

20079

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEHÇET, SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATUZUS, ROMATOİD ARTRİT VE KRONİK
BÖBREK YETMEZLİKLİ HASTALARDA, LÖKOSİT, B VE T LENFOSİT,
ERİTROSİT VE PLAZMA SÜPEROKSİT DİSMUTAZİNİN TANI DEĞERİ

Yük.Kim. Hüseyin TUTKAK

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Zuhâl YURTARSLANI

1991 - ANKARA

İ Ç İ N D E K İ L E R

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Süperoksit Radikali	3
2.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi	8
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Kullanılan Materyal, Kimyasal Madde, Malzeme ve Cihazlar	26
3.2. Kullanılan Metodlar	29
4. BULGULAR.	48
4.1. Kontrol Grubunda, Plazma, Eritrosit, Lökosit, B ve T lenfosit SOD aktiviteleri	48
4.2. Behçet' li Hasta Grubunda, Plazma, Eritrosit, Lökosit, B ve T Lenfosit SOD aktiviteleri.	55
4.3. SLE 'li Hasta Grubunda, Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD aktiviteleri	59
4.4. RA 'li hasta Grubunda, Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD aktiviteleri	63
4.5. KBY 'li Hasta Grubunda, Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD aktiviteleri	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
6. ÖZET	82
7. SUMMARY	84
8. KAYNAKLAR	86
TEŞEKKÜR	99

1. G İ R İ Ş

Serbest oksijen radikallerinin doku hasarına yol açmak suretiyle, kanser, otoimmünite, kronik ve inflamatuvar hastalıklara kadar uzanan birçok hastalıkta önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir (17,23,45,54,55,64,75,97,100,102). Bu radikaller, biomembranlar ve subsellüler organellerdeki fosfolipidlerin poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek hücrelerde hasar oluştururlar. Proteinlerin denatürasyonuna, çapraz bağlarla aggregasyonlarına veya parçalanmaları suretiyle aktivite kaybına yol açtıkları gibi, karbonhidrat polimerlerinin de yıkılmasına, in vivo olarak glukozaminoglukanlar ve hyalüronik asidin depolimerizasyonuna sebep olurlar. DNA molekülünü etkileyerek mutagenesiz, karsinogenesiz ve hücre ölümüne yol açarlar (54,64,102). Buna karşılık, serbest oksijen radikallerinin fagositozis, inflamasyon, ilaç ve toksinlerin detoksifikasyonu, iskemik reperfüzyon yetmezliği gibi birçok fizyopatolojik işlemlerde, önemli düzenleyici işlevleri vardır (17).

Mc Cord and Fridovic (63) 'in 1969 yılında, süperoksit radikalini spesifik olarak ortadan kaldıran süperoksit dismutazın (SOD) enzimatik aktivitesini göstermelerinden sonra bu konudaki araştırmaların giderek yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Son yirmi yıldan günümüze kadar yapılan çalışmalar sonunda gerek süperoksit radikali, gerekse SOD konusunda bir hayli bilgi edinilmiştir.

Süperoksit radikali, mikrobiyal patojenleri ortadan kaldırmak için çeşitli uyarılarla polimorf nükleer lökositlerden, monosit ve makrofajlar tarafından üretilir. Bu hücrelerde membrana bağlı NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, mitokondrial ve mikrozomal sitokrom P - 450, elektron transport zinciri ile oluşturulan süperoksit radikalının hücre içindeki konsantrasyonu, stoplazma ve mitokondri iç membranında bulunan bakır, çinko - SOD, mitokondri matriksinde bulunan mangan - SOD ile kontrol edilir (4,7,39,45,83,84,101).

Yaptığımız literatür taramasında, çeşitli hastalıklarda SOD aktivitesinde bir değişiklik olup olmadığını tesbit etmek amacıyla, plazma eritrosit ve lökositlerde SOD enzim aktivitesi tayinlerinin yapıldığı tesbit edilmiştir (15,20,32,37,38,49,60,61,71,80,100,107) . Bunlardan Romatoid Artrit (RA) ve Kronik Böbrek Yetmezlikli (KBY) hastalardaki çalışmalarda, daha çok plazma ve eritrositlerde, RA 'li hastalarda ise bunlara ek olarak lökositlerde de SOD enzim aktivitesi tayininin yapıldığı görülmüştür (5,18,43,47,59,82,86,87,88,99,108). RA ve KBY 'li hasta gruplarında elde edilen sonuçlar birbirine uymamaktadır. Behçet'li ve Sistemik Lupus Eritamatozuslu (SLE) 'li hastalarda bu konuda yapılan bir çalışmaya rastlanılamamıştır. B ve T lenfositlerde SOD enzim aktivitesinin 6 normal kişide tayin edildiği bir çalışma bulunmuştur (48). Hastalıklarda B ve T lenfosit SOD aktivitesi konusunda ise herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

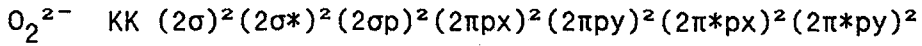
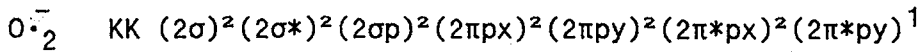
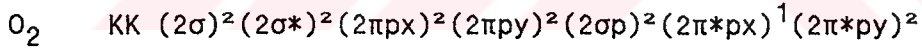
Bu sebeple çalışmamızda SOD enzim aktivitesinin hastalıklardaki tanı değerini ve hastalıkların değişik evrelerindeki düzeylerini ortaya koymak amacıyla, kontrol grubu ile Behçet, SLE, RA ve KBY 'li hastaların plazma, eritrosit ve lökositlerinde SOD enzim aktivitesini tayin ettik. Bunlara ek olarak kontrol grubunun bir bölümünde ve Behçet'li hasta grubunda B ve T lenfosit SOD aktivitelerini ölçtük. Behçet, SLE ve RA 'li hasta grupları, klinik olarak aktif ve inaktif olgulardan oluşuyordu. Elde edilen sonuçları klinik açıdan değerlendirerek, SOD enzim aktivitesinin tanı değerini, aktif ve inaktif hasta gruplarındaki değişimlerini, plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfositlerdeki SOD enzim aktiviteleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süperoksit Radikali

2.1.1. Süperoksit radikalinin kimyası :

Moleküler oksijen veya son yıllarda daha fazla kullanılmaya başlayan adlandırılması ile dioksijen ürünlerinin bir kısmı yavaş reaksiyon verirken, bir kısmı oldukça hızlı reaksiyon verirler. Moleküler orbital teorisine göre dioksijenin bağ sayısı iki olup, $2\pi^*p$ orbitalindeki ortaklanmamış iki elektronu nedeniyle de paramanyetik özellik gösterir (25, 68). Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali (anyonu), iki elektron eklenmesi ile peroksit iyonu oluşur. Dioksijen (O_2), süperoksit (O_2^-) ve peroksitin (O_2^{2-}) moleküler orbitalleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (19) .



