



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
METODOLOGIE IN MEDICINA PREVENTIVA E TERAPIA

XX CICLO

*Meccanismi di immunosoppressione in corso di sepsi: ruolo del
sistema monocito-macrofagico*

Tutor: Prof. Alberto Bergamini

Dottoranda: Dott.ssa Anna Sinistro

Coordinatore: Prof. Giovanni Rocchi

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Importanza clinica della sepsi	4
1.2 Fisiopatologia della sepsi	8
1.3 Meccanismi di immunosoppressione nella sepsi	10
1.4 La risposta immunitaria durante la sepsi	14
1.5 Il CD40- CD154 nell'immunità cellulo-mediata	16
1.6 Regolazione nell'attività delle APC	18
1.7 CD40-CD154 e le funzioni effettrici sui monocito- macrofagi	20
1.8 Alterazioni indotte dalla sepsi sull'espressione di molecole co-stimolatorie	22
1.9 Soppressione dell' IL-12 durante la tolleranza endotossinica in modelli sperimentali: perdita di cellule dendritiche e iporesponsività macrofagica	24
2. ATTIVITA' DI RICERCA SVOLTE DALLA DOTT.SSA ANNA SINISTRO NELL' AMBITO DELLO STUDIO DEI MECCANISMI DI IMMUNOSOPPRESSIONE IN CORSO DI SEPSI	27
2.1 Introduzione al lavoro sperimentale	28
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 Pazienti	30
3.2 Cellule	32
3.3 Anticorpi	32
3.4 Citofluorimetria	33
3.5 Stimolazione cellule	34
3.6 Analisi statistica dei dati	35

4. RISULTATI	36
4.1 Pazienti	36
4.2 Rilevanza clinica dell'immunosoppressione del paziente settico	38
4.3 I monocito- macrofagi di pazienti settici rispondono in maniera alterata alla stimolazione con CD40L	38
4.4 Nei monocito-macrofagi di pazienti settici si ha riduzione nell' espressione di molecole co-stimolatorie	41
4.5 I monocito-macrofagi dei pazienti settici presentano alterazione nella loro funzione di APC	44
4.6 La funzionalità dei linfociti T non si modifica in corso di sepsi	46
5. DISCUSSIONE	47
6. CONCLUSIONE	50
7. BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

1.1 Importanza clinica della sepsi

La sepsi rappresenta una condizione clinica la cui incidenza è in aumento, e che è associata ad una prognosi grave. E' particolarmente frequente nei pazienti delle Unità di Terapia Intensiva (UTI), ma spesso è la stessa sepsi che rappresenta il motivo di ricovero in UTI: globalmente fino a 1/3 dei pazienti in terapia intensiva presenta sepsi, sepsi grave e shock settico. La Concensus Conference internazionale del 2001 ha confermato la definizione di sepsi elaborata nel 1992: "la sepsi è la sindrome clinica caratterizzata dalla presenza sia di infezione che di una risposta infiammatoria sistemica (SIRS)". Si considera in atto una SIRS quando il paziente presenta uno o più dei seguenti riscontri:

- temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$;
- frequenza cardiaca >90 battiti/min;
- iperventilazione con frequenza respiratoria >20 atti/min o $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg;
- conta di globuli bianchi >12000 cellule μL^{-1} o <4000 μL^{-1} (1).

Nonostante gli avanzamenti nella conoscenza della fisiopatologia della sepsi e nelle opzioni diagnostiche/terapeutiche, la sepsi presenta una mortalità ancora molto elevata.

La sepsi è infatti la decima causa di morte più comune negli Stati Uniti con un tasso di mortalità di circa il 29% (2). Tale tasso la allinea ad alcune delle principali cause di morte in ospedale, compreso l'infarto cerebrale (rischio 12-19% di morte nei primi 30 giorni) e l'infarto acuto del miocardio (rischio 8% di morte nei primi 30 giorni) (3). Molti pazienti con la sepsi hanno almeno una co-morbosità e le morti sono attribuite spesso a queste condizioni piuttosto che alla sepsi stessa.

Il paziente diventa settico severo se ha gli stessi sintomi (infezione diagnosticata, febbre, leucocitosi, tachicardia, tachipnea) e compare un'insufficienza d'organo. Da un punto di vista clinico, l'organo che è primariamente visibile come insufficiente è il rene perché il paziente diviene oligo- o anurico .

E' attualmente possibile utilizzare un sistema di classificazione (SOFA score = Sepsis Organ Failure Assessment) con cui è possibile dare un punteggio da 1 a 4 per ogni insufficienza (tabella 1).

Lo shock settico rappresenta invece una sottocategoria della sepsi grave ed è definito come un'ipotensione indotta dalla sepsi, refrattaria ad un adeguato rimpiazzo volemico e accompagnata da ipoperfusione periferica o danno d'organo. Quindi le caratteristiche emodinamiche più rilevanti della sepsi grave e dello shock settico sono la riduzione delle resistenze sistemiche e la mal distribuzione generalizzata del flusso ematico.

Il volume effettivo circolante è ridotto nei pazienti con sepsi. Questa riduzione è la principale causa d'instabilità cardiovascolare. La genesi dell'ipovolemia è multifattoriale e comprende l'aumento della capacità venosa, della permeabilità del microcircolo, delle perdite e lo scarso introito di liquidi.

Nei pazienti che non ricevono un adeguato rimpiazzo volumico lo shock settico può presentarsi come uno stato ipodinamico, mentre la gittata cardiaca è normale o elevata nel 90% dei pazienti trattati adeguatamente per correggere l'ipovolemia.

Il trattamento dei pazienti con sepsi grave si fonda principalmente sull'eradicazione del focolaio infettivo, su un'appropriata terapia antibiotica, sull'applicazione di un adeguato supporto emodinamico e di altre terapie sintomatiche (4,5).

Allo stato attuale, nonostante i significativi progressi nello sviluppo di antibiotici, nella tecnologia delle unità di cura intensiva e nel supporto di ventilazione meccanica, la mortalità per sepsi rimane elevata e segue la progressione della malattia da SIRS a shock settico. La tempestività diagnostica e terapeutica è pertanto fondamentale.

La limitata capacità, di trattare efficacemente la sepsi e i disturbi ad essa correlati riflette presumibilmente una insufficiente comprensione dei meccanismi che sono alla base della sua patogenesi. Pertanto sono necessari

studi approfonditi per raggiungere una più completa comprensione dei mediatori endogeni che iniziano e regolano le risposte infiammatorie che portano alla sindrome settica.

SCORE	1	2	3	4
SNC GCS	13-14	10-12	6-9	<6
RESPIRATORIO Pa/FiO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200 con supporto resp	< 100
CARDIOVASCOLARE Ipotensione	MAP < 70 mmHg	Dopa < 5 o DObutamina	Dopa > 5 o Adr < 0,1 o Noradr < 0,1	Dopa > 15 Adr > 0,1 Noradr > 0,1
COAGULAZIONE Piastrine(10 ³ /mm ³)	< 150	<100	<50	<20
FEGATO Bilirubina(mg/dl)	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
RENALE Creat(mg/dl) o Diuresi	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 o < 500 ml/24h	> 5,0 < 200 ml/24 H

Tabella 1

1.2 Fisiopatologia della sepsi

L' eziologia della malattia è dovuta alla penetrazione di organismi microbici attraverso una porta d'entrata (cute,oro-faringe,orecchio medio, vie respiratorie, vie digerenti, apparato urogenitale). Il lipopolisaccaride (LPS), il maggior componente della parete cellulare degli organismi batterici Gram-negativi, può da solo provocare molti degli eventi fisiopatologici presenti nel malato durante un episodio settico.

Le cellule del sistema immunitario innato riconoscono i microrganismi e avviano la risposta attraverso un sistema di recettori di riconoscimento chiamati "toll-like receptor " (TLRs).

