



UTICAJ GENETSKE VARIJABILNOSTI TNF- α NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA U KRVI BOLESNIKA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

Autori: Milan Stojiljković¹, Jelena Ivanović¹, Marija Stojiljković¹

Mentor: doc. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov²

¹Univerzitet u Nišu Medicinski fakultet,

²Institut za biohemiju KC Niš

SAŽETAK

Reaktivne vrste kiseonika (RVK), regulatorni molekuli uključeni u signalizaciju faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α), igraju značajnu ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa (RA). Poznato je da je TNF- α povećan u serumu i u sinovijalnoj α tečnosti bolesnika sa RA i da deluje kao autokrini i parakrini faktor rasta sinoviocita. Imajući u vidu podatke iz literature, koji ukazuju da polimorfizam -308 G/A na genu za TNF- α povećava genetsku ekspresiju ovog citokina, za cilj istraživanja postavljeno je ispitivanje udruženosti intenziteta oksidativnog stresa sa pojavom polimorfnog gena za TNF kod bolesnika sa RA. Polimorfizam na genu za TNF- α (TNF-308 G/A SNP) ispitivan je PCR-RFLP metodom; aktivnost katalaze i superoksid dizmutaze određivana je spektrofotometrijskom metodom; nivo malondialdehida (MDA) je određivan metodom pomoću tiobarbiturne kiseline. Svi parametri mereni su u plazmi 35 bolesnika sa RA i 40 zdravih kontrola (dobrovoljnih davaoca krvi). Dobijeni rezultati pokazuju značajan porast nivoa MDA, kod bolesnika koji su heterozigoti i homozigoti za ispitivani polimorfizam ($p < 0.01$). Pozitivna korelacija nivoa MDA (krajnjeg produkta lipidne peroksidacije) i polimorfnog gena (visoko produktivnog TNF alela) potvrđuje da TNF indukuje produkciju RVK i time oksidativnu modifikaciju biomolekula. Aktivnost antioksidativnih enzima (katalaze i SOD) je viša kod bolesnika sa polimornim genom (G/A i A/A), ali ne statistički značajno, što ukazuje na proces aktivacije odbrambenog mehanizma na povećanu produkciju slobodnih radikala indukovanu TNF. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da intenzitet oksidativnog stresa snažno korelira sa pojavom polimorfnog gena za TNF (TNFA), što otvara mogućnosti primene dodatne antioksidativne terapije, pre svega onim bolesnicima koji imaju prisutan polimorfizam -308 G/A na genu za TNF.

Ključne reči: RA, oksidativni stres, TNF- α polimorfizam

UVOD

Reumatoidni artritis (RA) je hronična sistemska autoimuna bolest, nepoznate etiologije i multifaktorijalne patogeneze koja se karakteriše perzistentnim zapaljenjem sinovijalnih zglobova i progresivnom destrukcijom zahvaćenih zglobova, često dovodeći do trajne nepokretnosti. Najčešća forma je inflamatorni artritis i ima socijalni značaj u smislu cene lečenja, nesposobnosti i gubitka produktivnosti obolele osobe. To je jedna od najčešćih autoimunih bolesti jer zahvata otprilike 1% odrasle populacije u zapadnim zemljama. Rana dijagnoza i terapija smanjuje oštećenje zglobova, čuva njihovu funkciju i popravlja stopu preživljavanja (1).

Poslednjih godina veliki broj studija bavio se istraživanjem moguće uloge reaktivnih kiseoničnih radikala (RKR) u etiologiji i patogenezi RA (2). Slobodni radikali se stvaraju u mnogim biohemijskim reakcijama u ćeliji i neophodni su za odvijanje brojnih normalnih biohemijskih i fizioloških procesa. Slobodni radikal može biti atom, molekul ili jo a koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona (1, 2). Ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidantnog kapaciteta ćelija i tkiva može biti narušena. Posledica ovoga je nastanak oksidativnog stresa, u kome je postojeća dinamička ravnoteža pomerena ka oksidativnom potencijalu (3, 4). U tom slučaju, višak RKR reaguje sa lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama i polisaharidima izazivajući značajna oštećenja (3). Istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima ključnu ulogu u patogenezi brojnih kliničkih stanja, među kojima su najčešće maligne bolesti, autoimune bolesti (dijabetes, lupus, reumatoidni artritis i dr), ateroskleroza, hronična zapaljenja, HIV infekcija, ishemijska-perfuzijska povreda, «sleep apneja» i dr. U patogenezi RA slobodni radikali su označeni kao medijatori tkivnog oštećenja. Tokom inflamatornog odgovora u RA, dolazi do aktivacije polimorfonukleara, monocita i makrofaga i pokreće se respiratorna eksplozija koja se karakteriše povećanom potrošnjom kiseonika, anaerobnom glikolizom, heksozomonofosfatnim šantom i povećanom produkcijom slobodnih radikala (5). Dokazano je da monociti, naročito u RA, proizvode 2.7 puta veću količinu slobodnih kiseoničnih radikala nego u kontrolama (6).

