# Ассоциация экспрессии генов в крови больных ревматоидным артритом с клиническими и лабораторными показателями до и после терапии метотрексатом

**Четина Е.В.[1], Демидова Н.В.[1], Каратеев Д.Е.[1], Маркова Г.А.[1], Макаров М.А.[1], Коломацкий В.В.[1], Логунов А.Л.[1], Нарышкин Е.А.[1], Липина М.М.[1], Макаров С.А.[1], Кузин А.Н.[2]**

[1]ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия; [2]Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия
[1]115522 Москва, Каширское шоссе, 34А; [2]115516 Москва, Тарный проезд, 3

[1]V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; [2]Bureau of Forensic and Medical Examination, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia
[1]34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; [2]3, Tarnyi Passage, Moscow 115516

**Контакты:** Елена Васильевна Четина; **etchetina@mail.ru**

**Contact:** Elena Chetina **etchetina@mail.ru**

Поступила 16.09.14

Определены гены, высокая базальная экспрессия которых указывает на эффективность терапии метотрексатом (МТ) в плане купирования воспаления и деструкции суставов у больных ревматоидным артритом (РА).
**Цель** – найти ассоциацию между начальной экспрессией генов *mTOR* (mammalian target of rapamycin), главного регулятора клеточного роста и пролиферации; *ULK1* (маркера аутофагии); *p21* (ингибитора циклин-зависимых киназ); *каспазы 3* (индикатора апоптозной активности); *ММП9* (матриксной металлопротеиназы 9) и *катепсина К*, участвующих в деструкции сустава, а также цитокинов: *ФНОα* (фактора некроза опухоли α), *ТРФβ1* (трансформирующего ростового фактора β1) и *Runx2* (Runt-related transcription factor) – в крови больных РА с активностью заболевания и деструкцией суставов до и после терапии МТ в течение 24 мес.
**Материал и методы.** Обследовано 40 больных РА (средний возраст – 47,5 года) с длительностью заболевания <2 лет и 26 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 ревматоидного фактора (РФ). Деструктивные изменения суставов оценивали с помощью рентгенографии. Кроме того, исследованы образцы крови и хряща коленного сустава 21 больного РА на поздней стадии заболевания (средний возраст – 50,4 года), а также хряща 25 здоровых лиц. Экспрессию генов в клетках периферической крови и хряща определяли посредством обратно-транскриптазной реакции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
**Результаты и обсуждение.** Терапия МТ значительно снижала активность заболевания по индексу DAS28, уровню СРБ, скованности, числу болезненных (ЧБС) и припухших (ЧПС) суставов, однако при этом значительно увеличивалась величина сужения суставной щели (ССЩ) по сравнению с началом терапии. Экспрессия генов *ULK1, p21, MMP9, катепсина К* и *ТРФβ1* была повышена как в начале исследования, так и через 24 мес, тогда как изначально повышенная экспрессия *mTOR, ФНОα, каспазы 3* и *Runx2* снижалась к концу терапии до уровня здоровых лиц. Начальная экспрессия генов *ТРФβ1, Runx2, каспазы 3, p21* отрицательно коррелировала с уровнем РФ, измеренным как в начале исследования, так и через 24 мес. Отмечена положительная корреляция начальной экспрессии *ULK1* и *ММП9* с уровнем СРБ до терапии, а также начальной экспрессии *ММП9* – с исходным значением DAS28 и ЧПС. Кроме того, начальная экспрессия гена *ФНОα* положительно коррелировала с ССЩ в конце терапии, а генов *p21, каспазы 3* и *Runx2* – с изменением DAS28. Кроме того, отмечена отрицательная корреляция начальной экспрессии гена *mTOR* с ЧПС и числом эрозий, *p21* и *ФНОα* – с ЧПС и ЧБС; *ФНОα*, *ТРФβ1*, *Runx2* и *катепсина К* – с продолжительностью скованности в конце терапии. Положительная корреляция обнаружена между экспрессией генов *катепсина К* и *ТРФβ1* в крови и суставном хряще больных РА на поздней стадии заболевания.
**Заключение.** Экспрессия генов *ММП9* и *ULK1* связана с активностью заболевания. Высокая начальная экспрессия остальных исследованных генов в крови ассоциируется с более эффективным воздействием МТ на скованность ( *ФНОα*, *Runx2, катепсин К* и *ТРФβ1*), ЧБС и ЧПС (*mTOR, p21* и *ФНОα*) и прогрессирование деструкции суставов *(mTOR)* и, возможно, играет протективную роль. Положительная корреляция экспрессии генов *ТРФβ1* и *катепсина К* в крови и суставном хряще может указывать на их корегуляцию в данных тканях при РА.
**Ключевые слова:** ревматоидный артрит; экспрессия генов; периферическая кровь; воспаление; поражение суставов; метотрексат.
**Для ссылки:** Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ и др. Ассоциация экспрессии генов в крови больных ревматоидным артритом с клиническими и лабораторными показателями до и после терапии метотрексатом. Научно-практическая ревматология. 2016;54(2):155-163.

## ASSOCIATION OF BLOOD GENE EXPRESSIONS IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS WITH CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS BEFORE AND AFTER METHOTREXATE THERAPY

**Chetina E.V.[1], Demidova N.V.[1], Karateev D.E.[1], Markova G.A.[1], Makarov M.A.[1], Kolomatsky V.V.[1], Logunov A.L.[1], Naryshkin E.A.[1], Lipina M.M.[1], Makarov S.A.[1], Kuzin A.N.[2]**

The genes, the high basic expression of which indicates the efficiency of methotrexate (MTX) therapy in relieving joint inflammation and destruction in patients with rheumatoid arthritis (RA), have been defined.
**Objective:** to find an association between the initial expression of the genes: *mTOR* (mammalian target of rapamycin), a major regulator of cell growth and proliferation; *ULK1* (an autophagy marker 1); *p21* (a cyclin-dependent kinase inhibitor); *kaspase-3* (an apoptosis activity indicator); *MMP-9* (matrix metalloproteinase 9), and *cathepsin K*, which are involved in joint destruction, and the cytokines: *TNF-α* (tumor necrosis factor-α), *TGFβ1* (transforming growth factor β1) and *Runx2* (Runt-related transcription factor 2) in the blood of RA patients with disease activity and joint destruction before and after MTX therapy during 24 months.