Le citochine sono tra i maggiori responsabili della fisiopatologia della sepsi (6). In una prima risposta precoce all'infezione si ha produzione di citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α e l'interleuchina (IL)-1, che mediano direttamente o indirettamente i cambiamenti emodinamici e infiammatori caratteristici della sepsi. Inoltre, TNF- α e IL-1 iniziano una catena pro-infiammatoria, che dà luogo alla produzione di altre citochine pro-infiammatorie come IL-6, interferone (IFN)- γ , IL-12 e varie chemochine. Il TNF- α e IL-1 hanno quindi un ruolo fondamentale nell' attivazione della catena pro-infiammatoria e recenti studi hanno mostrato che la neutralizzazione di IL-1 e TNF- α in modelli di shock

settico dà luogo ad una sostanziale riduzione dell' infiammazioni sistemica e della mortalità (7).

Altre citochine mostrano invece proprietà antinfiammatorie (IL-10, IL-4), realizzando il controbilanciamento di un eccessivo stato pro-infiammatorio (8). In particolare, IL-10 sembra essere in grado di promuovere uno stato di riduzione della infiammazione cellulare, come mostrato dalla inibizione dell' attività fagocitica e battericida di macrofagi e neutrofilii (9).

Durante le fasi iniziali della sepsi si assiste quindi ad uno stato di iperattivazione del sistema immunitario a cui segue però una fase di ipoattivazione, caratterizzata da perdita dell'ipersensibilità ritardata, predisposizione ad infezioni nosocomiali e incapacità a risolverle. Di fatto, la principale causa di morte nei pazienti settici non è l'insufficienza d'organo multisistemica, associata a shock quanto piuttosto le conseguenze dello sviluppo incontrollato di infezioni secondarie di tipo "opportunistic"(10,11). Una delle ragioni del fallimento delle strategie antinfiammatorie nei pazienti con sepsi può quindi essere legata all'evoluzione naturale della malattia nel tempo che comporta che i trattamenti non solo devono essere mirati ma devono avvenire secondo una scansione temporale precisa.

1.3 Meccanismi di immunosoppressione nella sepsi

Durante le fasi avanzate della sepsi è presente uno stato di immunosoppressione caratterizzato da alterazione della funzionalità sia dei macrofagi che dei linfociti. Nelle sepsi da batteri Gram-negativi, LPS svolge un ruolo chiave nel determinare questa disfunzione immunitaria. Ciò è stato evidenziato in esperimenti in cui, dopo aver stimolato sangue intero di pazienti settici con LPS, si verificava un rilascio di citochine pro-infiammatorie in quantità significativamente inferiore rispetto ai soggetti presi come controllo (12). Le cause dell'immunodepressione che si sviluppa durante la sepsi non sono ancora del tutto conosciute anche se numerosi meccanismi (tabella 2) sono stati chiamati in causa. Fra questi, l'incapacità dei macrofagi ad attivarsi sembra giocare un ruolo di particolare rilievo (vedi paragrafo 1.8).

A. Williams e collaboratori hanno valutato l'espressione di molecole di membrana di monociti espianati da pazienti in shock settico, riscontrando una riduzione significativa di CD71 e HLA (Human Leukocyte Antigen)-DR. Pertanto detti autori hanno ipotizzato che in corso di shock settico viene indotta apoptosi del sistema monocito-macrofagico (13). Durante la sepsi, si osserva anche morte per apoptosi di linfociti e cellule epiteliali gastrointestinali, probabilmente indotta dal rilascio di glucocorticoidi

endogeni in seguito a stimoli stressanti.

Le cellule apoptotiche potrebbero inoltre indurre anergia dei linfociti T rendendoli incapaci di rispondere allo stimolo antigenico (14-16).

Un altro meccanismo implicato potrebbe riguardare lo shift verso citochine antinfiammatorie. I linfociti T-CD4 attivati secernono citochine con 2 distinti profili antagonisti. I linfociti T helper 1 (Th1) producono citochine infiammatorie, come TNF- α , INF- γ , e IL-2, mentre i linfociti T helper (Th2), citochine antinfiammatorie come IL-4 e IL-10. I fattori che determinano la risposta da parte dei linfociti T-CD4 in senso Th1 o Th2 non sono stati del tutto chiariti, ma possono essere influenzati dal tipo di agente patogeno, dalla quantità della carica batterica e dal sito di infezione. La capacità di esprimere un diverso profilo citochinico implica l'espressione di funzioni diverse. Le cellule Th1 sono in grado di attivare in modo massimale i monocito-macrofagi coinvolgendoli nei cosiddetti "fenomeni di ipersensibilità ritardata", nonché di indurre in tali cellule l'espressione di attività pro-coagulante e produzione di fattore tissutale in grado di iniziare nel microambiente capillare la cascata coagulativa fino alla deposizione di fibrina ed alla microtrombosi. Per contro, le cellule Th2 sono in grado di svolgere una maggiore attività di supporto alla sintesi di immunoglobuline (Ig), inducendo anche risposte di classe IgE ed IgG4; sono in grado di interagire

con mastociti e granulociti eosinofili, di cui guidano la maturazione, la differenziazione, l'attivazione, supportandone peraltro una prolungata sopravvivenza. Le cellule Th2 svolgono inoltre un' azione inibitoria sull'attivazione macrofagica indotta dalle cellule Th 1 e mediante la IL-10 inibiscono la produzione di IL-12.

I fattori che determinano la risposta da parte dei linfociti T-CD4 in senso Th1 o Th2 sono sconosciuti, ma possono essere influenzati dal tipo di agente patogeno, dalla quantità della carica batterica e dal sito di infezione. Le cellule mononucleate di pazienti con sepsi grave producono ridotte quantità di citochine Th1, ma livelli elevati di citochine Th2. E' stato dimostrato che lo shift verso la risposta Th2 è correlato in questi pazienti, ad un aumento della mortalità (17).

POTENZIALI MECCANISMI DI IMMUNOSOPPRESSIONE NELLA SEPSI:
- Shift da una risposta infiammatoria (Th1) verso una risposta antinfiammatoria (Th2)
- Anergia
- Apoptosi dei linfociti T-CD4, linfociti B, cellule dendritiche
- Perdita macrofagica dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) e di molecole co-stimolatorie
- Effetti immunosoppressori delle cellule apoptotiche

Tabella 2

1.4 La risposta immunitaria durante la sepsi.

Il tipo di risposta immunitaria durante la sepsi è determinato da numerosi fattori, quali la virulenza e la sede di ingresso del patogeno, le condizioni individuali preesistenti, lo stato nutrizionale e l'età del paziente, il polimorfismo genetico delle citochine o di altre molecole effettrici del sistema immunitario o dei loro recettori. Uno studio effettuato sulla milza prelevata dopo la morte di pazienti con sepsi ha dimostrato che maggiore è la durata della malattia, più importante sarà la perdita di linfociti B e linfociti T-CD4 (18).

Recentemente, è stata identificata l'high-mobility group 1 protein" (HMGB1) come un mediatore rilasciato in seguito al danno tissutale che può promuovere l'infiammazione, la risposta immunitaria e la rigenerazione dei tessuti nei mammiferi. HMGB1 è stata correlata alla letalità indotta da LPS nei topi e potrebbe fornire un indicatore di prognosi della sepsi (19). Come descritto nei paragrafi precedenti, nelle fasi iniziali della sepsi, la malattia è caratterizzata da una risposta infiammatoria esagerata cui segue in un secondo tempo uno stato di immunodepressione. La concentrazione dei mediatori circolanti dell'infiammazione può essere utile per determinare lo stadio della sepsi e per stabilire un' adeguata strategia terapeutica. Una strategia antinfiammatoria applicata precocemente in caso di risposta

immunitaria esagerata può apportare benefici, mentre durante la fase di immunodepressione, una terapia stimolante il sistema immunitario come ad esempio il trattamento con interferon- γ può migliorare la sopravvivenza (20).

