

Биопсия синовиальной оболочки как метод оценки эффективности терапии ревматоидного артрита: подход к стандартизации клинических испытаний

С.Г. Раденска-Лоповок

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН, Москва

Ключевые слова: ревматоидный артрит, синовиальная оболочка, биопсия, стандартизация исследований.

Key words: rheumatoid arthritis, synovial membrane, biopsy, standardization of studies.

Контакты: Стефка Господиновна Раденска-Лоповок radenska@mail.ru

Contact: Stefka Gospodinovna Radenska-Lapovok radenska@mail.ru

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется хроническим воспалением синовиальной оболочки (СО), приводящим к ее инвазии в хрящ и кость. Это в свою очередь вызывает деформацию и деструкцию суставов, а впоследствии и раннюю инвалидизацию больных. Изучение СО помогает расшифровать некоторые звенья патогенеза РА, выявить потенциальные мишени лекарственного воздействия и, соответственно, открывает перспективы для поиска новых терапевтических препаратов [1–15]. Современные исследования должны дать ответ на вопрос, могут ли синовиальные биомаркеры использоваться для диагностики и определения прогноза заболевания у больных ранним РА.

За последние 15 лет накопилось много данных о поражении СО. Создание новых лекарственных препаратов — трудный и длительный процесс, связанный с существенными финансовыми затратами. Клинические испытания часто требуют подбора большой когорты больных и их длительного наблюдения для определения эффективности различных лекарственных препаратов. Однако число подходящих для исследования больных невелико. Наряду с этим этические нормы могут ограничивать число пациентов, принимающих плацебо, а больные, получающие новый препарат в ранних фазах клинического испытания, подвергаются риску. В связи с этим можно прогнозировать, что в ближайшие 10 лет мы столкнемся с новыми проблемами при изучении РА и его терапии. Необходимость поиска альтернативного пути исследований привела к созданию концепции дизайна клинических испытаний, основанной на изучении малых «насыщенных данными» групп больных для определения биомаркеров СО. Стандартизация получения образцов ткани СО и их обработки — одно из условий подбора соответствующих клиническим испытаниям групп больных, позволяющее сопоставлять данные многоцентровых исследований РА. Этот новый подход ускорит получение нужной информации о развитии болезни и ее терапии на ранних стадиях [15].

Биомаркеры как индикаторы нормального или патологического процесса, а также фармакологического ответа на терапевтическое воздействие дают возможность объективизации и измерения данных. Иммуногистохимические осо-

бенности СО при РА, в частности макрофагальная инфильтрация, а также экспрессия фактора некроза опухоли α (ФНО α) и интерлейкина 6 (ИЛ 6), коррелируют с показателями активности заболевания независимо от его давности [16–18]. Использование биомаркеров СО в исследованиях позволяет сократить время и число пациентов, нуждающихся в скрининге для определения потенциального эффекта новых препаратов. Например, известно, что количество макрофагов в субсиновиальном слое — важный критерий эффективности лечения РА, который не зависит от механизма действия основного лекарственного вещества и положительно коррелирует с показателями клинической ремиссии [19–25]. Количественное определение макрофагов СО — надежный метод оценки эффективности местного биологического воздействия на ранних стадиях лечения РА, менее чувствительный к плацебо [15]. Изучение достаточного количества биоптатов СО может пролить свет на специфические механизмы воздействия различных терапевтических агентов.

Оценка морфологических изменений в СО в клинических испытаниях дает богатую информацию о РА и его терапии. Предварительные результаты показывают, что такой подход может быть использован и при других исследованиях, например при псориатическом артрите [26]. В настоящее время продолжается поиск новых биомаркеров СО путем исследования профиля экспрессии генов [27–29].

Таким образом, разработка методики стандартизации получения и обработки биоптатов СО крайне необходима. Использование такой методики сделает сопоставимыми результаты научных исследований и клинических испытаний в разных центрах.

