

Анализ экспрессии генов в крови как дополнительный инструмент мониторинга терапии метотрексатом больных ревматоидным артритом

Е.В. Четина, Н.В. Демидова, Д.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» РАМН, Москва, Россия

Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Контакты: Елена Васильевна Четина
etchetina@mail.ru

Contacts: Elena Chetina
etchetina@mail.ru

Поступила 12.03.13

Цель — оценить изменения клинических, иммунологических, рентгенологических показателей и экспрессии генов *mTOR* (mammalian target of rapamycin), главного регулятора клеточного роста и пролиферации; *ULK1* (маркер аутофагии); *p21* (ингибитор циклинзависимых киназ); каспазы 3 (индикатор апоптозной активности); *MMP9* (матриксная металлопротеиназа 9) и катепсина К, участвующих в деструкции сустава, а также провоспалительного цитокина ФНО α (фактор некроза опухоли α) в крови больных ревматоидным артритом (РА) при терапии метотрексатом (МТ). **Материал и методы.** Обследовано 33 больных РА (21 — позитивный и 12 — негативных по ревматоидному фактору — РФ; средний возраст 47,1 года) и 28 здоровых доноров (средний возраст 45,1 года). Все больные получали МТ в течение 2 лет. Клинический ответ оценивали по индексу DAS28, определяли также СОЭ, сывороточный уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), С-реактивного белка (СРБ) и РФ. Деструктивные изменения суставов оценивали с помощью рентгенографии. Экспрессию генов определяли в клетках периферической крови посредством обратнo-транскриптазной реакции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Терапия МТ значительно снижала активность заболевания по индексу DAS28, скованность, число припухших и болезненных суставов как у серопозитивных (РФ+), так и у серонегативных (РФ-) больных РА. При этом 10 больных достигли состояния ремиссии к концу исследования. У РФ- больных РА отсутствие прогрессирования разрушения суставов сопровождалось отсутствием значительных изменений экспрессии MMP9 и катепсина К, а также более сильным подавлением ФНО α , экспрессия которого становилась сравнимой с контрольными лицами. У больных, достигших ремиссии, наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии гена катепсина К по сравнению с началом исследования. У РФ+ больных РА терапия МТ приводила к статистически достоверному снижению клинических и иммунологических показателей, однако наблюдалось увеличение числа эрозий и дальнейшее сужение суставных щелей. Это сопровождалось значительным повышением экспрессии генов MMP9, катепсина К и ФНО α по сравнению со здоровыми лицами.

Заключение. Изменение экспрессии генов, ответственных за разрушение матрикса гиалинового хряща и кости, — MMP9 и катепсина К, а также уровень ФНО α в крови больных РА при терапии МТ коррелируют с изменениями клинических, иммунологических и рентгенологических параметров, используемых для оценки состояния больного в клинической практике.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; экспрессия генов; периферическая кровь; воспаление; поражение суставов; метотрексат.

Для ссылки: Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ. Анализ экспрессии генов в крови как дополнительный инструмент мониторинга терапии метотрексатом больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2013;51(6):654–61.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN BLOOD AS AN ADDITIONAL TOOL TO MONITOR METHOTREXATE THERAPY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS E.V. Chetina, N.V. Demidova, D.E. Karateev, E.L. Nasonov

Objective. To assess the changes in clinical, immunological, X-ray indicators and expression of the *mTOR* (mammalian target of rapamycin) genes, the key regulator of cell growth and proliferation; *ULK1* (autophagy marker); *p21* (cyclin-dependent kinase inhibitor); caspase 3 (indicator of apoptotic activity); *MMP9* (matrix metalloproteinase 9) and cathepsin K, which participate in joint destruction, and proinflammatory cytokine TNF α (tumor necrosis factor α) in blood of patients with rheumatoid arthritis (RA) receiving methotrexate (MT) therapy.

Materials and Methods. Thirty-three RA patients (21 with positive and 12 with negative rheumatoid factor (RF), respectively; median age, 47.1 years) and 28 healthy volunteers (median age, 45.1 years) were examined. All patients have been receiving MT for 2 years. The clinical response was assessed according to the DAS28 score. ESR and the serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA), C-reactive protein (CRP), and RF were also determined. Degenerative changes in the joints were evaluated by X-ray examination. Gene expression was measured in peripheral blood cells using reverse transcriptase reaction and real-time polymerase chain reaction.

Results. MT therapy considerably reduced the disease severity according to DAS28 score, as well as the number of swollen and painful joints both in seropositive (RF+) and seronegative (RF-) RA patients. Ten patients reached remission by the end of the study. In (RF-) RA patients, the absence of progression of joint destruction was accompanied by the absence of any significant changes in expression of MMP9 and cathepsin K, as well as a stronger suppression of TGF α (its expression became comparable to that in the control group). Patients who achieved remission showed a significant decrease in the expression level of the cathepsin K gene as compared to that at the start of the study. In (RF+) RA patients, MT therapy significantly reduced the clinical and immunological indicators; however, the increased number of erosion sites and further joint space narrowing was observed. It was accompanied by a considerable increase in the expression levels of the MMP9, cathepsin K, and TGF α genes as compared to those in healthy individuals.

Conclusions. The changes in expression of the genes responsible for destruction of the hyaline cartilage and bone matrix (MMP9 and cathepsin K) and the TGF α level in blood of RA patients due to MT therapy correlate with the changes in clinical, immunological, and X-ray parameters used to evaluate patient's condition in clinical practice.

Keywords: rheumatoid arthritis; gene expression; peripheral blood; inflammation; joint lesion; methotrexate.

