



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
METODOLOGIE IN MEDICINA PREVENTIVA E TERAPIA**

XXI CICLO

***Riduzione della risposta monocitica al CD40L in corso
di sepsi***

A.A. 2008/2009

Tutor: Prof. Alberto Bergamini

Dottoranda: Dott.ssa Silvia Natoli

Coordinatore: Prof. Giovanni Rocchi

Indice

Introduzione	3
La sepsi: rilevanza clinica	3
Fisiopatologia	8
Inflammazione	10
Immunoparalisi	10
Ruolo della risposta immunitaria nella sepsi	14
Ruolo della tolleranza monocitica e della IL-12	16
Ruolo dell'immunità linfocito-mediata	17
Interazione CD40-CD40L (CD154) nell'immunità cellulo- mediata	18
Introduzione al lavoro sperimentale	21
Materiali e metodi	23
Risultati	27
Discussione	31
Conclusioni	34
Figure	35
Bibliografia	41

Introduzione

La sepsi: rilevanza clinica

La sepsi è una sindrome complessa che si configura in seguito alla interazione tra un organismo infettante ed il sistema immunitario dell'ospite infettato. L'invasione di tessuti o fluidi del corpo normalmente sterili da parte di un micro-organismo patogeno o potenzialmente patogeno genera nei soggetti immuno-competenti una reazione infiammatoria il cui scopo è quello di marginare il patogeno infettante e di eradicarlo. Le circostanze in cui questa interazione avviene (tipo di patogeno, carica del patogeno e sito di infezione, patologie concomitanti, predisposizione genetica, età e sesso dell'organismo infettato) possono determinare un'intensità diversa della risposta infiammatoria che, sfuggendo dai meccanismi omeostatici locali, diventa una risposta infiammatoria sistemica (SIRS : systemic inflammatory response syndrome). Esistono però situazioni in cui le caratteristiche cliniche o bio-umorali della SIRS si riscontrano in assenza di un processo infettivo scatenante, ad esempio in caso di pancreatite, ustioni o traumi estesi. E' sembrato quindi importante definire la sepsi e le sue diverse manifestazioni cliniche, poiché il trattamento della SIRS infettiva differisce dalle cause di SIRS, in primo luogo nell'uso o meno di molecole antibiotiche, il cui abuso è causa di aumento di costi per la sanità pubblica e di morbidità ed aumento dei tempi di ospedalizzazione per il paziente.

Già nel 1991 si è sentita la necessità di definire clinicamente la risposta infiammatoria sistemica, indipendentemente dalla causa scatenante, come la presenza concomitante di 2 o più delle seguenti condizioni cliniche¹:

- temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$;
- frequenza cardiaca >90 battiti/min;

- iperventilazione con frequenza respiratoria >20 atti/min o PaCO₂<32 mmHg;
- conta di globuli bianchi >12000 cellule μ L⁻¹ o <4000 μ L⁻¹.

Nella stessa sede si definiva la “sepsi” come la risposta infiammatoria sistemica scatenata da un'infezione, accertata o presunta, la “sepsi severa” come sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione e lo “shock settico” come sepsi associata ad ipotensione arteriosa refrattaria al riempimento fluidico.

Questo concetto di SIRS e sepsi è stato globalmente adottato da clinici e ricercatori di tutto il mondo ed attualmente rappresenta lo standard di definizione nei trial clinici. Tuttavia le crescenti nozioni cliniche e laboratoristiche hanno ampliato questa definizione “scarna” di risposta infiammatoria sistemica, arricchendo i criteri diagnostici sopra esposti, rendendo quindi più accessibile la diagnosi clinica.²

TABELLA 1. Criteri diagnostici della sepsi

<p>INFEZIONE</p> <p>Documentata o sospetta + uno dei seguenti parametri</p>
<p>PARAMETRI GENERALI</p> <p>Febbre (temperatura centrale > 38,3°C)</p> <p>Ipotermia (temperatura centrale < 36°C)</p> <p>Frequenza cardiaca > 90 bpm o > 2SD del valore normale per età</p> <p>Tachipnea > 30 bpm</p> <p>Alterato stato mentale</p> <p>Edema significativo o bilancio fluidico positivo (> 20 ml/Kg in 24 ore)</p> <p>Iperglicemia (glucosio plasmatico > 110 mg/dl in assenza di diabete)</p>
<p>PARAMETRI INFIAMMATORI</p> <p>Leucocitosi (conta globuli bianchi > 12.000/mm³)</p>

<p>Leucopenia (conta globuli bianchi < 4.000/ mm³)</p> <p>Conta leucocitaria normale con > 10% forme immature</p> <p>Proteina C reattiva > 2SD valore normale</p> <p>Pro-calcitonina > 2 SD valore normale</p>
<p>PARAMETRI EMODINAMICI</p> <p>Ipotensione arteriosa (PAM < 70 mmHg)</p> <p>Saturazione sangue venoso misto > 70%</p> <p>Indice cardiaco > 3.5 L/min/m²</p>
<p>PARAMETRI DI DISFUNZIONE D'ORGANO</p> <p>Ipossiemia arteriosa (PaO₂/FiO₂ < 300)</p> <p>Oliguria acuta (diuresi < 0,5 ml/kg/h)</p> <p>Aumento creatininemia (≥ 0,5 mg/dl)</p> <p>Anomalie emocoagulative (INR < 1,5 o aPTT < 60 sec)</p> <p>Ileo paralitico (assenza rumori peristaltici)</p> <p>Trombocitopenia (conta piastrinica < 100.000/ mm³)</p> <p>Iperbilirubinemia (bilirubina totale > 4 mg/dl)</p>
<p>PARAMETRI DI PERFUSIONE TISSUTALE</p> <p>Iperlattatemia (> 3 mmol/L)</p> <p>Ridotto tempo di riempimento capillare o mazzatura cute</p>

La sepsi rappresenta dunque una sindrome clinica complessa cui si associano una morbilità ed una mortalità significative. Inoltre è opinione prevalente che questo “problema sanitario” sia ampiamente sottostimato e scarsamente riconosciuto. Studi epidemiologici stimano che negli Stati Uniti circa 750.000 persone siano affette da sepsi severa ogni anno, con una mortalità che varia dal 20% per la sepsi al 50% per lo shock settico.³ Su più di 6,5 milioni di ricoveri ospedalieri, il 2,9% sviluppa una forma di sepsi severa. Negli Stati Uniti, nel 2001, le morti per sepsi sono state 32.000.⁴ I dati italiani

sono meno aggiornati, ma altrettanto impressionanti: nello studio di Salvo et al, pubblicato nel 1995, all'ammissione in terapia intensiva il 4,5% dei pazienti presentava una sepsi, il 2,1% una sepsi severa ed il 3% uno shock settico. La mortalità era del 36% nei pazienti con sepsi e saliva al 52% in caso di sepsi severa e all'81% in caso di shock settico⁵. Nel 2005 in un campione rappresentativo delle terapie intensive italiane, su 2106 pazienti che all'ammissione presentavano un'infezione, il 25,5% arrivava in stato di shock settico, con una mortalità del 66,8%. Nello stesso studio, il 72,2% dei pazienti che all'ammissione non presentava un'infezione la sviluppava durante la degenza, con una mortalità del 34,1% (73,3% in caso di shock settico).⁶ Nelle terapie intensive non coronariche europee, la sepsi severa è la prima causa di morte.⁷

Ancora più preoccupante è il dato che l'incidenza di sepsi severa è in costante aumento. Negli Stati Uniti dal 1979 al 2000 è stato riportato un aumento annuo delle sepsi dell'8,7% in parte dovuto all'aumento della sopravvivenza negli anziani e nei pazienti affetti da co-morbidità (diabete, cancro), in parte dovuto al miglioramento delle capacità diagnostiche, sia tecniche che cliniche.⁸

La rilevanza clinica e socio-sanitaria della sepsi ha portato ad un'attenta rivalutazione del problema, anche alla luce di nuovi farmaci⁹ e di nuove metodologie di approccio terapeutico¹⁰ che hanno dimostrato una riduzione della mortalità per sepsi grave e shock settico. Le principali organizzazioni scientifiche internazionali di terapia intensiva (La Società Europea di Terapia Intensiva (ESICM), la Società di Medicina Critica degli Stati Uniti (SCCM) e il Forum Internazionale sulla Sepsis (ISF)) si sono riunite per creare delle linee guida comuni, basate su un'attenta revisione della letteratura e sull'evidenza dei risultati ottenuti da studi clinici multicentrici, che mettessero ordine nell'enorme quantità di dati prodotti negli ultimi anni. Tali linee guida sono

riunite in un progetto denominato “Surviving Sepsis Campaign” che dal 2002 promuove una campagna di informazione e formazione con lo scopo di aumentare l’attenzione, la conoscenza e la comprensione del problema, definire degli standard di terapia per la patologia, ridurre la mortalità per la patologia del 25%.¹¹ E’ tutt’ora in corso la valutazione degli effetti clinici dell’applicazione sistematica dell’approccio proposto dalla Surviving Sepsis Campaign.

