



Università degli Studi di Palermo

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica

TESI DI DOTTORATO AA 2007/2010

Influenze della terapia con anti-TNF sulla concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e sul rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da Artrite Reumatoide in fase di attività clinica.

Tesi di Dottorato di :

Dott.ssa Maria Riili

Relatore

Ch.mo Prof. Giovanni Triolo

INTRODUZIONE	- 3 -
Aterosclerosi ed Infiammazione: una genesi comune	- 4 -
Meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione dell'aterosclerosi in pazienti con artrite reumatoide	- 7 -
TNF-α : un mediatore coinvolto nella patogenesi dell'artrite reumatoide e nell'aterosclerosi	- 10 -
Il blocco del TNF-α può rallentare lo sviluppo dell'aterosclerosi in pazienti con artrite reumatoide?	- 13 -
PAZIENTI E METODI	- 14 -
Popolazione in studio e disegno	- 14 -
Valutazioni di laboratorio.....	- 17 -
Analisi statistica	- 17 -
RISULTATI	- 17 -
DISCUSSIONE	- 22 -
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	- 26 -

INTRODUZIONE

È da tempo noto che l'artrite reumatoide (AR) è causa di morbidità significativa come conseguenza dell'infiammazione sinoviale, della distruzione articolare e della disabilità associata. In aggiunta a queste manifestazioni articolari vi è la recente consapevolezza di un incremento di mortalità tra i pazienti con artrite reumatoide legata principalmente ad un aumentato rischio di aterosclerosi coronarica.

Circa il 50% della coronaropatia si estrinseca in assenza dei tradizionali fattori di rischio come il fumo, il diabete mellito e l'ipercolesterolemia (1). Gli studi istopatologici ed i modelli animali hanno dimostrato inoltre l'importanza dei mediatori della flogosi (leucociti attivati, citochine, PCR) all'interno stesso della placca ateromastica; inoltre in ampi studi epidemiologici gli indici di infiammazione, proteina C reattiva (PCR) ed amiloide sierica (SAA), erano predittivi di eventi cardiovascolari (1-4). La flogosi cronica potrebbe quindi agire indipendentemente o sinergicamente con i tradizionali fattori di rischio aterosclerotico e potrebbe anche essere associata con uno stato di ipercoagulabilità. L'artrite reumatoide ed altre patologie infiammatorie croniche potrebbero fornire ulteriori conoscenze in queste interazioni.

La mortalità dei pazienti con artrite reumatoide è stata valutata da gruppi differenti, sebbene sia difficilmente confrontabile nei vari studi per differenze legate al tipo di popolazione, durata di malattia e lunghezza del follow-up. Nella maggior parte degli

studi è stato comunque riportato un incremento della mortalità con un accorciamento della vita media di 3-18 anni (5-17). La prognosi dei pazienti con artrite reumatoide è risultata spesso infausta e paragonabile se non peggiore di quella di pazienti affetti da malattia dei tre vasi o malattia di Hodgkin al IV stadio (18-20). Un eccesso di morbilità cardiovascolare risulta evidente in pazienti con artrite reumatoide. In effetti pazienti con artrite reumatoide presentano una maggiore prevalenza di infarto del miocardio, scompenso cardiaco congestizio ed ictus rispetto a quelli affetti da osteoartrosi (21). Banks et al (22) hanno confrontato 67 pazienti con artrite reumatoide con 37 soggetti affetti da osteoartrosi mostrando una prevalenza di cardiopatia ischemica circa doppia nei primi. In uno studio prospettico Gabriel et al. (23) hanno riportato una più elevata incidenza di scompenso cardiaco congestizio in 450 pazienti con artrite reumatoide rispetto a controlli. Inoltre pazienti con artrite reumatoide presentano un aumentato spessore intima-media della carotide misurato con tecniche ultrasonografiche (24, 25) che è predittivo di infarto del miocardio ed ictus cerebri (26).

Aterosclerosi ed Infiammazione: una genesi comune

Da alcuni anni si assiste ad una crescente attenzione del ruolo dell'infiammazione e delle risposte immunitarie nell'inizio e progressione dell'aterosclerosi. Ciò è legato principalmente ad una serie di osservazioni condotte a livello sperimentale: abbondanza di monociti, macrofagi e linfociti T nelle placche ateromasiche, nonché

di mediatori come la PCR, SAA e componenti attivati della cascata complementare (3, 4). Nei modelli animale di aterosclerosi indotta da una dieta iperlipidica le cellule che inizialmente aderiscono all'endotelio sono i monociti, che migrano negli strati subendoteliali, si riempiono di colesterolo e si differenziano in macrofagi (1). I macrofagi attivati ed i linfociti T rilasciano oppure inducono una varietà di mediatori della flogosi, incluse citochine (IL-1, TNF- α), fattori di crescita, molecole di adesione e metalloproteinasi (1). Tutto ciò comporta un ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie, la migrazione e la proliferazione di cellule endoteliali e fibrocellule muscolari lisce, la rottura di fibre collagene, l'aggregazione piastrinica, la trombosi in situ, la liberazione di NO ed il rilascio di radicali dell'ossigeno (1). Questi processi contribuiscono alla formazione della placca ateromasica e condividono parecchie caratteristiche con la patologia dell'artrite reumatoide.

I modelli animale illustrano l'importanza dell'infiammazione nell'aterosclerosi. I topi KO per il gene che codifica per l'apoproteina E (apoE^{-/-}) sviluppano una aterosclerosi accelerata in risposta alla dieta iperlipidica. Quando i topi apoE^{-/-} vengono incrociati con quelli SCID/SCID affetti da una forma di immunodeficienza severa combinata (che mancano di cellule T e B) si osserva una sostanziale riduzione delle lesioni ateromasiche a livello aortico (27). Inoltre il trasferimento di cellule T CD4⁺ dai modelli murini apoE^{-/-} ai topi apoE^{-/-}/SCID/SCID induce ispessimento con l'infiltrazione delle placche ateromasiche da parte delle cellule del donatore. Un effetto di riduzione delle placche ateromasiche, simile a quanto osservato nei modelli apoE^{-/-}, era evidente inoltre in modelli apoE^{-/-} trattati con immunoglobuline

policlonali (28) ed in animali resi tolleranti alle LDL ossidate (29). In maniera analoga in topi KO per il recettore delle LDL, il blocco del sistema costimolatorio CD40 attraverso la somministrazione di anticorpi monoclonali anti-CD40 riduce in maniera significativa le dimensioni della placca ateromasica, il contenuto in lipidi, il numero dei leucociti e l'espressione di recettori di adesione (VCAM-1) (30).