**Subjects and methods.** Forty patients (mean age, 47.5 years) with RA lasting < 2 years) and 26 healthy donors (mean age, 45.1 years) were examined. All the patients took MTX for 2 years. A clinical response was assessed with disease activity score (DAS28); erythrocyte sedimentation rate and the serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACCPA), C-reactive protein (CRP), and rheumatoid factor (RF) were also estimated. Joint destructive changes were assessed by radiography. Furthermore, blood and knee articular cartilage samples from 21 patients (mean age, 50.4 years) with late-stage RA and cartilage samples from 25 healthy individuals were investigated. Gene expression in the cells of peripheral blood and cartilage was determined by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction.
**Results and discussion.** MTX therapy considerably reduced disease activity assessed by DAS28, CRP levels, stiffness, tender and swollen joint counts (TJC and SJC); however, joint space (JS) narrowing (JSN) substantially increased compared with the baseline values. The expression of the *ULK1*, *p21, MMP-9, cathepsin K* genes, and *TGFβ1* was increased both at the beginning of the investigation and 24 months later whereas the initially higher expression of *mTOR*, *TNF-α, caspase 3*, and *Runx2* was decreased by the end of therapy to the level of the healthy individuals. The initial expression of the *TGFβ1, Runx2, caspase 3*, and *p21* genes correlated negatively with the RF level measured both at the beginning of the investigation and 24 months later. There was a positive correlation of the initial expression of *ULK1* and *MMP-9* with CRP levels prior to therapy and that of the initial expression of *MMP-9* with baseline DAS28 scores and NSJ. Moreover, the initial expression of the *TNF-α* gene positively correlated with JSN at the end of therapy and that of the *p21, caspase 3*, and *Runx2* genes with a change in DAS28. There was also a negative correlation of the initial expression of the *mTOR* gene with the SJC and the number of erosions; the *p21* and *TNF-α* genes correlated negatively with SJC and TJC; and the *TNF-α*, *TGFβ1, Runx2*, and *cathepsin K* genes also negatively correlated to the duration of stiffness at the end of therapy. A positive correlation was found between the expression of the *cathepsin K* and *TGFβ1* genes in the blood and articular cartilage of patients with late-stage RA.
**Conclusion.** The expression of the *MMP-9* and *ULK1* genes is associated with disease activity. The high initial blood expression of the other examined genes is associated with the more effective action of MTX on stiffness (*TNF-α*, *Runx2, cathepsin K*, and *TGFβ1*), TJC and SJC (*mTOR, p21*, and *TNF-α*), and the progression of joint destruction (*mTOR*) and may play a protective role. The positive correlation of the blood and articular cartilage expression of the *TGFβ1* and *cathepsin K* genes may point to their co-regulation in these tissues in RA.
**Key words:** rheumatoid arthritis; gene expression; peripheral blood; inflammation; joint injury; methotrexate.
**For reference:** Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, et al. Association of blood gene expressions in rheumatoid arthritis patients with clinical and laboratory parameters before and after methotrexate therapy. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2016;54(2):155-163 (In Russ.).
**doi: http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-155-163**

Ревматоидный артрит (РА) – это аутоиммунное заболевание неизвестной этиологиии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным воспалительным поражением внутренних органов [1, 2]. Метотрексат (МТ) является препаратом выбора для лечения РА, несмотря на то что число терапевтических мишеней для лечения заболевания постоянно растет, а в результате этого увеличивается число терапевтических агентов, специфически направленных на эти мишени. Однако в настоящее время невозможно предсказать эффективность МТ для каждого конкретного больного, тогда как у значительного числа пациентов он не дает желаемого эффекта или вызывает неблагоприятные реакции [3, 4]. Поэтому выявление больных РА, чувствительным к МТ, позволило бы значительно улучшить результаты терапии [5]. Прогнозирование ответа на МТ важно как при его назначении в виде монотерапии, так и при его использовании в комбинации с другими базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и генно-инженерными биологическими препаратами, такими как инфликсимаб, адалимумаб или этанерцепт [6–8].

Поскольку при РА поражаются многие системы органов и компоненты центрального метаболизма клеток больного, терапия должна приводить к восстановлению клеточного гомеостаза. Экспрессия генов является наиболее ранним ответом организма на изменения внешней и внутренней среды клеток, который иногда выявляется задолго до изменений на тканевом уровне [9], и ее можно использовать для оценки состояния больного. Сопоставление экспрессии генов в клетках периферической крови у больных РА и здоровых доноров в ходе терапии может оказаться наиболее простым способом мониторинга развития заболевания и ответа пациента на лекарственные препараты. Поэтому в последние годы интенсивно развиваются проведенные с использованием метода генетических матриц исследования, позволяющие оценить изменения экспрессии большого числа генов конкретного больного [10]. В отношении МТ таких исследований немного. Поскольку МТ является антагонистом фолата, в одномоментном исследовании было проведено сравнение экспрессии генов метаболизма фолата у больных РА (получавших и не получавших МТ) и у здоровых лиц. При этом оказалось, что начальные уровни экспрессии генов метаболизма фолата повышены у больных, которые не получали МТ, а на фоне терапии МТ их экспрессия снижалась и была сопоставима с таковой у здоровых лиц [11]. Однако, несмотря на снижение экспрессии генов метаболизма фолата у больных, получавших МТ, активность заболевания оставалась высокой. Поэтому, хотя при назначении МТ экспрессия генов метаболизма фолата нормализуется, она не является показателем клинического улучшения.