1.5 Il CD40-CD154 nell'immunità cellulo-mediata.

L'interazione "cellula-cellula" gioca un importante ruolo nella regolazione della risposta immunitaria. Sono state identificate diverse molecole deputate a stabilire contatti intercellulari e indurre segnali co-stimolatori ed apoptotici.

Tra queste, il CD154 (CD40L) e il CD40 svolgono un ruolo di particolare rilievo. Il CD40L è espresso su linfociti T attivati mentre il CD40 è un recettore che si trova sulla membrana di linfociti B e macrofagi. I soggetti che presentano una mutazione del CD40L sviluppano una grave forma di immunodeficienza, denominata "sindrome da iper-IgM" (HIGM 1), che è caratterizzata da elevati livelli circolanti di IgM e da bassi livelli di IgA, IgG, IgE, dall'assenza di centri germinativi e dall'incapacità di fornire una risposta umorale timo dipendente (21). Come risultato, i pazienti HIGM1 sono suscettibili ad infezioni batteriche ricorrenti (22). Studi effettuati nei topi con l'utilizzo di anticorpi che bloccano l'interazione CD40-CD40L hanno indicato un ruolo primario di questo legame nella regolazione della proliferazione delle cellule B, nella produzione di immunoglobuline (Ig), nello switch isotipico delle Ig, nel salvataggio dei linfociti B dall'apoptosi, nella formazione di centri germinativi e nella produzione di linfociti B della memoria (23,24). Il ruolo dell'interazione CD40-CD40L nella regolazione

della risposta dei linfociti B è stato recentemente confermato in topi con deficit nell'espressione di CD40L(25). E' stata dimostrata l'importanza del CD40L sia nell'espansione clonale che nella delezione di linfociti B in vivo (26). Il CD40L espresso sui linfociti T attivati insieme con il Fas-ligando induce un'espansione clonale dei linfociti B che legano specifici antigeni; l'espressione del CD40L induce anche una delezione clonale dei linfociti B, i cui recettori siano stati desensibilizzati dalla stimolazione cronica con un antigene self o che siano sprovvisti di antigene. Il fatto che il CD40 non sia espresso esclusivamente sui linfociti B, ma anche su altre cellule presentanti l'antigene (APC), come le cellule del sistema monocito-macrofagico, suggerisce che l'interazione CD40-CD40L può influenzare le funzioni di altre cellule che esprimono il CD40 e svolgere quindi un ruolo importante nella risposta immunitaria T mediata sia nella fase iniziale che effettrice (27).

1.6 Regolazione dell'attività delle APC

Le interazioni tra i linfociti T e le APC sono necessarie per avviare una risposta immunitaria efficace (T-mediata). Numerose tipi cellulari hanno la capacità di presentare l'antigene, tra cui i linfociti B, i macrofagi, e le cellule dendritiche. Il modello più comune di attivazione dei linfociti T prevede la necessità di due distinti segnali. Il primo è dato dall'interazione tra il T cell receptor (TCR) e il complesso MHC/antigene sulla superficie delle APC, mentre il secondo è rappresentato da molecole co-stimolatorie come il CD80 (B7-1) e il CD86 (B7-2) sulla superficie delle APC che interagiscono con il CD28 presente sui linfociti T.

Talune APC, come i linfociti B quiescenti e i macrofagi, che esprimono costitutivamente bassi livelli di molecole co-stimolatorie, non sono APC competenti e richiedono, all'inizio, un'attivazione per aumentare l'attività co-stimolatoria e divenire cellule APC competenti. Il ruolo dell'interazione CD40-CD40L nella regolazione dell'attività co-stimolatoria dei linfociti B è stato dimostrato in vitro attraverso il blocco dell'espressione di CD80 e CD86, indotta dai linfociti T, con l'utilizzo di anticorpi anti-CD40L (28,29).

Recenti ricerche (30-33) hanno inoltre suggerito che il legame CD40-CD40L è importante per l'induzione dell'attività co-stimolatoria anche in

altri tipi di APC come, per esempio, i macrofagi e le cellule dendritiche, sottolineando l'importanza dell'interazione CD40-CD40L nell'attivazione di tutte le APC.

1.7 CD40-CD154 e le funzioni effettrici sui monocito–macrofagi

I macrofagi hanno un ruolo centrale nei processi infiammatori T-mediati: agiscono promuovendo la risposta infiammatoria e sono mediatori del danno tissutale. Inoltre, funzionano da APC per processare e presentare l'antigene ai linfociti T e come cellule effettrici uccidendo i microbi extracellulari e quelli fagocitati grazie alla produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno ed enzimi lisosomiali. L'attivazione di monocito-macrofagi è indotta da segnali generati dai linfociti T, compreso il legame del CD40 espresso sulla superficie dei monociti con il CD40L dei T. (34-36). L'interazione tra il CD40L, espresso dai linfociti T attivati ed il CD40 dei monocito-macrofagi, determina un'attivazione delle cellule monocito-macrofagiche che si concretizza nella produzione di citochine (IL-12 e TNF- α), nell'aumento di espressione di molecole co-stimolatorie (CD40, CD80, CD86) ed, in ultima analisi, nel corretto sviluppo della risposta immune umorale e cellulare. Dal momento che IL-12 è fondamentale per l'induzione e il mantenimento della risposta immunitaria di tipo Th1, così come per l'attivazione delle cellule natural killer (NK), è probabile che l'interazione CD40-CD40L svolga un importante ruolo nella risposta infiammatoria Th1 mediata nei confronti di patogeni intracellulari

Studi condotti su topi con deficit nell'interazione CD40-CD40L, dimostrano

un importante ruolo svolto da queste molecole nella difesa contro la *Leishmania major*. I protozoi del genere *Leishmania* sono parassiti intracellulari dei macrofagi e delle cellule dendritiche del cane, uomo ed altri animali selvatici. I topi deficitari erano incapaci di inibire la replicazione del parassita e sviluppavano lesioni ulcerative nel sito di infezione. Inoltre, i linfociti T prelevati da questi animali, mancavano del priming Th1 e della capacità di produrre IFN- γ (37).

1.8 Alterazioni indotte dalla sepsi sull'espressione di molecole co-stimolatorie

Durante la sepsi si assiste ad una “disfunzione” dei macrofagi che contribuisce a creare lo stato di immunodepressione riscontrato nelle fasi tardive della malattia. Questa alterazione è caratterizzata da una diminuita espressione delle molecole MHC di classe II e, come conseguenza, da una incapacità dei macrofagi di presentare l'antigene ai linfociti T. Tra le cause ipotizzate di questa disfunzione vi è la riduzione dell'espressione di molecole co-stimolatorie di membrana.

I recettori co-stimolatori coinvolti nella presentazione dell'antigene ai linfociti T includono il CD40, CD80 e il CD86. Le molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 hanno funzioni simili ma distinte. Durante la risposta immunitaria il CD86 è espresso precocemente sulle cellule dei tessuti linfatici primari. Al contrario, il CD80 è espresso più tardivamente sul sito dell'infiammazione. Il CD86 è presente costitutivamente sulle APC e la sua espressione aumenta velocemente durante la risposta all'infiammazione. Il CD86 è implicato nella risposta Th2 e se manca, non può essere sostituito dal CD80 per fornire il secondo segnale necessario per l'attivazione del linfocita T. Un altro importante recettore co-stimolatore espresso sui macrofagi è il CD40. Come evidenziato nei precedenti paragrafi,

l'interazione tra il CD40 e il CD40L, induce il priming e l'espansione clonale dei linfociti T-CD4, l'attivazione del segnale per l'espressione di molecole co-stimolatorie da parte dei macrofagi e la produzione di citochine. I ligandi di CD80 e CD86 sono CD28 e CTLA-4, entrambi espressi sulla superficie linfocitaria. In base al recettore con cui il CD80 e il CD86 interagiscono si avranno effetti opposti: legandosi al CD28 promuovono l'attivazione dei linfociti T; al contrario l'interazione con CTLA-4 produce un segnale inibitorio che provoca un rallentamento della proliferazione dei linfociti T. Modelli di sepsi sperimentale, indicano che la capacità di presentazione dell'antigene da parte dei macrofagi diminuisce dopo 24 ore dall'induzione della sepsi. Questa disfunzione dei macrofagi è già evidente dopo 1-4 ore dall'inizio della sepsi (38). L'incapacità di presentare l'antigene da parte dei macrofagi peritoneali in modelli animali rimane ad un livello inferiore rispetto al normale fino a 14 giorni dopo l'inizio della sepsi e diminuisce anche la capacità dei macrofagi di rilasciare le citochine. Infine in un'ulteriore studio, Gallinaro e collaboratori hanno osservato una diminuzione dell'espressione delle molecole MHC di classe II da parte dei monociti già dopo un giorno dall'inizio della sepsi (39).