For references: Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasonov EL. Analysis of gene expression in blood as an additional tool to monitor methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology Science and Practice. 2013;51(6):654–61.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2013-654-61>

Ревматоидный артрит (РА) — это аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным воспалительным поражением внутренних органов [1, 2]. Предполагаемые патогенетические механизмы РА включают нарушение клеточного деления иммунных клеток, составных синовиоцитов и хондроцитов хряща. В частности, в поврежденном суставе продуцируется большое количество цитокинов и других провоспалительных медиаторов, которые оказывают синергическое митогенное действие на синовиальные фибробласты и вынуждают их войти в клеточный цикл с последующим высвобождением деструктивных молекул в полость сустава [3]. Эрозии суставного хряща, в свою очередь, наблюдаются преимущественно в зонах, прилегающих к пролиферирующим синовиоцитам, которые, как предполагается, секретируют протеолитические ферменты, разрушающие коллаген и протеогликаны хряща и кости. Гиперплазия синовиоцитов также характеризуется опухолевым типом пролиферации и считается главной причиной деструкции сустава при РА [4].

Воспаление считается движущей силой РА и сопровождается структурными изменениями, которые развиваются по мере прогрессирования заболевания. Выраженность воспаления прямо пропорциональна тяжести структурных повреждений. Поэтому предикторами структурных нарушений при РА являются параметры, которые количественно описывают активность воспаления, такие как число припухших суставов (ЧПС) или уровень С-реактивного белка (СРБ) [5–7]. Кроме того, вероятность возникновения структурных изменений возрастает по мере увеличения длительности заболевания. Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и ревматоидный фактор (РФ) также являются факторами риска развития структурных повреждений [5–8].

Кроме того, системный характер РА означает, что эта патология вовлекает многие системы органов и компоненты центрального метаболизма клеток больного. Поэтому терапия должна приводить к общей нормализации клеточного метаболизма. Экспрессия генов является наиболее ранним ответом организма на изменения внешней и внутренней среды клетки, иногда задолго до изменений на тканевом уровне [9], поэтому ее можно использовать для прогнозирования состояния больного. А поскольку глубинные механизмы РА пока до конца не ясны, наиболее простым способом мониторинга развития заболевания и ответа пациента на лекарственные препараты может служить сопоставление экспрессии генов клеток периферической крови у больных РА и здоровых доноров.

Проведенные ранее исследования показали, что при РА происходит нарушение регуляции пролиферации и апоптоза в этих клетках [10]. Исследования экспрессии регуляторных генов в крови больных РА весьма немногочисленны. Однако в них выявлены статистически достоверные различия экспрессии генов, связанных с апоптозной активностью (*FasL*, *LIGHT*), а также регуляторов морфогенеза хряща и кости (*BMP 4/6* и *Runx2*) в лимфоцитах больных РА и здоровых лиц [11].

В ряде исследований, проведенных с использованием метода генетических матриц, также были выявлены различия по экспрессии больших групп генов в лимфоцитах больных РА и здоровых лиц. Различалась, в частности, экспрессия кластеров генов у больных с ранним РА, с длительным прогрессирующим заболеванием и у здоровых доноров

[12]. В другом исследовании обнаружена значительно более высокая экспрессия генов, регулируемых интерфероном (ИФН) 1-го типа, у больных РА по сравнению со здоровыми лицами [13]. Близнецовые исследования также показали наиболее значительное превышение экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом, ангиогенезом и протеолизом в крови больных РА по сравнению с их здоровыми сибсами. Кроме того, оказалось, что продукты трех генов, экспрессия которых наиболее значительно отличалась от нормы, ранее были выявлены в высокой концентрации в синовиальных тканях больных РА [14].

Ранее проведенные нами исследования показали, что уровни экспрессии генов главного регулятора клеточного роста и пролиферации *mTOR* (mammalian target of rapamycin); маркера аутофагии *ULK1*; ингибитора циклин-зависимых киназ *p21*; индикатора апоптозной активности каспазы 3, а также провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли α (ФНО α) в крови больных РА различаются на разных этапах заболевания и могут служить прогностическими маркерами тяжести болезни и разрушения суставного хряща [15–17]. При этом ген *mTOR* является одним из главных регуляторов клеточного роста, пролиферации и биосинтеза белка в клетке [18], а в условиях голодания, гипоксии или стресса, а также под действием рапамицина и его аналогов происходят инактивация *mTOR* и активация аутофагии, обеспечивающей выживание клетки [19].

Недавно показано, что ингибирование *mTOR* подавляет индуцированную митогенами пролиферацию Т- и В-лимфоцитов и сокращает продукцию интерлейкина 1 (ИЛ1) и ФНО α *in vitro* [20, 21], а также индуцированную тромбоцитарным фактором роста (ТФР) выработку ИЛ1 и ФНО α в синовиальных фибробластах больных РА [22]. Кроме того, блокирование *mTOR* приводит к уменьшению припухлости конечностей у грызунов с индуцированным артритом [23].

Аутофагия наступает при аресте пролиферации и связана с продукцией циклин-зависимых киназ, таких как *p21* [24]. Поскольку аутофагия может также индуцироваться цитокинами (ФНО α , ИФН) и аутоантителами, она, скорее всего, является важным фактором патогенеза РА и других аутоиммунных заболеваний [25]. При аутофагии происходит переваривание белков и собственных поврежденных клеточных органелл в аутофагосомах, сформированных с участием продуктов семейства генов *ATG* (или их аналогов — генов *ULK* у человека), которые являются маркерами аутофагии. Аутофагия тесно связана с апоптозом и может служить резервным механизмом клеточной смерти при продолжительном стрессе, когда нарушен апоптоз [24, 26]. Роль аутофагии при РА практически не изучена. Однако действие одного из модифицирующих заболевание антиревматических препаратов — хлорохина — основано на ингибировании аутофагии и усилении апоптоза [27]. Кроме того, показано, что индукция аутофагии в синовиальных фибробластах при РА усиливает устойчивость этих клеток к гибели посредством апоптоза [28].