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; провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли α (ФНОα), а также матриксной металлопротеиназы 9 (ММП9) и катепсина К, участвующих в деструкции сустава, в крови больных РА различаются на разных этапах заболевания и могут служить прогностическими маркерами тяжести болезни и разрушения суставного хряща [12–15]. В частности, в ходе терапии улучшение клинических параметров сопровождалось снижением экспрессии перечисленных генов в крови до уровня здоровых лиц. Напротив, рост числа эрозий и величины сужения суставной щели (ССЩ) у серопозитивных больных РА в ходе терапии МТ сопровождался увеличением экспрессии *ММП9* и *катепсина К* в крови [16, 17]. Кроме того, нормализация экспрессии генов, ассоциированных с ростом клеток и апоптозной активностью, также ранее наблюдалась в присутствии МТ в культуре синовиальных фибробластов *in vitro* [18].

Поскольку при РА происходит опосредуемая воспалением потеря костной ткани и снижена активность восстановления кости [19], помимо регистрации изменений экспрессии генов, участвующих в деструкции тканей сустава при РА, важно иметь представление об уровне актив-

ности генов, участвующих в регенерации кости и суставного хряща. Поэтому в данное исследование включены также гены, регулирующие процессы костеобразования, – трансформирующего ростового фактора β1 *(ТРФβ1)* и *Runx2* (Runt-related transcription factor).

Runx2 является фактором транскрипции остеобластов, а также контролирует экспрессию белков костного матрикса [20], а ТРФβ1 регулирует механические свойства и состав костного матрикса [21]. Кроме того, активация mTOR связана с увеличением экспрессии *Runx2* и *ТРФβ1* в преостеобластах [22]. Напротив, подавление *mTOR* рапамицином ингибировало пролиферацию остеобластов и подавляло экспрессию *Runx2* и способность к минерализации [23].

Экспрессия *Runx2* в когорте больных РА на разных стадиях заболевания была снижена по сравнению со здоровыми лицами и отрицательно коррелировала с активностью РА [24]. Напротив, экспрессия *ТРФβ1* у больных РА повышена [25], а содержание ТРФβ1 в синовии коррелировало с рентгенологическим прогрессированием [26].

Мы предположили, что гены, экспрессия которых будет коррелировать с клиническими и/или лабораторными показателями до и после лечения МТ, могут служить маркерами активности и прогрессирования заболевания.

В настоящей работе изучалась корреляция экспрессии генов *mTOR, ULK1, p21, каспазы 3, ФНОα, ТРФβ1, Runx2, ММП9* и *катепсина К* с клиническими, иммунологическими, рентгенологическими показателями больных РА до и после терапии МТ, а также корреляция экспрессии этих генов в крови и суставном хряще больных РА на поздней стадии заболевания.

## Материал и методы

***Пациенты.*** В исследование включены 40 пациентов с РА с длительностью заболевания ⩽2 лет. Среди них было 5 мужчин и 35 женщин в возрасте 18 лет и более (средний возраст 47,5±15,5 года), не получавших БПВП и системной терапии глюкокортикоидами. Больные проходили лечение в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в 2007–2008 гг. по программе РАДИКАЛ. Регистрационный номер клинического исследования 0120.0810610. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике, 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 в неделю. После 2 нед дозу увеличивали до 15 мг в неделю и продолжали терапию в течение 2 лет. Одиннадцать из 40 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.

**Таблица 1** Характеристика больных ранним РА, Me [25-й; 75-й перцентили]

| Показатель | До лечения (n=40) | Через 2 года (n=40) | p |
|---|---|---|---|
| РФ, МЕ/л | 52 [9,5; 80] | 25,1 [9,5; 58,9] | 0,150 |
| АЦЦП, ЕД/л | 48,8 [0,4; 100] | 48,8 [0,4; 100] | 0,996 |
| СРБ, мг/мл | 14,7 [5,45; 24,7] | 5,14 [2,49; 11,3] | 0,002 |
| DAS28 | 5,56 [5,04; 5,96] | 3,29 [2,47; 3,82] | <0,001 |
| ΔDAS28 | | 2,45 [0,82; 3,32] | |
| Скованность | 90 [30; 180] | 15 [0; 30] | <0,001 |
| ЧПС | 8 [5; 11] | 1 [0; 3] | <0,001 |
| ЧБС | 8 [6; 12] | 2 [0; 6] | <0,001 |
| Число эрозий | 0 [0; 1] | 0 [0; 4,5] | 0,07 |
| ССЩ | 12 [7; 21] | 18 [14; 28] | 0,004 |

Кроме того, обследованы образцы крови и суставного хряща 21 больного РА с длительным течением заболевания в возрасте 50,4±13,2 года после артропластики, а также хрящи 25 здоровых лиц после аутопсии.

Контрольную группу составили 26 произвольно набранных доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

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

***Иммунологические методы.*** Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) и IgM ревматоидного фактора (РФ) в сыворотке проводилось с использованием иммунонефелометрического метода на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия). Определение концентрации антител к циклическому цитруллинированному пептиду (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. При этом подсчитывали эрозии и ССЩ в 16 суставах и костях каждой кисти и в 6 суставах каждой стопы. Индексы числа эрозий и ССЩ регистрировали в каждой кисти и каждой стопе, вычисляя среднее значение оценок двух исследователей.

***Молекулярно-биологические методы.*** Общую РНК выделяли из цельной крови, используя коммерческий набор РИБО-золь-А («ИнтерЛабСервис», Москва). Обратно-транскриптазную 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), *ФНОα* (Hs00174128_m1), *ММП9* (Hs00234579_m1), *катепсина К* (Hs00166156_m1), *ТРФβ1* (Hs99999918_m1) и *Runx2* (Hs00231692_m1), как описано ранее [27]. β-Актин использовали в качестве эндогенного контроля.

Исследование клинических, иммунологических и молекулярно-биологических показателей проводилось перед началом терапии МТ и через 24 мес.

***Статистический анализ.*** Данные количественных экспериментов представлены как медиана [25-й; 75-й перцентили]. Анализы проводили в двух повторностях. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для статистической обработ-

ки результатов использовали тест Манна–Уитни и Вилкоксона. Значения вероятности ошибки $p \leqslant 0,05$ считались достоверными. Статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечены звездочкой (*), по сравнению с началом исследования – знаком #.

