

## MARCADORES DE GENERACION DE TROMBINA EN INSUFICIENCIA RENAL DE NIÑOS CON SINDROME UREMICO HEMOLITICO EPIDEMICO

ROSANA F. MARTA<sup>2</sup>, LETICIA FLORENTIN<sup>1</sup>, MARIO DIAZ<sup>1</sup>, PATRICIA INDABURU<sup>2</sup>,  
JULIO C. SANCHEZ AVALOS, FELISA C. MOLINAS<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Sección Nefrología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan; <sup>2</sup> Laboratorio Hematología-Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** Se presentan aquí los niveles de los marcadores tempranos de activación de la coagulación y del TNF- $\alpha$  en 12 niños con la forma epidémica del síndrome urémico hemolítico, de 16 meses de edad, (12-18) (mediana y rango) Todos los pacientes se recuperaron de la enfermedad dentro de las 2 a 4 semanas de evolución. Se tomaron cuatro muestras de sangre: al ingreso al hospital, luego en la primera y segunda semana y en la remisión. Las determinaciones del F1+2, TAT y TNF- $\alpha$  se realizaron por técnicas de ELISA comerciales, mientras que el factor von Willebrand se determinó por el método de Laurell. Los valores de F1+2 y del TAT al ingreso fueron 7.8 nM (3.7-12.3) y 22.7 ng/ml (8-76) respectivamente. Además, se encontró correlación significativa entre los niveles de F1+2 vs creatinina sérica,  $r:0.47$   $p < 0.001$ ; F1+2 vs úrea sérica,  $r:0.66$   $p < 0.001$ ; TAT vs creatinina sérica,  $r:0.77$   $p < 0.001$ ; TAT vs urea,  $r:0.59$   $p < 0.001$ . La mediana del FvW al ingreso en 11/12 niños fue de 260% (170-420). Los niveles del FvW se correlacionaron con los del F1+2;  $r:0.77$   $p < 0.001$  y con los del TAT,  $r:0.41$   $p < 0.01$ . Los valores de estos marcadores séricos tendieron a normalizarse con la mejoría de la enfermedad. Se encontró una correlación negativa entre el recuento plaquetario y los niveles del F1+2,  $r:-0.64$   $p < 0.001$ . Los niveles de TNF- $\alpha$  estuvieron aumentados en 5 niños, 22.2 pg/ml (17.2-53.7). Los resultados sugieren que estas anomalías pueden ser atribuidas a un estímulo común sobre células endoteliales.

**Abstract** *Markers of thrombin generation in epidemic hemolytic uremic syndrome with kidney insufficiency.* We present herein the levels of the early markers of blood coagulation activation and TNF- $\alpha$  in 12 children with the epidemic form of the hemolytic-uremic syndrome, median age 16 months, range 12-18. All patients recovered from the disease within 2 to 4 weeks. Four blood samples were collected: at admission, 1 week and 2 weeks later and on remission. Prothrombin fragments 1+2 (F1+2), thrombin-antithrombin complex (TAT) and tumor necrosis factor alpha (TN- $\alpha$ ) were assayed by commercial ELISA techniques, while von Willebrand factor (vWf) was measured by Laurell's method. At admission, F1+2 and TAT levels were 7.8 nM (3.7-12.3) and 22.7 ng/ml (8-76), respectively. Besides, significant correlations were obtained for F1+2 levels vs blood creatinine,  $r:0.57$   $p < 0.001$ ; F1+2 vs urea,  $r:0.66$   $p < 0.001$ ; TAT vs blood creatinine,  $r:0.77$   $p < 0.001$ ; TAT vs blood urea,  $r:0.59$   $p < 0.001$ . Median vWf value at admission in 11/12 children was 260% (170-420), correlating with F1+2,  $r:0.77$   $p < 0.001$  and with TAT,  $r:0.41$   $p < 0.01$ . Such values tended to normalize with the improvement of the disease. A negative correlation was found for platelet count vs F1+2,  $r:-0.64$   $p < 0.001$ . TNF- $\alpha$  levels were increased in 5/12 children, 22.2 pg/ml (17.2-53.7). These results may be attributable to similar stimuli on endothelial cells.