Биопсия СО

СО легко доступна для биопсии. Известны три чрескожных малоинвазивных метода [30]. *Во-первых* — слепая иглопункция биопсия СО коленного сустава. Она наиболее безопасна, проста в применении, может проводиться в любом ревматологическом стационаре, не нуждается в специальном техническом оснащении, не затратна. Процедура выполняется под местным обезболиванием иглой Parker–Pearson или Williamson–Holt в верхнем завороте ко-

ленного сустава. Можно получить несколько биоптатов из различных участков СО, а также из других суставов (плечевого, локтевого и голеностопного), а используя модифицированные иглы — и из мелких суставов [26, 31].

Биоптаты СО, полученные с помощью этого метода и артроскопии, сопоставимы, и в большинстве случаев можно собрать адекватный материал. D.L. Saaibi и H.R. Schumacher [31] выполнили 800 процедур иглой Parker—Pearson, при этом авторы не наблюдали ни одного осложнения, в том числе гемартроза или инфекции, и в 85% случаев получили пригодные для изучения образцы. При биопсии неподвижных суставов не удается получить подходящие для исследования образцы ткани, что является самым важным недостатком метода. Слепую игольчатую биопсию нельзя рекомендовать для серийных биопсий в клинических испытаниях терапевтических средств, но ее можно широко использовать в диагностических целях или при сравнительных научных исследованиях [31–33].

Во-вторых — биопсия под контролем УЗИ. Это сравнительно новый метод, который применяется в мелких и крупных суставах, бурсах и сухожильных влагалищах под местной анестезией [34, 35]. Сонографическое изображение, многократно получаемое в ходе одного исследования, позволяет выбрать лучшие участки для биопсии. В ходе исследования возможно обнаружение участков субсиновиального полиморфно-клеточного воспалительного инфильтрата и поверхностно расположенного фибрина, что указывает на активное воспаление СО. Наряду с этим отсутствие положительного сигнала не исключает наличие синовиита [36, 37]. Гипертрофия ворсин и собственно СО хорошо выявляется в сером диапазоне изображения. УЗИ более информативно, чем клинический счет поражения, особенно при множественном вовлечении суставов [38–40], поэтому оно является важным компонентом обследования больных и определения наиболее подходящих для биопсии суставов и участков СО.

Этот метод, несомненно, полезен, но не лишен недостатков. Так, костные компоненты, например надколенник, могут создавать ультразвуковые помехи, что ограничивает доступ к некоторым суставам. В литературе отсутствуют данные об исследовании клинически неизменных суставов. Однако УЗИ позволяет выбрать пораженный сустав и выполнить биопсию СО независимо от использованной техники при субклиническом поражении. В литературе отсутствуют данные о пригодности полученных образцов для лабораторного исследования (количественная полимеразная цепная реакция — ПЦР), получения клеточных культур и др. Хотя метод привлекателен, необходима его валидизация.

В-третьих — артроскопическая биопсия. Метод безопасен, хорошо переносится больными [33, 41–45], но по стоимости превосходит слепую биопсию толстой иглой, так как требует специального обучения персонала и технического обеспечения. Исследование проводится под местной анестезией. Специалист визуально оценивает воспаление синови, осматривает все отделы сустава и берет несколько образцов ткани из наиболее измененных участков. В коленном суставе это супрапателлярная сумка, медиальный и латеральный заворот, тибioфemorальное сочленение и пателлярный край. Процедуру можно проводить в пораженном и непораженном коленном, локтевом и метакарпофаланговом суставах [46, 47]. Осложнения артроскопии редки. Поч-

ти треть больных с гонитом отмечают незначительную боль и дискомфорт во время процедуры, менее 10% — быстро проходящий отек сустава и сосудистую реакцию. В исследовании, основанном на 15 682 артроскопиях, гемартроз развился в 0,9% случаев, тромбоз глубоких вен — в 0,2% и инфицирование сустава — в 0,1% [43].