Il modello murino KO per l'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra) ha evidenziato un legame diretto tra l'artrite e l'infiammazione della parete dei vasi (31). Questi esperimenti dimostrano inoltre l'importanza di citochine proinfiammatorie come l'IL-1 nello sviluppo dell'aterosclerosi e nella patogenesi dell'artrite reumatoide (32).

Anche i risultati degli studi epidemiologici indicano una componente infiammatoria nell'aterosclerosi. Parecchi studi di popolazione hanno dimostrato una correlazione tra i livelli di PCR (anche all'interno del range di normalità) ed il rischio futuro di infarto del miocardio e di ictus ischemico (33-36). Una recente meta-analisi di 11 studi ha mostrato un indice di rischio per la malattia coronaria di 2.0 in individui nel terzile superiore confrontati con quelli nel terzile inferiore dei livelli di PCR (2). I livelli di PCR presentano anche un significato prognostico in pazienti con angina stabile ed instabile (37). Anche l'espressione di alcuni recettori di adesione (ICAM-1) e di alcune citochine (IL-6), potenziali indici di fase acuta sono associati ad un maggiore rischio di coronaropatia (35, 36).

Meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione dell'aterosclerosi in pazienti con artrite reumatoide

Se l'aterosclerosi è in qualche misura una malattia infiammatoria e l'eccesso di coronaropatia osservato in pazienti con artrite reumatoide non è interamente spiegato dai tradizionali fattori di rischio, in che modo l'artrite reumatoide potrebbe contribuire alla genesi e/o progressione della placca ateromasica ? I meccanismi potenziali sono differenti.

Gli eventi che danno origine all'artrite reumatoide potrebbero anche dare origine o potenziare i processi mediati dai linfociti T in maniera focale o diffusa nella parete vascolare. Pazienti con artrite reumatoide, specialmente quelli con lesioni vasculitiche presentano abbondanti popolazioni di cellule T CD4+CD28- nel sangue periferico (38). Le cellule T CD4+ CD28- presentano delle caratteristiche che le distinguono dalle classiche cellule T-helper:

- 1) non dipendono dal sistema costimolatorio CD28/B7 per l'attivazione;
- 2) non esprimono il recettore CD40L e sono incapaci di attivare le cellule B;
- 3) possiedono una significativa attività citolitica;
- 4) ed esprimono alti livelli di IFN- γ (che induce attivazione dei monociti e macrofagi).

La presenza di queste cellule indica uno spostamento delle risposte immuni dall'attivazione delle cellule B alla attivazione Th1 e produzione di IFN- γ (che inibisce la sintesi del collagene da parte delle fibrocellule muscolari lisce) ed attiva i macrofagi a rilasciare le metalloproteinasi.

L'espansione clonale delle cellule T CD4+CD28- è stata mostrata anche nel sangue e nelle placche ateromasiche di pazienti con angina instabile ma non in quelle di pazienti con angina stabile (39). Inoltre i fattori reumatoidi circolanti o altri immunocomplessi potrebbero causare un danno diretto alle cellule endoteliali così come gli autoanticorpi rivolti contro le LDL ossidate (anti-oxLDL) riscontrati in pazienti aterosclerosi e sindromi coronariche (40-42). Questi autoanticorpi sono stati identificati in pazienti con lupus eritematoso e sindrome ad anticorpi anti-fosfolipidi (43, 44) ma non sono stati ancora riportati in pazienti con artrite reumatoide.

La sinovia reumatoide è caratterizzata dalla produzione di differenti citochine, incluse il TNF- α , IL-1, ed IL-6. Queste citochine reclutano i leucociti tramite l'aumento dell'espressione di recettori di adesione sulle cellule endoteliali e contribuiscono al danno della cartilagine attraverso l'induzione di enzimi destruenti come le collagenasi e le stromelisine. Le citochine circolanti potrebbero contribuire ad una simile azione nelle parete dei vasi sanguigni promuovendo la crescita della placca ateromasica o destabilizzandone una precedente. Recentemente è stato dimostrato che la PCR induce l'espressione di recettori di adesione (ICAM-1, VCAM-1 e selectina-

E) in cellule endoteliali suggerendo un ruolo diretto di questa proteina nel processo ateromasico (45).

Come la PCR anche la SAA è una proteina di fase acuta i cui livelli sierici aumentano durante l'inflammatione (4). Sebbene la SAA venga prodotta principalmente dal fegato, è stata riscontrata anche nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e nelle fibrocellule muscolari lisce all'interno della placca ateromasica (46). La proteina SAA possiede funzioni multiple che potrebbero contribuire all'aterogenesi incluse funzioni pro ed antinfiammatorie sulle piastrine e sui leucociti ed un ruolo nel trasporto e nel metabolismo del colesterolo (4).

La trombosi in una placca instabile rappresenta l'evento scatenante di molte sindromi coronariche, come l'infarto del miocardio (47). In studi prospettici di soggetti sani elevati livelli basali di fibrinogeno, fattore di von Willebrand (vWf) ed inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) sono associati ad un elevato rischio di infarto del miocardio (48, 49). L'inflammatione sistemica potrebbe essere associata con uno stato di ipercoagulabilità legato alla trombocitosi ed ai livelli elevati di vWf, fibrinogeno e PAI-1 (50, 51). Un recente studio condotto su 67 pazienti con artrite reumatoide ha confermato la presenza di una condizione di trombofilia (elevati livelli di piastrine, fibrinogeno, vWf, tPA e D-dimero) nei pazienti rispetto ai controlli (52). Inoltre in una coorte separata di 74 pazienti con artrite reumatoide seguita per oltre 8 anni elevati livelli di vWf, PAI-1 e tPA erano predittivi di eventi cardiovascolari (53).

E' quindi possibile che l'inflammatione nell'artrite reumatoide possa contribuire sia all'aterosclerosi che alla componente trombotica degli eventi cardiovascolari acuti.

