

LAVORO ORIGINALE

Livelli di P-selettina solubile nel liquido sinoviale e nel siero di pazienti con artrite psoriasica

Soluble P-selectin levels in synovial fluid and serum from patients with psoriatic arthritis

R. Scrivo, A. Spadaro, V. Riccieri, M. Bombardieri, M. Di Franco, D. Celestino, G. Valesini

Cattedra di Reumatologia, Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

SUMMARY

Objective: *P-selectin is an adhesion molecule expressed by activated endothelial cells and platelets favouring the leukocyte adherence to microvascular endothelium. A soluble form of this molecule has been described, whose serum levels were found to be elevated and correlate with disease activity in rheumatoid arthritis (RA) patients. Aim of this study was to determine soluble P-selectin levels in synovial fluid (SF) and serum from patients with psoriatic arthritis (PsA), where it has never been investigated, to define its involvement in PsA synovial damage.*

Methods: *we analysed, by ELISA, soluble P-selectin serum and SF levels in 100 patients presenting a knee joint effusion: 38 of them presented PsA, 40 RA and 22 osteoarthritis (OA). We examined the main clinical and laboratory parameters of these patients. Soluble P-selectin serum levels were also detected in 15 healthy subjects.*

Results: *soluble P-selectin SF levels were significantly higher in PsA and RA patients respect to OA subjects. Soluble P-selectin SF levels were lower than those found in serum and the SF/serum ratio was higher in PsA and RA patients respect to OA. Soluble P-selectin serum levels were not significantly different among patients and controls. No correlation was found between SF and serum levels of soluble P-selectin and the main clinical parameters.*

Conclusions: *our study of soluble P-selectin in PsA reveals a prominent local role of this molecule, with no differences respect to RA. Histological findings may be of help in understanding the role of this adhesion molecule in PsA.*

Reumatismo, 2005; 57(4):250-255

INTRODUZIONE

La P-selettina è una glicoproteina di 140 kDa appartenente alla famiglia di molecole di adesione delle selettine, che media il legame dei leucociti alle cellule endoteliali durante le fasi iniziali di una risposta infiammatoria acuta (1). Questa molecola è espressa dalle cellule endoteliali attivate e dalle piastrine dopo rapido rilascio da parte, rispettivamente, dei corpi di Weibel-Palade e dei granuli α (2).

Nella membrana sinoviale (MS) dei malati con ar-

trite reumatoide (AR) è stata dimostrata una iperpressione di molecole di adesione comprendenti P- ed E-selettina, ICAM-1, VCAM-1 (3, 4), che potrebbero favorire il richiamo dei leucociti all'interno del cavo articolare. In particolare, è stato dimostrato nei test *in vitro* che la P-selettina espressa dai vasi della MS nell'AR rappresenta un importante mediatore dell'adesione tra monociti e/o linfociti e cellule endoteliali (5, 6). Un'ulteriore dimostrazione dell'importanza del ruolo della P-selettina nell'AR deriva dall'evidenza che l'uso di anticorpi anti-P-selettina può impedire l'adesione dei monociti all'endotelio microvascolare della MS (5). La P-selettina è presente in forma solubile nel plasma e nel siero sia di soggetti normali (7) che di pazienti con AR (8), potendo derivare dal clivaggio della forma espressa sulla membrana cellulare o, più probabilmente, rappresentare una variante molecolare della P-selettina priva della porzione transmembrana (9). Più di recente, anche nei malati

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Antonio Spadaro

Cattedra di Reumatologia

Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata

Azienda Policlinico Umberto I

Università di Roma "La Sapienza"

Viale del Policlinico, 155 - 00161 Roma

E-mail: a.spadaro.reuma@virgilio.it

con artrite psoriasica (AP) lo studio della MS, riccamente vascolarizzata, ha dimostrato la presenza di ICAM-1, VCAM-1 ed E-selettina (10), mentre l'espressione della P-selettina, che si è rivelata molto importante nell'AR, non è mai stata valutata nei pazienti affetti da AP.

Pertanto, abbiamo deciso di indagare il ruolo di questa molecola nell'infiammazione articolare dell'AP, analizzandone la concentrazione nel liquido sinoviale (LS) e nel siero dei malati e confrontandola con quella dei soggetti affetti da AR e osteoartrosi (OA).

PAZIENTI E METODI

In 100 malati con versamento del ginocchio, di cui 38 affetti da AP diagnosticata come un'artrite persistentemente sieronegativa associata a psoriasi cutanea (11), 40 con diagnosi di AR classificata in accordo con i criteri ARA (12) e 22 affetti da OA primaria (13-15), sono stati ottenuti campioni di siero e, tramite artrocentesi terapeutica, di LS.