Хотя артроскопия является дорогим методом, требующим обучения персонала, на сегодняшний день она рассматривается как «золотой стандарт» обследования и проведения биопсий, позволяющий получить образцы ткани из различных отделов суставов. Собранный таким образом материал пригоден для морфологической диагностики даже анкилозированных суставов. Активность воспаления в одном суставе коррелирует с поражением других суставов. Метод позволяет проводить динамическое наблюдение пораженного сустава в клинических испытаниях.

Получение биоптатов

Морфологическое заключение основывается на суммарном описании множества признаков в синовиальной оболочке, отражающих активность воспаления и коррелирующих с системными проявлениями болезни. Предполагают, что медиаторы воспаления и костной деструкции экспрессируются в суставе, прежде всего на стыке паннус—хрящ (СПХ) и не-СПХ. В различных исследованиях получены аналогичные данные о наличии Т-клеток, плазматических клеток и нескольких матричных металлопротеиназ и гранзимов в СПХ и не-СПХ. В то же время информация о количестве макрофагов противоречива [32, 48–50].

Морфологические изменения в синовии гетерогенны, поэтому изучение маленьких фрагментов ткани может привести к гипер- или гиподиагностике. Чтобы избежать диагностической ошибки, важно получить множество образцов из разных отделов сустава. Это позволит составить реальное представление о количестве Т-клеток в инфильтрате и активации маркеров с более чем 10% точностью, а также выявить двукратную разницу экспрессии генов при количественном определении методом ПЦР [51]. Аналогичные результаты дает изучение биоптатов, полученных под контролем УЗИ.

Хотя коленный сустав наиболее удобен для артроскопии, он не всегда подходит для биопсии, так как на момент исследования этот сустав может быть непораженным. В таких случаях рекомендуется получить серию биоптатов из другого крупного сустава.

Рекомендации для получения биоптатов СО коленного сустава

Рекомендации для получения биоптатов СО коленного сустава основаны на опыте разных исследователей, участвующих в консенсусном протоколе группы по изучению синовиов EULAR. Эти рекомендации могут быть использованы для дальнейших клинических исследований.

Поражение коленного сустава клинически наиболее выражено, СО в нем наиболее доступна. Образцы ткани необходимы для гистологического, иммуногистохимического, количественного исследований, ПЦР и др. Для этих целей используют 6–8 фрагментов ткани из пяти локализаций: верхнего заворота, медиальной поверхности СО, нижнего заворота, тибioфemorальной области и, наконец, СПХ рядом с краем надколенника. В соответствии с требованиями различных методик образцы размещают на влажной марлевой салфетке, смоченной физиологическим раствором, и готовят для дальнейшего хранения. Эти же принципы при-

менимы для исследования биоптатов разных локализаций не только при РА, но и при других нозологических формах.

Хранение биоптатов

Для гистологического исследования образцы фиксируют на 24 ч в 10% нейтральном формалине и заливают в парафиновые блоки по общепринятой методике. Окрашивают гематоксилином и эозином, а при необходимости и другими рутинными методами. Для иммуногистохимического исследования помещают в контейнер 8 образцов ткани, заливают Tissue-Tek, 2 мин инкубируют при комнатной температуре, после этого в течение 1 мин замораживают в жидком азоте, пока гель не побелеет, и в таком виде хранят до проведения исследования.

Образцы для ПЦР, исследования генов в ДНК (DNA-microarray), ELISA или других методов обычно сразу помещают в маркированные контейнеры, замораживают и хранят в жидком азоте. РНК в СО быстро деградирует, поэтому для ее изучения требуется максимально быстрая заморозка тканей в жидком азоте. Свежие образцы ткани можно хранить в специальных контейнерах, содержащих 1,5 мл RNAlater, при температуре 4 °С в течение 16–24 ч. На следующий день RNAlater удаляют, не повреждая биоптаты, и контейнеры оставляют в холодильнике при температуре -80 °С. Контейнеры нельзя хранить в жидком азоте. Условия обработки материала для изучения популяции клеток, ПЦР или DNA-microarray зависят от требований, предъявляемых к каждой методике [29].