" Oksijen radikali " terimi biyokimya literatüründe, oksijenin suya dönüştüğü redoks reaksiyonunda, ara ürün olarak oluşan reaktif oksijen ürünlerini belirtmek için kullanılır (14). Birçok oksijen ürününün sağlandığı reaksiyonlarla, ilgili enzimlerin hücredeki lokalizasyonları Tablo - 2.1.' de verilmiştir (14).

Tablo 2.1. Oksijen radikali oluşturan ilgili biyolojik redoks reaksiyonları .

	1e ⁻ oksidasyonu (örn.: ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz)	1e ⁻ dismutasyonu (örn.: SOD)	2e ⁻ H ₂ O ₂ oluşturan oksidasyon (örn.: Ürikaz, aminoasit oksidaz)	2e ⁻ su oluşturan oksidaz (örn.: peroksidaz)	2e ⁻ dismutasyonu (örn.: katalaz)	3e ⁻ oksidasyon dismutasyonu (örn. Haber-Weiss reaksiyonu)	4e ⁻ oksidasyon (örn.: sitokrom oksidazlar)
Reaksiyon tipi							
1e ⁻	O ₂						
2e ⁻	HO ₂ ⁻						
3e ⁻	H ₂ O ₂						
4e ⁻	·OH + OH ⁻						
	2 H ₂ O						
Hücredeki lokalizasyon örnekleri	Granülosit Membranı	Stoplazma, Mitokondrion	Peroksizom	Stoplazma Granülosit Granülleri	Peroksizom	Granülosit	Mitokondrion

2.1.2. Süperoksit radikalinin biyolojik sistemlerdeki kaynakları :

Süperoksit radikalinin hücrelerde, tioller (örn., glutasyon), flavinler (flavin mononükleotidler, flavadoksin, riboflavin gibi), dihidrooratat, nitrofurantion ve fenilhidrazinin oksidasyonu ile oluştuğu gösterilmiştir (84). Bu reaksiyonlarla oluşan O₂⁻ ' nin iyon transportunda, primidin biyosentezinde, oksihemoglobin - methemoglobin oranlarının düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmektedir (84).

Otooksidasyonlar neticesinde de süperoksit radikali oluşur. Katekolaminlerden epinefrinin, metal iyonu ile adenokroma oksidasyonu reaksiyonu O₂⁻ ile ilerler (66). Glutasyon, 6-hidroksidopamin, LDH'ın mevcudiyetinde NADH, menadionlu veya menadionsuz oksihemoglobin, diabetojenik dihidroksi fumarat, dialürik asit, karsinojenik aromatik aminler, askorbik asit ve sitokrom C'nin otooksidasyonu neticesinde O₂⁻ meydana gelir. Ayrıca adriamisin, mitomisin C, bleomisin gibi redoks aktif bileşikler de O₂⁻ oluşturur. Bu oksidatif proseslerle O₂⁻ oluşumu SOD ile inhibe edilir (68,73,74,84).

Solunum zincirinde , oksijen ve glukoz kullanımının artması, O_2^- , H_2O_2 'nin oluşumu ile karakterize edilen, değişik uyarımlarla oluşan solunumsal yanmada (respiratory burst), süperoksit radikalinin oluşumuna sebep olabilir (84). Nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozonofiller, Kupffer hücreleri ve mesangial hücrelerin tümü, bakteri veya zimozaan partiküllerinin fagositozları esnasında O_2^- oluşturdukları gösterilmiştir (39,45,56,83,84). Hücrel sistemlerde çeşitli uyarımlarla O_2^- 'nin oluşumu Tablo 2.2. 'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Hücrel sistemlerde çeşitli uyarımlarla süperoksit radikalinin oluşturulması.

1. Polimorfonükleer lökositlerden : Mikroplar, forbol esterleri , cytochalsin D, konkanavalin A, arasıdonik asit ürünleri, dijitonin, kemotaktik peptitler, kadmiyum, A23187 kalsiyum ionoforu ve prostoglandin Bx, lateks ve zimozaan partikülleri, hipotonik medyum, immünglobulinler, kompleman türevleri C5a ve carreegenan etkisi ile.

2 Monositlerden : Fagositoz esnasında veya aggrege IgG, forbol miristat asetat (PMA), kemotaktik ve trombosit aktivasyon faktörleri, opsonize zimozaan ve A23187 kalsiyum ionoforu etkisi ile.

3 Makrofajlardan : Bakterileri fagositozları esnasında, lateks bilyelerinin opsonize zimozaan partikülleri veya PMA'ya bağlı olarak, fagositik uyarımlar (tufsin), lipooksijenaz inhibitörleri (nordihidroguiraretik asit), trombosit aktivasyon faktörleri, immün kompleksler, tümör ve immün hücreler, pinositozis ile.

4. Eozonofillerden : Fagositoz esnasında.

5. Kupffer hücrelerinden : Zimozaan partiküllerinin fagositozu sırasında.

6. Mesangial hücrelerden : Fagositoz esnasında.

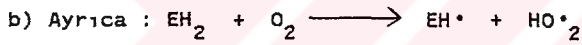
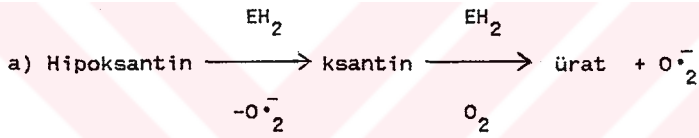
7. Bakterilerden : Elektron transportu sırasında.

Süperoksit radikalinin subsellüler sistemlerde oluşturulmasına ait örnekler Tablo-2.3. 'de gösterilmiştir. Bunun örneklerinden birisi, ksantin, ksantin oksidazın katalitik etkisi ile O_2^- teşkil ederek ürata çevrilmesidir. Bu reaksiyonda oluşan O_2^- SOD enzim aktivitesinin tayininde substrat olarak kullanılabilir (84).

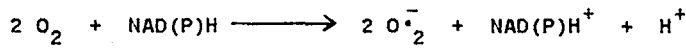
Nötrofil, monosit, makrofaj, Kupffer hücreleri, mesangial ve tümör hücre çekirdeklerini aktive eden, membrana bağlı NADPH oksidazın katalizi ile O_2^- oluşur (74,83,84). NADPH oksidaz, bir elektronu NADPH'dan oksijene transfer eder. Enzimin kofaktörü FAD'dir.

