

Значимость полиморфизма гена *SAA1* в формировании АА-амилоидоза у больных ревматоидным артритом в московской популяции

В.А. Мякоткин¹, Ю.В. Муравьев¹, А.В. Алексеева¹,
В.А. Кадникова², А.В. Поляков²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН;
²МГ НЦ РАМН, Москва

¹Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;
²Medical Genetics Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Контакты: Муравьев Юрий Владимирович
murawyu@mail.ru

Contact: Muravyev Yuri Vladimirovich
murawyu@mail.ru

Поступила 14.12.11

Цель исследования — оценить значимость полиморфизма гена *SAA1* в формировании АА-амилоидоза у больных ревматоидным артритом (РА) в московской популяции.

Материал и методы. Включено 57 больных РА, находившихся на лечении в клинике ФГБУ «НИИР» РАМН, с гистологически подтвержденным АА-амилоидозом. У 41 из них изучен полиморфизм 3-го экзона гена *SAA1* (SNP rs1136747 с.224Т→С и SNPrs1136743 с.209С→Т) с помощью полимеразной цепной реакции и детекции полиморфизма длины рестриктивных фрагментов.

Результаты. Носительство генотипа α/α в 3 раза повышает вероятность возникновения АА-амилоидоза у больных РА (показатель отношения шансов ОШ=3,0; $p=0,007$). В то же время наличие аллеля β в генотипе α/β эпистатически подавляет действие аллеля α , в 3 раза уменьшая риск возникновения вторичного амилоидоза у больных РА — носителей этого генотипа.

Выводы. Генотип α/α *SAA1*-локуса является фактором риска возникновения АА-амилоидоза у больных РА в московской популяции, в то же время наличие в нем аллеля β в гетерозиготном или в гомозиготном состоянии является фактором, предотвращающим развитие этого осложнения.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, АА-амилоидоз, ген *SAA1*, полиморфизм

SIGNIFICANCE OF SAA1 GENE POLYMORPHISM IN THE DEVELOPMENT OF AA AMYLOIDOSIS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE MOSCOW POPULATION

V.A. Myakotkin¹, Yu.V. Muravyev¹, A.V. Alekseyeva¹, V.A. Kadnikova², A.V. Polyakov²

Objective: to estimate the significance of *SAA1* gene polymorphism in the development of AA amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis (RA) in the Moscow population.

Subjects and methods. The investigation included 57 RA patients treated at the clinic of the Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, for histologically verified AA amyloidosis. In 41 of them, polymorphism of exon 3 of the *SAA1* gene (SNP rs1136747 с.224Т→С and SNPrs1136743 с.209С→Т) was studied by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis.

Results. The carriage of the α/α genotype increases the likelihood of AA amyloidosis by 3 times in patients with RA (odds ratio (OR) = 3.0; $p = 0.007$). At the same time, the presence of allele β in the α/β genotype epistatically suppresses the action of allele α , by showing a 3-fold reduction in the risk of secondary amyloidosis in RA patients who were carriers of this genotype.

Conclusion. The α/α genotype at the *SAA1* locus is a risk factor for AA amyloidosis in patients with RA in the Moscow population; at the same time its presence of allele β in the heterozygous or homozygous state is a factor for preventing the development of this complication.

Key words: rheumatoid arthritis, AA amyloidosis, *SAA1* gene, polymorphism

АА (вторичный) амилоидоз еще в 60-е годы прошлого века считался наиболее частой формой поражения почек в российской популяции больных ревматоидным артритом (РА) [1]. Спустя три десятилетия эта патология оставалась серьезным осложнением и одной из частых причин летального исхода у больных РА [2]. В последнее время уремия, обусловленная АА-амилоидозом, является преобладающей причиной смерти среди больных, умерших в Москве с основным патологоанатомическим диагнозом РА [3]. Заболеваемость АА-амилоидозом связана с гиперпродукцией белка SAA (serum amyloid A — сывороточного амилоида А, ген *SAA1*) и составляет, по результатам стационарной выборки ФГБУ «НИИР» РАМН, 1,1%. Обычно АА-амилоидоз диагностируется на поздних (нефротической или хронической

почечной недостаточности) стадиях болезни, когда лекарственные препараты малоэффективны. В настоящее время интенсивно изучаются генетические, биологические и клинические факторы, влияющие на развитие АА-амилоидоза у больных хроническими ревматическими заболеваниями, проводится сопоставление их с экспериментальными данными [4]. Весьма актуальным является поиск факторов риска, позволяющих прогнозировать развитие этого фатального осложнения.

