

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОГО АМИЛОИДОЗА ПОЧЕК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ**

Н.Ф.Сорока, Л.Н.Сивицкая, А.К.Чиж, Н.Г.Даниленко

*Белорусский государственный медицинский университет  
ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси*

Амилоидоз — термин, объединяющий группу заболеваний, которые отличаются большим разнообразием клинических проявлений и характеризуются внеклеточным отложением нерастворимых патологических фибриллярных белков в органах и тканях. Две наиболее часто встречающиеся формы системного амилоидоза - это AL амилоидоз (первичный амилоидоз, или амилоидоз легких цепей), и вторичный, или реактивный (AA) амилоидоз [1]. Вторичный амилоидоз, или AA амилоидоз, является достаточно редким, но серьёзным осложнением хронических воспалительных процессов и хронических инфекций.

Предшественниками AA амилоида являются сывороточные острофазовые белки,  $\alpha$ -глобулины, продуцируемые клетками разных типов, в основном нейтрофилами и фибробластами. До разработки эффективных антибактериальных и противотуберкулёзных препаратов основной причиной развития AA амилоидоза являлись инфекционные заболевания (остеомиелит, туберкулёз, хронические нагноительные заболевания лёгких и т.д.). В настоящее время по частоте встречаемости амилоидоза на первое место вышли системные заболевания соединительной ткани, в первую очередь ревматоидный артрит (РА) (до 60% всех случаев вторичного амилоидоза) [2, 3, 4]. Ранее AA амилоидоз возникал почти у каждого третьего пациента с ревматоидным артритом. Можно предполагать, что если бы ревматоидный артрит так же хорошо поддавался лечению, как сегодня туберкулёз или остеомиелит, то доля осложнения РА амилоидозом также заметно уменьшилась бы.

К сожалению, клинические и патологоанатомические данные по частоте амилоидоза при РА существенно различаются, что объясняют длительным латентным течением амилоидоза и не всегда правильной оценкой клинических проявлений. Kobayashi и соавт. [5] установили, что при проведении биопсии слизистой прямой кишки амилоидоз выявляется у 13,3% пациентов с РА, в то время как клинические проявления отмечаются только у 4,4% пациентов. По оценкам разных авторов амилоидоз развивается

у 10-15% пациентов с РА [6], Правда, в некоторых публикациях указывается и более широкий диапазон значений - от 5 до 20% [7, 8].

До настоящего времени точная причина развития амилоидоза при ревматоидном артрите остается неизвестной [9, 10]. Было выдвинуто предположение, что развитие вторичного амилоидоза в значительной степени обусловлено особенностями генотипа.

Белок-предшественник амилоидного протеина А (Serum Amyloid A – SAA) – острофазовый белок, близкий по своим свойствам к С-реактивному белку и продуцируемый печенью в ответ на воспаление, при котором его концентрация в крови многократно повышается [11, 12]. Считается, что SAA является более чувствительным белком острой фазы воспаления, чем СРБ [13, 14, 15]. SAA состоит из 104 аминокислот [16], а в циркулирующей крови SAA находится в связи с липопротеинами высокой плотности. Амилоид А образуется из SAA путём протеолиза и представляет собой N-конец SAA, состоящий из 76 аминокислот [17, 18]. Физиологическая роль SAA до конца не установлена [19]. Патологическая же роль изучена достаточно хорошо – SAA является компонентом амилоидных отложений [20, 21].

На индукцию генов SAA, а, следовательно, на повышение синтеза SAA, оказывают влияние провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-1, интерлейкин-6,  $\alpha$ -фактор некроза опухоли ( $\alpha$ -ФНО) и некоторые другие. В норме уровень SAA составляет  $\leq 10$  мкг/мл. При воспалении уровень SAA 1 может повышаться в 1000 раз. Взаимосвязь степени повышения уровня циркулирующего SAA и риском развития АА амилоидоза в настоящее время является спорным вопросом. Считается, что развитие АА амилоидоза при РА замедляется, если концентрация SAA находится в пределах нормы, при этом оптимальным считается значение  $SAA \leq 3$  мкг/мл [22]. Гены SAA-белков объединены в единый кластер и находятся на коротком плече хромосомы 11 (11p15.1). Кроме SAA1 и SAA2, в этот кластер входит псевдоген SAA3 и ген SAA4 [23]. Последний экспрессируется конститутивно и поддерживает фоновый уровень сывороточного амилоида А. 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 –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , (или по альтернативной классификации, соответственно *SAA1.1*, *SAA1.2* и *SAA1.3*). В 1995 году в исследованиях Baba et al. [24] впервые была выявлена ассоциация гаплотипа  $\gamma$  с риском развития амилоидоза у коренного населения Азии. В работе были определены генотипы по локусу *SAA1* в группе пациентов, страдающих амилоидозом, и выборке здоровых субъектов. Выявлено, что частота генотипа  $\gamma/\gamma$ , как и