Ključnu ulogu u inflamaciji, produkciji RKR i oštećenju zglobova u reumatoidnom artritisu igra TNF- α . TNF- α stimuliše produkciju slobodnih radikala na dva načina. Prvi je aktivacija fagocitnih ćelija tokom inflamacije, a drugi je posredovanje u programiranoj ćelijskoj smrti (7). Produkcija RKR tokom TNF- α signalizacije je od kritične važnosti za propagaciju TNF- α signala. Mnogobrojne studije su pokazale da indukuje stvaranje slobodnih radikala primarno u mitohondrijama (8,9), što ukazuje na značaj mitohondrija u regulaciji nishodnih TNF- α efekata, kao što su aktivacija NF- κ B i apoptoza. Povećanje oksidativnog stresa u mitohondrijama je uključeno kako u citotoksične efekte TNF- α tako i u regulaciju ekspresije gena (10).

TNF- α je plejotropni citokin koji proizvode uglavnom makrofagi i T limfociti (11). To je membranski protein koji ima i solubilnu formu. Solubilna forma ima ulogu u inflamaciji i imunomodulaciji, a TNF- α ima značajnu ulogu u patogenezi

infektivnih, autoimunih bolesti, neoplazmi i sepse (12, 13, 14, 15). Gen za TNF- α je lociran na 6. hromozomu p21 kraku, između gena za limfotoksin alfa i limfotoksin beta. Gen ima više polimorfizama, većinu u promotornom regionu. Varijabilnost u promotornom regionu i kodiranje gena za TNF- α moduliraju sekretorni odgovor citokina (16, 17). Najčešće ispitivan polimorfizam je na poziciji -308, gde je guanin supstituisan adeninom. In vitro rezultati pokazuju da je ekspresija TNF- α kod osoba sa polimorfnim genom veća. Do sada, u literaturi postoje kontradiktorni podaci u vezi sa učešćem polimorfizma gena za TNF-alfa -308 G/A u patogenezi reumatoidnog artritisa (18, 19).

CILJRADA

Imajući u vidu da TNF alfa indukuje stvaranje slobodnih radikala kiseonika na nivou mitohondrija i da je nivo oksidativnog stresa, kao i nivo serumskog i sinovijalnog TNF, povišen kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom za cilj ovog rada postavljeno je ispitivanje uticaja visoko produktivnog polimorfizma na genu za TNF- α (-308 G/A) na parametre oksidativnog stresa (nivo malondialdehida, aktivnost katalaze i superoksid dizmutaze) u krvi bolesnika sa RA.

MATERIJAL

Istraživanje je obuhvatilo 194 ispitanika, 132 obolela od reumatoidnog artritisa lečena na Klinici za lečenje i rehabilitaciju Niška Banja i 62 ispitanika, klinički zdravih osoba (dobrovoljni davaoci krvi Zavoda za transfuziju krvi Kliničkog centra u Nišu). Za analizu je uzimana krv u vreme postavljanja dijagnoze. Iz uzorka pune krvi izolovana je DNK komercijalnim kitom (Qiagen, Nemačka), a zatim je metodom PCR-RFLP detektovan polimorfizam gena za TNF u promotoru na položaju -308. Nivo oksidativnog stresa određivan je kod 35 bolesnika i 15 zdravih ispitanika. Plazma je odvajana centrifugiranjem 10 minuta na 3000 obrtaja/min i čuvana na -80°C. U plazmi je određivana aktivnost enzima katalaze i SOD, kao i nivo produkata lipidne peroksidacije malondialdehid (MDA).

