

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
DERMATOLOGIA SPERIMENTALE**

XXI Ciclo

Coordinatore: Prof. Fabio Ayala

TESI DI DOTTORATO

OSTEOPONTINA:

UN NUOVO MARKER DELLA PSORIASI

TUTOR

Chiar.mo

Prof. Fabio Ayala

CANDIDATA

Dott. Maria Donnarumma

INDICE

▪ Scopo della ricerca	pag.	2
▪ 1. Introduzione		
• 1.1 OSTEOPONTINA (OPN)	pag.	4
• 1.1.1 Proprietà strutturali e funzionali.....	pag.	4
• 1.1.2 OPN e flogosi	pag.	7
• 1.1.3 OPN e tumori.....	pag.	8
• 1.1.4 OPN e angiogenesi.....	pag.	9
• 1.2 PSORIASI.....	pag.	10
• 1.2.1 Insorgenza e fattori etnici.....	pag.	10
• 1.2.2 Fattori genetici e ambientali.....	pag.	11
• 1.2.3 Manifestazione cliniche della psoriasi.....	pag.	12
• 1.2.4. PATOGENESI.....	pag.	16
• 1.2.4.1 Cellule dendritiche nella psoriasi.....	pag.	16
• 1.2.4.2 Migrazione delle cellule T dagli organi effettori....	pag.	17
• 1.2.4.3 Macrofagi nella psoriasi.....	pag.	18
• 1.2.4.4. Mastociti nella psoriasi.....	pag.	19
• 1.2.4.5 Sottopopolazioni di cellule T.....	pag.	20
• 1.2.5 Terapia.....	pag.	24
▪ 2. Materiali e Metodi		
• 2.1 Campioni di sangue.....	pag.	27
• 2.2 Separazione dei PBMC da sangue periferico.....	pag.	27
• 2.3 Biopsie cutanee.....	pag.	28
• 2.4 Analisi mediante RT-PCR.....	pag.	29
• 2.5 Analisi immunohistochimica.....	pag.	33
• 2.6 Analisi statistica	pag.	34
▪ 3. Risultati	pag.	35
▪ 4. Discussione e Conclusioni	pag.	55
▪ 5. Bibliografia	pag.	60

SCOPO DELLA RICERCA

L'osteopontina è una fosfoglicoproteina della matrice ossea, espressa da vari tipi di cellule nelle quali attiva adesione, chemiotassi e trasduzione di segnali legandosi a molecole biologicamente attive. Possiede effetti anti- e proinfiammatori, come si evince dalla sua espressione su cellule T ed NK e sui macrofagi. L'osteopontina, coinvolta nel riassorbimento osseo, viene prodotta e depositata dagli osteoblasti nella matrice. In seguito al legame con l'integrina $\alpha\beta3$, essa induce chemioattrazione degli osteoclasti sulla matrice e inibisce la neoapposizione di tessuto osseo da parte degli osteoblasti. Alcuni tumori secernono osteopontina per la propria sopravvivenza ed elevati livelli sierici della molecola sono spesso associati a metastasi ossee. Uno dei ruoli che gioca l'OPN è la polarizzazione dei linfociti T helper (Th) in cellule "type 1". Il coinvolgimento dell'OPN nell'insorgenza della psoriasi non è mai stato preso in esame. Lo scopo del lavoro è stato quello di analizzare il possibile ruolo dell'OPN nella manifestazione della

psoriasi. Gli studi hanno chiaramente evidenziato che tale molecola è espressa nel sangue periferico e nella cute di pazienti affetti da psoriasi. Inoltre, è stato valutato l'andamento di OPN nei pazienti psoriasici sottoposti a trattamenti con anti-TNF. La diminuzione di tale molecola nei pazienti dopo trattamento con i bloccanti del TNF, indica un potenziale coinvolgimento dell'OPN nella patogenesi della psoriasi.

Questo studio mette in luce un nuovo ruolo dell'OPN suggerendo che tale proteina possa rappresentare una potenziale molecola nella progressione della malattia ed essere un nuovo target per strategie terapeutiche innovative nei pazienti psoriasici.

1. INTRODUZIONE

1.1 OSTEOPONTINA (OPN)

1.1.1 Proprietà strutturali e funzionali

L'osteopontina (OPN) è una fosfoglicoproteina di circa 60 KDa, costituita da 314 aminoacidi (1) (Fig. 1). Essa rappresenta una componente della matrice ossea extracellulare e, mediante la sequenza amminoacidica Arg-Gly-Asp (2), è capace di mediare l'adesività degli osteoblasti, osteoclasti e fibroblasti con alcune integrine (αv - β_1 , $-\beta_3$, $-\beta_5$) e al tempo stesso di implementare la chemiotassi (3). L'OPN è stata identificata dapprima come prodotto di secrezione di cellule tumorali maligne e denominata "2ar", successivamente è stata riconosciuta su cellule CD4+ con il nome "Eta-1" (*early T-cell activation-1*), il cui m-RNA era altamente espresso in linfociti T murini attivati dalla concanavallina-A, un mitogeno ad azione aspecifica (4). L'OPN viene espressa da diversi tipi di cellule tra cui osteoblasti, osteoclasti, macrofagi, linfociti T attivati, cellule muscolari lisce, epiteliali e gangliari ed è una componente strutturale di alcuni tessuti quali midollo, placenta, rene ed epiteli secretivi (5). In forma solubile è presente in vari liquidi biologici tra cui sangue,

urine e latte (6), e partecipa al rimodellamento osseo e ad altri eventi fisiopatologici come l'angiogenesi, la cicatrizzazione e alcuni processi flogistici dell'apparato osteo-scheletrico.

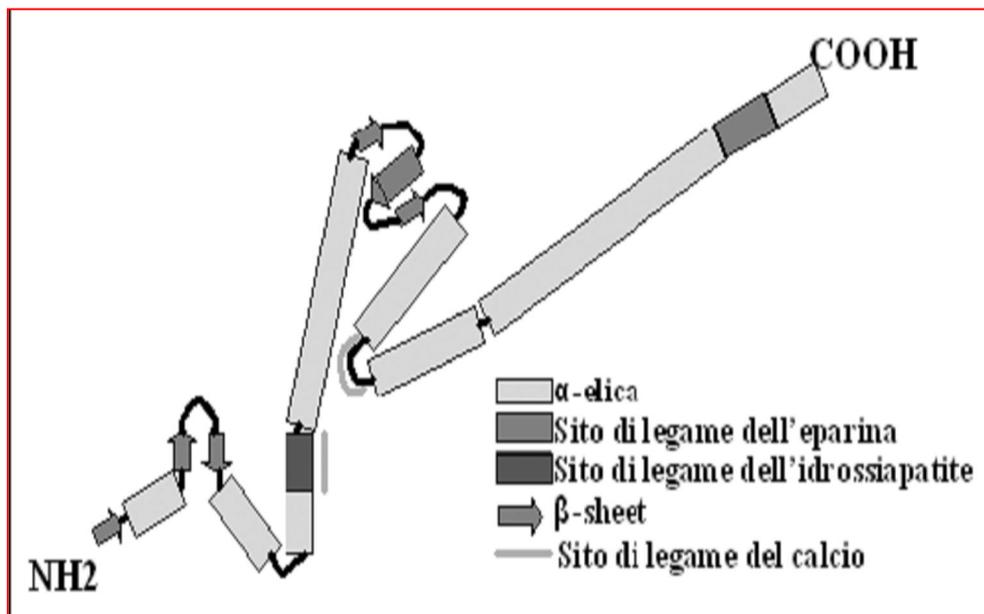


Figura 1. Struttura conformazionale dell'osteopontina (OPN)

1.1.2 OPN e flogosi

Nei processi flogistici l'OPN si è rivelata una molecola ad attività sia pro- che anti-infiammatoria. Nell'ambito delle lesioni flogistiche espleta azione anti-infiammatoria inibendo la produzione di ossido nitrico (NO) (7). Per quanto riguarda l'effetto pro-infiammatorio, l'OPN stimola la chemiotassi di cellule T e macrofagi. In particolare, favorisce la migrazione dei macrofagi ed è implicata nella formazione dei granulomi, in alcune malattie granulomatose, tra cui la sarcoidosi e la tubercolosi (2). Infatti, l'iniezione sottocutanea di OPN provoca accumulo di macrofagi nella sede di inoculazione (8). Il ruolo biologico dell'OPN nella risposta immune non è ancora ben definito. Infatti, mentre espleta azione di reclutamento dei macrofagi ed attiva la produzione di citochine dell'immunità cellulo-mediata, l'OPN svolge anche attività citotossica se prodotta da cellule NK e cellule T attivate, nelle quali viene appunto denominata Eta-1. In questi modelli funzionali l'OPN è apparentemente in grado di polarizzare in senso T helper 1 la risposta immunitaria (4). Per la molteplicità delle sue funzioni biologiche, l'OPN è stata studiata nell'ambito di numerose

patologie con implicazioni flogistiche e immunitarie tra le quali artrite reumatoide, sclerosi multipla e sarcoidosi, nonché in malattie del distretto osseo quali osteoartriti ed osteoporosi (9). In tali malattie è stata osservata una correlazione lineare dei livelli circolanti dell'OPN con la gravità clinica della malattia (10).

1.1.3 OPN e tumori

Elevati livelli sierici di OPN sono stati più volte dimostrati in neoplasie a diffusione ossea quali i carcinomi della mammella, della prostata, della tiroide e del polmone (11). Il valore medio dell'OPN sierica in un gruppo di volontari sani è stato valutato intorno a 90 ng/ml, mentre esso è di 142 ng/ml in pazienti con carcinoma della prostata e carcinoma mammario (12). Alcuni studi ipotizzano che la sua interazione con $\alpha v \beta 3$ ed altre molecole funzionali (tra cui il CD44) favorisca l'adesione, la migrazione e la crescita delle metastasi proteggendole al tempo stesso dalla sorveglianza immunologica e dall'apoptosi (13).

1.1.4 OPN e angiogenesi

L'OPN è apparentemente coinvolta anche nell'angiogenesi tumorale (14). Nel mieloma multiplo, le cellule B circolanti nel sangue periferico migrano specificamente al midollo osseo ove stabiliscono strette interazioni (grazie al loro ampio corredo di molecole di adesione) con le cellule stromali del microambiente, ricevendo da queste ultime i segnali appropriati per proliferare e differenziare in plasmacellule mature (15). In questo processo svolgono un ruolo cruciale numerose citochine prodotte tanto dalle cellule mielomatose che dalle cellule stromali. L'adesione integrino mediata delle cellule mielomatose alle cellule stromali induce l'aumentata trascrizione e secrezione dell' interleuchina (IL)-6, del VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e del TNF- α (*tumour necrosis factor- α*). Queste citochine hanno funzione di primaria rilevanza ai fini della crescita, progressione e diffusione del mieloma multiplo (16). Il VEGF sembra occupare un ruolo centrale nell'angiogenesi, sul quale agiscono, come induttori o promotori, numerosi fattori e condizioni: ad esempio fattori di crescita cellulare come TNF- α , HGF (*hepatocyte growth factor*),

EGF (*epidermal growth factor*), G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) e citochine come IL-1, IL-6 e IL-8.

L'OPN è un'altra molecola coinvolta nell'angiogenesi, che oltre ad essere coinvolta nel riassorbimento osseo, si correla alla densità dei microvasi della zona midollare, in quanto si lega all'integrina $\alpha\beta3$ inibendo l'apoptosi delle cellule endoteliali *in vitro* mediante attivazione di NFkB, con conseguente aumento della rete vascolare ed incremento della crescita tumorale (9).

1.2 PSORIASI

1.2.1 Insorgenza e fattori etnici

La *psoriasis vulgaris* è una malattia infiammatoria iperproliferativa della cute, dovuta a fattori genetici e ambientali. La sua eziologia è ancora sconosciuta. Il 2,5% della popolazione mondiale ne è affetta (17), la sua incidenza varia in rapporto a fattori climatici, essendo meno frequente nelle zone tropicali e subtropicali rispetto a quelle a clima temperato, e a fattori etnici, essendo più frequente nei paesi del Nord Europa rispetto a quelli dell'Europa meridionale. La psoriasi non mostra predilizioni di sesso, ma tende a comparire più precocemente nel sesso

femminile, può insorgere a qualsiasi età, sebbene più raramente nella prima infanzia e nell'età senile.

