

Ocena wpływu leczenia leflunomidem na wskaźniki procesu zapalnego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

Effects of leflunomide treatment on pro-inflammatory mediators in rheumatoid arthritis patients

Bożena Targońska-Stępnik, Dariusz Chudzik, Magdalena Dryglewska, Maria Majdan

Katedra i Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Akademia Medyczna im. F. Skubiszewskiego w Lublinie, kierownik Katedry i Kliniki prof. dr hab. med. Maria Majdan

Słowa kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, leki modyfikujące przebieg choroby, białka ostrej fazy.

Key words: rheumatoid arthritis, disease modifying antirheumatic drugs, acute phase proteins.

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu leflunomidu (LFM) na aktywność choroby oraz wskaźniki procesu zapalnego w ciągu pierwszych 6 mies. leczenia chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Badanie przeprowadzono w grupie 37 chorych na RZS. Leczenie LFM kontynuowano przez co najmniej 6 mies. u 31 chorych (83,8%), u 6 chorych (16,2%) terapię przerwano z powodu objawów niepożądanych lub nieskuteczności leczenia. Podczas kolejnych wizyt w tygodniach: 0., 4., 12. i 24. oceniano dane kliniczne, wskaźnik aktywności choroby (DAS 28) oraz parametry laboratoryjne: odczyn Biernackiego (OB), liczbę erytrocytów (ERY) i trombocytów (PLT), stężenie hemoglobiny (Hb), białka C-reaktywnego (CRP), albuminy, interleukiny 6 (IL-6), rozpuszczalnego receptora interleukiny 6 (sIL-6R), surowiczego białka amyloidu A (SAA) oraz osteoprotegeryny (OPG).

Podczas terapii LFM średnie wartości wskaźnika DAS 28 obniżały się stopniowo. Oceniając wyniki terapii w tyg. 0., 4., 12. i 24., zaobserwowano istotne statystycznie zmiany: zmniejszenie średniego stężenia CRP, wartości OB i liczby PLT oraz zwiększenie średniego stężenia albuminy, Hb oraz liczby ERY. Średnie stężenie IL-6 w surowicy obniżyło się istotnie statystycznie w kolejnych tygodniach 0., 4. i 12. ($p < 0,01$). Średnie stężenie sIL-6R w surowicy zmniejszyło się istotnie pomiędzy tygodniem 0. i 4. ($p = 0,03$). W grupie naszych chorych średnie stężenia SAA były bardzo wysokie przed rozpoczęciem leczenia, jednak pod wpływem terapii zaobserwowano stopniowe obniżenie wartości SAA w kolejnych tygodniach 4., 12. i 24. ($p < 0,01$). Stężenie OPG w tygodniach 4., 12. i 24. było wyższe

Summary

The objective of the study was to investigate the effects of LEF on disease activity and pro-inflammatory mediators during the first 6 months of therapy.

We analyzed the course of LEF therapy of 37 RA patients (pts). In 31 pts (83.3%) LEF treatment was continued for at least 6 months; the therapy was interrupted in 6 pts (16.2%) due to adverse events or non-satisfactory clinical effect.

Clinical and laboratory data were determined at weeks 0, 4, 12 and 24: disease activity score (DAS 28), C reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), haemoglobin (HB), erythrocyte (ERY) and platelet (PLT) count, serum concentrations of albumin, interleukin 6 (IL-6), soluble interleukin 6 receptor (sIL-6R), serum amyloid A (SAA) and osteoprotegerin (OPG).

The mean value of DAS28 decreased constantly after treatment. During the follow-up mean values of CRP, ESR and PLT count significantly decreased and mean concentrations of albumin, Hb and ERY count significantly increased between week 0 and consecutive weeks. The mean serum concentration of IL-6 decreased significantly between week 0 and weeks 4 and 12 ($p < 0.01$). The mean serum concentration of sIL-6R decreased significantly between weeks 0 and 4 ($p = 0.03$).