Tablo 2.3. Subsellüler sistemlerde süperoksit radikalinin oluşumu

1. Ksantin oksidaz (EH_2).



2. Membrana bağlı NAD(P)H oksidaz.

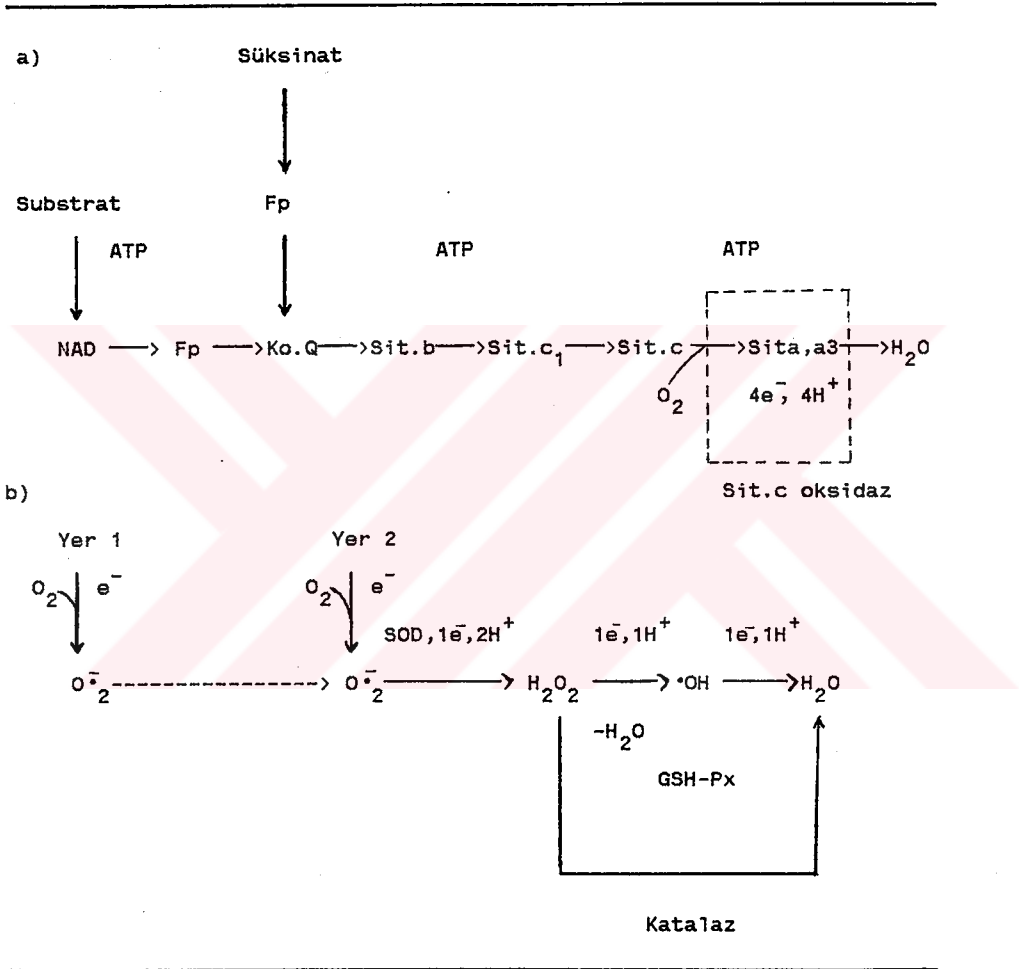


3. Mitokondrial elektron transport zinciri.

4. Mikrozomal sitokrom P-450 elektron transport zinciri.

Son çalışmalarda, mitokondrial solunum zincirinin 2 basamağından birinden kaynaklanan O_2^- 'nin, oluşan H_2O_2 'in büyük bölümünden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (84). Oluşan H_2O_2 katalaz ve glutatyon

peroksidaz (GSH-Px) tarafından suya çevrilir. Azid, siyanid, paraquat, streptonigrin ve menadion gibi bileşiklerin, mitokondrial solunum zincirindeki normal elektron transportunu 2 bölgeden saptırarak O_2^- oluşturdukları ileri sürülmektedir (84). Mitokondrial zararlı yol bileşeni kabul edilen O_2^- , SOD ile ortadan kaldırılır. Mitokondrial solunum zinciri ve O_2^- oluşum yerleri Şekil 2.1. 'de gösterilmiştir.



Şekil - 2.1. a) Normal mitokondrial solunum zincirinde elektron transportu ve ATP sentez yerleri. b) Mitokondrial solunum zincirinde zararlı elektron transferi. Yer 1 ve 2'de elektron akışının sapması sonucu O_2^- oluşabilir. Oluşan bu radikal de enzimatik veya kimyasal olarak dismutazyona uğrayarak H_2O_2 , $\cdot OH$ ve sonuçta suya indirgenebilir. Alternatif olarak, H_2O_2 katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH -Px) ile yine suya çevrilebilir (84).

(Sit. : sitokrom, Ko.Q : koenzim Q, Fp : flavoprotein)

2.1.3. Süperoksit radikalinin diğer reaktif ürünlere çevrilmesi :

Süperoksit radikali; protonlanarak perhidroksil radikali ($HO\cdot_2$), dismutasyonla hidrojen peroksit (H_2O_2) metal katalizi ile hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi diğer reaktif oksijen ürünlerine çevrilebilir. Fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitleri, perhidroksil, hidroksil ve tek oksijenle okside olabilir. Bunun sonucunda, alkil ($L\cdot$), peroksil ($LO\cdot_2$) ve alkoksi ($LO\cdot$) radikalleri oluşur. Ayrıca semikinon radikali de oluşturabilir ($Q\cdot$). Bu sebeple süperoksit radikalinin biyolojik sistemlerdeki toksik etkileri tartışılırken, oluşturduğu diğer reaktif ürünlerinde göz önünde tutulması gerekir (23,35,62,68,84). Süperoksit radikalinin çevrildiği diğer reaktif ürünler Tablo - 2.4. 'de topluca gösterilmiştir.

2.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi

2.2.1. SOD enzimi üzerindeki çalışmaların tarihi gelişimi :

1939 yılında Mann and Keilin sığır eritrositlerinden % 0,34 oranında bakır içeren, molekül ağırlığı yaklaşık 34.000 Dalton olan mavi renkli bir protein izole ederek buna " hemocuprein " ismini verdiler (63). Bu araştırmacılar hemocupreinde enzimatik aktivite tesbit edememişlerdi. Daha sonra insan eritrositlerinden buna benzer bir protein izole edilerek buna da " eritrocuprein " adı verildi. Devam eden çalışmalarda başka dokularda da molekül ağırlıkları yaklaşık aynı olan bakır içeren proteinler izole edildi. İnsan beyin dokusundan izole edilen protein " cerebocuprein ", sığır ve at karaciğerinden elde edilen ise " hepatocuprein " olarak isimlendirildi (63).

Tablo - 2.4. Süperoksit radikallerinin diğer reaktif ürünlere çevrilmesi.