В процессе апоптоза участвуют многочисленные каспазы, передающие информацию каспазе 3, которая непосредственно запускает программу апоптоза. Недавние исследования выявили низкую активность апоптоза в лейкоцитах синовиальной жидкости и синовиоцитах при РА [28–30].

Деструкция суставов при РА включает разрушение матрикса гиалинового хряща и кости [31]. В этом процес-

се участвуют матриксные металлопротеиназы (ММП) и литические ферменты остеокластов, такие как ММП9 и катепсин К [9, 32, 33], экспрессия которых повышена при РА как в сыворотке крови, так и в суставной жидкости [34–38]. Экспрессия ММП9 активируется провоспалительными цитокинами, включая ФНО α [39], и способна как снижаться в результате лечения ингибиторами ФНО α [40, 41], так и усиливаться [42]. Удобство использования генов *ММП9* и *катепсина К* обусловлено также тем, что они экспрессируются как в тканях сустава, так и в крови.

В данной работе проанализированы изменения клинических, иммунологических, рентгенологических показателей, а также экспрессии генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *ФНО α* , *ММП9* и *катепсина К* у больных РА при терапии метотрексатом (МТ).

Материал и методы

Пациенты. В исследование включены 33 пациента (21 — позитивный и 12 — негативных по РФ), среди них было 5 мужчин и 28 женщин в возрасте 18 лет и старше (средний возраст $47,2 \pm 14,2$ года), с достоверным диагнозом РА, с длительностью заболевания ≤ 2 лет и при отсутствии лечения базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и системной терапии глюкокортикоидами. Больные проходили лечение в ФГБУ «НИИР» РАМН в 2007–2008 гг. по программе «РАДИКАЛ». Регистрационный номер клинического исследования 0120.0810610. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике, и информированное согласие получено от всех исследуемых больных.

Диагноз выставлялся согласно классификационным критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. Критерием исключения пациента являлось наличие противопоказаний для назначения БПВП в эффективных терапевтических дозах.

Всем больным назначался МТ в дозе 10 мг/нед. После 2 нед дозу увеличивали до 15 мг/нед и продолжали терапию в течение 2 лет согласно инструкции ACR/Европейской антиревматической лиги (EULAR). 11 из 33 больных РА в дополнение к МТ получали метилпреднизолон в дозе 8 мг/сут. Каждого больного наблюдал один и тот же ревматолог каждые 6 мес после включения в исследование в течение 2 лет.

Ремиссию оценивали в соответствии с критериями ACR и по DAS28 (DAS28 $< 2,6$) [43, 44].

Контрольную группу составили 28 произвольно набранных доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

Клинические, лабораторные и инструментальные методы. Определяли ЧПС из 44, число болезненных суставов (ЧБС) из 53, продолжительность утренней скованности в минутах. Для количественной оценки активности РА использовали DAS28.

Иммунологические методы. Определение концентрации СРБ и IgM РФ в сыворотке проводилось с использованием иммунонефелометрического метода на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия). Определение концентрации АЦЦП проводилось иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора фирмы Axis-Shield Diagnostic Limited (Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя.

Инструментальные методы. Всем пациентам проводилась рентгенография кистей и дистальных отделов стоп в прямой проекции. Для оценки прогрессирования изменений суставов при РА использовали метод Sharp в модификации van der Heijde [45, 46]. При этом подсчитывали эрозии и сужение суставных щелей в 16 суставах и костях каждой кисти и в 6 суставах каждой стопы. Индексы числа эрозий и сужения суставной щели регистрировали в каждой кисти и каждой стопе, вычисляя среднее значение оценки двух исследователей.

Молекулярно-биологические методы. Общую РНК выделяли из цельной крови, используя коммерческий набор «РИБО-золь-А» («ИнтерЛабСервис», Москва). Обратнотранскриптазную реакцию проводили с использованием коммерческого набора «Реверта» («ИнтерЛабСервис», Москва). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили с использованием прибора модели 7300 Applied Biosystems и наборов для экспрессии генов (Applied Biosystems, США): *mTOR* (Hs0023522_m1), *ULK1* (Hs00177504_m1), *p21* (Hs00355782_m1), *каспазы 3* (Hs00263337_m1), *ФНО α* (Hs00174128_m1), *ММП9* (Hs00234579_m1) и *катепсина К* (Hs00166156_m1), как описано ранее [47]. β -Актин использовали в качестве эндогенного контроля.

Статистический анализ. Данные количественных экспериментов представлены как медиана (Me) [25-й; 75-й перцентили]. Анализы проводили в двух повторностях. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для статистической обработки результатов использовали тест Манна–Уитни. Значения вероятности ошибки $\leq 0,05$ считались достоверными. Статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечены звездочкой (*), по сравнению началом исследования — знаком #.

Результаты

Характеристика серонегативных больных РА (n=12).

Средний возраст больных серонегативным РА в начале исследования составлял $49,0 \pm 15,5$ года (табл. 1). Эта подгруппа состояла из одного мужчины и 11 женщин. Длительность заболевания составляла $4,3 \pm 4,2$ мес. 11 из 12 больных имели длительность заболевания от 1 до 5 мес, у одного пациента заболевание длилось 17 мес. Все больные имели II рентгенологическую стадию по Штейнбрökerу как в начале исследования, так и через 2 года. Все больные получали МТ, а 5 из 12 пациентов дополнительно принимали метилпреднизолон. В данной группе большинство больных (8 из 12) имели низкие уровни АЦЦП. Столько же больных данной подгруппы (8 из 12) имели высокую активность заболевания (DAS28 $> 5,1$) в начале исследования (см. табл. 1). В результате терапии происходило значительное уменьшение активности заболевания по индексу DAS28 ($p=0,0001$), длительности утренней скованности ($p=0,0004$), ЧПС ($p=0,0005$) и ЧБС ($p=0,002$). В конце исследования большинство больных имели умеренную активность заболевания (DAS28 от 3,2 до 5,1), а 5 больных (41,7%) достигли ремиссии (DAS28 $< 2,6$). Только у одного из 12 больных данной подгруппы были отмечены эрозии как в начале, так и в конце исследования, а сужение суставной щели в подгруппе прогрессировало незначительно ($p=0,13$).

