REDOX STATUS AND DNA BASES MODIFICATION BY OXIDATIVE STRESS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

A Thesis

Submitted to The Medical Research Institute
Alexandria University
In Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy

PhD

in

Applied Medical Chemistry

By

Hany Mohammed Mohany Abd El-Raof

M.Sc. in Applied Medical Chemistry 2005

2009

REDOX STATUS AND DNA BASES MODIFICATION BY OXIDATIVE STRESS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Presented by

Hany Mohammed Mohan Abd El-Raof

M.Sc. in Applied Medical Chemistry 2005

for the Degree of

Doctor

In

Applied Medical Chemistry

Examiner's committee **Approved**

Prof. Dr. Mervat Abd El-Fatah El Tokhy .....
Professor of Medical applied chemistry
Medical Applied Chemistry Department
Medical Research Institute
University of Alexandria

Prof. Dr. Abd Allah Mahmoud Foda .....
Professor in boiochemistry
Biochemistry Department
Faculty of Medicine
Tanata University

Prof. Dr. Mona Mohammed Rashad .....
Professor of Applied Medical Chemistry
Applied Medical Chemistry Department
Medical Research Institute
Alexandria University

Prof. Dr. Madeha Hassan Helmy .....
Professor of Medical Biochemistry
Medical Biochemistry Department
Medical Research Institute
Alexandria University

ACKNOWLEDGMENT

Allah, the first of all, I wish to express my deepest gratitude and thanks to Allah, the beneficent, the merciful, whose magnificent help was the only powerful thing for accomplishing this work, facilitating every difficult steps through my life and through this work stages, the generous supervisors are considered one of the important gifts from my **Lord** to me.

I would like to express my gratitude to **Prof. Dr. Mona M. Rashad,** Professor of Applied Medical Chemistry, Medical Research Institute Alexandria University, for her precious advice, constructive guidance.

I wish to express my thanks and deepest appreciation to **Prof. Dr. Madeha Hassan Helmy** Professor of Medical Biochemistry Medical Biochemistry Department, Medical Research Institute, Alexandria University, for her precious cooperation, kindness and encouragement, which made this work possible.

I am grateful to **Prof. Dr. Ana Nashat Abou Raya** Professor of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Alexandria University , for her help, generous cooperation, and kind assistance.

I am deeply thankful and indebted to **Prof. Dr. Maher Abd El-Nabi Kamel** Assistant Professor Medical Biochemistry, Medical Biochemistry Department, Medical Research Institute, Alexandria University, for kind supervision, valuable assistance, constructive guidance, continuous help, planning and help from the beginning to the end of this work.

لجنة الإشراف

أ.د/ منى محمد رشاد .....
أستاذ الكيمياء الطبية التطبيقية
قسم الكيمياء الطبية التطبيقية
معهد البحوث الطبية
جامعة الإسكندرية

أ.د/ مديحة حسن حلمى
أستاذ الكمياء الحيوية الطبية .....
معهد البحوث الطبية
جامعة الإسكندرية

أ.د/ آنا نشأت أبو ريا .....
أستاذ أمراض الباطنة
كلية الطب
جامعة الإسكندرية

أ. د/ ماهر عبد النبى كامل .....
أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية الطبية
معهد البحوث الطبية
جامعة الإسكندرية

Advisors' Committee:

Prof. Dr. Mona Mohammed Rashad ……
Professor of Applied Medical Chemistry
Applied Medical Chemistry Department
Medical Research Institute
Alexandria University

Prof. Dr. Madeha Hassan Helmy ……
Professor of Medical Biochemistry
Medical Biochemistry Department
Medical Research Institute
Alexandria University

Prof. Dr. Ana Nashat Abou Raya ……
Professor of Internal Medicine
Faculty of Medicine
Alexandria University

Prof. Dr. Maher Abd El-Nabi Kamel ……
Assistant Professor Medical Biochemistry
Medical Biochemistry Department
Medical Research Institute
Alexandria University