La sepsi è una patologia complessa con molteplici manifestazioni cliniche che affligge popolazioni di pazienti estremamente eterogenee. Questo rappresenta un grosso limite per gli studi clinici ed è una delle motivazioni addotte per giustificare i molti fallimenti di trial clinici atti a testare nuovi approcci terapeutici, che invece erano risultati efficaci su modelli animali. I malati critici in generale, ed i settici in particolare, vengono generalmente inclusi negli studi clinici inglobando le differenti alterazioni della funzione d’organo in punteggi di gravità, per cui gruppi di pazienti sono paragonabili tra loro per stesso “score” di gravità. Questi punteggi consentono anche di individuare una categoria di pazienti che beneficia di un determinato approccio terapeutico. Fra questi, i più utilizzati sono l’APACHE II score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II)¹² ed il SAPS II score (Simplified Acute Physiology Score)¹³ che, tuttavia, non sono stati creati per lo scopo sopra esposto, rappresentando solo un modo per predire la mortalità del paziente critico. L’APACHE II score varia da 0 a 71 e si calcola attribuendo un punteggio a 12 variabili fisiologiche comunemente misurate in terapia intensiva (temperatura corporea, pressione arteriosa, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, pH, ossigenazione, potassiemia, sodiemia, creatininemia, conta globuli bianchi, ematocrito, stato neurologico) ed aggiustando il risultato ottenuto per età e co-morbidità. Il SAPS II varia da 0 a 163. Anch’esso si calcola attribuendo un punteggio ad alcune variabili

fisiologiche, includendo età, causa del ricovero e co-morbidità. Un punteggio ampiamente utilizzato per valutare la funzione d'organo è invece il SOFA score (Sepsis Organ Failure Assessment)¹⁴ con cui è possibile dare un punteggio da 1 a 4 per ogni grado di insufficienza di 6 organi testati (apparato respiratorio, cardiocircolatorio, urinario, epatico, emocoagulativo, neurologico)

Fisiopatologia

Infiammazione

Da un punto di vista fisiopatologico, la sepsi è stata classicamente interpretata come l'effetto di un eccessivo rilascio di mediatori pro-infiammatori in seguito alla interazione del sistema immunitario innato e l'agente infettante. La SIRS era dunque l'effetto di una risposta infiammatoria che sfuggiva dal controllo omeostatico locale e diventava sistemica. In questo modello un ruolo primario contro l'agente infettante che ha superato le barriere fisiche del corpo per entrare in siti sterili, è rappresentato dal sistema monocito-macrofagico, con i suoi recettori CD14, e TRL (Toll like receptor, nome che deriva dall'analogia strutturale con il gene *Toll identificato in Drosophila*).¹⁵ I TRL rappresentano una classe di recettori a singolo segmento trans-membrana che riconoscono motivi molecolari stereotipati, comuni a numerosi microrganismi patogeni. Possono localizzarsi a livello della membrana citoplasmatica (es. TLR4 che riconosce insieme a CD14 il lipopolisaccaride batterico) o a livello endosomiale (es. TLR3 preposto al riconoscimento di dsRNA virali frequentemente presenti in quel distretto cellulare). Sono stati clonati 11 molecole Toll-like diverse che dimostrano una specificità generica per ampie categorie di patogeni, dai peptidoglicani dei batteri gram positivi, alle endotossine dei batteri gram negativi, a porzioni di acido nucleico virale, complessivamente denominati

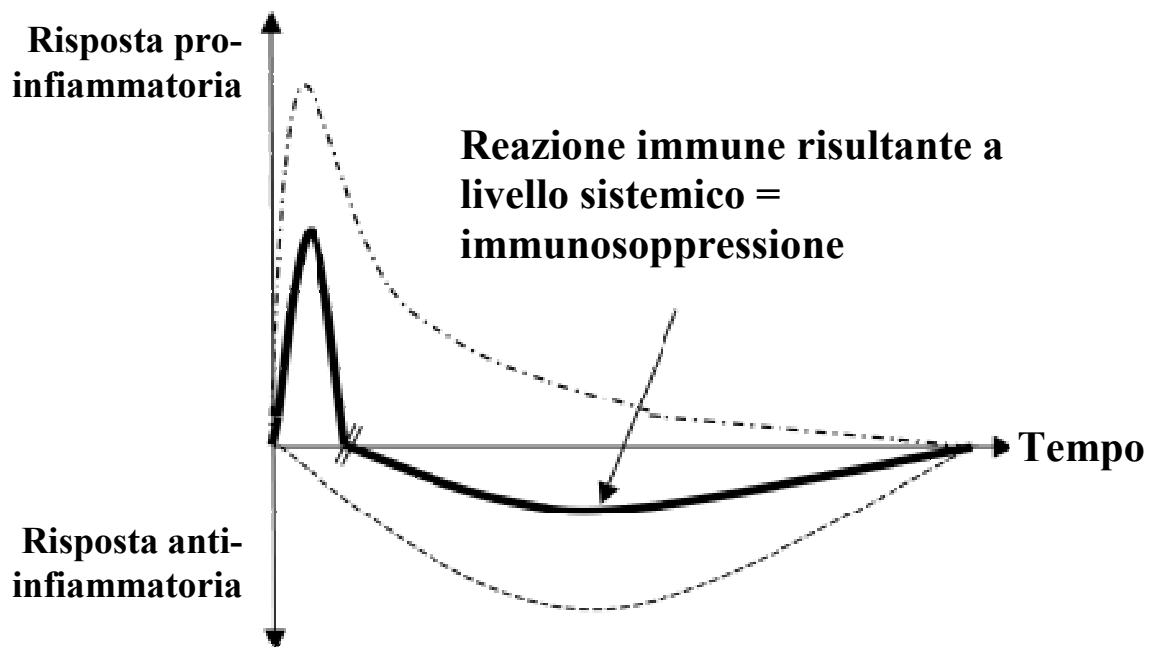
PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). L'interazione tra il TLR ed la molecola del patogeno determina una cascata di eventi intracellulari che esita nell'aumento della trascrizione genica di molecole infiammatorie, fra cui l'interleukina 1 (IL-1) ed il TNF α . Queste, agendo in modo autocrino e paracrino, amplificano la risposta umorale delle cellule del sistema immunitario, coinvolgendo anche cellule diverse, in particolar modo le cellule endoteliali. Queste ultime partecipano attivamente al processo infiammatorio amplificando la risposta citochinica, in particolar modo attraverso l'espressione di citochine secondarie, come l'interleukina 6 (IL-6) ed esprimendo sulla loro superficie endovascolare molecole di adesione che contribuiscono alla marginazione, il rolling e l'attivazione dei neutrofilo circolanti. Questo processo infiammatorio attiva un secondo meccanismo umorale: il sistema emocoagulativo, mediante l'espressione sulla superficie cellulare di molecole di Tissue Factor (TF). L'attivazione della coagulazione intravascolare e la concomitante inibizione della fibrinolisi contribuiscono alle alterazioni emocoagulative che si osservano in corso di sepsi e sono in parte responsabili del danno d'organo correlato, determinando, mediante occlusione del microcircolo, un danno ischemico da insufficiente apporto di ossigeno ai tessuti. A quest'ultimo contribuisce lo stato di vasoplegia associato al processo infiammatorio, e attivato da vari mediatori tra cui appare importante la massiva over-produzione di iNOS (ossido-nitrico sintetasi inducibile) con conseguente produzione di Ossido Nitrico (NO). Inoltre i processi infiammatori sono anche responsabili dell'aumentata permeabilità vascolare (capillary leak) che determina ipovolemia, contribuendo allo stato di shock (ipotensione), edema interstiziale ed ulteriore riduzione dell'apporto di ossigeno ai tessuti.¹⁶ Alla disfunzione multi organica a cui si assiste in corso di sepsi contribuisce inoltre l'incapacità

dei mitocondri di vari organi e tessuti di metter in atto i processi ossido-riduttivi per la produzione di ATP.¹⁷

Immuno-paralisi

La convinzione che l'eccessiva infiammazione fosse la causa prevalente delle alterazioni in corso di sepsi ha portato, negli ultimi 20 anni, al tentativo di utilizzare diverse molecole ad effetto anti-infiammatorio, bloccando a vari livelli i processi fin qui sommariamente descritti, producendo una notevole quantità di studi clinici con pochi o modesti effetti sulla sopravvivenza del paziente settico. Questi fallimenti sono stati attribuiti in parte all'incapacità del modello animale di mimare i processi fisiopatologici che conducono alla sepsi negli uomini e in parte alla grossa eterogeneità della popolazione dei settici. Tuttavia una nuova consapevolezza sta emergendo: i processi fisiopatologici che conducono alla disfunzione multi-organica in corso di sepsi non sono ancora del tutto chiariti. In particolare una visione del processo settico sta emergendo negli ultimi anni, cioè che insieme all'intensa risposta pro-infiammatoria designata all'eliminazione del patogeno infettante, l'organismo mette in atto meccanismi compensatori per circoscrivere la travolgente risposta infiammatoria. Questi meccanismi contro-regolatori (un processo che nell'insieme viene definito CARS = compensatory anti-inflammatory response syndrome) può sfuggire anch'esso al meccanismo omeostatico, risultando nella disfunzione dei processi immunitari, il cui perdurare nel tempo può risultare letale. (FIG. 1). A conferma di ciò, una quantità sempre crescente di dati sperimentali e clinici indicano che i pazienti settici sviluppano rapidamente alterazioni di vario genere del sistema immunitario.^{18, 19, 20, 21}. Allo stato attuale, la nostra capacità di trattare i pazienti durante le primissime ore dello shock è migliorata mettendo in atto un trattamento rianimatorio aggressivo e

precoce, come suggerito dalle linee guida, per cui molti pazienti sopravvivono a questo stadio critico iniziale. Olti di essi, però, muoiono successivamente in uno stato di immunosoppressione. L'80% dei pazienti che muoiono per sepsi dopo essere sopravvissuti allo shock perché sottoposti a trattamento rianimatorio precoce ed aggressivo, presentano note caratteristiche di immunodepressione, mentre i pazienti che sopravvivono sono quelli che riacquistano spontaneamente una funzione immunitaria valida, indipendentemente dal trattamento.²²



La necessità di una risposta immunitaria efficace per sopravvivere alla sepsi è stata messa in evidenza in un recente lavoro genomico, che dimostrava come i pazienti che sopravvivevano alla sepsi over-esprimevano geni coinvolti nell'attività del sistema immunitario innato (citochine, chemochine, effettori delle vie attivate dai TLR)²³.