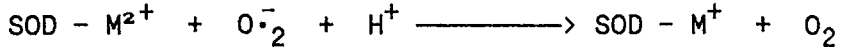
Reaksiyon	Yorum
<p>1. Protonlama :</p> $H^+ + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{pK\ 4.69} HO_2^{\cdot}$	Perhidroksil radikalleri, özellikle membran yüzeylerinde oluşabilir.
<p>2. Dismutasyon :</p> <p>i) $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow[2H^+]{SOD} H_2O_2 + {}^1O_2$</p> <p>ii) $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$</p>	<p>Reaksiyon yavaş.</p> <p>Reaksiyon hızlı.</p>
<p>3. Metal katalizleri ile hidroksil ($\cdot OH$) radikallerine çevrilme:</p> <p>i) $M^{n+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow M^{(n-1)+} + O_2$</p> <p>ii) $M^{(n-1)+} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{2H^+} M^{n+} + H_2O_2$</p> <p>iii) $M^{(n-1)+} + H_2O_2 \longrightarrow M^{n+} + OH^- + \cdot OH$</p>	<p>M= Fe, Cu, Mn gibi geçiş metal iyonlarının genellikle kompleks formları.</p> <p>$\cdot OH$, $O_2^{\cdot-}$ den daha reaktif.</p>
<p>4. Lipid peroksidasyonu :</p> <p>i) $LH + HO_2^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + H_2O_2$</p> <p>ii) $L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LO_2^{\cdot}$</p> <p>iii) $LO_2^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH$</p> <p>iv) $2 LOOH \longrightarrow LO_2 + LO + H_2O$</p> <p>v) $LOOH + M^{(n-1)+} \longrightarrow LO^{\cdot} + OH^- + M^{n+}$</p> <p>vi) $2 LOOH \longrightarrow LHOH + LO^{\cdot} + {}^1O_2$</p> <p>vii) $LO^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOH$</p>	<p>Doymamış yağ asitlerinin (LH) alkil radikallerine (L^{\cdot}), HO_2^{\cdot} ile oksidasyonu, $\cdot OH$ ile olduğu kadar hızlı değil ve bu proses anında, peroksil (LO_2^{\cdot}) alkoksi (LO^{\cdot}) radikalleri oluşur.</p> <p>Hidroperoksitler (LOOH), tek oksijen için potansiyel bir kaynak teşkil eder.</p>
<p>5. Semikinon radikali (Q^{\cdot}) oluşumu:</p> $O_2^{\cdot-} + Q \rightleftharpoons O_2 + Q^{\cdot}$	<p>Menadion semikinon radikali, methemoglobini, oksihemoglobine indirger, bu reaksiyonu SOD inhibe eder.</p>
<p>6. H_2O_2 ile - Halid - miyeloperoksidaz (MPO) sistemi :</p> <p>MPO</p> <p>i) $O_2^{\cdot-} + HOCl \longrightarrow HOCl^- + \cdot OH + O_2$</p> <p>ii) $OCl^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + Cl^- + H_2O$</p>	<p>Hipokloröz asit (HOCl), H_2O_2 den bir hem proteini olan MPO ile oluşturulur.</p>

1969 yılında McCord and Fridovic (63) bakır içeren bu proteinlerin, süperoksit radikalinin dismutasyonunu katalizleyen bir enzim olduğunu tesbit ettiler. Devam eden çalışmalarda SOD 'ın izoenzimleri birçok doku ve hücreden saflaştırılmıştır (2,3,7,12,14,27,36,51,58,77,94,101,103,107) Bu amaçla birçok kromatografik teknik kullanılmıştır. Bunlardan bakır şelat afinite kromatografisi ve immün afinite kromatografisinde daha kısa sürelerde, yüksek verimlerle saflaştırmalar yapılmıştır (2,3,103). Eritrositlerden Cu, Zn - SOD 'ın ayrılmasında, hazırlanan hemolizatların 70 - 80°C 'a kadar ısıtılarak hemoglobinin çöktürüldüğü, enzimin termal kararlılığından yararlanan teknikler de kullanılmıştır (8,27). Saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri de incelenmiştir (24). Rekombinant DNA 'lar kullanılarak E . kolide insan SOD 'ı üretilmiştir (34,40).

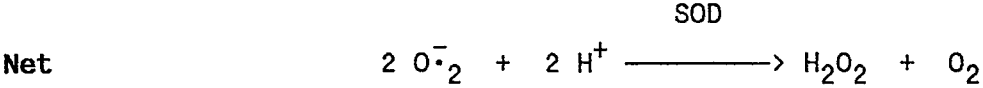
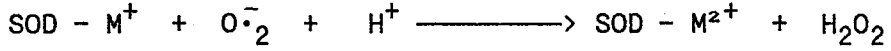
2.2.2. SOD enziminin katalizlediği reaksiyon :

Süperoksit radikali (O_2^-) dioksijenin indirgenmesinde sıkça rastlanılan bir ara ürün olarak ortaya çıkar.Canlı hücreler için hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi tehlike teşkil eder. Süperoksit dismutazlar (SOD, EC : 1, 15.1.1) olarak adlandırılan metallo enzimler, hemen hemen bütün organizmalarda bulunup, süperoksit radikaline karşı savunmayı sağlarlar (25,63,84). Tam olarak süperoksit; süperoksit oksidoredüktazlar olarak adlandırılan bu enzimler, süperoksit radikalinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizlerler (63). Bu enzimler aktif merkezlerinde bakır (Cu^{2+} , Cu^+), nonhem demir (Fe^{3+} , Fe^{2+}) veya mangenez (Mn^{3+} , Mn^{2+}) gibi metalleri ihtiva ederler (84).Enzimin, süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibi oluşur.

İndirgenme



Yükseltgenme



2.2.3. SOD 'ın izoenzimleri :

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 3 farklı SOD tesbit edilmiştir. Bunlar;

a) Bakır, çinko süperoksit dismutaz (Cu, Zn - SOD) : Karakteristik olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde bulunmakla birlikte nükleus, plazma membranı ve mitokondri iç membranından da izole edilmiştir (7,14,25,63,81,101,107). İnsanda bu izoenzimi kodlayan genin 21. ci kromozomda bulunduğu bildirilmiştir (7,94).

b) Mangan süperoksit dismutaz (Mn - SOD) : Ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde ve birçok bakteride bulunduğu gösterilmiştir (7,14,25,101). İnsanda bu izoenzimi kodlayan genin 6. kromozomda bulunduğu tesbit edilmiştir (7,94).

c) Demir süperoksit dismutaz (Fe - SOD) : Esas olarak bakterilerde bulunur. Az sayıda bitkide de tesbit edilmiştir (25).

Birçok farklı kaynaktan izole edilen Mn ve Fe - SOD 'ların amino asit dizilimleri bakımından benzerlikler gösterdiği, Cu, Zn - SOD 'ların ise farklı oldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte bütün SOD'lar, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonunu diffüzyon sınırlarına yakın ve yaklaşık aynı

hızlarla katalizlerler (25). Bunlara ek olarak insan dokularında, yüksek molekül ağırlıklı (135.000 dalton) , glikoprotein yapısında tetramerik bir Cu, Zn - SOD'da tesbit edilmiştir (58). Plazmadaki SOD'ın % 90'unu teşkil eden bu enzim, ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC - SOD) olarak adlandırılmıştır (1, 58).