## Результаты

***Характеристика больных ревматоидным артритом.*** Средняя длительность заболевания обследованных первичных больных составляла 7,8±6,0 мес. Половина (20 из 40) больных имели длительность заболевания от 1 до 5 мес, 12 – не более 12 мес, остальные – не более 24 мес. Все больные в начале исследования имели II рентгенологическую стадию по Штейнброкеру. Через 2 года трое больных имели III рентгенологическую стадию по Штейнброкеру, у остальных сохранилась II стадия. Четырнадцать из 40 больных (35%) имели низкие уровни АЦЦП, 25 из 40 пациентов были серопозитивными по РФ; 26 из 40 (62,5%) больных имели высокую активность заболевания (DAS28 >5,1) в начале исследования (табл. 1). На фоне терапии происходило значительное уменьшение активности заболевания по индексу DAS28 ($p<0,001$), длительности утренней скованности ($p<0,001$), ЧБС ($p<0,001$) и ЧПС ($p<0,001$). В конце исследования большинство больных имели умеренную (3,2<DAS28<5,1), 4 – высокую активность заболевания, а 12 (30%) – достигли ремиссии (DAS28 <2,6). В начале исследования эрозии были у 12, а через 2 года – у 15 больных. ССЩ значительно увеличилось к концу исследования ($p=0,004$).

***Оценка экспрессии генов в крови первичных больных ревматоидным артритом.*** В начале исследования у больных РА была значительно повышена экспрессия всех исследуемых генов по сравнению с контролем (рис. 1). Терапия МТ приводила к существенному снижению экспрессии генов *mTOR, каспазы 3* и *ФНОα*, при этом она становилась сравнимой с соответствующими показателями здоровых лиц. Вместе с тем экспрессия генов *ULK1, p21, ММП9, катепсина К, ТРФβ1* и *Runx2* оставалась высокой. Более того, экспрессия *ММП9* значительно повышалась по сравнению с началом исследования.

Анализ корреляции экспрессии исследованных генов по отношению друг к другу показал, что корреляция положительна, а коэффициент корреляции варьировал от 0,328 (*mTOR–ММП9*) до 0,963 (*p21–ТРФβ1*; табл. 2). При этом корреляция экспрессии генов *ULK1* и *ММП9* с остальными исследованными генами оказалась средней, поскольку коэффициент корреляции не превышал 0,7, тогда как корреляция остальных генов между собой была высокой.

***Анализ корреляции начальной экспрессии генов с клиническими показателями в начале исследования.*** В начале исследования экспрессия генов *p21, каспазы 3, ТРФβ1* и *Runx2* отрицательно коррелировала со значениями РФ

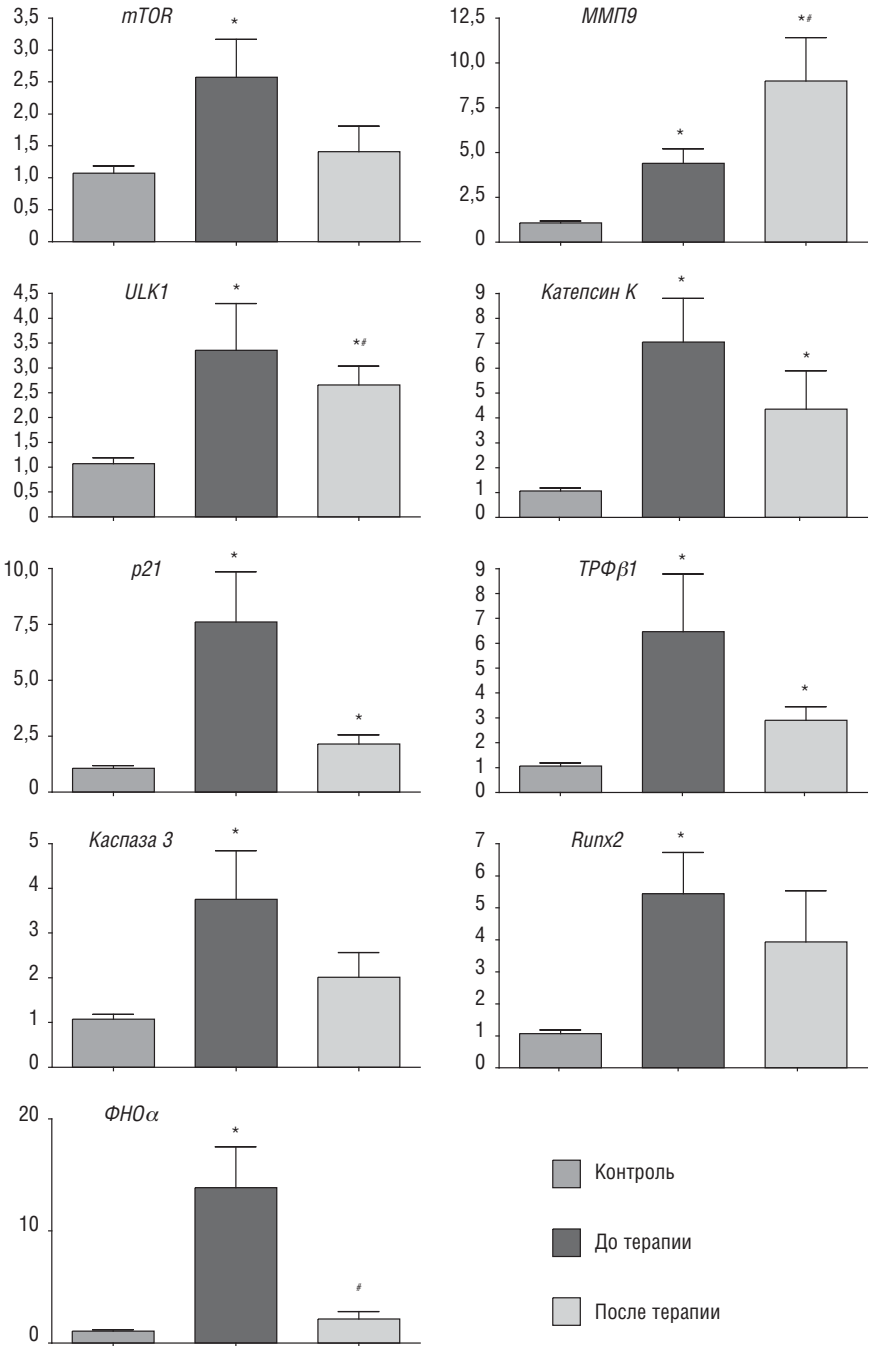


**Рис. 1.** Относительная экспрессия генов *mTOR, ULK1, p21, каспазы 3, катепсина К*, желатиназы *ММП9, ТРФβ1, Runx2* и *ФНОα* в крови больных РА (n=40) до и после терапии МТ в течение 24 мес по сравнению со здоровыми лицами (n=26; контроль). * – статистически значимые различия ($p \leqslant 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии гена в контроле; # – статистически значимые различия по сравнению с уровнем экспрессии гена в начале исследования