Lo stato di disfunzione immunitaria coinvolge sia il sistema immunitario innato che il sistema immunitario adattativo. Una caratteristica costantemente descritta nella popolazione dei pazienti settici riguarda

l'incapacità dei loro macrofagi di rispondere adeguatamente in termini di quantità di citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL-1, IL-6) prodotte alla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS)^{24, 25, 26}. Inoltre i monociti prelevati dai pazienti settici esprimono livelli ridotti di molecole di istocompatibilità di classe II (HLA-DR), causandone la ridotta capacità presentare l'antigene ai linfociti T.^{27, 28} Riguardo ai linfociti dei pazienti settici, essi dimostrano una ridotta capacità proliferativa in risposta a stimoli antigenici (tubercolina, tossina tetanica). E' stato inoltre descritto come linfociti B e T, macrofagi e cellule dendritiche vadano incontro ad apoptosi in corso di sepsi.^{29, 30, 31, 32}. Le cellule in grado di presentare l'antigene (APC) giocano un ruolo fondamentale nel determinare il tipo di linfocita T che contribuisce all'innescamento del sistema immunitario adattativo. Il tipo di stimolo presente al momento della maturazione della APC induce il linfocita T a diventare effetttore, di memoria, anergico o apoptotico. Inoltre, se le cellule T effettrici esprimano un fenotipo Th1 (in grado di produrre citochine pro-infiammatorie quali TNF α , INF γ ed IL-2) oppure Th2 (in grado di produrre citochine anti-infiammatorie quali IL-10 e IL-4), dipende dalla durata dell'interazione tra APC e linfocita T e dal profilo di citochine prodotte dalla APC al momento dell'interazione. Stimoli pro-infiammatori quali i prodotti microbici e le sostanze rilasciate dai tessuti necrotici determinano normalmente una produzione di sostanze pro-infiammatorie da parte dei macrofagi e delle DC, tra cui IL-6, IL-12, TNF α , NO, e determinano l'espressione di membrana di molecole co-stimolatorie come il CD40, il CD80 ed il CD86, che sono considerate markers della completa maturazione della cellula APC. In queste condizioni le APC mediano l'induzione di risposte immuni di tipo Th1. In presenza di stimoli anti-infiammatori/deattivanti (cellule apoptotiche, IL-10, TGF- β), la maturazione delle APC è disfunzionale, e la produzione di citochine è spostata verso molecole anti-infiammatorie

(IL-4; IL-10) e le cellule esprimono recettori inibitori quali PD-L1. Questo tipo di stimolazione induce la differenziazione di linfociti T di tipo Th2, con la conseguente over-produzione di citochine anti-infiammatorie. Tra i fattori che determinano la risposta da parte dei linfociti T-CD4 in senso Th1 o Th2 sono stati implicati anche il tipo di agente patogeno, la quantità della carica batterica ed il sito di infezione. Lo shift di produzione di citochine del tipo Th1 al tipo Th2 è uno dei meccanismi chiamati in causa nello stato disfunzionale dell'immunità del paziente settico. È stato dimostrato che lo shift verso la risposta Th2 è correlato in questi pazienti, ad un aumento della mortalità.³³

Nei monociti del paziente settico, come già detto, lo stimolo con LPS non determina una adeguata risposta pro-infiammatoria, mentre la capacità di produrre citochine anti-infiammatorie è invariata o leggermente aumentata, come se LPS conservi la capacità di attivare il monocita, ma i segnali intracellulari da esso attivati siano rimodellati a favore della produzione di citochine anti-infiammatorie (riprogrammazione leucocitaria).³⁴

Esiste una sorta di consenso non scritto sul fatto che le morti per sepsi siano il risultato di un sistema immunitario disfunzionale, che si caratterizza, nelle sue forme iniziali, con la morte programmata delle sue cellule effettrici. In uno studio di Hotchkiss si dimostrava come le cellule linfociti che e dell'epitelio gastrointestinale dei pazienti deceduti per sepsi fossero enormemente ridotte per fenomeni apoptotici rispetto alle stesse cellule di pazienti morti in terapia intensiva per altre cause.³⁵ L'estensiva apoptosi delle cellule dendritiche (DC) che si osserva in corso di sepsi è stata messa in relazione all'outcome sfavorevole: dati clinici dimostrano come i pazienti che sopravvivevano ad eventi settici avevano una quantità di DC circolanti significativamente maggiore dei pazienti deceduti. Le variazioni del numero di DC era associato inoltre a variazioni del punteggio SAPS II.³⁶ È stato

ipotizzato, inoltre, che le cellule apoptotiche potrebbero contribuire ad indurre anergia dei linfociti T, rendendoli incapaci di rispondere allo stimolo antigenico.³⁷

Da un punto di vista clinico, queste alterazioni giocano un ruolo primario nella ridotta capacità dei settici di eradicare l'organismo infettante e spiegano la loro suscettibilità ad infezioni nosocomiali secondarie. Inoltre è stato dimostrato come i pazienti settici mostrino una ridotta reazione di ipersensibilità di tipo ritardato, e presentano spesso la riattivazione di virus quiescenti (herpes zoster e citomegalovirus)^{38, 39}.

Le principali cause di immunodepressione in corso di sepsi sono riportate nella Tabella 2

TAB 2. POTENZIALI MECCANISMI DI IMMUNOSOPPRESSIONE NELLA SEPSI:
Shift da una risposta infiammatoria (Th1) verso una risposta antinfiammatoria (Th2)
Anergia (ridotta proliferazione linfociti T; aumentata % di linfociti T regolatori)
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

Ruolo della risposta immunitaria nella sepsi

La morte per sepsi può essere dovuta a diversi meccanismi che si innescano nel tempo. Nelle prime fasi della sepsi, se non riconosciuta e trattata prontamente, la malattia evolve rapidamente verso lo shock settico, prevalendo i fenomeni pro-infiammatori precedentemente descritti con

impatto sullo stato emodinamico del paziente. La tempistica dell'evoluzione verso lo shock dipende da molteplici fattori, non ancora del tutto chiariti, fra cui compaiono caratteristiche dell'agente infettante, sede dell'infezione primaria, carica batterica del patogeno ma anche 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. In questa prima fase la disfunzione d'organo è prevalentemente legata al ridotto apporto di ossigeno ai tessuti susseguente le alterazioni emodinamiche e la coagulazione intravascolare che occlude il microcircolo. Questa fase si giova, verosimilmente di un approccio rianimatorio precoce in grado di ripristinare la capacità di trasportare l'ossigeno e di conseguenza di "nutrire" le cellule. Ovviamente l'approccio rianimatorio deve in primo luogo aiutare l'organismo ad eradicare l'agente infettante mediante l'utilizzo di terapie antibiotiche mirate ed eventualmente la risoluzione chirurgica del sito infetto. Come già detto, però, tutto questo non è sufficiente, poiché lo stato immunitario dell'ospite correla con l'outcome del paziente e la persistenza di uno stato di immuno-paralisi determina una inefficace eradicazione dell'infezione primaria ed una maggiore suscettibilità ad infezioni nosocomiali. A dimostrazione di ciò, una discreta proporzione di infezioni nosocomiali nei pazienti settici è causata da microrganismi commensali che diventano patogeni solo nei pazienti immunocompromessi. Di conseguenza sono state proposte terapie immunostimolanti innovative con lo scopo di migliorare il killing dei batteri, nel sito primario di infezione e prevenire lo sviluppo di infezioni nosocomiali o la riattivazione di virus quiescenti.⁴⁰ Tuttavia, nonostante studi preliminari (interferone γ , GM-CSF), siamo ancora lontani dal poter iniziare ampi trial clinici su larga scala. In particolare, non tutti i pazienti hanno lo stesso grado di immunosoppressione, di conseguenza non

tutti si beneficerebbero di terapie immunostimolanti. La conoscenza dei meccanismi molecolari che sono alla base dello stato di immunosoppressione dei pazienti settici getta le basi per lo sviluppo di nuove terapie ad azione immunomodulante e crea i presupposti per definire le categorie di pazienti che più si gioverebbero dei diversi approcci (stimolare il sistema immunitario innato e/o stimolare il sistema immunitario adattativo, bloccare i meccanismi apoptotici, ecc).

Un approccio parallelo è attualmente in studio in molti centri di terapia intensiva: si tratta dell'utilizzo di un circuito extracorporeo con la capacità di adsorbire su un filtro specifico le citochine circolanti, sia pro- che anti-infiammatorie. Infatti sia gli eventi emodinamici che gli eventi pro-coagulativi che la disfunzione immunitaria sono mediate dal massivo rilascio nel plasma di queste sostanze, di conseguenza la riduzione della loro concentrazione plasmatica potrebbe modulare tali effetti.^{41, 42}

Ruolo della tolleranza monocitica e della IL-12

E' stato già messo in evidenza come i macrofagi esposti cronicamente al lipopolisaccaride (LPS), il maggior componente della membrana esterna dei batteri gram negativi, vadano incontro ad una "riprogrammazione" dei meccanismi endocellulari tale da ridurre la quantità di citochine pro-infiammatorie prodotte (in particolare TNF α e IL-1 β) in risposta ad ulteriore stimolazione con LPS.^{43, 44} Questo fenomeno di "tolleranza" è stato interpretato come una risposta adattativa all'infezione batterica a protezione da un'iperattivazione patologica del sistema immunitario innato. Tuttavia, se da una parte difende l'organismo dallo sviluppo di complicanze settiche, dall'altra può portare a infezioni letali. Bisogna inoltre sottolineare che si tratta di un fenomeno transitorio, e la sua reversibilità è stata messa in relazione alla guarigione. Di recente, tuttavia, modelli di

infezione con *Cryptococcus neoformans*⁴⁵ o *Salmonella enteritica*⁴⁶, hanno dimostrato che i topi i cui monociti erano tolleranti all'LPS erano maggiormente resistenti a infezioni fungine o batteriche, rilevando una minore carica batterica nei tessuti infettati. Di conseguenza l'assunzione che la tolleranza macrofagica all'LPS sia correlata alla maggiore suscettibilità alla sepsi non appare così ovvia. Sebbene i meccanismi alla base della tolleranza macrofagica non siano ancora del tutto chiariti, un ruolo centrale è stato dato alla IL-12. IL-12 è una citochina immunoregolatrice fondamentale per l'organizzazione della risposta immune cellulo-mediata sia del sistema innato che acquisito. LPS è un potente induttore di IL-12, e la sua produzione da parte dei macrofagi tolleranti è fortemente depressa. IL-12 è necessaria affinché le cellule Natural Killer (NK) ed i linfociti T producano INF γ ed altre citochine.⁴⁷ Inoltre questa citochina sembra essere un fattore di vitale importanza per la difesa dell'ospite contro le infezioni da batteri gram negativi, come dimostrato dal fatto che la somministrazione di IL-12 in diversi modelli di sepsi batterica aumenta la resistenza dell'ospite all'infezione stessa.^{48, 49} Di conseguenza l'incapacità di secernere adeguate quantità di IL-12 da parte dei macrofagi dei pazienti settici è verosimilmente una causa di suscettibilità all'infezione primaria ed ad infezioni secondarie.