2.2.3.1 Bakır, çinko süperoksit dismutazlar :

İlk olarak sığır eritrositlerinden izole edilerek enzimatik aktiviteleri gösterildikten sonra, yapıları ve katalitik özellikleri tanımlanmıştır. Cu, Zn - SOD'lar, maya, Neurospora crassa, ıspanak, buğday tohumu, kılıçbalığı, tavuk karaciğeri gibi birçok farklı kaynaktan izole edilmiştir. Bu çalışmalarda, her alt ünitesinde bir adet Cu (II) ve bir adet Zn (II) ihtiva eden, molekül ağırlığı yaklaşık 32.000 dalton olan homodimerik bir enzim elde edilmiştir. Alt ünitelerin zincir içindeki disülfid bağları ve nonkovalent kuvvetlerle birleşerek sağlam bir yapı teşkil ettikleri gözlenmiştir. Cu, Zn - SOD'lar genellikle oldukça kararlı enzimler olup, saflaştırılmaları sırasında kullanılan organik çözücülere karşı dayanıklı oldukları tesbit edilmiştir. Bu amaçla kullanılan 8.0 M üre ve % 2'lik sodyum dodesil sülfat ile aktivitelerini kaybetmedikleri gözlenmiştir (25,30).

Sığır eritrositlerinden elde edilen Cu, Zn - SOD, poliakrilamid jel elektroforezinde 3 bant verirken, tavuk karaciğerinden elde edilen enzimin 4 bant verdiği tesbit edilmiştir. Tavuk karaciğer Cu,Zn - SOD'nun izoelektrik fokusing ile, izoelektrik noktaları (pI), 6.75 ve 5.35 arasında 6 bant verdiği gözlenmiştir. Birçok fare dokusunda ise Cu, Zn-SOD'ın pI 4.0, 4.5 ve 5.0 'de, bağlı oranları 1:6:23 olmak üzere 3 bantı tesbit edilmiştir. Bu sonuçlarla enzimin pI 4.0 ve 5.0 'deki iki bantının, iki alt ünitesine ait olabileceği düşünülmüştür. Alt üniteler A ve B olarak gösterildiğinde, AA, AB, BB şeklindeki eşleşmelerin elektroforezde tesbit edilen 3 bantı izah edebileceği ileri sürülmüştür. Farklı örneklerdeki hibridizasyonlarda, alt ünitelerde de değişimler gözlenmiştir. Sığır Cu, Zn - SOD 'ının pI 4.9 ve 5.2'deki iki bandı , preperatif izo-

elektrik fokusung ile ayrılarak moleköl ağırlıkları, antijenik reaktiviteleri ile optik ve elektron spin rezonans (ESR) spektrumlarında herhangi bir farklılık gösterilememiştir. Ancak termal kararlılıklarında bir farklılık tesbit edilmiştir. Elektroforezde tesbit edilen bantların , posttranslasyonel modifikasyon düşüncesini doğrular nitelikte olduğu ileri sürülmektedir (2,6,14,25,107).

Fare ve sıçandaki Cu, Zn - SOD'ların elektroforetik paternlerinin doku spesifik oldukları gösterilmiştir. Bazı bitkilerdeki Cu, Zn - SOD elektroforez bantlarında, amino asit farklılıkları gösterilerek, bunların farklı gen ürünü olmaları gerektiği ileri sürülmüştür (7,25).

İnsan Cu, Zn - SOD 'ının normalde pI 4.7'de bant veren fraksiyonu ile karşılaştırıldığında, pI 4.85 'de bant veren genetik bir varyantı gösterilmiştir. Bu varyantın tam olarak aktif olduğu tesbit edilmiştir. Tetrazolium oksidaz olarak tanımlanan bir genetik varyantı da gösterilmiştir. Daha sonra bunun da aslında bir süperoksit dismutaz olduğu bildirilmiştir (7,14,25).

2.2.3.2. Mangan süperoksit dismutazlar :

İlk olarak Escherichia koliden izole edilmiştir. Daha sonra Streptococcus mutans, tavuk karaciğer mitokondrisi, Pleurotus olearius, Bacillus stearothermophilus, maya, insan karaciğeri, Thermus aquaticus, Porphyridium cruentum, Pisium sativum, mısır ve Myobacterianın birçok türü gibi çok sayıda organizmadan izole edilmiştir. Mn - SOD 'ların moleköl ağırlıkları yaklaşık 23.000 dalton olup, bir alt ünitesinde bir atom Mn (II) ihtiva eder. Bu enzimler genellikle dimerik bir yapı gösterirler. Bununla beraber, myobacteria ve termofilik bakterilerden elde edilen Mn - SOD'ların tetramerik yapıda oldukları tesbit edilmiştir (7, 14,25,94).

2.2.3.3. Demir süperoksit dismutazlar :

Bu izoenzim de ilk olarak Escherichia koliden izole edilmiş, daha sonra photobacteria, bir tür deniz yosunundan, Chlorobium thisulfatophilum, Chromatium vinosum, Pseudomonas ovalis, Anacytis nidulans ve Methanobacterium bryantii gibi birçok bakteriden izole edilmiştir. Birkaç istisnası dışında, bütün Fe - SOD'lar bir alt üniteli olup, dimerik yapı gösterirler. Alt ünitelerinde bir atom Fe (II) vardır. Molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 23.000 daltondur. Myobacterium tuberculosis ve Rhodococcus bronchialisden elde edilen Fe - SOD'ların tetramerik yapıda oldukları gösterilmiştir (14, 25).

2.2.4. SOD 'ların yapısal özellikleri :

Amino asit dizilişi tayin edilen ilk SOD, sığırcu, Zn - SOD 'dır. Daha sonra diğer izoenzimlerinin de amino asit dizilimleri tayin edilmiş ve birçok organizmadan elde edilen Mn ve Fe - SOD 'ların dizilim benzerlikleri gösterdikleri tesbit edilmiştir (14,25).

SOD izoenzimleri, x - ışını difraksiyonu metodları ile inceleyerek yapıları hakkında daha detaylı bilgiler edinilmiştir (25). Cu,Zn - SOD in 2 Å'luk çözümüleme (resolution) sonucunda , bu enzimin sekiz kollu antiparalel β yapılu bir silindir şeklinde olduğu bulunmuştur. Bu yapı şekli β - fıçı (barrel) olarakta anılır. β - fıçı yapıdan 2 uzun nonheliks ilmek (loop) uzanır. Bunlardan bir tanesi üst kenarda diğeri alt kenarda bulunup, aktif bölgeyi kapatırlar. Doğal dimerik molekülde 2 aktif merkez birbirinden 34 Å'luk uzaklıktadır. Bu da verilen dimer ölçülerinde birbirinden olabildiğince uzaktır. Her aktif merkezdeki Cu (II)'a, bükülmüş 4 düzlem tertibiyle, 4 imidazol halkası bağlanmıştır. Bu imidazoller 44, 46, 61 ve 118 numaralı histidinlere aittir. Zn (II) ise Cu (II)'a 61 numaralı histidin imidazolünün oluşturduğu bir ligant köprüsü ile bağlanmıştır. Zn (II) ye bağlanan diğer ligantlar 69 ve 78 numaralı histidinlerle 81 numaralı aspartik asit tarafından teşkil edilir. Her alt üniteyedeki sekiz histidin bakiyesinden altısının metale bağlanmış olması dikkati çekmektedir (25).