**Таблица 2** Коэффициенты корреляции (по Спирмену) относительной экспрессии исследованных генов до начала терапии МТ

| Гены | *ULK1* | *p21* | *Каспаза 3* | *ФНОα* | *ММП9* | *Катепсин К* | *ТРФβ1* | *Runx2* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *mTOR* | 0,396<br>p=0,02 | 0,817<br>p=0,0 | 0,878<br>p=0,0 | 0,697<br>p=0,0 | 0,328<br>p=0,05 | 0,764<br>p=0,0 | 0,844<br>p=0,0 | 0,874<br>p=0,0 |
| *ULK1* | | 0,608<br>p=0,0 | 0,570<br>p=0,0 | 0,432<br>p=0,005 | 0,623<br>p=0,0 | 0,655<br>p=0,0 | 0,520<br>p=0,001 | 0.471<br>p=0,04 |
| *p21* | | | 0,900<br>p=0,0 | 0,792<br>p=0,0 | 0,487<br>p=0,002 | 0,788<br>p=0,0 | 0,963<br>p=0,0 | 0,919<br>p=0,0 |
| *Каспаза 3* | | | | 0,661<br>p=0,0 | 0,431<br>p=0,008 | 0,751<br>p=0,0 | 0,908<br>p=0,0 | 0,899<br>p=0,0 |
| *ФНОα* | | | | | | 0,717<br>p=0,0 | 0,755<br>p=0,0 | 0,731<br>p=0,0 |
| *ММП9* | | | | | | 0,530<br>p=0,01 | 0,490<br>p=0,005 | 0,472<br>p=0,007 |
| *Катепсин К* | | | | | | | 0,784<br>p=0,0 | 0,774<br>p=0,0 |
| *ТРФβ1* | | | | | | | | 0,925<br>p=0,0 |

(табл. 3). Напротив, положительная корреляция экспрессии *ММП9* была обнаружена со значениями СРБ, ЧПС и DAS28. Уровень СРБ также положительно коррелировал с экспресией гена *ULK1*.

***Анализ корреляции начальной экспрессии генов с клиническими показателями в конце исследования.*** Значения коэффициента корреляции между РФ, измеренным в конце исследования, и начальной экспрессией генов *p21, каспазы 3, ТРФβ1* и *Runx2* снова оказались отрицательными (табл. 4). Кроме того, обнаружена отрицательная корреляция начальной экспрессии гена *mTOR* с ЧПС и числом эрозий, *p21* – с ЧПС и ЧБС, *ФНОα* – с ЧПС и ЧБС, измеренными в конце наблюдения. А значения утренней скованности в конце исследования отрицательно коррелировали с начальной экспрессией генов *катепсина К, ТРФβ1* и *Runx2*. Напротив, наблюдалась положительная корреляция экспрессии *ФНОα* с ССЩ, а также начальной экспрессии генов *p21, каспазы 3, Runx2* и динамикой DAS.

***Анализ корреляции начальной экспрессии генов в крови и суставном хряще больных ревматоидным артритом на поздней стадии.*** Анализ корреляции экспрессии генов *mTOR, ULK1, p21, каспазы 3, ФНОα, катепсина К, ММП9, ТРФβ1* и *Runx2* в крови и суставном хряще больных РА на поздней стадии показал наличие положительной корреляции только в случае *ТРФβ1* и *катепсина К* (рис. 2).

**Таблица 3** Корреляция (по Спирмену) начальной экспрессии генов с клиническими и иммунологическими показателями больных РА до терапии

| Показатели | Гены | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *ULK1* | *p21* | *каспаза 3* | *ММП9* | *ТРФβ1* | *Runx2* |
| РФ | | -0,338<br>p=0,04 | -0,428<br>p=0,006 | | -0,346<br>p=0,04 | -0,346<br>p=0,03 |
| СРБ | 0,404<br>p=0,01 | | | 0,359<br>p=0,03 | | |
| DAS28 | | | | 0,387<br>p=0,01 | | |
| ЧПС | | | | 0,355<br>p=0,03 | | |

## Обсуждение

Некоторые показатели, отражающие активность заболевания, являются предикторами прогрессирования заболевания, деструкции суставов и функциональной недостаточности. Однако обычно они не позволяют прогнозировать эффективность противоревматических препаратов вследствие высокой гетерогенности больных РА, которая может свидетельствовать о различных механизмах патогенеза как у разных пациентов, так и у одного больного на разных стадиях заболевания. Поэтому необходим надежный и недорогой подход к выбору терапии РА на индивидуальной основе. Для этого может быть использована стратификация больных РА посредством молекулярного фенотипирования на основе анализа экспрессии генов, которые являются функциональными маркерами состояния пациента.

В данном исследовании, несмотря на значительное снижение активности заболевания на фоне лечения МТ, у большинства больных она оставалась умеренной, у четырех – высокой, и только 12 пациентов достигли ремиссии. Улучшение клинических показателей сопровождалось снижением экспрессии генов провоспалительного цитокина *ФНОα, каспазы 3, Runx2* и *mTOR* до уровня здоровых лиц. Однако экспрессия большинства остальных исследованных генов оставалась значительно выше нормы.