Оценка экспрессии генов в крови серонегативных больных РА. В начале исследования у серонегативных больных

Таблица 1 Характеристика серонегативных больных РА

Показатель	Норма	До лечения (n=12) Ме [25-й; 75-й перцентили]	Через 2 года (n=12) Ме [25-й; 75-й перцентили]	p
РФ, МЕ/л	<15	9,5 [9,5; 9,5]	9,5 [9,5; 9,5]	
АЦЦП, ЕД/мл	<5	0,35 [0,15; 50,3]	1,0 [0,55; 44]	
СРБ, мг/мл	<5	12,51 [6,39; 30]	4,68 [1,54; 12,12]	0,03
DAS28	<2,6	5,37 [4,51; 5, 87]	3,29 [1,82; 3,56]	0,0001
Скованность	0	150 [75; 210]	10 [0; 30]	0,0004
ЧПС	0	8 [6; 10,5]	1 [0; 2]	0,0005
ЧБС	0	8,5 [6,5; 11,5]	2 [0; 3]	0,002
Общий счет эрозий по Шарпу {доля больных с эрозиями, %}	0	0 [0; 0] {8, 3 (1/12)}	0 [0; 0] {8, 3 (1/12)}	
Общий счет сужений по Шарпу	0	8 [5,5; 11]	13 [8,5; 17]	

РА была значительно ($p<0,05$) повышена экспрессия всех исследуемых генов по сравнению с контролем (рис. 1). Терапия МТ приводила к значительному снижению экспрессии генов *mTOR* и *ФНО α* ($p=0,01$), при этом она становилась сравнимой с соответствующими показателями у здоровых лиц ($p=0,44$). Вместе с тем МТ не оказывал существенного влияния на экспрессию генов *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *ММП9* и *катепсина К*. В данной группе число эрозий суставов не увеличивалось и сужение суставных щелей было незначительным (см. табл. 1).

Следовательно, при серонегативном РА терапия МТ не только подавляла воспалительный процесс, но и сдерживала прогрессирование деструкции суставов. Однако сохранение повышенной экспрессии большинства исследуемых генов может быть причиной обострения заболевания в случае прекращения терапии.

Характеристика серопозитивных больных РА (n=21).

Средний возраст больных серопозитивным РА в начале исследования составлял $46,2\pm 13,7$ года (табл. 2). Эта под-

группа состояла из 4 мужчин и 17 женщин. Длительность заболевания составляла $9,2\pm 6,5$ мес. У 18 больных она колебалась от 1 до 12, у 4 – от 18 до 23 мес. Все больные имели II рентгенологическую стадию по Штейнброкеру в начале исследования. Через 2 года у 18 больных сохранилась II, а у трех больных была III стадия. Все больные получали МТ, а 6 из 21 принимали также метилпреднизолон. У 18 из 21 больного отмечался высокий уровень АЦЦП. 15 больных данной подгруппы имели высокую активность заболевания ($DAS28 > 5,1$) в начале исследования (см. табл. 2). В результате терапии наблюдалось значительное ($p<0,05$) уменьшение активности заболевания по индексу DAS28 ($p=0,0001$), длительности утренней скованности ($p=0,001$) ЧПС ($p=0,002$) и ЧБС ($p=0,01$). В конце исследования большинство больных имели умеренную активность заболевания ($DAS28$ от 3,21 до 5,1), а 5 (23,8%) больных достигли ремиссии ($DAS28 < 2,6$). В начале исследования эрозии были у 5, а через 2 года – у 10 больных. Кроме того, в данной подгруппе наблюдалось статистически достоверное увеличение общего числа эрозий ($p=0,03$) и величины сужения суставной щели ($p<0,01$).

Оценка экспрессии генов в крови серопозитивных больных РА. В начале исследования у серопозитивных больных РА была значительно ($p<0,05$) повышена экспрессия генов *p21*, *каспазы 3*, *ММП9*, *катепсина К* и *ФНО α* (рис. 2). Терапия МТ приводила к значительному снижению экспрессии *ФНО α* ($p=0,05$), которая, однако, статистически достоверно превышала этот показатель у здоровых лиц ($p=0,04$). Вместе с тем МТ существенно не изменял экспрессию генов *mTOR*, *ULK1*, *p21* и *каспазы 3*, которая в случае последних трех генов оставалась значительно выше, чем в контроле. Экспрессия генов *ММП9* ($p=0,03$) и *катепсина К* ($p=0,04$) значительно повышалась. Это сопровождалось увеличением числа эрозий и сужением суставных щелей (см. табл. 2). Более того, после 2 лет лечения МТ общий счет сужений по Шарпу у серопозитивных больных оказался значительно ($p=0,005$) выше, чем у серонегативных.

Следовательно, при серопозитивном РА МТ менее эффективно сдерживает деструкцию суставов, чем при серонегативном. При этом сохранение повышенной экспрессии провоспалительного цитокина *ФНО α* , вероятно, связано с активной деструкцией суставов, а повышенная экспрессия большинства исследованных генов может быть причиной хронического характера заболевания.