TNF- α : un mediatore coinvolto nella patogenesi dell'artrite reumatoide e nell'aterosclerosi

Il TNF- α umano è una citochina implicata nella comunicazione di cellule del sistema immunitario come i macrofagi, i fibroblasti, le cellule endoteliali ed i linfociti, cellule implicate direttamente nella patogenesi dell'aterosclerosi (1) e dell'artrite reumatoide (54). Le varie funzioni del TNF- α sono mediate dalla capacità di questa citochina di:

1) reclutare cellule nei siti di flogosi, aumentando l'espressione di recettori di adesione (ICAM-1, VCAM-1, selectina-E) direttamente sulle cellule endoteliali oppure attraverso meccanismi costimolatori;

2) attivare una varietà di elementi cellulari come i linfociti T, B, i macrofagi, le fibrocellule muscolari lisce vascolari ed i fibroblasti sinoviali;

3) aumentare la produzione di metalloproteinasi (MMPs) e radicali dell'ossigeno da parte di neutrofili, macrofagi e condrociti;

4) indurre la sintesi di altre citochine come IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF OL/ODF (54).

La biosintesi di questa molecola è complessa e coinvolge la produzione iniziale di

una forma di 26 kD transmembrana (di tipo II) (55). Questa molecola viene clivata da un enzima di conversione (TACE) e rilasciata come forma solubile di 17 kD (56, 57). La forma di membrana e quella solubile esistono come trimeri, ed entrambi le forme svolgono molteplici attività biologiche (58, 59). Il TNF- α media le sue risposte attraverso due recettori di superficie, TNFR-I (p55) ed il TNFR-II (p75) che vengono espressi essenzialmente da tutte le cellule nucleate. L'attivazione di p55 comporta il legame della proteina TRADD (TNFR-Associated Death Domain Protein), della proteina TRAF-2 (TNFR-Associated Factor 2), RIP e con ulteriori molecole di trasduzione con l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B e del sistema delle MAP-kinasi JNK (60, 61). L'attivazione di p75 comporta il reclutamento di TRAF-1, TRAF-2, cIAP1 e cIAP2 e successiva attivazione di NF- κ B (62).

Il ruolo del TNF nello sviluppo dell'aterosclerosi è piuttosto complesso. Le fasi iniziali del processo aterogenetico sono caratterizzate dall'infiltrazione dei monociti nella parete vascolare e dalla loro successiva trasformazione in cellule cariche di lipidi (cellule schiumose). Questo processo richiede l'adesione iniziale dei monociti alle cellule endoteliali attraverso una serie di molecole recettoriali di adesione come ICAM-1, VCAM-1 e la selectina-E. I monociti allora penetrano la parete arteriosa, si trasformano in macrofagi e cominciano a sequestrare materiale lipidico, principalmente sottoforma di lipoproteine che hanno già penetrato l'endotelio. Diversi studi indicano che il TNF- α influenza ciascuna fase del processo aterogenetico. Il TNF- α infatti favorisce il reclutamento dei monociti inducendo l'adesione di questi ultimi all'endotelio (63, 64) e l'induzione di molecole ad attività

chemiotattica (65, 66) e potrebbe contribuire alla trasformazione ed attivazione dei macrofagi (67). Inoltre le lesioni ateromasiche più avanzate contengono diversi elementi cellulari, inclusi macrofagi, cellule muscolari lisce, linfociti T, mastociti tutti elementi cellulari capaci di produrre e rispondere al TNF- α (68-70). Il TNF potrebbe contribuire alle placche ateromasiche in via di sviluppo anche tramite la capacità di promuovere la proliferazione e la migrazione delle fibrocellule muscolari lisce (71), di stimolare la continua produzione di citochine e fattori di crescita (67), di alterare l'espressione di altri recettori cellulari (72) e di ridurre la produzione di ApoE (73).

Un ampio numero di ricerche ha ormai chiarito che il TNF- α è una citochina chiave nella patogenesi dell'artrite reumatoide:

- 1) l'attività biologica del TNF- α può contribuire direttamente ai processi patologici della sinovite reumatoide, incluso il reclutamento e l'attivazione cellulare, l'ispessimento e la proliferazione cellulare nella sinovia, aumento della sintesi di prostaglandine e delle metalloproteinasi che conducono alla degradazione della cartilagine e dell'osso (74);
- 2) Il TNF- α ed i suoi recettori subiscono un fenomeno di up-regulation nella sinovia reumatoide (75);
- 3) IL-1 ed altre citochine pro-infiammatorie vengono inibite in vitro dal trattamento con anti-TNF- α (76);

- 4) L'elevata espressione del TNF- α in un modello transgenico murino comporta lo sviluppo di una forma di artrite erosiva che presenta caratteristiche istopatologiche del tutto sovrapponibili a quelle dell'artrite reumatoide (77)
- 5) I modelli animale di artrite migliorano in maniera significativa dopo il trattamento con anti-TNF- α (78)
- 6) Il blocco del TNF- α comporta un beneficio clinico sostenuto in pazienti con artrite reumatoide (79)

Il blocco del TNF- α può rallentare lo sviluppo dell'aterosclerosi in pazienti con artrite reumatoide?

Per esplorare tale possibilità ed anche alla luce degli studi recenti che hanno mostrato un effetto positivo del blocco del TNF- α sulla disfunzione endoteliale (80-82) e sul profilo lipidico di tipo pro-aterogeno (83), condizioni strettamente associate allo sviluppo ed alla progressione dell'aterosclerosi, abbiamo valutato l'effetto a lungo termine del trattamento con anti-TNF α sulla progressione dello spessore intima-media (IMT) della carotide di soggetti con artrite reumatoide. Le arterie carotidi, in effetti, sono facilmente accessibili alle tecniche ultrasonografiche e queste ultime forniscono una misura accurata e riproducibile dell'aterosclerosi in stadi subclinici (84-86). Al fine di minimizzare l'influenza di variabili estranee associate con la IMT carotidea abbiamo ristretto tale studio a gruppi relativamente omogenei ed includendo solo soggetti di sesso femminile senza storia di aterosclerosi. In aggiunta

le donne presentano di solito valori medi di IMT significativamente più bassi della controparte maschile.

Lo scopo di questo studio è stato la valutazione dell'efficacia della terapia a lungo termine con terapia standard (Methotrexate) o con anti-TNF sullo spessore della intima-media, sulla concentrazione plasmatica delle lipoproteine e sul rischio cardiovascolare in donne con artrite reumatoide attiva e aterosclerosi non conclamata

PAZIENTI E METODI

Popolazione in studio e disegno

144 donne affette da AR diagnosticata in base ai criteri dell'American College of Rheumatology (98), sono state consecutivamente arruolate tra le pazienti ambulatoriali afferenti all'ambulatorio di Reumatologia dell'Università di Palermo.