**Key words:** HUS, kidney insufficiency, thrombin generation

El síndrome de microangiopatía trombótica se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia por mecanismo periférico, insuficiencia renal y manifestaciones neurológicas<sup>1-3</sup>. La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) son las dos variantes más ampliamente

reconocidas de la entidad<sup>4</sup>. El SUH puede aparecer esporádicamente a cualquier edad, mientras que la forma epidémica predomina en niños expuestos a infección por *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* tipo I<sup>5-7</sup>. Las verocitotoxinas producidas por estas bacterias producirían injuria endotelial desencadenando liberación de citoquinas<sup>8,9</sup>, deficiencia en la síntesis de prostaciclina<sup>10</sup>, activación plaquetaria con biosíntesis aumentada de tromboxano<sup>11-13</sup>, así como activación de leucocitos y de los sistemas de coagulación y fibrinólisis<sup>14-16</sup>. Por otro lado, se ha observado que el TNF- $\alpha$  y la IL-1 inducen la expresión de receptores de verocitotoxina sobre cultivo de células endoteliales humanas<sup>17</sup>. En algunos casos de la forma esporádica del SUH y de la PTT, se han repor-

Recibido: 19-VI-1997

Aceptado: 27-VIII-1997

\* Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dra. Felisa C. Molinas, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

Fax: 54-1-523-8947; e-mail: fmolinas@mail.vetina.ar

tado anomalías plaquetarias y del factor von Willebrand<sup>18, 19</sup>, junto con el aumento de los niveles de marcadores tempranos de la activación de la coagulación y la fibrinólisis<sup>15, 16</sup>. A diferencia de las anomalías de la función plaquetaria que se encontraron en la mayoría de los pacientes con SUH<sup>13, 20</sup>, la activación de la coagulación se encontró sólo en pacientes severamente comprometidos<sup>21, 22</sup>. Se ha propuesto que los niveles aumentados de citoquinas encontrados en algunos pacientes con síndrome de microangiopatía trombótica podrían jugar un rol patogénico en la enfermedad<sup>9, 23</sup>. Se sugirió que el TNF- $\alpha$  y IL-1 eran las citoquinas involucradas en la inducción de la expresión del factor tisular en cultivo de células endoteliales, tendiendo esto a la activación del factor VII<sup>24, 25</sup>. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la IL-6 es la citoquina que induce activación de la coagulación poniéndose esto de manifiesto por el aumento de los niveles de F1+2 y TAT<sup>26</sup>, mientras que el TNF parece estar involucrado en la activación de la fibrinólisis<sup>27</sup>. Se propuso que la causa de las anomalías hemostáticas encontradas en pacientes con sepsis y en sujetos normales post infusión de TNF podría ser la interacción entre citoquinas y células endoteliales, monocitos y neutrófilos<sup>28, 29</sup>. Estas alteraciones podrían cumplir un rol también en niños con SUH. Se hallaron niveles aumentados de TNF- $\alpha$  en la mayoría de los niños con SUH en Argentina<sup>9</sup>, así también como en adultos con PTT<sup>23</sup>. No obstante, en otros estudios, sólo se encontraron niveles aumentados de TNF- $\alpha$  en una minoría de niños con SUH<sup>14</sup>.

Nosotros dosamos los niveles de marcadores tempranos de activación de la coagulación y la fibrinólisis y TNF- $\alpha$  en un grupo de 12 niños con microangiopatía trombótica que presentaban un cuadro clínico típico de la forma epidémica de SUH. El objetivo del estudio fue correlacionar los niveles de F1+2, TAT y TNF- $\alpha$  con los hallazgos clínicos y de laboratorio, en particular con aquellos relacionados con falla renal aguda.

