

**Univerzita Karlova v Praze
1.lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Zuzana Potyšová (Sopková)

**VLIV NĚKTERÝCH FAKTORŮ NA POSTIŽENÍ
LEDVIN U AA AMYLOIDÓZY**

**THE INFLUENCE OF SOME FACTORS ON RENAL
IMPAIRMENT IN AA AMYLOIDOSIS**

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.
Konzultant: Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Praha, 2010

POTYŠOVÁ, Zuzana. *Vliv některých faktorů na postižení ledvin u AA amyloidózy. [The influence of some factors on renal impairment in AA amyloidosis]*. Praha, 2010. 42 s., x příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta. Školitel: doc.MUDr. Romana Ryšavá, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22.11.2010

Zuzana Potyšová

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat všem, s jejichž pomocí tato práce vznikla.

V první řadě mé školitelce doc. MUDr. Romaně Ryšavé, CSc., bez níž by se tento výzkum vůbec neuskutečnil, za léta odborného vedení, množství neocenitelné pomoci a nekonečnou trpělivost.

Děkuji prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., MBA, za poskytnutí zázemí, umožnění věnovat se této práci a mnohé cenné připomínky.

Poděkování patří mým konzultantům z Ústavu biologie a lékařské genetiky Ing. Jitce Štekrové a doc. MUDr. Miladě Kohoutové, CSc., za velkou pomoc při stanovování polymorfismů a poskytnutí odborných rad a též laborantkám Monice Škodové, Martině Řezníčkové a Michaele Krylové za praktickou pomoc při práci v laboratoři.

Můj dík patří i Mgr. Janě Švarcové z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky za provedení stanovování metodou ELISA.

Děkuji také RNDr. Věře Lánské, CSc. za statistické zpracování výsledků.

Za nezištné poskytnutí vzorků sér a DNA z Revmatologického ústavu děkuji prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc. a sestřám Miladě Lösterové a Markétě Kubálkové.

Prim. MUDr. Evě Honsové, PhD. děkuji za poskytnutí fotografií mikroskopických nálezů.

Za pomoc při zajišťování vzorků děkuji sestřám Kliniky nefrologie.

Mému manželovi Lukáši Potyšovi patří velký dík za psychickou podporu.

OBSAH

Abstrakt (česky).....	6
Abstrakt (anglicky).....	7
Úvod.....	8
Amyloidóza.....	8
Klasifikace amyloidózy.....	8
Patogeneze tvorby amyloidu.....	9
Klinický obraz systémových forem amyloidózy	10
Diagnostické možnosti průkazu amyloidózy	13
AA amyloidóza (sekundární).....	14
Terapie AA amyloidózy.....	15
SAA.....	17
Chemokiny.....	19
Hypotézy a cíle práce.....	21
SAA1 polymorfismy.....	21
MCP-1 a MIP-1 α polymorfismy.....	23
Cíle práce.....	25
Soubor vyšetřovaných a metodika.....	26
Soubor vyšetřovaných.....	26
Metodika.....	27
Statistické zpracování.....	28
Výsledky.....	29
Diskuse.....	30
Závěry.....	33
Tabulky.....	35
Použitá literatura.....	39
Příloha (publikace).....	47

Vliv některých faktorů na postižení ledvin u sekundární amyloidózy - abstrakt

Klíčová slova: AA amyloidóza, polymorfismy genů MCP-1, MIP-1 α a SAA1

Úvod: Lze předpokládat asociace mezi přítomností sekundární (AA) amyloidózy a polymorfismy genů MCP-1 a MIP-1 α . Některé studie poukázaly na důležitý vliv polymorfismu exonu 3 genu SAA1 na přítomnost AA amyloidózy v různých populacích.

Metoda: V této práci byla zjišťována incidence jednotlivých genotypů ve vybraných polymorfismech genů pro MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha) a SAA 1 (serum amyloid A 1). Byly stanoveny sérové hladiny SAA, MCP-1 a MIP-1 α a zkoumány závislosti na polymorfismech dotyčných genů. Stanovení se týkala nemocných s AA amyloidózou (43), pacientů s revmatoidní artritidou (RA) bez amyloidózy (50) a kontrolní zdravé skupiny (100).

Výsledky: U skupiny nemocných s AA amyloidózou bylo nalezeno signifikantně vyšší zastoupení genotypu 1.1/1.1 pro SAA 1 ve srovnání se skupinou nemocných s RA i se skupinou zdravých kontrol ($p < 0,001$). Statisticky významné rozdíly v zastoupení dalších genotypů nalezeny nebyly. Stejně tak se nelišilo zastoupení genotypu 1.1/1.1 (ani ostatních) mezi nemocnými s RA a kontrolní skupinou a ani u dalších zkoumaných genotypů nebyl v jejich zastoupení nalezen významný rozdíl napříč všemi skupinami. Sérové koncentrace SAA byly statisticky významně vyšší jednak ve skupině nemocných s AA amyloidózou, jednak i ve skupině nemocných s RA ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,001$). Mezi skupinami AA a RA nebyl nalezen významný rozdíl. Významně ($p < 0,05$) se lišila sérová koncentrace MCP-1 ve skupině nemocných s AA amyloidózou (byla vyšší) proti skupině s RA. Zřetelně, i když ne statisticky významně, byly vyšší i koncentrace MIP u obou skupin nemocných proti zdravé skupině.

Závěr: Homozygocie pro haplotyp 1.1 v genu pro SAA1 by mohla být rizikovým faktorem pro rozvoj AA amyloidózy v kavkazské populaci. Námi zjištěné signifikantně vyšší sérové koncentrace MCP-1 ve skupině s AA amyloidózou proti skupině s RA by mohly poukazovat na rizikovost i dalších faktorů. Toto by mohlo mít své terapeutické konsekvence – dřívější a razantnější léčba onemocnění predisponujících ke vzniku AA amyloidózy u pacientů s příslušným genotypem. Potřebný je však další výzkum ve větších souborech.

The influence of some factor on renal impairment in secondary amyloidosis – abstract

Key words: AA amyloidosis, MCP-1, MIP-1 α and SAA1 genes polymorphisms

Introduction: Available data suggest an association between presence of secondary (AA) amyloidosis and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) and MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha) genes polymorphisms. Some studies have also shown an impact of polymorphisms in exon 3 of SAA 1 (serum amyloid A 1) gene on the incidence of AA amyloidosis in different populations.

Methods: The incidence of single genotypes MCP-1, MIP-1 α and SAA 1 genes was investigated. Serum levels of SAA, MCP-1 and MIP-1 α were measured and potential relation between serum levels and genotypes were analyzed. All examinations were performed in patients with AA amyloidosis (43), rheumatoid arthritis (RA) without amyloidosis and healthy control group (100).

Results: Significantly more frequent occurrence of 1.1/1.1 genotype in SAA 1 was recorded in AA amyloidosis group compared to RA group as well as in control group ($p < 0,001$). No statistically significant differences in distribution of another genotypes were found. Distribution of neither 1.1/1.1 genotype nor another ones did not vary among RA group and control group. No significant difference in distribution of another examined genotypes was recorded among all three groups. Serum concentrations of SAA were statistically significantly higher in AA amyloidosis group and also in RA group compared to healthy controls ($p < 0,001$). The difference between AA and RA group was not significant. Serum concentration of MCP-1 was statistically significantly higher in AA amyloidosis group compared to RA group ($p < 0,05$). Concentrations of MIP were markedly (but not statistically significantly) higher in both groups of patients compared to healthy controls.

Conclusions: Homozygosity of the 1.1 haplotype in SAA1 gene could be a risk factor for development of AA amyloidosis in Caucasian population. Our findings of significantly higher serum concentrations of MCP-1 in the AA amyloidosis group compared to RA group could advert to riskiness of another factors. This could have therapeutic consequence – earlier and more assertive therapy of underlying diseases in patients with appropriate genotype in order to prevent or interfere with occurrence of AA amyloidosis. Further studies in larger populations of patients are warranted.

ÚVOD

Amyloidóza

Amyloidóza je onemocnění zapříčiněné metabolickou poruchou degradace proteinů, která vyúsťuje do extracelulárního ukládání nerozpustné bílkovinné hmoty fibrilární struktury – amyloidu. Pojem amyloid zavedl německý botanik Matthias Jakob Schleiden (1838) pro pojmenování škrobových struktur v rostlinách. Je odvozen od amyloidum = škrobu podobný, pro podobnost barvení se s uhlovodany při tehdy dostupných histologických barveních. V roce 1842 Karel Rokitanský jako první popsal vlastnosti tohoto „vosku“ v játrech u pacientů dlouhodobě léčených pro tuberkulózu, syfilis nebo chronickou osteomyelitidu ⁽¹⁾. V roce 1854 nazval Rudolf Virchow tuto substanci (u lidí) amyloid. V roce 1859 Nikolaus Friedreich a August Kekule objasnili proteinovou podstatu amyloidu ⁽²⁾.

Klasifikace amyloidózy

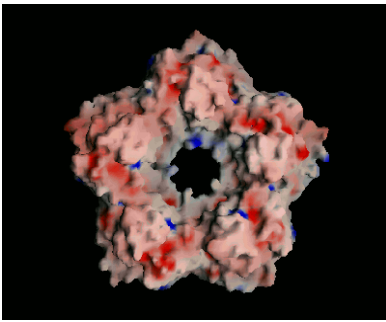
Základní dělení amyloidóz se provádí dle několika kriterií:

- dědičnosti (vrozená – familiární a získaná)
- příčiny (primární, sekundární)
- biochemické struktury (amyloid light chain, amyloid A, amyloid beta atd.)
- rozsahu orgánového postižení (difúzní–systémová nebo lokalizovaná) ⁽¹⁾