самого гаплотипа  $\gamma$ , достоверно выше у больных амилоидозом по сравнению с контрольной группой.

Группа японских исследователей также выявила ассоциацию генотипа  $\gamma/\gamma$  с риском развития амилоидоза: частота  $\gamma/\gamma$  была достоверно выше в группе лиц, страдающих амилоидозом, по сравнению с субъектами,отягощенными ранним ревматоидным артритом. Статистически значимой разницы по генотипу  $\gamma/\gamma$  между группами РА и здоровых людей не выявлено [25]. Показано, что японские пациенты с ревматоидным артритом и являющиеся носителями генотипа  $\gamma/\gamma$ , имеют высокий риск развития у них амилоидоза по сравнению с пациентами, не несущими в своем генотипе  $\gamma$ -аллеля. Следовательно, генотип  $\gamma/\gamma$  является генетическим фактором риска развития амилоидоза, но не РА. Кроме того, выявлена особая закономерность – продолжительность РА у больного до постановки дополнительного диагноза «амилоидоз» уменьшается с увеличением числа  $\gamma$ -аллелей по гену *SAA1*. Таким образом, у носителей гаплотипа  $\gamma$  амилоидоз манифестирует вскоре после РА [25].

Исследования японских генетиков указывают на повышенный риск развития амилоидоза при генотипе *SAA1.3/1.3*, то есть *SAA1\gamma/\gamma* [26]. Наличие аллеля *SAA1\gamma* не влияет на уровень СОЭ, однако связано с повышением уровня SAA и СРБ, а также отношение SAA/СРБ. Кроме того, генотип *SAA1 \gamma/\gamma* 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\gamma/\gamma)*, в то время как гетерозиготы составляют около 20%. Описанный недавно однонуклеотидный полиморфизм в 5'-фланкирующей области гена *SAA1* – -13T/C – продемонстрировал положительную ассоциацию с развитием АА-амилоидоза у больных РА как у японских, так и у некоторых групп европейских пациентов [27]. Фактором риска в случае данного полиморфизма считают носительство аллеля -13T. В работе Yamada с соавторами доля этого аллеля у японцев, страдающих 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 аллель -13T является основополагающим генетическим фактором развития амилоидоза у человека, а разница во встречаемости АА-амилоидоза в разных этнических группах является как следствием различий в частотах -13T аллеля, так и, отчасти, гаплотипов по полиморфизмам 2995C/T и 3010C/T [27]. Однако, данное предположение, несомненно, требует проверки на различных этнических группах пациентов.

Определение связи генотипа с риском развития амилоидоза у пациентов с ревматоидным артритом в Республике Беларусь ранее не проводилось. В настоящем

исследовании приведены данные по связи аллельного полиморфизма гена *SAAI* в группе пациентов с ревматоидным артритом, осложненным амилоидозом почек, а также пациентов с РА без данного осложнения. Все пациенты являются жителями Беларуси.

**Материал и методы.** Из лейкоцитов цельной крови 21 пациента, страдающих ревматоидным артритом, осложнённым амилоидозом почек и 27 пациентов с РА без наличия этого осложнения выделялась нативная ДНК. Методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом было проведено генотипирование на носительство генотипов риска гена *SAAI* по трем полиморфным сайтам: *-13T/C, 2995C/T и 3010C/T*. Отбор пациентов и взятие образцов крови осуществляли на базе отделения ревматологии УЗ 9-я ГКБ г. Минска. Общий объем выборки составил 48 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-НСl, MgCl<sub>2</sub>, тритон X-100). Лейкоциты лизировали с помощью другого детергента – додецилсульфата натрия; депротеинизацию ДНК лейкоцитов осуществляли с помощью протеиназы К (16 часов), 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 5М ацетата аммония и двойного объема 96% этанола, охлажденного до -20°С. Через 5-15 часов 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 *SAAI* по каждому из трех полиморфных локусов использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами. ПЦР проводили на амплификаторе *MyCycler<sup>TM</sup> Thermal cycler (BIORAD)*. Полиморфный участок генов амплифицировали в 15 мкл реакционной среды, содержащей 10 – 20 нг геномной ДНК, 2мкл 10х буфера для амплификации. Состав буфера: 750 мМ трис-НСl рН 8,8, 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% тритон X-100, 10 моль/л

