

دور مستويات MMP-3 المصلية في تقييم الاستجابة العلاجية لدى مرضى سوريين مشخصين حديثاً بالتهاب المفاصل الروماتويدي

رامنة حسين¹، د. ماجد عبود²، أ.م. عماد الدين أبو خميس³.

¹ طالبة دكتوراه، قسم الأحياء الدقيقة والدمويات والمناعيات، كلية الصيدلة، جامعة دمشق.

² رئيس قسم الشعبة المفصلية في مستشفى الموساة، مدرس في كلية الطب البشري، جامعة دمشق

³ دكتوراه (أستاذ مساعد)، قسم الدمويات والمناعيات، كلية الصيدلة، جامعة دمشق.

الملخص:

خلفية البحث وهدفه: يعد التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) مشكلة صحية واجتماعية تخلف آثاراً سلبية غير قابلة للعكس، فيما لم يتم التشخيص بشكل مبكر. إذ تعكس مستويات MMP-3 المصلية المرتفعة حالة الالتهاب المفصلي، أما انخفاضها يعد مؤشراً هاماً لتحسن الأعراض. لذا هدف بحثنا إلى مقايسة مستويات MMP-3 المصلية، وإمكانية الاعتماد عليها في تقييم الاستجابة العلاجية لدى مجموعة من مرضى RA. مواد البحث وطرائقه: شملت دراستنا 43 مريضاً (7 ذكور و36 إناث) تم تشخيصهم حديثاً وفقاً لـ معايير ACR/EULAR عام 2010، وتصنيفهم حسب العلاج المطبق إلى مجموعات: مجموعة المرضى الذين تلقوا Methotrexate (N=24)، ومجموعة المرضى الذين تلقوا Methotrexate مع Sulfasalazine (N=11) ومجموعة المرضى الذين تلقوا أحد مضادات TNF-a (N=8). قيست المستويات المصلية لـ MMP-3 بطريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم. أخذت العينات المصلية في مرحلتين: عند التشخيص، وبعد العلاج.

النتائج: أظهرت نتائجنا أن متوسط مستويات MMP-3 عند بدء التشخيص كان أعلى (486.49 ng/ml) من متوسط مستوياته بعد المعالجة (322.3 ng/ml) وبفارق يعد به إحصائياً (P<0.05). كما وجدنا أن متوسط مستويات MMP-3 قد انخفض عما كان عليه قبل المعالجة، وذلك في مجموعات العلاج الثلاث (P<0.05). كما وُجد فارقاً حقيقياً ذو دلالة إحصائية (P=0.009) في مستويات MMP-3 بعد المعالجة بين المرضى الذين حققوا هدأة، إذ بلغ متوسط MMP-3 (277.28ng/ml) بالمقارنة مع مجموعة المرضى الذين لم يحققوا هدأة (346.42 ng/ml). وقد أثبتت دراستنا وجود علاقة ارتباط طردية بين مقدار تناقص مستويات MMP-3 مع مقدار تناقص كل من المتغيرات (ESR

تاريخ القبول: 2022/4/3

تاريخ النشر: 2023/3/5



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

($r=0.381$)، ($r=0.515$) = DAS28، وعدد المفاصل المتورمة ($r=0.350$). وباستخدام منحنى ROC وجدنا عند القيمة المحددة لـ (317.8) ng/ml MMP-3 حساسية 67.9%، ونوعية 80% للتفريق بين مجموعة مرضى RA من حيث الوصول للهدأة. الاستنتاج: ترتفع مستويات MMP-3 المصلية عند مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي المشخصين حديثاً، كما أن انخفاض مستوياته المصلية بعد العلاج يعد مؤشراً هاماً لتقييم الاستجابة العلاجية.

كلمات مفتاحية: التهاب المفاصل الروماتويدي، MMP-3، الوصول للهدأة، الاستجابة العلاجية.

The role of serum MMP-3 levels in evaluating the therapeutic response in rheumatoid arthritis newly diagnosed Syrian patients

Rama hussein¹, Dr.Majed Abboud²,
Ass.Prof., Imad Aldean Abokhamis³

¹ PHD student in Department of Micro-organism, Heamatology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

² Head in Department of the articular division in Al-Mowasat Hospital, Instructor at the Faculty of Medicine, Damascus University.

³ Assistant Professor, Instructor in Department of Heamatology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

Abstract:

Background & Aim: Rheumatoid Arthritis, (RA) is a health and social problem that has irreversible negative effects if early diagnosis is not made. Elevated serum MMP-3 levels reflect articular inflammation, while their low levels are an important indicator of symptom improvement. Therefore, our research aimed to study the levels of MMP-3 serum and its reliability to evaluate the therapeutic response in a group of RA patients.

Research materials and methods: Our study included 43 patients (7 males and 36 females) newly diagnosed according to the criteria of ACR/EULAR 2010, and they were classified according to the treatment applied into several groups: the group of patients who received Methotrexate alone (N=24), the group of patients who received Methotrexate and Sulfasalazine (N=11), and the group of patients who received a TNF-a antagonist (N=8). Serum levels of MMP-3 were measured by Enzyme Linked Immune Sorbent Assay. Serum samples were taken in two phases: at diagnosis and after treatment.

Our results showed that the mean serum MMP-3 levels at the start of diagnosis was higher (486.49ng/ml) than the mean of its levels after treatment (322.3ng/ml) with a statistically significant difference ($P<0.05$). We also found that the mean levels of MMP-3 has decreased from what it was before treatment, in three treatment groups ($P<0.05$). A real statistically significant difference ($P=0.009$) was found in serum MMP-3 levels after treatment between patients who achieved remission, their mean of MMP-3 levels were (277.28ng/ml) compared to the group of patients who did not achieve remission (346.42 ng/ml). Our study demonstrated a positive correlation between the amount of decrease in serum MMP-3 levels with the amount of decrease for each of the variables; ESR ($r = 0.381$), DAS28 ($r = 0.515$) and the number of swollen joints ($r = 0.350$). Using the ROC Curve, we found at the specific value of MMP-3 (317.8 ng/ml) a sensitivity of 67.9% and specificity of 80% for differentiating between a group of rheumatoid arthritis patients according to achieving remission. **Conclusion:** Serum levels of MMP-3 are elevated in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis, and its decrease in serum levels after treatment is an important indicator for evaluating therapeutic response.

Key words: Rheumatoid Arthritis, MMP-3, Remission, therapeutic response.

