. 3

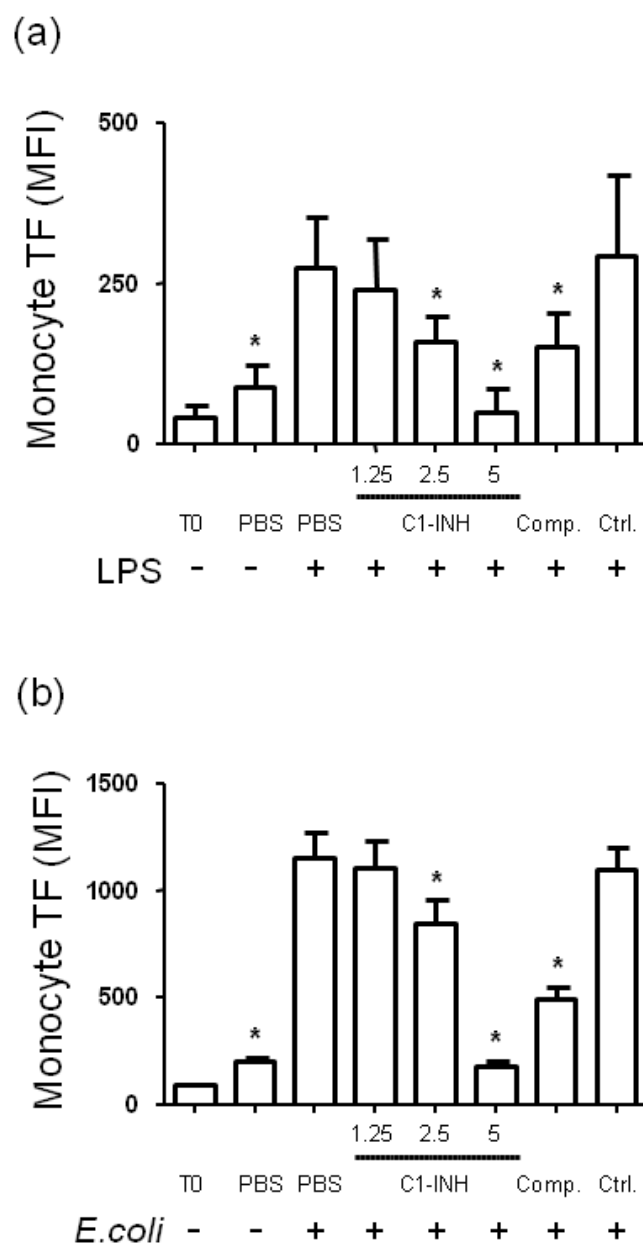