1.9 Soppressione dell' IL-12 durante la tolleranza endotossinica in modelli sperimentali: perdita di cellule dendritiche e iporesponsività macrofagica

LPS è il maggior componente della membrana esterna dei batteri Gram negativi. LPS è un potente attivatore del sistema immunitario innato e svolge un ruolo importante nella patogenesi della sepsi da Gram negativi, che è caratterizzata da un rilascio patologico di mediatori pro-infiammatori, apoptosi dei linfociti e di cellule endoteliali fino alla coagulazione intravascolare disseminata (40). L'esposizione a LPS raramente provoca un'iperattivazione letale del sistema immunitario innato. Questo può essere spiegato in parte con il fenomeno della tolleranza a LPS, una diminuzione transitoria della risposta immunitaria dopo esposizione cronica all'endotossina. Si tratta di un fenomeno probabilmente adattativo di protezione da un'iperattivazione patologica del sistema immunitario innato durante le infezioni batteriche. Questo meccanismo se da una parte difende l'organismo dallo sviluppo di complicanze settiche, dall'altra può portare a infezioni letali. Tra i soggetti con sepsi molti di essi presentano alterazioni persistenti della funzionalità monocitica correlata con la tolleranza a LPS. I pazienti che presentano una bassa risposta infiammatoria cioè una soppressione immunitaria hanno un maggior rischio di morte per infezioni opportunistiche in ospedale. La tolleranza al lipopolisaccaride è stata

dimostrata sia in vivo che in vitro (41-43). Questa apparente tachifilassi verso LPS è stata correlata alla soppressione di citochine proinfiammatorie. Sebbene la produzione di un gran numero di citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-1 e IL-6) e citochine antinfiammatorie (IL-10) sia soppressa, la produzione di altri mediatori (IL-1RA) rimane inalterata. Questa osservazione ha condotto al concetto che la tolleranza a LPS rappresenta una “riprogrammazione” dei macrofagi come risposta adattativa all’infezione batterica (44). E’ chiaro che la tolleranza indotta da LPS fa parte di un fenomeno più generale di riprogrammazione dei monocito-macrofagi dopo l’attivazione. Effetti simili a quelli indotti da LPS sono stati osservati in altri prodotti batterici [lipopeptidi attivanti macrofagi, 2kDa (MALP-2)] e mediatori endogeni pro-infiammatori (IL-1, TNF- α). Oltre i monocito-macrofagi, altre cellule responsive a LPS manifestano il fenomeno della tolleranza. A questo riguardo la probabile rilevanza in vivo delle alterazioni indotte da prodotti batterici sulla funzione delle cellule dendritiche è divenuta chiara di recente. IL-12 è una citochina immunoregolatrice fondamentale per l’organizzazione della risposta immune cellulo-mediata sia del sistema innato che acquisito. E’ prodotta in gran parte dai monocito-macrofagi e dalle cellule dendritiche ed è importante per la difesa da numerosi patogeni. LPS è un potente induttore della secrezione dell’IL-12. La produzione di IL-12 viene soppressa durante la tolleranza a LPS. Questo

fenomeno è correlato con l'aumentata incidenza di infezioni batteriche durante la sepsi (45). Il meccanismo della tolleranza e della soppressione immunologica rimangono tuttavia oscuri. E' stato ipotizzato il coinvolgimento di mediatori solubili, alterazioni nell'espressione e nella funzione dei recettori di LPS, alterazione nella trasduzione del segnale indotta da LPS, alterazioni della trascrizione e della traduzione e stabilità del mRNA. La soppressione di IL-12 durante la tolleranza al lipopolissaccaride in modelli murini ha dimostrato che si tratta di un fenomeno multifattoriale che coinvolge la delezione e l'alterazione di DC CD11c^{high} spleniche e la diminuzione della responsività macrofagica e delle DC spleniche rimanenti. Non è stato tuttavia dimostrato nessun coinvolgimento dei linfociti B o T né per i mediatori solubili, IL-10, TNF- α , IFN- $\alpha\beta$ o NO o membri della famiglia NF- κ B quali p50, p52 o RelB (46).

**2. ATTIVITA' DI RICERCA SVOLTE DALLA DOTT.SSA ANNA SINISTRO
NELL' AMBITO DELLO STUDIO DEI MECCANISMI DI
IMMUNOSOPPRESSIONE IN CORSO DI SEPSI.**

Le attività di ricerca della Dott. ssa Sinistro relative ai meccanismi di immunosoppressione in corso di sepsi si sono concentrate essenzialmente sul ruolo del sistema monocito-macrofagico attraverso lo studio prima su cellule prelevate da donatori sani trattate in vitro con LPS e poi in pazienti con sepsi da Gram-negativi della risposta dei monocito-macrofagi alla stimolazione con CD40L.

2.1 Introduzione al lavoro sperimentale

Da quanto riportato nel capitolo precedente, si evince con chiarezza il ruolo fondamentale svolto dalle cellule del sistema monocito-macrofagico nel funzionamento del sistema immunitario, sia innato che acquisito. E' inoltre evidente che durante la sepsi i monocito-macrofagi presentano numerosi deficit della loro capacità funzionale e del loro fenotipo di membrana e citochinico che, si ritiene, contribuiscono in maniera determinante alla patogenesi della sepsi. L'individuazione di tutte le possibili alterazioni funzionali che queste cellule possono sviluppare durante la sepsi, così come la definizione dei meccanismi che ne sono alla base, riveste un'importanza fondamentale per la messa a punto di appropriate strategie terapeutiche

In una prima fase sperimentale del lavoro, il nostro Gruppo di Ricerca ha dimostrato che monocito-macrofagi prelevati da donatori sani stimolati in vitro con LPS (0.1 µg/ml) presentavano un'alterazione del fenotipo citochinico ovvero LPS era in grado di modificare la produzione di citochine in queste cellule stimulate con il CD40L, riducendo la sintesi di TNF- α e IL-12 e aumentando la produzione di IL-10. Inoltre nei nostri esperimenti preliminari, LPS si è dimostrato in grado di ridurre l'espressione di membrana di monocito-macrofagi stimolati con CD40L di

molecole costimolatorie (CD80, CD86 e HLA-DR) e di interferire nell'espressione CD40L-indotta di CD25, CD80 e CD86 in linfociti B e quindi di interferire con le funzioni di APC di queste cellule (47).

Sulla base di queste evidenze, abbiamo ipotizzato che la tolleranza al CD40L in vitro, possa essere considerata un modello di alterazione monocitaria che si osserva durante lo stato di immunosoppressione nella sepsi.

Questi risultati ci hanno spinto a valutare i medesimi aspetti di immunosoppressione in monocito-macrofagi di pazienti settici ricoverati nella terapia intensiva del Policlinico di Roma "TorVergata".

Tale ricerca sarà oggetto di questa tesi.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Sono stati arruolati pazienti, in modo prospettico, se rispondevano ai seguenti *criteri d'inclusione*:

1) evidenza microbiologica d' infezione da Gram-negativi, accompagnata dai criteri necessari a formulare la diagnosi di SIRS in modo da configurare insieme il quadro di SEPSI.