Ruolo dell'immunità linfocito-mediata

Nonostante l'evidenza di una soppressione/disregolazione del sistema immunitario in animali/pazienti settici sia supportata da un sempre crescente numero di dati osservazionali e sperimentali, rimane ancora molto da capire. In particolare i meccanismi che sono alla base dell'eradicazione dell'infezione sono ancora oggetto di studio, per cui le nuove nozioni aprono nuove prospettive nella conoscenza dei meccanismi che sottendono allo sviluppo delle alterazioni immunitarie in corso di sepsi. In particolare la

maggior parte degli studi clinici e di scienze di base hanno finora studiato le alterazioni del sistema immunitario innato focalizzandosi sul ruolo delle cellule mieloidi. Di recente, però, ha assunto una nuova importanza il ruolo delle cellule T nella loro interazione con le cellule presentanti l'antigene e nelle loro funzioni regolatorie ed effettrici della risposta immune linfocito-mediata. Ad esempio è stato dimostrato come i topi depleti delle cellule B e T in cui veniva indotta una sepsi polimicrobica mostravano una maggiore mortalità, una ridotta clearance batterica ed una risposta immune pro-infiammatoria "disregolata" rispetto ai controlli sani.^{50, 51} La linfocitopenia che si osserva in corso di sepsi è stata correlata alla maggiore suscettibilità alle infezioni nosocomiali.⁵² Inoltre, come già esposto, una delle caratteristiche dell'immuno-paralisi sepsi-indotta è rappresentata dallo shift delle risposte immunitarie verso citochine del tipo Th2. Il ritorno alla produzione di citochine del tipo Th1 correla con una maggiore sopravvivenza nei pazienti settici.⁵³ E' stato inoltre messo in evidenza come durante la fase di immuno-paralisi il fenotipo dei linfociti T sia caratterizzato dall'overespressione di co-recettori inibitori tra cui CTLA4, che facilitano l'attivazione preferenziale di segnali negativi durante la stimolazione dei linfociti T, per cui privilegiano l'anergia di tali cellule.⁵⁴

Interazione CD40-CD40L (CD 154) nell'immunità cellulo-mediata

Il CD40 è una molecola di 50kD espressa su diversi tipi cellulari inclusi i monociti-macrofagi.⁵⁵ Essa appartiene alla superfamiglia dei recettori per il TNF ed è stata identificata primariamente sui linfociti B.⁵⁶ La sua presenza sulle APC è necessaria per la loro attivazione. Il suo ligando, il CD40L (CD 154), è una proteina integrale di membrana di tipo II espressa primariamente sulle cellule T CD4+.^{57, 58}

Il CD40 è essenziale nel mediare un'ampia varietà di risposte immuni ed infiammatorie tra cui lo switch isotipico delle immunoglobuline linfocito-T dipendente, lo sviluppo di cellule B memoria, la regolazione della proliferazione dei linfociti B, il salvataggio dei linfociti B dall'apoptosi e la formazione di centri germinativi.⁵⁹ 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.⁶⁰ Come risultato, i pazienti HIGM1 sono suscettibili ad infezioni batteriche ricorrenti.⁶¹

Il legame del CD40 al CD40L dei linfociti Th contribuisce all'attivazione delle APC e alla secrezione da parte di queste ultime di una serie di citochine pro infiammatorie, tra cui TNF α , IL-1 β ed IL-12. Queste giocano un ruolo fondamentale nel promuovere e mantenere la funzione del T-helper (Th1) e la risposta pro-infiammatoria durante un'infezione batterica.^{62, 63} L'attivazione macrofagica CD40L-mediata contribuisce alla espressione di membrana di molecole co-stimolatorie quali il CD80 (B7-1) ed il CD86 (B7-2), le quali giocano un ruolo cruciale nell'attivazione delle cellule T.⁶⁴ Infatti queste molecole co-stimolatorie espresse sulla superficie delle APC interagendo con il CD28 presente sui linfociti T ne mediano l'attivazione mediante un meccanismo complementare alla più nota interazione TCR (t-cell receptor) e complesso MHCII/antigene. L'espressione delle molecole co-stimolatorie è un passaggio essenziale per rendere le cellule macrofagiche delle APC competenti.⁶⁵ Di conseguenza l'interazione CD40-CD40L rappresenta uno step essenziale per lo stimolo di una risposta adattativa valida.⁶⁶ L'alterazione dell'interazione tra il CD40 espresso dai monociti-macrofagi ed il CD40L espresso dai linfociti T è stata oggetto di studio nella

sepsi. In studi su animali con mutazioni sul gene che codifica il CD40L è stato osservato un aumento di mortalità per sepsi.⁶⁷ Inoltre è stato osservato come in pazienti settici ci fosse un aumento dell'espressione monocitica del CD40, sebbene nei pazienti batteriemici la sua espressione era significativamente ridotta in coloro che non sopravvivevano rispetto a coloro che sopravvivevano.⁶⁸

Introduzione al lavoro sperimentale

Da quanto esposto finora si evince che negli ultimi anni sta emergendo una visione differente dei meccanismi patogenetici alla base della sindrome settica. Accanto ai meccanismi pro-infiammatori e pro-coagulanti classicamente descritti si sta accumulando un carico sempre maggiore di evidenze cliniche e sperimentali che vedono le alterazioni sepsi-indotte del sistema immunitario come un determinante fondamentale dell'outcome del paziente settico. Inoltre si sta pian piano delineando un ruolo sempre più decisivo del sistema immunitario adattativo, la cui competenza è necessaria per sopravvivere alla sepsi. In particolare si è focalizzata l'attenzione sul ruolo effettore e regolatore dei linfociti T.

E' stato già messo in evidenza come i macrofagi esposti cronicamente all'LPS vadano incontro a tolleranza, il cui ruolo, tuttavia, rimane ancora da chiarire. La disfunzione dei macrofagi in corso di sepsi è caratterizzata anche 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. La validità del dialogo tra i linfociti T ed il macrofago presentante l'antigene necessita della up-regolazione sulla membrana delle cellule monocitiche di molecole co-stimolatorie, il CD40, il CD80 ed il CD86. L'interazione tra il CD40L esposto sulla membrana del linfocita T ed il CD40 sulle cellule macrofagiche induce, infatti, la up-regolazione di tali molecole, passo necessario affinché il macrofago diventi un APC competente.⁶⁹ L'interazione tra il CD28 espresso dai linfociti T ed il CD80 ed il CD86 dei macrofagi gioca un ruolo fondamentale nel fornire segnali co-stimolatori alla cellula T, inducendone, ad esempio, la proliferazione e la secrezione di fattori di crescita.⁷⁰

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente descritto come le risposte *in vitro* al CD40L di macrofagi prelevati da donatori sani e trattati con LPS erano ridotte in termini di produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF α ed IL-12) e di capacità di up-regolare le molecole co-stimolatorie CD80,CD86.⁷¹ Sulla base di questi studi abbiamo ipotizzato che la tolleranza delle cellule monocitiche coinvolgeva uno stato funzionale distinto di attivazione e/o differenziazione che non era ristretto alla tachifilassi verso LPS, ovvero che l'LPS induceva una riprogrammazione dei meccanismi endocellulari tali da alterare altri sistemi coinvolti nella risposta all'infezione. La ridotta risposta *in vitro* al CD40L dei macrofagi in cui era stata indotta la tolleranza all'LPS potrebbe, pertanto rappresentare *in vivo* un meccanismo alternativo di disfunzione macrofagica in corso di sepsi.

Lo scopo di questo studio è stato, pertanto, valutare la risposta *ex vivo* al CD40L di macrofagi prelevati da pazienti affetti da sepsi da batteri gram negativi per verificare se gli studi preliminari condotti *in vitro* fossero o meno confermati.

Materiali e metodi

Pazienti

Sedici pazienti ricoverati presso la Terapia Intensiva del Policlinico di Tor Vergata sono stati inclusi nello studio se incontravano i criteri di inclusione di seguito riportati. Dieci soggetti sani, assortiti per sesso ed età, sono stati inclusi come controllo.

Criteri di inclusione: Presenza da almeno 24 ore di due o più segni di reazione infiammatoria sistemica (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}) + un focolaio identificabile di infezione

Criteri di esclusione: età $<$ di 18 anni; neoplasia maligna attiva; AIDS; neoplasia metastatica o ematologica; gravidanza; insufficienza renale cronica in fase dialitica; insufficienza epatica terminale; recente chemioterapia; terapia immunosoppressiva in corso o recente (< 4 settimane) uso di steroidi.

All'inclusione per tutti i pazienti è stato calcolato l' APACHE II score ed il SOFA score.

Composti

CD40L trimerico ricombinante solubile è stato fornito da Immunex (Seattle WA). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) è stato fornito da Sandoz Research Institute (East Hanover, NJ). ^3H -thymidine con attività specifica di 80mCi/mmol è stata acquistata da Amersham, Little Chalfont, UK.

Il LAL test (Limulus amoebocyte lysate) (QCL-1000, BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD) è stato utilizzato su tutti i composti ed i terreni di coltura

usati nello studio per escludere la contaminazione da endotossina. Tutti i campioni analizzati ne sono stati trovati privi.

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-IL1 β , anti-IL2, anti-IFN γ e anti-CD3. Lo staining è stato effettuato con anticorpi accoppiati a FITC-, PE- e Cy-chrome-

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, 50 μ g/ml di streptomicina e siero fetale bovino al 20% inattivato al calore e tenute a 37°C in atmosfera umidificata con CO₂ 5% in aria.

Per la determinazione della produzione di citochine intracellulari all'analisi FACS, le PBMC da pazienti e controlli sono stati coltivate per 18 ore nelle condizioni sopra riportate in presenza o in assenza di CD40L. 30 minuti dopo la stimolazione si è aggiunto 1 μ g/ml di brefaldina A (inibitore del trasportatore proteico) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state analizzate mediante FACS.