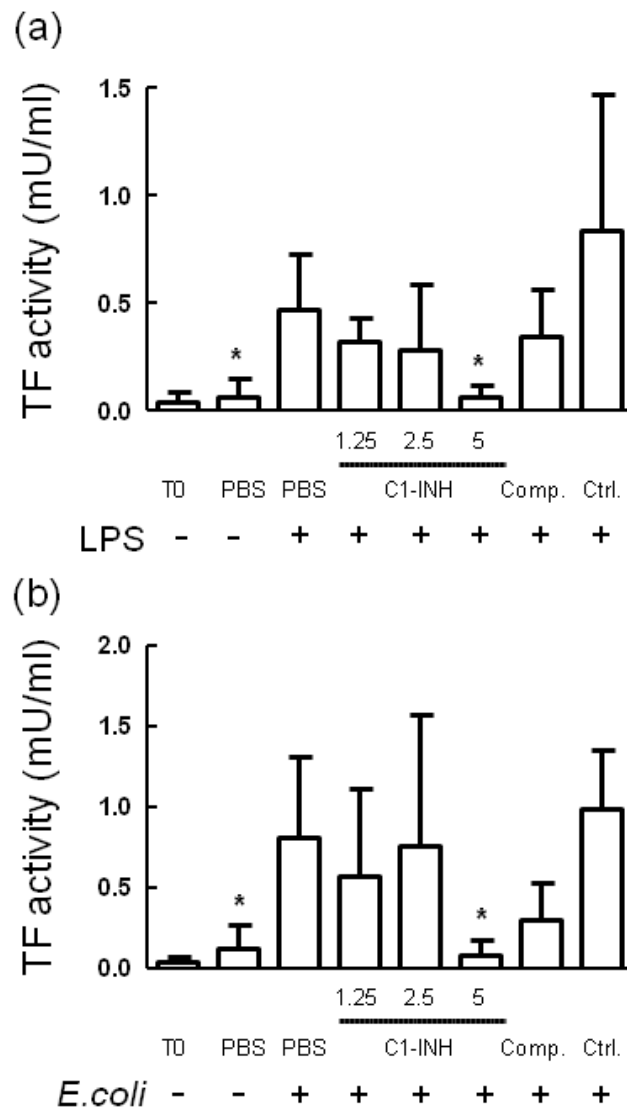
Fig. 4

Fig. 5

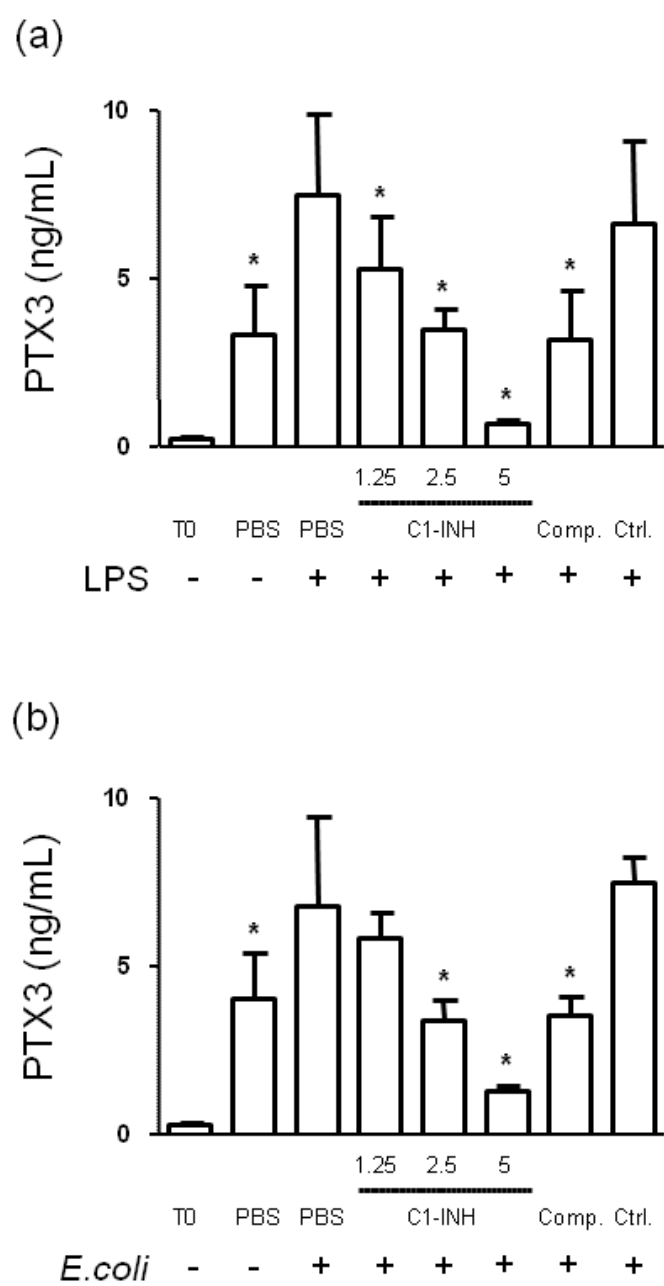