Patofyziologie tvorby amyloidu

Amyloid je tvořen několika komponentami, z nichž hlavní jsou bílkovinné nevětvené fibrily o průměru 8-10 nm, složené ze dvou filament. Typické je pro ně uspořádání v β -strukturu skládaného listu s antiparalelním průběhem filament⁽³⁾. Toto uspořádání je zodpovědné za ultrastrukturální, tinkční a optické vlastnosti amyloidu. V kontrastu s uniformními fyzikálními vlastnostmi amyloidových fibril je jejich chemická heterogenita. Do dnešní doby bylo identifikováno nejméně 27 různých proteinů, které způsobují vznik amyloidózy⁽⁴⁾, a právě druh proteinové fibrilární komponenty je pro různé druhy amyloidu specifický. Všechny typy amyloidu mají společnou P komponentu (AP), která je složena z 10 glykosylovaných polypeptidových podjednotek, tvořících dvě pentamerní matice pootočené proti sobě o polovinu jednotky (obr.1). AP tvoří tmelící prvek spojující fibrily v kompaktní hmotu. Tato hmota tvoří 5-15% amyloidových depozit. Fyziologicky má sérový prekurzor tohoto proteinu (SAP) v organismu pozitivní vliv spočívající v ochraně buněčného chromatinu před působením protilátek, virů a bakterií. Váže se, pravděpodobně prostřednictvím Ca^{2+} , na buněčnou membránu bakterií a kvasinek⁽³⁾. V experimentu bylo prokázáno, že SAP-knockoutované myši mají výrazně vyšší hladiny autoprotilátek (antinukleární protilátky - ANAb, protilátky proti bazální membráně glomerulů - antiGBM) a častější výskyt infekčních komplikací⁽⁵⁾. Kromě těchto dvou základních složek (fibrily a P komponenta) se na formaci amyloidových depozit podílejí ještě apolipoproteiny (především ApoE a ApoJ) a glykosaminoglykany (GAG, především heparan-sulfát). Současně se předpokládá ještě existence dalšího faktoru - AEF (amyloid enhancing factor). Získává se extrakcí z tkání infiltrovaných amyloidem a v experimentech s laboratorními zvířaty výrazně urychluje ukládání amyloidových depozit⁽⁶⁻⁸⁾. Dle mnoha výzkumů se jedná o makromolekulární komplex obsahující glykoprotein o velikosti přibližně 10-15 kDa⁽⁸⁻¹¹⁾. Předpokládá se, že AEF může být

amyloid sám ⁽¹²⁾, drobný fragment amyloidové fibrily obsahující vlákno ve struktuře β -skládaného listu ⁽¹³⁾ nebo komplex AA peptidu a GAG ⁽¹⁴⁾. Přesný mechanismus amyloidogeneze dosud není úplně objasněn. Na vzniku amyloidu se může významně podílet tvorba a kinetika amyloidových prekurzorů, kdy u většiny amyloidóz nalézáme jejich zvýšenou tvorbu. Není však prokázána přímá a jednoduchá závislost mezi závažností vyvolávajícího procesu, množstvím amyloidových prekurzorů a vznikem amyloidózy ⁽¹⁵⁾. Dalším momentem může být mutace v genu, který kóduje vznik daného prekurzoru. Takto patologicky změněné bílkoviny jsou obtížně degradovatelné z důvodu chybného prostorového uspořádání a v důsledku toho snáze tvoří agregáty fibril a následně depozita amyloidu (většina familiárních forem amyloidóz).



Obr.1. Struktura SAP
(<http://www.cryst.bbk.ac.uk>)

Obraz systémových forem amyloidózy

Klinický obraz u těchto forem amyloidózy souvisí s predilekčním postižením zejména těchto orgánů: ledviny, játra, slezina a srdce (obr. 2, 3, 4). Při postižení ledvin se amyloidová depozita ukládají nejprve v mezangiu, podél glomerulární bazální membrány a ve stěně cév (hlavně v medii), také ale ve stěně tubulů a intersticiu ledvin. Postupně však dochází k expanzi amyloidových depozit, v důsledku ischemie glomerulů k jejich sklerotizaci a rozvoji intersticiální fibrózy ⁽¹⁶⁾. Amyloidóza ledvin sice může probíhat i asymptomaticky ⁽¹⁾, nejčastěji se

však manifestuje nefrotickým syndromem, nezářídka s proteinurií přesahující 10g/24 hod. Klinický obraz pak dotvářejí komplikace související s rozvinutým nefrotickým syndromem: větší sklon k infekcím (z důvodu ztrát imunoglobulinů do moči a zvýšené kongesci tkání při retenci tekutin), tromboembolické příhody (intravaskulární dehydratace při hypalbuminemii, ztráty antitrombinu III do moči, zvýšená syntéza fibrinogenu) a často přítomná refrakterní anemie i při normálních renálních funkcích (ztráty transferinu do moči). Případné snížení glomerulární filtrace nesouvisí pouze s infiltrací glomerulů amyloidem, ale je závislé i na stupni intersticiální fibrózy a tubulární atrofie ⁽¹⁷⁾.

Při AA amyloidóze bývají játra postižena až u 90% nemocných a asi u 50% (stejně jako u AL amyloidózy) je zjištěna hepatomegalie ⁽¹⁾. Klinické známky postižení jater jsou u obou typů amyloidózy málo frekventní a jen velmi zřídka dochází k rozvoji portální hypertenze nebo hepatálního selhání. Byl ovšem zaznamenán i případ úmrtí na subakutní fulminantní jaterní selhání, kde byla stanovena diagnóza AA amyloidózy post mortem ⁽¹⁸⁾. Literatura popisuje i spontánní ruptury jater ⁽¹⁹⁾.

Slezina bývá časně infiltrována amyloidem. Uvádějí se případy atraumatické ruptury sleziny, někdy i jako první známka postižení amyloidózou ⁽²⁰⁾.

Depozice amyloidu v myokardu je nejčastější příčinou restriktivní formy kardiomyopatie. U AA amyloidózy je méně častá, než u AL (60% vs. 90%). Může vést k srdečnímu selhání a je příčinou úmrtí většiny nemocných s AA (i AL) amyloidózou ⁽¹⁾. Poměrně často se můžeme setkat u těchto nemocných s maligními arytmiemi, různými převodními poruchami a raménkovými blokádami.

Systémové amyloidózy postihují i řadu dalších orgánů. V gastrointestinálním traktu se můžou amyloidová depozita vyskytnout v celé jeho délce od dutiny ústní až po rektum. Infiltrace jazyka amyloidem se manifestuje jako makroglosie; v jícnu může dojít k dilataci až atonii, byly popsány žaludeční polypy, střevní obstrukce

nebo ulcerace ⁽²¹⁾. Nejvíce bývá infiltrováno tenké střevo s projevy malabsorpčního syndromu, průjmy, steatorheou ⁽²¹⁾.

Postižení nadledvin bývá příčinou adrenální insuficience, která může vyústit až v Addisonovu chorobu.

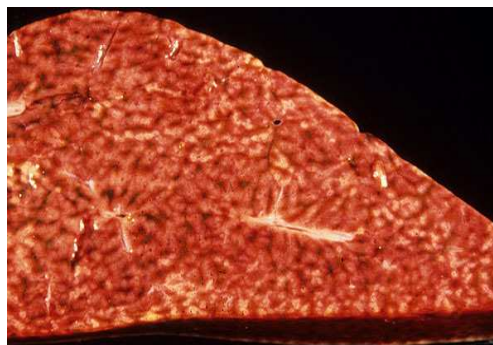
Častá je progredující senzorická periferní neuropatie, postižení autonomního nervstva se může spolupodílet na ortostatických hypotenzích ⁽²⁾.

Kůže bývá postižená poměrně často, u AA amyloidózy asi ve 40% ⁽¹⁾. Nejčastější je charakteristická kožní purpura v důsledku postižení cévních struktur podkoží.

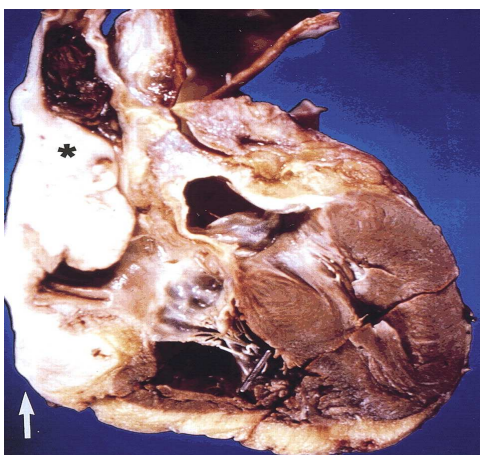
Vyskytuje se i amyloidová myopatie a spondylartropatie. Pro amyloidózu je typická artropatie ramenního kloubu, známá jako příznak „vycpaného ramene“ – shoulder pad sign (obr.5) ⁽¹⁾.



Obr.2. Amyloidóza ledviny
(<http://research.vet.upenn.edu>)



Obr.3. Játra infiltrovaná amyloidem
(<http://research.vet.upenn.edu>)



Obr.4. Amyloidóza myokardu
(<http://radiographics.rsna.org>)



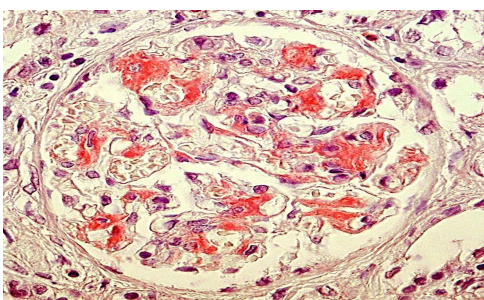
Obr.5. Příznak vycpaného ramene
(<http://content.nejm.org>)

Diagnostické možnosti průkazu amyloidózy

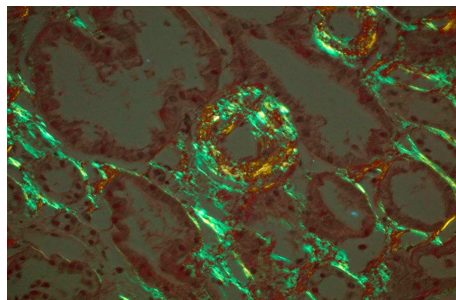
Diagnózu amyloidózy je možno definitivně stanovit na základě histologického vyšetření vzorku tkáně z postiženého orgánu. Materiál k hodnocení se získává nejčastěji biopsií ledviny nebo střevní sliznice při endoskopickém vyšetření kolon, méně často se používá aspirace tukové tkáně či endomyokardiální biopsie; vzorky lze získat i z jazyka, gingivy nebo jater.

Základní barvení užívané k průkazu amyloidu ve tkáni je kongo červeň, při kterém se amyloidová depozita jeví jako oranžovo-červené okrsky amorfni hmoty bez hypercelularity (obr.6).

Při pozorování v polarizačním mikroskopu umožňuje orientační rozdělení vzorků na AA a AL amyloid předchozí oxidace preparátů manganistanem draselným. AA amyloid po vystavení účinku manganistanu draselného a následném obarvení kongo červení ztrácí charakteristický dichroismus (zelený dvojlom) – obr. 7. V dnešní době se ale již tento způsob diferenciací AA a AL amyloidózy považuje za obsolentní.

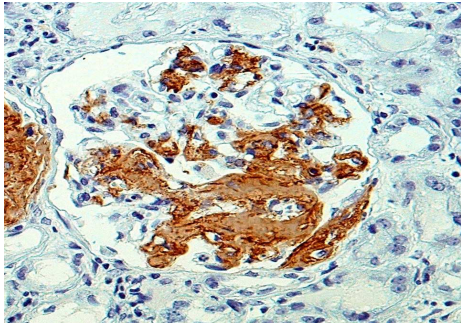


Obr.6. Amyloid, kongo červeň
(glomerulus, archiv autorky)

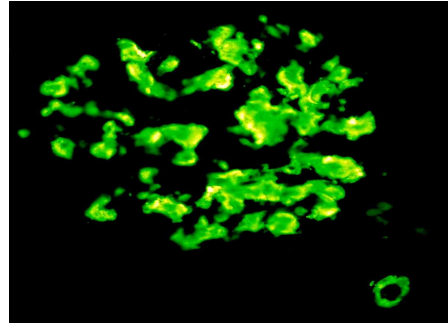


Obr.7. Zelený dvojlom (artérie
a intersticiium, archiv autorky)

K přesnému určení jednoho ze dvou nejčastěji diagnostikovaných typů amyloidózy (AL nebo AA) se v praxi mnohem více využívá imunofluorescence a imunohistochemie (obr.8, 9), kdy za použití specifické protilátky (anti-AA, anti- λ , anti- κ) detekujeme fibrilární komponentu amyloidu.