SAA concentrations were very high in our pts at baseline and decreased constantly in the following weeks 4, 12 and 24 ($p < 0.01$). OPG concentrations were higher at week 4, 12 and 24 with statistical significance between weeks 0 and 4 ($p < 0.05$).

Adres do korespondencji:

dr med. Bożena Targońska-Stępnik, Katedra i Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin, tel. +48 81 724 47 90, faks +48 81 742 45 15; e-mail: bozena.stepniak@am.lublin.pl

Praca wpłynęła: 30.10.2006 r.

niż w tygodniu 0., z różnicą znamioną statystycznie pomiędzy tygodniem 0. i 4. ($p < 0,05$).

Leczenie LFM wywołuje poprawę kliniczną, związaną z istotnym obniżeniem stężeń cytokin prozapalnych i SAA u chorych na RZS.

Wstęp

Leflunomid (LFM) jest lekiem immunomodulującym, który został zaakceptowany do terapii reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) jako lek modyfikujący przebieg choroby (LMPCh). Leczenie LFM wywołuje zwykle wczesną i wyraźną poprawę kliniczną, powoduje opóźnienie postępu destrukcji stawowych [1, 2, 3]. LFM jest prolekiem, *in vivo* szybko przekształcanym w błonie śluzowej jelita i wątrobie do aktywnego metabolitu A77 1726 (LFM-M). Mechanizm działania LFM jest wielokierunkowy [3, 4]. W niskich, terapeutycznych dawkach LFM-M hamuje odwracalnie aktywność enzymu dehydrogenazy dihydroorotanowej (DHODH), co ogranicza syntezę *de novo* nukleotydów pirymidynowych. Wynikiem tego działania jest zahamowanie proliferacji aktywowanych limfocytów T i B [3, 5] oraz hamowanie pobudzonej przez czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) aktywacji czynnika jądrowego κ B (NF κ B) i odpowiedzi komórkowej limfocytów T [6, 7].

Wykazano także, że LFM-M wywiera hamujący wpływ na aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2), zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [7]. W hodowlach komórkowych na aktywowanych ludzkich komórkach synowialnych stwierdzono, że LFM-M hamuje miejscową produkcję TNF- α , interleukiny-1 β (IL-1 β), tlenku azotu (NO) i stromelizyny (metaloproteiny 3, MMP-3) [8, 9], zmniejsza także ekspresję cząsteczki adhezyjnej (ICAM-1) oraz NF κ B [9]. W hodowli komórek pochodzących z błony maziowej wykazano, że LFM-M hamuje produkcję czynników prozapalnych, tj. prostaglandyny E₂ (PGE₂), metaloproteiny 1 (MMP-1), interleukiny 6 (IL-6) [10], natomiast w obecności cytokin prozapalnych (TNF α lub IL-1 β) zwiększa wytwarzanie mediatora przeciwzapalnego, antagonisty receptora interleukiny 1 (IL-1Ra) [11].

Pod wpływem LFM-M zmniejsza się również wytwarzanie przez hepatocyty surowiczego białka amyloidu A (SAA), białka ostrej fazy, którego stężenie zwiększa się gwałtownie w przebiegu procesów zapalnych [12].

Tylko nieliczne publikacje dotyczą zmian stężeń białek ostrej fazy i cytokin podczas aktywnego leczenia leflunomidem chorych na RZS [13, 14].

Istotną rolę w procesie powstawania nadżerek kostnych w RZS odgrywiają receptory RANK, które pobudzają działanie osteoklastów oraz ligandy RANK wolne lub związane z komórkami (RANKL). Wzajemne oddziaływanie tych dwóch cząsteczek jest blokowane przez

Leflunomide therapy in RA pts induces clinical improvement which is connected with significant reduction of SAA and pro-inflammatory cytokine concentrations.

osteoprotegerynę (OPG), naturalny, rozpuszczalny, fałszywy receptor dla RANKL, którego efektem działania jest zahamowanie pobudzenia osteoklastów i powstawania nadżerek kostnych. Skuteczne leczenie RZS powinno charakteryzować się zmniejszeniem oddziaływania pomiędzy RANKL i RANK (zmniejszeniem ich ekspresji) lub zwiększeniem stężenia OPG.