LIST OF ABBREVIATION

$O_2^{\bullet -}$	:	Superoxide anion
O_2^1	:	Single oxygen
Δ E	:	Electromotive force
Δ E°	:	Electromotive pore under standard contention
8-OH-G	:	8-hydroxyguanine
ACR	:	American college of rheumatology
ANA	:	Antinuclear Antibodies
Anti-dsDNA	:	Anti-double stranded DNA
Anti-RNP	:	Anti - ribonuclear protein
Anti-SM	:	Anti small nuclear ribonuclear protein
APS	:	Antiphospholipid syndrome
ATP	:	Adenosine triphosphate
BILAG	:	British Isles Lupus Assessment Group
BUN	:	Blood urea nitrogen
CBC	:	Complete blood count
CD	:	Cluster of differentiation
CNS	:	Central nervous system
CRP	:	C-reactive protein
DHEA	:	Dehydroepiandrosterone
DLE	:	Discoid lupus erythematosus
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
DR	:	Death receptor
DTNB	:	Dithionitrobenzoic acid
ECLAM	:	European consensus lupus activity measure
ESR	:	Erythrocyte sedimentation rate
GPX	:	Glutathione peroxidase
GR	:	Glutathione reductase
GSH	:	Reduced glutathione
GSSG	:	Oxidized glutathione

$^{\bullet}OH$	**:**	Hydroxyl radical
HLA	**:**	Human leucocytes antigen
$hMTH_2$	**:**	Human Mut T homology
HOCl	**:**	Hypochlorous acid
hOGG1	**:**	Human 8-oxo G-glycosylase
HRP	**:**	Horse radish peroxidase
IL	**:**	Interleukin
LAI	**:**	Lupus Activity Index
LH	**:**	Luteinizing hormone
MDA	**:**	Malondialdeyde
MHC	**:**	Major histocompatibility
$NO^{\bullet}$	**:**	Nitric oxide
NADPH	**:**	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	**:**	Nitro blue tetrazolium
NF-κB	**:**	Nuclear factor-kappa B
NHL	**:**	Non-Hodgkins lymphoma
$ONOO^{\bullet}$	**:**	Peroxnitrite anion
PBS	**:**	Phosphate buffered saline
PMNC	**:**	Peripheral mononuclear cells
Q	**:**	The mass action expression for the redox equation
$RO^{\bullet}$	**:**	Alkoxyl radicals
RNS	**:**	Reactive nitrogen species
$ROO^{\bullet}$	**:**	Hydroperoxyl radical
ROS	**:**	Reactive oxygen species
SCLE	**:**	Subacute cutaneous lupus erythematosus
SDS	**:**	Sodium dodecylsulphate
SLAM	**:**	SLE activity measure.
SLE	**:**	Systemic lupus erythematosus
SLE DAI	**:**	SLE Disease Activity Index
SOD	**:**	Superoxide dismutase
TBA	**:**	Thiobarbituric acid

TBARS	**:**	Thiobarbituric acid reactive substances
TMB	**:**	Tetramethyl benzidine
TMP	**:**	Tetramethoxy propane
Trx	**:**	Thioredoxin
XO	**:**	Xanthine oxidase

LIST OF CONTENTS

Chapter **Page**

ACKNOWLEDGMENT ..... **i**
LIST OF CONTENT ..... **ii**
LIST OF TABLES ..... **iv**
LIST OF FIGURES ..... **v**
LIST OF ABBREVIATION ..... **vi**

I. INTRODUCTION **1**

II. AIM OF THE WORK **22**

II. SUBJECTS AND METHODS **23**

III. RESULTS **39**

IV. DISCUSSION **59**

V. SUMMARY **63**

VI. RECOMMENDATIONS **65**

VII. REFERENCES **66**

VIII. ARABIC SUMMARY

X. PROTOCOL

LIST OF ERATA

Page	Position	Before correction	After
V	List of abbreviation	LAT	LAI
41	Sub method	is	15
64	Results table (3)	RBCs (10^9/L)	RBCs (10^{12}/2)
79	Results table (7)	GSH reduced in SLE 0.79	2.79
90	Discussion inline (15)	It haws	It has
97	Summary line (1)	Repired	Repaired
	Line (5)	Thiroredoxin	Thioredoxin

LIST OF FIGURES

Figure		Page
(1)	Various pathways of lipid peroxidation	**16**
(2)	Mechanism of 8-hydroxyguanine (8-OH-G) formation by reaction of guanine with hydroxyl radical	**17**
(3)	Overview or the pathways responsible for maintenance of genome integrity, with respect to (8-OH-G)	**19**
(4)	Redox cycling of Trx and TrxR.	**21**
(5)	standard curve of Superoxide anion	**28**
(6)	Standard curve of Hydrogen peroxide	**29**
(7)	Standard Curve of malondialdehyde (MDA)	**31**
(8)	standard curve of 8-OH guanine	**32**
(9)	Standard curve of GSH	**34**
(10)	Standard curve of GSSG	**35**
(11)	Standard curve of thioredoxin	**37**
(12)	Standard curve of total Protein	**38**
(13)	Hemoglobin concentration (g/L) in SLE patients and healthy control subjects	**40**
(14)	Red blood cell count (10^{12}/L), total leucocyte count (10^{9}/L) in SLE patients and health control subject	**40**
(15)	The plasma levels of anti-ds DNA and ANA in SLE patients and healthy control subjects	**42**
(16)	The production rate of $O_2^{\bullet -}$ by PMNC from healthy control subjects and SLE patients	**44**
(17)	The production rate of H_2O_2 by PMNC from healthy control subjects and SLE patients	**44**