тартразин и 5%-ный фикола 400, 1,5% мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ), 2,5 единицы ДНК-полимеразы *Taq* (НПО «*Fermentas*», Вильнюс), по 0,3 мкМ каждого праймера. Последовательности использованных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров к полиморфным участкам гена *SAA1*

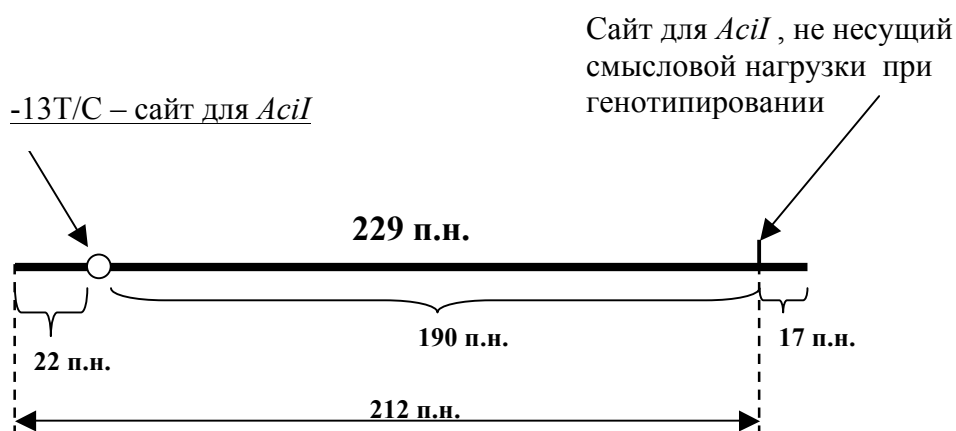
Полиморфизм	Прямой праймер, 5`-3`	Обратный праймер, 5`-3`
-13 T/C	ACA TCT TGT TCC CTC AGG TTG	GCT GTA GCT GAG CTG CGG
2995 C/T, 3010 C/T	GCC AAT TAC ATC GGC CTC AG	TGG CCA AAG AAT CTC TGG AT

### **Определение -13 T/C полиморфизма гена *SAA1***

Аmplификацию полиморфного участка гена *SAA1* проводили по следующей программе: инкубация геномной ДНК при 95<sup>0</sup> в течении 5 мин; 35 циклов, включающих денатурацию при 95<sup>0</sup> в течении 45с, отжиг праймеров - 60<sup>0</sup> - 60с и синтез 72<sup>0</sup> - 60с; 1 раунд досинтеза 72<sup>0</sup> – 7 мин.

Продукт амплификации участка длиной в 229 пн подвергали обработке эндонуклеазой *AciI* (НПО «*Fermentas*», Вильнюс) с последующим электрофоретическим разделением в 8% полиакриламидном геле. Рестрикцию проводили согласно инструкции фирмы-производителя – *MBI Fermentas*. ДНК в количестве 2-5 мкг инкубировали в реакционной смеси при +37<sup>0</sup>С в течении 5-12 часов.

Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного локуса -13T/C гена *SAA1* показано на рисунке 1.



