

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОГО АМИЛОИДОЗА ПОЧЕК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Ключевые слова:

ревматоидный артрит,
амилоидоз, сывороточный
амилоид А, ген SAA1,
полиморфизм.

Резюме. Разработка современных эффективных средств базисной терапии системных заболеваний соединительной ткани привела к увеличению продолжительности жизни этих пациентов, что вывело на первый план лечение осложнений данных заболеваний. В связи с этим необходимо изучать патогенез не только суставных, но и внесуставных поражений, в том числе поражения почек. Определение связи генотипа с риском развития амилоидоза у пациентов с ревматоидным артритом (РА) в Республике Беларусь ранее не проводилось.

Цель данного исследования — выявление связи аллельного полиморфизма гена SAA1 в группе пациентов с РА, осложненным амилоидозом почек, а также пациентов с РА без данного осложнения. Все участники исследования являются жителями Беларуси. Из лейкоцитов цельной крови 26 пациентов с РА, осложненным амилоидозом почек, и 44 пациентов с РА без наличия этого осложнения выделялась нативная ДНК с последующим генотипированием на носительство генотипов риска гена SAA1 по двум полиморфным сайтам: 2995С/Т и 3010С/Т.

Определены генотипы пациентов по двум полиморфным локусам гена SAA. Значение χ^2 при сравнении этих выборок по генотипу α/α составило $\chi^2=25,83$; $p=0,01$. При вычислении показателя «отношение шансов» по числу носителей генотипа α/α получено значение 48,3 ($p<0,001$). Таким образом, относительный риск развития амилоидоза на фоне РА статистически значимо возрастает у лиц с генотипом α/α по сравнению с больными РА.

Вторичный амилоидоз, или АА (Acquired Amyloidosis) амилоидоз, развивается на фоне хронических воспалительных процессов, в первую очередь — ревматоидного артрита (РА), и хронических инфекций. Ранее основными причинами данного заболевания являлись длительно текущие инфекционные заболевания (остеомиелит, туберкулез, хронические нагноительные заболевания легких и т.д.), в настоящее время по данным литературы лидирующее место (до 60%) занимает РА (Gertz M.A., Kyle R.A., 1991; Toyoshima H., Kusaba T. et al., 1993; Hazenberg B.P.C., van Rijswijk M.H., 1994). Следует отметить, что разработка эффективных средств базисной терапии РА приведет к снижению частоты развития вторичного амилоидоза. Существенные различия имеются также при анализе клинических и патологоанатомических данных, что объясняется латентностью течения амилоидоза и не всегда правильной оценкой клинических проявлений. Н. Kobayashi и соавторы (1996) установили, что при проведении биопсии слизистой оболочки прямой кишки амилоидоз выявляется у 13,3% пациентов с РА, в то время как клинические проявления отмечаются только у 4,4% пациентов. По оценкам различных авторов, амилоидоз развивается у 10–15% пациентов с РА (Okuda Y. et al., 1994), хотя иногда указывается более широкий диапазон — 5–20% (Misra R. et al., 2004; Sihvonen S. et al., 2004).

При анализе различных факторов риска развития вторичного амилоидоза особое внимание уделяется особенностями генотипа.

Белок-предшественник амилоидного протеина А (Serum Amyloid A — SAA) относится к острофазовым белкам и по своим свойствам близок к С-реактивному белку (СРБ). SAA продуцируется печенью в ответ на воспаление, при этом его концентрация в крови многократно повышается (Betts J.C. et al., 1991; Yamada T., 1999). В то же время считается, что SAA является более чувствительным белком острой фазы воспаления, чем СРБ (Maury C.P., Wegelius O., 1985; Steel D.M., Whitehead A.S., 1994; Malle E., deBeer F.C., 1996). SAA состоит из 104 аминокислот (Dwulet F.E. et al., 1988), а в циркулирующей крови SAA находится в связи с липопротеинами высокой плотности. Амилоид А образуется из SAA путем протеолиза и представляет собой N-конец SAA, состоящий из 76 аминокислот (Beach C.M. et al., 1992; Husby G. et al., 1994). Физиологическая роль SAA до конца не установлена. Некоторые авторы предполагают, что SAA участвует в метаболизме холестерина (Steinmetz A. et al., 1989; Kisilevsky R., 1991) или оказывает иммуносупрессивное действие на тромбоциты и нейтрофильные гранулоциты (Zimlichman S. et al., 1990). Патологическая роль изучена достаточно хорошо — SAA является компонентом амилоидных от-

