

## LAVORO ORIGINALE

# Analisi immunoistochimica dell'espressione delle principali molecole di adesione e dei fattori di necrosi tumorale a livello della membrana sinoviale nell'artrite psoriasica

## *Immunohistochemical analysis of the expression of main adhesion molecules and tumor necrosis factors in the synovial membrane of psoriatic arthritis*

V. Ricciari<sup>1</sup>, A. Spadaro<sup>1</sup>, E. Taccari<sup>1</sup>, A. Zoppini<sup>1</sup>, I. Markus<sup>2</sup>, M. Sesztak<sup>2</sup>, J. Ortutay<sup>3</sup>, E. Koo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata, Divisione di Reumatologia, Università "La Sapienza", Roma, Italia;

<sup>2</sup>National Institute of Rheumatology and Physiotherapy; <sup>3</sup>Polyclinic of the Hospitaller Brothers of St John of God, Budapest, Ungheria

### SUMMARY

**Objective:** To define the expression and pattern of the synovial distribution of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 and of TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  cytokines in psoriatic arthritis (PsA), according to the synovitis duration.

**Methods:** Cryostatic sections of the synovial membrane tissue samples were stained for the different antibodies using a standard three-stage-immunoperoxidase-labeling technique.

**Results:** E-selectin grade of staining was higher in those patients with a shorter disease duration compared to long-standing synovitic specimens, as well as ICAM-1 expression. On the contrary a higher VCAM-1 positivity was mainly found in longstanding PsA patients. Anti-TNF $\alpha$  positivity was found almost in all the specimens with no difference among the two groups, while the intensity of anti-TNF $\beta$  positivity was globally higher in longstanding cases.

**Conclusions:** Different adhesion molecules may separately participate to the synovitic process in the different phases of PsA, leading to the hypothesis of their different involvement during the disease evolution. Moreover the upregulation of TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  gives evidence to their local proinflammatory effect within the synovium and to their role in perpetuating the PsA synovitis.

Reumatismo, 2003; 55(3):164-170

### INTRODUZIONE

Nell'artrite psoriasica (AP) l'esame microscopico della membrana sinoviale (MS) evidenzia la presenza di un modesto infiltrato di cellule infiammatorie con vari gradi di iperplasia della limitante (1). L'aspetto istopatologico più evidente della sinovite psoriasica, soprattutto nelle fasi iniziali di malattia, è la neoangiogenesi con vasi a pareti ispessite e cellule endoteliali ipertrofiche (2).

L'interesse per il ruolo dell'endotelio nella flogosi sinoviale è aumentato considerevolmente negli ultimi anni: l'adesione di cellule circolanti all'endotelio microvascolare è alla base della migrazione cellulare nella sinovia infiammata (3) ed è stato suggerito che una diversa espressione endoteliale delle molecole di adesione favorisca la diapedesi cellulare nei tessuti, svolgendo così un ruolo importante nello sviluppo e nel mantenimento delle sinoviti croniche (4-6). Al riguardo il rilievo di particolari aspetti morfologici vasali e di un'intensa vascolarizzazione, sia nelle forme iniziali che croniche di AP ha recentemente permesso di prospettare la potenziale utilità di diversi marker endoteliali come affidabili misure di outcome del processo sinovite psoriasico (7).

È noto che nella flogosi sinoviale cronica l'infil-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Valeria Ricciari, Divisione di Reumatologia,  
Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata,  
Università degli studi di Roma "La Sapienza",  
Piazzale Aldo Moro 2, 00185, Roma  
E-mail: valeria.ricciari@uniroma1.it

trazione di cellule mononucleate è favorita da diversi mediatori in grado di indurre l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali (8,9). Infatti alcune molecole proinfiammatorie, quali i *tumor necrosis factors* (TNFs), che sono maggiormente espresse in corso di sinoviti croniche (10,11), sono in grado di indurre l'espressione sulle cellule endoteliali della MS di alcune molecole di adesione, quali l'ELAM-1 o E-selectina e l'ICAM-1 (12, 13), e stimolano i sinoviociti simil-fibroblasti ad esprimere ICAM-1 e VCAM-1 (14, 15).