Criteri di inclusione erano:

- un'età superiore ai 18 anni
- l'essere naive da trattamento con Methotrexate (MTX)

- avere una malattia attiva con VES > 28 mm/1h ed un Disease activity score (DAS) > 2.4.

Criteri di esclusione includevano trattamento pregresso con DMARDs o antimalarici ed evidenza di aterosclerosi, malattia cardiaca, ipertensione arteriosa, diabete mellito valutati tramite l'anamnesi, esame fisico ed ECG standard a 12 derivazioni. I pazienti sono stati confrontati con 78 soggetti di controllo sani con analoghe caratteristiche.

Al momento dell'arruolamento e quindi ogni 3 mesi per 2 anni consecutivi le pazienti sono state valutate per numero di articolazioni dolenti e tumefatte. Sono state inoltre eseguite la valutazione globale del paziente, la valutazione globale del medico, il punteggio di disabilità psichica e la valutazione del dolore da parte del paziente. L'attività di malattia è stata calcolata con una versione modificata del DAS (99). La capacità funzionale è stata misurata con l'HAQ (100).

Tutte le pazienti inizialmente sono state assegnate alla somministrazione orale o intramuscolare di MTX ad un dosaggio di 10-20 mg settimanali, con concomitante terapia di supporto con acido folico. Dopo 3 mesi di terapia le pazienti che non presentavano adeguata risposta clinica ricevevano in aggiunta agenti bloccanti il TNF- α . In quest'ultimo gruppo di pazienti, 20 sono state trattate con infliximab (3mg/kg alle settimane 0, 2 e 6 e successivamente ogni 6-8 settimane), 15 con etanercept (25mg 2 volte a settimana) e 5 con adalimumab (40mg ogni due settimane). L'assunzione di basse dosi di steroidi (prednisone < 10 mg/die) era inoltre consentita.

Ecografia carotidea

Lo studio è stato eseguito usando un ecografo della Hewlett Logic 500 Pro della GE con sonda lineare da 10MHz. Tutte le pazienti partecipanti allo studio sono state sottoposte all'esame ultrasonografico della carotide dallo stesso operatore.

L'interpretazione dei dati è stata eseguita dallo stesso operatore, il quale non era a conoscenza dell'identità delle partecipanti allo studio. Le pazienti venivano studiate in posizione supina con lieve iperestensione del collo.

Entrambe le carotidi sono state studiate con scansioni multiplanari usando ultrasuoni B-mode ad alta risoluzione.

La placca è stata definita o come una distinta protrusione superiore a 1.5 mm all'interno del lume vasale o come una chiara ecogenicità con cono d'ombra posteriore. Lo spessore intima-media è stato misurato a fine diastole (dimensione minima) con immagini M-mode del tratto distale della parete della carotide comune. I dati sono presentati come valori medi dello spessore intima-media delle carotidi destra e sinistra. La riproducibilità delle misure dello spessore intima-media è stata valutata in 10 soggetti dopo 10 giorni dal primo esame. Il coefficiente per IMT era di 0.96.

Valutazioni di laboratorio

Gli esami di laboratorio valutati all'inizio includevano esami ematochimici di routine, FR e livelli di anti-CCP. La determinazione del profilo lipidico e gli indici di flogosi (VES, PCR e fibrinogeno) sono stati effettuati al baseline e in seguito ogni 3 mesi per 2 anni consecutivi. La VES è stata misurata impiegando la tecnica di Westergren e la PCR con metodo nefelometrico. Il colesterolo totale, HDL, ed i trigliceridi sono stati determinati con metodo enzimatico. I valori di LDL sono stati calcolati con la formula di Friedwal e coll. (101), il quale fornisce un valore certo per concentrazioni di trigliceridi fino a 8mmol/l.

Analisi statistica

I risultati sono stati comparati con il test "t" di Student per campioni appaiati e non.

RISULTATI

Durante il periodo di reclutamento, sono state arruolate 144 donne affette da AR. Le caratteristiche cliniche e di laboratorio delle partecipanti allo studio (pazienti con AR e controlli) sono sintetizzati nella tabella Tab.1.

Table 1 Characteristics of RA patients and healthy controls

	RA (N = 144)	Controls (N = 78)	P
Age, mean \pm DS	45.3 \pm 8.2	43.4 \pm 7.8	NS
BMI, mean \pm DS (kg/m ²)	23.07 \pm 4.33	22.9 \pm 3.6	NS
Smokers/not smokers	20/124	17/52	NS
Cholesterol, mean \pm SD (mg/dl)	204.9 \pm 34.3	203.8 \pm 32.2	NS
Triglycerides, mean \pm SD (mg/dl)	107 \pm 41.1	106.0 \pm 30.4	NS
HDLc (mg/dl)	48.3 \pm 8.0	49.2 \pm 9.3	NS
LDLc (mg/dl)	139.3 \pm 28.4	134.5 \pm 25.1	NS
LDLc/HDLc	2.9 \pm 0.8	2.8 \pm 0.7	NS
Apo A1	134.7 \pm 30.9	138.3 \pm 30.1	NS
Apo B	105.6 \pm 23.8	103.5 \pm 23.0	NS

Non c'erano differenze significative in queste variabili tra le pazienti con AR ed i controlli.

25 pazienti sono state escluse dallo studio: 19 per mancanza del consenso informato e 6 per la presenza di placca carotidea.

All'inizio delle osservazioni lo spessore IMT era di 0.68 \pm 0.08 (DS) mm nei soggetti di controllo e di 0.73 \pm 0.09 mm nei pazienti con AR ($p < 0.01$) Fig.1.