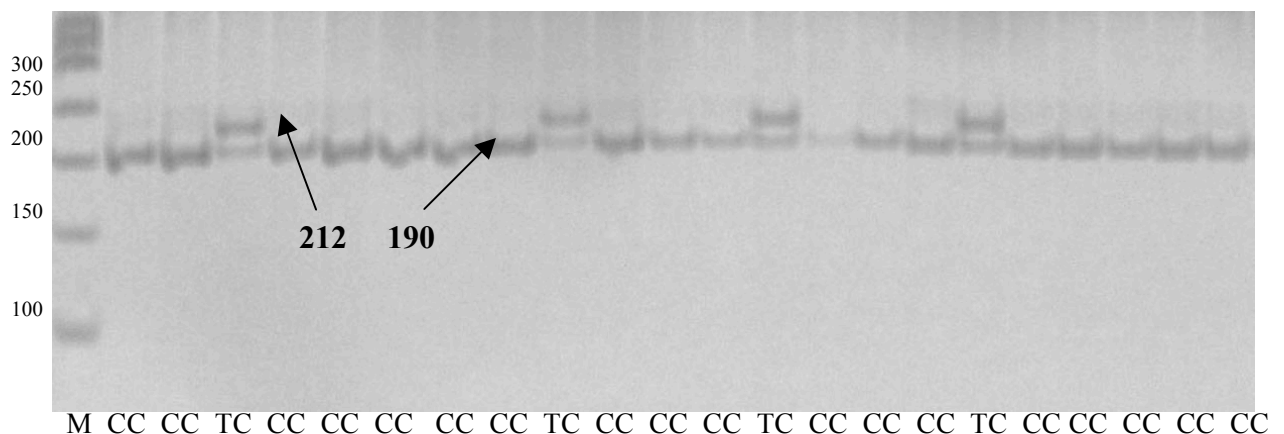
**Рисунок 1** – Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного участка -13Т/С гена *SAAI*

Возможные варианты длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой *AciI* и их соответствие генотипам представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Полиморфизм гена *SAAI* по точечной замене -13Т/С

Длина фрагментов, п.н.	Генотип
212+17	<i>TT</i>
212+190+22+17	<i>TC</i>
190+22+17	<i>CC</i>

На рисунке 2 представлен спектр рестриктных фрагментов полиморфного локуса -13Т/С, полученный в 8% полиакриламидном геле. Детекцию результатов электрофоретического разделения фрагментов осуществляли в УФ свете с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat, результаты фиксировали на цифровую камеру Nikon 2100. Фрагменты длиной 17 и 22 п.н. в геле не обнаруживаются из-за низкой молекулярной массы и суммарного заряда. Генотипы устанавливаются по тяжелым фрагментам – 212 и 190 п.н. (рисунок 2).



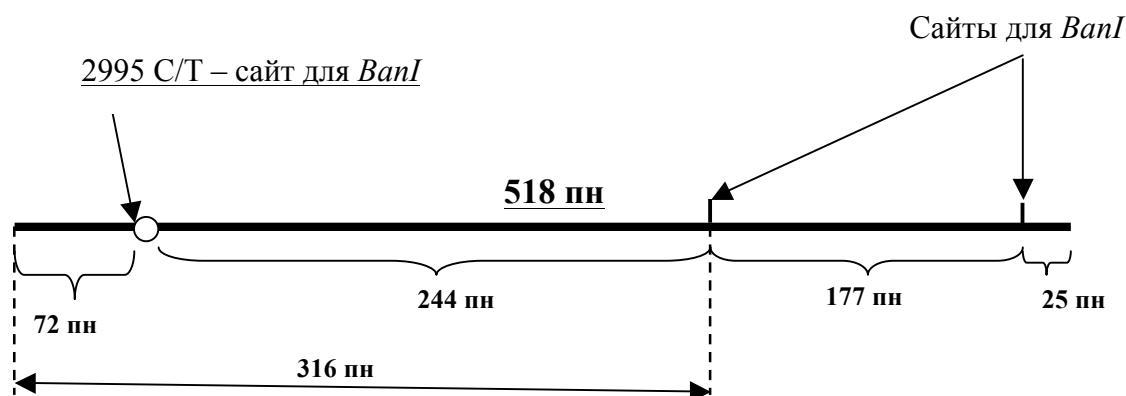
**Рисунок 2** – Электрофореграмма *AciI* фрагментов -13Т/С локуса  
Указаны размеры фрагментов рестрикции,  
слева – маркер длин 1,5+50 п.н., внизу – генотипы

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

Аmplification фрагмента гена *SAA1* с полиморфными локусами 2995С/Т и 3010С/Т проводили по следующей программе: инкубация геномной ДНК при 95<sup>0</sup> в течение 5 мин; 35 циклов, включающих денатурацию при 95<sup>0</sup> в течение 1 мин, отжиг праймеров - 62<sup>0</sup> – 1 мин и синтез 72<sup>0</sup> – 1 мин; 1 раунд досинтеза 72<sup>0</sup> – 7 мин. Последовательности используемых праймеров приведены в таблице 1.