Criteri SIRS:

- temperatura corporea $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$;
- frequenza cardiaca > 90 battiti/minuto;
- frequenza respiratoria > 20 atti/minuto (o $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$) o ventilati meccanicamente;
- conta leucocitaria $> 12000/\mu\text{l}$ o $< 4000/\mu\text{l}$.

2) quadro di SEPSI GRAVE ovvero presenza di sepsi con ipoperfusione o disfunzione d'organo:

- ipoperfusione d'organo: aumentati livelli plasmatici di lattati, oliguria, anomalie della circolazione periferica e alterazioni acute dello stato mentale

- disfunzione d'organo: CID, ARDS, iperbilirubinemia, insufficienza renale acuta.

I *criteri d'esclusione* sono stati i seguenti:

- età < 18 anni;
- HIV, immunodepressione, trapianto;
- neoplasia metastatica o ematologica;
- gravidanza;
- insufficienza renale cronica con necessità di dialisi;
- shock settico.

E' stato scelto un *gruppo di controllo* che fosse paragonabile a quello dei pazienti per numero, età e rapporto maschi/femmine.

3.2 Cellule

Le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità. I monocito-macrofagi sono stati successivamente purificati mediante centrifugazione contro-corrente.

Le cellule sono state risospese in terreno per colture cellulari (RPMI 1640) contenente 2mM di glutamina, 50U/mL di penicillina, 50µg/ml di streptomycina e siero fetale bovino al 10% inattivato al calore con aggiunta di Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF, 100UI).

Per la stimolazione è stato utilizzato CD40L (500ng/ml) trimerico ricombinante.

3.3 Anticorpi

Per l'analisi al citofluorimetro (FACS) sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD14, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-IL12, anti-TNF α , anti-IFN γ e anti-CD3.

3.4 Citofluorimetria

La produzione intracellulare di citochine (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e l'espressione di membrana di CD40, CD80 e CD86 sono state valutate al FACS mediante anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi.

Alla fine del periodo d'incubazione le cellule sono state centrifugate, lavate in tampone fosfato (PBS), fissate in paraformaldeide al 4% e dopo un ulteriore lavaggio, risospese in saponina 0,1% e marcate con gli anticorpi per 30 minuti.

Le cellule sono state quindi lavate una volta in saponina 0,1% e la successiva in saponina 0,01%, risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro .

Per valutare l'espressione di molecole di membrana invece le cellule alla fine del periodo d'incubazione sono state lavate in PBS e incubate per 15 minuti con gli anticorpi e dopo due ulteriori lavaggi sono state risospese in PBS e valutate al citofluorimetro.

I linfociti e i monocito-macrofagi sono stati differenziati dalle cellule morte sulla base dei valori di forward scatter e side scatter e sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi per ogni campione.

L'autofluorescenza è stata valutata attraverso dei campioni controllo senza anticorpi monoclonali

3.5 Stimolazione cellulare

Per valutare le differenze fra controlli sani e pazienti settici nella produzione intracellulare di citochine (IL-12 e TNF- α) e nell'espressione di molecole di membrana (CD40, CD86 e CD80) da parte dei monocito-macrofagi, le cellule sono state lasciate ad incubare con GM-CSF per 48 ore in piastre da 96 pozzetti quindi stimulate con il CD40L con l'aggiunta nel primo caso di 1 μ g di Brefeldina A che impedisce la fuoriuscita dalle cellule del materiale presente nel reticolo endoplasmatico e il giorno seguente marcate con gli anticorpi specifici.

In un altro set di esperimenti, per valutare l'attivazione dei linfociti T mediante espressione di IFN- γ , le cellule (monociti e linfociti) espianate da donatori sani e da pazienti settici sono state stimulate con il CD40L con l'aggiunta di Brefeldina A e sono state lasciate ad incubare per 72 ore e quindi sono state marcate con anticorpi anti CD3 e anti IFN- γ .

Infine in ulteriori esperimenti, condotti al fine di verificare l'attivazione linfocitaria in seguito a stimolazione con CD3/CD28, 50 μ l di CD3 per ogni pozzetto della piastra, alla concentrazione di 10 μ g/ml, sciolto in tampone TRIS-HCL a pH 8, è stato lasciato ad incubare a 4°C per 12 ore.

Il giorno seguente sono state aggiunte le cellule che sono state stimulate con il CD28 alla concentrazione di 10 μ g/ml e dopo l'aggiunta di Brefeldina A

sono state lasciate ad incubare per ulteriori 24 ore prima della marcatura con anticorpi anti-IFN γ e anti-CD3 e dell' analisi al FACS .

3.6 Analisi statistica dei dati

Tutti i dati numerici sono espressi come media \pm errore standard delle medie.

È stata utilizzata l'analisi statistica parametrica mediante "t test di Student" a due code.

Il livello di significatività è stato fissato per $P < 0.05$.

4.RISULTATI

4.1 Pazienti

Sono stati arruolati 20 pazienti con sepsi da Gram-negativi dei quali 15 presentavano un quadro di SEPSI GRAVE e 5 uno di SEPSI non complicata.

Dall'analisi dei dati appartenenti a ciascuno di loro è apparso quanto segue:

Età	65,7±10
Rapporto M/F	8/12
Accettazione medica	5 pazienti
Accettazione chirurgica	15 pazienti
Mortalità attesa	42,4%
Mortalità effettiva	40%
SOFA (medio)	8
Emocolture positive	12

FOCOLAIO SETTICO	N° PAZIENTI
Polmone	5
Addome	4
Sangue	3
Cute e tessuti molli	2
Vie biliari	2
Ferita chirurgica	2
Rene	1
Non identificato	1

4.2 Rilevanza clinica dell'immunosoppressione del paziente settico

Pazienti entrati in Terapia Intensiva per sepsi hanno sviluppato una media di 3 episodi infettivi in 60 giorni di degenza in contrasto, per esempio, con i **pazienti ricoverati per trauma cranico** che hanno avuto una media di meno di 1 episodio infettivo ciascuno in 60 giorni di ricovero.

4.3 I monocito-macrofagi di pazienti settici rispondono in maniera alterata alla stimolazione con CD40L

I macrofagi dei pazienti settici in seguito alla stimolazione con CD40L hanno prodotto minor quantità di citochine rispetto alle cellule dei controlli sani. In particolare, abbiamo osservato come si sia ridotta significativamente la produzione di tutte e due le citochine studiate (figure 1 e 2).