1.2.2 Fattori genetici e ambientali

In quanto all'età di insorgenza si distinguono una *psoriasi tipo I*, con un picco d'insorgenza tra i 16 e i 22 anni, forma ereditaria frequentemente associata al complesso maggiore di istocompatibilità umano (Human leukocyte antigen: HLA) (18), spesso estesa che si protrae per tutta la durata della vita attraverso varie fasi di remissione e riacutizzazione, e una *psoriasi tipo II*, con un picco d'insorgenza tra i 55 e i 60 anni, forma sporadica debolmente associata all'HLA. Numerosi studi su famiglie affette da psoriasi confermano invariabilmente la forte predisposizione genetica dei soggetti malati che possono sviluppare la malattia. Non meno importante è la componente ambientale che induce o provoca la riesacerbazione della malattia. I fattori ambientali che più frequentemente agiscono da stimolo induttore sono le faringiti batteriche, le infezioni da HIV, l'uso di alcuni farmaci, l'abuso di alcool e lo stress. L'approccio genetico ha portato alla mappatura di un gruppo di sei loci genici che sono associati alla psoriasi detti

PSORS1-2-3-4-5-6. All'interno di questi loci, i geni responsabili della patologia non sono stati ancora identificati univocamente. I candidati più studiati sono due geni identificati nel locus PSORS1. Il primo codifica per un particolare allele dell'HLA di classe I, ovvero l'HLA-Cw*0602, che in base alla sua espressione distingue la *psoriasi tipo I* dalla *psoriasi tipo II*, (19) mentre il secondo codifica per la corneodesmosina, una proteina di adesione espressa dai cheratinociti (20). Una delle difficoltà nell'identificazione di geni responsabili di patologie complesse come la dermatite atopica e la psoriasi risiede nella loro natura di malattie multigeniche in cui la presenza di un polimorfismo in un determinato allele ha un effetto moltiplicativo sul fenotipo, nel caso in cui si verifichi la copresenza di un secondo polimorfismo in un altro gene di suscettibilità. In queste condizioni si verifica ciò che viene definito interazione gene-gene o epistasi.

1.2.3 Manifestazioni cliniche della psoriasi

Le tipiche placche psoriasiche sono aree in cui la lesione, ben demarcata dalla circostante cute non affetta, appare come una zona eritematosa coperta di scaglie cornee biancastre. La cute

nelle aree lesionali è fortemente ispessita, poichè i cheratinociti proliferano molto più rapidamente ed è caratterizzata da ampie papille epidermiche che si approfondano nel derma; quest'ultimo è particolarmente ricco di vasi dilatati e tortuosi e di un infiltrato infiammatorio eterogeneo costituito da linfociti T, neutrofili cellule dendritiche, macrofagi e mastociti. La superficie epiteliale è debolmente aderente e produce squame. Nel 20% dei pazienti, oltre alle lesioni cutanee, si manifestano sintomi alle articolazioni simili a quelli riscontrati nell'artrite reumatoide. Le lesioni psoriasiche possono presentarsi in qualunque distretto cutaneo ma hanno una netta predilezione per le superfici estensorie delle estremità (particolarmente le zone subito al di sotto dei gomiti e delle ginocchia), il cuoio capelluto, il dorso e la regione sacrale. Più raramente colpite sono le regioni palmo-plantari, il viso, le regioni genitali e le superfici flessorie in genere. Le chiazze psoriasiche possono avere varia conformazione, possono essere puntiformi (*psoriasi puntata*), di forma lenticolare (*psoriasi guttata*), a forma di moneta (*psoriasi mummulare*), o formare delle grandi chiazze (*psoriasi a placche*) (21), in questo caso la manifestazione clinica è tipica della forma più comune di psoriasi

(22). Inoltre, le chiazze possono ulteriormente estendersi fino a ricoprire gran parte del tegumento e persino l'intero ambito cutaneo (*psoriasi eritrodermica*) (21). Le lesioni psoriasiche oltre ad essere la causa di problemi fisici, incidono anche a livello psicologico e sociale nei pazienti affetti da tale malattia (23). Anche il cuoio capelluto è frequentemente interessato; le chiazze sono più o meno estese fino a ricoprire tutto il cuoio capelluto e sono sempre caratterizzate da una netta delimitazione e dall'abbondante presenza di squame secche che ricoprono una superficie eritematosa non essudante. I capelli attraversano le squame senza presentare alcuna alterazione. Le unghie sono anch'esse colpite e alterate (*onicopatia psoriasica*) con presenza di depressioni puntiformi (*pits ungueale*) che rendono irregolare la superficie dell'unghia e la fanno assomigliare ad un ditale da cucito. Nelle forme gravi di psoriasi la lamina ungueale appare opaca, ispessita nel suo bordo libero e spesso distaccata (24).



Figura 2. Psoriasi a placche

1.2.4 PATOGENESI

1.2.4.1 Cellule dendritiche nella psoriasi

Le risposte immunitarie T specifiche richiedono l'attivazione di cellule T attraverso cellule presentanti l'antigene (*antigen-presenting cells*: APCs). Le più efficienti APCs sono le cellule dendritiche (*dendritic cells*: DCs), che in seguito all'attivazione da parte di uno stimolo esogeno o endogeno maturano e migrano nei linfonodi periferici, dove avviene l'attivazione dei linfociti T che così diventano cellule T specifiche per determinati antigeni estranei o in alcuni casi per antigeni self. In seguito alla maturazione dei linfociti T si ha la differenziazione in popolazioni di cellule effettrici con uno specifico pattern citochinico. Nella psoriasi, l'epidermide e il derma mostrano un elevato numero di DCs, come le cellule di Langerhans e le DCs del derma (25, 26). Nella psoriasi l'attività biologica delle cellule di Langerhans sembra essere caratterizzata da una compromessa capacità di migrare. La motilità delle cellule di Langerhans della cute non coinvolta dalla lesione psoriasica è apparsa ridotta in risposta a citochine proinfiammatorie come il TNF e l'IL-1 β rispetto alla cute di soggetti normali (27). Le

cellule dendritiche sono stimulate da segnali dell'immunità innata tramite un pattern di recettori, tra cui i recettori Toll-like. Un altro importante recettore di superficie delle DC è il CD91, il recettore per le proteine heat shock (HSP) (28). Anche se ancora non si è a conoscenza dell'antigene presentato dalle DC, che scatena la psoriasi, è indubbio il ruolo chiave delle DCs nella manifestazione e mantenimento della patologia. Le cellule dendritiche attivate rilasciano IL-12, citochina chiave del pathway infiammatorio "Type 1", in quanto promuove la differenziazione delle cellule T naive in cellule T helper 1 (Th1) e T citotossiche 1 (Tc1), produttori interferone- γ (IFN- γ) e TNF- α (29)

1.2.4.2 Migrazione delle cellule T dagli organi effettori

La migrazione dei linfociti T attivati dalla periferia al tessuto sembra essere un passaggio essenziale per lo sviluppo e il mantenimento della placca psoriasica. Numerosi studi hanno evidenziato l'esistenza di interazioni tra i recettori specifici del tessuto e i linfociti che spiegano come i linfociti del sangue periferico entrino nella cute psoriasica. Le cellule T per risiedere

nella cute psoriasica devono possedere i markers *lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 (30) e il *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA) (31). Nelle placche psoriasiche sono presenti diversi tipi di cellule, incluse le cellule T, che esprimono anche la E-selectina, l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), il *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), e l'integrina $\alpha E\beta 7$ rilevanti per la migrazione e l'*homing* nella cute psoriasica. La migrazione delle cellule dell'immunità nella cute psoriasica, invece, è dovuta all'espressione di recettori per le chemochine quali CCR4, CCR5, CCR6 e CXCR3 (32, 33). Il potenziale ruolo di queste molecole nella patogenesi della psoriasi è stato confermato dalla somministrazione di terapie basate sul blocco della migrazione e della residenza delle cellule T nella cute psoriasica (34).

1.2.4.3 Macrofagi nella psoriasi

Recenti studi istologici sulla psoriasi hanno dimostrato la presenza di linfociti T e di macrofagi nell'infiltrato infiammatorio della placca psoriasica. Queste cellule sono localizzate nel derma superficiale vicino alle papille. L'esatto ruolo dei macrofagi nella

patogenesi della psoriasi rimane ancora sconosciuto anche perché numerosi lavori scientifici hanno mostrato difficoltà nel distinguere le cellule dendritiche del derma dai classici macrofagi. Due recenti pubblicazioni dedicate alla psoriasi indotta nei topi suggeriscono che i macrofagi sono indispensabili per generare i processi infiammatori legati alla psoriasi. Entrambi gli studi suggeriscono che i macrofagi sono le cellule che partecipano, in modo rilevante, al rilascio di TNF. Infatti se l'azione del TNF è bloccata, la cute psoriasica mostra miglioramenti e sia il numero di macrofagi infiltranti la cute sia i livelli di TNF si riducono, evidenziando che il tale citochina è responsabile di un feedback positivo che è collegato con la manifestazione della psoriasi (35, 36). Inoltre è stato supposto che l'interazione cellule T-macrofagi sia la chiave della persistente infiammazione della patologia. Le cellule T e i macrofagi possono essere reciprocamente capaci di promuovere o attenuare il danno tissutale.

1.2.4.4 Mastociti nella psoriasi

Da 40 anni è stata descritta la presenza di mastociti attivate nelle lesioni psoriasiche (37). Later, Schubert e Christophers (38) hanno descritto nei loro lavori che i mastociti si infiltrano nella placca psoriasica prima dei macrofagi, dei linfociti T o dei neutrofili. Allo stesso modo dei macrofagi, i mastociti producono una notevole quantità di TNF, IFN- γ , IL-8 e una moltitudine di altri mediatori, come il VEGF (39, 40). Analisi dettagliate mostrano che i mastociti rilasciano i mediatori in pochi minuti, creando in breve tempo l'ambiente adatto per il reclutamento di neutrofili dell'immunità innata e linfociti T della risposta adattativa (41, 42).