Accepted: 3/4/2022

Published: 5/3/2023



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة Introduction

التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) هو مرض مناعي ذاتي التهابي مزمن، يقدر معدل انتشاره 0.3-1% من السكان البالغين حول العالم (Knani et al., 2018)، ويصيب حوالي 70-80% من الإناث (Mun et al., 2018). يستهدف المرض المفاصل الصغيرة، ثم يتطور ليشمل المفاصل الكبيرة، ويكون على شكل التهاب متعدد ومتناظر polyarthrits symmetrical، كما يتظاهر باضطرابات خارج مفصليّة (Kolarz, Ciesla, et al., 2021). وينجم عن المرض حدوث التهاب زليلي synovitis، فقدان عظمي bone lose، تخرب غضروفي cartilage destruction، وقلّة عظم حول المفصل osteopenia، مع وجود تضيق في الفراغ المفصلي (Corrado et al., 2021; Lerner et al., 2018). تشكل التآكلات العظمية bone erosions، والتشوهات المفصليّة joint deformities الملحوظة لدى مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي مشكلة صحية واجتماعية هامة، قد تخلف عقابيل كبرى غير قابلة للعكس. وينجم عن هذه الآثار غير المباشرة عجزاً وظيفياً، وعدم القدرة على الحركة، مما يؤدي إلى قلة الإنتاجية productivity، تناقص مأمول الحياة بالإضافة إلى تحمل المرضى أعباء اقتصادية واجتماعية بآن واحد (Aly Motawa et al., 2020; Halabi et al., 2015).

ومن هنا تأتي أهمية التشخيص المبكر، ومن ثم البدء بالمعالجة المكثفة والملائمة، لمنع تقدم المرض، وتخرب المفاصل وتفادياً للوصول إلى الأضرار غير العكوسة irreversible damage مع تناقص معدل المراضة morbidity والوفيات mortality لدى هذه الشريحة الواسعة من المجتمع (Halabi et al., 2015). ووفقاً للاتحاد الأوروبي لمكافحة الروماتيزم the European League Against Rheumatism (EULAR) فإن المعالجة المطبقة حالياً لمرضى RA تستند على إعطاء الأدوية المضادة للروماتيزم والمعدلة للمرض والمعروفة بأدوية disease modifying anti-rheumatic drugs

(DMARDs)، والتي يجب البدء بها حالما يتم التشخيص. تعمل أدوية DMARDs على عرقلة أو إبطاء تقدم المرض، وتعد من أهم المعالجات النوعية في التهاب المفاصل الروماتويدي. إلا أن نسبة من هؤلاء المرضى غير مرشحين لهذه المعالجة، إما لصعوبة الوصول إلى مرحلة التشخيص المبكر، أو نتيجة الآثار السمية الناجمة عن استخدام هذه الأدوية. وقد تعطى أدوية DMARDs كخط علاجي أول لمرضى RA، وخاصة للفة من المرضى الأكثر احتمالاً لتطور أذية مفصليّة (Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, Morita, et al., 2016). تصنف هذه الأدوية إلى مجموعة تخليقية اعتيادية (csDMARDs) conventional synthetic ومجموعة تخليقية هادفة targeted synthetic (tsDMARDs)، والمجموعة الأخيرة تدعى بالأدوية البيولوجية biological (bDMARDs). ويعد Methotrexate (MTX) الخيار العلاجي الأول والمنصوح به من قبل EULAR (Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, Morita, et al., 2016)، ويتم استخدامه مرة واحدة أسبوعياً لمرضى RA الذين لديهم شدة منخفضة أو مرتفعة للمرض، وذلك لتقليل الالتهاب الزليلي ومنع تقدم التخرّب المفصلي (Kolarz, Ciesla, et al., 2021; Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, Morita, et al., 2016). في حين تستخدم الأدوية البيولوجية مثل مضادات (TNF-a) كخيار علاجي ثانٍ أو ثالث في تدبير وإدارة مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي (Kolarz, Podgorska, et al., 2021). وقد أبدت المعالجة الأحادية أو المشاركة بأدوية DMARDs فعالية ممتازة لدى غالبية مرضى RA، إلا أن نسبة 30-40% من المرضى يفشلون في تحقيق الهدأة بعد المعالجة بالأدوية البيولوجية، أو قد يبدون مقاومة للعلاج (Cheng et al., 2021). طورت EULAR معايير للاستجابة العلاجية اعتماداً على التغير في مقياس Disease activity score 28 (DAS28)، وهو أداة لقياس فعالية التهاب المفاصل الروماتويدي، ويرتكز هذا المعيار على قياس عدد النقاط

المعتمدة على فحص 28 من المفاصل المصابة المتورمة swollen joint count (SJC) والمفاصل الممضمة (TJC) joint count tenderness مع تقييم الحالة العامة للمريض visual analog scale (VAS) وبالتالي إمكانية تصنيف المرضى حسب مقياس DAS28 إلى عدة مجموعات (هدأة، منخفضة، متوسطة، شديدة). بالإضافة إلى ذلك يتم تقييم نجاعة العلاج حالياً لدى مرضى RA اعتماداً على المعالم الالتهابية غير النوعية للمرض (ESR, CRP) (Karsdal et al., 2011). لذا دعت الحاجة إلى الكشف عن واصمات حيوية biomarkers نوعية تشارك في الآلية المرضية، وتتنبأ بالاستجابة العلاجية (therapeutic response) (Cheng et al., 2020; Laborde et al., 2021). وقد أشارت الدراسات الحديثة إلى دور أنزيمات matrix metalloproteinase (MMPs) في الآلية المرضية لالتهاب المفاصل الروماتويدي، وذلك من خلال تحريض آلية الارتشاف العظمي والتدرك الغضروفي (Murota et al., 2016). ويأتي أنزيم MMP-3 في مقدمة هذه العائلة، المعروف بـ stromelysin-1، وهو عبارة عن أنزيم حال للبروتين proteolytic، يؤدي دوراً جوهرياً في التخراب المفصلي في التهاب المفاصل الروماتويدي. يعمل أنزيم MMP-3 على تدرك العديد من مكونات القالب خارج الخلوي والتي تتضمن: أنواع الكولاجين المختلفة (types III, IV, V IX, and XI) والبروتيوغليكانات، وبروتينات القالب من جهة، كما يعزز MMP-3 الآلية الالتهابية من خلال تفعيل العديد من أنزيمات MMPs (pro-MMP-8, MMP-7, MMP-9, pro-MMP-8) (Hattori et al., 2018). وإلى جانب ذلك يبدى MMP-3 دوراً بارزاً في عملية دعم تجنيد العدلات والوحيدات، والخلايا التائية، وناقضات العظم، كما يدعم MMP-3 تحرر عامل النمو البطاني الوعائي المرتبط بالغشاء، فيساهم في تولد الأوعية angiogenesis وتقدم المرض. ونتيجة ذلك يتورط MMP-3 في الآلية المرضية لالتهاب المفاصل الروماتويدي (M. M. Ally, 2013). يتم إنتاج MMP-3 بشكل