ложений (Cunnane G., Whitehead A.S., 1999; Urieli-Shoval S. et al., 2000).

В гене *SAA1* описан ряд полиморфизмов, однако особое внимание исследователей приковано к двум однонуклеотидным заменам в третьем экзоне этого гена — 2995С/Т и 3010С/Т. Комбинации аллелей этих полиморфных вариантов определяют три *SAA1* гаплотипа — α , β и γ . В исследованиях S. Vaba и соавторов (1995) впервые выявлена ассоциация гаплотипа γ с риском развития амилоидоза в азиатской популяции. В работе были определены генотипы по локусу *SAA1* в группе пациентов с амилоидозом и выборке здоровых субъектов. Выявлено, что частота генотипа γ/γ , как и самого гаплотипа γ , достоверно выше у больных амилоидозом по сравнению с контрольной группой.

Группа японских исследователей также выявила ассоциацию генотипа γ/γ с риском развития амилоидоза: частота γ/γ была достоверно выше в группе лиц с амилоидозом по сравнению с субъектами,отягощенными ранним РА. Статистически значимой разницы по генотипу γ/γ между группами РА и здоровых людей не выявлено (Moriguchi M. et al., 1999). Показано, что японские пациенты с РА, являющиеся носителями генотипа γ/γ , имеют высокий риск развития у них амилоидоза по сравнению с пациентами, не несущими в своем генотипе γ -аллеля. Следовательно, генотип γ/γ является генетическим фактором риска развития амилоидоза, но не РА. Кроме того, выявлена особая закономерность — продолжительность РА у больного до установления дополнительного диагноза «амилоидоз» уменьшается с увеличением количества γ -аллелей по гену *SAA1*. Таким образом, у носителей гаплотипа γ амилоидоз манифестирует вскоре после РА (Moriguchi M. et al., 1999).

Исследования японских генетиков указывают на повышенный риск развития амилоидоза при генотипе *SAA1*.3/1.3, то есть *SAA1* γ/γ (Yamada T. et al., 2003). Наличие аллеля *SAA1* γ не влияет на уровень скорости оседания эритроцитов, однако связано с повышением уровня *SAA* и СРБ, а также отношением *SAA*/СРБ. Кроме того, генотип *SAA1* γ/γ является не только фактором риска развития амилоидоза, но и плохим прогностическим фактором. В Японии около 10% пациентов с РА являются гомозиготами по *SAA1*.3 (*SAA1* γ/γ), в то время как гетерозиготы составляют около 20%. Описанный недавно однонуклеотидный полиморфизм в 5'-фланкирующей области гена *SAA1* — -13Т/С — продемонстрировал положительную ассоциацию с развитием АА-амилоидоза у больных РА как у японских, так и у некоторых групп европейских пациентов (Nakamura T. et al., 2006). Фактором риска в случае данного полиморфизма считают носительство аллеля -13Т. В работе T. Yamada и соавторов (2003) доля этого аллеля у японцев с РА с и без амилоидоза, составила 70,8 и 52,1% соответственно; у американцев (европейского происхождения) — 53,6% (группа РА) и 19,6% (группа РА + амилоидоз). Некоторые исследователи предполагают, что именно -13Т является основополагающим генетическим фак-

тором развития амилоидоза у человека, а разница в выявляемости АА-амилоидоза в разных этнических группах является как следствием различий в частотах -13Т аллеля, так и, отчасти, гаплотипов по полиморфизмам 2995С/Т и 3010С/Т (Booth D.R. et al., 1998). Однако данное предположение, несомненно, требует проверки на различных этнических группах пациентов.