**Material y métodos**

*Pacientes:* se incluyeron en el estudio doce niños admitidos en el Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, con una mediana de edad de 16 meses, rango 12 a 28. El diagnóstico de síndrome urémico hemolítico (SUH) se estableció por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. Diez de esos niños recibieron una a dos transfusiones de sangre entera y el mismo número de pacientes fueron sometidos a diálisis peritoneal (1 sesión en 1 niño, 2 en 2, 3 en 3, 5 en 3 y 9 en 1 caso). Todos los pacientes se recuperaron de la enfermedad entre las 2 y 4 semanas.

La recolección de sangre para investigación clínica fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

*Recolección de sangre:* se tomaron cuatro muestras de sangre: al ingreso, a la semana, a las dos semanas y en la remisión (2 meses después del ingreso). Durante la fase agu-

da de la enfermedad las muestras de sangre se obtuvieron antes de la diálisis peritoneal. El anticoagulante usado fue citrato trisódico 129mM en relación 1:9 (v:v). El plasma pobre en plaquetas se preparó por centrifugación a 2500 g durante 20 min a temperatura ambiente, se alicató y se guardó a -70° C hasta su utilización.

*Ensayos de coagulación:* el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) y el complejo trombina-antitrombina (TAT) se midieron por técnicas de ELISA según descripción de Pelzer y col<sup>30, 31</sup>, empleando reactivos comerciales (Behringwerke, AGG, Marburg, Germany). Los rangos normales para F1+2 y TAT sugeridos por los fabricantes son 0.44-1.11 nM y 1.0-4.1 ng/ml, respectivamente. El vWf:Ag se midió por técnica de Laurell<sup>32</sup> usando un anticuerpo monoespecífico (Assera vWF, Diagnostica Stago, Asnieres, France). El recuento plaquetario se realizó mediante un contador hematológico automatizado.

*Ensayo de factor de necrosis tumoral (TNF):* se midió en la muestra del ingreso usando un equipo comercial de ELISA (Sigma, St Louis, MI, U.S.A.). El valor normal dado por el fabricante es < 15.6 pg/ml mientras que el límite de detección es 4.4 pg/ml.

*Análisis estadístico:* Los datos se presentan como mediana y rango. Se realizó el análisis de covarianza de acuerdo al método de Bland y Altman<sup>33</sup>.

**Resultados**

Los datos de laboratorio de los pacientes con SUH al ingreso incluyeron: hematocrito, 22% (17-29) (mediana y rango); hemoglobina, 8.1 g/dl (6.7-11.6); recuento de glóbulos blancos, 19.5 x 1.000/ $\mu$ l (13.8-35); recuento de plaquetas, 65 x1.000/ $\mu$ l (21-131); urea sérica, 1.87 g/l (1.21-3.7); creatinina sérica, 3.45 mg/dl (1.6-8.8).

Como se muestra en la Fig. 1, los niveles de F1+2 y TAT al ingreso estuvieron aumentados con valores de 7.8 nM (3.7-12.3) y 22.7 ng/ml (8-76), respectivamente. Los niveles disminuyeron progresivamente con la mejo-

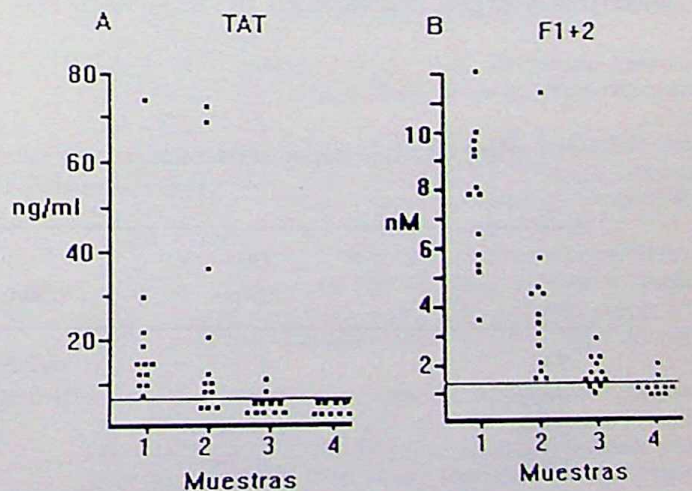


Fig. 1.- Niveles de TAT (A) y F1+2 (B) en las distintas muestras determinadas por técnica de ELISA en niños con SUH. 1, muestra obtenida al ingreso; 2, una semana después; 3, dos semanas después; 4, convalecencia. El rango normal es el área entre la abscisa y la línea horizontal justo sobre ella.