1.2.4.5 Sottopopolazioni di cellule T

Nella cute psoriasica sono presenti sia la sottopopolazione linfocitaria T CD4+ che quella CD8+. Le cellule T CD4+ si infiltrano preferenzialmente nel derma, mentre i linfociti T CD8+ sono presenti principalmente nell'epidermide (43). Le cellule T CD8+ situate nell'epidermide esprimono sulla propria superficie il marker CD103, una integrina $\beta 7$ che facilita la migrazione nell'epidermide (44). La maggior parte delle cellule T che

infiltrano la cute psoriasica esprimono LFA-1 e CLA, e in particolare è stato osservato che le cellule T CLA+ aumentano nel sangue periferico durante la fase acuta della psoriasi (45). Sebbene, nella placca psoriasica, siano presenti entrambi le sottopopolazioni di cellule T, dati sperimentali suggeriscono che le cellule T CD4+ giochino un ruolo chiave nella patogenesi della psoriasi. Anticorpi contro il CD4 migliorerebbero lo stato infiammatorio della psoriasi (46, 47). e studi su cute trapiantata mostrano che le cellule T CD4+, ma non le cellule T CD8+, sono capaci di indurre la psoriasi nella cute sana trapiantata ai pazienti psoriasici (48). I dati dei vari studi non provano che la psoriasi sia una patologia guidata esclusivamente dalle cellule T, ma stabiliscono con chiarezza che, almeno nel caso della psoriasi di tipo I, le cellule T antigene specifiche si infiltrino nella lesione allo stesso modo di come avviene per altre patologie, come ad esempio l'infezione e l'ipersensibilità di tipo ritardato (49). La prima prova evidente del ruolo centrale che i linfociti T hanno nella patogenesi della psoriasi deriva da pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. In pazienti che non hanno mai avuto la psoriasi, dopo aver ricevuto il trapianto di midollo osseo da

donatori con psoriasi, sviluppano la patologia (50). Un'ulteriore conferma dell'importanza dei linfociti T nella psoriasi è data dal ruolo centrale che svolgono le citochine da essi rilasciate (51). Le cellule Th1 e Tc1 rilasciano varie citochine, tra cui l'IFN- γ e il TNF- α (29). L'IFN- γ up-regola le chemochine e le molecole d'adesione permettendo un maggiore reclutamento dei linfociti nel sito infiammatorio. Inoltre questa citochina attiva i cheratinociti, aumentandone la proliferazione, e le DCs che rilasciano IL-12 e IL-23. Il TNF- α , invece, è capace di modulare la produzione di altri mediatori flogogeni quali l'IL-1, l'IL-6, il GM-CSF o di chemochine, quale l'IL-8, nonché di favorire l'espressione di molecole di adesione intercellulare (52). Una over-espressione di TNF- α nella cute lesionale psoriasica induce il reclutamento di altre citochine pro-infiammatorie ed è quindi, in parte responsabile dell'innescò sia della proliferazione cheratinocitaria che della persistenza della lesione psoriasica (53). Recentemente oltre alle sottopopolazioni di linfociti Th1 sono stati identificati dei linfociti T, che rilasciano IL-17 e IL-22 e quindi sono stati denominati Th17. L'IL-17 è una citochina chiave nelle malattie infiammatorie autoimmuni indotte in

modelli animali (54, 55). Esperimenti in vivo mostrano che le cellule T diventano cellule Th17 in presenza di IL-6 e IL-23 (55). Poiché la psoriasi sembra avere le stesse caratteristiche di alcune malattie autoimmuni potrebbe essere considerata una malattia infiammatoria autoimmune indotta da linfociti Th1/Th17 (56, 57). Dati sperimentali, osservati in malattie autoimmuni in modelli animali, dimostrano che lo stato delle malattie autoimmuni migliora quando anticorpi monoclonali bloccano la subunità p40 comune all'IL-12/IL-23 o quando viene determinato uno switch dai linfociti Th1 a linfociti Th2 (57, 58). E' stato dimostrato che anticorpi contro l'IL-12/IL-23, che sono le citochine chiave dell'induzione di Th1 e del mantenimento della risposta Th17, migliorano le manifestazioni cliniche di pazienti affetti da psoriasi (59). I numerosi dati riportati sui macrofagi, le DCs e i linfociti T convergono sul concetto che lo sviluppo della malattia dipende dalle cellule Th1 e Th17 che infiltrano la cute psoriasica e che stimolano i macrofagi e le cellule dendritiche a rilasciare mediatori come il TNF. I vari mediatori sostengono l'infiammazione e causano un enorme proliferazione dei cheratinociti (60, 61).

1.2.5 Terapia

Nelle varie teorie e nei modelli proposti per spiegare lo sviluppo della placca psoriasica sono stati valutati i singoli contributi di ogni tipo cellulare dell'epidermide e del derma, che partecipano all'infiammazione cutanea. Inizialmente l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sull'aspetto iperproliferativo dell'epidermide psoriasica e sullo studio di terapie volte al blocco della crescita incontrollata dei cheratinociti della placca. L'uso di agenti antiproliferativi come l'arsenico e, più tardi, il methotrexate, fanno parte delle prime strategie terapeutiche contro l'iperplasia epidermica. In seguito il successo della terapia a base di immunosoppressori come la ciclosporina A, ha spostato l'attenzione dalle cellule residenti alle varie popolazioni di cellule del sistema immunitario reclutate nella cute, quali cellule dendritiche e sottotipi di linfociti T (62).

In aggiunta a questa tradizionale terapia i pazienti affetti da psoriasi, che presentano un elevato indice di gravità della malattia, indicato dal Psoriasis Area and Severity Index (PASI), e che non hanno risposto alla terapia tradizionale, possono essere trattati con farmaci capaci di agire bloccando direttamente i

recettori, le citochine e le cellule del sistema immunitario, che partecipano allo sviluppo della psoriasi. La terapia che utilizza questo tipo di farmaci è definita biologica (63). Tra i farmaci biologici in uso ci sono dei bloccanti del TNF. Questi farmaci anti-TNF sono usati nel trattamento di forme gravi di psoriasi, poiché inibiscono questa citochina chiave per l'insorgenza di tale patologia. Attualmente, sono usati tre diversi inibitori di TNF nel trattamento della psoriasi: l'anticorpo monoclonale infliximab, una chimera con catene costanti umane e catene variabili di topo, l'anticorpo monoclonale adalimumab, interamente umanizzato e l'etanercept una proteina di fusione tra una immunoglobulina umana e due recettori p75 del TNF. I due anticorpi monoclonali, infliximab e adalimumab legano il TNF in forma solubile e quando il TNF è legato al suo recettore. L'etanercept è una proteina che lega il TNF e ne impedisce l'attività biologica; è capace di indurre progressivi cambiamenti nel network delle citochine e chemochine delle lesioni psoriasiche, regolando le interazioni tra cellule T e DC residenti nella cute (52). L'infliximab e l'adalimumab hanno entrambi la capacità di legare sia la forma pro-TNF sulla superficie delle cellule che il TNF

quando è legato al suo recettore. In tal senso si forma un complesso che potrebbe modificare l'attività biologica delle cellule TNF⁺ o indurne l'apoptosi (64). La risposta alla terapia con i diversi farmaci bloccanti il TNF, che legano il TNF solubile o sui recettori delle cellule target, certamente indica il ruolo chiave di questa citochina nella patogenesi della psoriasi (63). Gli effetti dei farmaci anti-TNF sui pazienti psoriasici sono rappresentati sia da una down-regolazione delle ICAMs, con una conseguente diminuzione delle cellule infiltranti la cute, che dall'interferenza dell'attivazione delle cellule T, dovuta a una diminuzione dell'espressione delle citochine (65, 66).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campioni di sangue

I campioni di sangue sono stati prelevati in due fasi differenti. In un primo momento lo studio è stato condotto su 30 pazienti affetti da psoriasi a placche, reclutati da Aprile 2006 a Novembre 2007. Ai pazienti, per 1 mese non è stato somministrato nessun trattamento sistemico sia per la psoriasi che qualsiasi altra patologia. Sono stati prelevati anche 11 campioni di sangue da donatori sani ed usati come controlli. In una seconda fase dello studio sono stati prelevati campioni di sangue da 7 dei 30 pazienti che presentavano un PASI compreso tra 15 e 31 e che sono stati sottoposti a trattamento con farmaci biologici anti-TNF. Tutti i campioni di sangue sono stati prelevati in seguito alla sottoscrizione del consenso informato.

2.2 Separazione dei PBMC dai campioni di sangue

I PBMC sono stati separati da tutti i campioni di sangue eparinato mediante il metodo standard della centrifugazione differenziale su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (Biochrom Ag, Milan, Italy). Dopo la separazione dei PBMC, è stato

effettuato un primo lavaggio con il terreno di coltura RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 700 rpm per 10 minuti. E' stato eliminato il surnatante ed è stato eseguito un ulteriore lavaggio sempre con RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in terreno RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) per contare le cellule nella camera del Bürker previa colorazione con trypan blue (190 µl di trypan blue e 10 µl di campione) e ricentrifugato a 1000 rpm per 10 minuti. Al pellet ottenuto è stato aggiunto buffer di lisi del kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics, Milan, Italy) e Phosphate Buffer Solution (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) per procedere all'estrazione dell'RNA.

2.3 Biopsie cutanee

Le biopsie di cute sono state prelevate sia da pazienti psoriasici che da donatori sani con un punch di 4mm. I pazienti al momento del prelievo non erano sottoposti per 1 mese a nessun tipo di trattamento topico o sistemico per la psoriasi o altre patologie. Per uno stesso paziente è stata prelevata sia cute non lesionale che cute psoriasica. Le biopsie di cute non lesionale e di

cute psoriasica insieme a quelle di cute normale dei donatori sani sono state incluse in paraffina per effettuare l'analisi immunohistochimica oppure poste in buffer di lisi del kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics, Milan, Italy) con aggiunta di PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) per procedere all'estrazione dell'RNA. Tutte le biopsie sono state prelevate in seguito alla sottoscrizione del consenso informato.

2.4 Analisi mediante RT-PCR (Reazione a catena di polimerizzazione con trascrizione inversa).

L'RNA totale, estratto da 1×10^6 di PBMC di tutti i campioni di sangue e da 4mm di tutte le biopsie di cute mediante l'High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Milan, Italy), è stato retrotrascritto mediante la trascrittasi inversa Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Milan, Italy), ad una temperatura di 42°C per 45 minuti, adoperando un protocollo standard. Per una migliore estrazione dell'RNA dai tessuti, le biopsie sono state omogenizzate con un Tissue-Lyser (QIAGEN, Milan, Italy). Due μ l del DNA complementare (cDNA) sintetizzato sono stati amplificati in una miscela di reazione

contenente Tris-Hcl 10 mM a pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, dNTP 200 μM, 2.5 Unità di Taq DNA polimerasi (Roche Diagnostics, Milan, Italy), in un volume finale di 50 μl. Per la coamplificazione di IL-1β, IFN-γ, TNF-α, ICAM-1, IL-8e OPN da 347bp, la PCR è stata eseguita in presenza di 0.5 μM di primers sia senso che antisenso per IL-1β, IFN-γ, TNF-α, ICAM-1, IL-8 e OPN da 347bp, e 0.05 μM di primers sia senso che antisenso per β-actina o glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). La PCR per OPN da 543bp è stata eseguita solo in presenza di 0.5 μM di primers OPN sia senso che antisenso. La sequenza dei primers, le condizioni di amplificazione e i pesi molecolari dei prodotti di PCR attesi sono riportati in Tabella 1. La reazione è stata eseguita in un “DNA thermal cycler” (Mastercycler gradient, Eppendorf, Milan, Italy). Tutte le PCR sono state eseguite in fase esponenziale di amplificazione (al di sotto, quindi, del livello di saturazione), con una fase iniziale di denaturazione di 3 minuti a 95°C e uno step finale di 7 minuti a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio all’1,8% (Eppendorf, Milan, Italy) in Tris Borato EDTA buffer (TBE) (Fluka,

BioChemiKa, Switzerland), colorato con bromuro di etidio. L'analisi densitometrica è stata eseguita con il software NIH image V1.6. Il confronto tra il prodotto di ogni gene amplificato e il co-amplificato del controllo interno permette di avere una relativa stima dei livelli di mRNA dei campioni analizzati. Il controllo interno è rappresentato da un gene housekeeping, il cui prodotto non si sovrappone con quello del gene preso in esame.