Figure		Page
(18)	Correlation between the production rate of $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2	**45**
(19)	The plasma level of TBARS of SLE patients and health control subjects	**47**
(20)	Correlation between production rate of $O_2^{\bullet -}$ and plasma level of MDA in SLE patients.	**47**
(21)	Correlation between production rate of H_2O_2 and plasma MDA level in SLE patients	**48**
(22)	The level of 8-OH-G in plasma of healthy control and SLE patients	**50**
(23)	Correlation between plasma level of 8-OH-G and MDA in SLE patients.	**50**
(24)	Correlation between plasma level of 8-OH-G and production rate of $O_2^{\bullet -}$ (µmoll /min/mg protein) in SLE patients.	**51**
(25)	Correlation between plasma level of 8-OH-G and production rate of H_2O_2 (µmol /min/mg protein) in SLE patients.	**51**
(26)	The levels of total reduced and oxidized glutathione in the plasma of healthy control and SLE patients	**53**
(27)	The level of redox potential in the plasma of healthy control and SLE patients	**55**
(28)	Correlation between ANA and redox potential in SLE patients.	**55**
(29)	The level of thioredoxin in plasma of healthy control and SLE patients	**57**
(30)	Correlation between plasma level of thioredoxin and MDA levels in SLE patients	**58**
(31)	Correlation between plasma levels of anti-ds DNA and thioredoxin in SLE patients.	**58**

LIST OF TABLES

Table		Page
1	The 1997 revised American College of Rheumatology criteria for diagnosis of Systemic Lupus Erythematous.	**7**
2	SLE Disease Activity Index (SLE DAI).	**11**
3	Clinical data of the study population	**39**
4	The plasma levels of anti-ds DNA and ANA in SLE patients and healthy control subjects.	**41**
5	Free radicals production rate by PMNC from SLE patients and healthy control subjects	**43**
6	Oxidative stress parameters in plasma of SLE patients	**46**
7	The plasma levels of total, reduced and oxidized glutathione and redox potential in healthy control subject and SLE patients	**52**
8	The plasma level of thioredoxin (ng/ml) in control and SLE patients	**56**

الملخص العربى

حالة الأكسدة والإختزال وتحورات القواعد النيتروجينية فى الحمض النووى الدى أوكس ريبوزى الناتجة عن الإجهاد التأكسدى فى مرض الذئبة الحمراء

مرض الذائبة الحمراء هو إحدى الأمراض المناعية المزمنة الذى يتميز بالتهابات مرضيه تصيب كثير من الأعضاء تتمثل فى التهاب المفاصل والبقع الجلدية وأيضا ارتفاع فى درجة الحرارة.

كثيراً من مرضى الذائبة الحمراء يظهر عليهم الأعراض فجأة وبعد ذلك تختفى هذه الأعراض لمدة طويلة لذلك فإن تشخيص هذا المرض معقد لأن أعراضه تتشابه مع بعض الأمراض المناعية الأخرى.

الهدف من الدراسة:

هو تقييم حالة الإجهاد التأكسدى فى مرضى الذائبة الحمراء وأيضا تقييم تأثيرات هذا الإجهاد التأكسدى فى مرضى الذائبة الحمراء بواسطة قياس مستوى ٨- اكسوجوانين كمؤشر على التأثير الضار للإجهاد التأكسدى على القواعد النيتروجينية فى الشريط الوراثى (DNA).

وتضمنت الدراسة المجموعات الآتية:

١- **المجموعة الأولى**: ثلاثون مريضاً مصابا بمرض الذائبة الحمراء تم تشخيصهم طبقاً لمواصفات الجمعية الأمريكية للصفات الروماتزمية (ACR).
٢- **المجموعة الثانية**: مجموعة الأصحاء وتشمل ١٥ فرداً متجانس الأعمار والنوع تستخدم كمجموعة ضابطة.