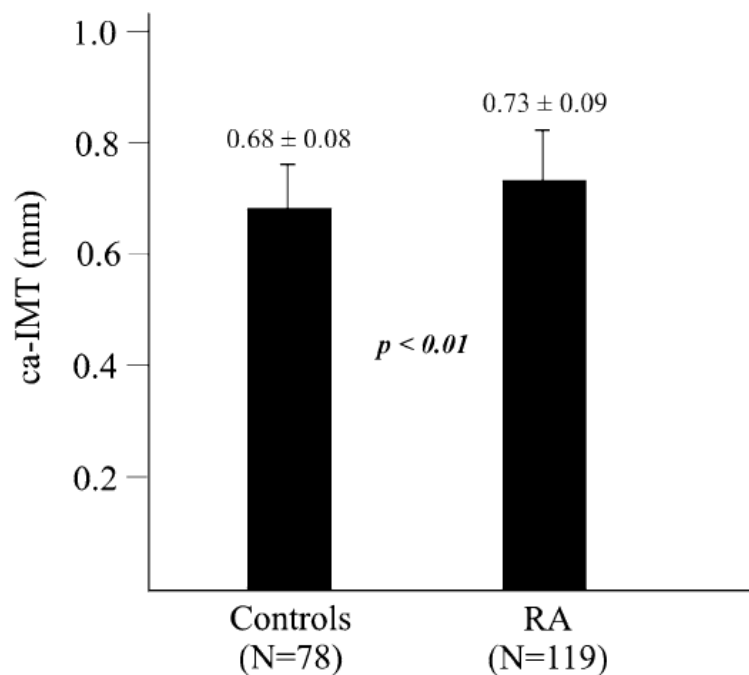


Fig. 1 ca-IMT in patients with RA versus healthy controls

Tutti le pazienti sono state inizialmente trattate con MTX e basse dosi di steroidi. Dopo 3 mesi, 79 pazienti con buona risposta clinica hanno continuato il MTX durante tutto il periodo di osservazione (gruppo A); 40 pazienti hanno invece iniziato una terapia con anti-TNF (gruppo B non responsivo al MTX in monoterapia).

Non sono state riscontrate significative differenze nei dati demografici, clinici e di laboratorio nei due gruppi al baseline (Tab 2).

Table 2 Characteristics of the two groups of patients

	Group B anti-TNF- α (N = 40)	Group A MTX (N = 79)	P
Duration of RA (months), mean \pm SD	33.55 \pm 13.39	32.89 \pm 14.28	NS
Age (mean \pm SD)	43.62 \pm 8.5	46.9 \pm 7.86	NS
DAS (mean \pm SD)	4.62 \pm 0.92	4.57 \pm 1	NS
Erosions (%)	65	66	NS
ESR (mm 1 h, median)	36	32	NS
CRP (mg/l, mean \pm SD)	4.71 \pm 0.93	4.54 \pm 1.69	NS
Fibrinogen (mg/dl, mean \pm SD)	487 \pm 88	486 \pm 85	NS
HAQ (mean \pm SD)	2.63 \pm 0.43	2.6 \pm 0.46	NS
RF+ (%)	79	76	NS
Anti-CCP+ (%)	65	66	NS
Cumulative dose of prednisone (g)	3.72 \pm 0.75	3.68 \pm 0.25	NS

Dopo 2 anni, rispetto al baseline, in entrambi i gruppi di pazienti si è osservata una significativa riduzione dei parametri clinici (DAS44, HAQ) e di laboratorio (PCR, fibrinogeno). Tab 3

Table 3 Measures of activity and of lipid levels in the two groups of therapy

	Group A (methotrexate) (mean \pm SD)		Group B (anti-TNF) (mean \pm SD)	
	Baseline	After 2 years	Baseline	After 2 years
DAS	4.57 \pm 1	2.39 \pm 0.5*	4.62 \pm 0.92	2.14 \pm 0.32*
CRP	4.54 \pm 1.69	2.48 \pm 1.12*	4.71 \pm 0.93	2.37 \pm 0.79*
Fibrinogen	486 \pm 85	353 \pm 88*	487 \pm 88	326 \pm 78*
Cholesterol	203 \pm 31.5	205 \pm 30.7	206 \pm 37.9	203.5 \pm 36.46
Triglyceride	109.7 \pm 47.4	111.5 \pm 39.9	106.7 \pm 35.6	108.6 \pm 30
HDLc	48.5 \pm 8.5	47.4 \pm 7.1	48.06 \pm 7.8*	51.6 \pm 7.6*
HAQ	2.63 \pm 0.43	2.13 \pm 0.47	2.6 \pm 0.46	1.77 \pm 0.29

* $P < 0.05$

Nelle pazienti trattate con anti-TNF è stato osservato un incremento dei livelli di colesterolo HDL (48.06 \pm 7.8 vs 51.6 \pm 7.6; $P < 0.05$) (tab 3).

Nei controlli lo Ca-IMT fu di 0.68 ± 0.08 (DS) mm. Un livello >0.076 (media + 1 DS, 95°percentile) è stato considerato anormale.

Ca-IMT era di 0.722 ± 0.099 nel gruppo A e di 0.737 ± 0.104 mm nel gruppo B. In entrambi i gruppi di pazienti i livelli erano significativamente più alti rispetto ai controlli ($P < 0.01$) Fig 1. 40 pazienti del gruppo A e 15 pazienti del gruppo B avevano livelli anormali. Dopo 2 anni nei pazienti trattati con MTX non furono osservate variazioni significative di ca-IMT (0.717 ± 0.091 , NS) (Fig 2). Un significativo decremento era invece osservato nei pazienti trattati con anti-TNF. (0.625 ± 0.094 , $P < 0.001$) (Fig 3)

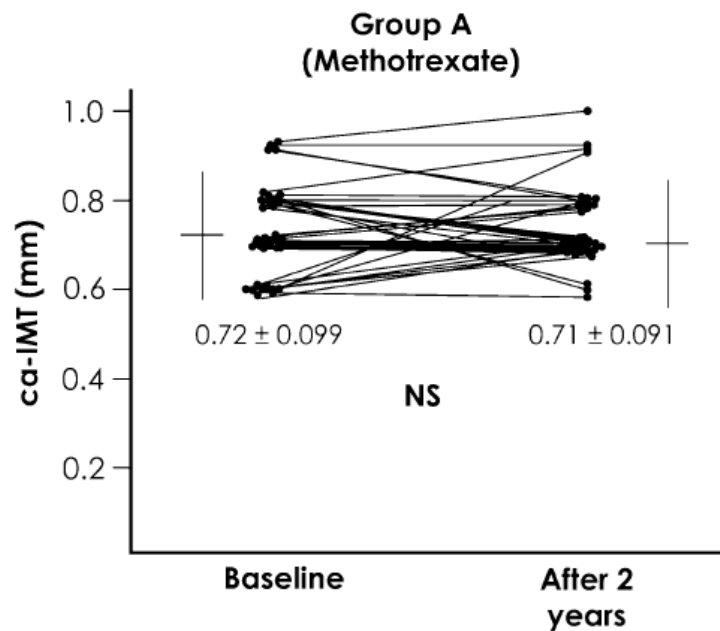


Fig. 2 ca-IMT in patients with RA treated with methotrexate at baseline and after 2 years