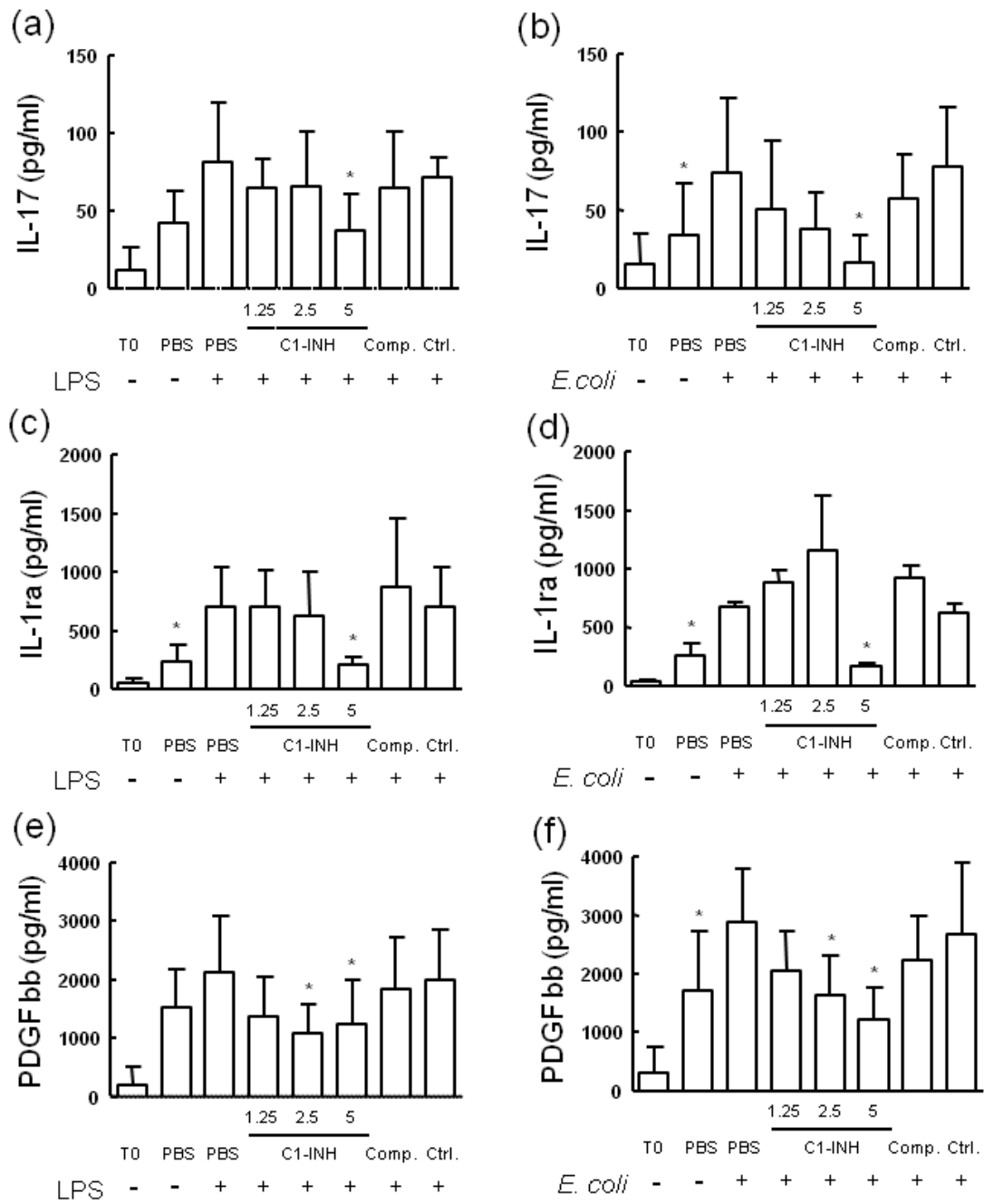