Tabella 1. Sequenze oligonucleotidiche dei primers umani usati, condizioni di amplificazione e grandezza dei prodotti attesi nella RT-PCR

Gene	Sequenza Senso e antisenso	Condizioni	Grandezza del prodotto (bp)
OPN	5'-CACCTgTgCCATACCAgTAAAC-3' 5'-ggTgATgTCCTCgTCTgTAgCATC-3'	94 C 1 min, 53 C 1 min, 72 C 1 min; 35 cicli	532
IL-1β	5'-gCATCCAgcTACgAATCTCC-3' 5'-CCACATTCAgCACAggACTC-3'	95 C 30 sec, 58 C 1 min, 72 C 1 min; 35 cicli	708
OPN	5'-CCAAgTAAgTCCAACgAAA-3' 5'-ggTgATgTCCTCgTCTgTA-3'	95 C 30 sec, 58 C 1 min, 72 C 1 min; 35 cicli	347
IFN-γ	5'-TgCAgAgCCAAATTgTCTCCTTTTAC-3' 5'-ggATgCTCTTCgACCTCgAAACAgCA-3'	94 C 1 min, 60 C 1 min, 72 C 1 min; 35 cicli	293
TNF-α	5'-gAgCACTgAAAgCATgATCCg-3' 5'-AAAgTAgACCTgCCCAgACTCgg-3'	94 C 1 min, 60 C 1 min, 72 C 1 min; 35 cicli	682
ICAM-1	5'-CgTgCCgCACTgACCTggAC-3' 5'-CCTCACACTACTTCACTgTCACCT-3'	94 C 1 min, 60 C 2 min, 72 C 3 min; 35 cicli	446
IL-8	5'-ATgACTTCCAAGCTggCCgtg-3' 5'-TgAATTCTCAgCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3'	94 C 1 min, 55 C 1 min, 72 C 1 min; 30 cicli	297
GAPDH	5'-CggAgTCAACggATTTggTCgTAT-3' 5'-AgCCTTCTCCATggTggTgAAgAC-3'		306
β-actin	5'-TgACggggTCACCCACACTgTgCCCATCTA-3' 5'-CTAgAAgCATTgCggTggACgATggAggg-3'		661
β-actin	5'-CggAgTCAACggATTTggTCgTAT-3' 5'-AgCCTTCTCCATggTggTgAAgAC-3'		243

2.5 Analisi immunoistochimica

Le biopsie di cute non lesionale e di cute psoriasica dei pazienti insieme a quelle di cute normale dei donatori sani sono state fissate in formalina tamponata al 10% con PBS (0.1M, pH 7.4). Dopo la deidratazione i campioni sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 4 micron, per poi procedere alle fasi seguenti dell'analisi immunoistochimica secondo un protocollo standard. Le sezioni sono state incubate con i seguenti anticorpi: OPN: anticorpo monoclonale coniglio, clone AKm2A1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); IL-1 β : anticorpo monoclonale topo, clone 2D8 (GeneTex, Inc. San Antonio, TX, USA); TNF- α : anticorpo monoclonale topo, clone 2C8 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); IL-8: anticorpo monoclonale topo, clone B-K8 (GeneTex); IL-10: anticorpo monoclonale ratto, clone JES3-9D7 (GeneTex). L'analisi immunoistochimica è stata eseguita mediante lo strumento automatico FBMK 750600 (Ventana Medical System, Tucson, AZ USA). Dopo il blocco delle perossidasi endogene utile per

evitare legami aspecifici, le sezioni sono state immerse in una soluzione di smascheramento per 5 minuti a 100°C per 2 volte, al fine di aumentare l'intensità della colorazione. Gli anticorpi primari sono stati incubati alle concentrazioni ottimali per 32 minuti a 40°C. In seguito è stato applicato il complesso biotina-streptavidina coniugato con la perossidasi per 30 minuti, per poi procedere con lo sviluppo mediante il cromogeno 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) diluito in PBS per 5 minuti. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer e montate su vetrini. E' stato eseguito un controllo negativo per ogni anticorpo mediante TBS (*tris buffer saline*).

2.6 Analisi statistica

Ciascun esperimento è stato eseguito cinque volte. I risultati sono stati espressi con valori medi \pm deviazione standard. Per ciascun tipo di esperimento è stato usato il test ANOVA (Analisi della varianza tra i gruppi) Per l'analisi immunoistochimica è stato usato il test Kurtosis. La significatività statistica è risultata minore di 0.05 ($P < 0.05$).

3. RISULTATI

3.1 L'osteopontina è espressa nei PBMC e nei campioni bioptici di cute lesionale dei pazienti psoriasici

E' stato studiato il coinvolgimento dell'OPN in psoriasi, valutando l'espressione di questa molecola in PBMC di pazienti psoriasici confrontati con quelli di donatori sani, mediante RT-PCR. Come è mostrato in Fig. 3 la RT-PCR eseguita sull'm-RNA estratto dai PMBC dei pazienti psoriasici ha mostrato una elevata espressione di OPN, mentre degli undici donatori sani usati come controllo, un solo controllo risulta altamente positivo. L'espressione dell'OPN è stata valutata anche in campioni bioptici prelevati dalla cute non-lesionale e dalla cute psoriasica appartenente allo stesso paziente.

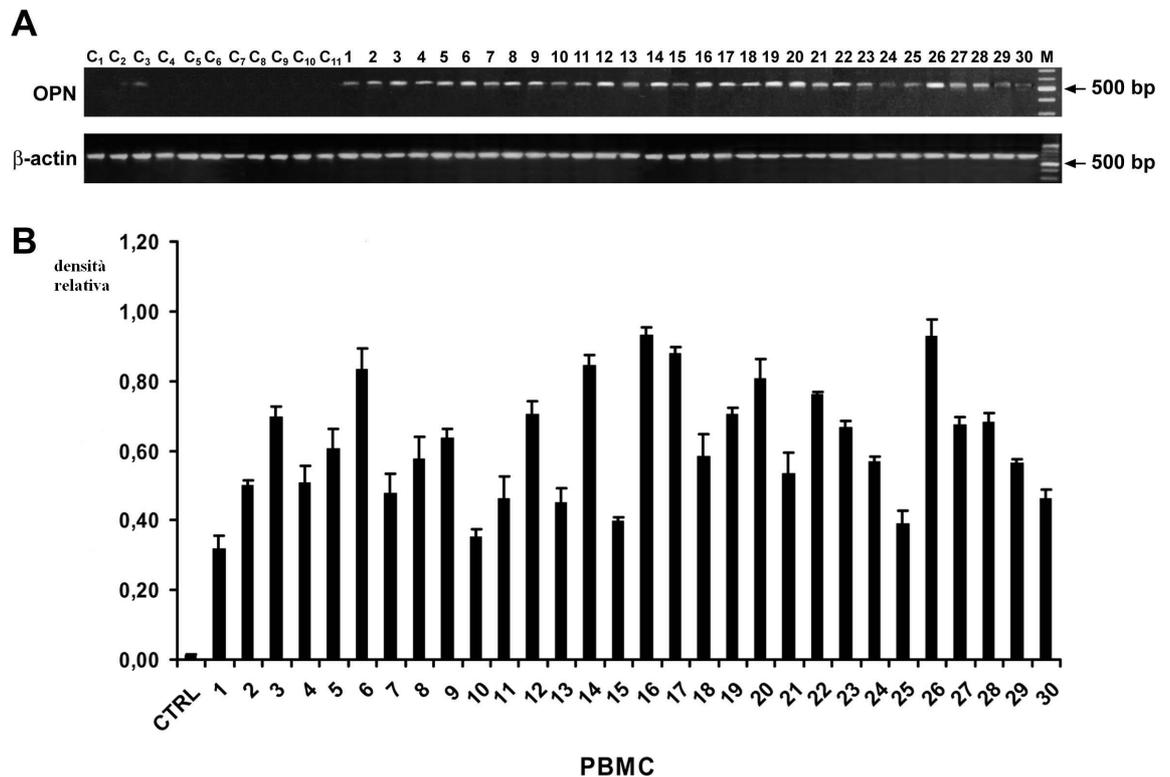


Figura 3. Analisi dell'espressione dell'mRNA di OPN in PBMC di donatori sani e pazienti psoriasici mediante RT-PCR. (A): Lanes C₁-C₁₁, mRNA di PMBC di donatori sani; lanes 1-30 mRNA di PBMC di pazienti psoriasici; M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). **(B):** Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per OPN presente nell'RNA totale preparato da PBMC di donatori sani e pazienti psoriasici. Ctrl: la media degli 11 controlli ottenuti dall'mRNA dei PBMC di donatori sani. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

I risultati illustrati in Fig. 4 mostrano l'induzione di questa citochina nel 75% dei campioni di cute lesionale e nel 25% di cute non lesionale della stesso paziente. Questi risultati sono stati alquanto sorprendenti, poichè l'espressione di OPN nella cute non-lesionale di alcuni dei pazienti presi in esame potrebbe indicare una predisposizione allo sviluppo della psoriasi, allo stesso modo di come accade nel cosiddetto fenomeno di Köbner. In seguito, i risultati sono stati confermati mediante analisi immunohistochimica dei campioni bioptici di cute non-lesionale e psoriasica degli stessi pazienti (Fig. 5B). Nelle placche psoriasiche, la colorazione citoplasmatica dell'OPN è stata osservata sia nei cheratinociti dell'epidermide che nell'infiltrato linfocitario del derma. Di contro, nella cute non-lesionale del paziente la colorazione dell'OPN non è stata osservata (Fig. 5A). Inoltre, l'espressione dell'OPN è stata valutata anche su campioni bioptici di cute normale di donatori sani ed è risultata negativa sia mediante analisi RT-PCR che immunohistochimica (dati non mostrati).

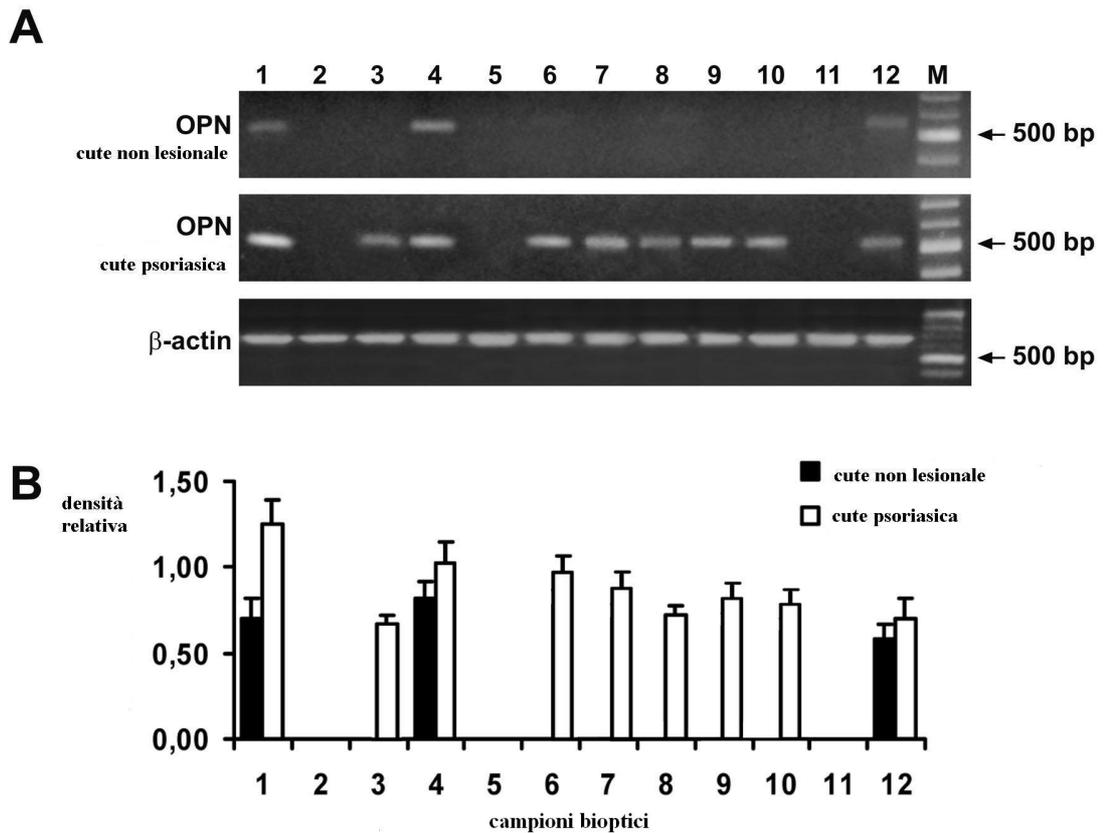


Figura 4. Analisi dell'espressione dell'mRNA di OPN da biopsie di cute non lesionale e cute psoriasica dello stesso paziente, mediante RT-PCR. (A): Lanes 1-12, mRNA di cute non lesionale e cute psoriasica. M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). **(B):** Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per OPN presente nell'RNA totale preparato da cute non lesionale e cute psoriasica. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