Celem pracy była ocena wpływu leczenia LFM na wybrane wskaźniki procesu zapalnego oraz aktywność RZS w trakcie pierwszych 6 mies. terapii.

Materiał i metody

Badaniem objęto 37 chorych na RZS, leczonych LFM w ramach programu terapeutycznego NFZ w latach 2005–2006 w Klinice Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej AM w Lublinie. Rozpoznanie RZS ustalono zgodnie z kryteriami diagnostycznymi ACR [15]. Grupa chorych to 34 kobiety (91,9%) i 3 mężczyźni (8,1%), w wieku od 28 do 76 lat (średnia 53,9 \pm 11,2). Czas trwania RZS wynosił od 7 do 420 mies. (średnia 153 \pm 97,8). W fazie przednadżerkowej RZS było 5 chorych (13,5%), w fazie nadżerkowej 32 chorych (86,5%).

Do terapii LFM kwalifikowano chorych, u których dotychczasowe leczenie metotreksatem w maksymalnie tolerowanej dawce lub innym LMPCh nie było w pełni skuteczne lub powodowało objawy niepożądane, które uniemożliwiały kontynuowanie leczenia. W terapii stosowano LFM (Arava) w dawce 20 mg/dobę. U 4 chorych zastosowano dawkę nasycającą 100 mg/dobę przez 3 dni, następnie kontynuowano leczenie dawką 20 mg/dobę. Czas leczenia LFM wahał się od 1 do 11 mies. (średnia 7,9 \pm 2,5). U 31 chorych (83,8%) leczenie prowadzono przez co najmniej 6 mies., u 6 chorych (16,2%) terapię przerwano przed upływem półrocznego okresu leczenia. U 3 chorych powodem zaprzestania leczenia w 3–6 mies. od jego rozpoczęcia była niedostateczna skuteczność, u kolejnych 3 chorych istotne klinicznie objawy niepożądane w 1–3 mies. od początku leczenia (biegunka u 1 osoby, owrzodzenia jamy ustnej i biegunka u 1 osoby i zmiany alergiczne na skórze także u 1 osoby).

Podczas kolejnych wizyt w tygodniach: 0., 4., 12. i 24. przeprowadzono badanie kliniczne, oceniając liczbę stawów bolesnych i obrzękniętych, nasilenie bólu i aktywności choroby w wizualnej skali analogowej (VAS). Przeprowadzono rutynowe badania laboratoryjne, oceniając liczbę erytrocytów (ERY), trombocytów (PLT), prędkość

Tabela I. Wyniki badań klinicznych i laboratoryjnych podczas leczenia leflunomidem**Table I.** Clinical and laboratory results during leflunomide treatment

Tydzień	0.	4.	12.	24.	p (0./24.)
DAS 28	5,9±1,2	4,8±1,4	4,8±1,2	4,6±1,1	<0,01
CRP (mg/l)	32,9±27,6	14,9±13,9	17,5±20,6	12,3±12,4	<0,01
OB (mm/h)	50,6±24,8	36,5±21,7	39,2±23,9	37,5±23,7	<0,01
albumina (g/dl)	3,9±0,5	4,0±0,5	3,9±0,4	4,0±0,5	<0,01
Hb (g/dl)	11,8±1,3	12,5±1,0	12,4±0,9	12,5±0,9	<0,01
ERY (M/ml)	4,26±0,4	4,59±0,5	4,49±0,4	4,44±0,3	<0,01
PLT (K/ml)	353,4±103,1	305,9±80,5	309,5±81,2	300,7±79,8	p=0,07