METODE

Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u plazmi

Indeks lipidne peroksidacije, kao jedan od parametara oksidativnog stresa, određivan je indirektno preko produkta reakcije lipidne peroksidacije sa tiobarbitrunom kiselinom, kao TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Koncentracija TBARS u plazmi određivana je spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (4), koja se bazira na reakciji MDA sa tiobarbitrunom kiselinom, na visokoj temperaturi i kiseloj sredini, pri čemu nastaje hromogen (MDA-TBA₂), a intenzitet boje čita na 532 nm. Koncentracija TBARS izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta koji iznosi $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i izražena u $\mu\text{mol/L}$.

Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi

Aktivnost katalaze u plazmi određivana je spektrofotometrijskom metodom po Gothu (5), koja se zasniva na sposobnosti katalaze da razlaže supstrat (H_2O_2), pri čemu se enzimski reakcija stopira dodatkom amonijum molibdata, a nastali žuti kompleks H_2O_2 i molibdata meri na 405 nm prema slepoj probi. Aktivnost enzima izražena je u katalitičkim jedinicama na litar seruma (kU/L).

Određivanje aktivnosti SOD

Određivanje aktivnosti SOD vršeno je pirogalolskom metodom (6). Ova metoda pripada grupi metoda, "negativnog" tipa, jer se prati smanjenje brzine oksidacije NBT (nitro blue tetrasolium) na račun autooksidacije pirogalola u alkalnoj sredini, koja rezultira produkcijom O_2^- . Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju oksidacije NBTa. Brzina oksidacije NBT u prisustvu pirogalola prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbance. Pad apsorbance na 540 nm potiče od prisustva SOD, koja sprečava autooksidaciju pirogalola i akumulaciju oksidisanog hromogena ljubičaste boje. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije pirogalola i stvaranje hromogena u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u krvnoj plazmi predstavlja deo referentne vrednosti. Jedna jedinica aktivnosti SOD predstavlja onu količinu enzima koja može da ostvari 50% inhibicije oksidacije NBT u prisustvu pirogalola.

Rezultati su statistički obrađeni u SPSS-u, prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija a značajnost rezultata prikazana studentskim T testom.

TNF- α genotipizacija

Genomska DNK je izolovana iz pune krvi uzete sa EDTA pomoću komercijalnog kita (Quiagen DNA Isolation Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany). Bi-alelni polimorfizam (substitucija G/A) u okviru TNF- α gena određivan je metodom lančane reakcije polimeraze i restriktivnom digestijom (PCR-RFLP). Region sa pomenutim polimorfizmom TNF α -308 umnožen je pomoću prajmera TNFa-308-1 (5'-AGGCAATAGTTTTGAGGGCCAT-3') i TNF- α -308-2 (5'-ACACTCCCCATCCTCCCTGCT-3') (12). PCR je izveden u finalnom volumenu 25 μ l koja sadrži 20 ng DNK, 5 μ l Q rastvora, 2,5 μ l 10 x PCR pufera, 10 mM dNTP, 20 pmol prajmera i 0.5 U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Uslovi izvođenja PCR su: inicijalna denaturacija na 95°C za 15 min, 35 ciklusa denaturacije na 94°C za 1 min, vezivanje prajmera na 50°C za 1 min i produženje na 72°C za 1min, završavajući sa finalnim produženjem na 72°C za 10min. PCR produkti su pušteni na elektroforezu kroz 2% agarozu gel, bojeni etidium bromidom i posmatrani pod UV svetlošću. Amplifikovani produkti su isečeni restrikcionim enzimom NcoI (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany) na 37°C preko noći i analizirani na 8% poliakrilamidnom gelu na elektroforezi. Bojeni su etidium bromidom i posmatrani pod UV svetlošću. A alel je detektovan kao neisečeni, produkt pune dužine (117 bp), dok je prisustvo G alela detektovano kao fragment od 97 i 20 bp na

dobijenom obrascu na gelu.