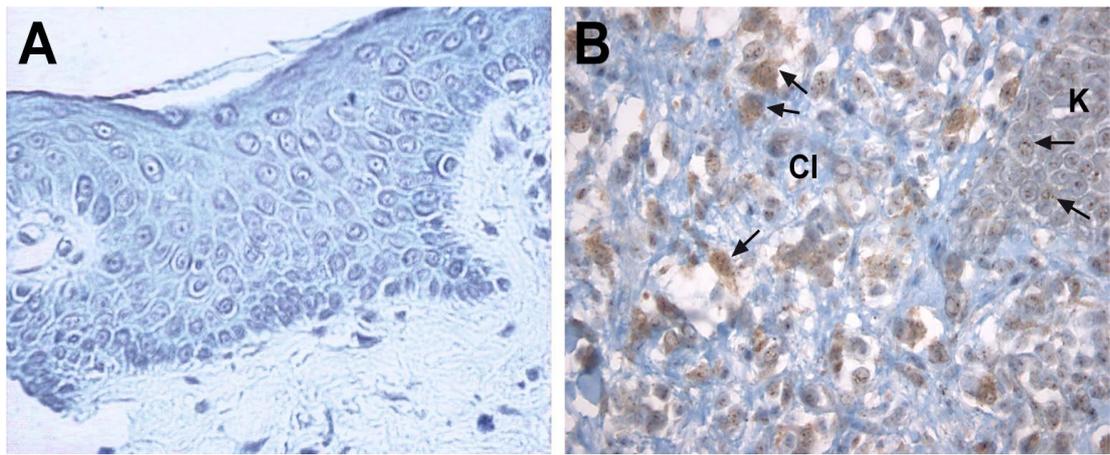


Figura 5. Colorazione di OPN mediante immunistochimica. (A): Colorazione negativa per OPN in cute non lesionale di paziente psoriasico. **(B):** Sezioni di cute lesionale psoriasica non trattata rivelano la colorazione citoplasmatica di OPN nell'infiltrato cellulare del derma e nei cheratinociti dell'epidermide (X400). **CI:** Infiltrato cellulare; **K:** cheratinociti

3.2 L'OPN polarizza la risposta Th1 nei pazienti psoriasici?

In studi recenti è stato evidenziato che l'OPN polarizza il rilascio di citochine da parte dei linfociti Th1 (4). È stato riportato che il network di citochine della cute lesionale psoriasica è caratterizzato da una risposta immuno-mediata di tipo Th1 (67). Come supporto a questa ipotesi, nel nostro studio svolto su pazienti psoriasici, è stata valutata l'espressione di alcune tipiche citochine Th1, come IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , di contro sono state analizzate anche l'IL-4 e l'IL-10, citochine rilasciate dalla popolazione linfocitaria Th2. Come mostrato in Fig. 6 l'espressione di IL-1 β , IFN- γ e TNF- α è up-regolata nell'mRNA estratto dai PBMC dei pazienti psoriasici, rispetto ai donatori sani.

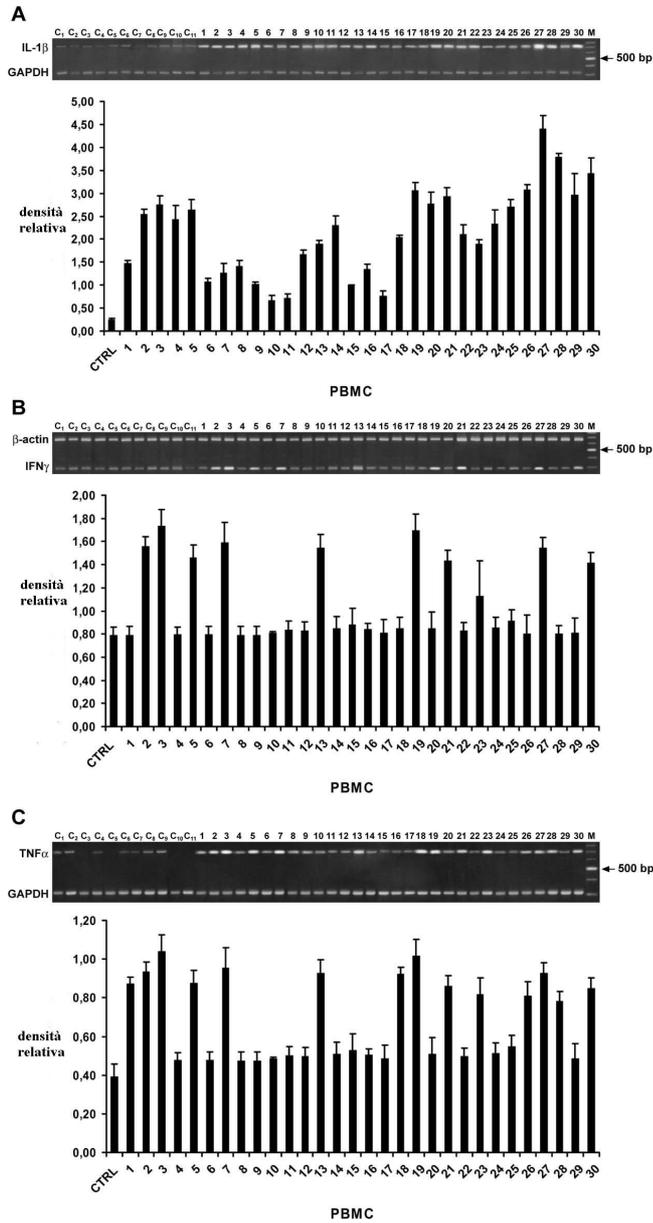


Figura 6. Analisi dell'espressione dell'mRNA di IL-1 β , IFN- γ and TNF- α in PBMC di donatori sani e pazienti psoriasici mediante RT-PCR. (A, B, C): Sopra: Lanes C₁-C₁₁, mRNA di PMBC di donatori sani; lanes 1-30 mRNA di PBMC di pazienti psoriasici; M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). In basso: Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per IL-1 β , IFN- γ and TNF- α presente nell'RNA totale preparato da donatori sani e pazienti psoriasici Ctrl: la media degli 11 controlli ottenuti dall'mRNA dei PBMC di donatori sani. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

L'mRNA estratto dai campioni di cute lesionale dei pazienti psoriasici mostra una positività per IL-1 β e TNF- α solo nel 30% dei campioni (Fig. 7). L'espressione di IL-1 β indica la presenza di un numero significativo di linfociti che infiltrano la cute lesionale, essendo l'isoforma β dell'IL-1 espressa maggiormente dai linfociti rispetto all'isoforma α , tipica invece dei cheratinociti. La cute non lesionale dello stesso paziente è risultata negativa (dati non mostrati). Inoltre, l'espressione di due delle tipiche citochine Th2, IL-4 e IL-10 è risultata negativa sia nel sangue periferico che nella cute (dati non mostrati).

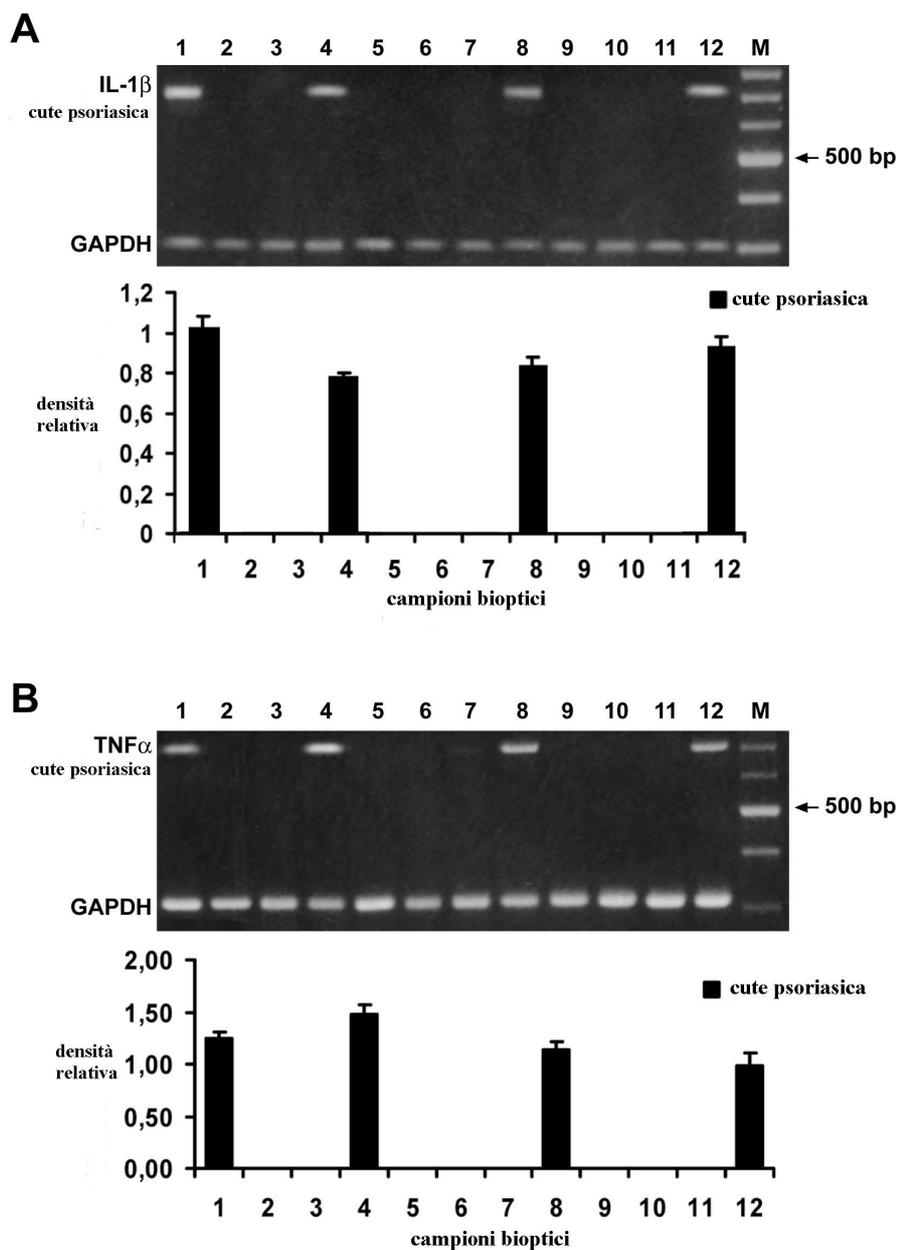


Figura 7. Analisi dell'espressione dell'mRNA di IL-1 β e TNF- α da biopsie di cute non lesionale e cute psoriasica dello stesso paziente, mediante RT-PCR. (A e B): Sopra: Lanes 1-12, mRNA di cute psoriasica. M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). In basso: Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per IL-1 β e TNF- α presente nell'RNA totale preparato da cute psoriasica. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

I risultati ottenuti sono stati confermati mediante analisi immunohistochimica effettuata su campioni biotici di cute non lesionale e cute psoriasica dei pazienti. Come mostrato in Fig. 8A e 8B la colorazione per l' IL-1 β è negativa nella cute non lesionale del paziente ed è positiva nel derma della cute psoriasica. Allo stesso modo anche la citochina TNF- α presenta una colorazione positiva nella cute psoriasica rispetto alla cute non lesionale del paziente (Fig. 9A e 9B). In particolare, la citochina TNF- α è stata osservata nell'infiltrato cellulare del derma, nelle vicinanze delle papille epidermiche, tipiche della psoriasi.