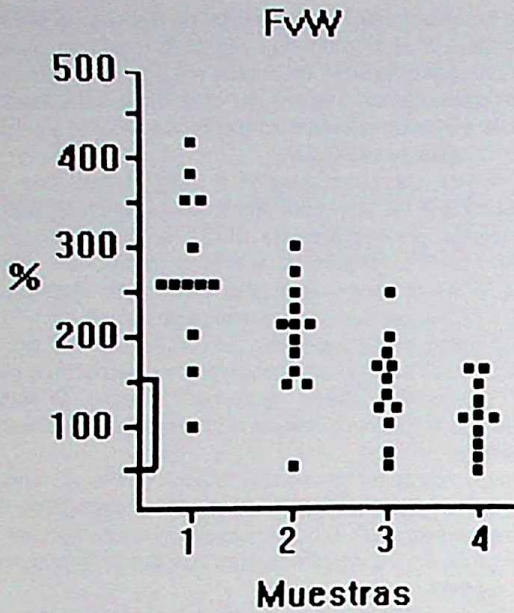


Fig. 2.- Niveles de FvW medidos por técnica de Laurell. El rango normal se indica con una línea vertical cerca del eje de las ordenadas. Las muestras fueron obtenidas en los mismos tiempos indicados en la Fig. 1.

ría del estado clínico. En la convalecencia, 2 meses más tarde, los valores de F1+2 se normalizaron en 8/10 pacientes, 1.0 nM (0.9-1.1), mientras que permanecieron aumentados en los otros 2 casos, 1.9 nM y 2.6 nM, probablemente debido a una infección viral. En cambio, los niveles de TAT fueron normales en los 10 niños evaluados en la convalecencia, 3.2 ng/ml (0.7-4.5). Al inicio de la enfermedad microangiopática, los niveles de FvW fueron superiores al nivel normal en 11/12 pacientes, con una mediana de 260% (170-420) y disminuyeron progresivamente a valores normales en 10 niños, 100% (70-

150), mientras que fue de 170% en los dos pacientes restantes (Fig. 2). Se encontró una correlación significativa entre el FvW y los niveles de F1+2,  $r=0.77$   $p<0.001$  y entre el FvW y TAT,  $r=0.41$   $p<0.01$ . Se encontró además una correlación negativa entre el recuento plaquetario y el FvW,  $r=-0.58$   $p<0.001$  y los niveles de F1+2,  $r=-0.64$   $p<0.001$ .

También se obtuvo una correlación significativa entre los valores de los estudios hemostáticos con la creatinina y urea sérica (Tabla 1): F1+2 vs creatinina,  $r=0.57$   $p<0.001$ ; F1+2 vs urea,  $r=0.66$   $p<0.001$ ; TAT vs creatinina,  $r=0.77$   $p<0.001$ ; TAT vs urea,  $r=0.57$   $p<0.001$ ; FvW vs creatinina,  $r=0.59$   $p<0.001$ ; FvW vs urea,  $r=0.65$   $p<0.001$ . Se encontró una correlación negativa entre el recuento plaquetario y creatinina,  $r=-0.52$   $p<0.001$  y entre el recuento plaquetario vs urea,  $r=-0.71$   $p<0.001$ .

Los niveles de TNF- $\alpha$  estuvieron aumentados al ingreso en 5 niños (41%), 22.2 pg/ml (17.2-53.7) y se encontraron normales o no detectables en los otros 7 pacientes.