Diversi dati sembrano avvalorare l'importanza dei TNFs anche per il determinismo della sinovite psoriasica. Nel liquido sinoviale di malati di AP sono stati riscontrati livelli di TNF $\alpha$  inferiori rispetto all'artrite reumatoide ma più elevati che nell'osteoartrosi (16) e colture di tessuto sinoviale psoriasico sembrano essere in grado di liberare elevate quantità di TNF $\alpha$  (17). Inoltre in alcuni versamenti articolari di AP è stata dimostrata la presenza di TNF $\beta$  (18) e infine esistono studi recenti che riportano dati incoraggianti, anche per quanto riguarda l'AP, sull'efficacia del trattamento con agenti anti-TNF (19).

Nonostante questi rilievi l'espressione di alcune molecole di adesione nella MS dell'AP è stata caratterizzata raramente. Nostri precedenti studi sul profilo fenotipico della sinovite psoriasica di lunga durata avevano indotto ad avvalorare il coinvolgimento dell'endotelio nei meccanismi patogenetici dell'AP (20). Ricerche successive, condotte nell'AP di minore durata, documentando una più elevata vascolarizzazione e una minore intensità di espressione dell'E-selectina nella MS psoriasica rispetto all'artrite reumatoide (21), e hanno indotto a rivalutare il ruolo dell'endotelio nel determinismo della flogosi sinoviale nelle spondiloartriti. Lo scopo di questo studio è stato di definire, sulla base della durata della sinovite, l'espressione e la tipologia della distribuzione sinoviale delle principali molecole di adesione coinvolte nel traffico cellulare, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, insieme a quelle del TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ , di cui sono ancora in gran parte sconosciuti la localizzazione ed il ruolo nel determinismo della sinovite psoriasica.

## MATERIALI E METODI

14 malati (8 uomini e 6 donne; età media = 39.6 aa, range 25-60) affetti da AP, diagnosticata secondo i criteri di Moll e Wright (22), sono stati

sottoposti a biopsia sinoviale dell'articolazione del ginocchio a scopo diagnostico. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato all'intervento. Parte dei campioni di tessuto sinoviale è stato incluso in OCT (Lab-tek Products Division, Miles Laboratories, Naperville, IL, USA), congelato rapidamente in azoto liquido e o tagliata immediatamente in sezioni seriate di 6  $\mu$  di spessore o conservati a  $-70^{\circ}$  C fino all'utilizzazione. Dopo il taglio al criostato, le sezioni sono state fatte asciugare a temperatura ambiente per una notte e poi fissate in una miscela di cloroformio:acetone (1:1, v:v). I rimanenti frammenti biotici sono stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina per un esame istologico di routine.

Le sezioni criostatiche di ogni paziente sono state colorate con i seguenti anticorpi monoclonali di origine murina diretti contro le seguenti molecole di adesione: E-selectina (CD62E), ICAM-1 (CD54) e VCAM-1 (CD106) (Immunotech, Mariglija, Francia). Sono stati inoltre utilizzati i seguenti anticorpi policlonali diretti contro il TNF $\alpha$  e TNF $\beta$  (Chemicon International, Temecula, CA, USA).

È stata impiegata una tecnica in tre stadi utilizzando un complesso avidina-biotina-immunoperossidasi (ABC) (LAB VISION, Fremont, CA, USA). In breve, le sezioni criostatiche sono state messe ad incubare in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% con aggiunta di una soluzione al 2% di siero di capra, per bloccare l'attività perossidasi endogena aspecifica. Successivamente l'anticorpo primario è stato seguito da un antisiero biotinilato e dal complesso avidina-biotina-perossidasi coniugato. Le sezioni sono state infine incubate con una soluzione di DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, controcolorate con ematossilina ed infine montate (23). I controlli positivi comprendevano colture di cellule endoteliali per E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e tessuto linfonodale normale per i TNF. I controlli negativi sono stati eseguiti mediante omissione dell'anticorpo primario.