Obr.8. Imunohistochemický průkaz AA amyloidu (glomerulus s masivním postižením arterioly, archiv autorky)



Obr.9. Imunofluorescenční průkaz AA amyloidu (protilátka proti AA amyloidu, archiv autorky)

Při odhalování rozsahu postižení jednotlivých orgánů se uplatňuje zejména scintigrafie. Za tímto účelem se používají jednak ^{123}I -SAP, ^{131}I -SAP, nebo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aprotinin (inhibitor proteáz), kdy se tyto látky vychytávají v amyloidových depozitech. Tato vyšetření mají velký význam zejména v monitoraci úspěšnosti léčby, kdy pozorujeme pokles aktivity izotopu. U postižení myokardu je možno při echokardiografickém vyšetření pozorovat obraz tzv. „sparkling myocardium“ – jiskřícího myokardu. Diagnózu amyloidózy myokardu lze podpořit i magnetickou rezonancí (známky restriktivní kardiomyopatie se ztluštěním stěn septa a zadní stěny a sníženou compliancí svaloviny).

AA amyloidóza (sekundární, reaktivní)

AA amyloidóza vzniká v důsledku dlouhodobého působení chronického zánětlivého procesu různé povahy v organismu. Patogeneze tvorby amyloidu je blíže popsána v části týkající se SAA (sérový amyloid A), diagnostika a klinický obraz byly zmíněny výše.

Onemocnění, která bývají nejvíce komplikována rozvojem AA amyloidózy, patří do skupiny revmatických chorob – revmatoidní artritida (RA), juvenilní chronická artritida (JCA), ankylozující spondylartritida (AS), dále pak nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), bronchiektazie, tuberkulóza, osteomyelitidy. V zemích Balkánu je nejčastější příčinou reaktivní amyloidózy familiární středozevní horečka (FMF – Familial Mediterranean Fever). V postmortálních studiích je incidence amyloidózy u nemocných s revmatickými onemocněními velmi variabilní a kolísá mezi 5-60%. Přibližně 10% nemocných s revmatoidní artritidou umírá na komplikace, které souvisejí s přítomností amyloidózy⁽²²⁾.

Terapie AA amyloidózy

Dosud není dostupná terapie, která by specificky odstranila amyloidová depozita, a současná terapeutická strategie v léčbě amyloidózy obecně je zaměřena na redukcí dodávky fibrilárních proteinových prekurzorů za současné podpory či náhrady funkce postižených orgánů⁽²³⁾.

V případě AA amyloidózy je hlavní snahou alespoň potlačit základní proces s následným snížením aktivity zánětu a zmenšením produkce cytokinů vedoucích ke zvýšené tvorbě SAA. Určitá šance na vylepšení AA amyloidózy existuje u zánětlivých onemocnění, která lze vyřešit chirurgicky (bronchiektazie, osteomyelitida, resekce části střeva u Crohnovy choroby).

Velmi problematické je zabránit rozvoji amyloidózy u nemocných s revmatickými onemocněními, především u vyšších stadií seropozitivní RA, AS a JCA. Doporučovaná léčebná schémata obsahují většinou malou dávku kortikosteroidů v kombinaci s různými cytotoxickými léky (alkylační: chlorambucil, cyklofosamid, antimetabolity: metotrexát, azathioprin). Spíše ojediněle lze použít cyklosporin A (i vzhledem k jeho

schopnosti snížit proteinurii). Mezi nespecifickou terapií rovněž řadíme kolchicin, který může až o 30% redukovat proteinurii a současně tlumit i zánětlivé procesy (stabilizací leukocytárních mikrotubulů a inhibicí uvolňování proteáz). Z hlediska maximálního ovlivnění základního onemocnění se jako nejefektivnější jeví biologická terapie, která se zaměřuje především na inhibici produkce cytokinů: tumor nekrotizujícího faktoru α - TNF- α (chimerická protilátka - infliximab, plně humánní protilátka - adalimumab, solubilní receptor - etanercept) a interleukinu 1 (antagonista receptoru – anakinra). Byly reportovány velmi dobré výsledky s použitím humánní protilátky proti receptoru pro interleukin 6 (tocilizumab) v Japonsku u AA amyloidózy při aktivní JCA ⁽²⁴⁾. Z preparátů zaměřených na depleci B lymfocytů se používá anti-CD20 protilátka (chimerická – rituximab, humánní – ocrelizumab). Na principu inhibice kostimulačních molekul, které se uplatňují při aktivaci T lymfocytů, funguje abatacept - fúzovaná molekula přirozeně se vyskytujícího CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) s molekulou IgG1, tedy CTLA-4Ig. Další slibnou léčebnou skupinou jsou mimetika s efektem glykosaminoglykanů, která vytěsňují heparan-sulfát z vazby na SAA a tím inhibují tvorbu fibrilárních agregátů, jako eprodisát sodný. Ve studii Dember z roku 2007 bylo potvrzeno, že eprodisát zpomaluje progresi renální insuficience u nemocných s AA amyloidózou ledvin ⁽²⁵⁾.

Aktuální je i otázka alogenní transplantace kostní dřeně, která se u některých nehematologických diagnóz provádí (zejména JCA, RA a systémová sklerodermie). Problémem je ale neúplná remise onemocnění v řadě případů; rekurence onemocnění do 18 měsíců je pozorována u 3/4 pacientů ⁽²⁶⁾.

U refrakterních nemocných s těžkým nefrotickým syndromem, u nichž jsme vyčerpali dostupné léčebné možnosti, je někdy nutné z důvodu zabránění fatálním komplikacím provést nefrektomii. Tím se sníží ztráty bílkovin do moči a pacienta lze vyvést z těžkého katabolizmu. Lze uskutečnit jednak "medikamentózní nefrektomii" za použití látek snižujících glomerulární filtraci - nejčastěji nesteroidních antiflogistik

(NSAID) nebo vyšších dávek cyklosporinu A; další možností je pak embolizace renální arterie nebo přímo otevřená nefrektomie. Transplantace ledviny se běžně neprovádí, neboť je spojena s velkým rizikem rekurence onemocnění (30-50%).

SAA (sérový amyloid A)

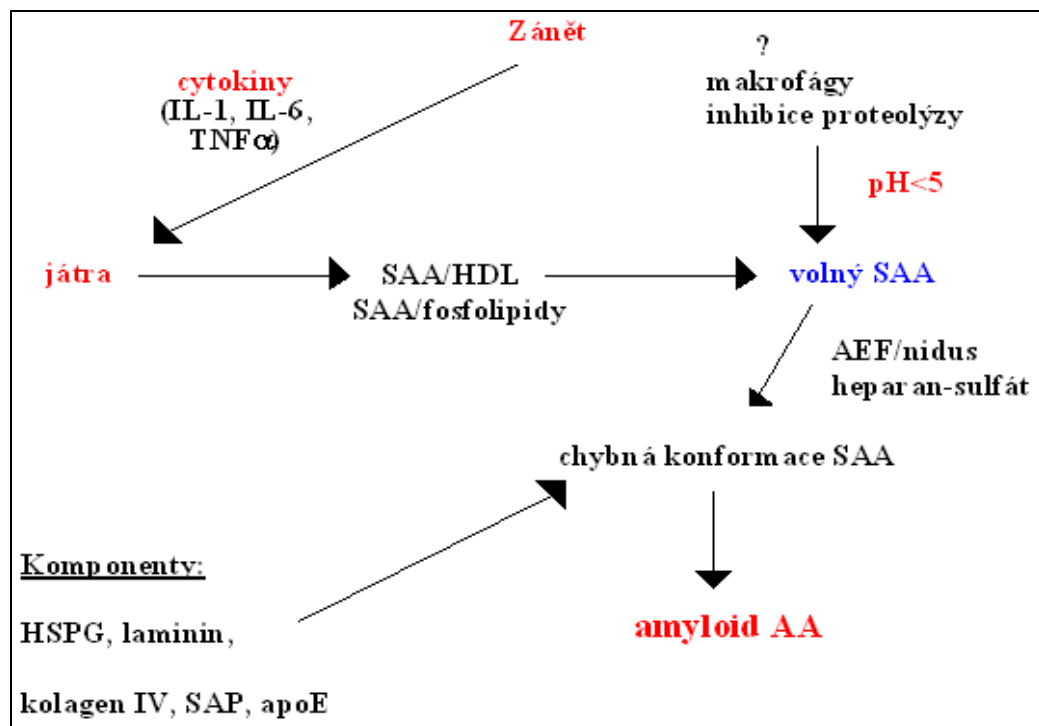
SAA je fibrilárním cirkulujícím prekurzorem amyloidových depozit u AA amyloidózy (obr.10). Jedná se o látku velmi podobnou C-reaktivnímu proteinu (CRP), která spolu s ním patří do rodiny proteinů akutní fáze. Obsahuje 104 aminokyseliny. Chronický zánětlivý proces vede prostřednictvím stimulace monocyto-makrofágového systému k zvýšení sekrece interleukinu -1β (IL- 1β), TNF- α a IL-6. Játra na tento podnět reagují zvýšením sekrece proteinů akutní fáze, tzn. i SAA (obr.11).

SAA je v krvi transportován ve vazbě na HDL lipoprotein. HDL je směřován do oblasti zánětu, kde se z poškozených buněk uvolňuje velké množství cholesterolu. Ve tkáních pak je SAA vylučován z cirkulace a působením leukocytárních proteáz (především cathepsinu B) ⁽²⁷⁾ a za pomoci glykosaminoglykanů se přeměňuje na amyloid A (má již jen 76 aminokyselin). Pokud bychom cathepsin zablokovali některým z inhibitorů proteolýzy (např. pepstatinem), dojde k rychlému vzniku amyloidových depozit, což se využívá u experimentálních modelů AA amyloidózy ⁽²⁸⁾. V experimentálních pracích se ukázalo, že tento proces se děje převážně intracelulárně v aktivovaných monocytech a za významného přispění IL- 1β a interferonu γ - IFN- γ ⁽²⁹⁾. V této práci byly CD14+ buňky (periferní monocyty) kultivovány s SAA a následně byla stanovována aktivita reziduálního SAA pomocí anti-SAA protilátky. Ukázalo se, že za bazálních podmínek je intracelulární koncentrace SAA nulová. Pokud se ale CD14+ buňky před kultivací s SAA vystavily účinku IL- 1β a/nebo IFN- γ , byla následně v kultuře monocytů detekovatelná poměrně vysoká koncentrace SAA. Z toho vyplývá, že pod vlivem

působení některých prozánětlivých cytokinů nedochází ke kompletní degradaci SAA v monocytech a to vede k jeho kumulaci v těchto buňkách a následně ve tkáních, které infiltrují. Jiné práce prokázaly, že navázání heparan-sulfátu na SAA vedoucí ke změně terciární struktury na formaci β -skládaného listu, je kritickým krokem k amyloidogenezi ⁽³⁰⁾. Následné konformační změny vyvolané navázáním heparan-sulfátu na SAA mohou snižovat jeho vnímavost vůči proteolýze. Heparan-sulfát navíc váže i cathepsin B ⁽³¹⁾, důsledkem čehož je snížení jeho proteolytické aktivity a tedy další inhibice kompletní proteolýzy SAA.