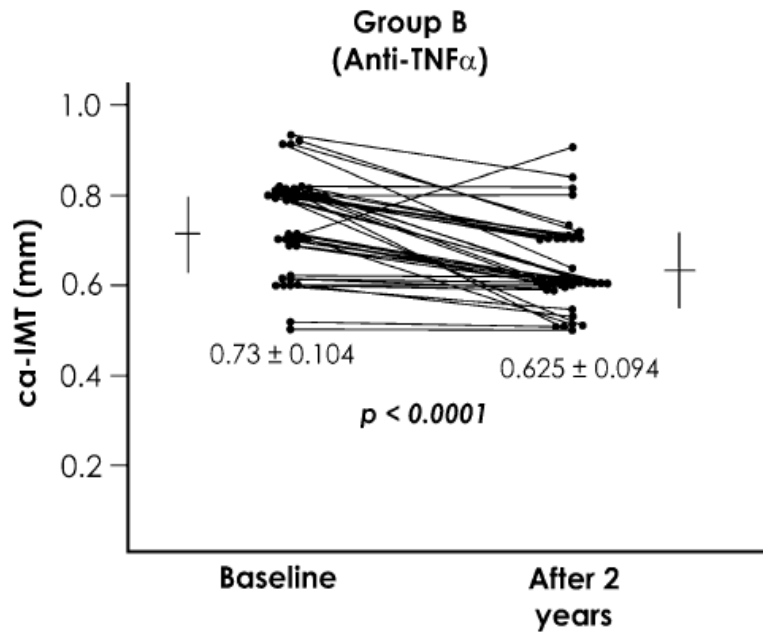


Fig. 3 ca-IMT in patients with RA treated with anti-TNF α plus methotrexate at baseline and after 2 years

DISCUSSIONE

Considerevoli evidenze indicano che le pazienti con AR sono a più alto rischio di sviluppare aterosclerosi subclinica e di conseguenza una cardiopatia ischemica (87-89).

Sebbene i meccanismi implicati non sono chiari, la disfunzione endoteliale mediata dalla infiammazione sistemica sembra giocare un ruolo chiave. Recenti studi usando misure dirette della funzione vascolare, come l'analisi del PW (onda sfigmica) e la vasodilatazione flusso-mediata confermano la presenza di una significativa

disfunzione endoteliale in pazienti affette da AR da lungo tempo correlata con la presenza di markers di infiammazione sistemica (102-103).

Inoltre, i pazienti con AR non trattati hanno indice aterogenico sfavorevole largamente caratterizzato da incremento di colesterolo totale e relativamente più bassi livelli di HDLc. Tutto ciò suggerisce uno stretto rapporto tra infiammazione e dislipidemia (104). E' stato ipotizzato un legame tra l'attivazione delle cellule endoteliali nei pazienti con AR e l'insorgenza di una precoce aterosclerosi (91). Il TNF potrebbe mediare la disfunzione endoteliale sia direttamente che indirettamente (91). In aggiunta è stato dimostrato che il TNF interferisce direttamente con il metabolismo dei trigliceridi e del colesterolo (105), pertanto la persistenza di queste alterazioni dei lipidi in circolo potrebbe promuovere lo sviluppo della lesione aterosclerotica. La terapia con anti-TNF sembrerebbe ridurre nei pazienti con AR il rischio di patologie cardiovascolari. Il trattamento con anti-TNF può in effetti migliorare transitoriamente la funzione endoteliale nei pazienti con AR, ridurre la rigidità aortica a livelli comparabili con i soggetti sani (92-93), implicando direttamente queste citochine come uno dei mediatori della disfunzione endoteliale nelle pazienti con AR, ed indurre un modesto ma sostanziale incremento dei livelli sierici di HDLc, il quale potrebbe avere a sua volta un effetto favorevole nel ridurre il rischio cardiovascolare in queste pazienti (106). Le misure del ca-IMT sono state largamente utilizzate in studi osservazionali al fine di valutare i fattori determinanti e le conseguenze del processo aterosclerotico (107-109). Vari studi hanno mostrato che un incremento del ca-IMT conferisce un maggior rischio di futura cardiopatia

ischemica e stroke. Pertanto, ciò ha suggerito che le misure del ca-IMT potrebbero essere impiegate per individuare i soggetti a alto rischio (110). Le misure del ca-IMT sono largamente utilizzate in trials controllati e randomizzati, come indicatori di morbilità e mortalità cardiovascolare. Il grande vantaggio di impiegare il ca-IMT è la considerevole riduzione della dimensione del campione e possibilmente della durata del follow-up (109). I dati di 13 RCTs che hanno come outcome la progressione del ca-IMT, mostrano in generale tassi di variazioni in media del ca-IMT di 0.0147 mm/anno (95% CI, 0.0122-0.0173), con una mediana della SD di 0.053 (109). Recentemente è stato dimostrato che la velocità di incremento del ca-IMT varia da 0.154mm/10anni fra i pazienti con AR di 7 anni o meno a 0.295mm/10anni fra i pazienti con RA da 20 anni o più (111).

In base alle nostre conoscenze, questo è il primo studio prospettico che compara due terapie a lungo termine che includono l'impiego del MTX e degli anti-TNF al fine di valutare gli effetti della terapia nella progressione di aterosclerosi subclinica nelle pazienti con AR. Effettivamente di recente, Gonzales-Juanatey e coll. (97) hanno dimostrato una progressione dell'aterosclerosi subclinica in un piccolissimo campione di pazienti con AR e malattia severa, malgrado il trattamento periodico con infliximab.

Tuttavia questo studio osservazionale includeva un limitato numero di pazienti con lunga durata di malattia (in media 15.4 anni) e una età media maggiore di 50 anni. Per minimizzare l'influenza delle variabili associate con incremento del ca-IMT,

come età, sesso, durata e severità di malattia, abbiamo selezionato un gruppo relativamente omogeneo includendo solo donne con età inferiore ai 55 anni e senza una storia di aterosclerosi.

Anche se in entrambi i tipi di trattamento furono osservati significativi miglioramenti degli indici di attività di malattia, dei livelli di PCR e fibrinogeno, solo la terapia con anti-TNF, è stata capace di ridurre il ca-IMT in pazienti donne con AR nei 2 anni di follow-up.