Nessun malato era stato sottoposto ad artrocentesi e/o infiltrazione intraarticolare con preparati cortisonici o con altre sostanze farmacologiche nel ginocchio sede del versamento nel mese precedente alla nostra osservazione.

In ciascun paziente sono stati esaminati i principali parametri clinici e di laboratorio, comprendenti il numero delle articolazioni dolenti e/o tumefatte, la velocità di eritrosedimentazione (VES), la proteina C reattiva (PCR), il fattore reumatoide, l'esame chimico-fisico del LS. In tutti i pazienti, sui campioni appaiati di siero e LS conservati a -20°C, sono stati determinati i livelli della P-selettina solubile utilizzando un test ELISA (Bender Medsystem, Vienna, Austria). I micropozzetti di polistirene sono stati incubati tutta la notte a 4°C con un anticorpo monoclonale murino diretto contro la P-selettina. Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente con PBS-Tween 20 (0.05%) contenente siero-albumina bovina (0.5%), sono stati aggiunti ai pozzetti i campioni di siero e LS e l'anticorpo monoclonale murino coniugato con biotina (1:5000) diretto contro la P-selettina. Due ore dopo è stata aggiunta streptavidina-HRP. Al termine del periodo di incubazione è stata aggiunta la soluzione di substrato (miscela 1:2 di H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e la reazione è stata bloccata dopo 15 minuti con acido solforico 4N. I lavaggi sono stati effettuati utilizzando PBS contenente Tween 20 (0.05%).

La densità ottica è stata determinata con uno spettrofotometro Titertek Multiscan (Flow Laboratories) ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Ciascun campione è stato analizzato in duplicato e per ognuno è stata calcolata la media del valore di assorbimento espressa in ng/ml usando un'opportuna curva di calibrazione. Il test presentava un limite di sensibilità di 0.5 ng/ml. I coefficienti di variazione inter- e intra-assay per la P-selettina erano rispettivamente 6.0% e 2.8%.

I livelli della P-selettina sono stati analizzati anche in 15 campioni di siero provenienti da soggetti normali.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando, per le variabili continue, il test di Mann-Whitney per campioni indipendenti e il test di Wilcoxon per campioni appaiati. La significatività delle correlazioni è stata valutata con il coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman. I risultati sono stati espressi come mediana e 25°-75° percentile. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Le principali caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei pazienti dello studio sono mostrate nella tabella I.

Nel LS sono stati riscontrati livelli (mediana/25°-75° percentile) significativamente più elevati della P-selettina solubile ($p < 0.00001$) nei soggetti con AP (108/79-133 ng/ml) o AR (117/80-160 ng/ml) rispetto a quelli con OA (63/54-75 ng/ml) (Fig. 1). I livelli della P-selettina solubile nel LS erano inferiori a quelli sierici con un rapporto LS/siero più elevato nei malati con AP (0.21/0.15-0.39 ng/ml; $p < 0.01$) e AR (0.35/0.23-0.45 ng/ml; $p < 0.00001$) rispetto ai soggetti con OA (0.15/0.09-0.21 ng/ml) (Fig. 2). I livelli sierici della P-selettina dei pazienti con AP, AR, OA e dei controlli non erano significativamente differenti tra loro. Nei soggetti affetti da AR, ma non in quelli con AP e OA, vi era una correlazione statisticamente significativa tra i livelli della P-selettina solubile nel siero e nel LS ($r_s = 0.383$, $p < 0.016$). Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra i livelli sierici e sinoviali della P-selettina solubile ed i principali parametri di attività di malattia nei pazienti esaminati.

In tutti i pazienti il numero dei leucociti nel LS correlava positivamente con il valore del rapporto LS/siero della P-selettina ($r_s = 0.370$, $p < 0.0002$) e

Tabella I - Principali caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei pazienti ammessi allo studio.