## Discusión

Los niveles de los marcadores tempranos de generación de trombina, F1+2 y TAT, estuvieron aumentados en los 12 niños con SUH. Resultados similares fueron publicados por Takahashi y col<sup>15</sup> y por Monteagudo y col<sup>16</sup>, en la mayoría de los casos en adultos con la forma esporádica de SUH y PTT. El estudio que presentamos aquí es el más numeroso en niños con SUH epidémico a los que se le midió marcadores de activación de trombina. Los niveles de F1+2 en estos niños con SUH se encontraron dentro del rango hallado en adultos con PTT, mientras que los niveles de TAT fueron más altos que aquellos encontrados en PTT<sup>15, 16</sup> y en sujetos nor-

TABLA 1.- Correlación entre los ensayos hemostáticos y la creatinina y urea séricas en niños con síndrome urémico hemolítico epidémico

	TAT (ng/ml)	F1+2 (nM)	FvW (%)	Recuento plaquetario (x1.000/ $\mu$ l)
TAT (ng/ml)	-	$r=0.36$ $p<0.025$	$r=0.41$ $p<0.01$	$r=-0.21$ NS
F1+2 (nM)	$r=0.36$ $p>0.025$	-	$r=0.77$ $p<0.001$	$r=-0.64$ $p<0.001$
Urea sérica (g/l)	$r=0.59$ $p<0.001$	$r=0.66$ $p<0.001$	$r=0.65$ $p<0.001$	$r=-0.71$ $p<0.001$
Creatinina sérica (mg/dl)	$r=0.77$ $p<0.001$	$r=0.57$ $p<0.001$	$r=0.59$ $p<0.001$	$r=-0.52$ $p<0.001$

males después de la infusión de endotoxina<sup>34</sup>. Es interesante remarcar que se encontraron correlación estadística entre los valores de F1+2 y TAT comparados con los marcadores de laboratorio de insuficiencia renal, urea y creatinina séricas, y estas correlaciones se mantuvieron a lo largo de estudios repetidos durante la enfermedad hasta la remisión, sugiriendo la existencia de un desencadenante común para las alteraciones hemostáticas y renales. La activación de la coagulación pudo producir depósitos de fibrina en la microcirculación renal dando lugar a insuficiencia renal. López y col<sup>9</sup> encontraron altos niveles de TNF- $\alpha$  en la mayoría de los niños con SUH. De todas maneras, y en concordancia con los resultados de Fitzpatrick y col<sup>14</sup>, nosotros encontramos aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  sólo en 5 niños de los 12 estudiados, 4 de los cuales recibieron 3 diálisis peritoneales cada uno y el otro recibió 9. De todas maneras, no se encontró correlación entre los niveles de TNF- $\alpha$  y el número de diálisis peritoneales ni los datos clínicos y de laboratorio. En niños con púrpura por infección severa, los niveles de TNF- $\alpha$  fueron significativamente más altos que en aquellos detectados en los casos con SUH<sup>28</sup>. Se creía que el TNF- $\alpha$  estaba involucrado en la activación de la coagulación por inducción de la expresión de factor tisular sobre las células endoteliales en cultivo<sup>24, 25</sup>.

Además, se encontraron niveles aumentados de los marcadores de activación de la coagulación<sup>29</sup> después de la infusión de TnF- $\alpha$  en sujetos normales, pero se demostró recientemente que la IL-6 es en realidad la citoquina que induce activación de la coagulación<sup>26</sup> mientras que el TNF- $\alpha$  parece estar involucrado con la activación de la fibrinólisis<sup>27</sup>.