Определение связи генотипа с риском развития амилоидоза у пациентов с РА в Республике Беларусь ранее не проводилось. Цель данного исследования — выявление связи аллельного полиморфизма гена *SAA1* в группе пациентов с РА, осложненным амилоидозом почек, а также пациентов с РА без данного осложнения. Все пациенты являются жителями Беларуси.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ

Из лейкоцитов цельной крови 26 пациентов с РА, осложненным амилоидозом почек, и 44 пациентов с РА без наличия этого осложнения выделялась нативная ДНК. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом проведено генотипирование на носительство генотипов риска гена *SAA1* по двум полиморфным сайтам: 2995С/Т и 3010С/Т. Отбор пациентов и взятие образцов крови осуществляли на базе отделения ревматологии Учреждения здравоохранения «9-я Городская клиническая больница г. Минска». Общий объем выборки составил 70 человек.

У добровольцев после разъяснения целей исследования в случае получения их добровольного согласия проводили забор крови из локтевой вены (3–5 мл) в стерильную пробирку с антикоагулянтом (раствор 0,5М ЭДТА) или нескольких капель крови из пальца на целлюлозный носитель. Все пробы в тот же день доставляли в лабораторию Института генетики и цитологии НАН Беларуси для последующего ДНК-анализа.

Выделение и очистка ДНК

После взятия венозной крови в тот же день осаждали фракцию лейкоцитов, предварительно лизировав эритроциты с помощью буфера, содержащего неионогенный детергент тритон X-100. Полученную фракцию лейкоцитов промывали и еще раз осаждали в том же буфере (сахароза, трис-НСI, MgCl₂, тритон X-100). Лейкоциты лизировали с помощью другого детергента — додецилсульфата натрия; депротеинизацию ДНК лейкоцитов осуществляли с помощью протеиназы К (в течение 16 ч), после чего очистку ДНК проводили последовательно фенолом, смесью фенол: хлороформ (1:1), смесью хлороформ: изоамиловый спирт (24:1). ДНК осаждали добавлением к водному раствору 10% объема 5 М ацетата аммония и двойного объема 96% этанола, охлажденного до -20 °С. Через 5–15 ч осадок ДНК для удаления ацетата аммония промывали последовательно 70; 80 и 96% спиртом, высушивали на воздухе и растворяли в стерильной деионизованной воде. Выделенные образцы ДНК хранятся в замороженном состоянии при -20 °С.

Для определения аллельных вариантов гена *SAA1* по каждому из трех полиморфных локусов использовали метод ПЦР со специфическими праймерами. ПЦР проводили на амплификаторе «MyCycler™ Thermal cycler» (BIORAD). Полиморфный участок генов амплифицировали в 15 мкл реакционной среды, содержащей 10–20 нг геномной ДНК, 2 мкл буфера для амплификации. Состав буфера: 750 ммоль трис-НСl рН 8,8, 200 ммоль (NH₄)₂SO₄, 0,1% тритон X-100, 10 ммоль/л тартазин и 5% фicol 400, 1,5% ммоль MgCl₂, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ), 2,5 единицы ДНК-полимеразы Taq (НПО «Fermentas», Вильнюс), по 0,3 мкмоль каждого праймера. Последовательности использованных праймеров представлены в табл. 1.

Таблица 1

Последовательности праймеров к полиморфным участкам гена <i>SAA1</i>		
Полиморфизм	Прямой праймер, 5'–3'	Обратный праймер, 5'–3'
2995 С/Т, 3010 С/Т	Gcc aat tac atc ggc ctc ag	Tgg cca aag aat ctc tgg at

Определение полиморфных аллелей 2995 С/Т и 3010 С/Т гена *SAA1*

Амплификацию фрагмента гена *SAA1* с полиморфными локусами 2995С/Т и 3010С/Т проводили по следующей программе: инкубация геномной ДНК при 95 °С в течение 5 мин; 35 циклов, включающих денатурацию при 95 °С в течение 1 мин, отжиг праймеров — 62 °С — 1 мин и синтез 72 °С — 1 мин; 1 раунд досинтеза 72 °С — 7 мин. Последовательности используемых праймеров см. в табл. 1.