موضعي في المفاصل الملتهبة من قبل الخلايا الغضروفية chondrocytes، الأرومات الليفية الزليلية synovial fibroblasts، البالعات، العدلات، والخلايا البطانية endothelial cells. كما يزداد التعبير عنه في الغشاء الزليلي synovium وذلك استجابة للعديد من السيتوكينات الالتهابية (TNF- α , IFN γ)، وقد تعكس مستوياته المنتجة موضعياً من قبل الغشاء الزليلي، مستوياته الموجودة في المصل (Shi et al., 2021). وقد وجدت مستويات متزايدة لـ MMP-3 في السائل الزليلي أو في المصل لدى مرضى RA، والتي تعكس حالة الالتهاب المفصلي لديهم (Pathology & Shams, 2020). كما أشارت الدراسات مؤخراً إلى أن ازدياد المستويات المصلية لـ MMP-3 قد ارتبطت مع فعالية التهاب المفاصل الروماتويدي، مما اقترح إمكانية الاعتماد عليه كواصم حيوي للتدرك الغضروفي، والالتهاب الزليلي (Hattori et al., 2018). ومن جهة أخرى أبدت بعض الأدبيات أهمية مقايسة مستويات MMP-3 المصلية في تقييم الاستجابة العلاجية therapeutic response لدى مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي، إذ تعد المستويات المصلية المعدلة لـ MMP-3 عاملاً تنبؤياً هاماً للاستجابة الفعالة، والوصول إلى مرحلة الهدأة والتي تُعرف حسب EULAR ($DAS28 < 2.6$) (Hattori et al., 2018). وبما أن المستويات المصلية المرتفعة لـ MMP-3 قد تم دراستها بشكل واسع كواصم للالتهاب الزليلي في التطبيق السريري، إلا أن قلة من الأدبيات قد أبرزت أهمية هذا الواصم في تقييم الاستجابة العلاجية لالتهاب المفاصل الروماتويدي. ومن هنا يركز محور وهدف دراستنا إلى إمكانية الاستفادة من المستويات المصلية لـ MMP-3 في التنبؤ بالاستجابة العلاجية والوصول للهدأة لدى مجموعة من مرضى الذين تم تشخيصهم حديثاً وذلك من خلال مقايسة مستوياته المصلية عند بدء التشخيص وبعد تلقيهم العلاج.

مواد البحث وطرائقه:

تعد الدراسة من نمط حالة Cross sectional study، وقد شملت 43 مريضاً تم تشخيصهم حديثاً بالتهاب المفاصل الروماتويدي وفقاً لمعايير American College of Rheumatology (ACR/EULAR) عام 2010. وكانوا من مراجعي قسم العيادة المفصلية في مستشفى المجتهد، ومستشفى المواساة الجامعي بدمشق، جُمعت العينات في الفترة الواقعة بين كانون الثاني 2020 إلى نيسان 2021. تضمنت مجموعة المرضى (7 ذكور و36 أنثى)، تراوحت أعمارهم بين 18-65 عاماً. استبعدت مجموعة المرضى المشخصين والمعالجين مسبقاً بأدوية DMARDs التقليدية أو البيولوجية أو أدوية الكورتيكوستيروئيدات الجهازية، والمرضى المصابين بأمراض مفصلية أخرى، والمصابين بالفشل الكلوي المزمن والمرضى المصابين بأمراض الكبد. خضعت مجموعة مرضى RA للعلاج، وتم تصنيفهم إلى عدة مجموعات حسب العلاج المستخدم:

- 1- مجموعة مرضى (N=24) تم معالجتهم بـ Methotrexate بجرعة (15 mg مرة أسبوعياً)، أو (20 mg Leflunomide) مرة باليوم) في حال عدم توفر Methotrexate.
- 2- مجموعة مرضى (N=11) تم معالجتهم بـ Methotrexate بالمشاركة مع أدوية DMARDs الأخرى مثل Sulphasalazine بجرعة (2mg/day).
- 3- مجموعة مرضى (N=8) تم معالجتهم بـ Infliximab وهو أحد مضادات TNF-a وذلك بجرعة (3 mg/kg).

كما صُنفت مجموعة المرضى إلى أربع مجموعات وفقاً لـ DAS28-ESR الذي يعطى بالقانون:

$$DAS28-ESR = 0.56\sqrt{(TJC28)} + 0.28\sqrt{(SJC28)} + 0.70 \ln(ESR) + 0.014$$

الجدول (1): مجموعة مرضى RA وفقاً لـ DAS28

التصنيف	:DAS28
High	>5.1
Moderate	3.3-5.1
Low	2.6-3.2
Remission	2.6 <

الاعتيان: أخذ 5 مل من عينات الدم الوريدي على أنبوب جاف، ثم نُبذت عينات الدم بعد سحبها مباشرة بسرعة 1980 g لمدة 20 دقيقة، وحُفظت العينات بالتجميد في الدرجة -80°C في كلية الصيدلة جامعة دمشق إلى حين إجراء المقايسة. جُمعت عينات الدم المصلية في مرحلتين:

المرحلة الأولى: عند التشخيص المؤكد لالتهاب المفاصل الروماتويدي لمجموعة من مرضى RA (N=43) وذلك قبل البدء بالمعالجة.

المرحلة الثانية: تم اعتيان العينة الثانية من نفس مجموعة المرضى (N=43)، ولكن بعد تلقّيهم العلاج ومتابعتهم مدة (3-6) أشهر.

أخذت البيانات التالية من ملفات المرضى المراجعة لعيادات المفاصل، وجُمعت المعلومات الخاصة لكل مريض: العامل الروماتويدي rheumatoid factor (RF)، وأضداد anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) وسرعة التثقل (erythrocyte sedimentation rate (ESR)، والبروتين المتفاعل (CRP)، وتعداد الدم الكامل complete blood count (CBC).

قُيِّمت درجة فعالية المرض (DAS28) بعد إجراء الفحص السريري لكل المرضى المشاركين في الدراسة، ولتقييم الاستجابة العلاجية بعد فترة المتابعة، تم إعادة قياس DAS28 وبعض الفحوص المخبرية (ESR,CRP).

• دراسة الاستقلال عن طريق اختبار Chi-Square
Independence Tests ويستخدم لتقييم العلاقة بين متغيرين نوعيين (تقييم الاختلافات في النسب)، حيث يمكن أن يكون المتغيران مستقلان أو مرتبطين.
• الحساسية والنوعية: عن طريق منحنى (ROC) Curve Receiver operating characteristic لتحديد القيمة المعيارية لـ MMP-3 في عينة البحث للتنبؤ بالوصول للهدأة. وحُسبت NPV (negative PPV (positive productive value) productive value).

النتائج Results

يبين الجدول 2 البيانات المتعلقة بمجموعة المرضى المدروسة من حيث: الجنس، الفئات العمرية، الاستجابة للعلاج، ونسبة المرضى الذين وصلوا للهدأة بعد فترة المتابعة للعلاج.