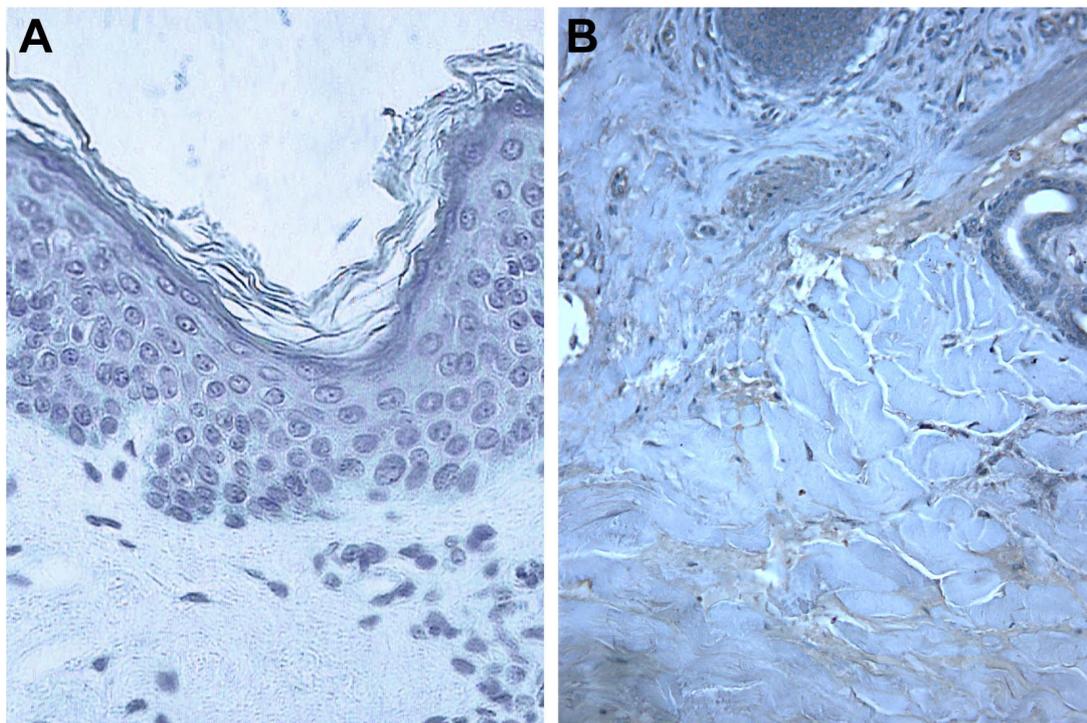


Figura 8. Colorazione di IL-1 β mediante immunohistochimica
(A): Colorazione negativa per IL-1 β in cute non lesionale di paziente psoriasico (X400). (B): Sezioni di cute lesionale psoriasica non trattata rivelano la colorazione interstiziale di IL-1 β nel derma (X200).

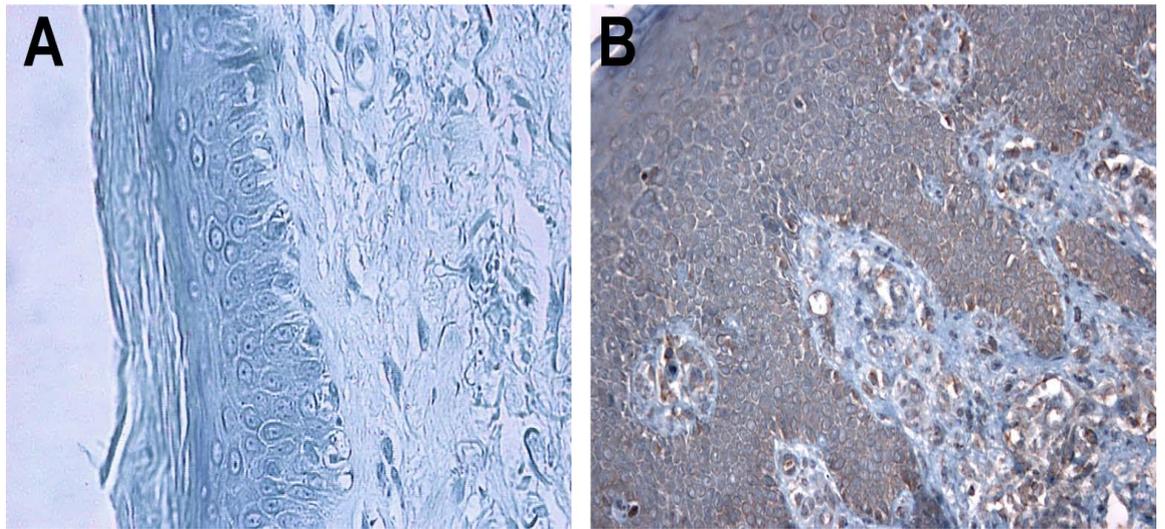


Figura 9. Colorazione di TNF- α mediante immunoistochimica (A): Colorazione negativa per TNF- α in cute non lesionale di paziente psoriasico. **(B):** Sezioni di cute lesionale psoriasica non trattata rivelano la colorazione citoplasmatica di TNF- α nell'infiltrato cellulare del derma e nei cheratinociti dell'epidermide (X400).

Per rendere maggiormente completo il pattern citochinico pro-infiammatorio dei pazienti psoriasici è stata valutata anche l'espressione dell'ICAM-1 e dell'IL-8. In particolare, l'espressione dell'ICAM-1 è risultata up-regolata in tutti i PBMC separati dal sangue dei pazienti psoriasici (Fig. 10A) confrontati con quelli dei donatori sani, mentre solo il 50% dei campioni di cute psoriasica risulta positiva per ICAM-1 (Fig. 11A). Inoltre, non è stata osservata l'espressione di ICAM-1 nella cute non lesionale dei pazienti (dati non mostrati). Al contrario, l'IL-8 risulta fortemente up-regolata sia in tutti i PBMC (Fig. 10B) che nei campioni di cute psoriasica (Fig. 11B), confrontati rispettivamente con i PBMC di donatori sani e cute non lesionale dei pazienti psoriasici.

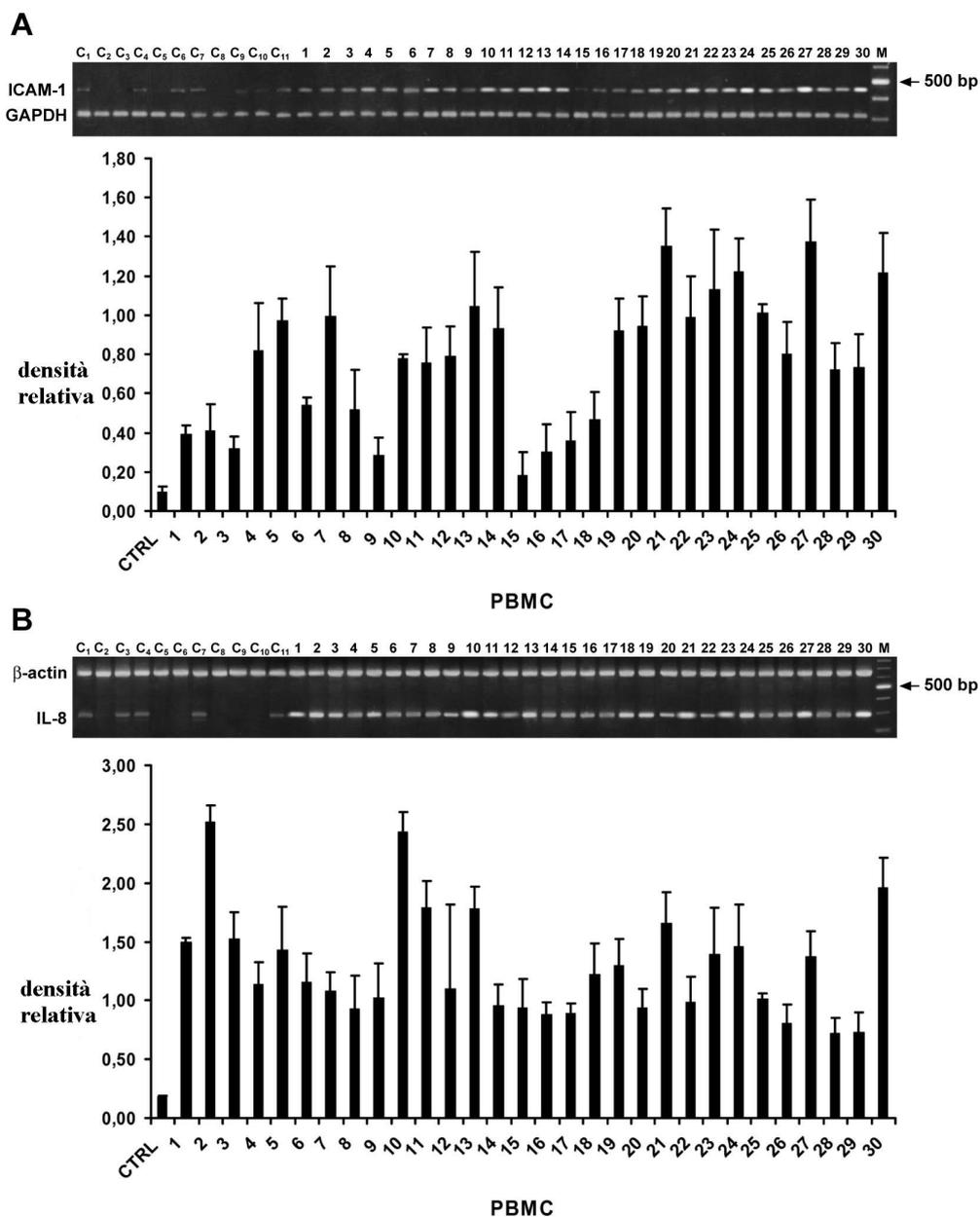


Figura 10. Analisi dell'espressione dell'mRNA di ICAM-1 e IL-8 in PBMC di donatori sani e pazienti psoriasici mediante RT-PCR. (A e B): Sopra: lanes C₁-C₁₁ mRNA di PMBC di donatori sani; lanes 1-30 mRNA di PBMC di pazienti psoriasici; M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). In basso: Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per ICAM-1 e IL-8 presente nell'RNA totale preparato da donatori sani e pazienti psoriasici Ctrl: la media degli 11 controlli ottenuti dall'mRNA dei PBMC di donatori sani. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

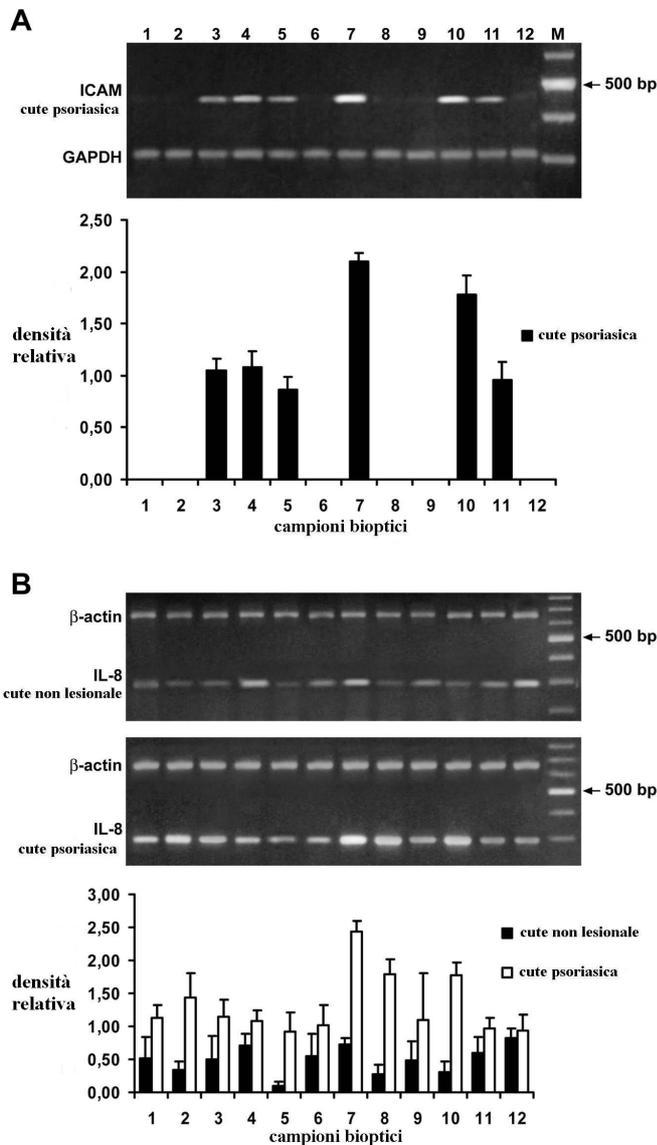


Figura 11. Analisi dell'espressione dell'mRNA di ICAM-1 e IL-8 da biopsie di cute non lesionale e cute psoriasica dello stesso paziente, mediante RT-PCR. (A e B): Sopra: Lanes 1-12, mRNA di cute non lesionale (solo per IL-8) e cute psoriasica. M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). In basso: Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per ICAM-1 presente nell'RNA totale preparato da cute psoriasica e IL-8 presente nell'RNA totale preparato da cute non lesionale e cute psoriasica. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0.05$).