Продукт амплификации участка длиной в 518 п.н. 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 +37<sup>0</sup>С в течении 5-12 часов.

Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного локуса 2995С/Т гена *SAA1* показано на рисунке 3. Основными фрагментами для генотипирования являются 72, 244 и 316 п.н. Все возможные комбинации длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой *BanI* и их соответствие генотипам представлены в таблице 3.

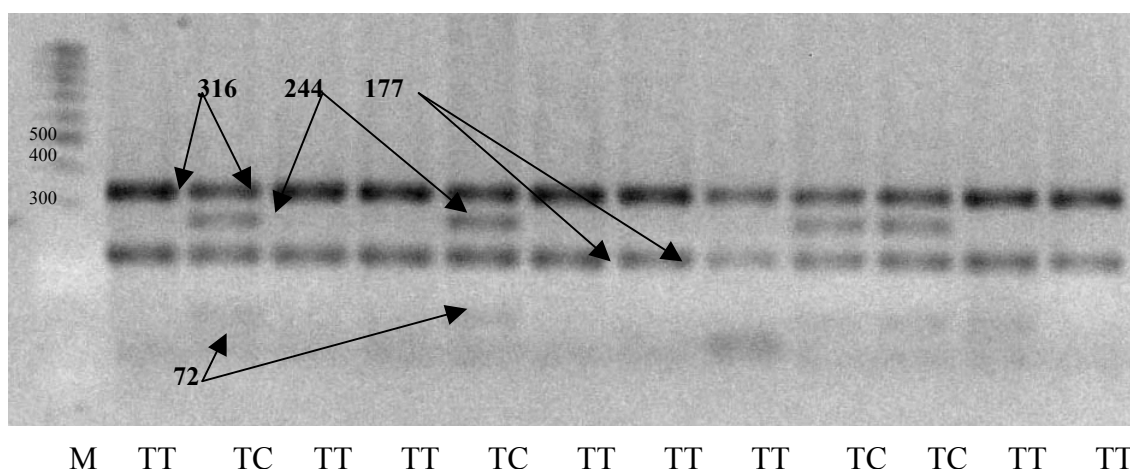


**Рисунок 3** – Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного участка 2995С/Т гена *SAA1*

Таблица 3 – Полиморфизм гена *SAA1* по точечной замене 2995С/Т

Длина фрагментов, п.н.	Генотип
244+177+72+25	СС

316+244+177+72+25	<i>CT</i>
316+177+25	<i>TT</i>



**Рисунок 4** – Электрофореграмма *BanI* фрагментов 2995C/T локуса  
 Указаны размеры фрагментов рестрикции,  
 слева – маркер длин 1,5+100п.н., снизу – генотипы

В случае однонуклеотидной замены в положении 3010 гена *SAAI* рестриктаза *BclI* разрезает амплифицированный фрагмент (518 пн) на 427 и 91 пн. Возможные варианты длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой и их соответствие генотипам представлены в таблице 4.

Таблица 4. Полиморфизм гена *SAAI* по точечной замене 3010C/T

Длина фрагментов, пн	Генотип
518	<i>CC</i>
518+427+91	<i>CT</i>
427+91	<i>TT</i>

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

**Результаты и обсуждение.** Определены генотипы пациентов по трем полиморфным локусам гена *SAAI* (таблица 5).



Таблица 5. Результаты генотипирования по полиморфным локусам 2995С/Т и 3010С/Т гена *SAAI*

Генотипы			Количество пациентов		Достоверность различий между группами пациентов
			Ревматоидный артрит	РА с амилоидозом	
2995С/Т	3010 С/Т	$\alpha, \beta, \gamma$	27	21	
ТТ	СС	$\alpha/\alpha$	11 (45,8%)	20 (95,2%)	$P<0,05$
ТС	СТ	$\alpha/\beta$	6 (25,0%)	0 (0,0)	$P<0,05$
ТС	СС	$\alpha/\gamma$	6 (25,0%)	0 (0,0)	$P<0,05$
СС	ТТ	$\beta/\beta$	1 (4,2%)	0 (0,0)	
СС	ТС	$\beta/\gamma$	0 (0,0)	0 (0,0)	
СС	СС	$\gamma/\gamma$	0 (0,0)	0 (0,0)	
ТТ	ТС			1 (4,8%)	
$\alpha$			34 (70,8%)	40 (95,2%)	$P<0,05$
$\beta$			8 (16,7%)	0 (0,0)	
$\gamma$			6 (12,5%)	0 (0,0)	