Fig. 6

Fig. 7

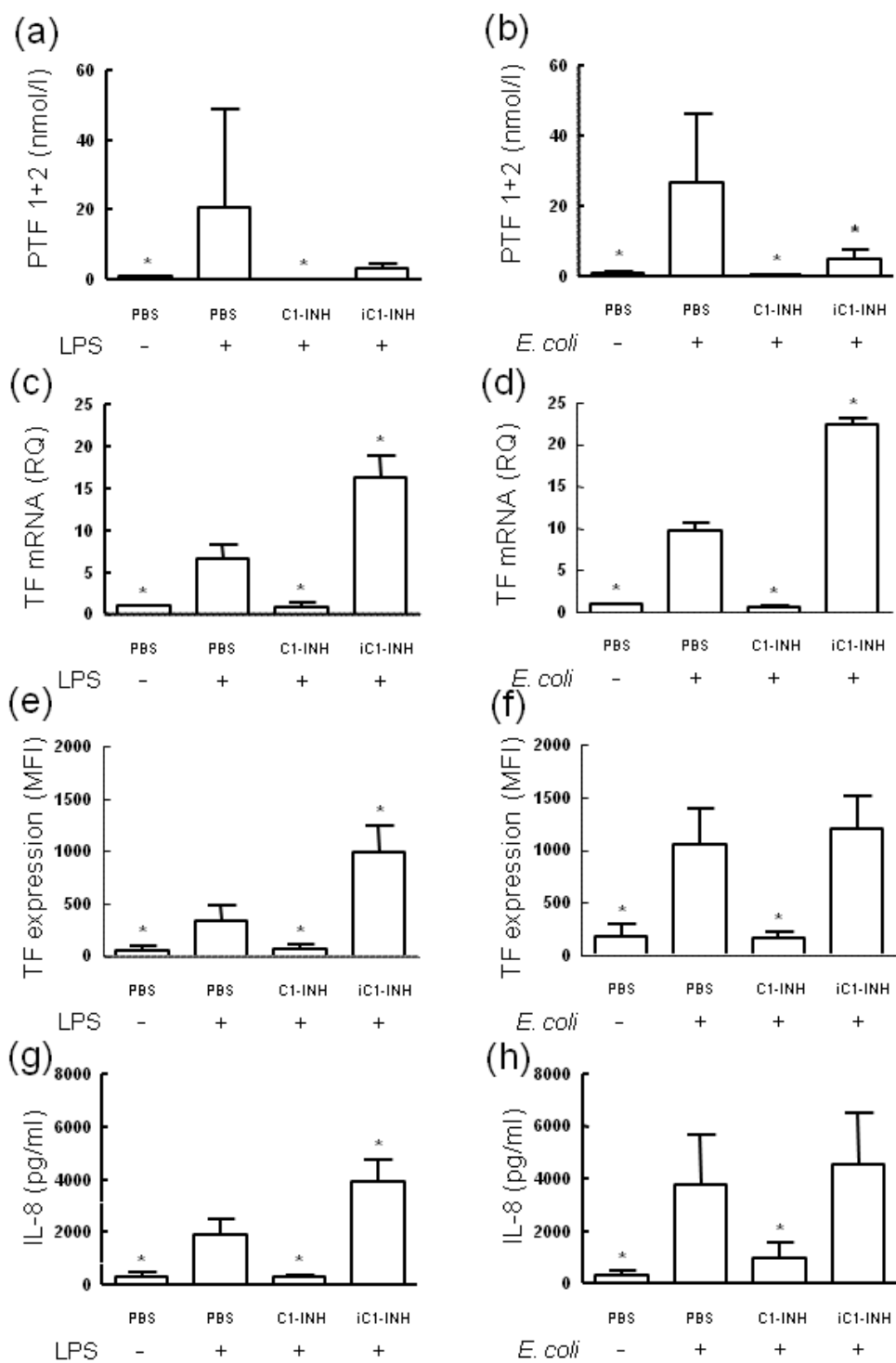


Fig. 8