El factor von Willebrand es un reactante de fase aguda y aumentó después de la infusión de TNF- $\alpha$  en humanos<sup>35</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la IL-6 es una citoquina proinflamatoria responsable de la inducción de la síntesis de reactantes de fase aguda<sup>36</sup>. Por otro lado, el TNF- $\alpha$  y la IL-1 son inductores de la síntesis y liberación por parte de los monocitos y de las células endoteliales de IL-6<sup>37</sup>. Encontramos niveles aumentados de TNF- $\alpha$  en el 41% de los niños con SUH mientras que el 96.6% de ellos tuvieron aumento de los niveles de FvW, por lo tanto, deberían determinarse los niveles de IL-6 para dilucidar estos hallazgos. Pero también otros mecanismos tales como Shiga toxinas podrían cumplir un rol en este fenómeno<sup>19</sup>. En contraste, Wada y col<sup>38</sup> encontraron niveles normales de FvW en adultos con PTT. La correlación significa que nosotros encontramos entre el FvW y los niveles de F1+2 y TAT da fundamento para la hipótesis de la activación de células endoteliales. Se han descrito extensamente en pacientes con síndrome de microangiopatía hemolítica anormalidades moleculares y funcionales del FvW<sup>39, 40</sup>.

El recuento plaquetario correlacionó con uno de los marcadores de generación de trombina, el F1+2, y con la creatinina y urea séricas. Estos datos indican interacciones complejas sugiriendo que la disminución en el recuento plaquetario podría ser secundaria a la generación de trombina o a la activación y/o daño endotelial por parte de las verocitotoxinas y/o citoquinas.

En conclusión, este grupo de niños con cuadro clínico de SUH epidémico presentaron generación de trombina evidenciado por los niveles aumentados de F1+2 y TAT. Más aún, la correlación encontrada entre estos marcadores, así como los niveles de FvW y el recuento de plaquetas con los de creatinina y urea sérica sugieren que estos pueden ser secundarios a un mismo estímulo sobre células endoteliales por parte de citoquinas tales como TNF- $\alpha$  e IL-6, y/o verocitotoxinas, pero no podemos descartar la participación de otros factores aún poco conocidos.

**Agradecimientos:** Estos estudios han sido llevados a cabo con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad de Buenos Aires. Queremos agradecer a Lic. Susana Laguna por su asesoramiento en el análisis estadístico.

## Bibliografía

1. Byrnes JJ, Moake JL. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome: evolving concepts of pathogenesis and therapy. *Clin Haematol* 1986; 15: 413-42.
2. Lian ECY. Pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Sem Hematol* 1987; 24: 82-100.
3. Moake JL. Studies on the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Sem Hematol* 1997; 34: 83-9.
4. Rose PE, Clark AJ. Hematology of the hemolytic uremic syndrome. *Blood Rev* 1989; 3: 136-40.
5. Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Mendilaharsu J, Ruffy A. The hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1964; 64: 478-91.
6. Kaplan BS, Preosmans W. The hemolytic uremic syndrome of childhood and its variants. *Sem Hematol* 1987; 24: 148-60.
7. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming DC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verocytotoxin producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-82.
8. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1991; 59: 4173-9.
9. López EL, Contrini MM, Devoto S, de Rosa MF, Grana MG, Genero MH, et al. Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 594-8.
10. Remuzzi G, Mecca G, Livio M, de Gaetano G, Donati MB, Pearson JD, et al. Prostacyclin generation by cultured endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *Lancet* 1980; 1: 656-7.
11. Walters MDS, Levin M, Smith C, Nokes TJC, Hardisty RM, Dillon MJ, et al. Intravascular platelet activation in the

- hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 1988; 33: 107-15.
12. Tonshoff B, Momper B, Gonne Kuhl P, Schweer H, Scharer K, Seyberth HW. Increased thromboxane biosynthesis in childhood hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 1990; 37: 1134-41.
  13. Fong JS, Kaplan BS. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion". *Blood* 1982; 60: 564-70.
  14. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barrat TM. Interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int* 1992; 42: 951-6.
  15. Takashi H, Tatewaki W, Wada K, Shibata H. Thrombin generation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1989; 32: 255-7.
  16. Monteagudo J, Pereira A, Reverter JC, Pijoan J, Tusell J, Ordinas A. Thrombin generation and fibrinolysis in the thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Thromb Haemost* 1991; 66: 515-9.
  17. van de Kar NCAJ, Monnens LAH, Karmali MA, Van Hinsbergh VWM. Tumor necrosis factor and interleukin 1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 1992; 80: 2755-64.
  18. Monteagudo J, Pereira A, Roig S, Reverter JC, Ordinas A, Castillo R. Investigation of plasma von Willebrand factor and circulating platelet aggregating activity in mitomycin C-related hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol* 1990; 33: 46-9.
  19. Kaye SA, Obrig TG. Effect of TNF- $\alpha$ , Shiga toxin and calcium ionophore on Weibel-Palade body content of endothelial cells: possible implications for the hemolytic uremic syndrome. *Thromb Res* 1995; 79: 415-21.
  20. Viscarbenaga M, Sánchez Avalos JC, Montes de Oca M, Kordich L, Vitacco M. Estudio de la agregación plaquetaria in vitro en el síndrome urémico hemolítico. *Medicina (Buenos Aires)* 1983; 43: 853-4 (Abstract).
  21. Sánchez Avalos JC, Vitacco M, Molinas FC, Peñalver J, Gianantonio C. Coagulation studies in the hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1970; 76: 538-48.
  22. Willoughby ML, Murphy AV, McMorris S, Jewell FG. Coagulation studies in the hemolytic uremic syndrome. *Arch Dis Child* 1972; 47: 766-71.
  23. Wada H, Kaneko T, Ohiwa M, Tanigawa M, Tamaki S, Minami N, et al. Plasma cytokine levels in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1992; 40: 167-70.
  24. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163: 740-5.
  25. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Coltrane RS, Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the action of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4533-7.
  26. Stouthard JML, Levi M, Hack CE, Veenhof CHN, Romijn HA, Sauerwein HP, et al. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemostas* 1996; 76: 738-42.
  27. van der Poll T, van Deventer SJH, ten Cate H, Haagmans BL, Biemond BJ, Buller HR, et al. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Thromb Haemostas* 1994; 83: 446-51.
  28. Girardin E, Grau GE, Dayer J-M, Roux-Lombard P. The J5 study group. Lambert P-J. Tumor necrosis factor and interleukin 1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 1988; 319: 397-400.
  29. van der Poll T, Bullaer HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJH, et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 1990; 322: 1622-7.
  30. Pelzer H, Schwartz A, Heimbürger N. Determination of human thrombin-antithrombin complexes in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb Haemostas* 1988; 59: 101-6.
  31. Pelzer H, Schwartz S, Stuber W. Determination of human prothrombin activation fragment 1+2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemostas* 1991; 56: 153-9.
  32. Laurell CB. Electroimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29 (Suppl 124): 21-7.
  33. Bland JM, Altman DG. Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1-correlation within subjects. *Brit Med J* 1995; 310: 446.
  34. van Deventer SJH, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990; 76: 2520-6.
  35. van der Poll T, van Deventer S, Pasterkamp G, van Mourik J, Buller H, ten Cate JW. Tumor necrosis factor induced von Willebrand factor release in healthy humans. *Thromb Haemostas* 1992; 67: 623-6.
  36. Le J, Vilcek J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein sequence. *Lab Invest* 1989; 61: 588-602.
  37. Brouckaert P, Spriggs DR, Demetri G, Kufe DW, Fiers W. Circulating interleukin 6 during a continuous infusion of tumor necrosis factor and interferon gamma. *J Exp Med* 1989; 169: 2257-62.
  38. Wada H, Taneko T, Ohiwa M, Tanigawa M, Hayashi T, Tamaki S, et al. Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1993; 44: 101-5.
  39. Lian ECY, Siddiqui FA. Investigation on the role of von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1985; 66: 1219-21.
  40. Moake JL. von Willebrand factor and the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenia: from human studies to a new animal model. *Lab Invest* 1988; 59: 415-7.