SAA — острофазовый аполипопротеин, связанный с липопротеином высокой плотности, циркулирует в виде предшественника амилоида А. Высокий уровень SAA поддерживается хроническим воспалительным процессом, что может привести к отложению в разных тканях, включая почки, сердце, же-

лудочно-кишечный тракт, нерастворимых фибрилл амилоида А [5, 6]. Однако наличия высокого уровня SAA в крови еще недостаточно для развития АА-амилоидоза. Недавние исследования показали, что полиморфизм SAA генетически детерминирован, а SAA1 – изоформа острофазового SAA человека [7]. Аминокислотные композиции SAA1-изоформы определяются наличием валина в положении 52 и аланина в положении 57 для α , аланина в положении 52 и валина в положении 57 для β ; аланина в позициях 52 и 57 для γ -изоформы. В дополнение к хорошо документированной роли в этиологии АА-амилоидоза, белки А-SAA могут участвовать и в других патологических акциях: 1) они ассоциированы с HDL3-белками, перемещающимися ApoA1 в качестве преобладающего аполипопротеина, обеспечивающего компромиссный реверсивный транспорт холестерина, непрямо содействуя атерогенезу при некоторых воспалительных заболеваниях; 2) белки А-SAA синтезируются в атеросклеротических бляшках клеток гладкомышечной ткани и эпителия и являются хемотактиками для Т-клеток и моноцитов; 3) они продуцируются синовиоцитами и функционируют как аутокринные индукторы коллагеназы, что указывает на их возможную роль в этиологии дегенеративных заболеваний суставов. Сиквенс А-SAA различных представителей позвоночных показал их отчетливую консервативность и наличие общего предка сотни миллионов лет назад, указывая на то, что эти APP-белки играют фундаментальную протективную роль, структурный мотив которых отобран положительной селекцией.

Цель исследования – оценить значимость полиморфизма гена SAA1 в формировании АА-амилоидоза у больных РА в московской популяции.

Материал и методы. Выборка больных РА, проживающих в г. Москве и наблюдавшихся в клинике ФГБУ «НИИР» РАМН, составила 57 человек, у 41 гистологически был подтвержден амилоидоз (РАам+), 16 амилоидоза не имели (РАам-). Длительность заболевания в 1-й группе

составила $16,2 \pm 9,1$ года, во 2-й группе – $10,6 \pm 8,4$ года. Полиморфизм 3-го экзона гена SAA1 (SNP rs1136747 с.224Т→С и SNPrs1136743 с.209С→Т) был изучен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и детекции полиморфизма длины рестриктных фрагментов (ПДРФ) в лаборатории ДНК-диагностики МГ НЦ РАМН (зав. лабораторией д-р биол. наук профессор А.В. Поляков). Комбинации SNP-аллелей позволяют идентифицировать носительство трех гаплотипов: (α , β , γ) – и дифференцировать 6 генотипов: $\alpha\alpha$; $\alpha\beta$; $\alpha\gamma$; $\beta\beta$; $\beta\gamma$ и $\gamma\gamma$.

Результаты и обсуждение

В исследование были включены 57 больных РА, соответствующих критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. [8]. Их клинично-демографическая характеристика представлена в табл. 1, из которой видно, что по полу, возрасту, серопозитивности по ревматоидному фактору больные с гистологически подтвержденным АА-амилоидозом и без АА-амилоидоза были сопоставимы.