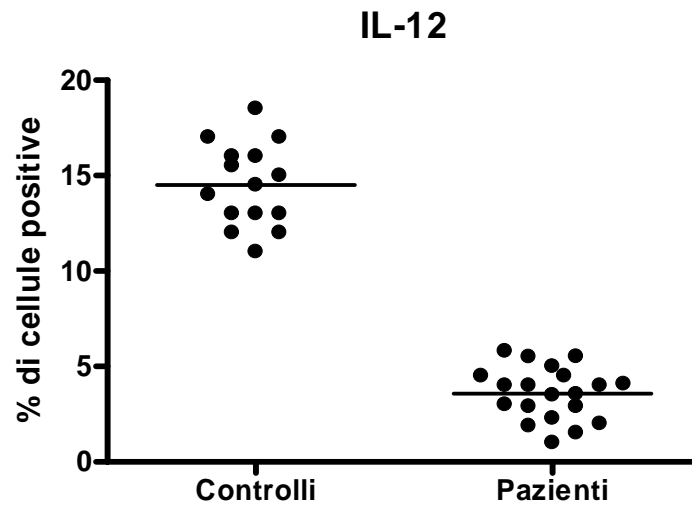
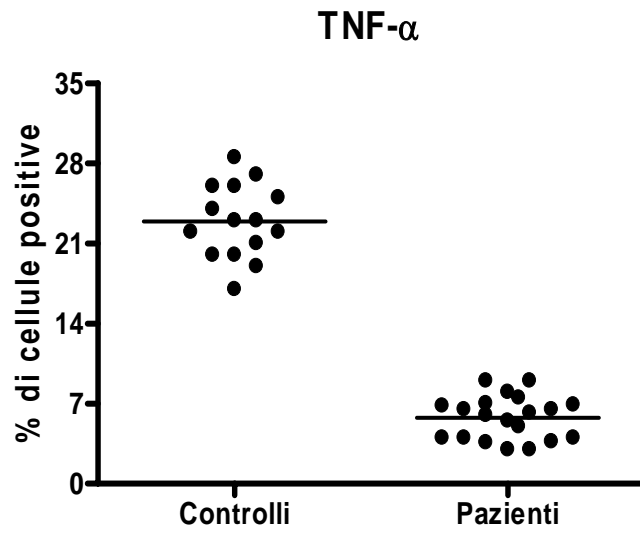
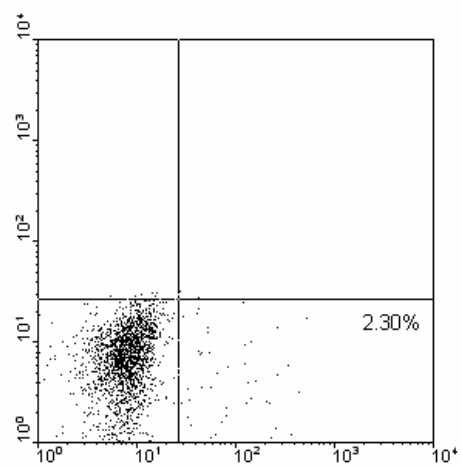
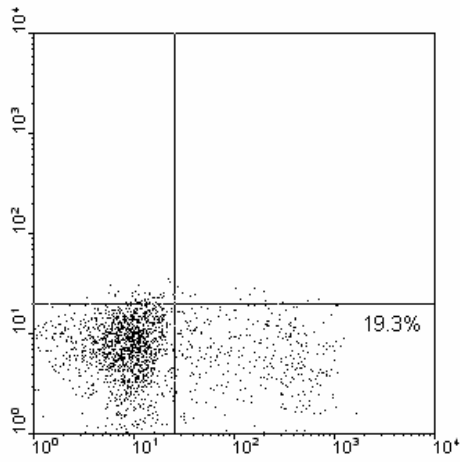


Figura 1: Nei monocito-macrofagi di pazienti settici , stimolati con il CD40L si ha una riduzione nella produzione di citochine pro-infiammatorie

CONTROLLI

PAZIENTI

TNF- α



IL-12

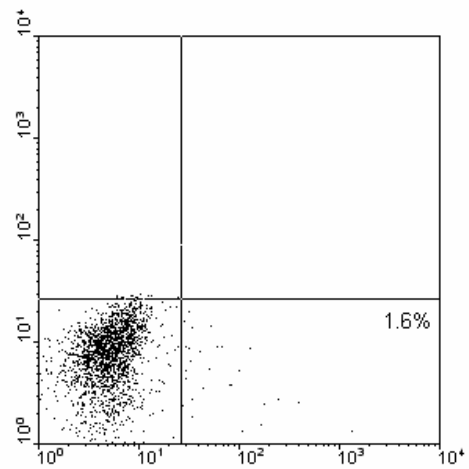
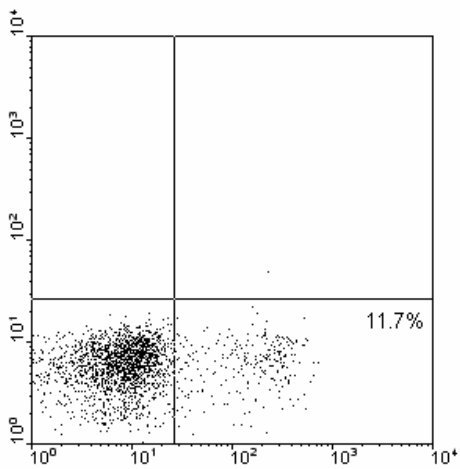


Figura 2: Produzione di TNF- α e IL-12 da parte di monocito-macrofagi espiantati da soggetti con sepsi e da controlli sani.

4.4 Nei monocito-macrofagi di pazienti settici si ha riduzione nell' espressione di molecole co-stimolatorie

E' ben noto che l'azione del CD40L sui monocito-macrofagi consiste, oltre che nell'induzione della sintesi di citochine, anche nel promuovere l'espressione di membrana di determinate molecole. Alcune di queste molecole come il CD80, il CD86 e CD40 rivestono una particolare importanza in quanto dotate della capacità di contribuire all'attivazione dei linfociti T mediante l'interazione con recettori specifici presenti su queste cellule (funzione APC dei monocito-macrofagi).

Data questa premessa, in questi esperimenti (figure 3 e 4) si è voluto verificare se nei pazienti settici si ha modificazione della capacità di CD40L di promuovere l'espressione di CD80, il CD86 e CD40 su monocito-macrofagi. Le cellule prelevate da pazienti con sepsi hanno presentato una grave riduzione della capacità di rispondere alla stimolazione con CD40L per quanto riguarda l'espressione di molecole co-stimolatorie, rispetto a monocito-macrofagi espianati da donatori sani.

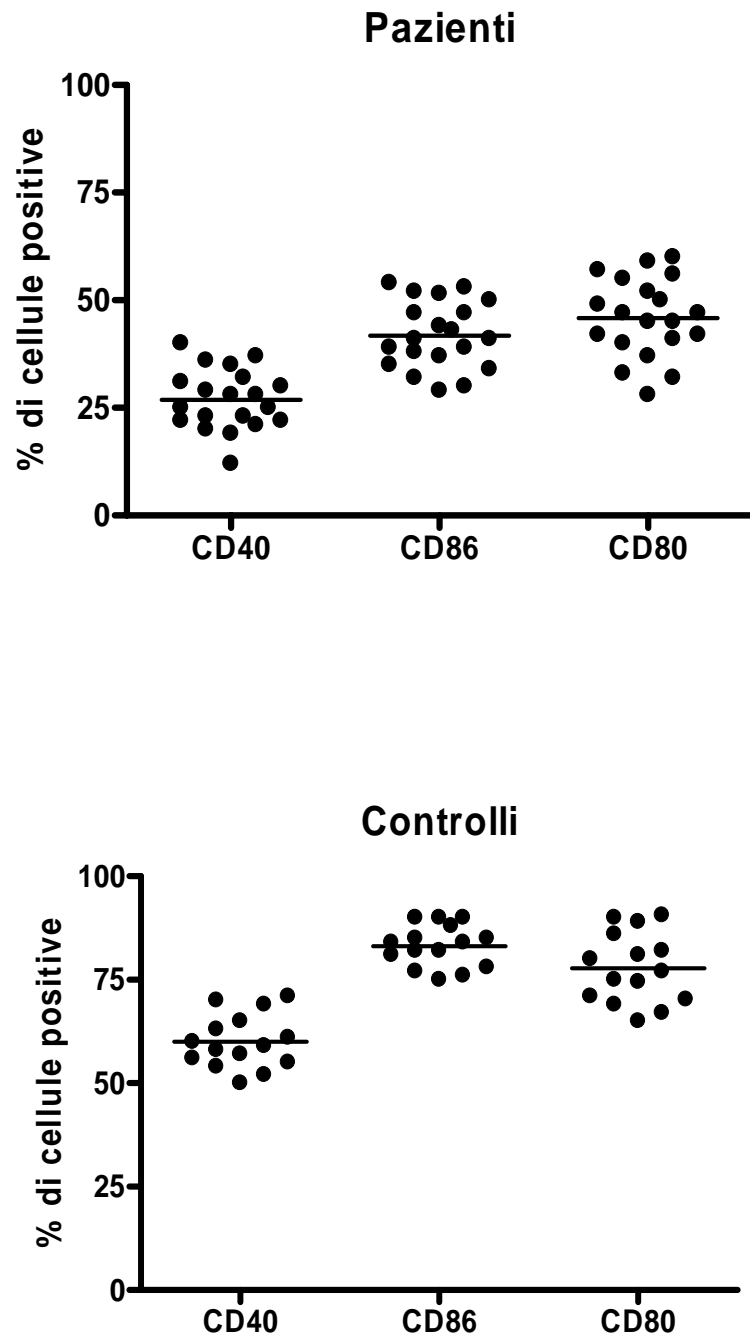


Figura 3: Riduzione dell'espressione di molecole co-stimolatorie in pazienti settici.