Per valutare l'abilità del CD40L e del GM-CSF di up-regolare le molecole CD40, CD86, CD80 sulla superficie macrofagica, PBMC dai pazienti e dai controlli sono stati coltivati per 72 ore nel mezzo di coltura con aggiunta di CD40L (500 ng/ml) o di GM-CSF (100 U/ml). Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state raccolte e analizzate mediante FACS.

Gli esperimenti per valutare le capacità co-stimolatorie dei monociti sono stati condotti come segue: le PBMC sono state coltivate per 72 ore nel mezzo di coltura completo supplementato con CD40L (500 ng/ml) o di GM-CSF (100 U/ml). Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate, messe nuovamente in terreno di coltura fresco e messe in una piastra a 96 pozzetti dal fondo piatto precedentemente rivestiti con anti CD3 /10 µg/ml) in presenza o assenza di anti CD28 solubile (1 µg/ml). Per la valutazione della proliferazione cellulare si è aggiunto in coltura 0,25 mCi/pozzetto di ³H-thimidina per le ultime 18 ore di coltura. La quantità di ³H-thimidina incorporata è stata determinata mediante spettroscopia a scintillazione liquida (contatore β- Canberra Packard Ltd, Pangbourne, UK). Per il rilevamento di citochine, 30 minuti dopo aver deposto le cellule nei pozzetti rivestiti con anti-CD3, si è aggiunta 1µg di Brefeldina A che impedisce la fuoriuscita dalle cellule del materiale presente nel reticolo endoplasmatico. Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state analizzate mediante FACS.

Valutazione della formazione di DNA ipodiploide

La formazione di DNA ipodiploide è stata valutata mediante marcatura con propidio ioduro e successiva misurazione della fluorescenza dei singoli nuclei mediante FACS.^{72, 73}

Staining delle molecole di superficie e delle citochine intracellulari

Dopo l'incubazione le cellule sono state marcate per i markers di superficie e successivamente analizzate al FACS per determinare l'espressione degli antigeni cellulari di superficie o permeabilizzate con soluzione Cytofix/Cytoprem, marcate per le citochine intracellulari e successivamente analizzate al FACS.

Citofluorimetria

La citofluorometria è stata effettuata mediante citofluorimetro FACS scan ed i dati analizzati con Software Cell Quest (Beckton Dickinson). I linfociti e i monocito-macrofagi (gate sul CD14) 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.

Analisi statistica

La normalità della variabile distribuzione è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Paragoni tra le distribuzioni di due variabili per un singolo gruppo sono stati effettuati mediante T-test di Student o il test U di Mann Whitney. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi. L'analisi statistica è stata effettuata mediante SPSS (SPSS Inc., Version 10.0, Chicago, Illinois, USA)

Risultati

Pazienti

Di 26 pazienti potenzialmente arruolabili, solo 16 erano affetti da sepsi accertate da batteri gram negativi. Le caratteristiche cliniche ed i siti di infezione con i patogeni isolati sono riportati nelle tabelle 2 e 3.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti

Maschi/Femmine	6/10
Età-anni , media \pm SD (range)	63.7 \pm 16 (24-83)
Neutrofili, $\times 10^9$ /L media \pm SD (range)	13.3 \pm 12.6 (3.7-59)
PaO ₂ /FIO ₂ , media \pm SD (range)	275.88 \pm 99.4 (73-490)
PCT, media \pm SD (range)	6.16 \pm 8 (0.07-33)
CRP, media \pm SD (range)	148.3 \pm 109.7 (11-360)
APACHE II score, media \pm SD (range)	24.5 \pm 6.5 (9-36)
SOFA score, media \pm SD (range)	9.28 \pm 3.8 (3-20)
Morti (%)	6 (37.5)

Note. PCT: procalcitonina. CRP: proteina C reattiva.

Tabella 3. Siti di infezione e patogeni isolati all'insorgenza della sepsi

Infezioni documentate con colture positive	11
Emocolture positive	5
Sito d' infezione	
Addome	6
Tratto genito-urinario	3
Tratto respiratorio	2
Altro sito	3
Microorganismi	

<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Klebsiella</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Proteus Species</i>	2
Altri Gram-negativi	4

Produzione di citochine da parte dei monociti dei pazienti settici

La produzione di citochine indotta dalla stimolazione con il CD40L è stata analizzata in tempi diversi:

giorno 0 (entro 24 ore dall'identificazione dei criteri di inclusione), giorno 7, ed al momento della guarigione (definita come assenza di febbre, stabilità emodinamica, assenza di disfunzione d'organo sepsi correlata). Il tempo medio di guarigione è stato di 20,2 giorni (range 10-32). Come mostrato in figura 1, la risposta in termini di produzione di citochine alla stimolazione macrofagica con il CD40L si è dimostrata fortemente ridotta nei settici se paragonata ai controlli sani. In particolare, la soppressione della produzione di citochine si osserva al tempo 0 e persiste al giorno 7 (controlli vs pazienti al giorno 0 e al giorno 7: $p < 0,05$ per TNF α , IL-1 β e IL-12), mentre la risposta dei monociti al CD40L era parzialmente, ma significativamente, aumentata nella fase di guarigione (giorno 0 e 7 vs guarigione: $p < 0,05$ per TNF α , IL-1 β e IL-12)

Effetti della sepsi sulla up-regolazione delle molecole di superficie indotta dal CD40L

I dati riguardanti l'espressione di molecole di membrana indotta dal CD40L sui monociti dei pazienti settici e nei controlli sono riportati in figura 2. Nei controlli sani il CD40L induce l'espressione sulla superficie macrofagica di elevati livelli di CD80, CD86 e CD40. I livelli raggiunti dal CD40 nei controlli

sani sono paragonabili ai livelli espressi sulla superficie dei monociti provenienti dai pazienti settici, mentre l'espressione del CD80 e del CD86 risulta essere ridotta dopo stimolazione con il CD40L nei settici, sia al giorno 0 che al giorno 7. L'incapacità di stimolare l'espressione del CD80 e CD86 da parte del CD40L non si riscontra in caso di guarigione. Il GM-CSF, invece, mantiene la capacità di stimolare l'espressione delle tre molecole studiate (CD80, CD86, CD40) nei settici come nei controlli (Fig. 2B), suggerendo che l'interferenza con l'attività del CD40L in corso di sepsi è piuttosto selettiva.

La sepsi interferisce con l'abilità del CD40L di indurre funzioni co-stimolatorie nei monociti.

L'evidenza dell'incapacità del CD40L di up-regolare le molecole co-stimolatorie nei settici ci ha indotto a paragonare la capacità dei monociti dei settici di stimolare i linfociti T autologhi rispetto ai controlli. PBMC sono state coltivate per 72 ore in presenza ed in assenza di CD40L o GM-CSF e successivamente sono state stimulate con anticorpi anti-CD3. La risposta proliferativa è stata valutata mediante l'incorporazione di H³-timidina (Fig. 3) e la produzione di citochine da parte dei linfociti T CD3⁺ è stata valutata mediante FACS (Fig 4). Sia nei pazienti che nei controlli, l'assenza di stimolazione con CD40L o GM-CSF induceva una limitata incorporazione di H³-timidina e scarsa produzione di IL-2 e INF γ , mentre la stimolazione con CD40L o GM-CSF induceva proliferazione cellulare e produzione di citochine nei controlli. Nei pazienti settici, solo l'incubazione dei macrofagi con GM-CSF era in grado di indurre la proliferazione cellulare dei linfociti T, mentre se i macrofagi erano trattati con CD40L essi non erano in grado di stimolare i linfociti T né in termini di proliferazione cellulare né in termini di produzione di citochine. Tuttavia la riduzione della risposta del linfocita T alla stimolazione con macrofagi pre-attivati con il CD40L non dipende da difetti del linfocita stesso, come dimostrato dal fatto che la co-stimolazione con

anticorpi anti-CD28 (in grado di attivare gli stimoli CD80/CD86 mediati), induce risposte simili nei settici e nei controlli.

La capacità di prevenire l'apoptosi dei monociti mediata dal CD40L è ridotta in corso di sepsi.

In assenza di appropriati stimoli, quali il CD40L o il GM-CSF, i monociti prelevati da sangue periferico messi in coltura vanno rapidamente incontro ad apoptosi. Abbiamo pensato, quindi, di valutare se la capacità del CD40L e del GM-CSF di salvare i monociti dall'apoptosi fosse alterata in corso di sepsi. La percentuale di DNA ipodiploide (un marker affidabile di apoptosi) è stata valutata mediante FACS in cellule dai settici e dai controlli, messe in coltura senza fattori stimolanti, in presenza di GM-CSF ed in presenza di CD40L. Nel primo caso la percentuale di DNA ipodiploide era elevata sia nei settici che nei controlli, in caso di stimolazione con GM-CSF la quantità di DNA ipodiploide era scarsa, suggerendone la conservata capacità di prevenire l'apoptosi. In caso di incubazione con CD40L, solo monociti dei controlli sani erano salvati dai processi apoptotici, mentre nei monociti dei settici la quantità di DNA ipodiploide era significativamente maggiore. (Fig 6)

Discussione

Nell'ambito delle possibili alterazioni che sottendono all'indebolimento delle risposte immunitarie in corso di sepsi, con questo lavoro si è voluto indagare il possibile ruolo della ridotta responsività macrofagica alla stimolazione con il CD40L. I risultati ottenuti dimostrano che nelle sepsi da batteri gram negativi la capacità dei monociti di produrre citochine pro infiammatorie ed immunoregolatrici, di agire come cellule co-stimolatorie per i linfociti T e di evitare l'apoptosi spontanea in risposta al CD40L è fortemente ridotta.

Nell'ambito della riduzione di produzione di citochine in risposta alla stimolazione con il CD40L, ci si è focalizzati sulla l'incapacità di produrre adeguate quantità di TNF α , IL-1 β e IL12.