Продукт амплификации участка длиной в 518 пар нуклеотидов (пн) подвергали обработке эндонуклеазой *BanI* для идентификации однонуклеотидной замены С/Т в положении 2995 или *BclI* в положении 3010. Манипуляции проводили для определения каждого полиморфизма по отдельности. Рестрикцию выполняли согласно инструкции фирмы-производителя «MBI Fermentas». ДНК в количестве 2–5 мкг инкубировали в реакционной смеси при температуре 37 °С в течение 5–12 ч.

Схематическое изображение анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов ((ПДРФ)-анализа) полиморфного локуса 2995С/Т гена *SAA1* — рис. 1. Основными фрагментами для генотипирования являются 72; 244 и 316 пн. Все возможные комбинации длины рестриционных фрагментов после обработки рестриктазой *BanI* и их соответствие генотипам представлены в табл. 2.

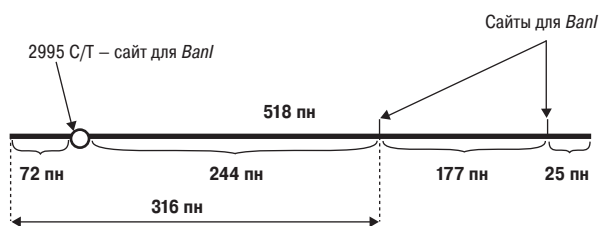


Рис. 1. Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного участка 2995С/Т гена *SAA1*

Таблица 2

Полиморфизм гена <i>SAA1</i> по точечной замене 2995С/Т	
Длина фрагментов, пн	Генотип
244+177+72+25	СС
316+244+177+72+25	СТ
316+177+25	ТТ

В случае однонуклеотидной замены в положении 3010 гена *SAA1* рестриктаза *BclI* разрезает амплифицированный фрагмент (518 пн) на 427 и 91 пн. Возможные варианты длины рестриционных фрагментов после обработки рестриктазой и их соответствие генотипам представлены в табл. 3.

Таблица 3

Полиморфизм гена <i>SAA1</i> по точечной замене 3010С/Т	
Длина фрагментов, пн	Генотип
518	СС
518+427+91	СТ
427+91	ТТ

Детекцию результатов электрофоретического разделения фрагментов осуществляли в 2% агарозном геле в ультрафиолетовом свете с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat (Франция), результаты фиксировали на цифровую камеру Nikon 2100 (рис. 2).

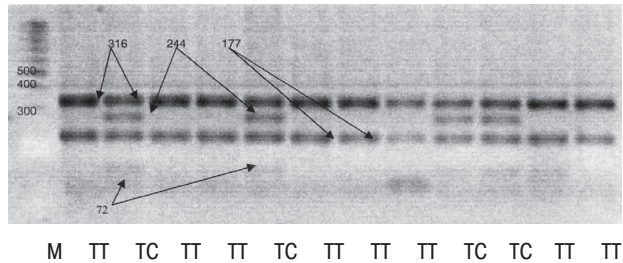


Рис. 2. Электрофореграмма *BanI* фрагментов 2995С/Т локуса. Указаны размеры фрагментов рестрикции, слева – маркер длины 1,5+100 пн, снизу – генотипы

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определены генотипы пациентов по двум полиморфным локусам гена *SAA1* (табл. 4).