Le sezioni sono state analizzate in cieco da due degli autori (V.R. e E.T.) per stabilire l'entità e l'intensità dell'espressione di ogni marcatore e i risultati rappresentano una media delle due indipendenti valutazioni. La limitante sinoviale, gli elementi cellulari dell'infiltrato e le cellule endoteliali sono state valutate sulla base del numero di cellule positive per campo (HPF) (x 40). Solo le cellule colorate in modo chiaro con il singolo anticorpo sono state considerate positive. La colorazione di ogni singola area è stata stadiata utilizzando una scala semiquantitativa: - = nessuna cel-

**Tabella I** – Risultati immunostochimici nella membrana sinoviale di 14 pazienti con AP

N° paziente	E-selectina			ICAM-1			VCAM-1			TNF- $\alpha$			TNF- $\beta$		
	I	L	E	I	L	E	I	L	E	I	L	E	I	L	E
Gruppo 1															
1	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
2	+	+	+	++	-	++	-	+	-	+	++	++	n.d.	n.d.	n.d.
3	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+
4	+	++	++	+	+	++	+	+	-	-	++	-	-	-	-
5	+	+	++	+++	++	+++	-	++	-	-	++	++	+	++	+
6	+	+	+	-	++	++	-	+	-	++	++	++	-	-	-
7	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
8	+	-	+	++	++	++	n.d.	n.d.	n.d.	++	++	++	-	-	+
Gruppo 2															
1	-	-	-	+	-	++	+	-	+++	++	++	++	+	+	+
2	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	-	+++	+++	+++
3	+	-	+	+	-	+	++	++	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	+	+	-	-	-	++	++	++	++	-	+	+	+++	+++	+++
5	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	-	-	++
6	+	++	+	++	-	++	+	-	++	++	++	++	n.d.	n.d.	n.d.

I = infiltrato; L = limitante; E = endotelio (vedere Materiali e Metodi per i dettagli e lo score); n.d. = non disponibile

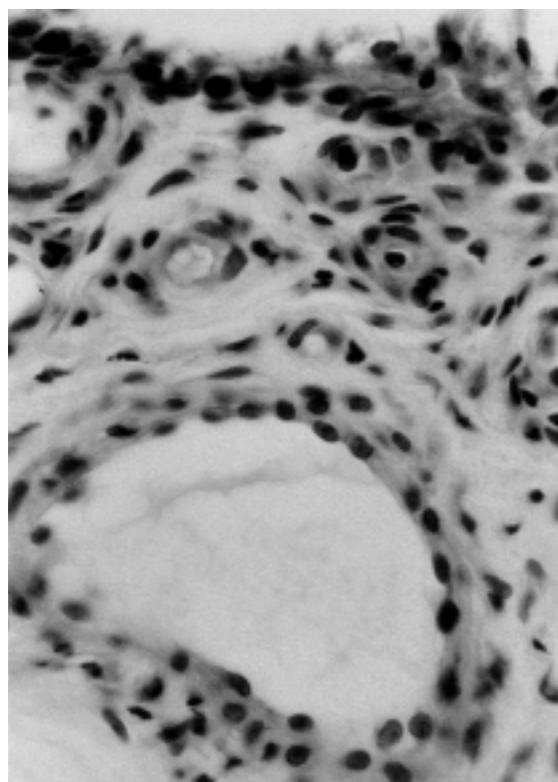
lula positiva;  $\pm$  = 1-5 cellule positive/HPF; + = 5-25 cellule positive/HPF; ++ = 25-50 cellule positive/HPF; +++ = più di 50 cellule positive/HPF (11).

L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita con il test esatto delle probabilità di Fisher.