Obr.10. Struktura SAA (www.molecularstructure.org)



Obr.11. Patogeneze tvorby amyloidu AA (upraveno dle Ryšavé)

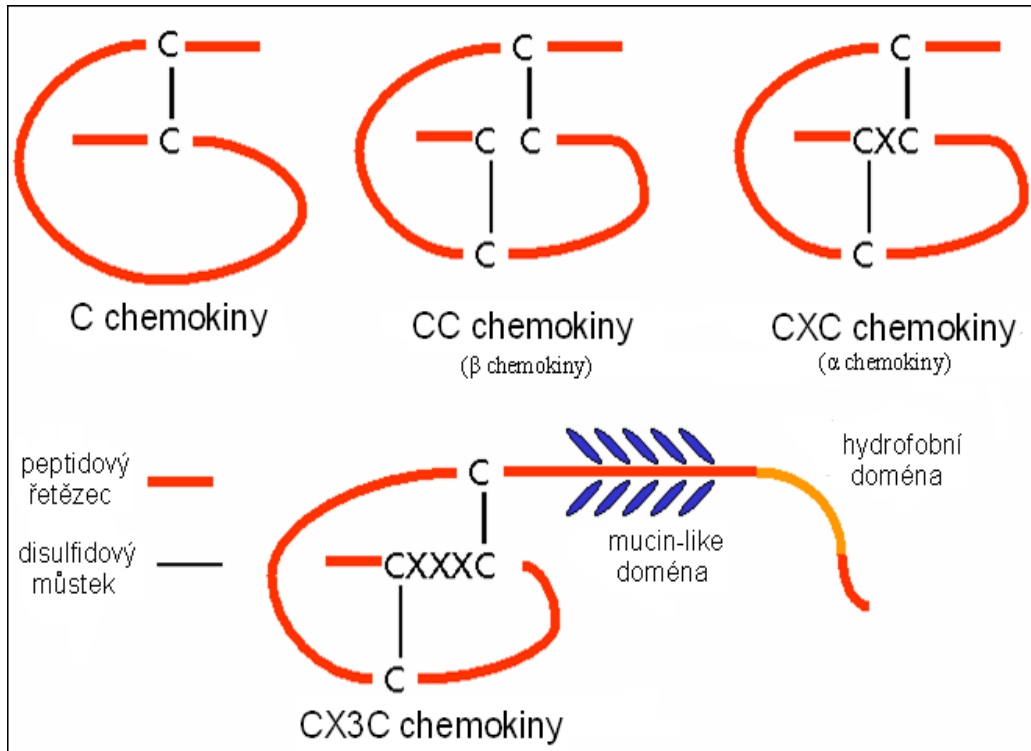
Chemokiny

Chemokiny jsou nízkomolekulární heparin vázající molekuly secernované jednak buňkami imunitního systému, jednak i dalšími buňkami různých tkání. Jsou to polypeptidy o molekulové hmotnosti 8 až 15 kDa, které jsou tvořené 70–400 aminokyselinami a mají schopnost chemotakticky působit na buňky imunitního systému. Dnes je známo více než 50 chemokinů, které se dělí do 4 skupin podle počtu a pozice cysteinových zbytků na NH₂-terminálním konci polypeptidu (obr.12). Tyto čtyři skupiny chemokinů se odlišují jak strukturně, tak i funkčně. Každá skupina má schopnost chemotaxe jiných typů leukocytů: CC chemokiny jsou chemotaktické především pro monocyto-makrofágy a lymfocyty, zatímco CXC chemokiny jsou chemotaktické hlavně pro neutrofilu.

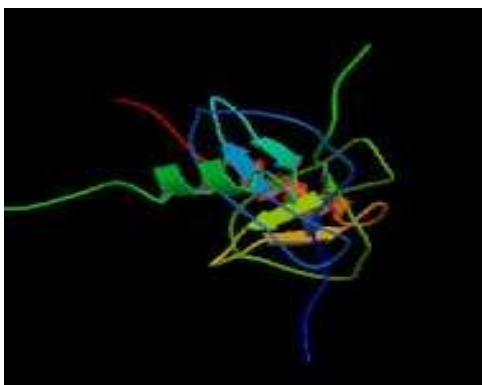
Dvě největší skupiny chemokinů jsou CXC chemokiny (α chemokiny) se dvěma cysteinovými zbytky (cys 1 a cys 2) oddělenými jednou aminokyselinou a CC chemokiny (β chemokiny) se dvěma cysteinovými zbytky v přilehlé pozici. Každá skupina chemokinů interaguje s rodinou receptorů asociovaných s trimerními G-proteiny, které jsou exprimovány především na leukocytech⁽³²⁾.

Chemokiny se účastní patogeneze mnoha autoimunitních zánětlivých onemocnění. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, obr.13) a MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , obr.14) byly nalezeny v synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou⁽³³⁾, v mozkomíšním moku nemocných trpících roztroušenou sklerózou⁽³⁴⁾ nebo v lavážní tekutině z dýchacích cest u pacientů s aktivním bronchiálním astmatem⁽³⁵⁾. V případě MCP-1 byl prokázán výskyt významně vyšších koncentrací jak v séru, tak i v synoviální tekutině nemocných s RA ve srovnání s jinými druhy artritidy⁽³⁶⁾, naproti tomu MIP-1 α byl u těchto nemocných nalezen ve zvýšené koncentraci pouze v synoviální tekutině, nikoli v séru⁽³³⁾, nicméně též jen v případě revmatoidní (a ne jiné) artritidy. V patogenezi mnoha infekčních onemocnění se tyto chemokiny uplatňují nejen jako chemoatraktanty

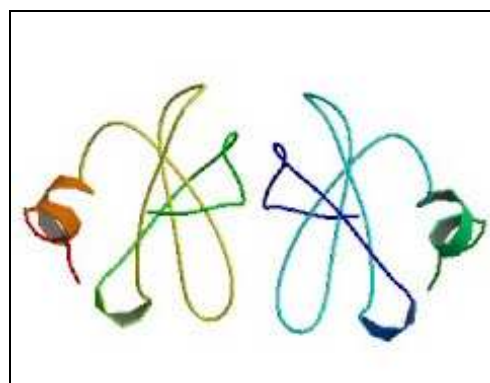
buněk imunitního systému, ale i jako koreceptory pro vstup virů do buněk.



Obr.12. Struktura chemokinů (upraveno dle Kohidaie)



Obr.13. Struktura MCP-1
(www.molecularstructure.org)

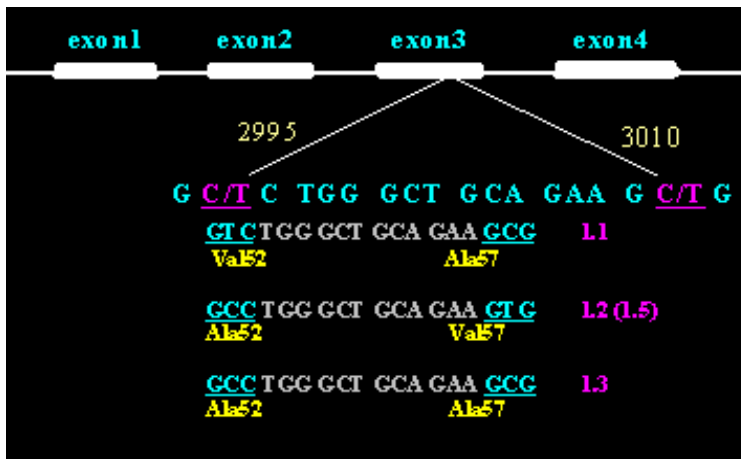


Obr.14. Struktura MIP-1 α
(www.molecularstructure.org)

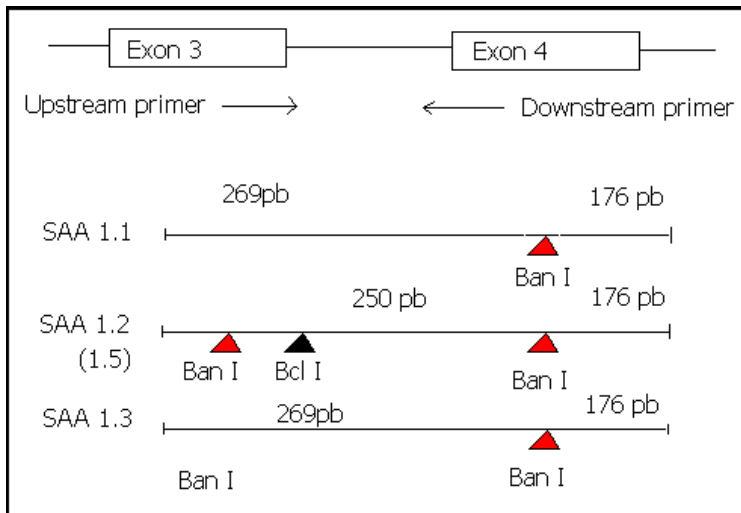
HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

SAA polymorfismy

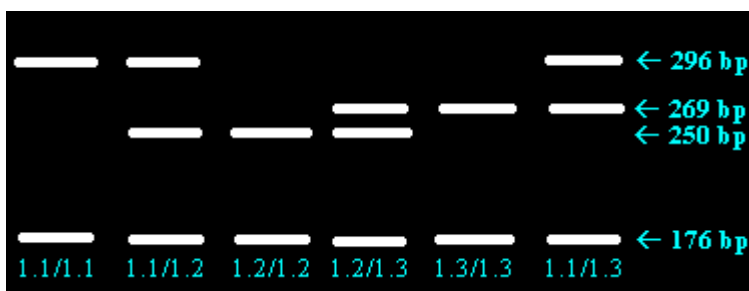
SAA je kódován 4 geny, které všechny jsou lokalizovány na krátkém raménku 11. chromozómu (p15.1). Cirkulující protein akutní fáze A-SAA je z 90% produktem genu SAA1 a SAA2. SAA3 je pseudogen bez proteinového produktu. Produktem SAA4 genu je tzv. konstitutivní SAA (C-SAA), který je minimálně ovlivnitelný cytokinovou stimulací a prakticky se neúčastní amyloidogeneze⁽³⁷⁾. Některé studie již poukázaly na důležitý vliv polymorfismů v exonu 3 genu pro SAA1 (obr.15) na přítomnost AA v různých populacích nemocných. Jedná se o dva single-nucleotide polymorfismy (v délce restrikčních fragmentů) C2995T a C3010T, jejichž možnými kombinacemi jsou dány tři haplotypy: 1.1 (2995T-3010C), 1.2 (2995C-3010T) a 1.3 (2995C-3010C)⁽³⁸⁾, a tedy 6 možných genotypů (obr.16, 17). Přítomnost haplotypu 1.1 byla výrazně častěji zastižena v kavkazské populaci (90%) nemocných s AA a jeví se jako rizikový faktor pro rozvoj AA amyloidózy^(39,40), u Japonců byla častější přítomnost haplotypu 1.3 a pozitivita 1.1 byla spojena s protektivním vlivem na vznik AA amyloidózy⁽⁴¹⁾. Adekvátní vysvětlení pro tyto nálezy dosud není. Nemocní s nejvyššími hladinami SAA v plasmě byli nositeli haplotypu 1.5, pravděpodobně v důsledku zpomalené degradace tohoto genového produktu^(42,43).