Таблица 4

Результаты генотипирования по полиморфным локусам 2995С/Т и 3010С/Т гена <i>SAA1</i>		Количество пациентов, n (%)	Достоверность различий между группами		
Генотип	Амилоидоз			РА	
2995С/Т	3010 С/Т	α, β, γ	26	44	–
ТТ	СС	α/α	25 (96,2)	15 (34,1)	p<0,05
ТС	СТ	α/β	1 (3,8)	15 (34,1)	p<0,05
ТС	СС	α/γ	0 (0,0)	6 (13,6)	–
СС	ТТ	β/β	0 (0,0)	5 (11,4)	–
СС	ТС	β/γ	0 (0,0)	3 (6,8)	–
СС	СС	γ/γ	0 (0,0)	0 (0,0)	–
		α	51 (98,1)	51 (58,0)	p<0,05
		β	1 (1,9)	28 (31,8)	
		γ	0 (0,0)	9 (10,2)	

Сравнение опытных групп проводили методом χ² по значениям частот генотипов, а также по частотам трех аллелей. Выявлены статистически достоверные различия между выборкой больных РА и группой, отягощенной амилоидозом. Наибольшее значение χ² получено при сравнении этих выборок по генотипу α/α — χ²=25,83; p=0,01. Среди

лиц с осложнением РА в виде амилоидоза почек носителями генотипа α/α являются 25 из 26, в то время как среди больных РА этот генотип отмечают в 34,1% случаев. Подобная тенденция наблюдается и по частоте аллеля α в данных группах, разница между ними статистически достоверна.

При вычислении показателя «отношение шансов» (ОШ) по числу носителей генотипа α/α получено значение 48,3 ($p < 0,001$). Таким образом, относительный риск развития амилоидоза на фоне РА статистически значимо возрастает у лиц с генотипом α/α по сравнению с больными РА. Результаты статистического анализа свидетельствуют в пользу того, что генотип α/α является генетическим фактором риска развития амилоидоза как осложнения РА в белорусской популяции.

В отличие от данных, полученных японскими исследователями, результаты наших исследований показывают, что у жителей Беларуси (европейская популяция) наибольшей амилоидогенностью обладает изотип SAA11 α/α . Частота аллелей гена *SAA1* у представителей разных этнических групп может значительно отличаться. Так, в работе D.J. Faulkers и соавторов (1994) при анализе небольшой выборки здоровых европейцев (21 человек) не выявлено ни одного носителя аллеля γ ; частоты аллелей α и β распределились как 62 и 38% соответственно (Faulkers D.J. et al., 1994). Сравнение результатов исследований азиатских и европейских популяций по частотам аллелей гена *SAA1* показывает, что у японцев аллель γ отмечается гораздо чаще и составляет примерно 37%. Носительство этого аллеля, а особенно в гомозиготном состоянии, является достоверным фактором риска к АА-амилоидозу у взрослых пациентов — японцев, болеющих РА (Yamada T. et al., 2003; Nakamura T. et al., 2006). В противоположность этим данным, D.R. Booth и соавторы (1998) определили частоту выявляемости аллеля γ в европейской популяции, которая составила лишь 5,3%. Среди 41 пациента — европейца с ювенильным хроническим артритом и АА-амилоидозом — частота аллельного варианта α , и особенно гомозигот α/α , была достоверно выше — 90,2% (аллельный вариант α) и 80,5% (генотип α/α) — по сравнению со здоровой выборкой (75,8 и 57,9% соответственно) и с группой больных ювенильным хроническим артритом, но без амилоидоза (8 человек, 56,3 и 12,5% соответственно) (Booth D.R. et al., 1998).

Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что разные изоформы белка SAA1, а именно α и γ , являются генетическими факторами риска развития амилоидоза в разных этнических группах: у японцев — SAA γ , в исследованных немногочисленных европейских популяциях, в том числе и белорусской — SAA α .

ВЫВОДЫ

1. Определен генетический полиморфизм гена *SAA1* у белорусских пациентов со вторичным амилоидозом, развившемся на фоне РА,

а также у пациентов с РА без амилоидоза. Показано, что генотип *SAA1* α/α является доминирующим в обеих группах, составляя 96,2% в 1-й и 34,1% — во 2-й группе.

2. По результатам анализа, генотип *SAA1* α/α (аллельные варианты 2995T и 3010C) является генетическим фактором риска развития амилоидоза как осложнения РА у белорусских пациентов, болеющих РА.