Снижение экспрессии гена *mTOR*, по-видимому, может служить показателем эффективности терапии, поскольку сопровождается уменьшением индуцированной митогенами пролиферации Т- и В-лимфоцитов, выработки ИЛ1 и ФНО *in vitro* и индуцированную тромбоцитарным фактором роста выработку ИЛ1 и ФНОα в синовиальных фибробластах больных РА [28, 29]. Кроме того, блокирование *mTOR* приводило к уменьшению припухлости конечностей у грызунов с индуцированным антигенами артритом [30] и снижению активности заболевания у больных РА [31].

Сохранение в конце терапии незначительного повышения уровня экспрессии гена *mTOR* в исследуемой группе может указывать на то, что у некоторых больных РА МТ не позволяет полностью нормализовать его экспрессию. Это может частично обусловливать увеличение сужения суставной щели на фоне терапии МТ, поскольку *mTOR*

**Таблица 4** Корреляция (по Спирмену) начальной экспрессии генов с клиническими и иммунологическими показателями больных РА после терапии МТ в течение 24 мес

| Показатель | Гены | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *mTOR* | *p21* | *каспаза 3* | *ФНОα* | *катепсин К* | *ТРФβ1* | *Runx2* |
| РФ | | -0,364<br>p=0,03 | -0,353<br>p=0,03 | | | -0,403<br>p=0,02 | -0,411<br>p=0,02 |
| ЧПС | -0,446<br>p=0,01 | -0,416<br>p=0,01 | | -0,434<br>p=0,01 | | | |
| ЧБС | | -0,382<br>p=0,03 | | -0,362<br>p=0,03 | | | |
| Скованность | | | | -0,503<br>p=0,002 | -0,503<br>p=0,004 | -0,383<br>p=0,03 | -0,420<br>p=0,02 |
| Число эрозий | -0,430<br>p=0,02 | | | | | | |
| ССЩ | | | | 0,404<br>p=0,02 | | | |
| ΔDAS28 | | 0,382<br>p=0,02 | 0,395<br>p=0,01 | | | | 0,372<br>p=0,03 |

способен участвовать в разрушении кости. Так, макрофагальный колониестимулирующий фактор (МКСФ) способен поддерживать остеокласты в активном состоянии и подавлять экспрессию проапоптозного белка Bim посредством активации *mTOR* в предшественниках остеокластов. Напротив, связывание белка *mTOR* индуцировало апоптоз в тех же клетках [32]. Также важно отметить, что сигнальные пути нескольких остеокластогенных факторов, таких как МКСФ, рецептор лиганда ядерного фактора кВ (RANKL) и ФНОα, могут активировать *mTOR* как общую мишень [33]. В то же время ингибирование *mTOR* сиролимусом или рапамицином снижало скорость формирования синовиальных остеокластов, индуцировало их апоптоз и подавляло резорбцию кости в экспериментах *in vitro* [30, 33–35], а на животных моделях снижало инвазивность синовиоцитов и препятствовало формированию костных эрозий и потере хряща [30, 35]. Кроме того, в опытах на животных было показано, что другой ингибитор *mTOR* – эверолимус – способен подавлять активность остеокластов, ингибируя экспрессию катепсина К – протеазы, ответственной за потерю костной ткани [36]. В то же время наши данные расходятся с результатами другого исследования, отмечавшего более низкую активность гена *Runx2* в крови больных РА по сравнению со здоровыми лицами [24]. Эти расхождения могут быть связаны с тем, что авторы вышеуказанной работы исследовали когорту больных РА с разными стадиями заболевания.

Деструкция суставов при РА включает разрушение матрикса гиалинового хряща и кости [37]. В этом процессе участвуют ММП и другие ферменты остеокластов, такие как ММП9 и катепсин К [38–40], экспрессия которых повышена при РА как в сыворотке крови, так и в суставной жидкости [41–45]. Экспрессия ММП9 активируется провоспалительными цитокинами, включая ФНОα [46], и способна как снижаться в результате лечения ингибиторами ФНОα [47, 48], так и усиливаться [49].

Вероятно, МТ менее эффективно сдерживает деструкцию суставов, поскольку экспрессия гена *катепсина К* у обследованных больных РА оставалась высокой; более того, экспрессия *ММП9* существенно увеличивалась на фоне терапии. При этом ее повышение сопровождалось значительным увеличением ССЩ у обследованных больных. Кроме того, наблюдалось снижение экспрессии *Runx2*, фактора, ответственного за формирование костной ткани

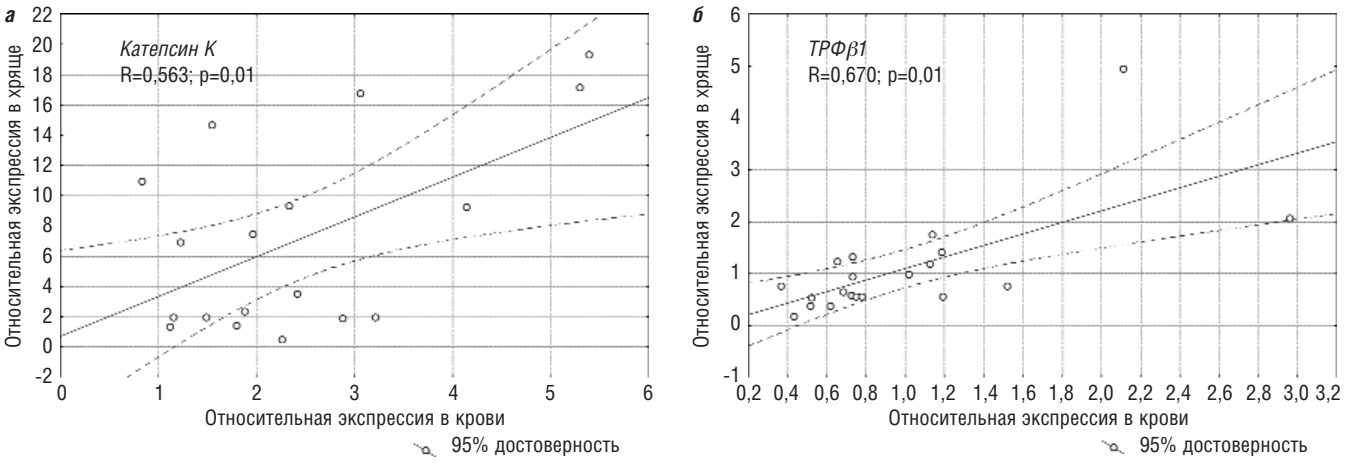


**Рис. 2.** Анализ линейной регрессии экспрессии генов *катепсина К (а)* и *ТРФβ1 (б)* по отношению к актину в периферической крови и суставном хряще больных РА

до уровня, незначительно превышающего норму в конце терапии МТ. Это подтверждает результаты других исследований, свидетельствующие о разобщении процессов резорбции и формирования кости и хряща при РА [19, 24].