Характеристика больных РА (n=10), достигших ремиссии. Средний возраст больных данной группы в начале исследования составлял $43,0\pm 17,1$ года. Среди них был

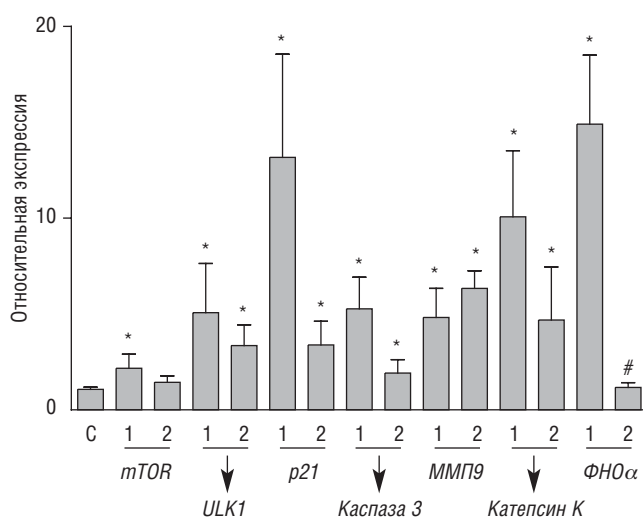


Рис. 1. Относительная экспрессия генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *ФНО α* , *катепсина К* и желатиназы *ММП9* в крови серонегативных больных ранним РА (n=12) до (1) и после (2) лечения МТ в течение 2 лет по сравнению со здоровыми лицами - контроль (С; n=28). Статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии гена в контроле обозначены звездочкой (*); статистически значимые различия по сравнению с уровнем экспрессии гена в начале исследования обозначены знаком # (здесь и на рис. 2, 3)

Таблица 2 Характеристика серопозитивных больных РА

Показатель	Норма	До лечения (n=21) Me [25-й; 75-й перцентили]	Через 2 года (n=21) Me [25-й; 75-й перцентили]	p
РФ, МЕ/л	<15	83,1 [58,5; 304,5]	76,7 [26,9; 250,1]	
АЦЦП, ЕД/мл	<5	100 [20,3; 100]	100 [68,7; 100]	
СРБ, мг/мл	<5	13,8 [3,71; 20,86]	6,2 [4,4; 11,4]	
DAS28	<2,6	5,56 [4,72; 6,49]	3,5 [2,4; 4,1]	0,0001
Скованность	0	60 [30; 180]	16,5 [0; 27]	0,001
ЧПС	0	8 [5,5; 13]	2 [0; 6]	0,002
ЧБС	0	9 [3; 18,5]	2,5 [0; 8]	0,01
Общий счет эрозий по Шарпу (доля больных с эрозиями, %)	0	0 [0; 0,5] {23,8 (5/21)}	1,5 [0; 5] {47,6 (10/21)}	0,03
Общий счет сужений по Шарпу	0	13 [7; 24]	23 [15,5; 31,5]	0,01

один мужчина и 9 женщин. Длительность заболевания в начале исследования составляла $7,8 \pm 6,6$ мес. У 8 из 10 больных она колебалась от 1 до 10 мес, у одного составляла 17 и еще у одного — 18 мес. Все больные имели II рентгенологическую стадию по Штейнброкеру как в начале, так и в конце исследования. Все больные получали МТ, а 3 из 10 принимали метилпреднизолон. 5 больных были серопозитивны, а 5 — серонегативны по РФ; 6 больных были позитивны по АЦЦП. 5 из 10 больных имели высокую ($DAS28 > 5,1$), остальные — умеренную ($3,2 < DAS28 < 5,1$) активность РА в начале исследования (табл. 3). В результате терапии происходило значительное уменьшение активности заболевания по индексу DAS28 ($p < 0,0001$), длительности утренней скованности ($p < 0,0001$), ЧПС ($p = 0,0003$) и ЧБС ($p < 0,0001$). Только у одного из 10 больных данной подгруппы были отмечены две эрозии в начале исследования, к концу исследования этот больной имел три эрозии. Сужение суставной щели за период наблюдения прогрессировало незначительно ($p = 0,26$).

Оценка экспрессии генов в крови больных РА, достигших ремиссии. В начале исследования у больных данной группы была значительно ($p < 0,05$) повышена экспрессия всех исследуемых генов, за исключением гена *mTOR*, по сравнению с контролем (рис. 3). Терапия МТ приводила к значительному снижению экспрессии *ФНОα* ($p = 0,01$) и *катепсина К* ($p = 0,04$). При этом экспрессия гена *ФНОα* становилась сравнимой с этим показателем у здоровых лиц ($p = 0,64$). Вместе с тем экспрессия генов *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *mTOR* и *ММП9* существенно не менялась.

Следовательно, в случае ремиссии у больных РА наблюдалось значительное подавление экспрессии маркеров воспалительного процесса (*ФНОα*) и суставов деструкции (*катепсина К*) при сохранении нормальной экспрессии гена *mTOR*. Однако сохранение повышенных уровней экспрессии остальных генов может указывать на то, что терапия МТ не улучшает состояние других важных клеточных функций, связанных с аутофагией, апоптозом и контролем клеточного цикла.

Обсуждение

Несмотря на то что МТ является основным препаратом для лечения РА, в настоящее время невозможно предсказать его эффективность у каждого конкретного больного. У многих пациентов он не дает желаемого эффекта или вызывает неблагоприятные реакции [48]. Вместе с тем выявление больных, чувствительных к МТ, позволило бы значительно улучшить результаты лечения [49].

В данном исследовании мы показали, что МТ значительно снижал активность заболевания по DAS28, скованность, ЧПС и ЧБС как у серопозитивных, так и у серонегативных больных РА.

При серонегативном РА отсутствие значительного прогрессирования разрушения суставов сопровождалось отсутствием значительных изменений экспрессии *ММП9* и *катепсина К*, а также более сильным подавлением экспрессии *ФНОα*, которая становится сравнимой с таковой у контрольных лиц.