(średnia ± odchylenie standardowe)

opadania krwinek czerwonych (OB), stężenie hemoglobiny (Hb). Aktywność choroby oceniano, porównując kolejne wartości wskaźnika aktywności choroby obliczanego dla 28 stawów (DAS 28). Pobrano próbki surowicy chorych i przechowywano w temperaturze -80°C. Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) oznaczano metodą immunoturbidymetryczną, z górną granicą normy 5 mg/l. Stężenie albuminy w surowicy określano metodą fotometryczną z zielenią bromokresolową (zakres normy 3,8–5,1 g/dl). Metodą ELISA oznaczano stężenie w surowicy: IL-6 (Human IL-6 ELISA; DRG Instruments GmbH, Germany), rozpuszczalnego receptora IL-6 (sIL-6R) (Human sIL-6R ELISA, DRG Instruments GmbH, Germany), SAA (Human SAA; BioSource Europe SA, Belgium) oraz OPG (Osteoprotegerin, Biomedica Gruppe).

Statystyka

W ocenie różnic między wartościami średnimi zmiennych ilościowych stosowano test t-Studenta wówczas, gdy zmienne charakteryzowały się rozkładem normalnym. Jeżeli zmienne nie pochodziły z rozkładu normalnego, stosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya. Korelacje między zmiennymi były oceniane z zastosowaniem testu Spearmana. Za istotne statystycznie uznawano różnice przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Wyniki

Na początku leczenia LFM wysoką aktywność RZS (DAS 28 $\geq 5,1$) zanotowano u 28 chorych (75,7%), umiarkowaną aktywność RZS (DAS 28 $\geq 3,2$ i $< 5,1$) u 9 chorych (24,3%); średnia wartość DAS 28 wynosiła 5,9±1,2. Średnia wartość DAS 28 zmniejszyła się konsekwentnie podczas leczenia LFM (tab. I). Po upływie 6 mies. terapii dobrą odpowiedź kliniczną (różnica wartości DAS 28 w tygodniach 0. i 24. leczenia $\geq 1,2$) obserwowano u 19 chorych (61,4%), umiarkowaną (różnica DAS 28 $\geq 0,6$ i $< 1,2$)

u 6 chorych (19,3%). Brak poprawy po półrocznym leczeniu LFM zanotowano u 6 chorych (19,3%).

W wyniku leczenia LFM uzyskano zmniejszenie średnich wartości OB, średnich stężeń CRP, albuminy i liczby PLT. Obserwowano znaczące statystycznie zwiększenie stężenia Hb i liczby ERY (tab. I). Największą skuteczność obserwowano na początku leczenia, pomiędzy tygodniem 0. i 4., jednak tendencja do poprawy utrzymywała się w kolejnych tygodniach, do 24. włącznie.

Średnie stężenia IL-6 zmniejszyły się istotnie statystycznie w kolejnych tygodniach leczenia (0., 4., 12., 24.) (tab. II). Średnie stężenie sIL-6R zmniejszyło się znacząco statystycznie po rozpoczęciu leczenia, osiągając najniższą wartość w tygodniu 4., w późniejszym okresie stopniowo podwyższało się (tab. II).

Średnie stężenia SAA były bardzo wysokie w grupie naszych chorych na początku obserwacji i zmniejszyły się stopniowo podczas leczenia (tab. II).

Średnie stężenia OPG znacząco statystycznie wzrosło po rozpoczęciu leczenia, osiągając najwyższą wartość w tygodniu 4. ($p < 0,05$), z późniejszym nieznacznym zmniejszeniem (tab. II).