Statistička analiza

Učestalost alela i genotipa određivana je kod bolesnika i kontrolne grupe i poređena je sa Hardy-Weinberg ravnotežom preko χ^2 testa. Dobijeni rezultati poređeni su pomoću Fisher's exact testa. Frekvencija alela i genotipa je takođe poređena između grupa Fisher's exact testom. Za kumulativnu analizu relativnog rizika (RHM) korišćen je metod Mantel-Hansela. Vrednost <0.05 smatrala se statistički značajnom i vrednosti između 0.05 i 0.1 su indikativne kao trend.

Parametrijski rezultati aktivnosti katalaze i SOD, kao i nivo MDA, izražavani su kao srednja vrednost SD, a za ispitivanje značajnosti korišćen je studentov t-test.

Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu i Etičkog komiteta Instituta „Niška Banja“. Svi ispitanici su potpisali informativni pristanak pre uključivanja u istraživanje.

REZULTATI

Prosečna starost ispitivane grupe bila je 55,29 godina i većina bolesnika bila je ženskog pola (83,33%). Demografske karakteristike i laboratorijske analize ispitivane grupe prikazane su u tabeli 1. Kontrolnu grupu činilo je 41 žena i 21 dobrovoljac muškog pola; starosti između 27–79 godina, srednja vrednost 50.12 ± 16.1 .

Tabela 1. Demografske i laboratorijske karakteristike ispitivane grupe

Demografske	N (%)
Ženski pol	110 (83,33)
Starost, godine	55,29 \pm 10,62
Laboratorijske	
SE, mm/h	54,42 \pm 28,36
RF pozitivni	91 (68,93)
CRP povišen	83 (62,88%)
Anti CCP At pozitivni	105 (79,54%)

Od 132 bolesnika 69 (52,27%) pripadalo je grupi A, 63 (47,73%) pripadalo je grupi G. U grupi obolelih od RA najčešći genotip je homozigotni G/G (wild tip) – 47,73%, zatim sledi heterozigotni G/A koji je prisutan kod 57 bolesnika (43,18%), dok homozigota sa A/A genotipom ima svega u 12 bolesnika (9,09%).

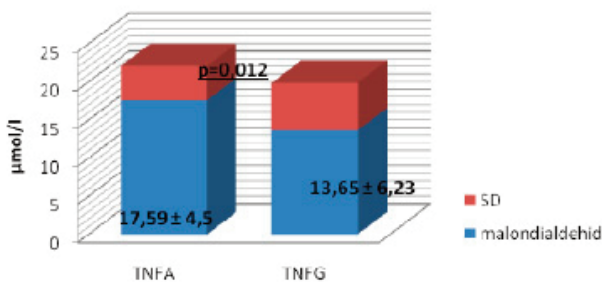
Učestalost A alela je značajno veća u grupi bolesnika sa RA u poređenju sa kontrolom ($\chi^2=23.05$; $p<0.001$). Dobijeni rezultati prikazani su na tabeli 2.

Tabela 2. Učestalost genotipa i A alela za ispitivani TNF-a promotor -308G/A polimorfizam kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom

	Učestalost genotipa (%)			Učestalost alela	
	TNF G/G	TNF G/A	TNF A/A	G	A
Pacijenti (n=132)	63(47,7%)	57(43,2%)	12(9,1%)	0,69	0,31
Kontrole (n=62)	37(59,7%)	20(32,3%)	5(8,06%)	0,75	0,24
p-vrednost	NS			0,001	
χ^2				23,05	

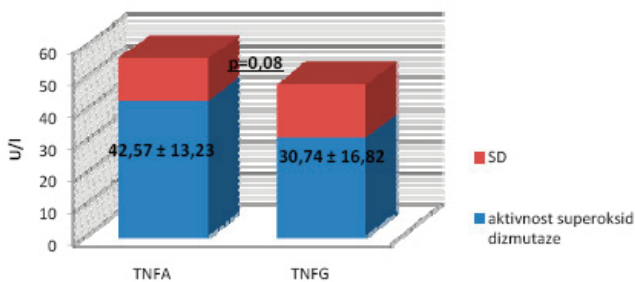
Koncentracija MDA u plazmi bolesnika sa RA u zavisnosti od TNF genotipa prikazana je na grafikonu 1. Dobijeni rezultati su pokazali značajan porast nivoa MDA u TNFA grupi bolesnika (kod heterozigota i homozigota za ispitivani polimorfni gen) u poređenju sa TNFG grupom (wild tip) ($17,59 \pm 4,5$ vs. $13,65 \pm 6,23$ mol/l, $p = 0.012$).