Bakır, çinko - SOD'ın aktif bölgesi de çok detaylı olarak incelenmiştir (25). Cu (II)'nin kanalın dibine yerleşerek kısmen solventle karşı karşıya bırakıldığı, Zn (II) 'nun ise Cu (II)'ın karşısındaki bir pozisyonda, protein yapısı içine yerleşerek hemen hemen bütünü ile gizlendiği ileri sürülmüştür . Kanal bölgesindeki atomların düzenlenme şeklinin, kataliz için kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. 141 numaralı arginine bir hidrojenin bağlanarak bakır ile ligant teşkil edip, O_2^- gibi giriş kanalını kapattığı, O_2^- olmadığı zaman ise iki su molekülünün bu pozisyona bağlandığı ileri sürülmektedir (25).

Mangan ve demir - SOD'ının, x - ışını kristallografisi ile yapılarının incelenmesi sonunda, bu iki izoenzimin birbirlerine benzer yapıda oldukları görülmüştür. Cu, Zn - SOD'da β - fıçı yapısı en önemli özellik iken, Mn ve Fe - SOD'ların α - heliksce zengin bir yapı gösterdikleri tesbit edilmiştir. Ayrıca metal bağlama bölgelerinin de farklı olduğu bulunmuştur. T. thermophilus dan izole edilen tetramerik Mn - SOD'ın x - ışını kristallografisi ile 2.4 Å'lık çözünmede analizi yapılarak, metal ligantlarının 26, 81 ve 167 numaralı histidin ile 163 numaralı aspartatdan sağlandığı tesbit edilmiştir . Mn ve Fe - SOD'ların alt üniteleri başına 0.5 veya 1 atom arasında metal iyonu ihtiva ettikleri gösterilmiştir (25,40).

2.2.5. Süperoksit dismutazların katalitik özellikleri :

Süperoksit dismutazların aktif merkezlerindeki metal iyonlarının uzaklaştırılmasının, katalitik aktivitelerini kaybetmelerine sebep olduğu, yeniden yerleştirilmeleri sonucunda da, aktivitelerini yeniden kazandıkları gösterilmiştir . Metal iyonlarının uzaklaştırılmasında, düşük pH'da şelat yapıcı maddeler kullanılmıştır (25,63).

Bakır, çinko - SOD'lardaki bakırın, katalitik siklustaki elektron transferinde fonksiyonu olduğu, çinkonun ise elektronların yönlendirilmesinde görev aldığı ileri sürülmektedir . Cu (II) 'ın bir başka metal iyonu ile yer değiştirmesi sonucunda enzim aktivitesini tamamen kaybet-

mektedir. Buna karşılık Zn (II)'nin, Ca (II), Hg (II), Cd (II), Cu (II) ile yer değiştirmesi veya başka bir yere yerleştirilmesi çok fazla aktivite kaybına yol açmamaktadır. Dietil ditiokarbamat gibi hidrofobik şelat yapıcılar, Cu, Zn - SOD'daki Cu (II)'ı ayırabilir. Böylece hazırlanan apoenzimin Cu (II)'a afinitesi oldukça fazladır. Mangan ve demir - SOD'larda da doğal enzimlerde bulunan metallerin tamamen spesifik oldukları, bunların uzaklaştırılması ile aktivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir (25,63).

Bakır, çinko - SOD'ın mavi rengi, katalitik yatışkın durumda (steady-state) yaklaşık % 30 oranında bu rengini kaybetmektedir. Bu bulgu, enzimin aktif merkezindeki Cu (II)'ın O_2^- ile dönüşümlü olarak birbirini izleyen indirgenme ve yükseltgenmeleri esnasında ping-pong mekanizmaların söz konusu olduğunu düşündürmektedir. Bu katalitik sıklustaki iki yarı reaksiyonun hız sabitlerinin de yaklaşık birbirine eşit oldukları ileri sürülmektedir. Bu enzim için verilen diffüzyon sınırlarına yaklaşan oldukça yüksek turn-over hızlarıyla muhtemelen substratla doygunluğa ulaşamamaktadır (24,25).

Homodimerik Cu, Zn - SOD 'un aktif merkezlerinin birbirinden bağımsız fonksiyon yaptıkları sanılmaktadır. Doğal alt ünitelerin birbirine eşit aktivite gösterdiği ileri sürülmektedir. Bu alt üniteler arasındaki fonksiyonel etkileşimlerin tam katalitik aktivite için esansiyel olmadığı düşünülmekte ise de , halen Cu, Zn -SOD'ın alt ünitelerinin katalitik aktivitelerinin korunarak ayrılmaları gerçekleştirilememiştir (25).

Bakır, çinko - SOD'ın redoks titrasyonu, bazik grupların salınımına Cu (II)'ın indirgenmesinin eşlik ettiğini göstermektedir. Katalitik çevrim esnasında protonların ürüne hızlı bir şekilde naklinin, 61 numaralı histidin imidazolatının yardımıyla oluştuğu düşünülmektedir. Cu (II)'ın müteakip indirgenmesi veya O_2^- ile oksidasyonu esnasında, bu histidin imidazolatının da Cu (II) ile yeniden ligant teşkil ettiği veya ayrıldığı ileri sürülmektedir . İmidazolün Cu (II)'dan ayrılması ile oldukça fazlaca bazikleşerek çözücüden bir proton aldığı, katalitik çevrimin ikinci yarısında HO_2^- teşkil ederek proton verdiği düşünülmekte-

iyonik kuvvetlerin değişimi incelenerek, iyonik kuvvetin artışıyla, enzimatik reaksiyonun hızının arttığı tesbit edilmiştir. Bu bulgu, elektrostatik kolaylaştırmanın katalizleme prosesinde etkili olduğu görüşünü destekler niteliktedir (14,25). E. kolu Mn ve Fe - SOD 'ları üzerinde yapılan çalışmalarda, katalitik prosesdeki elektrostatik kolaylaştırmada lizin bakiyelerinin etkili olduğu ileri sürülmüştür (25).

X ışını kristallografik verilerinden elde edilen detaylı yapısal bilgiler kullanılarak, sığır Cu, Zn - SOD' ı üzerindeki elektrostatik alanlar, özellikle aktif merkez bölgesi dikkate alınarak analiz edilmiştir. Bunun sonucunda, Cu (II)'nin bulunduğu aktif merkeze çözücü geçişine izin veren, uzun derin bir kanala uyan pozitif yüklü bir alan bulunduğu tesbit edilmiştir. Böylece elektrostatik potansiyel gradientinin, anyonik O_2^- 'ni kanal içine Cu (II) 'a doğru yönlendirerek, farklı örneklerin girişine de engel olabileceği ileri sürülmüştür. Cu, Zn - SOD 'da 134 numaralı lizin ile 131 numaralı glutamat bakiyelerinin süperoksit radikalinin kanala yaklaşımında, 141 numaralı argininin de radikalın lokal yönlendirilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (25).