Omówienie

W analizowanej przez autorów grupie 37 chorych na RZS leczonych leflunomidem, poprawę kliniczną uzyskano u 25 (67,6%), nieskuteczność leczenia obserwowano u 9 (24,3%), a objawy niepożądane powodujące przerwanie terapii u 3 chorych (8,1%). Poprawa kliniczna związana była ze znaczącym zmniejszeniem wartości wskaźników procesu zapalnego, poprawą wartości morfologii krwi i stężenia albuminy, wzrostem stężenia OPG. Istotną poprawę parametrów klinicznych i laboratoryjnych zanotowano już w ciągu pierwszych 4 tyg. leczenia LFM, a korzystne efekty terapii utrzymywały się u większości chorych w ciągu całego półrocznego leczenia.

Tabela II. Stężenia interleukiny 6 (IL-6), rozpuszczalnego receptora interleukiny 6 (sIL-6R), surowiczego białka amyloidu A (SAA) oraz osteoprotegeryny (OPG) podczas leczenia leflunomidem

Table II. Serum concentrations of interleukin 6 (IL-6), soluble interleukin 6 receptor (sIL-6R), serum amyloid A (SAA) and osteoprotegerin (OPG) during leflunomide treatment

Tydzień	0.	4.	12.	24.	p (0./4.)	p (0./12.)	p (0./24.)
IL-6 (pg/ml)	177,3±191,9	130,6±211,7	148,5±216,4	61,2±68,1	<0,01	<0,01	<0,01
sIL-6R (ng/ml)	103,2±35,7	96,1±39,7	105,9±34,2	110,8±30,6	p=0,03	NS	NS
SAA (µg/ml)	203,8±171,4	130,9±134,9	152,2±179,8	125,5±166,5	<0,01	<0,01	<0,01
OPG (pmol/l)	4,51±1,77	5,06±2,23	4,8±1,91	4,97±1,88	<0,05	NS	NS

(średnia ± odchylenie standardowe); NS – nieistotne statystycznie

Wyniki naszych obserwacji są zgodne z publikacjami, w których podkreśla się wczesny początek działania LFM, wcześniejszy niż w przypadku metotreksatu czy sulfasalazyny [16]. Autorzy wiążą występowanie szybkiego efektu terapeutycznego ze stosowaniem wstępnej dawki nasycającej LFM (przez 3 dni po 100 mg) [16]. W przedstawianej przez nas grupie, u większości chorych nie stosowano dawki nasycającej LFM, mimo to obserwowano wczesną poprawę klinicznych i laboratoryjnych parametrów aktywności choroby. Kullich i wsp. oceniali, że skuteczność leczenia LFM poprawia się wyraźnie pomiędzy 3. a 6. mies. terapii oraz, że po półrocznym leczeniu blisko 40% chorych na RZS określa efekt kliniczny jako bardzo dobry i tylko 9,5% jako słaby [14].

Smolen i Emery zwracają uwagę na opóźnienie progresji zmian radiologicznych w stawach pod wpływem leczenia LFM [16]. Na podstawie naszych obserwacji zahamowanie procesu uszkodzenia stawów można tłumaczyć pośrednio wzrostem stężenia OPG jako czynnika zapobiegającego powstawaniu destrukcji.

Surowicze białko amyloidu A jest bardzo czułym wskaźnikiem ostrej fazy zapalenia, którego produkcja w hepatocytach gwałtownie wzrasta w odpowiedzi na działanie cytokin prozapalnych, a stale utrzymujące się jego wysokie stężenie stanowi podstawę dla rozwoju amyloidoz. Dlatego skuteczne obniżenie aktywności procesu zapalnego i zmniejszenie wytwarzania SAA może zapobiegać amyloidozie. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że poprawa stanu klinicznego chorych związana była podczas całego okresu leczenia z istotnym zmniejszeniem stężenia SAA oraz cytokiny prozapalnej IL-6. Stężenie sIL-6R obniżyło się wyraźnie tylko na początku terapii, powracając następnie do poziomu wyjściowego.