Для выделения клеточной культуры синовиальную ткань помещают в культуральную среду (Dulbecco's modified Eagle's medium — DMEM, содержащую сыворотку). Клетки выращивают в среде вне ткани или выделяют путем обработки ферментами. Впоследствии синовиальные клетки выращивают в инкубаторе при температуре 37 °С в 5% CO₂.

Фрагменты СО можно культивировать *ex vivo* [52, 53]. В этом случае сохраняются архитектура ткани и межклеточные контакты и более точно отражается окружение

воспаления. Такая культура ткани спонтанно выделяет провоспалительные цитокины и используется для доказательства концепции потенциальных терапевтических мишеней. Биоптат помещают в 48- или 96-луночные планшеты со средой, содержащей DMEM или RPMI 1640. Ткань культивируют при отсутствии доступа провоспалительных индукторов (ФНО α, ИЛ 1 β) при температуре 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂. После инкубации супернатантные клетки отделяют для количественного определения провоспалительных медиаторов и устанавливают массу ткани. Образцы мгновенно замораживают и используют для выделения РНК или готовят для гистологического исследования.

При необходимости в препаратах можно выявлять кристаллы уратов в поляризационном микроскопе в неокрашенных парафиновых срезах. При подозрении на бактериальную инфекцию СО может быть окрашена по Граму или изучена при ПЦР [54].

Таким образом, стандартные условия сбора и хранения биоптатов СО необходимы для достоверного анализа результатов в многоцентровых клинических исследованиях. Хотя акцент сделан на РА, эти условия могут распространяться и на изучение других воспалительных заболеваний суставов, таких как спондилоартриты, остеоартроз и др.

Для определения исходов терапии можно сравнивать наличие или уровень экспрессии биомаркеров СО, например макрофагов в субсиновиальном слое до и после лечения. Маркеры могут быть использованы для определения дозы использованных препаратов.

Представленные данные являются первым шагом к стандартизации инновационных, доказательных клинических исследований [55]. Иммуногистохимическое (в том числе количественное) исследование, экспрессия генов и экспрессия белков также нуждаются в стандартизации, а сбор и сохранение материала необходимо проводить в соответствии с предложенными рекомендациями.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Tak P.P., Bresnahan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthr Rheum* 2000;43:2619–33.
2. Rooney M., Whelan A., Feighery C. et al. Changes in lymphocyte infiltration of synovial membrane and the clinical course of rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1989;32:361–9.
3. Fireshtein G.S., Pain M.M., Boyle D.L. Mechanisms of metotrexate action in rheumatoid arthritis. Selective decrease in synovial collagenase gene expression. *Arthr Rheum* 1994;37:193–200.
4. Tak P.P., van der Lubbe P.A., Cauli A. et al. Reduction of synovial infiltration after anti-CD4 monoclonal antibody treatment in early rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1995;38:1457–65.
5. Tak P.P., Taylor P.C., Breedveld F.C. et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1996;39:1077–81.
6. Kraan M.C., Reece R.J., Barg E.C. et al. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and metotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Findings in a prospective, randomized, double-blind, parallel-design clinical trial in thirty-nine patients at two centers. *Arthr Rheum* 2000;43:1820–30.
7. Youssef P.P., Triantifillou S., Parker A. et al. Variability in cytokine and cell adhesion molecule staining in arthroscopic synovial biopsies: quantification using color video image analysis. *J Rheumatol* 1997;24:2291–8.
8. Cunnane G., Madigan A., Murphy E. et al. The effect of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:62–9.
9. Catrina A.I., Lampa M.C., Ernestam S. et al. Anti-tumor necrosis factor (TNF)-alpha therapy (etanercept) down-regulates serum matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:484–9.
10. Smeets T.J., Kraan M.C., Loon M.E. et al. Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrates early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthr Rheum* 2003;48:2155–62.
11. Rooney T., Murphy E., Benito M. et al. Synovial tissue interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1393–8.
12. Makrygiannakis D., Klint E., Catrina S.B. et al. Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis. *Arthr Rheum* 2006;54:1463–72.
13. Catrina A.I., Klint E., Ernestam S. et al. Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2006;54:76–81.
14. Tak P.P. Examination of synovium and synovial fluid. In: Firestein G.S., Panayi G.S., Wolheim F.A., eds. *Rheumatoid arthritis: Frontiers in pathogenesis and treatment*.