Infine l'analisi immunostochimica rivela un'evidente colorazione, specifica per l'IL-8 nella cute psoriasica (Fig. 12A), mentre non c'è positività per tale citochina nella cute non lesionale dei pazienti psoriasici (Fig. 12B). I risultati ottenuti, quindi, confermano una polarizzazione della risposta immunitaria Th1 nei nostri pazienti psoriasici.

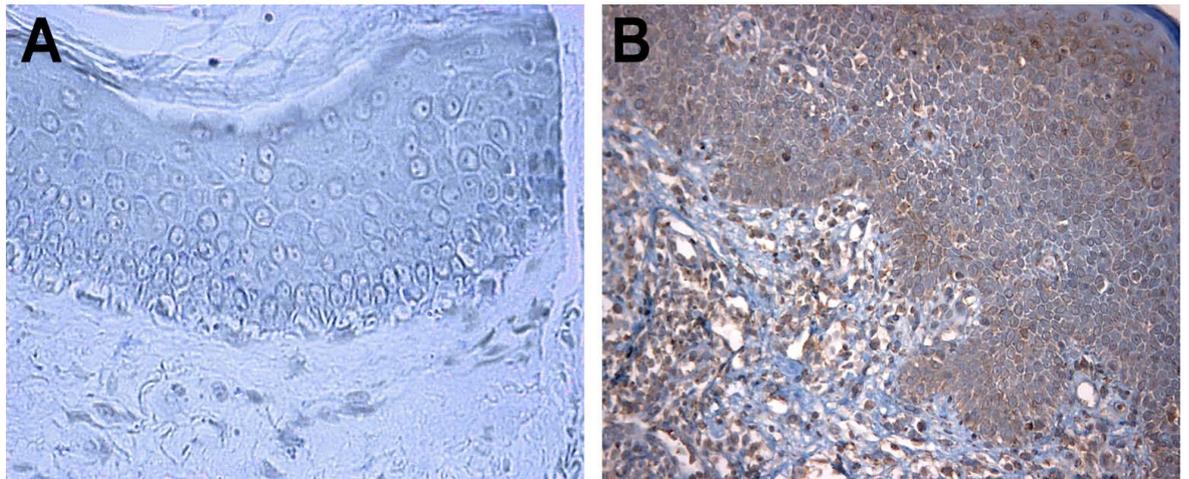


Figura 12. Colorazione di IL-8 mediante immunistochimica. (A): Colorazione negativa per IL-8 in cute non lesionale di paziente psoriasico **(B):** Sezioni di cute lesionale psoriasica non trattata rivelano la colorazione citoplasmatica di IL-8 nell'infiltrato cellulare del derma e nei cheratinociti dell'epidermide (X400).

3.3 L'espressione di OPN si riduce nei PBMC di pazienti psoriasici trattati con farmaci anti-TNF

L'uso di farmaci anti-TNF per il trattamento della psoriasi ha suscitato un crescente interesse grazie agli evidenti miglioramenti delle manifestazioni cliniche dei pazienti affetti da tale patologia. Numerosi sono stati gli studi effettuati sui tre farmaci anti-TNF, in cui si evidenzia sia una diminuzione delle cellule infiltranti la cute sia del livello di citochine (65, 66). Una particolare attenzione è stata rivolta alla proteina ricombinante etanercept. Dopo 1 mese soltanto di terapia con tale farmaco, la cute psoriasica presenta una diminuzione delle ICAM, dell'IL-8, dell'IL-1 β e dello spessore dell'epidermide analizzato tramite il marker K16. Nel proseguimento del trattamento con etanercept la cute affetta da psoriasi presenta una diminuzione progressiva dei linfociti (52).

Nel nostro studio sette dei 30 pazienti psoriasici reclutati, affetti da una forma grave di psoriasi a placche, sono stati trattati con farmaci anti-TNF. È stata valutata la modulazione dell'espressione di OPN mediante RT-PCR nei PBMC dei pazienti psoriasici prima e dopo trattamento con farmaci bloccanti

la citochina TNF. Come mostrato in Fig. 13 è evidente la diminuzione della molecola di nostro interesse nei PBMC dei pazienti trattati con i farmaci biologici anti-TNF rispetto ai pazienti prima del trattamento. Infatti, l'espressione di OPN è addirittura inferiore nei PBMC dei pazienti psoriasici trattati rispetto ai PBMC di donatori sani, usati come controllo. La diminuzione evidente di OPN nei pazienti psoriasici trattati potrebbe indicare una correlazione tra la molecola di nostro interesse e l'utilizzo del farmaco biologico. Attraverso i numerosi studi effettuati sui farmaci anti-TNF, e in particolare per il trattamento di pazienti psoriasici, è stata osservata una diminuzione delle citochine e delle molecole di adesione. Il risultato ottenuto indicherebbe la capacità del farmaco biologico di modulare significativamente la produzione di OPN, regolando la polarizzazione della risposta infiammatoria di tipo Th1 e, quindi, l'evoluzione della malattia. Infine, tutti i nostri pazienti psoriasici dopo il trattamento presentano una diminuzione del PASI, indicando una risoluzione delle manifestazioni cliniche a livello cutaneo ed una corrispondente diminuzione dei livelli di OPN nei PBMC isolati dal sangue dei pazienti affetti da psoriasi.

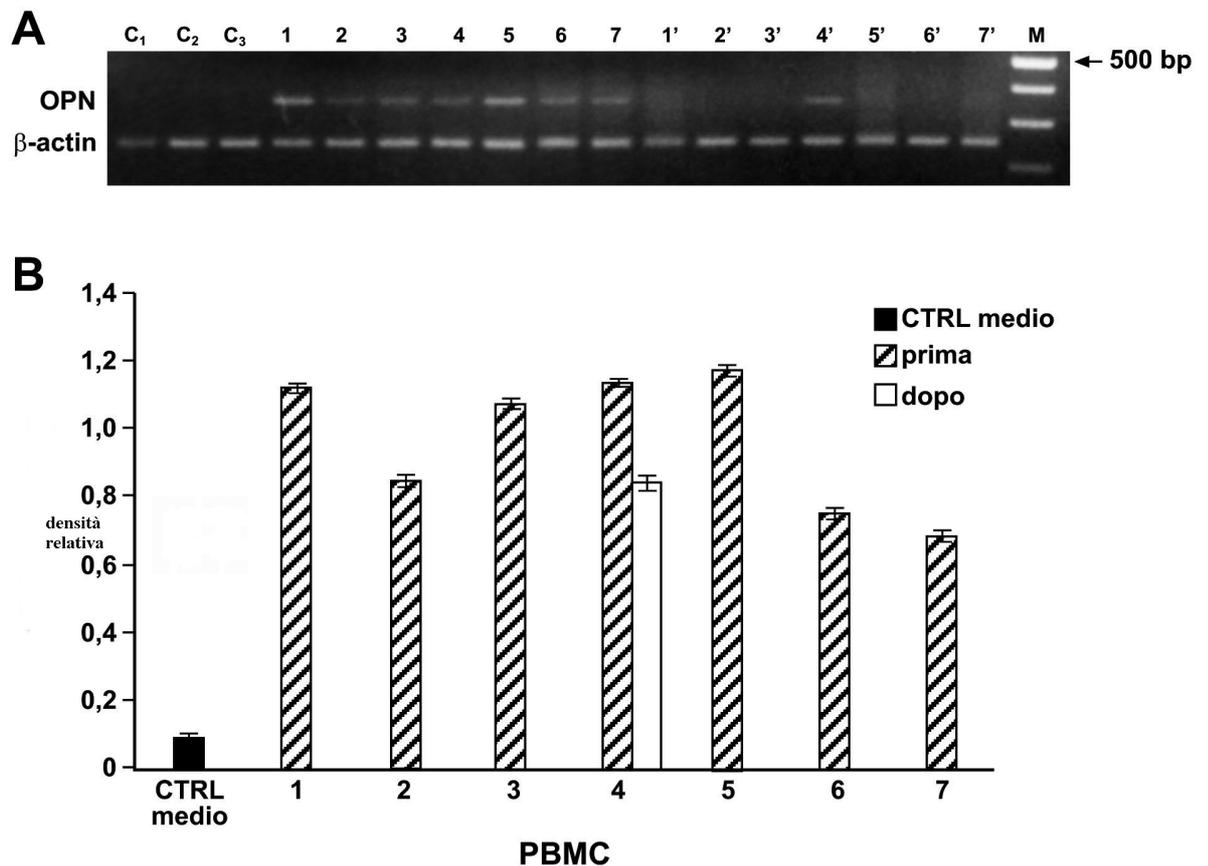


Figura 13. Analisi dell'espressione dell'mRNA di OPN in PBMC di pazienti psoriasici prima e dopo trattamento con farmaci biologici anti-TNF mediante RT-PCR. (A): Lanes C₁-C₃, mRNA di PMBC di donatori sani; lanes 1-7 mRNA di PBMC di pazienti psoriasici prima del trattamento con farmaci biologici anti-TNF; lenes: 1'-7' mRNA di PBMC di pazienti psoriasici dopo il trattamento con farmaci biologici anti-TNF; M: marcatore di peso molecolare di 100 bp (Roche Diagnostics). **(B):** Analisi densitometrica dell'intensità del gel colorato con bromuro di etidio (NIH image V 1.6) determinata dalla quantizzazione dell'mRNA specifico per OPN presente nell'RNA totale preparato da pazienti psoriasici prima e dopo trattamento con farmaci biologici anti-TNF Ctrl: la media dei 3 controlli ottenuti dall'mRNA dei PBMC di donatori sani. I valori sono significativi per cinque esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0,05$)

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'osteopontina (OPN) è una proteina della matrice ossea extracellulare con proprietà pleiotrope e di recente è stata identificata come una potenziale citochina infiammatoria. L'OPN è prodotta da differenti linee cellulari, come i linfociti T attivati, i macrofagi, i condrociti ipertrofici e le cellule epiteliali, ed è capace di legarsi a diverse integrine tra cui $\alpha v \beta 3$ (2).

In questo studio, secondo le nostre conoscenze, viene dimostrato per la prima volta che la presenza di OPN è indotta nei PBMC ed è presente nelle biopsie di cute dei pazienti psoriasici. Questo aumento è associato all'incremento dell'IL-1 β , del TNF- α e dell'IFN γ , mentre l'espressione dell'IL-10 e dell'IL-4 risultano ridotte. Questi risultati sono concordanti con la letteratura, suggerendo quindi un possibile ruolo dell'OPN come una citochina capace di guidare una risposta linfocitaria Th1 nei pazienti psoriasici. In particolare, l'OPN interagisce con le integrine e il CD44 per indirizzare l'espressione delle citochine a favore della risposta Th1 e quindi inibendo l'attivazione dei linfociti Th2. Esperimenti in vitro riportano che in macrofagi peritoneali murini, l'interazione OPN-integrina induce il rilascio

di IL-12, citochina chiave per la differenziazione dei linfociti in Th1 (4). Nel nostro lavoro sono stati osservati anche livelli elevati dell'ICAM-1 e dell'IL-8 nelle biopsie cutanee così come nei PBMC dei pazienti psoriasici. Come riportato in letteratura, l'espressione dell'ICAM-1 e della chemochina IL-8 sono state dimostrate nei cheratinociti della cute lesionale psoriasica e in quella affetta da dermatite atopica (40, 68) e a livello sistemico (69). L'ICAM-1 è una molecola di adesione espressa in risposta al TNF- α e all'IL-1 β . L'espressione regolata dell'ICAM-1 è di rilevante importanza per l'inizio e l'evoluzione dei processi infiammatori localizzati nella cute, poichè essa facilita sia il reclutamento dei linfociti T al sito infiammatorio che l'interazione dei cheratinociti con i linfociti T (70), laddove la produzione nella cute psoriasica dell'IL-8, invece è capace di focalizzare e amplificare la risposta infiammatoria (68).