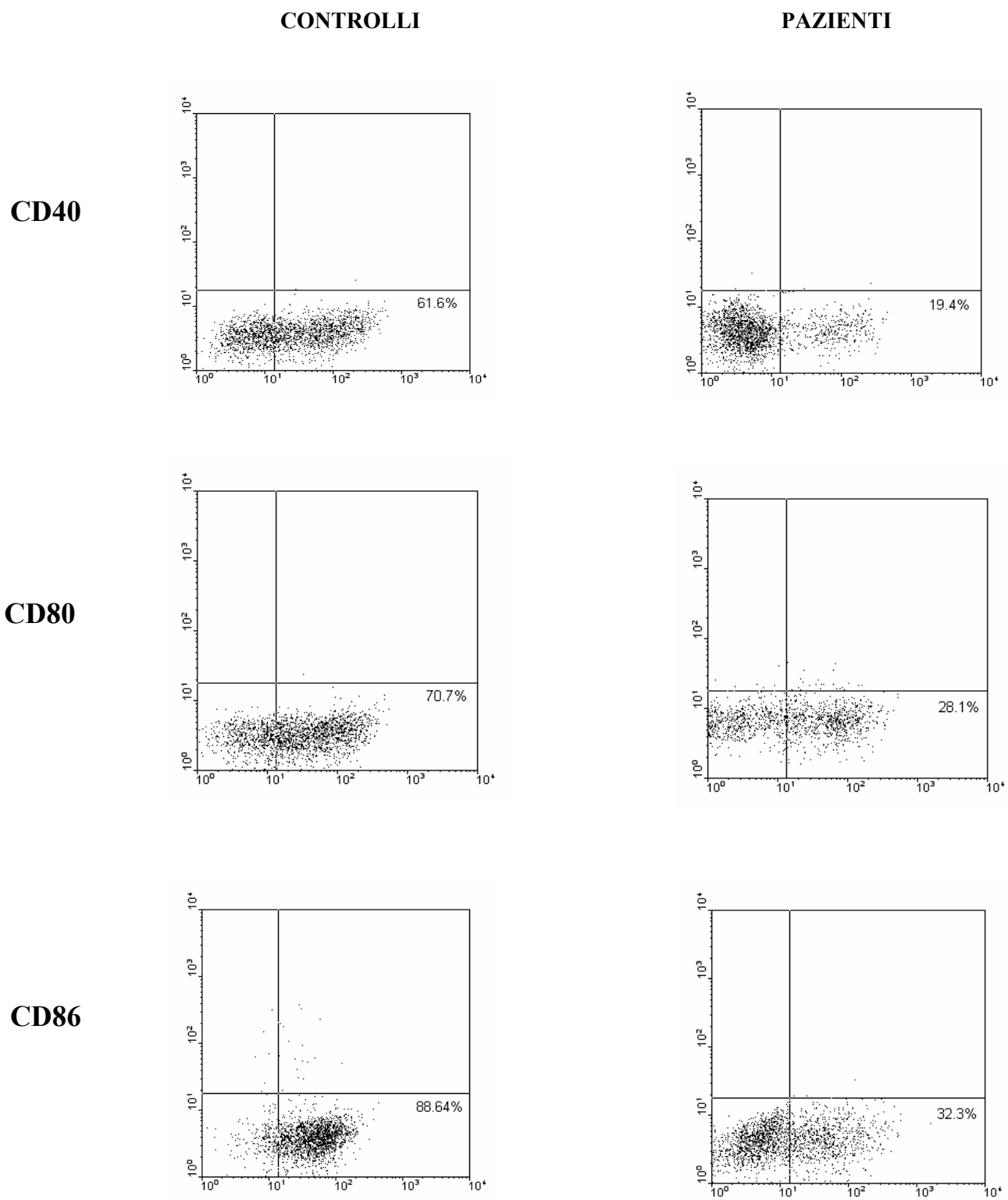


Figura 4: Espressione di CD40,CD80,CD86 in monocito-macrofagi prelevati da soggetti con sepsi e controlli sani.

4.5 I monocito-macrofagi dei pazienti settici presentano alterazione nella loro funzione di APC

Come visto precedentemente nella parte introduttiva l'interazione fra le cellule T e le APC determina segnali stimolatori che sono importanti nella attivazione di specifiche cellule T e nella regolazione e attivazione di molecole autoreattive

A tale proposito, in questo ulteriore set di esperimenti abbiamo valutato l'attivazione dei linfociti T mediante espressione di IFN- γ .

Come mostrato in figura 5, le cellule T di pazienti settici hanno prodotto una quantità di IFN- γ significativamente inferiore a quella dei donatori sani. Di conseguenza, si può ipotizzare che anche la capacità di co-stimolazione dei linfociti T da parte dei macrofagi prelevati da pazienti con sepsi è gravemente compromessa rispetto a quella osservata nei macrofagi ottenuti da soggetti sani.

4.6 La funzionalità dei linfociti T non si modifica in corso di sepsi

I linfociti T dei pazienti settici, se stimolati oltre che con il CD3 anche con CD28, che sostituisce CD80 e CD86 nella co-stimolazione, dimostrano una funzionalità, valutata in termini di produzione di IFN- γ , del tutto normale, come mostrato in figura 6. Quest'ultimo dato suggerisce che l'alterazione funzionale dei macrofagi del paziente settico sia specifica e non dovuta ad una generale tossicità cellulare legata alla sepsi stessa

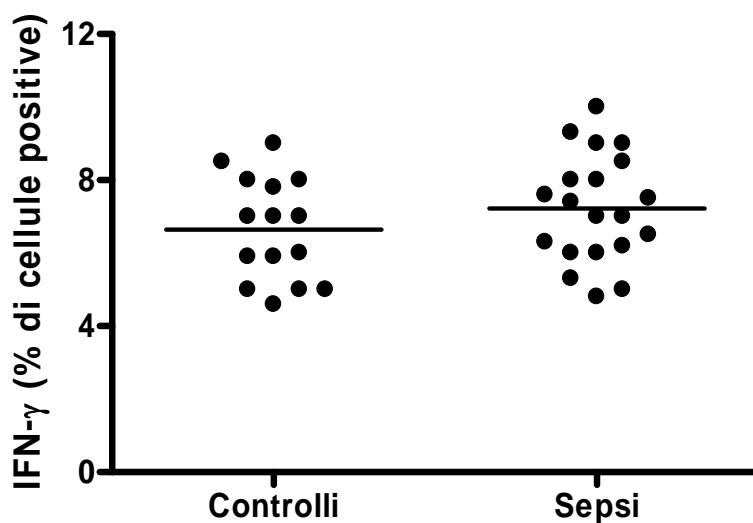


Figura 6: Produzione di IFN- γ da parte di linfociti T stimolati con CD3/CD28.

5. DISCUSSIONE

L'attivazione del linfocita T e la maturazione del macrofago a cellula presentante l'antigene necessitano dei segnali intracellulari innescati dal legame CD40-CD40L.

In questo lavoro abbiamo valutato l'influenza che i fenomeni fisiopatologici caratteristici della sepsi hanno sulla risposta del macrofago al CD40L e come questa influenza possa essere una delle cause dell'immunosoppressione del paziente settico.

La ridotta risposta macrofagica del paziente settico allo stimolo con CD40L si manifesta sia in termini di produzione di IL-12 e TNF- α che di espressione di membrana di CD40, CD80 e CD86 che sono risultate significativamente inferiori se confrontate a quelle dei macrofagi dei controlli sani.

Questo meccanismo di alterata risposta immunitaria si è verificato sia in sepsi non complicate che gravi.