الجدول (2): وصف متغيرات الدراسة لدى مجموعة مرضى RA

المتغير	N (%)
الجنس	
ذكر	7 (15.6%)
أنثى	36 (84.4%)
الفئات العمرية (السنة)	
< 40	7 (15.6%)
40 – 50	16 (35.6%)
≥ 50	20 (48.9%)
الاستجابة للعلاج	
مستجيب	38 (88.4%)
غير مستجيب	5 (11.6%)
الوصول للهدأة	
هدأة	15 (34.88%)
لم يحقق هدأة	28 (65.12%)

كما يوضح الجدول 3: تصنيف مجموعة مرضى RA حسب DAS28-ESR قبل وبعد العلاج.

الجدول (3): تصنيف مجموعة مرضى RA حسب DAS28

التصنيف	قبل المعالجة N (%)	بعد المعالجة N (%)
DAS28-ESR		
Remission	-	15 (34.88%)

قيست المستويات المصلية لـ MMP-3 بطريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)، وذلك باستخدام عتيدة Aviva Systems Biology's MMP3 ELISA Kit (Human) المصنعة من قبل شركة Aviva الألمانية (Systems Biology Aviva San Diego)، والتي اعتمدت على مبدأ الشطيرة. قيس امتصاص العينات بطول موجة 450 nm، ثم رُسم منحنى معياري لوغاريتم بتعيين قيم الامتصاص مقابل تراكيز العيارات، وحُدثت التراكيز المجهولة للعينات باستخدام منحنى المعايرة الذي تم إجراؤه.

التحليل الإحصائي :

تم الاعتماد على برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) النسخة 25 لتحليل البيانات، وبرنامج Excel

• تم حساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للمتغيرات الداخلة في الاختبارات، والنسب المئوية والتكرارات لمتغيرات الدراسة، مع تطبيق عدة اختبارات:

• اختبار التوزيع الطبيعي: عن طريق اختبار Shapiro-Wilk لأن حجم العينات أصغر من 50.

• اختبارات الفرق: باستخدام الاختبارات الوسيطة اختبار Student للعينات المستقلة T-Independent test لأجل

دراسة الفرق بين مجموعتي الدراسة، وبديله اللاوسيطي اختبار Mann-Whitney وذلك عند رفض فرضية التوزيع الطبيعي لمتغيرات الدراسة، واختبار ستودنت للعينات المترابطة Paired

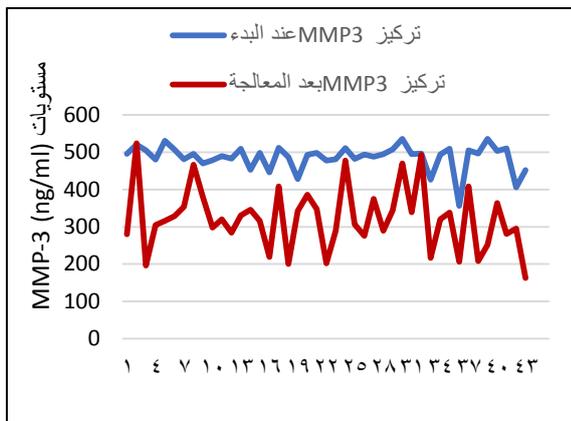
T-Test للتحقق من وجود اختلافات ذات دلالة إحصائية في المجموعة الواحدة وبديله اللامعلمي Wilcoxon Signed

Ranked Test.

• دراسة الارتباط: تمت عن طريق معامل الارتباط بيرسون Person للمتغيرات التي تتبع التوزيع الطبيعي، وارتباط سبيرمان Sperman عند رفض فرضية التوزيع الطبيعي.

MMP-3 (ng/ml)	N= 43		0.000
	Mean ± SD	Mean ± SD	
	486.49 ± 34.5	322.3 ± 43.83	
	Median	Median	
494.63	319.97		

ويوضح الشكل 1 تركيز MMP-3 المصلي لدى كل مريض في اللحظتين (عند التشخيص وبعد المعالجة).



الشكل (1): مستويات MMP-3 المصلية عند التشخيص وبعد المعالجة لدى جميع مرضى RA

كما تبين نتائج الجدول 6 دراسة الفروق في مستويات MMP-3 عند مجموعة مرضى RA الذين حققوا هدأة (N=15) ومجموعة المرضى الذين لم يحققوها (N=28) حيث وجد فارقاً يعدد به إحصائياً (0.009) بين المجموعتين إذ كانت مستوياته بعد المعالجة أعلى عند مجموعة المرضى الذين لم يحققوا الهدأة بالمقارنة مع مستوياته عند مجموعة المرضى الذين حققوا الهدأة. (جدول 6، شكل 2)

الجدول (6): مستويات MMP-3 بين مجموعتي المرضى من حيث الوصول للهدأة قبل وبعد المعالجة.

	مستويات MMP-3 (ng/ml)		P-value
	مجموعة مرضى حققوا هدأة	مجموعة مرضى لم يحققوا هدأة	
قبل المعالجة	N= 15	N= 28	0.949 ^b
	Mean ± SD	Mean ± SD	
	485.01 ± 35.08	486.75 ± 34.13	
	Median	Median	
	494.97	494.47	0.009 ^a
	N= 15	N= 28	

Low activity	2 (4.6%)	7 (16.27%)
Moderate activity	18 (37.3%)	12 (34.88%)
High activity	25 (58.1%)	9 (13.97%)

أما الجدول 4: فيظهر الفروق في متغيرات الدراسة قبل وبعد المعالجة لجميع مرضى RA المشاركين في الدراسة.

الجدول (4): الفرق في متغيرات الدراسة قبل وبعد المعالجة

المتغير	قبل المعالجة		بعد المعالجة		P-value
	Mean ± SD	Median n	Mean ± SD	Median n	
RF (IU/ml)	201.0 ± 215.4	5 ± 113	105.6 ± 115.7	65	0.000 ^b
CRP (mg/dl)	23.10 ± 29.5	10.1	5.95 ± 9.48	1.37	0.000 ^b
ESR (mm/h)	50.49 ± 22.4	49	29.02 ± 20.4	20	0.000 ^b
DAS28	5.29 ± 0.9	5.25	4.08 ± 1.04	4.01	0.000 ^a
عدد المفاصل الممضية	9.7 ± 4.9	10.0	5.56 ± 3.1	5.0	0.000 ^b
عدد المفاصل المتورمة	5.53 ± 2.3	6.0	2.74 ± 1.68	3.0	0.000 ^b
VAS (%)	0.67 ± 0.21	0.70	0.43 ± 0.21	0.40	0.000 ^b

^a: Paired Samples Test, ^b: Wilcoxon Signed Ranks Test

فبعد دراسة الفروق في مستويات MMP-3 المصلية قبل المعالجة وبعدها، تبين أن معنوية الاختبار 0.000 أصغر من مستوى الدلالة 0.05، أي أنه يوجد فروق ذات دلالة إحصائية في مستويات MMP-3 قبل وبعد المعالجة كما يوضح الجدول 5.