АА-амилоидоз был диагностирован на разных стадиях (табл. 2), почти у половины больных – на поздних (нефротической и почечной недостаточности).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, среди больных РА со вторичным амилоидозом отмечается повышенная частота лиц с генотипом α/α по сравнению со здоровым контролем, что свидетельствует о том, что аллель α в двойной дозе (α/α) является фактором риска развития этого процесса у больных РА. Носительство данного генотипа в 3 раза повышает вероятность возникновения вторичного амилоидоза у больных РА (показатель отношения шансов ОШ=3,0; $p=0,007$). В то же время наличие аллеля β в генотипе α/β эпистатически подавляет действие аллеля α , в 3 раза уменьшая риск возникновения вторичного амилоидоза у больных РА – носителей этого генотипа. Наличие генотипа β/β у больного РА также снижает риск возникновения вторичного амилоидоза,

Таблица 1 Клинично-демографическая характеристика больных РА

Показатель	С гистологически подтвержденным АА-амилоидозом (n=41)	Без АА-амилоидоза (n=16)
Пол, n:		
м.	3	1
ж.	38	15
Возраст, годы, $M \pm \sigma$	$53,7 \pm 13,9$	$56,7 \pm 11,5$
Длительность РА до диагностики АА-амилоидоза, годы, $M \pm \sigma$	$14,7 \pm 10,0$	
Позитивный ревматоидный фактор, n (%)	30 (73,2)	13 (81,3)
Рентгенологическая стадия, n		
I	0	1
II	6	3
III	10	1
IV	25	11
Биопсия, n (%)		
десны	6 (14,6)	1 (6,3)
двенадцатиперстной кишки	38 (92,7)	12 (75)
подкожного жира	22 (53,7)	10 (62,5)
СОЭ, мм/ч, $M \pm \sigma$	$41,6 \pm 18,4$	$40,1 \pm 18,8$
Общий белок, г/л, $M \pm \sigma$	$62,3 \pm 7,1$	$71,7 \pm 4,9$
Альбумин, г/л, $M \pm \sigma$	$27,6 \pm 5,2$	$32,0 \pm 4,2$
Суточная протеинурия, г/л, $M \pm \sigma$	$1,7 \pm 3,1$	$0,1 \pm 0,1$

Таблица 2 Характеристика больных АА-амилоидозом, $M \pm \sigma$

Показатели	Стадии АА-амилоидоза			
	доклиническая	протеинурическая	нефротическая	хронической почечной недостаточности
Пол, n				
м.	–	1	–	2
ж.	12	8	10	8
Возраст, годы	58,8±11,2	52,4±16,5	48,3±12,7	54,2±15,5
Суточная протеинурия, г/л	0,09±0,1	1,9±1,5	2,4±1,2	2,4±5,6
Альбумин, г/л	31,5±4,9	25,3±3,5	24,3±4,8	29,1±4,4
Креатинин, мкмоль/л	65,7±18,9	68,2±19,8	58,9±8,2	127,9±38,2

однако данные не достоверны, так как среди больных и в контрольной группе этот генотип встречается нечасто. Помимо этого, у носителей гомозиготного генотипа α/α риск заболеть РА выше по сравнению с обладателями других генотипов (ОШ=2,0; $p=0,038$), т. е. полиморфизм гена *SAA1* оказывает определенное влияние на формирование чувствительности к РА.

Аллель α является мажорным для обеих выборок, его частота равнялась 0,7683 у больных РА с амилоидозом и 0,6338 в контроле (здоровые), при частоте аллеля γ 0,0488 и 0,0563 соответственно.

Частота носительства аллеля β среди больных РА с амилоидозом была существенно ниже, чем в контрольной группе (0,1829 и 0,3098 соответственно). У больных средиземноморской лихорадкой носительство генотипа α/α также являлось фактором риска развития вторичного амилоидоза в популяции турок (ОШ=12,1; $p<0,00001$), армян (ОШ=4,3; $p=0,0001$) и евреев Израиля (ОШ=2,8; $p=0,001$). Наличие в гетерозиготном генотипе (α/β) аллеля β , так же как и на нашей выборке РА, снижало риск возникновения амилоидоза у больных средиземноморской лихорадкой турок (ОШ=0,37; $p=0,004$), армян (ОШ=0,46; $p=0,05$) и евреев Израиля (ОШ=0,78; $p=0,48$), что подтверждает наличие выявленного нами эпистатического эффекта (эффект подавления) аллеля β на проявления аллеля α . Расчеты показателей относительного риска для гетерозиготного генотипа α/β проведены нами на основании опубликованных данных о частотах генотипов гена *SAA1* у больных средиземноморской лихорадкой турок, армян и евреев Израиля [9–12].