При серопозитивном РА МТ менее эффективен, чем при серонегативном, поскольку, несмотря на статистически достоверное снижение клинических и иммунологических показателей, у РФ+ больных РА прогрессировала деструкция суставов: увеличивалось число эрозий и наблюдалось дальнейшее сужение суставных щелей. У этих пациентов была значительно повышена экспрессия генов, ассоциированных с активностью резорбции кости и суставного хряща, — *ММП9* и *катепсина К*, а также провоспалительного цитокина *ФНОα* по сравнению со здоровыми лицами. Остаточный синовит может быть причиной хронизации заболевания [50], а также связан с более короткой фазой ремиссии, которая наблюдалась у серопозитивных боль-

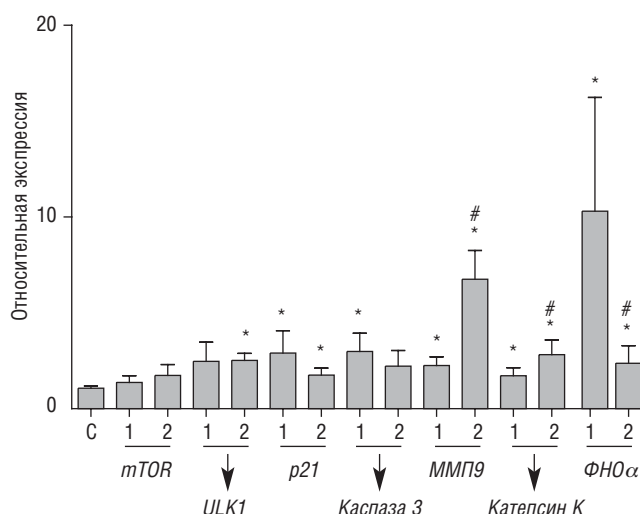


Рис. 2. Относительная экспрессия генов *tTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *ФНОα*, *катепсина К* и желатиназы *ММП9* в крови серопозитивных больных ранним РА (n=21) до (1) и после (2) лечения МТ в течение 2 лет по сравнению со здоровыми лицами — контроль (C; n=28)

Таблица 3 Характеристика больных РА, достигших ремиссии в конце исследования

Показатель	Норма	До лечения (n=10) Ме [25-й; 75-й перцентили]	Через 2 года (n=10) Ме [25-й; 75-й перцентили]	p
РФ, МЕ/л	<15	43,55 [9,5; 163,3]	26,9 [9,5; 133,2]	
АЦЦП, ЕД/мл	<5	20 [0,35; 98,95]	100 [1,1; 100]	
СРБ, мг/мл	<5	7,32 [2,25; 31,09]	4,88 [1,46; 11,01]	
DAS28	<2,6	5,08 [3,73; 5,85]	1,85 [1,66; 2,46]	<0,0001
Скованность	0	90 [30; 180]	0 [0; 12,5]	<0,0001
ЧПС	0	6 [5; 9,5]	0 [0; 0,5]	0,0003
ЧБС	0	7,5 [5,5; 13,5]	0 [0; 0,5]	<0,0001
Общий счет эрозий по Шарпу {доля больных с эрозиями, %}	0	0 [0; 0] {10 (1/10)}	0 [0; 0] {10 (1/10)}	
Общий счет сужений по Шарпу	0	7,5 [4; 22]	13 [10; 28,5]	

ных РА в других исследованиях [51–54], тогда как при серонегативном РА ремиссия сохранялась в течение 4 лет после терапии МТ [55].

В большинстве поведенных исследований не обнаружено связи между РФ и эффективностью МТ [51–54, 56–64], однако в работе J.A. Wessels и соавт. [65] отмечалось, что серопозитивность по РФ ассоциирована с меньшей эффективностью МТ.

Кроме того, следует отметить, что почти все серопозитивные больные РА в нашей выборке имели повышен-

ный уровень АЦЦП, а в ряде других исследований сообщалось, что АЦЦП-позитивность строго связана с устойчивостью к терапии МТ [66].

Хотя МТ значительно снижал активность РА, не удалось достичь ремиссии у всех обследованных пациентов. Это может быть отчасти связано с особенностями экспрессии исследованных нами генов, ответственных за функционирование основных метаболических систем в клетке: *ULK1*, *p21* и *каспазы 3*. Экспрессия этих генов оставалась на прежнем уровне у серопозитивных и незначительно снижалась у серонегативных больных, однако в обоих случаях оставалась значительно выше, чем у здоровых лиц. Это может свидетельствовать о том, что МТ не восстанавливает здоровый фенотип, но только создает новое состояние гомеостаза, при котором про- и противовоспалительные механизмы частично уравниваются [67].

Следует также отметить, что у больных РА, достигших ремиссии, динамика клинических и иммунологических показателей, а также экспрессии исследованных генов близка к таковой у серонегативных больных РА. Вместе с тем необходимо дальнейшее более детальное исследование изменения экспрессии генов в период ремиссии на фоне терапии МТ, которое проводится в настоящее время.

Таким образом, наши исследования показали, что изменение экспрессии генов, ответственных за функционирование основных метаболических систем в клетке, а также за разрушение матрикса гиалинового хряща и кости и содержание ФНОα в крови больных РА при терапии МТ, коррелирует с изменениями клинических, иммунологических и рентгенологических параметров, используемых для оценки состояния больного в клинической практике.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №12-04-00038а).