Wyniki przedstawiane w naszej pracy są zgodne z danymi z literatury. Migita i wsp. w hodowli ludzkich hepatocytów wykazali, że LFM-M hamuje wytwarzanie SAA [12]. Kullich i wsp. potwierdzili takie działanie w badaniach *in vivo*, u chorych na RZS leczonych LFM przez

6 mies. [14]. Publikacje oceniające stężenie cytokin w czasie leczenia LFM są nieliczne i niejednoznaczne. Burger i wsp., prowadząc hodowlę ludzkich synowocytów, obserwowali, że LFM-M hamuje produkcję IL-6, PGE₂ i MMP-1 [10], a Kraan i wsp. opisali, że leczenie LFM nie wpływa na stężenie IL-6 w surowicy, wywołuje natomiast znaczącą obniżenie stężenia interferonu γ (IFN γ) [13].

W dotychczasowych publikacjach nie znaleźliśmy oceny stężeń sIL-6R pod wpływem LFM. Podwyższone tężenie sIL-6R jest opisywane w przewlekłych chorobach zapalnych, takich jak choroba śródmiąższowa płuc, infekcja HIV, szpiczak plazmocytowy [17]. Klimiuk i wsp. obserwowali nieznacznie podwyższone stężenie sIL-6R w surowicy chorych na RZS w porównaniu z chorobą zwyrodnieniową, znajdując tylko słabe skojarzenie z wartością OB i stężeniem IL-6 [17]. Uson i wsp. uzyskali podobne wyniki i uznali, że sIL-6R może nasilać ogólnoustrojowe działanie IL-6, np. wytwarzanie białek ostrej fazy w hepatocytach [18].

Wnioski

Terapia leflunomidem chorych na reumatoidalne zapalenie stawów wywołuje poprawę kliniczną oraz zahamowanie aktywności choroby u większości leczonych. Te objawy kliniczne łączą się z obserwowanym istotnym zmniejszeniem stężeń cytokin prozapalnych i białek ostrej fazy oraz podwyższeniem stężenia osteoprotegeryny.

Piśmiennictwo

1. Strand V, Cohen S, Schiff M, et al. Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with placebo and methotrexate. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. Arch Intern Med 1999; 159: 2542-50.
2. Smolen JS, Kalden JR, Scott DL, et al. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial. European Leflunomide Study Group. Lancet 1999; 353: 259-66.

3. Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 841-9.
4. Fox RI, Herrmann ML, Frangou CG, et al. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 1999; 93: 198-208.
5. Davis JP, Cain GA, Pitts WJ, et al. The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemistry* 1996; 35: 1270-3.
6. Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. *J Immunol* 1999; 162: 2095-102.
7. Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. A77 1726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1589-96.
8. Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, et al. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 440-3.
9. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, et al. Anti-inflammatory effects of leflunomide in combination with methotrexate on co-culture of T lymphocytes and synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 728-35.
10. Burger D, Begue-Pastor N, Benavent S, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of prostaglandin E (2), matrix metalloproteinase 1 and interleukin 6 in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 89-96.
11. Palmer G, Burger D, Mezin F, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, increases the production of IL-1 receptor antagonist in human synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R181-9.
12. Migita K, Miyashita T, Maeda Y, et al. An active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of serum amyloid A protein in human hepatocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 443-8.
13. Kraan MC, Smeets TJ, van Loon MJ, et al. Differential effects of leflunomide and methotrexate on cytokine production in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1056-61.
14. Kullich WC, Mur E, Aglas F, et al. Inhibitory effects of leflunomide therapy on the activity of matrixmetalloproteinase-9 and the release of cartilage oligomeric matrix protein in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 155-60.
15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
16. Smolen JS, Emery P. Efficacy and safety of leflunomide in active rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39 (1 Suppl): 48-56.
17. Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, et al. Interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and soluble interleukin-6 receptor in the sera of patients with different histological patterns of rheumatoid synovitis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 63-9.
18. Uson J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol* 1997; 24: 2069-75.