- New York, USA: Oxford University Press, 2006;229–41.
15. Gerlag D.M., Tak P.P. Novel approaches for treatment of rheumatoid arthritis: lessons from the evaluation of synovial biomarkers in clinical trials. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:311–23.
 16. De Groot J., Zuurmond A.M., Tak P.P. Biological markers. In: Firestein G.S., Budd R.C., Harris E.D., McInnes I.B., Ruddy S., Sargent J.S., eds *Kelly's Textbook Of rheumatology*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: WB Saunders, 2009;475–89.
 17. Nak P.P., Smeets T.J., Daha M.R. et al. Analysis of synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthr Rheum* 1997;40:217–25.
 18. Atkinson A.J., Colburn W.A., DeGruttola V.G. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
 19. Smeets T.J., Kraan M.C., Versendaal J. et al. Analysis of serial synovial biopsies in patients with rheumatoid arthritis: description of control group without clinical improvement after treatment with interleukin 10 or placebo. *J Rheumatol* 1998;26:2089–93.
 20. Gerlag D.M., Haringman J.J., Smeets T.J. et al. Effects of oral prednisolone on biomarkers in synovial tissue and clinical improvement in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2004;50:3783–91.
 21. Haringman J.J., Gerlag D.M., Zwinderman A.H. et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:834–8.
 22. Beeten D., Houbiers J., Kruithof E. et al. Synovial inflammation does not change in the absence of effective treatment: implications for the use of synovial histopathology as biomarker in early phase clinical trials in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:990–7.
 23. Wijbrandts C.A., Vergunst C.E., Haringman J.J. et al. Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: implications for use of synovial sublining macrophages as biomarker. *Arthr Rheum* 2007;56:3869–71.
 24. Thurlings R.M., Vos K., Wijbrands C.A. et al. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:917–25.
 25. Bresnihan B., Pontifex E., Thurlings R.M. et al. Synovial tissue sublining CD68 expression is a biomarker of therapeutic response in rheumatoid arthritis clinical trials: consistency across centers. *J Rheumatol* 2009;36:1800–2.
 26. Parker R.H., Pearson C.M. A simplified synovial biopsy needle. *Arthr Rheum* 1963;6:172–6.
 27. Van Baarsen L.G., Bos C.L., van der Pouw Kraan T.C. et al. Transcription profiling of rheumatic diseases. *Arthr Res Ther* 2009;11:207.
 28. Hü upl T., Stuhlmüller B., Grutzkau A. et al. Do gene expression analysis inform us in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl.): i37–42.
 29. Lindberg J., Wijbrandts C.A., van Baarsen L.G. et al. The gene expression profile in the synovium as a predictor of the clinical response to infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* 2010; 5: e11310.
 30. Gerlag D.M., Tak P.P. How to perform and analyse synovial biopsies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:221–32.
 31. Saaibi D.L., Schumacher H.R. Jr. Percutaneous needle biopsy and synovial histology. *Baillier Clin Rheumatol* 1996;10:535–54.
 32. Youssef P.P., Kraan M., Breedveld F. et al. Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. *Arthr Rheum* 1998;41:663–9.
 33. Gerlag D.M., Tak P.P. Synovial biopsy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:387–400.
 34. Koski J.M., Helle M. Ultrasound guided synovial biopsy using portal and forceps. *Ann Rheum Dis* 2005;64:926–9.
 35. Scire C.A., Epis O., Codullo V. et al. Immunohistochemical assessment of the synovial tissue in small joints in rheumatoid arthritis: validation of minimally invasive ultrasound-guided synovial biopsy procedure. *Arthr Res Ther* 2007;9:R101.