Obr.15. Schéma struktury části genu pro SAA1 a lokace SNP (Upraveno dle J.Arijo)



Obr.16. Schéma oblasti genu pro SAA1 pro PCR a místa pro restrikci (Upraveno dle T.Yamada)



Obr.17. 6 možných genotypů SAA1 – schéma elektroforetického nálezu

MCP-1 a MIP-1 α polymorfismy

Gen pro MCP-1 je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 17 (q11.2-q12). Již v roce 1999 byl publikován vliv SN (single nucleotide) polymorfismu MCP-1 (-2518 A na G) na transkripční aktivitu regulačního úseku genu a následnou produkci MCP-1⁽⁴⁴⁾. Jedná se o polymorfismus délky restričních fragmentů, kdy za přítomnosti adenosinu v pozici -2518 nedochází ke štěpení za použití restriktázy Pvu II, ale v přítomnosti guaninu ano.

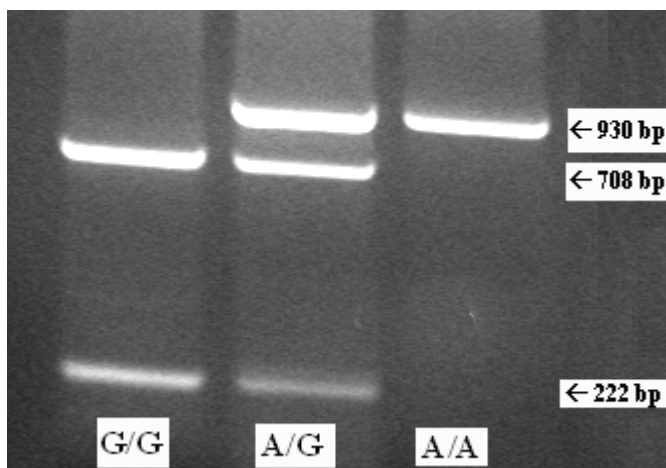
Gen pro MIP-1 α se nachází také na chromozómu 17 (q12). Uvnitř promotoru tohoto genu byla nalezena dinukleotidová mikrosatelitní repetice začínající na pozici -906⁽⁴⁵⁾, jejíž poloha z ní činí dobrý marker pro asociační a vazebné studie u zánětlivých onemocnění. Jedná se o dvě alely, z nichž delší obsahuje o dva páry bazí v repetici více.

Polymorfismy genů pro MCP-1 i MIP-1 α byly vyšetřovány u řady imunopatologických stavů – revmatoidní artritida (RA), systémový lupus erytematoses (SLE), sarkoidóza. Ve většině případů nebyla nalezena přímá asociace mezi přítomností daného genotypu a rozvojem onemocnění, ale bylo možné najít vztah mezi např. aktivitou onemocnění či určitými fenotypickými rysy a daným genotypem. Příkladem může být přítomnost A/G či G/G na pozici -2518 u MCP-1 asociovaná s přítomností kožní vaskulitidy u nemocných se SLE⁽⁴⁶⁾. Jiná práce ale dokládá vliv přítomnosti alely G na riziko rozvoje SLE v kavkazské populaci, ale nikoli afroamerické, i když právě u afroamerických nemocných byly nalezeny významně vyšší hladiny MCP-1⁽⁴⁷⁾. U nemocných s Crohnovou chorobou je naopak přítomnost G/A či G/G genotypu spojena s významně nižším výskytem závažnějších forem onemocnění a pozdějším začátkem choroby⁽⁴⁸⁾. U RA byl G/G genotyp významně častěji nalezen u seronegativních nemocných v porovnání se seropozitivními či zdravými kontrolami⁽⁴⁹⁾. G/G genotyp byl identifikován jako významný rizikový faktor pro vznik syndromu karpálního tunelu u dialyzovaných nemocných⁽⁵⁰⁾.

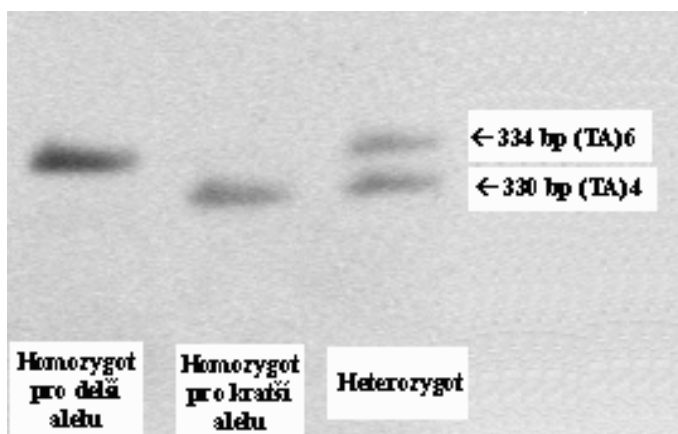
či udržování aktivity plicního postižení (posuzováno dle diferenciálního rozpočtu elementů z BAL) u nemocných se sarkoidózou ⁽⁵¹⁾.

A/A genotyp byl naopak asociován se zvýšením plasmatických i močových hladin MCP-1 u nemocných se SLE ⁽⁵²⁾.

Dle dostupné literatury nejsou k dispozici informace týkající se výskytu daných MCP-1 genotypů u nemocných s AA amyloidózou (kromě výše zmíněné studie u dialyzovaných nemocných). Hodně se naopak vyšetřuje souvislost s Alzheimerovou nemocí. Pokud by se např. potvrdil předpoklad, že G/G genotyp by byl spojen s časnějším výskytem a závažnějším průběhem AA amyloidózy, pak by to mohlo mít i své terapeutické konsekvence (agresivnější léčba i u laboratorně „mírnějších“ forem RA). Níže jsou uvedené elektroforetické obrazy možných genotypů daných polymorfismů (obr. 18, 19).



Obr.18. 3 možné genotypy MCP-1 – elektroforetický nále



Obr.19. 3 možné genotypy MIP-1α – elektroforetický nále

Cíle práce

Cíle této práce vycházejí z uvedených hypotéz a jsou následující:

1. určit incidenci níže uvedených polymorfismů, resp. incidenci haplotypů a genotypů ve vyšetřovaných genech u nemocných s AA amyloidózou, v kontrolní skupině nemocných s RA a ve skupině zdravých kontrol. Vyšetřované polymorfismy jsou následující: v genu pro SAA 1 v exonu 3 dva single-nucleotide polymorfismy (v délce restrikčních fragmentů) C2995T a C3010T, v regulačním úseku genu MCP-1 single nucleotide polymorfismus A-2518G a dinukleotidová mikrosatelitní repetice začínající na pozici -906 uvnitř promotoru genu pro MIP-1 α .
2. stanovit sérové koncentrace SAA, MCP-1 a MIP-1 α jako výsledných produktů činnosti jednotlivých genů v obou skupinách nemocných a u zdravých kontrol
3. prozkoumat závislost výše sérové koncentrace jednotlivých působků na přítomnosti určitého genotypu či polymorfismu ve všech vyšetřovaných skupinách
4. prozkoumat možné asociace mezi přítomností AA amyloidózy a druhem přítomného polymorfismu jednotlivých genů ve skupině nemocných s AA amyloidózou
5. identifikovat ve skupině nemocných s AA amyloidózou případnou závislost mezi jednotlivými genotypy (a produkty jednotlivých genů) a některými dalšími laboratorními parametry (sérový kreatinin, CRP, proteinurie), které vypovídají o rozsahu postižení orgánů a o aktivitě AA amyloidózy

SOUBOR VYŠETŘOVANÝCH A METODIKA

Soubor vyšetřovaných

Za účelem zjištění polymorfismů zmiňovaných genů a stanovení sérových hladin příslušných proteinových produktů byly shromážděny vzorky krve a sér pacientů s AA amyloidózou, pacientů s RA a zdravých kontrol.

Soubor pacientů s AA amyloidózou byl tvořen 43 pacienty (21 mužů, 22 žen) s histologicky ověřenou diagnózou (převážně z renální biopsie, méně často z rektální biopsie). Průměrný věk ve skupině byl 55,4 let (20-82 let). Průměrná doba trvání primárního onemocnění (počítáno u nemocných, u kterých bylo primární onemocnění známé včetně přibližné délky jeho trvání) byla 19,6 let ($\pm 9,9$ let). V době diagnózy nemělo žádnou léčbu základního onemocnění 25% pacientů. Dle ověřených informací zemřelo 18,6% pacientů, v průměru po 15 měsících (4-47 měsíců) od stanovení diagnózy AA amyloidózy. Další charakteristiky skupiny pacientů s AA amyloidózou viz tab.1, 2.

Skupina pacientů s RA byla tvořena 50 pacienty (13 mužů, 37 žen) s průměrným věkem 60,6 let (34-86 let). Specifickou léčbu RA mělo 74% pacientů.

Kontrolní skupina byla tvořena 100 zdravými dobrovolníky (bez chronických zánětlivých onemocnění), průměrného věku 48,3 let (27-83 let), z toho žen bylo 56.

Metodika

Vzorky krve byly odebírány za bazálních podmínek, t.j. ráno nalačno. DNA byla izolovaná na izolační lince QIAcube firmy QIAGEN a následně skladována při +4°C. Séra byla skladována při -80°C.