	AP (n = 38)	AR (n = 40)	OA (n = 22)
Sesso (F/M)	7/31	29/11	14/8
Età (anni)*	48 (17-78)	54 (24-76)	63 (45-79)
Età all'esordio (anni)*	41 (17-67)	45 (12-73)	62.5 (53-71)
Durata di malattia (mesi)*	76 (1-372)	111 (2-588)	91 (1-420)
Tipo di interessamento articolare			
Monoarticolare (n/%)	6/15.7	0	10/45.4
Oligoarticolare (n/%)	11/28.9	0	6/27.2
Poliarticolare (n/%)	21/55.2	40/100	6/27.2
VES (mm/h)**	22 (10-30)	42 (22-60)	16 (7-18)
PCR (mg/L)**	12 (6-24)	15 (7-48)	2.5 (0-5.5)
Fattore Reumatoide (n/%)	3/7.9	24/60	0/0
Liquido sinoviale			
Leucociti (cellule/mmc)**	7.200 (5.000-9.800)	8.270 (6.600-16.000)	725 (400-1.150)
Polimorfonucleati (n)**	4.855 (2.060-7.650)	6.000 (4.115-12.453)	30 (10-187)
Polimorfonucleati (%)**	70 (60-80)	75 (65.5-81.5)	5 (5-14.5)
Mononucleati (n)**	2.020 (1.350-2.580)	2.012 (2.000-3.786)	2.012 (2.000-3.786)
Mononucleati (%)**	30 (20-40)	25 (18.5-34.5)	95 (85.5-95)
Coagulo mucinico (n/%)			
I tipo	9 (24)	7 (17.5)	20 (91)
II tipo	24 (63)	24 (60)	2 (9)
III tipo	5 (13)	9 (22.5)	0 (0)
Volume (ml)**	42.5 (23.5-57.5)	27.5 (10-45)	25 (7-35)
Terapia in atto (n/%)			
FANS	34/89.4	32/80	14/100
Cortisonici	13/34.2	30/75	-
DMARDs	16/42.1	31/77.5	-

*Media (range); **Mediana (25°-75° percentile)

con i livelli della P-selettina solubile nel LS ($r_s = 0.400$, $p < 0.0001$). Il numero dei polimorfonucleati e dei mononucleati nel LS correlava con il valore del rapporto LS/siero della P-selettina ($r_s = 0.315$,

$p < 0.001$; $r_s = 0.404$, $p < 0.0001$, rispettivamente) e con i livelli della P-selettina solubile nel LS ($r_s = 0.419$, $p < 0.00001$; $r_s = 0.359$, $p < 0.0004$, rispettivamente) (Tab. II).

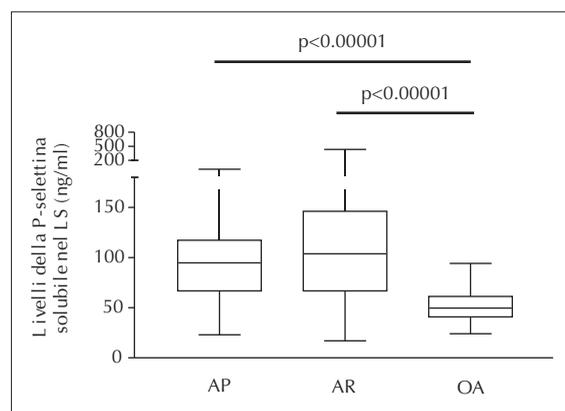


Figura 1 - Livelli della P-selettina solubile (grafico box & whiskers; mediana/25°-75° percentile/range) nel liquido sinoviale dei pazienti con AP (n = 38), AR (n = 40) e OA (n = 22).

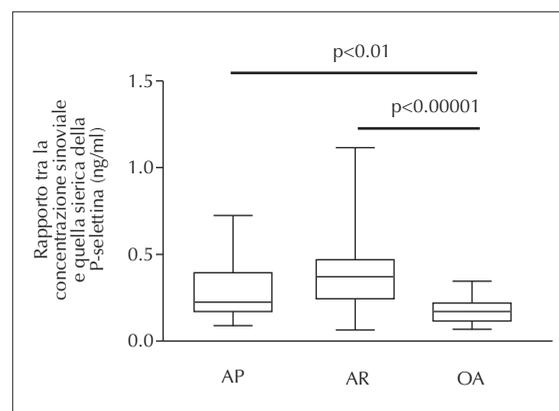


Figura 2 - Valori del rapporto tra la concentrazione sinoviale e quella sierica della P-selettina solubile (grafico box & whiskers; mediana/25°-75° percentile/range).

Tabella II - Correlazioni dei principali parametri del LS nei 100 pazienti esaminati nello studio.