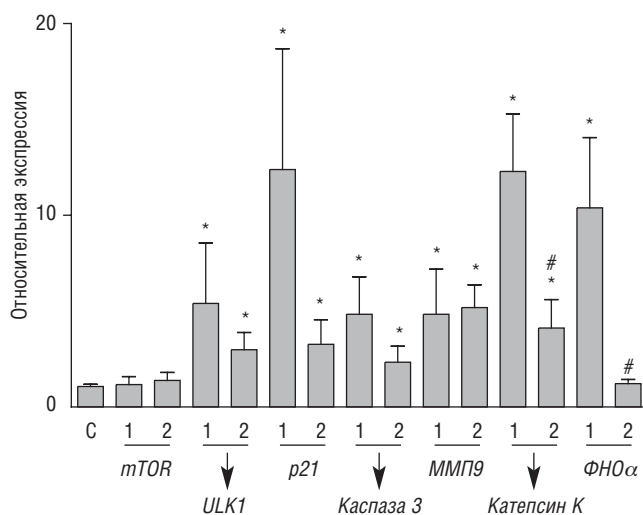


Рис. 3. Относительная экспрессия генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспаза 3*, *ФНОα*, *катепсина К* и желатиназы *ММР9* в крови больных РА (n=10), достигших ремиссии, до (1) и после (2) лечения МТ в течение 2 лет по сравнению со здоровыми лицами – контроль (С; n=28)

ЛИТЕРАТУРА

- Насонов ЕЛ, Каратеев ДЕ, Балабанова РМ. Ревматоидный артрит. Ревматология. Национальное руководство. Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008: С. 290–331. [Nasonov EL, Karateev DE, Balabanova RM. Revmatoidnyi artrit. Revmatologiya. Natsional'noe rukovodstvo. Nasonov EL, Nasonova VA, editors. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 290–331.]
- Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. N Engl J Med. 1990;322(18):1277–89. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199005033221805>.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 2003;423(6937):356–61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01661>.
- Rindfleisch JA, Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. Am Fam Physician. 2005;72(6):1037–47.
- Visser H, le Cessie S, Vos K, et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. Arthritis Rheum. 2002;46(2):357–65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.10117>.
- Machold KP, Stamm TA, Nell VP, et al. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of dis-

- ease. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(2):342–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ke1237>.
7. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):709–15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.20044>.
 8. Polzer K, Baeten D, Soleiman A, et al. Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(11):1610–6. DOI: [10.1136/ard.2007.083394](http://dx.doi.org/10.1136/ard.2007.083394).
 9. Tchétina EV, Squires G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol*. 2005;32(5):876–86.
 10. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunology Letters*. 2006;106(1):8–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2006.04.011>.
 11. Grcevic D, Jajic Z, Kovacic N, et al. Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol*. 2010;37(2):246–56. DOI: [10.3899/jrheum.090167](http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.090167).
 12. Olsen N, Sokka T, Seehorn CL, et al. A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(11):1387–92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.017194>.
 13. Van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(8):1008–14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2006.063412>.
 14. Haas CS, Creighton CJ, Pi X, et al. Identification of genes modulated in rheumatoid arthritis using complementary DNA microarray analysis of lymphoblastoid B cell lines from disease-discordant monozygotic twins. *Arthritis Rheum*. 2006;54(7):2047–60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.21953>.
 15. Tchétina EV, Demidova NV, Semyonova LA, et al. Differential expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the peripheral blood of early-stage rheumatoid arthritis patients as a prognostic marker of the disease activity and knee joint destruction: a two year follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2010;69 Suppl 3:675.
 16. Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ. Гетерогенность первичных больных ревматоидным артритом по экспрессии генов в крови: теоретические основы дифференциального подхода к терапии. *Научно-практическая ревматология*. 2011;(4):24–30. [Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasovov EL. Heterogeneity of early rheumatoid arthritis patients according to blood gene expression: theoretical bases of a differential therapy approach. *Rheumatology Science and Practice*. 2011;(4):24–30.]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2011-57>.
 17. Четина ЕВ, Семенова ЛА, Логунов АЛ и др. Повышенная экспрессия регуляторных генов в крови и суставном хряще больных ревматоидным артритом. *Научно-практическая ревматология*. 2012;(4):44–8. [Chetina EV, Semyonova LA, Logunov AL, et al. Enhanced regulatory gene expressions in the blood and articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology Science and Practice*. 2012;(4):44–8.]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2012-1111>.
 18. Hay N, Sonnenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926–45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1212704>.
 19. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1715094>.
 20. Yoshimura N, Ohmoto Y, Yasui H, et al. The direct effect of FK506 and rapamycin on interleukin 1(beta) and immunoglobulin production in vitro. *Transplantation*. 1994;57(12):1815–8.
 21. Foey AD, Feldmann M, Brennan FM. CD40 ligation induces macrophage IL-10 and TNF-alpha production: differential use of the PI3K and p42/44 MAPK-pathways. *Cytokine*. 2001;16(4):131–42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/cyto.2001.0954>.
 22. Carlson RP, Hartman DA, Tomchek LA, et al. Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;266(2):1125–38.
 23. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):439–48. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1660>.
 24. Lleo A, Invernizzi P, Selmi C, et al. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun*. 2007;29(2–3):61–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2007.06.003>.
 25. Lu B, Capan E, Li C. Autophagy induction and autophagic cell death in effector T cells. *Autophagy*. 2007;3(2):158–9.
 26. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):1025–40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>.
 27. Shin YJ, Han SH, Kim DS, et al. Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R19. DOI: [10.1186/ar2921](http://dx.doi.org/10.1186/ar2921).
 28. Catrina AI, Ulfgren AK, Lindblad S, et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(10):934–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.10.934>.
 29. Rasa K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, et al. Synovial fluid apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar2009>.
 30. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*. 2001;40(4):275–84. DOI: <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.40.275>.
 31. Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, et al. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):2009–17. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200109\)44:9%3C2009::AID-ART349%3E3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200109)44:9%3C2009::AID-ART349%3E3.0.CO;2-L).
 32. Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, et al. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):244–51. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10445>.
 33. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, et al. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(3):247–55. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/40.3.247>.
 34. Kim KS, Choi HM, Lee YA, et al. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol Int*. 2011;31(4):543–7. DOI: [10.1007/s00296-010-1592-1](http://dx.doi.org/10.1007/s00296-010-1592-1).
 35. Chia WT, Chen YW, Cheng LY, et al. MMP-9 mRNA as a therapeutic marker in acute and chronic stages of arthritis induced by type II collagen antibody. *J Formos Med Assoc*. 2008;107(3):245–52. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60143-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60143-6).
 36. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, et al. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(12):1645–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2006.063412>.