Vyšetření polymorfismů probíhalo následovně: zkoumaná část vlákna DNA byla namnožena za použití polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction - PCR). Roztok pro jednotlivé reakce obsahoval: 38 µl vody (aqua pro injectione), 5 µl pufru (Tris-HCl s obsahem síranu amonného), 3-4 µl roztoku chloridu hořečnatého, 1 µl roztoku obsahujícího jednotlivé nukleotidy. Roztok obsahující oligonukleotidové primery se přidával v množství 0,5 µl, vzorek zkoumané DNA v množství 1 µl a polymeráza v množství 1,2 µl. Byly použity následující primery od firmy Generi Biotech: *465A8 SAA1R 20-mer 5'-TGC CCA AAG AAT CTC TGG AT-3', *465A7 SAA1F 20-mer 5'-ATG ATG CTG CCA AAA GGG GA-3', *449S1 MCP1R 20-mer 5'-CTG CTT TGC TTG TGC CTC TT-3', *449S0 MCP1F 20-mer 5'-CCG AGA TGT TCC CAG CAC AG-3', *449S3 MIP1AR 27-mer 5'-TCA GTG GTT AAA AAA AGC AAG ATA CGA-3', *449S2 MIP1AF 26-mer 5'-TGT ATT TTT TTC CAT GCT TAG GGT TG-3'. Pro použití byly primery naředěné na koncentraci 100 pmol/ µl dle pokynu dodavatele. Jako polymeráza byla použita rekombinantní Taq DNA polymeráza dodávaná firmou Fermentas (koncentrace 1u/ul, zdroj buňky *Escherichia coli* nesoucí klonovaný pol gen z *Thermus aquaticus*, #EP0404). Tato polymeráza je vysoce termostabilní, poločas enzymu je více než 40 minut při teplotě 95°C. Katalyzuje syntézu DNA 5'→3'. Jedná se o obecně nejvíce používanou polymerázu pro PCR. Průběh reakce byl následující: úvodní denaturace 5 minut při teplotě 95°C, poté 30-sekundové cykly denaturace (95°C), anelace – nasedání primerů na vlákna DNA (48-60°C) a elongace – prodlužování primerů (72°C), které se opakovaly 35 – 45-x, s následnou 5-minutovou závěrečnou elongací.

V případě genů pro SAA1 a MCP-1 se jednalo o polymorfismy v délce restričních fragmentů (restriction fragments length polymorphisms -

RFLP). Použité byly restriktázy firmy Fermentas: BclI (koncentrace 10u/ul, zdroj Bacillus caldolyticus, #ER0721) a BshNI (koncentrace 10u/ul, zdroj Bacillus sphaericus, #ER1001) pro SAA1 a PvuII (koncentrace 10u/ul, zdroj Proteus vulgaris, #ER0631) pro MCP-1. Namnožená vlákna DNA byla inkubovaná s příslušnými restriktázami při teplotě 37°C po dobu 16 hodin. Následná vizualizace spočívala v obarvení PCR-produktu za použití barviva s přídavkem ethidium bromidu (5 µl roztoku namnožené DNA a 3 µl barvy), nanesení na 2%-ní agarózu a provedení elektroforézy (30 minut). V případě polymorfismu genu MIP-1 α (rozdíl v počtu mikrosatelitních repetic) byly namnožené úseky DNA obarvené a přímo vizualizované vertikální elektroforézou na 6% polyakrylamidovém gelu (4-6 hodin).

Sérové koncentrace SAA, MCP-1 a MIP-1 α byly stanoveny metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) za použití kitů dodávaných firmou Biosource Int. Vzorky byly stanovovány v doubletech podle postupů doporučených dodavatelem.

Statistické zpracování

Výsledky jsou uváděny v procentech – v případě zastoupení jednotlivých genotypů, resp. jako medián, minimum a maximum v případě sérových hladin. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu a χ^2 testu. K posouzení vztahů mezi jednotlivými parametry byl stanovován korelační koeficient dle Spearmana. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

U skupiny nemocných s AA amyloidózou bylo nalezeno signifikantně vyšší zastoupení genotypu 1.1/1.1 pro SAA 1 ve srovnání se skupinou nemocných s RA i se skupinou zdravých kontrol ($p < 0,001$). Statisticky významné rozdíly v zastoupení dalších genotypů nalezeny nebyly. Stejně tak se nelišilo zastoupení genotypu 1.1/1.1 (ani ostatních) mezi nemocnými s RA a kontrolní skupinou (tab. 3, 4).

U dalších zkoumaných genotypů (MCP-1, MIP-1 α) nebyl v jejich zastoupení nalezen významný rozdíl napříč všemi skupinami. Podrobně jsou tyto výsledky zobrazeny v tabulkách 5, 6.

Hodnoty sérových koncentrací SAA, MCP-1 a MIP-1 α (průměr, medián, maximum, minimum) ve všech skupinách jsou přehledně uvedeny v tabulkách 7, 8, 9.

Sérové koncentrace SAA byly statisticky významně vyšší jednak ve skupině nemocných s AA amyloidózou, jednak i ve skupině nemocných s RA ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,001$). Mezi skupinami AA a RA nebyl nalezen významný rozdíl (tab.10). Ve skupině nemocných s AA amyloidózou bylo dále zjištěno, že pacienti s genotypem „non1.1“ (1.2/1.2, 1.3/1.3) mají ve srovnání s pacienty s genotypem 1.1/1.1 signifikantně vyšší hladiny SAA ($p < 0,05$, tab.11) – nicméně toto zjištění je třeba hodnotit s velkou opatrností vzhledem k dosti malému počtu nemocných s příslušnými genotypy v našem souboru (byli pouze tři).

Dále se významně ($p < 0,05$) lišila sérová koncentrace MCP-1 ve skupině nemocných s AA amyloidózou (byla vyšší) proti skupině s RA (tab.12).

V případě sérové koncentrace MIP-1 α byly rozdíly nepříliš daleko od hodnoty statistické významnosti ($p = 0,1$), nicméně při pohledu na hodnoty sérových koncentrací MIP-1 α uvedených v tab.9 je patrné, že je významný rozdíl mezi skupinami nemocných (kde jsou hladiny vyšší) a zdravými kontrolami. To, že tento rozdíl není statisticky významný, je dáno nejspíše velkým rozptylem naměřených hodnot v poměrně malém souboru nemocných (tab. 13). Ve skupině

nemocných s AA amyloidózou byly dále zkoumány i vztahy mezi zastoupením jednotlivých genotypů všech vyšetřovaných genů a hodnotami sérových koncentrací kreatininu, C-reaktivního proteinu a též výší proteinurie, ale nebyla mezi nimi nalezena žádná statisticky signifikantní závislost (výsledky nejsou uváděny).

DISKUSE

Při stanovování polymorfismů SAA1 bylo v našem souboru nemocných s AA amyloidózou prokázáno podstatně větší zastoupení homozygotů 1.1/1.1. Toto zjištění potvrzuje nálezy z jiných publikací, které byly výsledkem vyšetřování provedených v kavkazské populaci nemocných s AA amyloidózou (Booth et al. 1998, Yamada 2003) ^(39,40). Naopak v japonské populaci pacientů je zastoupení alely 1.1 výrazně nižší a má naopak spíše protektivní vliv na rozvoj AA amyloidózy (Moriguchi et al. 1999, Yamada et al. 1999) ^(41,42). Přítomnost alely 1.3 u japonské populace nemocných s RA byla vyhodnocena jako rizikový faktor pro rozvoj AA amyloidózy (Baba 1995, Nakamura 2003) ^(53,54). Dle jiné japonské studie (Nakamura 2005)⁽⁵⁵⁾ je navíc tato alela, a obzvláště pak homozygocie 1.3/1.3, univariantním prediktorem přežívání. Zatím nebylo podáno jednoznačné vysvětlení těchto demografických rozdílů.

V naší práci nebylo možné spolehlivě zhodnotit, zda je rozdíl v přežívání nemocných v závislosti na přítomnosti alely SAA 1.1 resp. 1.3 s ohledem na velmi malé zastoupení genotypu „non 1.1“. Nicméně by bylo jistě velmi zajímavé provést toto pozorování na větší skupině nemocných s AA amyloidózou (což by v našich podmínkách vyžadovalo nejspíše shromáždění údajů o pacientech z celé ČR a případně ze zahraničí). Naše výsledky nicméně potvrzují, že v kavkazské populaci je výskyt genotypu 1.1/1.1 u pacientů s AA amyloidózou významně vyšší nejen proti zdravé populaci, ale i ve srovnání s nemocnými s RA (jakožto

nejčastějším základním onemocněním predisponujícím ke vzniku AA amyloidózy). Lze tedy předpokládat, že tento genotyp by mohl být rizikovým faktorem pro rozvoj AA amyloidózy minimálně u české, ale pravděpodobně i v rámci kavkazské populace. Naše práce je první, která sledovala výskyt tohoto rizikového genotypu i u nemocných s RA. Doposud se studie na kavkazské populaci zabývaly pouze konstatováním, že genotyp 1.1/1.1 je častější u nemocných s AA amyloidózou a zmapování frekvence výskytu tohoto genotypu u pacientů s RA chybělo. S ohledem na výše zmíněnou hypotézu o potenciální rizikovosti genotypu 1.1/1.1 by si tato zaslouhovala další výzkum s větším souborem pacientů a rozšířením vyšetření i na další rizikové skupiny nemocných (např. nemocné s nespecifickými střevními záněty či chronickým infekčním fokusem). Vliv genotypu by mohl hrát zásadní roli při vzniku AA amyloidózy už i proto, že nebyl asociován v vyšších plasmatickými hladinami SAA (spíše naopak). Onemocnění u těchto jedinců tedy vzniklo, i když nebyli vystaveni vyšším hladinám prekursoru v porovnání s ostatními genotypy.

Sérové koncentrace SAA byly statisticky významně vyšší jak ve skupině nemocných s AA amyloidózou, tak i ve skupině pacientů s RA v porovnání se zdravou populací. Toto zjištění koreluje se známou patofyziologickou podstatou AA amyloidózy i RA, a není tedy nijak překvapivé. V souladu s literárními daty je i námi zjištěná výše sérové koncentrace SAA v případě přítomnosti haplotypu 1.2 (1.5), kdy u jediného nemocného v našem souboru byla tato hodnota druhá nejvyšší, přestože se jednalo o pacienta, u kterého nebylo nalezeno žádné vyvolávající onemocnění přes extenzivní vyšetřování. Práce van der Hilsta uveřejněna v roce 2008 prezentuje výsledky potvrzující zhoršenou degradaci SAA matrix-metaloproteinázou 1 u nemocných s haplotypem 1.2 (1.5), čímž vysvětluje i vyšší sérové hladiny SAA⁽⁵⁶⁾.