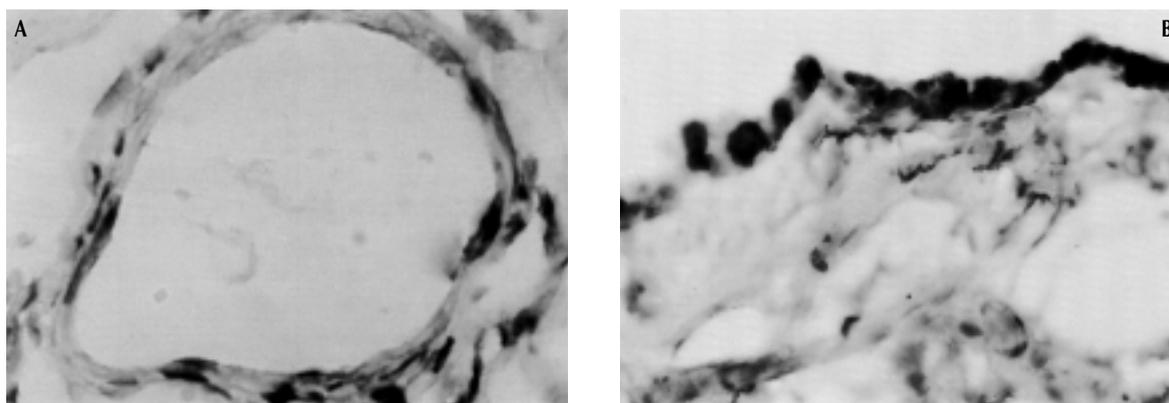
## RISULTATI

Sulla base della diversa durata di malattia (inferiore o superiore ad un anno), i nostri malati sono stati divisi in due gruppi, di 8 e 6 persone rispettivamente. 10 assumevano FANS, 4 terapie di fondo (uno methotrexate, uno sulfasalazina e due idrossiclorochina) e 2 steroidi a basso dosaggio.

In tutti i campioni di MS esaminati è stata rilevata una iperplasia da lieve a moderata della limitante. La neoangiogenesi è stata un reperto costante, mentre un infiltrato diffuso era più evidente nei pazienti appartenenti al gruppo con una più breve durata di malattia. Nei malati con una forma di AP di lunga durata gli infiltrati erano costituiti essenzialmente da larghi elementi cellulari arrotondati, ed erano presenti anche vari gradi di fibrosi con proliferazione fibroblastica. Nel gruppo con minore durata di malattia lo spessore della limitante è risultato maggiore che nel gruppo con AP di più lunga durata.



**Figura 1** - Espressione di E-selectina su di un campione di membrana sinoviale di un paziente con artrite psoriasica, con una durata di malattia inferiore ad un anno. La sezione è stata colorata con l'anticorpo monoclonale CD62E (ingrandimento originale 400x).



**Figura 2** - Campioni di membrana sinoviale di pazienti con artrite psoriasica di lunga durata: a) espressione dell'anticorpo anti-TNF $\alpha$  sulle cellule endoteliali di un vaso (ingrandimento originale 650x); b) espressione dell'anticorpo anti-TNF $\beta$  principalmente sulla limitante (ingrandimento originale 250x).

La tabella I sintetizza i dati immunoistochimici dei due gruppi di pazienti.

Quando sono state considerate le diverse espressioni delle molecole di adesione, è stata rilevata una più frequente positività per l'E-selectina sia a livello endoteliale che degli infiltrati cellulari e della limitante, in 7 su 8 pazienti (88% dei casi) con una durata di malattia più breve (Fig. 1) rispetto ai campioni di più lunga durata di malattia, dove solo 2 su 6 pazienti (33% dei casi) presentavano una positività per l'E-selectina. L'espressione di ICAM-1 era meno intensa sia a livello degli infiltrati cellulari che delle cellule endoteliali, e sostanzialmente ridotta anche a livello della limitante in 2 su 6 campioni di più lunga durata (33%) laddove è risultata espressa in modo significativamente più elevato ( $p < 0.01$ ) pressochè in tutte le aree tissutali di tutti i campioni con sinovite di minor durata (100% dei casi). Infine una più evidente, seppur non statisticamente significativa, positività per VCAM-1 è stata rilevata nei pazienti con AP di più lunga durata (5/5; 100% vs 4/7; 57%).

Cellule contenenti TNF $\alpha$  sono state costantemente rilevate nella limitante e negli infiltrati sinoviali; anche una gran parte dei vasi sanguigni è risultata positiva per l'anti-TNF $\alpha$  senza alcuna significativa differenza tra i due gruppi (Fig. 2a). La colorazione delle MS con anti-TNF $\beta$  è risultata meno intensa rispetto all'anti-TNF $\alpha$  e gli anticorpi non hanno reagito su alcuni campioni, indipendentemente dalla durata di malattia, sebbene nei casi di più lunga durata l'intensità della positività per l'anti-TNF $\beta$  era globalmente più alta che nei casi più recenti (Fig. 2b).