Cu, Zn - SOD 'ın aktif merkez modeli ile O_2^- 'nin etkileşiminin kuantum kimyası çalışmalarının ışığı altında yeni bir mekanizma da önerilmiştir. Aktif merkezdeki Cu (II) 'nin sıra ile indirgenme ve yükseltgenmesiyle, ürün olarak O_2^- ve H_2O_2 'den birinin oluştuğu ping - pong mekanizma yerine öne sürülen yeni mekanizma şöyledir. Cu (II) 'a bağlı bir O_2^- 'nin ikinci bir O_2^- 'nin bakırı Cu (I)'e indirgeyene kadar bağlı kaldığı ileri sürülmektedir. Böylece istirahat halindeki enzimde, Cu (II)'de ligant olarak bir molekül suyun bulunduğu ve O_2^- 'nin bu su molekülü ile yer değiştirdiği düşünülmektedir. Daha sonra Cu (II) - O_2^- , ikinci bir O_2^- ile Cu (I) - O_2^- kompleksine indirgenerek, taşıdığı yüklerin dağılımı ile Cu(II) - peroksit kompleksi oluşturarak neticede HO_2^- 'ye dissosiyeye olmaktadır. Burada 141 numaralı argininin, Cu (II) - O_2^- kompleksinin bir hidrojen bağı ile stabilizasyonunda kritik bir rol üstlen - diği ileri sürülmektedir (25).

2.2.6. SOD inhibitörleri :

Bütün SOD'lar azid ve nitropirussid ile inhibe olurlar. Ayrıca SOD izoenzimlerinin spesifik inhibitörleri de vardır. Siyanür (5 mM) ve N, N - dietil ditio karbamatın Cu, Zn - SOD 'ı , hidrojen peroksite Cu, Zn - SOD ve Fe - SOD'ı , % 2 'lik sodyum dodesil sülfatın Mn - SOD 'ı spesifik olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Spesifik inhibitörler doku ve hücre ekstraktlarında izoenzimlerin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Bakterilerde bulunan Fe - SOD için spesifik inhibitörler, bunlar için selektif bir zehir teşkil eder. Bu durumun pratik yararlarının olabileceği düşünülmektedir (14,16,25,30,84).

2.2.7. SOD 'ın biyosentezi :

Streptococcus faecalis ve *E. kolide* hücre içindeki süperoksit radikal oluşumunun artışı ile SOD düzeylerinde de artışlar gözlenmiştir. Fare akciğeri, alveolar makrofajlar, kültürlenmiş endotelial hücreleri ile diğer bir çok hücre ve dokuda pO_2 'nin artışı ile SOD'nin indüksiyonu gösterilmiştir. *P. Ovalis* ve *E. kolide* kültür ortamındaki Fe miktarının artışı ile Fe - SOD düzeyleri artarken, Mn tuzlarının da Mn - SOD 'ın artışına sebep olduğu bildirilmiştir. Quinon, viologen ve boyaların *E. kolide* SOD'ı artırdığı gözlenmiştir (14,25,84).

Dactylium dendroides mantarının, Cu (II) 'ın bulunmadığı ortamda Cu, Zn - SOD 'ındaki azalışını, Mn - SOD 'ın telafi edici artışı ile dengelediği bildirilmiştir (25). Fare ve civcivlerin Mn 'dan fakir diyetle beslenmeleri sonucunda, Mn - SOD düzeyleri azalırken Cu, Zn - SOD düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (25). Uzun süreli E vitamini eksikliği sonucunda, farenin birçok dokusundaki SOD düzeylerinde artışlar olduğu tesbit edilmiştir (25).

2.2.8. SOD tayin metodları :

SOD enzim aktivitesinin tayin edilmesi için substratı olan süperoksit radikali enzimatik veya non enzimatik bir yolla deney ortamında oluşturulur. Ortama bu radikali gösteren bir indikatör eklenerek, indikatör reaksiyonun değişiminden SOD aktivitesi tayin edilir. Süperoksit radikali geleneksel analitik cihazlarla kolayca tayin edilemez. Bununla birlikte radikalın direkt ölçümüne dayanan metodlar da geliştirilmiştir. SOD tayininde kullanılan bu direkt deneyler Tablo 2.5. 'de topluca verilmiştir. Direkt deneyler, oldukça saf örnek gerektirmeleri ve özel düzeneklerle yapılabilmeleri nedeniyle rutin tayinler için pratik değildirler (6,14,16,25,30,44,50,51,57,63,66,79,81,90,98,104).

SOD enzim aktivitesinin tayininde, substratı olan süperoksit radikalının oluşturulması ve bu radikalın gösterilmesi için birçok reaksiyon tanımlanmıştır. SOD enzim aktivitesi tayininde kullanılan bu indirekt deney bileşenleri Tablo 2.6. 'da gösterilmiştir (14,57).

Tablo 2.5. SOD tayininde kullanılan direkt deneyler.

-
- Puls radyoliz
 - Donmuş örneklerin elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi
(rapid - freeze EPR)
 - Stopped - flow spektroskopisi
 - Polarografik teknikler
 - ¹⁹F NMR spektroskopisi
-

SOD tayinlerinde elektroimmünoassay, enzimimmünoassay, RIA, gibi immünolojik tayin metodlarında kullanılmıştır. Bu metodlar duyarlılık ve spesifiklik yönünden üstün olmakla birlikte enzim aktivitesini yansıtmazlar (14,25,78).

Tablo 2.6. SOD 'ın indirekt tayininde kullanılan süperoksit radikal kaynakları ve indikatörleri.

$O_2^{\cdot -}$ kaynakları	$O_2^{\cdot -}$ indikatörleri
- Ksantin + ksantin oksidaz	- Sitokrom C 'nin indirgenmesi
- Flavinlerin fotoredüksiyonu	- NBT 'nin indirgenmesi
- Epinefrinin otooksidasyonu	- Tetranitrometanın indirgenmesi
- Pirogallolun otooksidasyonu	- Epinefrinin otooksidasyonu
- 6-hidroksidopaminin otooksidasyonu	- Pirogallolun otooksidasyonu
- Fenozin metosülfatın NADH ile oksidasyonu	- 6-hidroksidopaminin otooksidasyonu
- Potasyum süperoksit	- 2-etil-1-hidroksi-2,5,5-trimetil-3-okzazilidinin oksidasyonu
- $O_2^{\cdot -}$ 'nin elektrokimyasal indirgenmesi	- Lüminolün kemilimünesansı
- Rifamycin SV 'nin otooksidasyonu	- Hidroksil amonyum kloritten nitrit teşekkülü
	- Hematoksilenin otooksidasyonu
	- Karatenoid erocin
	- Horseradish peroksidaz

2.2.9. SOD enziminin klinik önemi :

Çeşitli hastalıklarda hücrelerdeki SOD aktivitelerinde değişikliklerin olabileceği bu konuda yapılan birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Bu durum oksijen ve süperoksit radikalleri, Tirosoy 21 'in gen dosaj etkisi, inaktivasyon, sızma ve hastalığın tabiatı gibi faktörlerle açıklanmaya çalışılmıştır(5,15,20,32,37,38,43,49,60,61,80,82,87,93,99,100,107,108). SOD aktivite değişimleri organ spesifik olabileceği gibi, Cu, Zn - SOD ve Mn - SOD gibi izoenzimlerini de farklı şekilde etkileyebileceği ileri sürülmektedir (7,14,84,101). SOD 'ın biyolojik sistemlerdeki bazı etkileri Tablo 2.7. 'de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. SOD 'ın biyolojik sistemlerdeki bazı etkileri.