Il TNF α sembra avere un ruolo predominante nel combattere le infezioni. Ad esempio, i pazienti affetti da artrite reumatoide e trattati con antagonisti del TNF α hanno dimostrato una maggiore suscettibilità alla sepsi e ad altre complicanze infettive.⁷⁴ Inoltre in un trial clinico in cui si somministrava un anticorpo anti-TNF α ad azione neutralizzante in pazienti con shock settico è stata riscontrata una maggiore mortalità.⁷⁵

Il ruolo dell'IL-1 β ha in corso di sepsi è stato ampiamente studiato in laboratorio. Essa è essenziale per il reclutamento dei neutrofili nel sito di infezione. Inoltre le è stato attribuito un ruolo predominante nella difesa contro ascessi cerebrali da *S.aureus* e nelle artriti settiche e nelle infezioni sistemiche.^{76, 77}

Il ruolo immunoregolatorio dell'interleuchina 12 è già stato esposto. Essa è necessaria ai linfociti T per produrre INF γ e se somministrata in animali settici ne aumenta la sopravvivenza.

Tuttavia il reale impatto di queste citochine pro-infiammatorie nei pazienti settici è ancora da chiarire. Almeno nelle fasi precoci della sepsi, sebbene i

macrofagi non siano in grado di produrre adeguate quantità in seguito a stimoli appropriati, i livelli circolanti di TNF α ed IL-1 β sono enormemente aumentati, ed il loro aumento è stato messo in relazione allo sviluppo dell'insufficienza multi-organica. La perdita della capacità di produrre citochine pro-infiammatorie da parte dei macrofagi dei pazienti settici in seguito alla stimolazione con CD40L è un fenomeno abbastanza precoce, per cui sembra inverosimile che l'attivazione dei macrofagi mediata dal CD40 giochi un ruolo prioritario nella fase iper-infiammatoria precoce della sepsi.

Oltre alla ridotta capacità di produzione di citochine pro-infiammatorie, i monociti dei pazienti settici non sono in grado di esprimere le molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 in seguito alla stimolazione con CD40L e di conseguenza perdono la capacità di stimolare la proliferazione ed il release di citochine CD28 mediata dei linfociti T. La disfunzione dell'interazione monocita-linfocitaT riguarda primariamente il monocita, come dimostrato dal fatto che il linfocita T del paziente settico, se stimolato in maniera simile a quella fisiologica (anti-CD28 + anti-CD3), risponde in modo ottimale. La mancata espressione delle molecole co-stimolatorie, infatti, determina la mancata maturazione del monocita verso lo stato funzionale di APC competente. È stato dimostrato come i macrofagi dei settici mostrino ridotte capacità presentanti l'antigene già a 24 ore dell'insorgenza della sepsi, e rimangono disfunzionali fino a 14 giorni dopo.^{78,79} Un meccanismo responsabile potrebbe essere quello appena descritto. La mancata espressione di molecole di superficie CD40L-mediata non coinvolge, nei nostri esperimenti, il CD40. Questo dato è in contrasto con i risultati ottenuti *in vitro* dal nostro stesso gruppo. Tuttavia il modello *in vitro* dimostrava una down-regulation del CD40 a concentrazioni di LPS > 100 ng/ml, che difficilmente si raggiungono *in vivo*. Inoltre altre molecole solubili potrebbero influire *in vivo* sulla modulazione dell'espressione di molecole di

superficie. Come già detto, altri studi hanno riportato un aumento del CD40 sui monociti dei settici.⁶⁸

Normalmente i monociti reclutati nella sede d' infezione, se non ricevono stimoli adeguati, vanno incontro ad apoptosi. Come dimostrato dal nostro set di esperimenti, i monociti dei pazienti settici sono poco responsivi all'effetto anti-apoptotico CD40L mediato. Questo potrebbe aumentare la percentuale di monociti che vanno incontro ad apoptosi in seguito alla presentazione dell'antigene⁸⁰ e potrebbe contribuire alla riduzione di efficienza della risposta immune in corso di sepsi.

Occorre infine ricordare che la sepsi è una sindrome molto complessa i cui meccanismi fisiopatologici sono ancora in gran parte sconosciuti. A questa scarsa conoscenza si aggiungono la grande variabilità degli agenti eziologici e l'eterogeneità dei pazienti che rendono estremamente complicati gli studi clinici, non essendo identificabile una popolazione ristretta di pazienti che sia rappresentativa di questa sindrome. La maggior parte dei dati a nostra disposizione, in particolare dalla ricerca di base, forniscono informazioni sui meccanismi patogenetici indotti dall'LPS. Esistono, infatti, dati solidi a supporto che l'endotossina sia una causa di disfunzione monocitica nella sepsi. Per questo motivo in questo studio è stata selezionata una coorte di pazienti in cui vi fosse una diagnosi eziologica accertata da batteri gram negativi. Per rigore scientifico, quindi, i nostri dati non sono esportabili a sepsi da eziologie diverse o a pazienti dissimili dalla popolazione studiata. Di conseguenza ogni deduzione fisiopatologica o terapeutica in questa fase necessita di ulteriori conferme.

Conclusioni

Il nostro lavoro supporta l'ipotesi che uno dei meccanismi coinvolti nella disfunzione del sistema monocito-macrofagico in corso di sepsi sia legato alla ridotta capacità di tali cellule di rispondere con appropriatezza alla stimolazione da parte del CD40L. Con ciò si contribuisce ad aumentare le conoscenze sui meccanismi patogenetici della sindrome settica ponendo le basi per lo sviluppo di potenziali interventi terapeutici.

Figure

Figura 1A

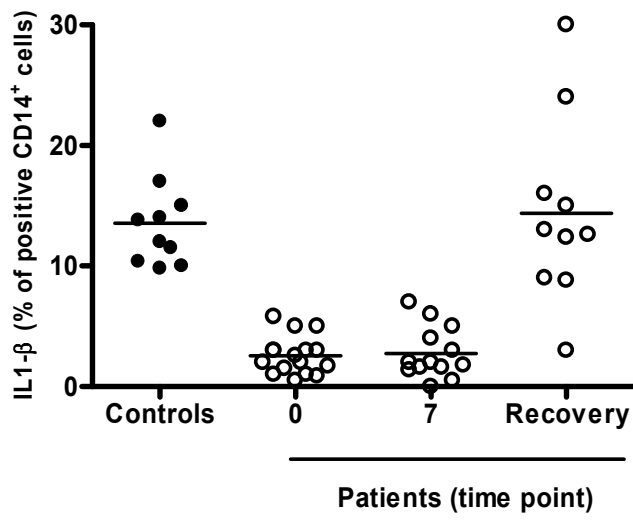


Figura 1B

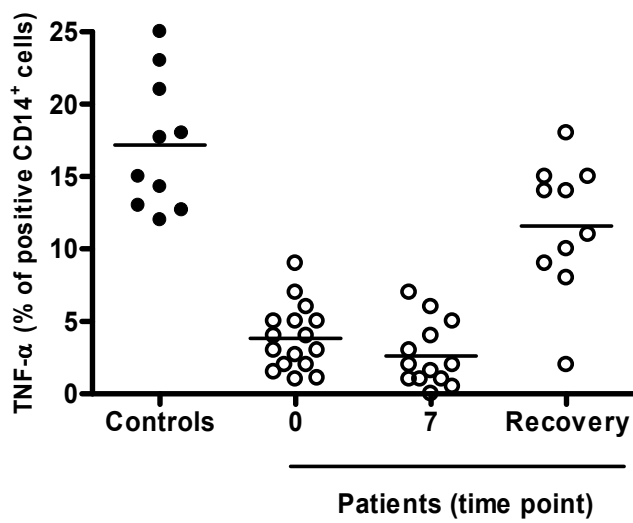


Figura 3A

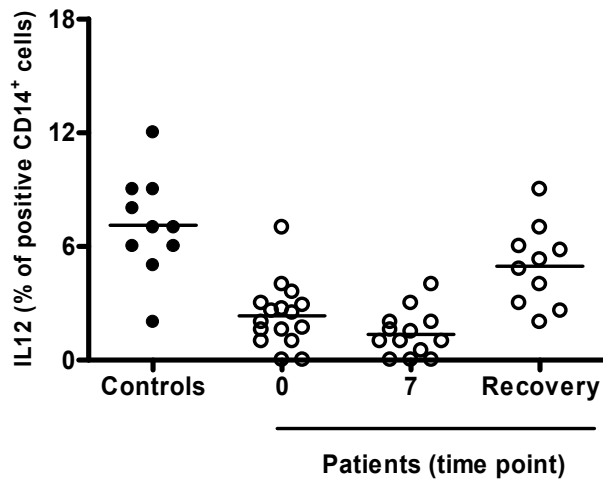


Figura 1. Produzione di citochine monocitiche indotte dal CD40L in differenti momenti della sepsi e nei controlli sani. Il numero di donatori usati ad ogni punto è il seguente: controlli n. 10, giorno 0 n. 16; giorno 7 n. 13; guarigione n. 10. Meno dell'1% di $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-12 è stato riscontrato in cellule non stimulate.