In conclusione, il nostro studio indica che l'anti-TNF ma non il MXT è in grado di ridurre lo ca-IMT nelle pazienti donne con AR nei 2 anni di follow-up. Questo effetto può essere imputato al blocco delle citochine direttamente implicate nella patogenesi dell'aterosclerosi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9
2. Danesh J, Whincup P et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: protective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000; 321:199-204
3. Yasojima K, Schwab C, McGeer, EG et al. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:1039-51
4. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* 2000; 7:64-9
5. Cobb S, Anderson F, Bauer W. Length of life and cause of death in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1953;249:553-6
6. Allebeck P, Ahlbom A, Allander E. Increased mortality among persons with rheumatoid arthritis, but where RA does not appear on death certificate: eleven-year follow-up of an epidemiological study. *Scand J Rheumatol* 1981;10:301-6.
7. Allebeck P. Increased mortality in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1982;11:81-6.
8. Jacobsson LTH, Knowler WC, Pillemer S, Hanson RL, Pettitt DJ, Nelson RG, et al. Rheumatoid arthritis and mortality: a longitudinal study in Pima Indians. *Arthritis Rheum* 1993;36: 1045-53.
9. Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1984;23:92-9.
10. Symmons DP, Jones MA, Scott DL, Prior P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J Rheumatol* 1998;25:1072-7.
11. Krause D, Schleusser B, Herborn G, Rau R. Response to methotrexate treatment is associated with reduced mortality in patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:14-21.
12. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:481-94.
13. Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 1997;24:445-51.

14. Mitchell DM, Spitz PW, Young DY, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF. Survival, prognosis, and causes of death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:706–14.
15. Kvalvik AG, Jones MA, Symmons DP. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand J Rheumatol* 2000;29:29–37.
16. Reilly PA, Cosh JA, Maddison PJ, Rasker JJ, Silman AJ. Mortality and survival in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective study of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 1990;49:363–9.
17. Myllykangas-Luosujarvi RA, Aho K, Isomaki HA. Mortality in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1995;25:193–202.
18. Pincus T, Callahan LF. Rheumatology function tests: grip strength, walking time, button test and questionnaires document and predict longterm morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992;19:1051–7.
19. Guedes C, Dumont-Fischer D, Leichter-Nakache S, Boissier MC. Mortality in rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 1999;66:492–8.
20. Pincus T, Callahan LF. Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously: predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. *J Rheumatol* 1986;13:841–5.
21. Wolfe F, Straus WL. Increased prevalence of cardiovascular and cerebrovascular disease in rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 2000;43 Suppl 9:S133.
22. Banks M, Flint J, Bacon PA, Kitas GD. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for ischaemic heart disease [abstract]. *Arthritis Rheum* 2000;43 Suppl 9:S385.
23. Gabriel SE, Crowson CS, O’Fallon WM. Comorbidity in arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:2475–9.
24. Park Y-B, Lee S-H, Ahn C-W, In B-H, Lee H-C, Lee S-K. Increased carotid wall thickness in patients with rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 2000;43 Suppl 9:S385.
25. Kumeda Y, Inaba M, Kurioka Y, Goto H, Nagata M, Waki M, et al. Progression of atherosclerosis in common carotid artery (CCA) of patients with rheumatoid arthritis (RA): thickening of intima-media thickness (IMT) by ultrasonography [abstract]. *Arthritis Rheum* 2000;43 Suppl 9:S385.
26. O’Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr, the Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med* 1999;340:14–22.
27. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4 T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000;102:2919–22.
28. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariety J, Hansson GK. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J Clin Invest* 1998;102:910–8.

29. Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou X, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Mol Med* 2000;6:283–90.
30. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394:200–3.
31. Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191:313–20.
32. Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med* 2000;191:303–12.
33. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237–42.
34. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731–3.
35. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836–43.
36. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973–9.
37. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB, the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 1997;349:462–6.
38. Weyand CM, Bryl E, Goronzy JJ. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000;48: 429–35.
39. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:2883–8.
40. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:883–7.
41. Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Alfthan G, Ehnholm C, et al. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994;154:2605–9.
42. Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3159–63.

43. Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised lowdensity lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923–5.
44. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Tinahones F, Hughes GR. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1997;36:964–8
45. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165–8.
46. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3186–90.
47. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365–72.
48. Ma J, Hennekens CH, Ridker PM, Stampfer MJ. A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1347–52.
49. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241–7
50. Pottinger BE, Read RC, Paleolog EM, Higgins PG, Pearson JD. Von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 1989;53:387–94.
51. Bevilacqua MP, Schleef RR, Gimbrone MA Jr, Loskutoff DJ. Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin 1. *J Clin Invest* 1986;78:587–91.
52. McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:640–4.
53. Wallberg-Jonsson S, Cederfelt M, Rantapaa Dahlqvist S. Hemostatic factors and cardiovascular disease in active rheumatoid arthritis: an 8 year followup study. *J Rheumatol* 2000;27:71–5.
54. Beutler B. The role of TNF in health and disease. *J. Rheumatol.* 1999; 26: 16
55. Kriegler M, Perez C, et al. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramification for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53:45-52
56. Moss ML, Jin SL, Milla ME et al. Cloning a disintegrin metalloproteinase that processes precursor of TNF. *Nature* 1997; 385:733-736
57. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CY et al. A metalloprotein disintegrin that release TNF- α for cells. *Nature* 1997; 385:729-733

58. Georgopoulos S, Plow D, Kollias G. Transmembrane TNF is sufficient to induce localized tissue toxicity and chronic inflammation arthritis in transgenic mice. *J. Inflammation* 1996; 46:86-97
59. Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenaabeele B. et al Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine TNF. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 18473-18478
60. Hsu H, Huang J, Shu HB, et al. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF-RI signalling complex. 1996 *Immunity*. 4; 387-396
61. Hsu H, Shu HM, Pan MG et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interaction define two distinct TNF receptor-1 signal transduction pathways. 1996 *Cell*; 84: 289-308
62. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ et al. The TNFR-2-TRAF signalling complex contains two novel protein related to Baculoviral inhibitor of apoptosis protein. 1995. *Cell*; 83:1243-1252
63. Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by IL-1, TNF- α and immune interferon. *J. Immunol.* 1986; 137: 1893-1896
64. Neumann B, Machleidt T, Lifka A. et al. Crucial role of 55-kd TNF-receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J. Immunol.* 1996; 156: 1587-1593
65. Clinton SK, Underwood R, Hayes L. et al. M-CSF gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1992; 140: 301-316
66. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage-colony stimulating factors by modified LDL. *Nature* 1990; 344:254-257
67. Libby P, Galis ZS. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1995; 748:158-168
68. Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT et al. Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF- α . *Circulation* 1996; 94: 2787-2792
69. Barath P, Fishbein MC, Cao J. et al. Detection and localisation of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am. J. Cardiol.* 1990 65; 297-302
70. Barath P, Fishbein MC, Cao J. et al. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 1990; 137:503-509
71. Jovinge S, Hultgaardh-Nilsson A, Regnstrom J. et al. Tumor necrosis factor alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17:490-497
72. Li H, Freeman MW, Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:122-133