3. Впервые проведенное определение полиморфизма гена *SAA1* и выявление у белорусских пациентов с РА аллелей риска формирования вторичного амилоидоза позволит оптимизировать профилактику данного фатального заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- Baba S., Masago S.A., Takahashi T. et al. (1995) A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 γ : genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis. *Hum. Mol. Genet.*, 4: 1083–1087.
- Beach C.M., de Beer M.C., Sipe J.D. et al. (1992) Human serum amyloid A protein: complete amino acid sequence of a new variant. *Biochem. J.*, 282: 615–612.
- Betts J.C., Edbrooke M.R., Thakker R.V. et al. (1991). The human acute-phase serum amyloid A gene family: structure, evolution, and expression in hepatoma cells. *Scand. J. Immunol.*, 34: 471–482.
- Booth D.R., Booth S.E., Gillmore J.D. (1998) SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis. *Amyloid.*, 5: 262–265.
- Cunnane G., Whitehead A.S. (1999) Amyloid precursors and amyloidosis in rheumatoid arthritis. *Bailliere's Clin. Rheumatol.*, 13: 615–628.
- Dwulet F.E., Wallace D.K., Benson M.D. (1988) Amino acid structures of multiple forms of amyloid-related serum protein SAA from a single individual. *Biochemistry*, 27: 1677–1682.
- Faulkers D.J., Betts J.C., Woo P. (1994) Characterization of five human serum amyloid A1 alleles. *Amyloid. Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 1: 255–262.
- Gertz M.A., Kyle R.A. (1991) Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients. *Medicine (Baltimore)* 70: 246–256.
- Hazenbergh B.P.C., van Rijswijk M.H. (1994) Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis. *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 8: 661–690.
- Husby G., Marhaug G., Dowton B. et al. (1994). Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid*, 1: 119–137.
- Kisilevsky R. (1991) Serum amyloid A (SAA), a protein without a function: some suggestions with reference to cholesterol metabolism. *Med. Hypotheses*, 35: 337–341.
- Kobayashi H., Tada S., Fuchigami T. et al. (1996) Amyloidosis in rheumatoid arthritis: diagnostic and prognostic value of gastroduodenal biopsy. *Br. J. Rheumatol.*, 35: 44–49.
- Malle E., de Beer F.C. (1996) Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur. J. Clin. Invest.*, 26: 427–435.
- Maury C.P., Wegelius O. (1985) Clinical value of serum amyloid A and C-reactive protein measurements in secondary amyloidosis. *Int. J. Tissue React.*, 7: 405–407.
- Misra R., Wakhlu A., Krishnani N. et al. (2004) Prevalence of silent amyloidosis in rheumatoid arthritis and its clinical significance. *J. Rheumatol.*, 31: 1013–1014.
- Moriguchi M., Terai C., Koseki Y. et al. (1999) Influence of genotype at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum. Genet.*, 105: 360–366.
- Nakamura T., Higashi S., Tomoda K. et al. (2006) Significance of SAA 1.3 allele genotype in Japanese patients with amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 45: 43–49.
- Okuda Y., Takasugi K., Oyama T. et al. (1994) Amyloidosis

in rheumatoid arthritis: clinical study of 124 histologically proven cases. *Ryumachi*, 34: 939–946.

Sihvonen S., Korpela M., Mustonen J. et al. (2004) Renal disease as a predictor of increased mortality among patients with rheumatoid arthritis. *Nephron. Clin. Pract.*, 96: c107–114.

Steel D.M., Whitehead A.S. (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today*, 15: 81–88.

Steinmetz A., Hocke G., Salle R. et al. (1989) Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1006: 173–178.

Toyoshima H., Kusaba T., Yamaguchi M. (1993) Cause of death in autopsied RA patients. *Ryumachi*, 33: 209–214.

Urieli-Shoval S., Reinhold L., Yaacov M. (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.*, 7: 64–69.

Yamada T., Okuda Y., Takasugi K. et al. (2003) An allele of serum amyloid A1 associated with amyloidosis in both Japanese and Caucasians. *Amyloid*, 10: 7–11.