## DISCUSSIONE

Le molecole di adesione ed i TNF svolgono molteplici ruoli nella patogenesi delle sinoviti croniche, intervenendo nell'insorgenza e nel mantenimento dei processi flogistici (4-6). L'E-selectina, l'ICAM-1 e il VCAM-1 facilitano l'adesione delle cellule infiammatorie alle cellule endoteliali, la loro migrazione transendoteliale nella MS, la neoangiogenesi e infine la loro attivazione con produzione di citochine e di altre molecole effettrici (4-6). Anche il TNF $\alpha$  e si è dimostrato in grado di aumentare il traffico delle cellule infiammatorie nella MS, principalmente regolando l'espressione di molecole di adesione quali E-selectina, ICAM-1, e VCAM-1 sulle cellule endoteliali (10, 11, 24) e può promuovere una sinovite agendo direttamente sul tessuto articolare o anche per via indiretta attraverso l'induzione di altre citochine proinfiammatorie (25, 26). Analoghi effetti biologici sebbene non ancora completamente definiti sembra avere il TNF $\beta$  (27). Tuttavia l'esatto contributo di ognuna di queste molecole al mantenimento di un processo sinovite, quale quello dell'AP, è ancora lontano dall'essere completamente chiarito.

L'analisi immunoistochimica delle MS dei nostri malati di AP conferma il già segnalato (21) aumento di espressione in vivo di ICAM-1 e VCAM-1, ma non di E-selectina che, al contrario, nei nostri campioni risulta ridotta. Il rilievo di una positività per ICAM-1 sulle pareti vasali in tutti i campioni tissutali esaminati, avvalorà l'ipotesi che questa molecola di adesione sia non solo espressa costitutivamente sulle cellule endoteliali, ma che aumenti durante l'attivazione cellulare, dimostrando

di essere la principale molecola di adesione per il legame delle cellule all'endotelio nei tessuti infiammati (5).

È stato documentato per altre sinoviti ad impronta flogistica di lunga durata (6) che VCAM-1, generalmente assente nella MS normale, è sovraespressa dall'endotelio attivato e la nostra osservazione della sua presenza anche nella sinovite psoriasica avvalorava un suo ruolo anche nel determinismo di questa sinovite. Infine, la constatazione della ridotta espressione dell'E-selectina anche nei nostri campioni di MS con una più lunga durata di malattia, concorda con quanto già prospettato per altre forme di sinovite ad evoluzione cronica (5).

Nel loro complesso questi rilievi non sembrano quindi indicare peculiari modalità di localizzazione e di espressione delle molecole di adesione nella sinovite psoriasica rispetto ad altre sinoviti croniche. Tuttavia la nostra analisi del grado di espressione di queste molecole di adesione ha evidenziato alcune differenze in rapporto con la durata di malattia. La positività più marcata per l'E-selectina e, in parte, per l'ICAM-1 nelle forme di breve durata e al contrario, la maggiore espressione di VCAM-1 negli stadi più avanzati di malattia, mostrano per la prima volta come queste molecole possano essere espresse in maniera diversa e indipendente a livello sinoviale nelle diverse fasi dell'AP e ci inducono a ipotizzare un loro diverso coinvolgimento nell'evoluzione della malattia.

In questo senso il loro essere in grado di mediare le diverse capacità di legame dell'endotelio sinoviale induce ad ipotizzarne ruoli differenti correlati con la durata di malattia e mirati al mantenimento del processo sinovite dell'AP.