73. Duan H, Li Z, Mazzone T. et al. Tumor necrosis factor- α modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression. *J. Clin. Invest.* 1996; 96:915-922
74. Feldmann M, Maini, RN. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38 (Suppl. 2):3
75. Chu CQ, Field M, Feldmann M, et al. Localisation of TNF α in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction on patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 1125
76. Brennan FM, Chantry D, Jackson A. et al. Inhibitory effect of TNF α antibodies in synovial cell IL-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 244
77. Keffer J, Prober L, Cazlaris H. et al. Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor : A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991; 10:4025
78. Williams RO, Feldman M., Maini RN. et al. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1992; 89:9784
79. Keystone EC. Tumor Necrosis factor- α blockade in the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis, Clin. North Am.* 2001; 27:427-443
80. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Bechir M, Spieker LE, Neidhart M, Michel BA, Gay RE, Luscher TF, Gay S, Ruschitzka F. Anti-tumor necrosis factor- α treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2002 Oct 22;106(17):2184-7.
81. Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Active but transient improvement of endothelial function in rheumatoid arthritis patients undergoing long-term treatment with anti-tumor necrosis factor α antibody. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun 15;51(3):447-50
82. Booth AD, Jayne DR, Kharbanda RK, McEniery CM, Mackenzie IS, Brown J, Wilkinson IB. Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. *Circulation.* 2004 Apr 13;109(14):1718-23
83. Popa C, Netea MG, Radstake T, Van der Meer JW, Stalenhoef AF, van Riel PL, Barerra P. Influence of anti-tumour necrosis factor therapy on cardiovascular risk factors in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Feb;64(2):303-5.
84. Li R, Cai J, Tegeler C, Sorlie P, Metcalf PA, Heiss G. Reproducibility of extracranial carotid atherosclerotic lesions assessed by B-mode ultrasound: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ultrasound Med Biol* 1996;22:791-9.
85. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993;87: II56-65

86. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74:1399–406
87. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandi LA, Manson JE et al (2003) Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 107:1303—1307 doi:10.1161/01.CTR.0000054612.26458.B2
88. Fischer LM, Schlienger RG, Matter C, Jick H, Meier CR (2004) Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 93:198—200. doi:10.1016/j.amjcard.2003.09.037
89. Van Doornum S, McColl G, Wicks TP (2002) Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 46:862—873. doi: 10.1002/art.10089
90. Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D et al (2004) Endothelial dysfunction in young patients with longterm rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis* 63:31—35. doi:10.1136/ard.2003.007740
91. Sattar N, Mc Carey DW, Capell H, McTnnes TB (2003) Explaining how high grade systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 108:2957—2963. doi: 10.1161/01.CTR.0000099844.31524.05
92. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O et al (2002) Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 106:2184—2187. doi: 10.1161/01.CTR.0000037521.71373.44
93. Maki-Petaja KM, Hall FC, Booth AD, Wallace SM, Yasmin, Bearcroft PW et al (2006) Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Circulation* 114(11):1185—1192. doi: 10.1161/CTR.CULATTONAHA.105.601641
94. Van Doornum S, McColl G, Wicks TP (2005) Tumour necrosis factor antagonists improve disease activity but not arterial stiffness in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44:1428—1432. doi: 10.1093/rheumatology/fkei033
95. Trace C, Mancuso G, Fiaschi E et al (2004) Effect of anti TNF alpha therapy on arterial diameter and wall shear stress and HDL cholesterol. *Atherosclerosis* 177:113—118. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.031
96. van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE (2006) Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther* 8(5):R151. doi: 10.1186/ar2045
97. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Porrúa C, Martín J, Gonzalez-Gay MA (2006) Effect of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on the progression of

- subclinical atherosclerosis in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 55:150—153. doi:10.1002/art.21707
98. Amett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315—324. doi: 10.1002/art.1780310302
99. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995) 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* 38:44—48. doi: 10.1002/art.1780380107
100. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR (1980) Measurement of patients outcome in arthritis. *Arthritis Rheum* 23:137—145. doi: 10.1002/art.1780230202
101. Friedwal WT, Levy RT, Friedckson DS (1972) Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499—502
102. Van Doornum S, McColl G, Jenkins A, Green DJ et al (2003) Screening for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: comparison of two in vivo tests of vascular function. *Arthritis Rheum* 48:72—80. doi: 10.1002/art.10735
103. Mki-Petiji KM, Hall FC, Booth AD, Wallace SML et al (2006) Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factoralpha therapy. *Circulation* 114:1185—1192. doi: 10.1161/CTRCU-LATTONAHA.105.601641
104. Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH et al (1999) Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26:1701—1704
105. Grunfeld C, Feingold KR (1991) Tumour necrosis factor, cytokines and the hyperlipidemia of infection. *Trends Endocrinol Metab* 2:213—219. doi: 10.1016/1043-2760(91)90027-K
106. Spanakis E, Sidiropoulos P, Papadakis J, Ganotakis E et al (2006) Modest but sustained increase of serum high density lipoprotein cholesterol levels in patients with inflammatory arthritides treated with infliximab. *J Rheumatol* 33:2440—2446
107. Geroulakos G, O'Gorman DJ, Kalodiki E, Sheridan DJ, Nicolaidis AN (1994) The carotid intima—media thickness as a marker of the presence of severe symptomatic coronary artery disease. *Eur Heart J* 15:781—785
108. Tang R, Hennig M, Thomasson B, Scherz R et al (2000) Baseline reproducibility of B-mode ultrasonic measurement of carotid artery intima—media thickness: the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA). *J Hypertens* 18:197—201. doi:10.1097/00004872-200018020-00010
109. Bots ML, Evans MA, Riley WA, Grobbee DE (2003) Carotid intima—media thickness measurements in intervention studies. *Stroke* 34:2985—2994. doi:10.1161/01.STR.0000102044.27905.B5

110. Grobbee DE, Bots ML (1994) Carotid artery intima—media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. *J Intern Med* 236:567—573
111. Del Rincon I, O’leary DH, Freeman GL, Escalante A (2007) Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 195:354—360. doi: 10.1016/j.atheroscle-rosis.2006.09.027