- <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2005.047704>.
37. Di Girolamo N, Indoh I, Jackson N, et al. Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. *J Immunol*. 2006;177(4):2638–50.
 38. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529–43. DOI: <http://dx.doi.org/10.2741/1817>.
 39. Richardson VJ. Divergent and synergistic regulation of matrix metalloprotease production by cytokines in combination with C-C chemokines. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23(3):715–26.
 40. Huang JL, Wu SY, Xie XJ, et al. Inhibiting effects of Leflunomide metabolite on overexpression of CD147, MMP-2 and MMP-9 in PMA differentiated THP-1 cells. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(1):304–10. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.045.
 41. Vandooren B, Kruithof E, Yu DT, et al. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2942–53. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.20477>.
 42. Matsushita I, Uzuki M, Matsuno H, et al. Rheumatoid nodulosis during methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2006;16(6):401–3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10165-006-0522-2>.
 43. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):44–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780380107>.
 44. Prevoo ML, van Gestel AM, van't Hof MA, et al. Remission in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. American Rheumatism Association preliminary remission criteria in relation to the disease activity score. *Br J Rheumatol*. 1996;35(11):1101–5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/35.11.1101>.
 45. Van der Heijde DM. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 1999;26(3):743–5.
 46. Van der Heijde DM, Dankert T, Nieman F, et al. Reliability and sensitivity to change of a simplification of the Sharp/van der Heijde radiological assessment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(10):941–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/38.10.941>.
 47. Четина ЕВ, ДиБатиста Д, Пул АР. Роль простагландина Е2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. Научно-практическая ревматология. 2009;(3):18–24. [Chetina EV, DiBattista D, Pool AR. Prostaglandin E2 role in inhibition of joint cartilage collagen destruction in patients with osteoarthritis. *Rheumatology Science and Practice*. 2009;(3):18–24.]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2009-1308>.
 48. Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF, et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*. 1994;37(10):1492–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780371013>.
 49. Machold KP, Stamm TA, Nell VP, et al. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(2):342–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kel237>.
 50. Schett G, Stach C, Zwerina J, et al. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(10):2936–48. DOI: 10.1002/art.23951.
 51. Gossec L, Dougados M, Goupille P, et al. Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(6):675–80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.010611>.
 52. Mottonen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, et al. Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with "saw-tooth" strategy. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(9):533–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.57.9.533>.
 53. Eberhardt K, Fex E. Clinical course and remission rate in patients with early rheumatoid arthritis: relationship to outcome after 5 years. *Br J Rheumatol*. 1998;37(12):1324–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/37.12.1324>.
 54. Forslind K, Hafstrom I, Ahlmen M, et al.; BARFOT Study Group. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*. 2007;66(1):46–52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2006.056937>.
 55. Morgan C, Lunt M, Brightwell H, et al. Contribution of patient related differences to multidrug resistance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(1):15–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.62.1.15>.
 56. Hider SL, Silman AJ, Thomson W, et al. Can clinical factors at presentation be used to predict outcome of treatment with methotrexate in patients with early inflammatory polyarthritis? *Ann Rheum Dis*. 2009;68(1):57–62. DOI: 10.1136/ard.2008.088237.
 57. Saevarsdottir S, Wallin H, Seddighzadeh M, et al.; SWEFOT Trial Investigators Group. Predictors of response to methotrexate in early DMARD naive rheumatoid arthritis: results from the initial open-label phase of the SWEFOT trial. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):469–75. DOI: 10.1136/ard.2010.139212.
 58. Vazquez I, Graell E, Gratacos J, et al. Prognostic markers of clinical remission in early rheumatoid arthritis after two years of DMARDs in a clinical setting. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(2):231–8.
 59. Ma MH, Ibrahim F, Walker D, et al. Remission in early rheumatoid arthritis: predicting treatment response. *J Rheumatol*. 2012;39(3):470–5. DOI: 10.3899/jrheum.110169.
 60. Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, et al.; FIN-RACo Trial Group. FINnish Rheumatoid Arthritis Combination therapy. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):894–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.10135>.
 61. Combe B, Cantagrel A, Goupille P, et al. Predictive factors of 5-year health assessment questionnaire disability in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003;30(11):2344–9.
 62. Hodgkinson B, Musenge E, Ally M, et al. Response to traditional disease-modifying anti-rheumatic drugs in indigent South Africans with early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2011;31(4):613–9. DOI: 10.1007/s10067-011-1900-5.
 63. Cao Y, Bonner A, Barra LJ. Response to second-line DMARDs and TNFi in seropositive and seronegative patients in early and late rheumatoid arthritis are not the same: results from the CATCH cohort and a large, established rheumatoid arthritis database [abstract]. *Arthritis Rheum*. 2011;63 Suppl 10:2202.
 64. Verschueren P, Esselens G, Westhovens R. Predictors of remission, normalized physical function, and changes in the working situation during follow-up of patients with early rheumatoid arthritis: an observational study. *Scand J Rheumatol*. 2009;38(3):166–72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03009740802484846>.
 65. Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, et al; Pharmacogenetics Collaborative Research Group. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1765–75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.22640>.
 66. Mori S, Hirose J, Yonemura K. Contribution of HLA-DRB1*04 alleles and anti-cyclic citrullinated antibodies to development of resistance to disease-modifying antirheumatic drugs in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2010;29(12):1357–66. DOI: 10.1007/s10067-010-1454-y.
 67. Knowlton N, Jiang K, Frank MB, et al. The meaning of clinical remission in polyarticular juvenile idiopathic arthritis: gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells identifies distinct disease states. *Arthritis Rheum*. 2009;60(3):892–900. DOI: 10.1002/art.24298.