Il legame CD40-CD40L si è dimostrato essenziale all'attivazione del linfocita T, infatti i linfociti messi in coltura con macrofagi di pazienti settici che non avevano espresso le molecole co-stimolatorie di membrana, in seguito al legame con il CD40L, hanno prodotto una quantità di IFN- γ significativamente inferiore a quella prodotta dai linfociti messi in coltura

sempre con macrofagi di pazienti settici ma stimolati anche con anticorpi anti-CD28 che sostituivano CD80 e CD86 nella co-stimolazione. Questo dato ci ha consentito di rafforzare l'importanza della mancata risposta al CD40L come motivo di immunosoppressione ed inoltre ha dimostrato che il linfocita T del paziente settico, se stimolato in maniera simile a quella fisiologica, risponde in modo ottimale.

I nostri lavori in vitro e in vivo trovano sostegno nella recente letteratura, K. Sugimoto e collaboratori hanno riscontrato una correlazione inversa tra espressione del CD40 e mortalità di pazienti settici (48).

S.B. Flohé e collaboratori, inducendo sepsi in cavie tramite legatura del cieco e puntura dello stesso, hanno documentato una riduzione della capacità delle cellule dendritiche provenienti dalla milza, di produrre IL-12 dopo stimolo con CD40L (49).

In un esperimento simile S. Newton e la sua equipe hanno dimostrato che l'espressione di CD86 ma non quella di CD40 e CD80 risulta ridotta su macrofagi peritoneali di cavie settiche (50).

L'ampio numero di pazienti arruolati nel nostro studio ci consente, oltre alla verifica della alterata risposta al CD40L anche di considerare che i degenti ricoverati per sepsi hanno avuto in sei mesi di ricovero una media di tre episodi infettivi, spesso dovuti a batteri diversi e comunque caratteristici del paziente immunocompromesso, mentre altre categorie di pazienti, quali

quelli ricoverati per trauma cranico, ne hanno avuto in media, meno di uno ciascuno.

Questo dato clinico è in linea con la letteratura e conferma l'effetto di importante immunosoppressione legato ai meccanismi fisiopatologici della sepsi.

6.CONCLUSIONE

I dati presentati in questo lavoro mettono in evidenza, per la prima volta, la presenza in corso di sepsi di una alterazione della trasduzione del segnale mediato dal CD40 che condiziona la possibilità da parte delle cellule monocito-macrofagiche di rispondere con appropriatezza alla stimolazione da parte del CD40L. I risultati di questo lavoro possono contribuire in maniera sostanziale a definire i meccanismi che sono alla base dell'immunosoppressione in corso di sepsi e fornire possibili indicazioni per eventuali interventi di tipo terapeutico.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.*31(4):1250-6.

2. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, et al. 1998. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet.*351:929-33.

3. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, et al. National Vital Statistics Reports [serial online], 21 September 2001
[http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr49/nvsr49_08.pdf], accessed 1 October 2002.

4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine. *Chest.*101:1644-55.

5. Marik PE, Varon J. 1998. The hemodynamic derangement in sepsis: implication for treatment strategies. *Chest.*114(3):854-60.

6. Volk HD, Reinke P, Docke WD. 2000. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol.*74:162-77

7. Blackwell T, Christman J. 1996. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.*77:110-17.

8. O'Dwyer MJ, Mankan AK, O'Connell B, et al. 2006. The occurrence of severe sepsis and septic shock are related to distinct patterns of cytokine gene expression. *Shock.* 26(6):544-50

9. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. 1996. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun.* 64:4733-38
10. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. 1999. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock.* 11:153-9.
11. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. 2001. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock.* 16:83-96.
12. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. 1995. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 85(5):1341-7
13. Williams MA, Withington S, Newland AC, et al. 1998. Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo. *J Infect Dis.* 178(5):1421-33.
14. Green DR, Beere HM. 2000. Apoptosis: gone but not forgotten. *Nature.* 405:28-29.
15. Voll RE, Hermann M, Roth EA, et al. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 390:350-1.
16. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, et al. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 405:85-90.

17. Iwasaka H, Noguchi T. 2004. Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Nippon Rinsho*. 62(12):2237-43
18. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 166:6952-63
19. Parrish W, Ulloa L. 2007. High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Mol Biol*. 361:145-62
20. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 3(6):678-81.
21. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow W, et al. 1993. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*. 14:559-64.
22. Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. 1992. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodeficiency Rev*. 3:101-22.
23. Clark LB, Foy TM, Noelle RJ. 1996. CD40 and its ligand. *Adv Immunol*. 63:43-78.
24. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, et al. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand gp39. *Annu Rev Immunol*. 14:591-617.

25.Renshaw BR, Fanslow WC, Armitage RJ, et al. 1994. Humoral immune responses in CD40 ligand- deficient mice. *J Exp Med*.180:1889-900.

26.Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, et al..1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)- ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*.87:319-29.

27.Grewal IS, Flavell RA. 1996. CD40-CD40L interactions in T cell activation. *Immunol Rev*.153:85-106 .

28.Wu Y, Xu J, Shinde S, et al. 1995. Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40 ligand. *Curr Biol*.5:1303-11.

29.Buhlmann JE, Foy TM, Aruffo A, et al. 1995. In the absence of a CD40 signal, B cells, are tolerogenic. *Immunity*.2:645-53.

30.Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*.180:1263-72.

31.Magott-Procelewska M. 2004. Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells. *Ann Transplant*.9(3):13-8

32.Hasse C, Michelsen BK, Jorgensen TN. 2004. CD40 is necessary for activation of naïve T cells by a dendritic cell line in vivo but not in vitro. *Scand J Immunol*. 59(3):237-45

33.Laning JC, Deluca JE, Isaac, et al. 2001. In vitro analysis of CD40-CD154 and CD28-CD80/86 interactions in the primary T-cell response to allogeneic "nonprofessional" antigen presenting cells. *Transplantation*.71(10):1467-74

34.Grewal IS, Xu J, Flavell RA. 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*.378:617-20.

35.Borrow P, Tishon A, Lee S, et al. 1996. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8⁺ CTL response. *J Exp Med*. 183:2129-42.

36.Stout R, Sutles J, Xu J, et al. 1996. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol*. 156:8-11.

37.Kamanaka M, Yu P, Yasui T, et al. 1996. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity*.4:275-81.

38.Ayala A, Urbanich MA, Herdon CD et al. 1996. Is sepsis-induced apoptosis associated with macrophage dysfunction? *J Trauma*.40:568-573

39.Gallinaro RN, Naziri W, McMasters KM, et al. 1994. Alteration of mononuclear cell immune-associated antigen expression, interleukin-1 expression, and antigen presentation during intra-abdominal infection. *Shock*.1:130-134.

40. Morrison DC, Ryan JL. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev.*38:417- 432
41. Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK, et al. 1990. Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am J Pathol.*136(1):49-60.
42. Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, et al. 2001. Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. *Immunol Res.*24:273-287
43. Mengozzi M, Ghezzi P. 1993. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. *Eur Cytokine netw.*4:89-98
44. Shnyra A, Brewington R, Alipio A, et al. 1998. Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. *J Immunol.*160:3729-36.
45. Wittmann M, Larsson VA, Schmidt P, et al. 1999. Suppression of interleukin-12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. *Blood.* 94:1717-26.
46. Karp CL, Wysocka M, Ma X, et al. 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol.* 28(10):3128-36.

47. Sinistro A, Ciaprini C, Natoli S, et al. 2007. Lypopolysaccharide desensitizes monocytes-macrophages to CD40L stimulation. *Immunology*.122(3):362-70.
48. Sugimoto K, Galle C, Preiser JC, et al. 2003. Monocyte CD40 expression in severe sepsis. *Shock*.19:24-27.
49. Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, et al. 2006. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukocyte Biol*.79:473-481.
50. Newton S, Ding Y, Chung CS, et al. 2004. Sepsis induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. *Surg Infect*.5:375-383.