Yamada T. (1999) Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37: 381–388.

Zimlichman S., Danon A., Nathan I. et al. (1990) Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J. Lab. Clin. Med.*, 116: 180–186.

ГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ВТОРИННОГО АМІЛОЇДОЗУ НИРОК ПРИ РЕВМАТОЇДНОМУ АРТРИТІ

А.К. Чиж

Резюме. Розробка сучасних ефективних засобів базисної терапії системних хвороб сполучної тканини зумовила збільшення тривалості життя цих пацієнтів, що висунуло на перший план лікування ускладнень цих захворювань. У зв'язку з цим необхідно вивчати патогенез не лише суглобових, але й позасуглобових уражень, у тому числі ураження нирок. Визначення зв'язку генотипу з ризиком розвитку амілоїдозу у пацієнтів з ревматоїдним артритом (РА) у Республіці Білорусь раніше не проводилося.

Мета цього дослідження — виявлення зв'язку алельного поліморфізму гена SAA1 у групі пацієнтів з РА, ускладненим амілоїдозом нирок, а також пацієнтів з РА без цього ускладнення. Всі учасники дослідження — мешканці Білорусі. Із лейкоцитів цільної крові 26 пацієнтів із РА, ускладненим амілоїдозом нирок і 44 пацієнтів із РА без наявності цього ускладнення виділялась нативна ДНК з подальшим генотипуванням на носійство генотипів ризику гена SAA1 за двома поліморфними сайтами: 2995C/T та 3010C/T. Визначено генотипи пацієнтів за двома поліморфними локусами гена SAA. Значення χ^2 при порівнянні цих вибірок за генотипом α/α становило $\chi^2=25,83$; $p=0,01$. При підрахунку показника «відношення шансів» за кількістю носіїв генотипу α/α отримано значення 48,3

($p<0,001$). Таким чином, відносний ризик розвитку амілоїдозу на фоні РА статистично достовірно зростає у осіб із генотипом α/α порівняно із хворими на РА.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, амілоїдоз, сироватковий амілоїд А, ген SAA1, поліморфізм.

GENETIC RISK FACTORS OF KIDNEY SECONDARY AMYLOIDOSIS DEVELOPMENT IN RHEUMATOID ARTHRITIS

A.K. Chyzh

Summary. Secondary (AA) amyloidosis in rheumatoid arthritis (RA) is considered to be extensively determined by genotype characteristics. In the present study we compared the influence of the SAA1 gene allele polymorphism in AA-positive RA patients with those in AA-negative RA. All patients are Belarusian citizens. Native DNA was extracted from leucocytes of blood samples obtained from 21 AA-positive RA patients (1st group) and 27 AA-negative RA patients (2nd group). To amplify a segment of the SAA1 gene including the polymorphic sites -13T/C, 2995C/T and 3010C/T it was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) with subsequent restriction enzyme digest analysis. Statistical analyses of genotype and allele frequency comparisons of the various single nucleotide polymorphisms between groups were performed using the chi-square test. Genetic polymorphism of the SAA1 gene in Belarusian AA-positive RA patients (1st group) and AA-negative RA patients (2nd group) was determined. An odds-ratio (OR) calculated for the α/α genotype was 48.3, and the 95% confidence interval was — 95%CI, $p<0,001$. Therefore, according to obtained data SAA1 α/α (allele variants 2995T and 3010C) are the genetic risk factor for the development of secondary amyloidosis in Belarusian patients with rheumatoid arthritis. Conclusion. In contrast to Japanese data, our results revealed that in Belarusian citizens (Caucasians) SAA1 α/α isotype was the most amyloidogenic. Relative risk of secondary amyloidosis in RA patients significantly increases in α/α genotype.

Key words: rheumatoid arthritis, amyloidosis, serum amyloid A, SAA1 gene, polymorphism.

Адрес для переписки:

Чиж Анастасія Константиновна
220082, Республіка Білорусь, Минск,
ул. Д. Сердича, 11, к. 9