V případě genotypů MCP-1 a MIP-1 α nebyl mezi námi zkoumanými skupinami nalezen statisticky významný rozdíl v jejich zastoupení. Tento nálezný koresponduje s dostupnými literárními údaji⁽⁴⁷⁾, kde bylo popisováno srovnatelné zastoupení alel mezi nemocnými s RA a zdravými kontrolami u MCP-1 polymorfismu -2518 A to G. Dle našich

vědomostí dosud tyto polymorfismy (jak v genu pro MCP-1, tak i v genu pro MIP-1 α) u nemocných s AA amyloidózou vyšetřovány nebyly. Tím spíše zasluhuje pozornost nález námi zjištěných statisticky významně vyšších sérových koncentrací MCP-1 u nemocných s AA amyloidózou proti nemocným s RA. Taktéž dle našich výsledků byly vyšší hladiny MIP-1 α u nemocných s AA amyloidózou, ale i RA ve srovnání se zdravými kontrolami, ovšem pouze statisticky nevýznamně ($p=0,1$). V literatuře se uvádí výskyt vyšší hladiny MCP-1 u nemocných s RA ve srovnání s jinými druhy artritid ⁽³⁶⁾. Též se uvádí výskyt vyšších hladin MIP-1 α u nemocných s RA proti jiným druhům artritidy, ale pouze v synoviální tekutině ⁽³³⁾. S ohledem na rozmanité funkce chemokinů v patogenezi různých zánětlivých onemocnění lze pomýšlet i na možný vliv na rozvoj a průběh AA amyloidózy. Nález přesvědčivě vysokých hladin MCP-1 u nemocných s AA amyloidózou je o to více zajímavý, že je známý fakt, že při formování depozit amyloidu hrají dominantní roli makrofágy, uvnitř kterých dochází k degradaci prekurzorů na fibrily, a zde bychom tedy předpokládali spíše zvýšení koncentrace MIP-1 α . Role monocytů při formování amyloidových depozit není popsána zcela jednoznačně, i když jsou experimentální práce, které dokládají zhoršenou degradaci SAA v monocytech vlivem některých prozánětlivých cytokinů in vitro ⁽²⁹⁾ a lze předpokládat jejich potenciální podíl na rozvoji AA amyloidózy. Bylo by zajímavé ověřit si toto zjištění na větším souboru nemocných a také prozkoumat, zda zvýšení MCP-1 v séru je doprovázeno i vyšší koncentrací monocytů v séru a případně zvýšeným monocytárním infiltrátem v postižené tkáni ledviny. Pro ověření této hypotézy by však bylo nutné provést další výzkum

ZÁVĚRY

1. Dle našich předpokladů byla v našem souboru vyšetřovaných nalezena významná převaha homozygotů 1.1/1.1 v polymorfismu v exonu 3 genu pro SAA1 mezi nemocnými s AA amyloidózou. Rozdíl byl statisticky významný nejen ve srovnání se zdravými kontrolami, ale i ve srovnání se skupinou RA. Na základě těchto nálezů se lze domnívat, že v případě polymorfismů v exonu 3 genu pro SAA 1 C2995T a C3010T je homozygocie pro haplotyp 1.1 rizikovým faktorem pro rozvoj AA amyloidózy v kavkazské populaci.
2. Sérové koncentrace SAA byly dle očekávání zvýšené jak ve skupině nemocných s AA amyloidózou, tak ve skupině nemocných s RA. Naše výsledky korespondují i s literárními údaji o závislosti výše sérové koncentrace SAA na druhu haplotypu (u výše zmíněného genotypu „non1.1“ genu pro SAA 1 jsme našli zvýšené hladiny SAA). Tyto rozdíly v plasmatických koncentracích nicméně byly statisticky nevýznamné s ohledem na velmi nízký výskyt tohoto genotypu v souboru a tím na malý počet vyšetřených nemocných.
3. Zastoupení jednotlivých alel námi zkoumaných polymorfismů v genech pro MCP-1 a MIP-1 α se neliší u pacientů s RA nebo AA amyloidózou od zdravé populace.
4. V našem souboru vyšetřovaných nemocných byly nalezeny signifikantně vyšší sérové koncentrace MCP-1 ve skupině s AA amyloidózou proti skupině s RA. Tento nález nekoreluje s žádným z dalších vyšetřovaných parametrů a také na toto téma neexistují žádné dostupné literární údaje. K jeho potvrzení by bylo

potřeba dalšího výzkumu s větším počtem pacientů. Současně by bylo zajímavé provést korelaci zvýšené plasmatické koncentrace MCP-1 na počet monocytů v periferní krvi, což bychom rádi do budoucna rovněž zahrnuli do našeho dalšího výzkumu.

5. V naší práci bychom rádi pokračovali a kromě prozkoumání všech našich nálezů na větších skupinách nemocných plánujeme rozšířit naše obzory o další polymorfismy, např. polymorfismus v promotoru genu pro SAA 1 v pozici -13, který by mohl mít dle studie Moriguchiho z roku 2001 ještě silnější vliv na rozvoj amyloidózy než polymorfismy v exonu 3.

TABULKY

Tab. 1: Vyvolávající onemocnění u pacientů s AA amyloidózou

Vyvolávající onemocnění	Počet pacientů
Revmatoidní artritida	18
Chronické infekce	9
Ankylozující spondylitida	3
Crohnova choroba	2
Juvenilní chronická artritida	2
Psoriatická artropatie	1
Bronchiektázie	1
Ulcerozující kolitida	1
Sjogrenův syndrom	1
Behcetův syndrom	1
Eozinofilní fasciitida	1
Nejasné	3

Tab.2: Laboratorní parametry u pacientů s AA amyloidózou (průměr±SD)

Koncentrace sérového kreatininu ($\mu\text{mol/l}$)	230 (\pm 170)
Koncentrace celkové bílkoviny v séru (g/l)	54.8 (\pm 12.8)
Koncentrace albuminu v séru (g/l)	24.8 (\pm 8.5)
Koncentrace sérového CRP (g/l)	47.6 (\pm 12.5)
Hodnota glomerulární filtrace (ml/s)	0.7 (\pm 0.51)
Hodnota proteinurie (g/24 hodin)	6.7 (\pm 5.5)
Erytrocyturie přítomna	41%

Tab. 3: SAA 1 genotypy – zastoupení v jednotlivých skupinách

Skupiny	SAA 1 genotypy					
	1.1/1.1	1.1/1.2	1.1/1.3	1.2/1.2	1.2/1.3	1.3/1.3
AA amyloidóza (n=43)	88.3%	0.0%	4.7%	2.3%	0.0%	4.7%
RA (n=50)	42.0%	34.0%	6.0%	14.0%	0.0%	4.0%
Kontroly (n=100)	39.4%	29.3%	2.0%	13.1%	5.1%	11.1%

Tab. 4: SAA 1 genotypy – zastoupení alely 1.1 a srovnání mezi jednotlivými skupinami

Skupiny	SAA 1 genotypy		
	1.1/1.1	1.1/*	Ne 1.1
AA amyloidóza (n=43)	88.4%	4.6%	7.0%
RA (n=50)	42.0%	40.0%	18.0%
Kontroly (n=100)	39.4%	31.3%	29.3%

MINIMUM ESTIMATED EXPECTED VALUE IS 9.18
 STATISTIC VALUE D.F. PROB.
 PEARSON CHISQUARE 34.003 4 0.0000

Tab. 5: MCP-1 genotypy – zastoupení a srovnání mezi jednotlivými skupinami

Skupiny	MCP -1 genotypy		
	A/A	A/G	G/G
AA amyloidóza (n=43)	57.5%	35.0%	7.5%
RA (n=50)	58.0%	38.0%	4.0%
Kontroly (n=100)	48.9%	40.2%	10.9%

MINIMUM ESTIMATED EXPECTED VALUE IS 3.30
 STATISTIC VALUE D.F. PROB.
 PEARSON CHISQUARE 2.762 4 0.5984 - ns

Tab. 6: MIP-1 α genotypy – zastoupení a srovnání mezi jednotlivými skupinami

Skupiny	MIP -1 α genotypy		
	TA4/TA4	TA6/TA4	TA6/TA6
AA amyloidóza (n=43)	4.7%	32.6%	62.7%
RA (n=50)	8.7%	41.3%	50.0%
Kontroly (n=100)	10.0%	41.0%	49.0%

MINIMUM ESTIMATED EXPECTED VALUE IS 3.64
 STATISTIC VALUE D.F. PROB.
 PEARSON CHISQUARE 2.797 4 0.5924 - ns

Tab. 7: Sérové koncentrace SAA v jednotlivých skupinách

Skupiny	SAA (mg/mL)			
	Průměr	Medián	Minimum	Maximum
AA amyloidóza (n=30)	249.8	72.4	0.2	933.5
RA (n=50)	225.6	67.6	3.7	1055.9
Kontroly (n=30)	13.2	7.1	1.4	111.3

Tab. 8: Sérové koncentrace MCP-1 v jednotlivých skupinách

Skupiny	MCP-1 (pg/mL)			
	Průměr	Medián	Minimum	Maximum
AA amyloidóza (n=30)	393.2	398.5	87.5	756.0
RA (n=50)	271.0	240.5	0.0	797.9
Kontroly (n=30)	291.0	317.5	120.7	554.4

Tab. 9: Sérové koncentrace MIP-1 α v jednotlivých skupinách

Skupiny	MIP-1 α (pg/mL)			
	Průměr	Medián	Minimum	Maximum
AA amyloidóza (n=30)	657.2	32.8	0.0	4121.0
RA (n=50)	447.0	18.0	0.0	4107.8
Kontroly (n=30)	11.0	7.2	0.0	52.4

Tab. 10: Srovnání sérových koncentrací SAA mezi jednotlivými skupinami

COMPARISONS	ZSTAT	DIF	SE
AA vs. RA	0.36	-2.57	7.22
AA vs. kontroly	4.50***	37.44	8.33
RA vs. kontroly	5.13***	40.01	7.80

KRUSKAL-WALLIS TEST STATISTIC = 29.44.

LEVEL OF SIGNIFICANCE = 0.0000, $p < 0.001$ ***

USING CHI-SQUARE DISTRIBUTION WITH 2 DEGREES OF FREEDOM

Tab. 11: Sérové koncentrace SAA ve skupině nemocných s AA amyloidózou v závislosti na SAA 1 genotypu - srovnání

COMPARISONS	ZSTAT	DIF	SE
1.1/1.1 vs. 1.1/*	0.26	-1.97	7.69
1.1/1.1 vs. non1.1	2.56*	-16.30	6.37
1.1/* vs. non1.1	1.49	-14.33	9.62

KRUSKAL-WALLIS TEST STATISTIC = 6.55.

LEVEL OF SIGNIFICANCE = 0.0377, $p < 0.05$ *

USING CHI-SQUARE DISTRIBUTION WITH 2 DEGREES OF FREEDOM

Tab.12: Sérové koncentrace MCP-1 v jednotlivých skupinách – srovnání

COMPARISONS	ZSTAT	DIF	SE
AA vs. RA	2.94*	21.26	7.23
AA vs. kontroly	1.99	16.35	8.23
RA vs. kontroly	0.66	-4.91	7.39

KRUSKAL-WALLIS TEST STATISTIC = 8.84.