		Mononucleati (cell/mmc)	PMN (cell/mmc)	Leucociti (cell/mmc)	P-selettina (Rapporto LS/siero)	P-selettina (ng/ml)
P-selettina (ng/ml)	r_s	0.359	0.419	0.400	0.674	-
	p<	0.0004	0.00001	0.0001	0.00001	-
P-selettina (Rapporto LS/siero)	r_s	0.404	0.315	0.370	-	-
	p<	0.0001	0.0017	0.0002	-	-
Leucociti (cell/mmc)	r_s	0.690	0.950	-	-	-
	p<	0.00001	0.00001	-	-	-
PMN (cell/mmc)	r_s	0.534	-	-	-	-
	p<	0.00001	-	-	-	-
Mononucleati (cell/mmc)	r_s	-	-	-	-	-
	p<	-	-	-	-	-

PMN = Polimorfonucleati

DISCUSSIONE

La P-selettina favorisce l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare, promuovendo un passaggio fondamentale nell'avvio della risposta infiammatoria (16). Infatti, è stato dimostrato che l'espressione della P-selettina preformata sulla superficie della membrana cellulare avviene entro un minuto dall'attivazione endoteliale (17) ed inoltre che l'inibizione o la perdita di questa molecola provocano, in numerosi modelli infiammatori, una significativa riduzione del rolling dei neutrofili (18). Nell'ambito delle malattie reumatiche infiammatorie croniche, il ruolo della P-selettina è stato indagato prevalentemente nei pazienti con AR: essa è espressa dalle cellule endoteliali dei vasi della MS sia *in vitro* che *in vivo* e livelli elevati della P-selettina solubile sono stati riscontrati nel LS dei pazienti (8, 19-20). Nei soggetti con AP la MS dimostra un'ampia presenza di molecole di adesione, in particolare ICAM-1, V-CAM-1 ed E-selettina (10, 21), ma non è mai stata valutata l'espressione della P-selettina. Nel nostro studio i pazienti con AP mostrano livelli di P-selettina nel LS significativamente più alti rispetto all'OA, con valori simili ad altre forme ad impronta flogistica come l'AR. Tuttavia, il riscontro di livelli più bassi di questa molecola nel LS rispetto al siero nelle diverse patologie considerate dipende dal meccanismo di produzione del LS in condizioni normali e patologiche. È noto infatti che la concentrazione proteica del LS durante il processo infiammatorio correla con l'intensità della flogosi, poiché è espressione dell'aumento della permeabilità della MS alle proteine e della loro sintesi locale, ma dipende anche dalle ca-

ratteristiche dell'interstizio sinoviale, dal peso molecolare o dalla taglia sterica delle proteine e dal drenaggio linfatico, responsabile della rimozione delle proteine dal cavo articolare (22). Pertanto, una adeguata interpretazione della concentrazione proteica nel LS necessita di una concomitante valutazione delle concentrazioni sieriche e della cinetica di produzione legata alla vascolarizzazione e al drenaggio linfatico articolare (22). Ne consegue che un approccio corretto allo studio della sintesi di una molecola prevede la valutazione del rapporto LS/siero (23). Infatti, è stato dimostrato che i livelli di IgG ed IgM nel LS in condizioni normali e patologiche (AR e OA) sono più bassi rispetto al siero ma, considerando il rapporto, si hanno in realtà valori più elevati nelle patologie articolari a carattere infiammatorio, a dimostrazione di una produzione locale di queste Ig. Nel nostro studio, l'evidenza di livelli sierici di P-selettina non significativamente differenti nell'AP, nell'AR e nell'OA rispetto ai controlli e un rapporto LS/siero più elevato nelle forme articolari a carattere infiammatorio rispetto a quelle a carattere degenerativo, suggerisce che nell'AP, analogamente all'AR, si abbia prevalentemente una iperproduzione locale di P-selettina. L'aumento dei livelli di P-selettina solubile nel LS dei pazienti con AP e AR potrebbe derivare anche dall'attivazione e/o dal danneggiamento delle cellule endoteliali e delle piastrine. Infatti è stato dimostrato in maniera indiretta che le piastrine nel LS dell'AR sono attivate, come risulta dalla presenza nel LS di molti fattori di crescita secreti in vivo dai granuli α e dal fatto che il numero degli stessi granuli α nelle piastrine del LS risulta inferiore rispetto al sangue, il che è imputa-

bile ad un consumo (24). È anche possibile che l'aumento della permeabilità vascolare alle proteine legato all'infiammazione sinoviale favorisca il passaggio della molecola all'interno del cavo articolare, in particolare nell'AP, dove la vascolarizzazione della MS è molto più evidente rispetto all'AR (21). Inoltre, l'aumento della permeabilità vascolare è dimostrato indirettamente nel nostro studio dall'evidenza che il volume di LS nei malati con AP era significativamente più elevato rispetto ai soggetti con AR e OA, in accordo con quanto precedentemente osservato da altri autori (25). In ogni caso concentrazioni della P-selettina nel LS in corso di AP sembrano scarsamente influenzate da una produzione sistemica, come dimostrato dalla mancanza di correlazione fra livelli sierici e del LS. Tale conclusione è stata invece riscontrata nei pazienti con AR.