В популяциях японцев, корейцев и китайцев о. Тайвань, в противоположность европейским популяциям, мажорным аллелем гена *SAA1* является аллель γ , а генотип γ/γ является фактором риска развития амилоидоза у японцев, больных РА [13].

О протективной роли аллеля β в развитии вторичного амилоидоза у больных РА свидетельствуют и результаты анализа генотипических средних таких патогенетически значимых показателей, как концентрации альбумина, общего и суточного белка мочи (табл. 4).

Обращает на себя внимание наиболее низкая концентрация общего белка крови у больных РА с амилоидозом по сравнению с носителями других генотипов, особенно с пациентами с генотипом β/β . В то же время у больных РА с амилоидозом – обладателей генотипа α/α – отмечались наиболее высокие концентрации суточного белка и белка мочи, особенно контрастные на фоне таковых у носителей генотипа β/β (примечательно, что различия достоверны или близки к достоверным). Аналогичная закономерность прослеживается и при изучении генотипических концентраций альбумина в сыворотке крови у больных РА с вторичным амилоидозом.

Так как эти показатели очень тесно коррелируют между собой (табл. 5), можно предположить наличие увеличенной потери белка у больных РА с АА-амилоидозом – носителей генотипа риска α/α – по сравнению с носителями других генотипов.

Также было установлено, что более старший возраст, более высокая концентрация креатинина и более низкая концентрация альбумина наряду с полиморфизмом гена *SAA1* являются факторами неблагоприятного прогноза заболеваемости амилоидозом и выживаемости больных РА с амилоидозом в японской популяции [14]. Результаты нашего исследования представлены в табл. 6.

Как видно из таблицы, больные РА – носители гомозиготного генотипа α/α – в целом заболевают вторичным амилоидозом в более раннем возрасте по сравнению с носителями других генотипов гена *SAA1*. Однако полученные нами результаты не столь однозначны, как можно было бы предполагать на основании данных японских исследователей. В частности, можно было бы ожидать большего смеще-

Таблица 3 Особенности распределения генотипов *SAA1* локуса среди больных РА с АА-амилоидозом, без АА-амилоидоза и в контроле (здоровые), n (%)

Генотипы <i>SAA1</i> локуса	Больные РА с АА-амилоидозом	Больные РА без АА-амилоидоза	Контроль (здоровые)	ОШ	ОШ±5% доверительный интервал	p
α/α	27 (66,8)	6 (37,5)	28 (39,4)	3,0	1,2< ОШ <7,2	0,007
α/β	8 (19,5)	6 (37,5)	30 (42,2)	0,33	0,12< ОШ <0,88	0,015
α/γ	1 (2,4)	0	4 (5,6)			
β/β	2 (4,9)	2 (12,5)	5 (7,0)	0,68	0,09< ОШ <4,2	0,65
β/γ	3 (7,3)	2 (12,5)	4 (5,6)			
γ/γ	0	0	0			
Всего	41	16	71			

Таблица 4 Средняя концентрация альбумина, общего белка и суточной протеинурии в зависимости от носительства *SAA1*-генотипов у больных РА с АА-амилоидозом

SAA1-генотипы	Общий белок, г/л		Суточный белок в моче, г/л		Альбумин, г/л	
α/α	62,5±6,3		0,81±1,43		27,4±4,4	
α/β	67,2±9,7	α/α против α/β p=0,032	0,46±0,72	α/α против α/β p=0,40	28,2±7,1	α/α против α/β p=0,75
β/β	72,1±5,9	α/α против β/β p=0,022	0,01±0,02	α/α против β/β p=0,085	35,4±3,8	α/α против β/β p=0,006
β/γ	68,4±7,8	α/α против β/γ p=0,1	0,08±0,17	α/α против β/γ p=0,05	29,3±3,3	β/β против β/γ p=0,035

ния начала вторичного амилоидоза у больных РА в сторону более старшего возраста среди носителей генотипа β/β . Кроме того, повозрастные различия между генотипами, так же как и по концентрации креатинина, статистически не достоверны вследствие небольших по объему выборок.