وأخضعت كل الحالات للتحاليل التالية:

١- تحليل مؤشرات الدم الاعتيادية وهى صور دم كاملة وسرعة الترسيب.
٢- مستوى البلازما لكل من الأجسام المضادة للشريط المزدوج للحامض الديؤكسى ريبوزن (Anti ds- ANA) ومستوى الأجسام المضادة لمحتويات النواة (ANA).
٣- قياس معدل إنتاج فوق أوكسيد الهيدروجين وأنيونات الأكسجين الفوقية الناتجة من خلايا الدم البيضاء.
٤- قياس المالون داى الديهيد (MDA)كمؤشر على الأكسد الفوقية للدهون.
٥- قياس مستوى ٨- أكسوجوانين كمؤشر على الإجهاد التأكسدى على الشريط الوراثى المزدروج.
٦- قياس موانع الأكسدة المتمثلة فى نظام الجلوتاثيون والثيوريدوكسين.

ومن النتائج تبين أن مرضى الذائبة الحمراء يعانون من الإجهاد التأكسدى نتيجة لزياد معدل إنتاج الشقوق الحرة بواسطة خلايا الدم البيضاء وقصور فى نظام موانع الأكسدة خاصة نظام الجلوتاثيون.

وأثبت الدراسة وجود انخفاض ذو دلالة إحصائية فى كل من مستوى الجلوتاثيون الكلى والمختزل فى مرض الذائبة الحمراء فى حين أن الجلوتاثيون المؤكسد أظهر زيادة كبيرة بينما وجد أيضا أن مستوى المالون داى الديهيد فى البلازما يرتبط إيجابيا مع إنتاج شقوق الأكسجين النشطة (فوق أوكسيد الهيدروجين وأنيونات الأكسجين الفوقية) التى ربما تكون سبب فى إنتاجه.

بجانب التأثير السلبى للإجهاد التأكسدى على الدهون فله أيضاً تأثيرات ضارة على القواعد النيتروجينية المكونة للشريط الوراثى (DNA) ومن أهم هذه التأثيرات هى تكوين قواعد نيتروجينية محورة مثل ٨- أكسوجوانين. لذلك فإن مستوى ٨- أكسوجوانين يكون دليل قوى على الأضرار الناتجة من شقوق الأكسجين النشطة على (DNA).

وفى دراستنا تبين وجود زيادة ذات دلالة إحصائية فى مستوى ٨- أكسوجوانين فى بلازما مرضى الذائبة الحمراء هذه الزيادة ترتبط إيجابيا مع إنتاج كرات الدم البيضا لكل من فوق أكسيد الهيدروجين وأنيونات الأكسجين الفوقية وهذه الشقوق ربما تكون محفزة لتحورات الشريط الوراثى المزدوج.

أن الزيادة فى مستوى ٨- أكسوجوانين من الممكن أن تكون نتيجة لأحد المصدرين الآتيين:

المصدر الأول: هو تصحيح نيوكلوتيدات الجوانين المؤكسدة الموجودة فى الشريط الوراثى المزدوج (DNA).
المصدر الثانى هو الإجهاد التأكسدى على النيوكلوتيدات الحرة نتيجة تفاعل شقوق الهيدروكسيل الحرة على موضع ذرة الكربون رقم ٨ لجزئ الجوانين فى النيوكلوتيدات.

أظهرت النتائج أن هناك ارتفاع كبير فى مستوى الثيوريدوكسين فى بلازما مرض الذئبة الحمراء هذه الزيادة من الممكن أن تكون نتيجة الإلتهابات المصاحبة للمرضى حيث أن الثيوريدوكسين يعتبر من بروتينات الأزمات الحادة (Acute Phase Protein)

ومن دراستنا يمكن استنتاج الآتى:

١- أن مرضى الذائبة الحمراء يعانون من زيادة فى الإجهاد التأكسدى نتيجة زيادة إنتاج شقوق الأكسجين الحرة من كرات الدم البيضاء.
٢- مرضى الذائبة الحمراء يعانون من قصور فى موانع الأكسدة خاصة نظام الجلوتاثيون.
٣- القصور فى موانع الأكسدة خاصة نظام الجلوتاثيون ينتج عنه إجهاد تأكسدى والذى يؤدى إلى تأثيرات ضارة على جزئيات الخلية مثل (DNA)، الدهون والبروتينات.
٤- أن مستوى ٨- أكسوجوانين فى بلازما مرضى الذائبة الحمراء وقد ازداد كثيراً نتيجة للإجهاد التأكسدى.
٥- ارتفاع فى مستوى الثيورودكسين بصفة ملحوظة فى الذائبة الحمراء وهذه الزيادة مرتبطة إيجابيا مع مستوى الأجسام المضادة للشريط المزدوج للحامض الديؤكسى ريبوزن (Anti ds- DNA).