La sovraespressione del TNF $\alpha$  e, sebbene in minor misura, del TNF $\beta$  nella limitante e nelle aree più profonde del tessuto sinoviale, in quasi tutti i campioni esaminati, indipendentemente dalla durata di malattia, avvalorava ulteriormente il ruolo proinfiammatorio locale di queste citochine nella sinovite psoriasica. I nostri dati confermano il coinvolgimento del TNF $\alpha$  nell'induzione e nel mantenimento del processo flogistico (17) e documentano per la prima volta che anche il TNF $\beta$  sembra avere un ruolo nel determinismo di questa sinovite. I TNF possono indurre l'espressione di molecole di adesione (12-15), contribuendo indirettamente alla migrazione cellulare; la nostra osservazione della positività degli stessi campioni per E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e per i TNF,

convalida i dati già noti. Tuttavia la localizzazione immunostochimica del TNF $\alpha$  e del TNF $\beta$  sulle cellule endoteliali suggerisce anche che queste cellule possano produrre TNF e che i diversi TNF di per sé possano contribuire a regolare l'adesione e la migrazione cellulare nelle articolazioni colpite. La persistenza di un'aumentata espressione di queste citochine anche nella sinovite psoriasica di lunga durata, in analogia con quanto osservato in altre spondiloartriti (28), anche giovanili (10), ribadisce poi l'importanza del ruolo svolto dai TNF $\alpha$  e  $\beta$  nel perpetuare la flogosi sinoviale dell'AP.

I nostri dati assumono maggiore rilievo considerando un recente studio immunostochimico che ha dimostrato l'efficacia del trattamento con agenti biologici anti-TNF proprio a livello della MS delle spondiloartriti, suggerendo anche che i meccanismi immunomodulatori di tale terapia coinvolgano proprio l'espressione di alcune molecole di adesione (29).

I nostri rilievi immunostologici, pur nella loro aspecificità, dimostrano l'utilità di localizzare l'espressione di diverse molecole e citochine sulla MS dell'AP nelle diverse fasi della malattia. Le diverse espressioni delle molecole di adesione e delle citochine da noi rilevate non sono specifiche per la sinovite psoriasica ma sono indicative di una generica risposta al sottostante processo infiammatorio di qualsiasi sinovite cronica. Ad ogni modo tutte le molecole da noi esaminate in questo studio sono importanti per le interazioni tra cellule, inclusi il riconoscimento linfocita-cellula endoteliale e la migrazione cellulare nelle zone sede di flogosi. Questi avvenimenti sono fattori essenziali nella patogenesi di qualsiasi infiammazione cronica inclusa l'AP.

Nei nostri pazienti le variazioni nell'entità dell'espressione di alcune molecole di adesione e dei TNF, in parte correlata con la durata di malattia, potrebbero indicare la loro relativa importanza nel mediare i diversi meccanismi che si susseguono nell'evolversi della sinovite psoriasica. La loro migliore conoscenza potrà aiutarci a definire meglio il processo flogistico alla base della progressione dell'AP, favorendo anche lo sviluppo di nuove e più puntuali strategie terapeutiche.

## RINGRAZIAMENTI

*Gli Autori ringraziano la Sig.ra Giuliana Giuliani per l'ottima assistenza tecnica.*

**RIASSUNTO**

**Scopo:** Definire, sulla base della diversa durata di malattia, l'espressione ed il pattern di distribuzione sinoviale delle principali molecole di adesione quali E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 nonché del TNF $\alpha$  e TNF $\beta$  nell'AP.

**Materiali e Metodi:** Sezioni criostatiche di campioni di MS di 14 malati di AP [(M/F = 8/6; età media = 39.6aa (range 25-60)] sono state esaminate utilizzando differenti anticorpi mono e policlonali mediante una tecnica immunoistochimica standard, per identificare le diverse espressioni tissutali di alcune molecole di adesione (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) e di TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ .

**Risultati:** Nei malati con sinovite iniziale (< a 1 anno) l'espressione di E-selectina e di ICAM-1 era più intensa rispetto ai campioni tissutali dei pazienti con malattia di più lunga durata. Invece una positività di grado più elevato per VCAM-1 è stata riscontrata prevalentemente nei malati con AP di lunga durata. La presenza di TNF $\alpha$  è stata rilevata pressochè in tutti i campioni esaminati senza alcuna differenza tra i due gruppi, mentre l'intensità di positività per l'anti-TNF $\beta$  era globalmente più alta nelle forme di lunga durata.