Поскольку при РА экспрессия значительного числа генов повышена, анализ ее корреляции с уровнями клинических и лабораторных показателей активности болезни может дать дополнительную информацию о патологических процессах. Так, положительная корреляция начальной экспрессии *ММП9* с DAS28, ЧПС и уровнем СРБ до начала терапии МТ указывает на то, что экспрессия этого гена может служить показателем активности заболевания. Это согласуется с результатами других исследований, отмечавших участие *ММП9* в поддержании провоспалительной активности синовиальных фибробластов у больных РА [38] и в опытах на животных [42]. В то же время сопоставление начальной экспрессии генов с клиническими показателями, измеренными в конце терапии, выявило положительную корреляцию только между *ФНОα* и величиной ССЩ. Это позволяет предположить, что разрушение суставного хряща при РА обусловлено активностью этого цитокина.

Наиболее интересна отрицательная корреляция начальной экспрессии исследованных генов с ЧПС *(mTOR, p21, ФНОα)* и ЧБС (*p21* и *ФНОα*), скованностью (*ФНОα, катепсин К, ТРФβ1* и *Runx2*) и числом эрозий (*mTOR*) в конце терапии МТ, а также положительная корреляция с динамикой DAS28 (*p21*, *каспаза 3* и *Runx2*). Эти результаты свидетельствуют о том, что наиболее высокую эффективность терапии МТ для больных РА, ранее не получавших БПВП, можно ожидать при высокой исходной экспрессии указанных генов в крови. Наши данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований экспрессии генов в синовиальной ткани больных РА до и после терапии инфликсимабом, которые показали, что высокий уровень экспрессии провоспалительных генов ассоциировался с большей эффективностью терапии [50]. В другом исследовании у ответивших на терапию инфликсимабом была значительно повышена начальная экспрессия гена *ММП3* [51]. Кроме того, отмечалась отрицательная корреляция экспрессии гена *Runx2* в крови больных РА с индексом DAS28 [24].

Недавние исследования выявили низкую активность апоптоза в лейкоцитах синовиальной жидкости и синовиоцитах при РА [52–54]. Поэтому не удивительно, что более высокая начальная экспрессия *каспазы 3* ассоциируется с более выраженной положительной динамикой DAS28 и улучшением клинических показателей на фоне терапии.

Отрицательная корреляция экспрессии генов с клиническими показателями может свидетельствовать о протективной роли повышения экспрессии исследованных генов в начале заболевания, что подтверждается недавними данными о протективной роли *ФНОα*, вызывающего уменьшение содержания свободных радикалов, опосредованное сигнальным путем JAK/STAT и активацией NF-κB [55–60]. Напротив, отрицательная корреляция экспрессии генов *p21, каспазы 3, ТРФβ1* и *Runx2* с РФ в начале исследования указывает на то, что РФ может участвовать в подавлении экспрессии этих генов и, таким образом, противодействует их протективной функции.

Хотя экспрессия генов была измерена в крови, данные выводы, вероятно, можно экстраполировать на экспрессию по крайней мере некоторых из исследуемых генов в тканях сустава, поскольку мы наблюдали положительную корреляцию экспрессии генов *катепсина К* и *ТРФβ1* в крови и суставном хряще больных РА на поздней стадии заболевания.

Таким образом, наши исследования больных РА показали, что начальная экспрессия генов *ММП9* и *ULK1* связана с активностью заболевания. Высокая базальная экспрессия *mTOR*, *p21*, *ФНОα*, *катепсина К*, *ТРФβ1* и *Runx2* является предиктором хорошего ответа больных РА на МТ и поэтому может иметь протективное значение, по крайней мере у больных, ранее не получавших БПВП и системной терапии глюкокортикоидами. Кроме того, предлагаемый подход может быть использован для прогнозирования ответа больных РА на другие препараты.

***Прозрачность исследования***

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

***Декларация о финансовых и других взаимоотношениях***

*Все авторы принимали участие в разработке концепции и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.*

***Благодарности***

*Предварительные результаты исследования были опубликованы в виде тезисов в материалах European League Against Rheumatism (EULAR), Annual Symposium [Ann Rheum Dis. 2014;73 Suppl 2. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.3992].*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов ЕЛ. Применение ритуксимаба при ревматоидном артрите. В кн.: Насонов ЕЛ, редактор. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. Москва: ИМА-ПРЕСС; 2012. С. 55-93 [Nasonov EL. The use of rituximab in rheumatoid arthritis. In: Nasonov EL, editor. Anti-B-kletochnaya terapiya v revmatologii: fokus na rituksimab [Anti-B-cell therapy in rheumatology: Focus on rituximab]. Moscow: IMA-PRESS; 2012. P. 55-93].
2. Harris ED Jr. Rheumatoid Arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. 1990;322:1277-89. doi: 10.1056/NEJM199005033221805
3. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):26-37. doi: 10.1002/art.21519
4. Emery P, Breedveld FC, Hall S, et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomized, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet*. 2008;372(9636):375-82. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61000-4
5. De Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, et al. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1293-8. doi: 10.1002/art.23439