Таким образом, на основании полученных нами результатов можно констатировать, что генотип α/α является фактором риска возникновения АА-амилоидоза. Носители этого генотипа имеют большую вероятность развития данного осложнения через более короткий промежуток времени от начала РА по сравнению с носителями других генотипов. Обладатели генотипа α/α имели наиболее высокие средние показатели содержания суточной протеинурии, более низкие показатели концентрации общего белка и альбумина. Наличие в генотипе аллеля β в гетерозиготном или в гомозиготном состоянии снижает риск возникновения АА-амилоидоза у больных РА, являясь протективным фактором.

Таблица 6 Зависимость между генотипами *SAA1* и длительностью РА до развития АА-амилоидоза, n (%)

SAA1 генотипы	Длительность РА до развития АА-амилоидоза, годы			Креатинин, мкмоль/л
	<10	10-20	> 20	
α/α	13 (50)	6 (23,1)	7 (26,9)	76,6
α/β	2 (25,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	65,0
β/β	0	2 (100)	0	75,6

ЛИТЕРАТУРА

- Астапенко М.Г., Пихлак Э.Г. Болезни суставов. М.: Медицина, 1966; 379 с.
- Ревматические болезни: Руководство для врачей. Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. М.: Медицина, 1997; 520 с.
- Демина А.Б., Раденска-Лоповок С.Г., Фоломеева О.М., Эрдес Ш. Осложнения и причины смерти больных ревматоидным артритом в г. Москве. Тез. науч.-практ. конф. «Социальные аспекты ревматических заболеваний». Науч.-практич ревматол 2004;2:128.
- Obici L., Raimondi S., Lavatelli F. et al. Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic disease: a critical overview. Arthr Rheum 2009; 61:1435–40.
- Immonen K., Finne P., Hakala M. et al. No improvement in survival of patients with amyloidosis associated with inflammatory rheumatic diseases data from Finish National registry for kidney diseases. J Rheumatol 2008;35:1–5.
- Cunnane G., Whithead A.S. Amyloid precursor and amyloidosis in rheumatoid arthritis. Baillieres Clin Rheumatol 1999;13:615–28.
- Booth D.R., Booth S.E., Gillmore J.D. et al. SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis. Amyloid 1998;5(4):262–5.
- Arnet F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A. et al. The American

Таблица 5 Корреляционная матрица концентраций альбумина, общего белка и суточной протеинурии

Показатели	Общий белок	Суточный белок в моче
Альбумины, г/л	r=0,68; p<0,0001	r=0,72; p<0,0001
Общий белок, г/л		r=0,67; p<0,0001
Суточный белок в моче, г/л		

Выводы

- Генотип α/α *SAA1*-локуса – фактор риска возникновения АА-амилоидоза у больных РА в московской популяции.
- Наличие в генотипе *SAA1*-локуса аллеля β в гетерозиготном или в гомозиготном состоянии является фактором, предотвращающим развитие этого осложнения.

- Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthr Rheum 1988;31:315–24.
- Yilmaz E., Balci B., Kutlay S. et al. Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients. Turk J Pediatr 2003;45:198–202.
- Jeru I., Hayrapetyan H., Duquesnoy P. et al. Involvement of the modifier gene of a human Mendelian disorder in a negative selection process. PLoS One 2009;4:7676.
- Bakkaloglu A., Duzova A., Ozen S. et al. Influence of Serum Amyloid A (SAA1) and SAA2 gene polymorphisms on renal amyloidosis, and on SAA/C-reactive protein values in patients with familial mediterranean fever in the Turkish population. J Rheumatol 2004;6:1139–42
- Buxbaum J. The genetics of the amyloidoses: interactions with immunity and inflammation. Genes Immun 2006;7:439–49.
- Nakamura T., Higashi S., Tomoda K. et al. Significance of SAA1.3 allele genotype in Japanese patients with amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2006;45:43–9.
- Moriguchi M., Terai C., Koseki Y. et al. Influence of genotypes 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;105:360–6.