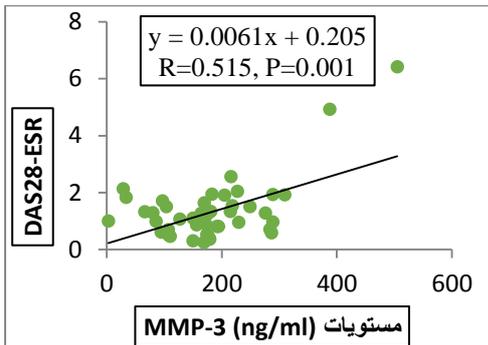
الجدول (5): دراسة الفروق في مستويات MMP-3 في مجموعة مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي قبل وبعد المعالجة

الواصم المدروس	بدء التشخيص N= 43	بعد 3 - 6 أشهر من العلاج	Wilcoxon Signed Ranks Test P
----------------	----------------------	--------------------------	------------------------------

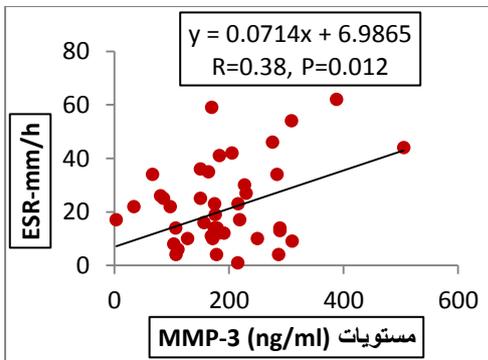
لا يوجد علاقة ارتباط	0.768 ^b	0.053	الفرق في RF
يوجد علاقة ارتباط	0.001 ^a	0.515	الفرق في DAS28

^a: Pearson Correlation, ^b: Spearman's rho

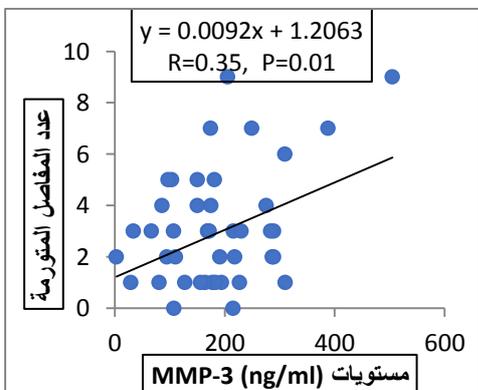
وتبدو علاقات الارتباط بين مقدار التناقص في مستويات MMP-3 المصلية ومقدار التناقص في متغيرات الدراسة واضحة في الأشكال (2، 3، 4).



الشكل (2): العلاقة بين مقدار تناقص MMP-3 ومقدار انخفاض DAS28



الشكل (3): العلاقة بين مقدار تناقص MMP-3 ومقدار انخفاض ESR



بعد المعالجة	Mean ± SD	Mean ± SD	
	277.28 ± 70.52	346.42 ± 82.97	
	Median	Median	
	289.63	340.3	

^a: Independent Samples Test, ^b: Mann-Whitney Test.

كما وجد أن معنوية الاختبار Wilcoxon Signed Ranks Test لدراسة الفروق في مستويات MMP-3 قبل وبعد المعالجة كانت أصغر من مستوى الدلالة 0.05، في مجموعات العلاج الثلاث. (جدول 7)

الجدول (7): الفروق في مستويات MMP-3 حسب العلاج المطبق

العلاج المستخدم	مستويات الواصم MMP-3 (ng/ml)			
	N	بعد المعالجة		Wilcoxon Ranks Test P
		Mean ±SD	Mean ± SD	
MTX لوحده أو Leflunomide	24	485.84 ± 34.3	330.20 ± 84.7	0.000
MTX مع SSZ	11	476.27 ± 33.1	298.75 ± 82.9	0.003
MTX مع Infiximab	8	502.51 ± 32.6	330.97 ± 92.8	0.017

عند دراسة العلاقة بين الفرق (قبل المعالجة وبعد المعالجة) في مستويات MMP-3 والفرق في متغيرات الدراسة، وجدنا أنه يوجد علاقة ارتباط بين مستويات MMP-3 مع المتغيرات (ESR و DAS28) وعدد المفاصل المتورمة) أي أنه كلما ازداد مقدار التناقص في مستويات MMP3، زاد مقدار التناقص في هذه المتغيرات (جدول 8).

الجدول (8): دراسة العلاقة بين الفرق في مستويات MMP-3 والفرق في متغيرات الدراسة

المتغير	الفرق في مستويات MMP-3 (ng/ml)		دلالة الارتباط
	R	P-value	
الفرق في عدد المفاصل الممضمة	0.092	0.559 ^a	لا يوجد علاقة ارتباط
الفرق في عدد المفاصل المتورمة	0.350	0.01 ^a	يوجد علاقة ارتباط
الفرق في CRP	0.176	0.266 ^b	لا يوجد علاقة ارتباط
الفرق في ESR	0.381	0.012 ^a	يوجد علاقة ارتباط

		Sig. ^b	Bound	Bound
0.742	0.079	0.010	0.586	0.897
a. Under the nonparametric assumption b. Null hypothesis: true area = 0.5				

الجدول (10): الجدول المختصر لقيم الحساسية و تتم النوعية المقابلة لقيم MMP-3 بعد المعالجة حسب الوصول للهدأة.

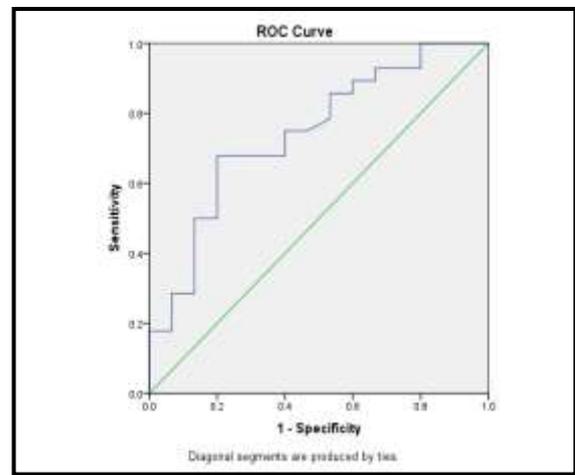
Test Result Variable(s): (ng/ml) MMP-3 بعد المعالجة		
Positive if Greater Than or Equal To a	Sensitivity	1 – Specificity
161.6333	1	1
179.1333	1	0.933
296.3	0.75	0.4
301.3	0.714	0.4
305.8	0.679	0.4
317.8	0.679	0.2
324.4667	0.607	0.2

وقد أظهرت النتائج أن 22 شخص تم تشخيص عدم وصولهم للهدأة وفق نقطة القطع 317.8 ng/ml لمستويات MMP-3 بعد المعالجة، 19 حالة موجبة صحيحة و 3 حالات موجبة كاذبة، و 21 حالة سالبة منها 12 حالة سالبة صحيحة و 9 حالة سالبة كاذبة، بمعدل دقة بلغ 86.4% ويعبر عن نسبة المرضى الذين لم يصلوا للهدأة وتم تشخيصهم بشكل صحيح.