Figura 2

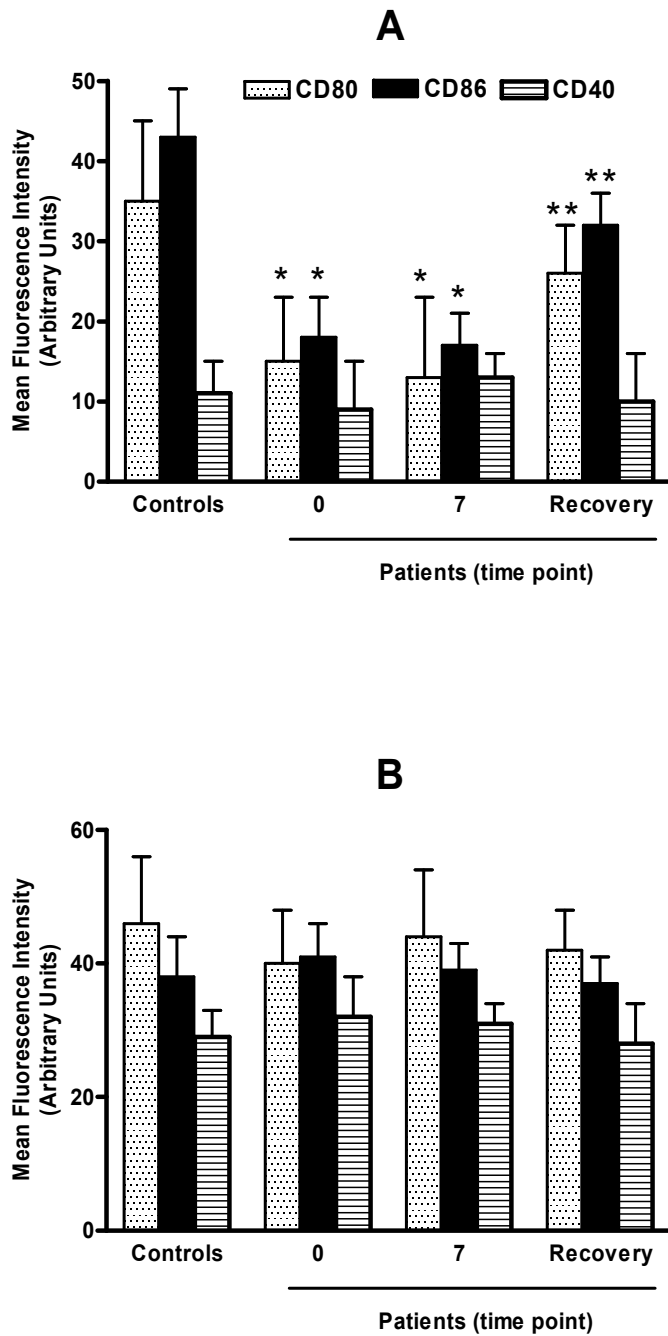


Figura 2. Effetti della sepsi sull'espressione di molecole di superficie dei monociti stimolati con CD40L (A) e con GM-CSF (B). Il numero di donatori usati ad ogni punto è il seguente: controlli n. 10, giorno 0 n. 16; giorno 7 n. 13; guarigione n. 10. I dati rappresentano la media \pm SD (error bars). A. L'asterisco singolo indica $p < 0.05$ rispetto ai controlli; il doppio asterisco indica $p < 0.05$ rispetto ai giorni 0 e 7. Nessuna significatività statistica è stata riscontrata tra controlli e settici in ogni time point per l'espressione del CD40. B. Nessuna differenza statistica riscontrata per CD40, CD80 e CD86 tra controlli e settici per ogni time point.

Figura 3

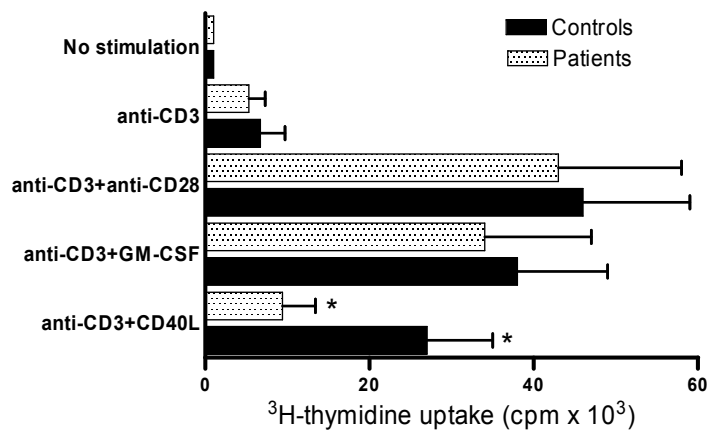


Figura 3. Il monociti stimolati con CD40L non sono in grado di indurre la proliferazione dei linfociti T CD4+ autologhi. Le PBMC sono state ricavate da 13 pazienti settici al giorno 7. Nessuna differenza significativa si rileva nella quantità di ³H-timidina incorporata in cellule non stimulate tra settici e controlli così come nelle cellule stimulate solo con anti-CD3. Le cellule stimulate con anti-CD3 e anti-CD28 proliferavano (incorporazione di ³H-timidina aumentata) ma in maniera analoga ($p > 0,05$) tra settici e controlli, ad indicare che i linfociti dei settici rispondono in modo ottimale a stimoli fisiologici. I linfociti T messi in contatto con i monociti stimolati con GM-CSF proliferano in maniera sovrapponibile tra controlli e settici. Infine se monociti sono stimolati con CD40L, la capacità proliferativa dei linfociti T è ridotta nei settici rispetto ai controlli. L'asterisco indica $p < 0.05$.

Figura 4

Figura 4A

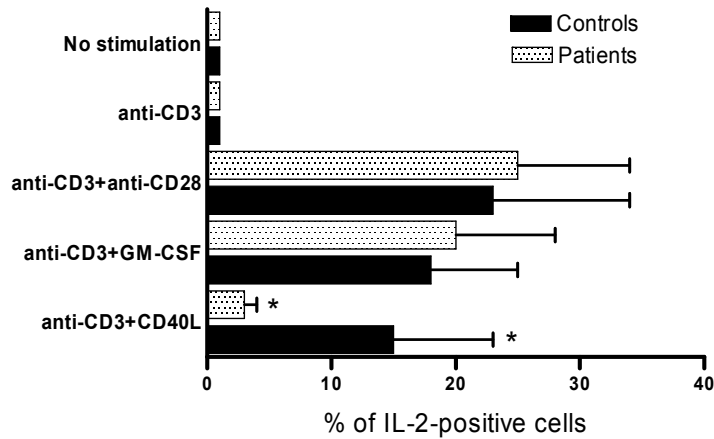


Figura 4B

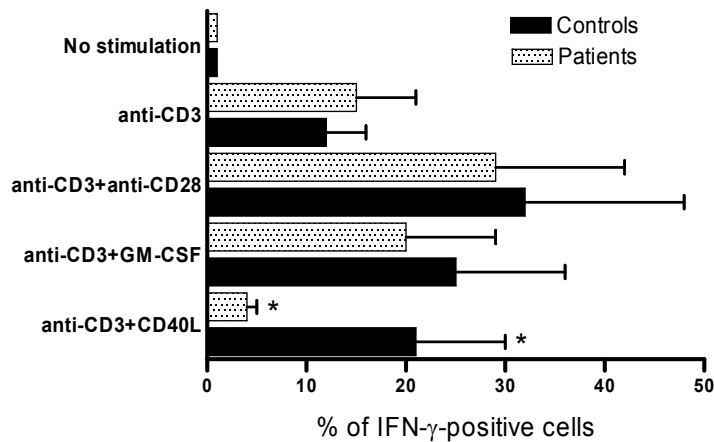


Figura 4. Il monociti stimolati con CD40L non sono in grado di indurre la produzione di citochine (IL-2 e INF γ) nei linfociti T CD4+ autologhi. Le PBMC sono state ricavate da 13 pazienti settici al giorno 7. Nessuna differenza significativa si rileva nella quantità di IL-2 (A) e INF γ (B) prodotte in cellule non stimolate tra settici e controlli così come nelle cellule stimolate solo con anti-CD3. Le cellule stimolate con anti-CD3 e anti-CD28 mostrano un aumento dell'intensità di fluorescenza per IL-2 (A) e INF γ (B) ma in maniera analoga ($p > 0,05$) tra settici e controlli, ad indicare che i linfociti dei settici rispondono in modo ottimale a stimoli fisiologici. I linfociti T messi in contatto con i monociti stimolati con GM-CSF producono quantità di citochine sovrapponibili tra controlli e settici. Infine se monociti sono stimolati con CD40L, la capacità di produzione di citochine dei linfociti T è ridotta nei settici rispetto ai controlli. L'asterisco indica $p < 0.05$.

Figura 5

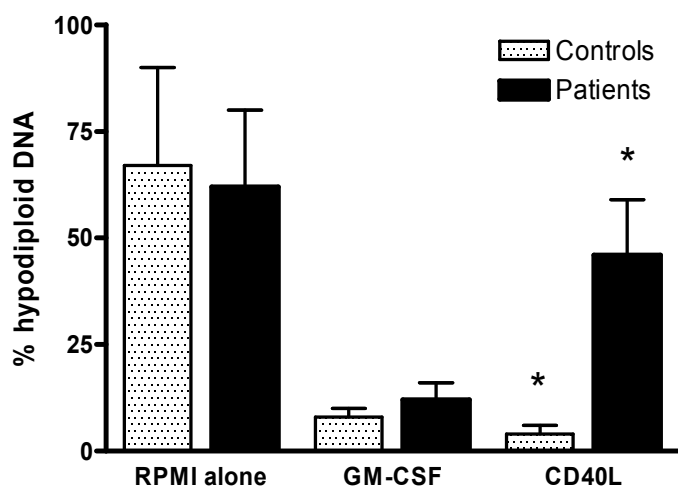


Figura 5. La capacità di prevenire l'apoptosi dei monociti mediata dal CD40L è ridotta in corso di sepsi. Le PBMC sono state ricavate da 13 pazienti settici al giorno 7. La percentuale di DNA ipodiploide è stata analizzata al FACS previa marcatura con propidio ioduro. A differenza del GM-CSF, il CD40L non è in grado di prevenire l'apoptosi nei settici.

Bibliografia

¹ American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74

² 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):530-8

³ Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* (2001) 29 (7): 1303 -1310.

⁴ Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD: National Vital Statistics Reports (serial online). National Vital Statistics (2002).

⁵ Salvo I, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piateda R, Wolfler A, Montani C, Magni E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 1995 Nov;21 Suppl 2:S244-9

⁶ Gruppo italiano per gli interventi in terapia intensiva Continuous quality improvement in intensive care medicine. The GiViTI Margherita Project - Report 2005 *Minerva Anestesiol.* 2006 Jun;72(6):419-32

⁷ Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R., Payen, D., Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators (2006) Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* 34, 344 –353.

⁸ 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 (16): 1546 -1554

⁹ Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):699-709

¹⁰ Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M; Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1368-77.

¹¹ Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey

M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1):296-327.

¹² Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985). "APACHE II: a severity of disease classification system". *Critical Care Medicine* 13: 818–29

¹³ Jean-Roger Le Gall, MD; Stanley Lemeshow, PhD; Fabienne Saulnier, MD. (1993). A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA*. 1993;270:2957-2963

¹⁴ The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):707-10

¹⁵ Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348 (2): 138 -150

¹⁶ Sepsis: state of the art. Gattinoni L, Vagginelli F, Taccone P, Carlesso E, Bertoja E. *Minerva Anesthesiol*. 2003 Jun;69(6):539-54, 554-61.