Сравнение опытных групп проводили методом хи-квадрат по значениям частот генотипов, а также по частотам трех аллелей. Обнаружены статистически достоверные различия между выборкой больных РА и группой, отягощенной амилоидозом. Наибольшее значение хи-квадрата получено при сравнении этих выборок по генотипу  $\alpha/\alpha$  –  $\chi^2=11,4$ ;  $P=0,001$ . Среди лиц с осложнением РА в виде амилоидоза почек носителями генотипа  $\alpha/\alpha$  являются 20 из 21, в то время как среди больных РА этот генотип встречается в 45,8% случаев, что в 2,1 раза реже. Подобная тенденция наблюдается и по частоте аллеля  $\alpha$  в данных группах, разница между ними статистически достоверна.

При вычислении показателя «отношение шансов» (ОШ) по числу носителей генотипа  $\alpha/\alpha$  получено значение 23,6, при этом доверительный интервал составил – ДИ (1,7-38,8). Таким образом, относительный риск развития амилоидоза на фоне РА статистически значимо возрастает у лиц с генотипом  $\alpha/\alpha$  по сравнению с больными РА без этого генотипа. Результаты статистического анализа говорят в пользу того, что генотип  $\alpha/\alpha$  является генетическим фактором риска развития амилоидоза как осложнения ревматоидного артрита в белорусской популяции.

В отличие от данных, полученных японскими исследователями, наши результаты показывают, что у жителей Беларуси (европейская популяция) наибольшей амилоидогенностью обладает *SAAI1* $\alpha/\alpha$  изотип. Частота аллелей гена *SAAI* у

представителей разных этнических групп может значительно отличаться. Так в работе Faukers с соавт. при анализе небольшой выборки здоровых европейцев (21 человек) не обнаружено ни одного носителя аллеля  $\gamma$ ; частоты аллелей  $\alpha$  и  $\beta$  распределились как 62% и 38% соответственно [28]. Сравнение результатов исследований азиатских и европейских популяций по частотам аллелей гена *SAA1* показывает, что у японцев аллель  $\gamma$  встречается 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, страдающих ревматоидным артритом [24, 25]. В противоположность этим данным, Booth с соавт. определили частоту встречаемости аллеля  $\gamma$  в европейской популяции, которая составила лишь 5,3% [29]. Среди 41 пациента - европейца с ювенильным хроническим артритом и АА-амилоидозом частота аллельного варианта  $\alpha$ , и особенно гомозигот  $\alpha/\alpha$ , была достоверно выше - 90,2% (аллельный вариант  $\alpha$ ) и 80,5% (генотип  $\alpha/\alpha$ ) – по сравнению со здоровой выборкой (75,8 и 57,9% соответственно) и с группой больных ювенильным хроническим артритом, но без амилоидоза (8 чел., 56,3% и 12,5% соответственно) [29].

Эти результаты говорят в пользу того, что разные изоформы белка SAA1, а именно  $\alpha$  и  $\gamma$ , являются генетическими факторами риска развития амилоидоза в разных этнических группах: у японцев - SAA $\gamma$ , в исследованных немногочисленных европейских популяциях, в том числе и белорусской – SAA $\alpha$ .

Результаты генотипирования по локусу *-13T/C* гена *SAA1* представлены в таблице 6. Аллель риска *-13T* в исследованных выборках встречается лишь в виде гетерозигот, его частота в группе ревматоидного артрита без поражения почек составила 13,0%. У пациентов с амилоидозом все генотипы представлены гомозиготами по аллелю *-13C*. Гомозигот *-13TT* ни в одной из исследованных выборок не обнаружено, что связано, очевидно, с низкой частотой *-13T* аллеля в популяции белорусов. Согласно опубликованным ранее данным, частота *-13T* в европейской популяции составляет около 8%, а встречаемость гомозигот стремится к нулю [30].