Grafikon 1. Vrednosti malondialdehida u krvi kod pacijenata



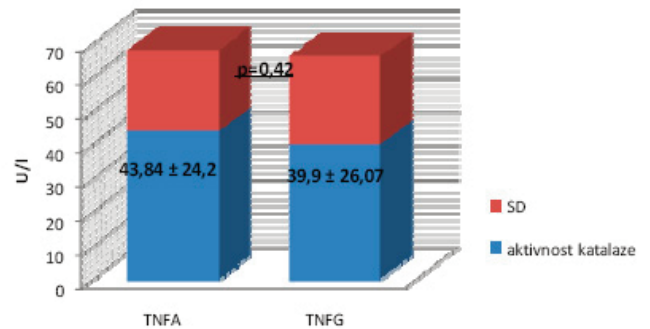
Aktivnost enzima antioksidativne zaštite SOD bila je veća u grupi bolesnika sa prisutnim polimorfnim genom, tj. A alelom u odnosu na G alel, ali ne i statistički značajno veća ($42,57 \pm 13,23$ vs $30,74 \pm 16,82$ U/l, $p = 0.08$).

Grafikon 2. Aktivnosti superoksid dizmutaze u krvi kod pacijenata



Aktivnost katalaze u plazmi bolesnika sa RA nije pokazala statistički značajnije promene u odnosu na prisustvo A alela u genu za TNF ($43.84 \pm 24,2$ vs $39,9 \pm 26,07$ U/l, $p=0,42$).

Grafikon 3. Aktivnosti katalaze u krvi kod pacijenata



DISKUSIJA

U ovom radu ispitivan je uticaj visoko produktivnog polimorfizma -308 G/A gena za TNF- α na stepen oksidativnog stresa kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom. Budući da se radi o hroničnom imuno-inflamatornom oboljenju, u čijoj patogenezi značajno mesto imaju i TNF- α i oksidativni stres, postavljena je radna hipoteza da bolesnici sa TNF A genotipom pokazuju veći stepen oksidativnog stresa u odnosu na obolele sa TNF G genotipom.

Ispitivanja su pokazala da je viši nivo produkcije TBARS kod bolesnika sa TNFA alelom u odnosu na TNFG alel. Pozitivna korelacija nivoa MDA (kao mere lipidne peroksidacije) i polimorfnog A alela (visoko produktivnog TNF alela) potvrđuje da TNF- α indukuje produkciju RKR u mitohondrijama i oksidativnu modifikaciju lipida. Do sada u literaturi nisu poznati podaci o korelaciji ovog polimorfizma sa parametrima oksidativnog stresa. Imajući u vidu ispitivanja korelacije nivoa serumskog TNF i nivoa MDA, literaturni podaci pokazuju da nivo cirkulišućeg TNF pozitivno korelira sa produkcijom MDA (20). Matthews i saradnici (21) su objavili da je izlaganje ćelija fibroma senzitivnih na delovanje TNF, L929, udruženo sa akumulacijom malon dialdehida, markera lipidne peroksidacije.

U kompleksnoj patogenezi reumatoidnog artritisa deo tkiva domaćina postaje reumatoidni antigen i imuni sistem ga prepoznaje kao strano telo (22). Reumatoidni antigen aktivira proinflamatorne i inflamatorne citokine koji su odgovorni za simptome hronične inflamacije sinovije zglobova. Jedan od sintetisanih citokina, faktor nekroze tumora α (TNF- α) zajedno sa interleukinom-1 dovodi do hiperplazije i umnožavanja sinoviocita do zglobne hrskavice (23), kao i do migracije sinovijalnih ćelija iz krvi u zglob.