**Conclusioni:** Le diverse molecole di adesione possono separatamente partecipare al processo sinovite nelle diverse fasi dell'AP, conducendo all'ipotesi di un loro diverso coinvolgimento durante l'evoluzione della malattia. Inoltre la sovraespressione di TNF $\alpha$  e TNF $\beta$  giustifica la loro azione proinfiammatoria locale all'interno della MS, e il loro importante ruolo nel perpetuare la sinovite dell'AP.

**Parole chiave** - Artrite psoriasica, membrana sinoviale, molecole di adesione, fattori di necrosi tumorale.

**Key words** - Psoriatic arthritis, synovial membrane, adhesion molecules, tumor necrosis factors.

**BIBLIOGRAFIA**

- Soren A. Histodiagnosis and clinical correlation of rheumatoid and other synovitis. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1978.
- Espinoza LR, Vasey FB, Espinoza CG, Bocanegra TS, Germain BF. Vascular changes in psoriatic synovium. A light and electron microscopic study. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 677-84.
- Ziff M. Role of the endothelium in chronic inflammatory synovitis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1345-52.
- Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, Kubo H, Nakagawa N, Nishibayashi Y, et al. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996; 16: 53-60.
- Mellbye OJ, Shen Y, Hogasen K, Mollnes TE, Forre O. Adhesion molecule expression and complement activation in vessel walls in synovial tissue from patients with chronic inflammatory joint disease. *Clin Rheumatol* 1996; 15: 441-7.
- Mojcik CF, Shevach EM. Adhesion molecules. A rheumatologic perspective. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 991-1004.
- Fiocco U, Cozzi L, Chieco Bianchi F, Rigon C, Vezzù M, Favero E, et al. Vascular changes in psoriatic knee joint synovitis. *J Rheumatol* 2001; 28: 2480-6.
- Lindsley HB, Smith DD, Davis LS, Koch AE. Regulation of the expression of adhesion molecules by human synoviocytes. *Sem Arthritis Rheum* 1992; 21: 330-4.
- Lipsky PE, Davis LS, Cush JJ, Oppenheimer-Marks N. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1989; 11: 123-62.
- Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor  $\alpha$  in synovial tissues and at the cartilage pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1125-32.
- Grom AA, Murray KJ, Luyrink L, Emery H, Passo MH, Glass DN, et al. Patterns of expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\beta$ , and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1703-10.
- Abbot SE, Kaul A, Stevens CR, Blake DR. Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells: characterization and assessment of adhesion molecule expression. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 401-6.
- Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, Perry CA, Shen CP, Szczepanski A, Carley WW. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 593-602.
- En Chin J, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME. Role of cytokines in inflammatory synovitis: the coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1776-86.
- Marlor CW, Webb DL, Bombara MP, Greve JM, Blue ML. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblast-like synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1992; 140: 1055-60.
- Partsch G, Steiner G, Leeb BF, Dunky A, Broll H, Smolen JS. Highly increased levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol* 1997; 24: 518-23.
- Richlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium. *J Rheumatol* 1998; 25: 1544-52.
- Partsch G, Wagner E, Leeb BF, Broll H, Dunky A, Smolen JS. T cell derived cytokines in psoriatic arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 691-3.

19. Mease PJ. Tumor necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 298-304.
20. Taccari E, Fattorossi A, Moretti S, Ricciari V, Fasani M, Zoppini A. Phenotypic profile of major synovial cell populations in longstanding psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1987; 14: 525-30.
21. Veale D, Yanni G, Rogers S, Barnes L, Bresnihan B, Fitzgerald O. Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 893-900.
22. Moll JMH, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3: 55-78.
23. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-immunoperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
24. Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 139: 1855-60.
25. Brennan DM, Maini RN, Feldmann M. TNF $\alpha$  - a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 1992; 31: 293-8.
26. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 872-7.
27. Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ). *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 327-32.
28. Canete JD, Llena J, Collado A, Sanmarti R, Gaya A, Gratacos J, et al. Comparative cytokine gene expression in synovial tissue of early rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 38-42.
29. Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, Demetter P, Van Damme N, Cuvelier C, et al. Immunomodulatory Effects of anti-Tumor necrosis factor a therapy on synovium in spondyloarthropathy. Histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 186-95.