Особенностью распределения полиморфных аллелей гена *SAA1* в исследованных группах является то, что в 6 из 7 случаев гетерозиготный генотип по локусу *-13T/C* находится в контексте с генотипом  $\alpha/\gamma$ , и в одном случае – с генотипом  $\alpha/\beta$ . Корреляционный анализ возможен после расширения объема выборок. В исследовании Mavragani et al. [30] также была обнаружена связь *-13T* аллеля с гаплотипом  $\gamma$  у греческих пациентов с РА и контролем, несмотря на низкую частоту встречаемости *-13T* в обеих выборках.

Таблица 6 – Результаты генотипирования по локусу -13T/C гена *SAAI*

Генотипы по -13T/C	Количество пациентов		Достоверность различий между группами пациентов
	Ревматоидный артрит, абс. (%)	РА с амилоидозом, абс. (%)	
	27	21	
ТТ	0 (0,0)	0(0,0)	
ТС	7 (25,9% )	0 (0,0)	P<0,05
СС	20 (74,1%)	21 (100,0%)	P<0,05
Аллель -13T	7 (13,0%)	0(0,0)	P<0,05
Аллель -13C	47 (87,0%)	42 (100,0%)	P<0,05

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что носительство -13T аллеля гена *SAAI* не повышает риск развития АА-амилоидоза у белорусских пациентов.

Таким образом, приведены результаты определения полиморфных аллелей гена *SAAI* трех позиций: 5' фланкирующем сайте -13T/C, а также сайтах 2995C/T и 3010C/T у пациентов с амилоидозом, развившемся как осложнение РА, а также у пациентов с РА без амилоидоза. Выявлено, что генотипы риска развития вторичного амилоидоза у белорусских пациентов коренным образом отличаются от японских и сходны с таковыми для пациентов Англии и Греции.

### Выводы

1. Определен генетический полиморфизм гена *SAAI* у белорусских пациентов с вторичным амилоидозом, развившемся на фоне РА (1 группа), а также у пациентов с РА без амилоидоза (2 группа). Показано, что генотип *SAAI*  $\alpha/\alpha$  является доминирующим в обеих группах, составляя 95,2% в 1-ой и 45,8% во 2-ой группе. Пациенты с генотипом *SAAI*  $\alpha/\beta$  и  $\alpha/\gamma$  выявлены только во 2 группе, и составляют по 25% каждый; один пациент имеет генотип  $\beta/\beta$  (4,2%) и также обнаружен во второй группе.

2. По результатам анализа, генотип *SAAI*  $\alpha/\alpha$  (аллельные варианты 2995T и 3010C) является генетическим фактором риска развития амилоидоза как осложнения ревматоидного артрита у белорусских пациентов.

3. Частота аллеля -13T гена *SAAI* (полиморфный локус -13T/C) составила 13% в группе 2, среди пациентов с амилоидозом (группа 1) данный аллель не обнаружен. Не выявлено гомозигот -13T/T. Таким образом, аллель -13T не является фактором риска для манифестации АА-амилоидоза у белорусских пациентов с РА.

4. 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

1. Merlini G., Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis // *N. Engl. J. Med.* - 2003. – Vol. 349. – P. 583 – 596.
2. Gertz M.A., Kyle R.A. Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients // *Medicine (Baltimore)*. – 1991. – Vol. 70. – P. 246 – 256.
3. Toyoshima H., Kusaba T., Yamaguchi M. Cause of death in autopsied RA patients // *Ryumachi*. – 1993. – Vol. 33. – P. 209 – 214.
4. Hazenberg B.P.C., Rijswijk M.H. Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis // *Baillieres Clin. Rheumatol.* – 1994. – Vol. 8. – P.661 – 690.
5. Kobayashi H., Tada S., Fuchigami T. et al. Amyloidosis in rheumatoid arthritis: diagnostic and prognostic value of gastroduodenal biopsy // *Br. J. Rheumatol.* - 1996. – Vol. 35. – P. 44 -49.
6. Okuda Y., Takasugi K., Oyama T., Onuma M., Oyama H. Amyloidosis in rheumatoid arthritis: clinical study of 124 histologically proven cases // *Ryumachi*. – 1994. – Vol. 34. – P. 939 – 946.
7. Sihvonen S., Korpela M., Mustonen J. et al. Renal disease as a predictor of increased mortality among patients with rheumatoid arthritis // *Nephron Clin. Pract.* – 2004. – Vol. 96. – P. 107 - 114.
8. Misra R., Wakhlu A., Krishnani N. et al. Prevalence of silent amyloidosis in rheumatoid arthritis and its clinical significance // *J. Rheumatol.* - 2004. – Vol. 31. – P.1013 – 1014.
9. Artl A., Marsche G., Lestavel S. et al. Role of Serum Amyloid A During Metabolism of Acute-Phase HDL by Macrophages // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 763 – 772.
10. Черствый Е.Д., Портянко А.С. Амилоидоз: новый взгляд на старую проблему // *Здравоохранение*. – 2008. – №2. – С. 26 – 30
11. Betts J. C., Edbrooke M. R., Thakker R. V., Woo P. The human acute-phase serum amyloid A gene family: structure, evolution, and expression in hepatoma cells // *Scand. J. Immunol.*- 1991. – Vol. 34. – P. 471 – 482.
12. Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 1999. – Vol. 37. – P. 381 – 388.
13. Malle E., deBeer F.C. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 26. – P. 427 – 435.