LEVEL OF SIGNIFICANCE = 0.0120, $p < 0.05$ *

USING CHI-SQUARE DISTRIBUTION WITH 2 DEGREES OF FREEDOM

Tab.13: Sérové koncentrace MIP-1 α v jednotlivých skupinách – srovnání

COMPARISONS	ZSTAT	DIF	SE
AA vs. RA	0.08	0.57	7.17
AA vs. kontroly	1.79	14.48	8.10
RA vs. kontroly	1.92	13.91	7.25

KRUSKAL-WALLIS TEST STATISTIC = 4.40.

LEVEL OF SIGNIFICANCE = 0.1108

USING CHI-SQUARE DISTRIBUTION WITH 2 DEGREES OF FREEDOM

POUŽITÁ LITERATURA

1. Sakalová, A, Mistrík, M, Rovenský, J. Systémová amyloidóza. In: Ďuriš, I, Hulín, I, Bernadič, M: Princípy internej medicíny. Bratislava, Slovak Academic Press, 2001, p. 1556-1564
2. Van Der Hem, GK, Van Rijswijk, MH. Amyloidosis. In: Cameron S, et al: Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford, NewYork, Tokyo, Oxford University Press 1992, p. 545-561.
3. Strejček, J. Amyloidóza. Fórum imunologie, 1995, 1:38-41.
4. Pettersson T, Konttinen YT, Maury CPJ. Treatment strategies for amyloidosis. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(12):2117-28
5. Pepys, M. Serum amyloid P component. Structure, function and role in amyloidosis. In: Amyloid and Amyloidosis. The proceedings of the VIIIth International symposium on amyloidosis, Rochester, 1998, p. 6-10.
6. Axelrad M, Kisilevsky R, Beswetherick S. Acceleration of amyloidosis by syngeneic spleen cells from normal donors. Am J Pathol, 1975, 78:277-284
7. Kisilevsky R, Axelrad M, Corbett W, Brunet S, Scott F. The role of inflammatory cells in the pathogenesis of amyloidosis. Lab Invest, 1977, 37:544-553
8. Shtrasburg S, Livneh A, Gal R, Pras M. Extremely active murine amyloid enhancing factor. Clin Exp Rheumatol, 1996, 14:37-42
9. Axelrad MA, Kisilevsky R, Willmer J, Chen SJ, Skinner M. Further characterization of amyloid-enhancing factor. Lab Invest, 1982, 47:139-146

10. Kedar J, Bleiberg I, Sohar E. Stimulation of murine amyloidosis by a dialyzable product from pre-treated donors. *Br J Exp Pathol*, 1975, 70:579–588
11. Yokota T, Takahashi M, Ishihara T, Yamashita Y, Gondo T, Kawamura S, Hoshii Y, Koga M, Iwata T, Uchino F. Amyloid enhancing factor (AEF). Isolation and biochemical and pathological characteristics. *Acta Pathol Jpn*, 1991, 41:798–805
12. Shirahama T, Lawless OJ, Cohen AS. Heterologous transfer of amyloid – human to mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1969, 130: 516–519
13. Niewold TA, Hol PR, van Andel AC, Lutz ET, Gruys E. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest*, 1987, 56:544–549
14. Snow AD, Kisilevsky R, Stephens C, Anastassiades T. Characterization of tissue and plasma glycosaminoglycans during experimental AA amyloidosis and acute inflammation. Qualitative and quantitative analysis. *Lab Invest*, 1987, 56:665–675
15. Schreinberg, MA, Benson, MD. SAA amyloid protein levels in amyloid-prone chronic inflammatory disorders. Lack of association with amyloid disease. *J Rheumatol*, 1980, 7:724-726.
16. Ryšavá R. Postižení ledvin u AA amyloidózy. In: Tesař V, Schück O et al. *Klinická nefrologie*. Grada Publishing 2006, p.233-234
17. Bohle, A, Wehrmann, R, Eissele, R, et al. The long-term prognosis of AA and AL renal amyloidosis and the pathogenesis of chronic renal failure in renal amyloidosis. *Path Res Pract*, 1993, 189:316-331.

18. Köklü, S, Ödemiş, B, Cengiz, C, Yüksel, O, Üsküdar, O and Turhan, N. Fulminant hepatic failure due to secondary amyloidosis. *Digestive and Liver Disease*, 2006, 38(3):208-210
19. Tam, M, Seldin, D, Forbes, B, Connors, L, Skinner, M, Oran, B, Quillen, K, Sanchorawala, V. Spontaneous rupture of the liver in a patient with systemic AL amyloidosis undergoing treatment with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation: A case report with literature review. *Amyloid*, 2009, 16(2):103-107
20. Renzulli, P, Schoepfer, A, Mueller, E and Candinas, D. Atraumatic splenic rupture in amyloidosis. *Amyloid*, 2009, 16(1):47-53
21. Ebert, EC, Nagar, M. Gastrointestinal manifestation of amyloidosis. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103:776–787
22. Hazes, JMW, Cats, A. Rheumatoid arthritis. In: Klippel J.H.- Dieppe P.A. *Rheumatology*. Mosby-Year Book Europe Limited, 1994, 3:14.1-14.8.
23. Gillmore JD, Hawkins PN. Drug Insight: emerging therapies for amyloidosis. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2(5):263-270
24. Okuda Y, Takasugi K. Successful Use of a Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody, Tocilizumab, to Treat Amyloid A Amyloidosis Complicating Juvenile Idiopathic Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 2006, 54(9):2997–3000
25. Dember LM, Hawkins PN, Hazenberg BP, Gorevic PD, Merlini G, Butrimiene I, Livneh A, Lesnyak O, Puéchal X, Lachmann HJ, Obici L, Balshaw R, Garceau D, Hauck W, Skinner M; Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *N Engl J Med*, 2007, 356(23):2349-60

26. Wulffraat, N, Van Royen, A, Bierings, M, et al. Autologous haemopoietic stem-cell transplantation in four patients with refractory juvenile chronic arthritis. *Lancet*, 1999, 353:550-553.
27. Yamada T, Liepnieks JJ, Kluge-Beckreman B, Benson MD. Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand J Immunol*, 1995, 41:94-7
28. Kisilevski, R, Anestin, JB. AA amyloidogenesis – a progress report and possible future directions. In: *Amyloid and Amyloidosis. The proceedings of the IXth International symposium on amyloidosis, Budapest, 2001*, p. 99-103.
29. Migita, K, Yamasaki, S, Shibatomi, K, et al. Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin Exp Immunol*, 2001, 123:408-411.
30. Röcken C, Menard R, Bühling F, et al. Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64:808-815
31. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*, 2001, 276:944-51
32. Krásná, E, Stříž, I. Role chemokinů v zánětlivých procesech. *Alergie*, 2005, 1_2005, Tigris.
33. Koch, AE, Kunkel, SL, Harlow, LA, et al. Macrophage inflammatory protein 1- α : A novel chemotactic cytokine in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93:921-928.

34. Mahad, DJ, Howell, SLJ, Woodroffe, MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2002, 72:498-502
35. Alam R, York J, Boyars M, Stafford S, Grant J A, Lee J, Forsytie P, Sim T and Ida N. Increased MCP-1, RANTES and MIP-1a in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 153:1398–1404.
36. Koch A E, Kunkel S L, Harlow L A, Johnson B, Evanoff H L, Haines G K, Burdick M D, Pope R M, Strieter R M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.*, 1992, 90(3):772–779.
37. Cunnane G. Amyloid precursors and amyloidosis in inflammatory arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2001, 13(1):67-73.
38. Baba S, Takahashi T, Kasama T, Fujie M, Shirasawa H. A novel polymorphism of human serum amyloid A protein, SAA1 gamma, is characterized by alanines at both residues 52 and 57. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 303:361-6.
39. Booth DR, Booth SE, Gillmore JD, Hawkins PN, Pepys MB. SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic amyloidosis. *Amyloid*, 1998, 5:262-5.
40. Yamada T, Okuda Y, Takasugi K, Wang L, Marks D, Benson MD, Kluge-Beckerman B. An allele of serum amyloid A1 associated with amyloidosis in both Japanese and Caucasians. *Amyloid: J Protein Folding Disord*, 2003, 10:7-11
41. Moriguchi M, Terai C, Koseki Y et al. Influence of genotypes of 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, 105:360-366.

42. Yamada T, Wada A, Itoh Y et al. Serum amyloid A1 alleles and plasma concentrations of serum amyloid A. *Amyloid*, 1999, 6:199-204.

43. Yamada T, Wada A. Slower clearance of human SAA 1.5 in mice: implications for allele specific variation of SAA concentration in human. *Amyloid*, 2003, 10:147-150.

44. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259:344-348.

45. Al-Sharif FM, Makki RF, Oilier WE, Hajeer AH. A new microsatellite marker within the promoter region of the MIP- 1A gene. *Immunogenetics*, 1999, 49:740-741.

46. Aguilar F, Gonzales-Escribano MF, Sanchez-Roman J et al. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 2001, 58(5):335-8.

47. Brown K S, Nackos E, Morthala S, Jensen LE, Whitehead AS, Von Feldt JM. Monocyte chemoattractant protein-1: plasma concentration and A(-2518)G promoter polymorphism of its gene in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*, 2007, 34(4):740-6.

48. Herfarth H, Goke M, Hellerbrand C et al. Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 in Crohn´s disease. In *J Colorectal Dis.*, 2003, 18(5):401-5.

49. Gonzales-Escribano MF, Torres B, Aguilar F et al. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*, 2003, 64(7):741-4.

50. Omori K, Kazama JJ, Song J et al. Association of MCP-1 gene polymorphism A-2518-G with carpal-tunnel syndrome in hemodialysis patients. *Amyloid*, 2002, 9(3):175-82.
51. Takada T, Suzuki E, Morohashi K et al. MCP-1 and MIP-1a gene polymorphisms in Japanese patients with sarcoidosis. *Intern Med*, 2002, 41(10): 813-8.
52. Kim HL, Lee DS, Yang SH et al. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis.*, 2002, 40(6):1146-52.
53. Baba S, Masago SA, Takahashi T, Kasama T, Sugimura H, Tsugane S, Tsutsui Y, Shirasawa H. 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, 4(6):1083-7.
54. Nakamura T, Yamamura Y, Tomoda K, Tsukano M, Shono M, Baba S. Efficacy of cyclophosphamide combined with prednisolone in patients with AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2003, 22(6):371-5.
55. Nakamura T, Higashi S, Tomoda K, Tsukano M, Baba S, Shono M. Significance of SAA1.3 allele genotype in Japanese patients with amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2006, 45(1):43-9.
56. Van der Hilst J C H, Yamada T, Op den Camp H J M, van der Meer J W M, Drenth J P H, Simon A. Increased susceptibility of serum amyloid A 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology*, 2008, 47:1651-1654