كما تبين نتائج الجدول 11 أن معنوية الاختبار 0.003 لدراسة العلاقة بين إيجابية وسلبية الواسم MMP-3 بعد المعالجة والوصول أو عدم الوصول للهدأة أصغر من مستوى الدلالة 0.05، مما يدل على وجود علاقة ارتباط حقيقية ذات دلالة إحصائية بين المتغيرين. وتبين أن نسبة الأرجحية بلغت 8.444 وهي ذات دلالة إحصائية وتعني أن احتمالية إيجابية الواسم MMP-3 بعد المعالجة (عدم الوصول للهدأة) تزيد عند عدم وصول المريض للهدأة.

الشكل (4): العلاقة بين مقدار تناقص MMP-3 ومقدار انخفاض عدد المفاصل المتورمة.

فُمنّا بحساب حساسية ونوعية MMP-3 بعد المعالجة في التفريق بين مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي الذين حققوا هدأة، والذين لم يحققوا هدأة باستخدام منحني ROC Curve الذي يظهر حساسية (تحقق عدم الوصول للهدأة عند المرضى الذين لم يحققوا هدأة)، والنوعية (تحقق الوصول للهدأة عند المرضى الذين حققوا هدأة) (شكل 5). وقد تبين أن منحني ROC ذو دلالة معنوية لأن معنوية الاختبار 0.010 أصغر من 0.05، كما أنه متوسط الأهمية لأن قيمة المساحة تحت المنحنى كانت 74.2% ولكن يمكن الأخذ بنتائجه (جدول 9). وتم اختيار قيمة MMP-3 بعد المعالجة (317.8 ng/ml) لأنها تحقق الحساسية والنوعية الأفضل حسب القيم المبينة والمدرجة في الجدول 10. مما يمكن أن نقول إن الأشخاص الذين لديهم قيمة MMP-3 بعد المعالجة تزيد عن 317.8ng/ml لديهم احتمالية أكبر بأن يكونوا غير محققين للهدأة.



الشكل (5): منحني ROC لقيم MMP-3 بعد المعالجة للتنبؤ بالوصول للهدأة.

الجدول (9): المساحة تحت المنحنى حسب الوصول للهدأة

Test Result Variable(s): MMP-3 بعد المعالجة				
Area	Std. Error ^a	Asymptotic	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower	Upper

وجدنا تزايداً في تراكيز MMP-3 المصلية عند التشخيص قبل البدء بالمعالجة بالمقارنة مع مستوياته المصلية بعد المعالجة. ويعود سبب هذا الارتفاع في مستوياته المصلية إلى تأثير السيتوكينات الالتهابية المفعلة بالآلية المرضية والتي تحرض الخلايا الزليلية والعدلات على زيادة التعبير عن MMP-3 (Kotani et al., 2012). وقد يعود سبب الارتفاع أيضاً إلى تأثير خلايا أخرى كالأرومات الليفية، والخلايا الغضروفية التي تؤدي إلى زيادة إفراز MMP-3 في الدم أو السائل الزليلي (Sun et al., 2019). وهذا ما يؤكد دوره في التدخل بالآلية المرضية لالتهاب المفاصل الروماتويدي، ومما يمكن القول أن مستويات MMP-3 المرتفعة قد تعكس الآليات التخريبية في المفاصل، وتدل على إنذار سيئ وذلك في المرحلة المبكرة من المرض مما يمكن من الاستفادة منه كواصم نوعي يفيد في تأكيد تشخيص المرض (Skacelova et al., 2017b). ففي دراسة Kotani وزملائه في اليابان عام 2012 التي تضمنت (N=12) مريض RA، وُجد ارتفاعاً في مستويات MMP-3 قبل البدء بالمعالجة بـ Infliximab وهذا ما يدعم نتائجنا (Kotani et al., 2012)، وأيضاً في دراستي Hattori وزملائه في اليابان عامي 2018 و2019، وقد أثبت فيهما ارتفاع مستويات MMP-3 المصلية لدى مجموعة مرضى RA (Hattori et al., 2019) (Hattori et al., 2018).

أظهرت دراستنا انخفاضاً هاماً في مستويات MMP-3 المصلية لدى مجموعة مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي بعد المعالجة، وذلك حسب نوع العلاج المطبق. فمنهم من عولج بـ MTX أو Leflunomide، أو بمشاركة MMP-3 مع (Sulphasalazine) أو باستخدام أحد الأدوية البيولوجية (Infliximab). ويعزى سبب انخفاض MMP-3 المصلي: إما سمية MTX كمعالجة وحيدة، ودوره في إنقاص عدد الأرومات الليفية التي تؤدي بدورها إلى زيادة إنتاج MMP-3 (Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, Morita, et al., 2016)، أو كنتيجة لتأثير دور Leflunomide الذي يؤثر بشكل

الجدول (11): جدول التقاطع لتوزيع المرضى الواصلين للهدأة والذين لم يصلوا لها حسب إيجابية وسلبية MMP-3 بعد المعالجة وفق أفضل نقطة قطع.

MMP-3 بعد المعالجة (ng/ml)	عدم الوصول للهدأة	الوصول للهدأة	المجموع
Positive (عدم الوصول)	19	3	22
Negative (الوصول للهدأة)	9	12	21
المجموع	28	15	43
Cut-Off: 317.8			
Sensitivity: 67.9%			
Specificity: 80%			
Positive Predictive value (PPV): 86.4%			
Negative Predictive value (NPV): 57.1%			
Chi Square P-value: 0.003			
Odd Ratio (OR) Value & 95% CI & P-value: 8.444, (1.9 to 37.6), P = 0.005.			

المناقشة Discussion:

يعد MMP-3 أحد أنزيمات البروتيازات الهامة التي تتورط في التدرج الغضروفي وتساهم في الآلية المرضية لالتهاب المفاصل الروماتويدي. يتم إفرازه بصورة أساسية من الخلايا الزليلية والأرومات الليفية، والخلايا الغضروفية لدى هؤلاء المرضى (Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, & Morita, 2016; Skacelova et al., 2017a) وقد أشارت الأدبيات إلى أهمية مقايسة مستوياته التي لوحظت لدى 62-80% من مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي (M. M. T. Ally et al., 2013). وبمقايسة مستويات MMP-3 المصلية في دراستنا الحالية عند مجموعة من مرضى RA:

السريرية لدى مرضى RA (Murota, Suzuki, Kassai, Miyazaki, Morita, et al., 2016). وتضمنت دراسة Kotani وزملائه في اليابان عام 2012 (N=12) مريض RA، حيث وجد ارتفاعاً في مستويات MMP-3 المصلية قبل البدء بالمعالجة بـ Infliximab ثم انخفضت تراكيزه المصلية بعد المعالجة بـ Infliximab (Kotani et al., 2012). كما وجدت دراستنا انخفاضاً واضحاً في مستويات MMP-3 بعد المعالجة لدى مجموعة المرضى الذين حققوا الهدأة بالمقارنة مع مجموعة المرضى الذين لم يحققوها. حيث انخفضت مستويات MMP-3 لدى مجموعة المرضى الذين وصلوا للهدأة بشكل أكبر من المجموعة الأخرى. وهذا ما يؤكد أهمية مقايسة مستوياته المصلية في متابعة مرضى RA حيث أن انخفاض مستوياته المصلية عن الحالة البدئية أكدت دوره كواصم نوعي في الآلية المرضية وذلك من خلال التنبؤ والوصول للهدأة السريرية وتحسين الوظيفة الطبيعية لدى هؤلاء المرضى. وهذا ما كان واضحاً في دراسة Rinaudo وزملائه عام 2019 حيث وجد أن الانخفاض في تركيز MMP-3 بعد المعالجة بـ Infliximab كان أعلى لدى مجموعة المرضى الذين حققوا هدأة، بالمقارنة مع مجموعة المرضى غير المحققين للهدأة (Rinaudo-Gaujous et al., 2019). وقد أكدت دراسة Tokai عام 2018 أيضاً في اليابان تناقصاً هاماً في مستويات MMP-3 لدى المرضى الذين وصلوا إلى مرحلة الهدأة (N=20) في دراسته بالمقارنة مع المجموعة الأخرى (N=23) بعد 12 أسبوع من المتابعة (Tokai et al., 2018a). أثبتت دراستنا وجود علاقة ارتباط طردية بين مقدار تناقص مستويات MMP-3 مع مقدار تناقص كل من المتغيرات على التوالي ESR, DAS28 ومع الفرق في عدد المفاصل المتورمة. وهذا ما يثبت دوره MMP-3 في تفاقم الآلية الالتهابية وارتباط مستوياته المصلية مع حالة الالتهاب الزليلي synovitis (Hattori et al., 2018) وبالتالي إمكانية الاستفاد منه كواصم

مباشر على النسيج الزليلي، مما يؤدي إلى انقاص التعبير عن مركبات الالتصاق، وأنزيمات البروتياز المعدنية (MMP-3)، وذلك من خلال آليته المتمثلة في تثبيط أنزيم dihydroorotate dehydrogenase الذي يؤثر بدوره على تصنيع البيريميديونات، وبالتالي يقلل Leflunomide من ارتشاح الخلايا التائية CD4 للنسيج الزليلي، كونها تعد من أكثر الخلايا حساسية لاستنزاف البيريميديونات، مما يحد من الآلية الالتهابية (Litinsky et al., 2006).

ومن جهة أخرى أدت المعالجة التي تعمل على حجب TNF-a مثل (Infliximab) إلى انخفاض مستويات MMP-3 المصلية، وذلك يعزى إلى دور TNF-a الهام في تحرر أنزيمات البروتياز، وفي طبيعتها MMP-3 (Sun et al., 2014). وقد تقترح نتيجة دراستنا المتمثلة في الانخفاض الملحوظ لمستويات MMP-3 إلى إمكانية الاعتماد عليه في تقييم الاستجابة العلاجية الدورية لدى هؤلاء المرضى، وبالتالي يمكن إضافته كواصم هام إلى جانب المعالم المخبرية الغير نوعية (ESR, CRP) والمستخدمه الحالية للتنبؤ بفعالية المعالجة لدى مرضى RA. وقد ظهر انخفاضاً هاماً في مستويات MMP-3 بعد المعالجة في قلة من الدراسات التي أشارت إلى أهميته في متابعة المعالجة، ونذكر منها دراسة Shiozawa في اليابان عام 2016 التي شملت (N=161) مريض، حيث تم متابعتهم لمدة 3 سنوات مع تلقيهم معالجة مفردة بالميتوتريكسات، ووجدت أن (50.4%) من هؤلاء المرضى قد حققوا مرحلة الهدأة السريرية وأظهرت أهمية الاعتماد على مستويات MMP-3 المصلية في التنبؤ بالاستجابة العلاجية بـ MTX كمعالجة مفردة لدى مرضى RA (Shiozawa et al., 2016). وفي دراسة Murota وزملائها في اليابان التي تناولت 28 مريض RA وتلقوا جرعات مفردة من MTX دون مشاركة دوائية، وتبين بعد فترة 12 أسبوع من المعالجة أن تركيز MMP-3 قد انخفض بشكل ملحوظ لدى مجموعة المرضى مما يقترح أن مستويات MMP-3 المعدلة بعد المعالجة قد تلعب دوراً هاماً في الاستجابة

للوصول إلى الهدأة في دراسة Tokai وزملائه عام 2018 في اليابان، حيث كانت الحساسية 81.7% والنوعية 61.4% (Tokai et al., 2018b). ويمكن القول أن تباين هذه النتائج قد يعود إلى اختلاف عدد المرضى وأعمارهم في الأدبيات المذكورة، وعتائد الشركات المستخدمة للمقاييس مع العلم أن طريقة المقاييس اعتمدت على ELIZA في أغلب الدراسات.

الاستنتاج:

ترتفع مستويات MMP-3 المصلية عند مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي المشخصين حديثاً، كما أن انخفاض مستوياته المصلية بعد العلاج يعد مؤشراً هاماً لتقييم الاستجابة العلاجية والوصول للهدأة. ويرتبط مقدار تناقص MMP-3 مع مقدار التغير في فعالية المرض بعد المعالجة.

حيوي جديد novel يرتبط مع فعالية التهاب المفاصل الروماتويدي (Murota et al., 2016).

ويتطبيق منحنى ROC لإيجاد القيمة القاطعة لـ MMP-3 في التمييز بين مجموعتي المرضى من حيث الوصول للهدأة. وجدنا عند القيمة المحددة (317.8 ng/ml) الحساسية 67.9%، والنوعية 80%، وقد تباينت الأدبيات في تقييم الحساسية والنوعية لمستويات MMP-3 للوصول للهدأة. ففي دراسة Hattori وزملائه في اليابان 2017، وجدت أنه عند القيمة 113 ng/ml كانت الحساسية 57.32%، والنوعية 78.57% في تفريق المرضى الذين حققوا الهدأة السريرية (Hattori et al., 2019). وفي دراسة أخرى لـ Hattori وزملائه في اليابان عام 2018 وجد أن الحساسية 47%، والنوعية 83% (Hattori et al., 2018). في حين كانت القيمة القاطعة 76.7 ng/ml

References:

1. Ally, M. M. (2013). **Biomarkers in rheumatoid arthritis - the old and new. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis - the Old and New**, 12(4), 19–22.
2. Ally, M. M. T. M., Hodkinson, B., Meyer, P. W. A., Musenge, E., Tikly, M., & Anderson, R. (2013). **Serum matrix metalloproteinase-3 in comparison with acute phase proteins as a marker of disease activity and radiographic damage in early rheumatoid arthritis.** *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/183653>
3. Aly Motawa, I., Ibrahim Aref, M., Sad Abd El-Latif, S., Ahmed Hassieb, A. E.-S., Mohamed Hafez Shrif, H., & Mohamed Saied Al-Shorbagy, A. (2020). **Osteoprotegerin (Opg) and Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (S-Rankl) in Patients With Rheumatoid Arthritis.** *Al-Azhar Medical Journal*, 49(3), 999–1016. <https://doi.org/10.21608/amj.2020.91624>
4. Cheng, Q., Wu, H., & Du, Y. (2021). The Cheng, Q., Wu, H., & Du, Y. (2021). **The roles of small-molecule inflammatory mediators in rheumatoid arthritis.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(3), 1–10. <https://doi.org/10.1111/sji.12982>roles of small-molecule inflammatory mediators in rheumat. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(3), 1–10. <https://doi.org/10.1111/sji.12982>
5. Corrado, A., Rotondo, C., Mele, A., Cici, D., Maruotti, N., Sanpaolo, E., Colia, R., & Cantatore, F. P. (2021). **Influence of glucocorticoid treatment on trabecular bone score and bone remodeling regulators in early rheumatoid arthritis.** *Arthritis Research and Therapy*, 23(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02562-3>
6. Halabi, H., Alarfaj, A., Alawneh, K., Alballa, S., Alsaied, K., Badsha, H., Benitha, R., Bouajina, E., Al Emadi, S., El Garf, A., El Hadidi, K., Laatar, A., Makhloufi, C. D., Masri, A. F., Menassa, J., Al Shaikh, A., Swailem, R. Al, & Dougados, M. (2015). **Challenges and opportunities in the early diagnosis and optimal management of rheumatoid arthritis in Africa and the Middle East.** *International Journal of Rheumatic Diseases*, 18(3), 268–275. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12320>
7. Hattori, Y., Kida, D., & Kaneko, A. (2019). **Normal serum matrix metalloproteinase-3 levels can be used to predict clinical remission and normal physical function in patients with rheumatoid arthritis.** *Clinical Rheumatology*, 38(1), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3829-9>
8. Hattori, Y., Kojima, T., Kaneko, A., Kida, D., Hirano, Y., Fujibayashi, T., Yabe, Y., Oguchi, T., Kanayama, Y., Miyake, H., Kato, T., Takagi, H., Hayashi, M., Ito, T., Shioura, T., Takahashi, N., Ishikawa, H., Funahashi, K., & Ishiguro, N. (2018). **High rate of improvement in serum matrix metalloproteinase-3 levels at 4 weeks predicts remission at 52 weeks in RA patients treated with adalimumab.** *Modern Rheumatology*, 28(1), 119–125. <https://doi.org/10.1080/14397595.2017.1317320>
9. Karsdal, M. A., Woodworth, T., Henriksen, K., Maksymowych, W. P., Genant, H., Vergnaud, P., Christiansen, C., Schubert, T., Qvist, P., Schett, G., & Platt, A. (2011). **Biochemical markers of ongoing joint damage in rheumatoid arthritis - current and future applications , limitations and opportunities.**
10. Knani, I., Bouzidi, H., Zrour, S., Bergaoui, N., Hammami, M., & Kerkeni, M. (2018). **Methylglyoxal: A relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis.** *Disease Markers*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8735926>
11. Kolarz, B., Ciesla, M., Rosenthal, A. K., Dryglewska, M., & Majdan, M. (2021). **The value of anti-CarP and anti-PAD4 as markers of rheumatoid arthritis in ACPA/RF negative rheumatoid arthritis patients.** *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1177/1759720X21989868>
12. Kolarz, B., Podgorska, D., & Podgorski, R. (2021). **Insights of rheumatoid arthritis biomarkers.** *Biomarkers*, 26(3), 185–195. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1794043>

13. Laborde, C. M., Castro-Santos, P., & Díaz-Peña, R. (2020). **Contribution of multiplex immunoassays to rheumatoid arthritis management: From biomarker discovery to personalized medicine.** *Journal of Personalized Medicine*, 10(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/jpm10040202>
14. Lerner, A., Neidhöfer, S., Reuter, S., & Matthias, T. (2018). **MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis.** *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 32(4), 550–562. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.01.006>
15. Mun, S., Lee, J., Lim, M. K., Lee, Y. R., Ihm, C., Lee, S. H., & Kang, H. G. (2018). **Development of a Novel Diagnostic Biomarker Set for Rheumatoid Arthritis Using a Proteomics Approach.** *BioMed Research International*, 2018(Das 28). <https://doi.org/10.1155/2018/7490723>
16. Murota, A., Suzuki, K., Kassai, Y., Miyazaki, T., & Morita, R. (2016). **Cytokine Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis.** *Cytokine*, 78, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.12.002>
17. Murota, A., Suzuki, K., Kassai, Y., Miyazaki, T., Morita, R., Kondo, Y., Takeshita, M., Niki, Y., Yoshimura, A., & Takeuchi, T. (2016). **Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis.** *Cytokine*, 78, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.12.002>
18. Pathology, C., & Shams, A. (2020). **Serum and synovial matrix metalloproteinases 1 and 3 in patients with early rheumatoid arthritis: potentially prospective biomarkers of ultrasonographic joint damage and disease activity.** *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, 31(4), 965–971. https://doi.org/10.4103/ejim.ejim_163_19
19. Skacelova, M., Hermanova, Z., Horak, P., Kazi, A., & Langova, K. (2017a). **Higher levels of matrix metalloproteinase-3 in patients with RA reflect disease activity and structural damage.** *161(3)*, 296–302.
20. Skacelova, M., Hermanova, Z., Horak, P., Kazi, A., & Langova, K. (2017b). **Higher levels of matrix metalloproteinase-3 in patients with RA reflect disease activity and structural damage.** *Biomedical Papers*, 161(3), 296–302. <https://doi.org/10.5507/bp.2017.015>
21. Sun, S., Bay-Jensen, A. C., Karsdal, M. A., Siebuhr, A. S., Zheng, Q., Maksymowych, W. P., Christiansen, T. G., & Henriksen, K. (2014). **The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases.** *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-93>
22. Tokai, N., Yoshida, S., Kotani, T., Yoshikawa, A., Kimura, Y., Fujiki, Y., Matsumura, Y., Takeuchi, T., Makino, S., & Arawaka, S. (2018a). **Serum matrix metalloproteinase 3 levels are associated with an effect of iguratimod as add-on therapy to biological DMARDs in patients with rheumatoid arthritis.** *PLoS ONE*, 13(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202601>
23. Tokai, N., Yoshida, S., Kotani, T., Yoshikawa, A., Kimura, Y., Fujiki, Y., Matsumura, Y., Takeuchi, T., Makino, S., & Arawaka, S. (2018b). **Serum matrix metalloproteinase 3 levels are associated with an effect of iguratimod as add-on therapy to biological DMARDs in patients with rheumatoid arthritis.** *PLoS ONE*, 13(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202601>