 36. Scire C.A., Epis O., Vitolo B. et al. Comparison between US-guided and arthroscopic synovial biopsies. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):108.
 37. Koski J.M., Saarakkala S., Helle M. et al. Power Doppler ultrasonography and synovitis: correlating with histopathological findings and evaluating the performance of ultrasound equipment. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1590–5.
 38. Wakefield R.J., Green M.J., Marzo-Ortega H. et al. Should oligoarthritis be reclassified? Ultrasound reveals a high prevalence of subclinical disease. *Ann Rheum Dis* 2004;63:382–5.
 39. Magni-Manzoni S., Epis O., Ravelli A. et al. Comparison of clinical versus ultrasound-determined synovitis in juvenile idiopathic arthritis. *Arthr Rheum* 2009;61:1497–504.
 40. Scire C.A., Iagnocco A., Meenagh G. et al. Ultrasound imaging for the rheumatologist XXVIII. Impact of sonographic knee joint in recent-onset inflammatory polyarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:449–53.
 41. Baeten D., van den Bosch F., Elewaut D. et al. Needle arthroscopy of the knee with synovial biopsy sampling: technical experience in 150 patients. *Clin Rheumatol* 1999;18:434–41.
 42. Veale D.J. The role of arthroscopy in early arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:37–8.
 43. Kane D., Veale D.J., Fitzgerald O. et al. Survey of arthroscopy performed by rheumatologists. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:210–15.
 44. Klint E., Cartina A.L., Matt P. et al. Evaluation and macroscopic scoring. *Arthr Res Ther* 2009;11:R81.
 45. Vordenbäumen S., Joosten L., Friemann J. et al. Utility of synovial biopsy. *Arthr Res Ther* 2009;11:256.
 46. Kraan M.C., Versendaal H., Jonker M. et al. Asymptomatic synovitis precedes clinical manifest arthritis. *Arthr Rheum* 1998;41:1481–8.
 47. Ostendorf B., Dann P., Wedenkind F. et al. Miniarthroscopy of metacarpophalangeal joints in rheumatoid arthritis. Rating of diagnostic value in synovitis staging and efficiency of synovial biopsy. *J Rheumatol* 1999;26:1901–8.
 48. Kirkham B., Portek I., Lee C.S. et al. Intraarticular variability of synovial membrane histology, immunohistology, and cytokine mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:777–84.
 49. Smeets T.J., Kraan M.C., Galjaard S. et al. Analysis of the cell infiltrate and expression of matrix metalloproteinases and granzyme B in paired synovial biopsy specimens from the cartilage-pannus junction in patients with RA. *Ann Rheum Dis* 2001;60:561–5.
 50. Kane D., Jensen L.E., Grehm S. et al. Quantitation of metalloproteinase gene expression in rheumatoid and psoriatic arthritis synovial tissue distal and proximal to the cartilage-pannus junction. *J Rheumatol* 2004;31:1274–80.
 51. Boyle D.L., Rosengre S., Bugbee W. et al. Quantitative biomarker analysis of synovial gene expression by real-time PCR. *Arthr Res Ther* 2003;5:R352–60.
 52. Fearon U., Mullan T., Markham T. et al. Oncostatin M induces angiogenesis and cartilage degradation in rheumatoid arthritis synovial tissue and human cartilage cocultures. *Arthr Rheum* 2006;54:3152–62.
 53. Grabiec A.M., Krausz S., de Jager W. et al. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patients synovial macrophages and tissue. *J Immunol* 2010;184:2718–28.
 54. Gerlag D.M., Tak P.P. How useful are synovial biopsies for the diagnosis of rheumatic diseases? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:248–9.
 55. Van de Sande M.G.H., Gerlag D.M., Lodde B.M. et al. Evaluating antirheumatic treatment using synovial biopsy: a recommendation for standardization to be used in clinical trials. *Ann Rheum Dis* 2010;70:423–7.