TNF- α je potentni stimulator respiratorne eksplozije u polimorfonuklearima (24, 25) i na taj način učestvuje u povećanju citotoksičnosti fagocita. To je multifunkcionalni, potentni, imunomodulatorni citokin koji reguliše imuni odgovor, inflamaciju i apoptozu zahvaljujući svojim različitim biološkim aktivnostima. Preko svojih receptora na target ćelijama, TNF- α aktivira brojne signalne puteve koji obuhvataju IKKs, c-Jun NH2-terminalnu kinazu (JNK) i kaspaze (26). TNF- α indukovana ćelijska smrt zavisi direktno od produkcije RKR u mitohondrijama (6, 7). Slobodni radikali, pre svega RKR, kao što

su superoxid anjon (O_2^-), hidroksilni radikal (OH \cdot) i vodonik peroksid (H_2O_2) mogu biti sekundarni glasnici pri delovanju proinflatornog citokina TNF- α . Smatra se da akumulirani RKR izazivaju prolongiranu aktivaciju JNK i time omogućavaju apoptozu indukovanu TNF. Ključni molekul u ovom signalnom putu je JNK fosfataza koju RKR aktiviraju. Pored ove fiziološke uloge RKR ostvaruju i patološke efekte tako što indukuju lipidnu peroksidaciju, nitrozilaciju tirozina, oksidativne promene na DNK i proteinima i time zauzimaju značajno mesto u patogenezi reumatoidnog artiritisa. Takođe je poznato da direktnim oštećenjem endotela plućnih kapilara, RKR posreduju u povećanju permeabilnosti vaskulature i pojavi edema pluća koje izaziva TNF- α (27). Porast RKR indukovani TNF može imati i suprotno dejstvo. Dokazano je da H_2O_2 može da smanji ćelijski odgovor na delovanje TNF- tako što smanjuje kapacitet receptora za vezivanje TNF (28).

Citotoksični efekti TNF- posredovani slobodnim radikalima mogu se sprečiti primenom skavendžera slobodnih radikala (kao što je dimetilsulfoksid), helatorima gvožđa (desferriksamin) (29) ili inkubacijom ćelija u anaerobnim uslovima čime se sprečava stvaranje O_2^- i H_2O_2 , kao i peroksidacija lipida. To je još jedan dokaz koji ide u prilog činjenici da TNF indukuje povećanu produkciju slobodnih radikala. U cilju zaštite od njihovog štetnog delovanja mitohondrije takođe sintetisu antioksidativne enzime. Naši

rezultati nisu dokazali statistički značajno povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, mada je aktivnost serumske SOD (tkivna i ekstracelularna) na granici značajnosti povećana u grupi TNFA pacijenata u odnosu na TNFG. Za razliku od SOD, koja je prva linija odbrane organizma od RKR, katalaza nije pokazala značajniju razliku u aktivnost zavisno od prisustva A alela na genu za TNF. U prilog tvrdnje da je citotoksičnost TNF- α posredovana slobodnim radikalima ide i činjenica da i rezistentnost ćelije na TNF zavisi od antioksidativnog kapaciteta ćelije (30). S tim u vezi, Wong i saradnici su pokazali da različite tumorske ćelije povećano sintetisu mitohondrijalnu Mn-SOD (MnSOD) (31), teški lanac feritina (32) i tioredoksin 2.

ZAKLJUČAK

Povećana lipidna peroksidacija kod bolesnika sa polimorfnim genom za TNF, kao i povećana aktivnost SOD, kao posledica indukcije sinteze ili kao mera antioksidativne zaštite u istoj grupi pacijenata sa reumatoidnim artritismom ukazuje da stepen oksidativnog stresa korelira sa prisustvom A alela. Imajući u vidu da se RA javlja kod mlađih osoba ženskog pola, da se radi o veoma progresivnoj bolesti i da terapija bazira na kortikosteroidima i imunosupresivnim lekovima kao i veoma toksičnim biološkim lekovima, a na osnovu dobijenih rezultata može se preporučiti dopunska terapija antioksidansima.