Nel trattamento di pazienti con grave forma di psoriasi possono essere utilizzati degli inibitori del TNF. I farmaci anti-TNF in uso sono l'adalimumab, l'infliximab e l'etanercept. L'uso di questi farmaci diretti contro target immunologici sono efficienti per la risoluzione clinica della psoriasi. La risoluzione

delle manifestazioni cliniche del paziente psoriasico è la risposta ai tre distinti inibitori del TNF, indicando che questa citochina ha un ruolo chiave nella patogenesi della psoriasi (63). Gli anticorpi infliximab e adalimumab possono legare il complesso TNF-recettore espresso sulle cellule, inducendo l'apoptosi di quest'ultime. La proteina etanercept lega la forma attiva e solubile della citochina TNF e induce progressivi cambiamenti delle citochine infiammatorie quali IL-1 β , IFN- γ , IL-23 nelle lesioni psoriasiche, a dimostrazione di quanto la diminuzione di queste molecole influenzi il reclutamento dei linfociti T e la loro interazione con le cellule dendritiche. E' stato infatti riportato una evidente riduzione dell'ICAM e dell'IL-8 in prelievi biotici di pazienti affetti da psoriasi in terapia da un mese con etanercept (52). I nostri risultati hanno riportato una notevole diminuzione dell'espressione di OPN nei PBMC di pazienti psoriasici trattati con i diversi inibitori del TNF, indicando che l'OPN possa essere in qualche modo modulata dal farmaco biologico.

L'infiammazione gioca un importante ruolo anche nell'insorgenza dell'angiogenesi. Vari studi hanno dimostrato che VEGF, una citochina multifunzionale che promuove la

permeabilità vascolare, svolga un rilevante ruolo nell'angiogenesi della psoriasi (71). Infatti, l'espressione di VEGF è aumentata nella cute psoriasica e nel siero di pazienti (72) con gravi forme di psoriasi (73). E' stato proposto che la psoriasi pustulare, una delle forme più severe di psoriasi, possa essere accompagnata da proteinuria patologica ed elevati livelli plasmatici di VEGF. In base ai dati riportati, il ruolo che gioca l'OPN suscita grande interesse. E' stato dimostrato che l'OPN, da mediatore proinfiammatorio, induce un'aumento di espressione di IL-1 β nei monociti umani (74). Questo incremento è associato all'aumento di produzione di TNF- α , IL-8 e IL-6, e ad una riduzione del rilascio dell'IL-10. In particolare, è stato dimostrato che la risposta angiogenica è ridotta utilizzando anticorpi anti-IL-1 β , ciò indica che tale citochina può rappresentare un importante fattore angiogenetico espresso dai monociti attivati dall'OPN. Inoltre, studi in vitro effettuati sull'artrite reumatoide dimostrano che la neutralizzazione sia del TNF- α che dell'IL-1 riduce il rilascio di VEGF, indicando che l'inibizione di entrambe le citochine in vivo possa ridurre la capacità della formazione di

nuovi vasi sanguigni (75). Il TNF- α e l'IL-1 β sono tipiche citochine del pathway infiammatorio della psoriasi e quindi potrebbero indurre un aumento di VEGF e di conseguenza l'angiogenesi nella patologia. Essendo l'OPN la probabile citochina che induce l'IL-1 β nei monociti umani si può ipotizzare che anch'essa sia coinvolta nell'angiogenesi della psoriasi. Infatti, i nostri dati hanno mostrato una riduzione dell'OPN dopo che i pazienti psoriasici sono stati trattati con inibitori del TNF. La riduzione di OPN dopo trattamento con farmaci biologici anti-TNF è proporzionale alla risoluzione delle manifestazioni cliniche e probabilmente alla diminuzione dell'angiogenesi.

In conclusione, i risultati riportati indicherebbero un nuovo ruolo dell'OPN nell'induzione e aggravamento della psoriasi, individuando un nuovo target per strategie terapeutiche alternative.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K et al. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter. *Biochem J* 1994; 303: 255-62
2. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107(9): 1055-61
3. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by $\alpha 3$ integrin stimulates cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 20369-74
4. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V et al. ETA-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 287: 860-64
5. Denhardt DT, Gou X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993; 7: 1475-82
6. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000; 19: 615-22

7. Tian JY, Sorensen ES, Butler WT et al. Regulation of NO synthesis induced by inflammatory mediators in RAW 264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin. *Cytokine* 2000; 12: 450-57
8. O'Regan A, Berman LS. Osteopontin: a key cytokine in cellmediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 373-90
9. Cafforio P, Campagna M, Silvestris F. Osteopontin: a new marker of bone involvement in oncology. *Biochimica clinica* 2005; 29(1): 30-8
10. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004; 103: 1376-82
11. Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O et al. Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 253-60
12. Hotte SJ, Winqvist EW, Stitt L et al. Associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 95; 506-12

13. Rosol TJ. Pathogenesis of bone metastasis: role of tumor-related proteins. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 844-50
14. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31
15. Caligaris-Cappio F, Gregoret MG, Merico F et al. Bone marrow microenvironment and the progression of multiple myeloma *Leuk Lymphoma* 1992; 8(1-2): 15-22
16. Klein LM, Lavker RM, Matis WL et al. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(22): 8972-6.
17. Christophers E. Psoriasis- epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26: 314-20
18. Suarez-Almazor ME, Russeli AS. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*. 1990; 126: 1040-42
19. Schmitt-Egenolf M, Boehncke WH, Christophers E et al. Type I and type II psoriasis show a similar usage of T-cell receptor variable regions. *Invest Dermatol*. 1991; 97(6): 1053-6

20. Matsumoto M, Zhou Y, Matsuo S et al. Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(18): 6720-4
21. Williams HC, Strachan DP. The challenge of dermatology. Boca Raton, CRC Press Inc, 1997.
22. Gladman DD. Psoriatic arthritis. *Dermatol Ther* 2004; 17: 350-63
23. Krueger G, Koo J, Lebwohl M et al. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol* 2001; 137: 280-4
24. Farber EM, Nall L. Nail psoriasis. *Cutis*. 1992; 50(3): 174-8
25. Gottlieb AB, Lifshitz B, Fu SM et al. Expression of HLA-DR molecules by keratinocytes, and presence of Langerhans cells in the dermal infiltrate of active psoriatic plaques. *J Exp Med*. 1986; 164: 1013-28
26. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T

- lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994; 94: 202-9
27. Cumberbatch M, Singh M, Dearman RJ et al. Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *J Exp Med.* 2006; 203: 953-60.
28. Boyman O, Conrad C, Dudli C et al. Activation of dendritic antigen-presenting cells expressing common heat shock protein receptor CD91 during induction of psoriasis. *Br J Dermatol* 2005; 152: 1211-8
29. Austin LM, Ozawa M., Kikuchi T et al. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon gamma, interleukin-2, and tumour necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol.* 1999; 113: 752-759
30. Chin YH, Falanga V, Streilein JW et al. Lymphocyte recognition of psoriatic endothelium: evidence for a tissue-

- specific receptor/ligand interaction. *J Invest Dermatol.* 1989; 93: 82S-7S
31. Santamaria L, Babi F, Picker LJ et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med.* 1995; 181: 1935-40
32. Rottman JB, Smith TL, Ganley KG et al. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin α E β 7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab Invest.* 2001; 81: 335-47
33. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol.* 2000; 164: 6621-32
34. Lebwohl M, Tying SK, Hamilton TK et al. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2004-13
35. Wang H, Peters T, Kess D et al. Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic

- psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2105-14
36. Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA et al. Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2094-104
37. Szabo E, Meszaros C. Role of mast cells in the histogenesis of psoriasis. *Z Haut Geschlechtskr* 1964; 36: 373-9
38. Schubert C, Christophers E. Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1985; 277:3 52-8.
39. Ackermann L, Harvima IT, Pelkonen J et al. Mast cells in psoriatic skin are strongly positive for interferon-gamma. *Br J Dermatol.* 1999; 140: 624-33
40. Ackermann L, Harvima IT. Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF-alpha and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis. *ArchDermatol Res.* 1998; 290: 353-9

41. Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*. 1996; 381: 75-7
42. Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R et al. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*. 2000; 192: 1441-52
43. Prinz JC. Which T cells cause psoriasis? *Clin Exp Dermatol*. 1999; 24: 291-5
44. Pauls K, Schön M, Kubitza RC et al. Role of integrin $\alpha E(CD103) \beta 7$ for tissue-specific epidermal localization of CD8⁺ T lymphocytes. *J Invest Dermatol*. 2001; 117: 569-75
45. Pont-Giralt M, Gimenez-Arnau AM, Pujol RM et al. Circulating CLA(+) T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 227-8

46. Prinz J, Braun-Falco O, Meurer M et al. Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet*. 1991; 338: 320-1
47. Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J et al. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet*. 1991; 338:321
48. Nickoloff BJ, Wronce-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999; 155: 145-58
49. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R et al. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med*. 1995; 1: 442-7
50. Snowden JA, Heaton DC. Development of psoriasis after syngeneic bone marrow transplant from psoriatic donor: further evidence for adoptive autoimmunity. *Br J Dermatol*. 1997; 137: 130-2
51. Ghoreschi K, Röcken M. Immunopathogenesis of psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2003; 1: 524-32

52. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol.* 2005; 175: 2721-9
53. Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2002 ; 46: 1-23
54. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 177: 566-73
55. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201: 233-40
56. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004; 199: 125-30
57. Ghoreschi K, Röcken M. Molecular and cellular basis for designing gene vaccines against inflammatory autoimmune disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9: 331-8

58. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1317-26
59. Kauffman CL, Aria N, Toichi E et al. A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 1037-44
60. Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M et al. Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nat Med.* 2002; 8: 694-701
61. Paliwal V, Tsuji RF, Szczepanik M et al. Subunits of IgM reconstitute defective contact sensitivity in B-1 cell-deficient *xid* mice: kappa light chains recruit T cells independent of complement. *J Immunol.* 2002; 169: 4113-23
62. Horn FJ, Fox KM, Patel V et al. Are patients with psoriasis undertreated? Results of National Psoriasis Foundation survey. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57(6): 957-62

63. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007; 445: 866-73
64. Krüger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L et al. Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol*. 2006; 154(3): 460-6
65. Tan JK, Aphale A, Malaviya R et al. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis *J Invest Dermatol* 2007; 12: 38-45
66. Glottlieb AB, Masud S, Ramamurthi R et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 68-75
67. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF et al. The cytokine network in lesional and lesional-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol*. 1993; 101: 701-05

68. Sticherling M, Sautier W, Schröder J M et al. Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol.* 1999; 79: 4-8
69. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Ann Rev Immunol.* 1997; 15: 675-705
70. Fuchs J, Zollner T M, Kaufmann R et al.. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radicl Biol Med.* 2001; 30: 337-53
71. Detmar M, Brown LF, Claffey KP et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med.* 1994; 180: 1141-46
72. Creamer D, Allen M, Jaggar R et al. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Arch Dermatol.* 2002; 138: 791–96.
73. Nielsen HJ, Christensen IJ, Svendsen MN et al. Elevated plasma levels of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 decrease during improvement of psoriasis. *Inflamm Res.* 2002;51: 563–67.

74. Naldini A, Leali D, Pucci A et al. Cutting edge: IL-1 beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol.* 2006; 177: 4267-70
75. Paleolog EM, Young S, Stark AC et al. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1258-65