¹⁷ Cellular dysfunction in sepsis. Singer M. *Clin Chest Med*. 2008 Dec;29(4):655-60, viii-ix.

¹⁸ Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63-78

¹⁹ Munford RS, Pugin J (2001) Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 163:316-321.

²⁰ Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. *World J Surg*. 1996 May;20(4):454-9.

²¹ Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. Volk HD, Reinke P, Döcke WD. *Chem Immunol*. 2000;74:162-77

²² Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive. Care. Med.* 32:1175-83

²³ Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mougin B, Monneret G (2006) Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol. Lett.* 106:63-71.

²⁴ Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. Haas JG, Baeuerle PA, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock HW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):9563-7

²⁵ Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. Munoz C, Misset B, Fitting C, Blériot JP, Carlet J, Cavaillon JM. *Eur J Immunol.* 1991 Sep;21(9):2177-84

²⁶ Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. *Blood.* 1995 Mar 1;85(5):1341-7

²⁷ Tschoeke SK, Moldawer LL (2005) Human leukocyte antigen expression in sepsis: what have we learned? *Crit. Care Med.* 33:236-7

²⁸ Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. González-Roldán N, Ferat-Osorio E, Aduna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, Astudillo-de la Vega H, Sánchez-Fernández P, Arriaga-Pizano L, Villasis-Keever MA, López-Macías C, Isibasi A. *World J Gastroenterol.* 2005 Dec 21;11(47):7473-9

²⁹ Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, Gerlitz S, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ (2003) Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:840-6.

³⁰ Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, P. E. Swanson, R. E. Schmiege, Jr, J. J. Hui, K. C. Chang, D. F. Osborne, B. D. Freeman, J. P. Cobb, T. G. Buchman and I. E. Karl. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans *J. Immunol.* 166:6952-6963

³¹ Choudhry, M. A., S. Ahamad, K. D. Thompson and M. M. Sayeed. 1994. T-lymphocyte Ca²⁺ signaling and proliferative responses during sepsis. *Shock.* 1:267-272

³² Changes in dendritic cell function in the immune response to sepsis. Cell- & tissue-based therapy. Huang X, Venet F, Chung CS, Lomas-Neira J, Ayala A. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Jul;7(7):929-38.

³³ Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. Spellberg B, Edwards JE Jr. *Clin Infect Dis.* 2001 Jan;32(1):76-102. Epub 2000 Dec 15

³⁴ Cavaillon JM, Adib-Conquy M (2006) Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care* 10:233.

-
- ³⁵ Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD et al. : Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit. Care Med. (1999) 27 (7): 1230 - 1251
- ³⁶ Guisset O, Dilhuydy Ms, Thiebaut R et al. : Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. Intensive Care Med. (2007) 33 (1): 148 -152.
- ³⁷ Voll RE, Hermann M, Roth EA, et al. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature.390:350-1
- ³⁸ Hartemink, K. J., M. A. Paul, J. J. Spijkstra, A. R. J. Girbes and K. H. Polderman. 2003. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? Intensive Care Med. 29:2068-2071
- ³⁹ von Müller, L., A. Klemm, M. Weiss, M. Schneider, H. Suger-Wiedeck, N. Durmus, W. Hampl and T. Mertens. 2006. Active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. Emerg Infect Dis 12:1517-22
- ⁴⁰ Pugin J (2007) Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. Novartis. Found. Symp. 280:21-7
- ⁴¹ Effects of coupled plasma filtration adsorption on immune function of patients with multiple organ dysfunction syndrome. Mao HJ, Yu S, Yu XB, Zhang B, Zhang L, Xu XR, Wang XY, Xing CY. Int J Artif Organs. 2009 Jan;32(1):31-8
- ⁴² Coupled plasma filtration adsorption: rationale and perspectives in septic shock. Page M, Rimmelé T. Can J Anaesth. 2008 Dec;55(12):847-52.
- ⁴³ .Mengozzi M, Ghezzi P. 1993. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. Eur Cytokine netw.4:89-98
- ⁴⁴ .Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, et al. 2001. Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. Immunol Res.24:273-287
- ⁴⁵ Rayhane, N., C. Fitting, O. Lortholary, F. Dromer and J. M. Cavillon. 2000. Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. Infect Immun. 68:3748-53
- ⁴⁶ Lehner, M. D., J. Ittner, D. S. Bundschuh, N. van Rooijen, A. Wendel and T. Hartung. 2001. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. Infect Immun. 69:463-71
- ⁴⁷ Brunda, M. 1994. Interleukin-12. J. Leukocyte Biol. 55:280-288

⁴⁸ Greenberger, M. J., S. L. Kunkel, R. M. Strieter, N. W. Lukacs, J. Bramson, J. Gauldie, F. L. Graham, M. Hitt, J. M. Danforth and T. J. Standiford. 1996. IL-12 gene therapy protects mice in lethal *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol.* 157:3006-3012

⁴⁹ Metzger, D. W., R. Raeder, V. H. Van Cleave and M. D. Boyle. 1995. Protection of mice from group A streptococcal skin infection by interleukin-12. *J Infect Dis.* 171:1643-5

⁵⁰ Shelley, O., Murphy, T., Paterson, H., Mannick, J. A., Lederer, J. (2003) Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 20, 123–129.

⁵¹ Hotchkiss R. S., Chang K. C., Swanson P. E., Tinsley K. W., Hui J. J., Klender P., Xanthoudakis S., Roy S., Black C., Grimm E., et al. (2000) Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat. Immunol.* 1, 496–501.

⁵² Christou NV, Meakins JL, Gordon J, Yee J, Hassan-Zahraee M, Nohr CW, Shizgal HM, MacLean LD (1995) The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients: 20 years later. *Ann. Surg.* 222:534-46.

⁵³ Spolarics Z, Siddigi M, Siegel JH, Garcia ZC, Stein DS, Denny T, Deitch EA (2003) Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit. Care Med.* 31: 1722-9.

⁵⁴ Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C (2007) Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit. Care. Med.* 35:794-801

⁵⁵ Alderson, M. R., R. J. Armitage, T. W. Tough, L. Strockbine, W. C. Fanslow, and M. K. Spriggs. 1993. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* 178:669-674

⁵⁶ The biology of the human ligand for CD40. Spriggs MK, Fanslow WC, Armitage RJ, Belmont J. *J Clin Immunol.* 1993 Nov;13(6):373-80.

⁵⁷ Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski, E. A. Clark, C. A. Smith, K. H. Grabstein, D. Cosman and M. K. Spriggs. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature.* 357:80-82

⁵⁸ Graf, D., U. Korthauer, H. W. Mages, G. Senger and R. A. Kroczeck. 1992. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur. J. Immunol.* 22:3191-3194

⁵⁹ Clark LB, Foy TM, Noelle RJ. 1996. CD40 and its ligand. *Adv Immunol.* 63:43-78.

⁶⁰ 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

-
- ⁶¹ Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. 1992. Immunodeficiency with hyperIgM (HIM). *Immunodeficiency Rev.*3:101-22
- ⁶² O'Sullivan, B. and R. Thomas. 2003. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol.* 23:83-107
- ⁶³ Kiener, P. A., P. Moran-Davis, B. M. Rankin, A. F. Wahl, A. Aruffo and D. Hollenbaugh. 1995. Stimulation of CD40 with purified soluble gp 39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* 155:4917-25
- ⁶⁴ Brossart, P., F. Grunebach, G. Stuhler, V. L. Reichardt, R. Möhle, L. Kanz and W. Brugger. 1998. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 11:4238-47
- ⁶⁵ Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.*180:1263-72.
- ⁶⁶ Grewal, I. S. and R. A. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 16:111-135
- ⁶⁷ Nolan, A., M. D. Weiden, Y. Hoshino and J. A. Gold. 2004. CD40 but not CD154 knockout mice have reduced inflammatory response in polymicrobial sepsis: a potential role for Escherichia coli heat shock protein 70 in CD40-mediated inflammation in vivo. *Shock.*22:538-542
- ⁶⁸ Monocyte CD40 expression in severe sepsis. Sugimoto K, Galle C, Preiser JC, Creteur J, Vincent JL, Pradier O. *Shock.* 2003 Jan;19(1):24-7.
- ⁶⁹ Würtzen PA, Nissen MH, Claesson MH. 2001. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand J. Immunol.* 53:579-87
- ⁷⁰ Damle, N.K., K. Klussman, P. S. Linsley and A. Aruffo. 1992. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 148:1985-1992
- ⁷¹ Sinistro, A., C. Ciaprini, S. Natoli, E. Sussarello, F. Calò Carducci, C. Almerighi, M. Capozzi, F. Bolacchi, G. Rocchi and A. Bergamini. 2007. Lipopolysaccharide Desensitizes Monocytes-Macrophages to CD40L Stimulation. *Immunology.* 122:362-370
- ⁷² Fried, J., A. G. Perez and B. D. Clarkson. 1978. Rapid hypotonic method for flow cytometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem. Cytochem.* 26:921-33

-
- ⁷³ Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi. 1991. A rapid and simple method for measuring tymphocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth.* 139:271-9
- ⁷⁴ Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel and M. M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 345:1098-1104
- ⁷⁵ Fisher, C. J. Jr, J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein and E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 334:1697-1702.
- ⁷⁶ Fearon, D.T. and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response *Science* 272:50-53
- ⁷⁷ Kielian, T., E. D. Bearden, A. C. Baldwin and N. Esen. 2004. IL-1 and TNF- α play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63:381-396
- ⁷⁸ Ayala, A., M. A. Urbanich, C. D. Herdon and I. H. Chaudry. 1996 Is sepsis-induced apoptosis associated with macrophage dysfunction? *J. Trauma.* 40:568-573
- ⁷⁹ Gallinaro, R. N., W. Naziri, K. M. McMasters, J. C. Peyton and W. G. Cheadle. 1994. Alteration of mononuclear cell immune-associated antigen expression, interleukin-1 expression, and antigen presentation during intra-abdominal infection. *Shock.* 1:130-134.
- ⁸⁰ Pryjma, J., M. Zembala, J. Baran, M. Ernst and H-D. Flad. 1995. Elimination of monocytes from cultures activated with recall antigens. *Immunol Lett.* 46:229-235