LITERATURA

1. Weyand CM, Goronzy JJ. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med Clin North Am* 1997; 81(1):29-55
2. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27:141-145
3. Kamanl A, Naziroglu M, Aydilek N, Hacievliyagil C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 53–57
4. Ozkan Y, Yardim S, Sepyci A, Keskin E, Sepici V, Simsek B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 64-68
5. Annil Mahajan A, Tandon V. Antioxidants in rheumatoid arthritis. *J Indian Rheumatol As Soc* 2004;12:139-142
6. Cimen MYB, Cimen OB, Kacmaz K, Osturk S, Yorgancioglu K, Durak I. Oxidant/Antioxidant Status of the Erythrocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin Rheumatol* 2000;19:275–277
7. Camussi G, Albano E, Tetta C, Busolino F. The molecular action of tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 1991; 202: 3- 14
8. Goossens, V, Grooten J, de Vos K and Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8115-8119
9. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA. and Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992; 267, 5317-5323
10. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. *J Immunol* 2000; 164: 6509-6519
11. Hajeer H.A, Hutchinson I. Influence of TNF- α gene polymorphisms on TNF- α production and disease. *Human Immunol*

2001; 62(11): 1191-1199

12. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilisation of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175: 323-329
13. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringmans TS, Nedwins GE, Goeddel DW, Harkins RN. Human Tumor Necrosis Factor production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985; 260(4): 2345-2354
14. Allen RD. Polymorphism of the human TNF- α promoter- random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36: 1017-1027
15. Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor alpha in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett* 1996;215:75-78
16. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol J Immunol* 1997; 34:391-399
17. Louis E, Franchimont D, Piron A, gevaert Z, Schaaf-Laontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, de Groote D, Louise R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharides (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:401-406.
18. Feldmann M, Brennan FM, Elliott M, Katsikis P, Maini RN. TNF as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Circ Shock* 1994; 43:179-184
19. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-3199
20. D Li, L Zhao, et al. Kinetics of tumor necrosis factor α in plasma and the cardioprotective effects of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor α in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 137: 1145-1152
21. Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987;62(1):153-5
22. Klareskog L, McDevitt H. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF- α and the possible absence of specific immune reactions. *Curr Opin Immunol* 1999; 1(6): 657-662)
23. Duff G, DiGiovine F, Dickens E, Symons J, Wood D, Manson J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in arthritis. *Immunobiol* 1987; 175: 10-1
24. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;136(11):4220-5
25. Das UN, Padma M, Sagar PS, Ramesh G, Koratkar R. Stimulation of free radical generation in human leukocytes by various agents including tumor necrosis factor is a calmodulin dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167(3):1030-6
26. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-G589
27. Goldblum SE, Hennig B, Jay M, Yoneda K, McClain CJ. Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury. *Infect Immun.* 1989; 57(4):1218-26
28. Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1989;49(7):1671-5
29. Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cell Immunol* 1987;107(2):317-25
30. Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988; 242 (4880):941-4
31. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, and Goeddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 1989; 58, 923-931
32. Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Cytocidal mechanism of TNF: effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988; 10(1):109

OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IS ASSOCIATED WITH TUMOR NECROSIS FACTOR - ALPHA -308 POLIMORPHISM

Milan Stojiljković, Jelena Ivanović, Marija Stojiljković

Reactive oxygen species (ROS), regulatory molecules implicated in the signaling cascade triggered by tumor necrosis factor (TNF), have important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Also, it is well known that TNF- is increased in synovial fluids of RA patients and acts as an autocrine and paracrine growth factor. Since there are strong evidence that TNF- (-308) polymorphism is responsible for higher rate of TNF transcription, we have investigate the association of this polymorphism with oxidative stress in RA development. In this study, we have analyzed polymorphism in TNF- gene (TNF-308 G/A SNP) by PCR-RFLP; the activities of catalase and superoxide dismutase were measured by spectrophotometric methods; the level of MDA was measured by TBAR method. All these parameters were measured in plasma of 35 RA patients and 40 healthy controls.

The obtained results showed significant increase of MDA level, in heterozygote and homozygote patients for investigated polymorphism ($p < 0.01$). The positive correlation of MDA level (as a measure of lipid peroxidation) and polymorphic allele A (highly productive TNF allele) confirms that TNF induce ROS production and oxidative modification of organic molecules. The activities of antioxidant enzymes (catalase and SOD) were higher in patients with polymorphic allele A, probably as a consequence of increased production of free radicals. Since the level of oxidative stress strongly depends on TNF genotype we recommend intensifying antioxidative therapy, especially for RA patients heterozygote or homozygote for TNF- (-308) polymorphic gene.

Key words: rheumatoid arthritis, oxidative stress, TNF- α polymorphism