14. Maury C.P., Wegelius O. Clinical value of serum amyloid A and C-reactive protein measurements in secondary amyloidosis // *Int. J. Tissue React.* – 1985. – Vol. 7. – P. 405 – 407.
15. Steel D.M., Whitehead A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein // *Immunol. Today.* – 1994. – Vol. 15. – P. 81 – 88.
16. Dwulet F.E., Wallace D.K., Benson M.D. Amino acid structures of multiple forms of amyloid-related serum protein SAA from a single individual // *Biochemistry.* – 1988. – Vol. 27. – P. 1677 – 1682.
17. Beach C.M., de Beer M.C., Sipe J.D. et al. Human serum amyloid A protein: complete amino acid sequence of a new variant // *Biochem. J.* - 1992. – Vol. 282. – P.615 - 622.
18. Husby G., Marhaug G., Downton B., Sletten K., Sipe J.D. Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis // *Amyloid.* - 1994. – Vol. 1. – P.119 – 137.
19. Kisilevskiy R. Serum amyloid A1 (SAA), a protein without a function: some suggestion with reference to cholesterol metabolism // *Med. Hypothesis.* – 1991. – Vol. 35. – P. 337-341.
20. Urieli-Shoval S., Reinhold L., Yaacov M. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states // *Curr. Opin. Hematol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 64 – 69.
21. Cunnane G., Whitehead A.S. Amyloid precursors and amyloidosis in rheumatoid arthritis // *Bailliere's Clin. Rheumatol.* – 1999. – Vol.13. – P. 615 – 628.
22. Toth T., Toth-Jakatics R., Jimi S., Takebayashi S. Increased density of interstitial mast cells in amyloid A renal amyloidosis // *Mod. Pathol.* – 2000. – Vol. 13. – P. 1020 - 1028.
23. Kisilevsky R. Amyloidogenesis — unquestioned answers and unanswered questions // *J. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 130. – P. 99 -108.
24. Baba S., Masago S.A., Takahashi T. et al. A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 $\gamma$ : genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – Vol. 4. – P. 1083-1087.
25. Moriguchi M., Terai C., Koseki Y. et al. 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.* - 1999. – Vol. 105. – P. 360 - 366.
26. Nakamura T., Higashi S., Tomoda K., Tsukano M., Baba S., Shono M. Significance of SAA 1.3 allele genotype in Japanese patients with amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis // *Rheumatology.* - 2006. – Vol. 45. – P. 43 – 49.

27. Yamada T., Okuda Y., Takasugi K. et al. An allele of serum amyloid A1 associated with amyloidosis in both Japanese and Caucasians // *Amyloid*. - 2003. – Vol. 10. – P. 7-11.
28. Faulkers D.J., Betts J.C., Woo P. Characterization of five human serum amyloid A1 alleles // *Amyloid. Int. J. Exp. Clin. Invest.* – 1994. – Vol. 1. – P. 255-262.
29. Booth D.R., Booth S.E., Gillmore J.D. SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis // *Amyloid*. – 1998. – Vol. 5. – P. 262-265].
30. Mavragani C.P., Yiannakouris N., Zintzaras E. et al. Analysis of SAA1 gene polymorphisms in the Greek population: rheumatoid arthritis and FMF patients relative to normal control. Homogeneous distribution and low evidence of AA amyloidosis // *Amyloid*. – 2007. – Vol. 14. – P. 271-275.