La partecipazione della P-selettina nella flogosi articolare è ulteriormente sostenuta dalla correlazione dei suoi livelli nel LS e dal suo rapporto LS/siero con il numero dei leucociti, PMN e cellule mo-

nonucleate nel sangue. Nonostante la segnalazione che i livelli sierici della P-selettina potessero riflettere l'attività di malattia in un piccolo campione di 22 malati con AR (8), l'importanza clinica di questa molecola di adesione sembra essere modesta, infatti nel nostro studio non abbiamo riscontrato correlazioni significative tra i livelli sierici o sinoviali della P-selettina solubile con i principali parametri di attività di malattia sia nell'AP che nell'AR. Questo dato non appare sorprendente in quanto nella nostra casistica i livelli di P-selettina nel LS erano simili nell'AP e nell'AR pur essendo presente un diverso pattern di coinvolgimento articolare e di attività di malattia nelle due forme. In conclusione, questo studio suggerisce che nell'AP il ruolo della P-selettina sia prevalentemente locale, senza differenze particolarmente significative rispetto ad altre patologie a carattere infiammatorio come l'AR, sebbene studi istologici a livello della MS psoriasica potrebbero essere di ausilio per chiarire ulteriormente il ruolo di questa molecola di adesione.

RIASSUNTO

La P-selettina media il legame dei leucociti alle cellule endoteliali durante una risposta infiammatoria. Abbiamo analizzato l'espressione della P-selettina solubile nel LS e nel siero di soggetti con AP rispetto ai malati di AR e OA. Nel LS abbiamo riscontrato livelli significativamente più elevati della P-selettina nei soggetti con AP o AR rispetto a quelli con OA, mentre nel siero non vi erano differenze significative tra i malati e i controlli sani. Questi risultati suggeriscono che nell'AP il ruolo della P-selettina sia prevalentemente locale, sebbene studi istologici sulla membrana sinoviale potrebbero chiarire ulteriormente il ruolo di questa molecola di adesione.

Parole chiave - P-selettina solubile, artrite psoriasica, liquido sinoviale.

Key words - Soluble P-selectin, psoriatic arthritis, synovial fluid.

BIBLIOGRAFIA

- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757-60.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-101.
- Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 137-46.
- Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 147-57.
- Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, et al. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis: in situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J Clin Invest* 1993; 91: 2609-19.
- Konstantopoulos K, Kukreti S, Smith CW, McIntire LV. Endothelial P-selectin and VCAM-1 each function as primary adhesive mechanisms for T cells under conditions of flow. *J Leukocyte Biol* 1997; 61: 179-87.
- Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favaloro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med* 1992; 175: 1147-50.
- Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Brit J Rheumatol* 1997; 36: 164-9.
- Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McE-

- ver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem* 1993; 268: 15229-37.
10. Riccieri V, Spadaro A, Taccari E, Zoppini A, Koo E, Ortutay J, et al. Adhesion molecule expression in the synovial membrane of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 569-70.
 11. Michet JM. Psoriatic arthritis. In: Kelley WN, Harris ED jr, Ruddy S, Sledge CB, editors. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders 1993: 974-84.
 12. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries GF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
 13. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
 14. Altman R, Alarcon G, Appellrough D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1601-10.
 15. Altman R, Alarcon G, Appellrough D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 505-14.
 16. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
 17. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; 84: 92-9.
 18. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, et al. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1995; 86: 1106-14.
 19. Tak PP, Thurkow EW, Daha MR, Kluin PM, Smeets TJM, Meinders AE, et al. Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 77: 236-42.
 20. To SS, Newman PM, Hyland VJ, Robinson BG, Schriber L. Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 467-77.
 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. Weinberger A, Simkin PA. Plasma proteins in synovial fluids of normal human joints. *Sem Arthritis Rheum* 1989; 19: 66-76.
 23. Killingsworth LM. Clinical applications of protein determinations in biological fluids other than blood. *Clin Chem* 1982; 28: 1093-1102.
 24. Endresen GKM, Forre O. Human platelets in synovial fluid. A focus on the effects of growth factors on the inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 181-7.
 25. Punzi L, Bertazzolo N, Pianon M, Michelotto M, Cesaro G, Gambari PF. The volume of synovial fluid effusions in psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 535-6.