6. Burmester GR, Mariette X, Montecucco C, et al. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(6):732-9. doi: 10.1136/ard.2006.066761
7. Klareskog L, van der Heijde HD, de Jager JP, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363(9410):675-81. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15640-7
8. Emery P, Genovese MC, van VR, et al. Less radiographic progression with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate monotherapy across the spectrum of clinical response in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2009;36(7):1429-41. doi: 10.3899/jrheum.081018
9. Tchetina 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. Burska AN, Roget K, Blits M, et al. Gene expression analysis in RA: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics J.* 2014;14(2):93-106. doi: 10.1038/tpj.2013.48
11. Blits M, Jansen G, Assaraf YG, et al. Methotrexate normalizes upregulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2791-802. doi: 10.1002/art.38094
12. Tchetina 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.
13. 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;49(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. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2011;49(4):24-30 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2011-57
14. Четина ЕВ, Семенова ЛА, Логунов АЛ и др. Повышенная экспрессия регуляторных генов в крови и суставном хряще больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2012;50(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. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(4):44-8 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2012-1111
15. 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 [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. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2013;51(6):654-61(In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2013-654-61
16. Четина ЕВ, Пиванова АВ, Кузикянц КХ и др. Мониторинг терапии ритуксимабом больных ревматоидным артритом посредством анализа экспрессии генов в периферической крови. Научно-практическая ревматология. 2014;52(3):263-9 [Chetina EV, Pivanova AV, Kuzikyants KK, et al. Rituximab therapy monitoring in patients with rheumatoid arthritis hrough peripheral blood gene expression analysis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2014;52(3):263-9 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2014-263-269
17. Tchetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasonov EL. Rheumatoid factor positivity is associated with increased joint destruction and upregulation of matrix metalloproteinase 9 and cathepsin K gene expression in the peripheral blood in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Int J Rheumatol*. 2013;2013:Article ID 457876. doi: 10.1155/2013/457876
18. Hä upl T, Yahyawi M, Lü bke C, et al. Gene expression profiling of rheumatoid arthritis synovial cells treated with antirheumatic drugs. *J Biomol Screen*. 2007;12(3):328-40. doi: 10.1177/1087057107299261
19. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, et al. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*. 2009;24(9):1572-85. doi: 10.1359/jbmr.090320
20. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*. 2008;13:898-903. doi: 10.2741/2730
21. Alliston T. TGF-β regulation of osteoblast differentiation and bone properties. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(4):349-50.
22. Kim J, Jung Y, Sun H, et al. Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling. *J Cell Biochem*. 2012;113(1):220-8. doi: 10.1002/jcb.23347
23. Tang CH, Lu DY, Tan TW, et al. Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/integrin-linked kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25406-15. doi: 10.1074/jbc.M701001200
24. 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):246-256. doi: 10.3899/jrheum.090167
25. Pohlers D, Beyer A, Koczan D, et al. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):R59. doi: 10.1186/ar2217
26. Rooney T, Roux-Lombard P, Veale DJ, et al. Synovial tissue and serum biomarkers of disease activity, therapeutic response and radiographic progression: analysis of a proof-of-concept randomised clinical trial of cytokine blockade. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):706-14. doi: 10.1136/ard.2009.108324
27. Четина ЕВ, ДиБатиста Д, Пул АР. Роль простагландина Е2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. Научно-практическая ревматология. 2009;47(3):18-23 [Chetina EV, DiBattista D, Pool AR. Prostaglandin E2 role in inhibition of joint cartilage collagen destruction in patients with osteoarthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2009;47(3):18-24. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2009-1308
28. 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. doi: 10.1097/00007890-199457120-00024
29. 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: 10.1006/cyto.2001.0954
30. Carlson RP, Hartman DA, Tomchek LA, et al. Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266(2):1125-38.
31. Bruyn GA, Tate G, Caeiro F, et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1090-5. doi: 10.1136/ard.2007.078808

32. Sugatani T, Hruska KA. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem*. 2005;280(5):3583-9. doi: 10.1074/jbc.M410480200
33. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, et al. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ*. 2003;10(10):1165-77. doi: 10.1038/sj.cdd.4401285
34. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2294-302. doi: 10.1002/art.27504
35. Laragione T, Gulko PS. mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010;16(9-10):352-8. doi: 10.2119/molmed.2010.00049
36. Kneissel M, Luong-Nguyen NH, Baptist M, et al. Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts. *Bone*. 2004;35(5):1144-56. doi: 10.1016/j.bone.2004.07.013
37. 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: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2009::AID-ART349>3.0.CO;2-L
38. Xue M, McKelvey K, Shen K, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jun 29. pii: keu254. [Epub ahead of print].
39. 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.org/10.1002/jcp.10445
40. 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: 10.1093/rheumatology/40.3.247
41. 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
42. 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: 10.1016/S0929-6646(08)60143-6
43. 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: 10.1136/ard.2005.047704
44. 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. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2638
45. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529-43. doi: 10.2741/1817
46. 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.
47. 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
48. 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: 10.1002/art.20477
49. 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: 10.3109/s10165-006-0522-2
50. Van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, et al. Responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapy is related to pre-treatment tissue inflammation levels in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(4):563-6. doi: 10.1136/ard.2007.081950
51. Lindberg J, af Klint E, Catrina AI, et al. Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R179. doi: 10.1186/ar2090
52. 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: 10.1136/ard.61.10.934
53. 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: 10.1186/ar2009
54. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*. 2001;40(4):275-84. doi: 10.2169/internalmedicine.40.275
55. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:180-210. doi: 10.1159/000289205
56. Eddy LJ, Goeddel DV, Wong GH. Tumor necrosis factor-alpha pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;184(2):1056-9. doi: 10.1016/0006-291X(92)90698-K
57. Nelson SK, Wong GH, McCord JM. Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(1):223-9. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80021-1
58. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, et al. The involvement of cytokines in the second window of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):415-22. doi: 10.1038/sj.bjp.0703594
59. Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines safe in heart failure? *Eur Heart J*. 2011;32(6):680-5. doi: 10.1093/eurheartj/ehq484
60. Burchfield JS, Dong JW, Sakata Y, et al. The cytoprotective effects of tumor necrosis factor are conveyed through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in the heart. *Circ Heart Fail*. 2010;3(1):157-64. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.899732