Sistem	Etki
1. Moleküler	<p>SOD epinefrin ile C vitamininin otooksidasyonunu, adriamisin, daunorubin, mitomisin C 'nin redoks metabolizmasını inhibe eder.</p>
2. Hücresel	<p>i) Forbol miristat asetat ile insan lenfositlerindeki kromozal hatanın indüksiyonu SOD ile inhibe edilir.</p> <p>ii) Kemik iliği ana hücreleri radyasyondan SOD ile korunur</p> <p>iii) SOD fagositozun sebep olduğu mutajenezi inhibe eder.</p> <p>iv) Kemoterapi ile myelosüppresyon i.v. SOD ile tersine çevrilir.</p> <p>v) Lösemide, eritrositlerdeki SOD sıklıkla depresedir. Methemoglobin ve malondialdehit düzeylerinin artışıyla birlikte olan bu durumu hücre ömrünün azalışı ve aneminin izlediği düşünülmektedir.</p> <p>vi) İnsan endotelial hücreleri ve fibroblastlardaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin sitotoksik etkileri SOD ve katalaz tarafından inhibe edilir. SOD 'ın bu koruması enzimlerin lipozomlarda artabilen hücre içi konsantrasyonları ile orantılıdır.</p> <p>vii) Fagositik bakterisid etki SOD ve katalaz tarafından inhibe edilir.</p>
3. Organizmalar	<p>i) Plasmodium berhei fagositik hücrelerden süperoksit radikalinin salınımına sebep olur, böylece konakçı hücrede SOD oluşur.</p> <p>ii) Süperoksit radikalının Trichinella spiralis öldürücü etkisi SOD ile inhibe edilir.</p>

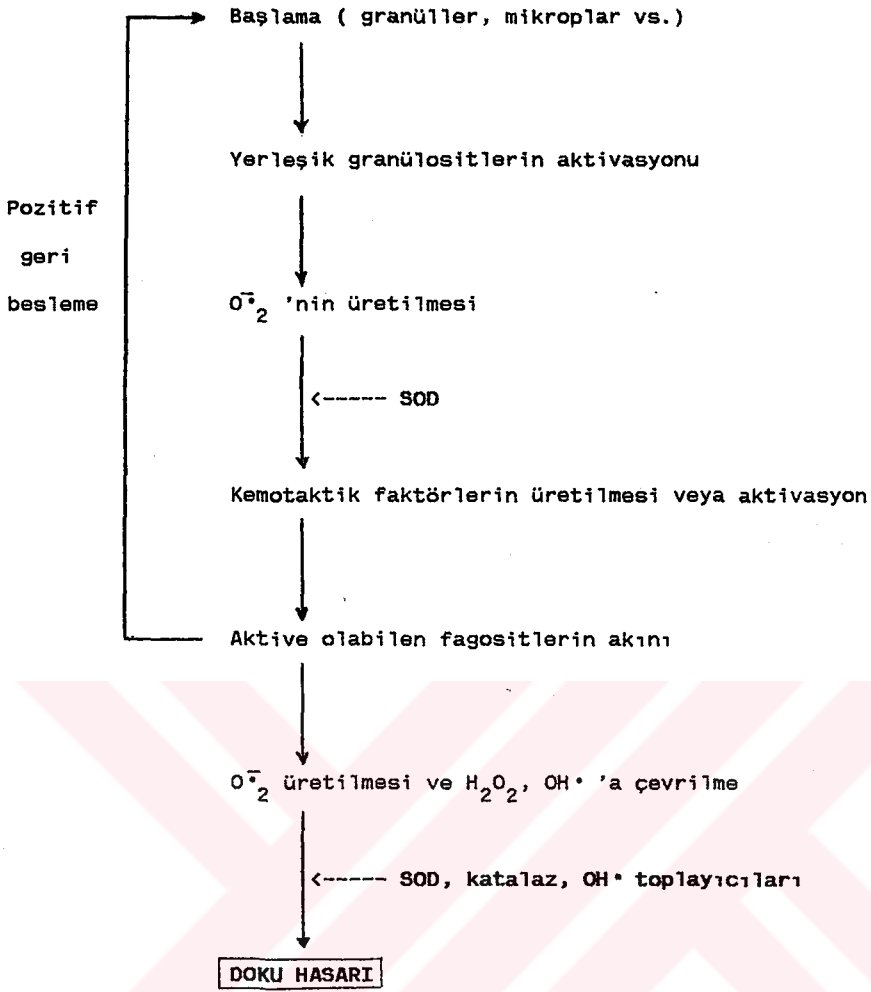
SOD 'ın anti - inflamatuvar etkileri eritrocuprein adı verilen proteinin bir enzim olarak tanımlanmasından önce ortaya konmuştu (63,84). Daha sonra inflamasyonda serbest oksijen radikal türevlerinin rollerinin açıklanması yönünde pekçok çaba sarfedilmiştir (17,39,54,55,64,77,84, 102). Şekil 2.3. 'da SOD, katalaz ve •OH radikalini ortadan kaldırı- cuların inflamasyonu inhibe edebilecekleri yerler gösterilmiştir.

Radyasyonun sebep olduğu birçok olumsuz etkiden hücrelerin korunmasında SOD 'ın önemli bir işlevinin olduğu düşünülmektedir. Fare- llerde kemik iliği ana hücrelerinin, radyasyonun zararlı etkilerinden SOD ile korunduğu ileri sürülmüştür. (17,55,84,85,93). Hayvanlarda x ışınının sebep olduğu malign transformasyonların SOD ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Farelerde x ışını ile oluşturulan lösemide, yaşama süresinin SOD ile % 50 oranında uzadığı bildirilmiştir (17,54,84).

Sigara ve kahve tiryakilerinde oluşan fazla sayıdaki toksik radikalın SOD ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (17,55,84). SOD 'ın renal vasküler rezistansın düşmesinde ve reperfüzyonu takiben hızlı kan akımının sağlanmasında katalazdan daha etkili olduğu bulunmuştur (17, 55,64,84,102). Mesengial alanda fazla miktarda antijenin bulunduğu otoimmün glomerulonefritin bir formunun SOD ile inhibe edilebileceği bildirilmiştir (17,84).

RA 'li hastalarda, Marklund et all.(57) sinovial sıvısında EC - SOD ve Cu, Zn - SOD 'ı , Pasquier et all. (82) polimorfonükleer lökositlerde Mn - SOD 'ı, Rister (87,88) granülositlerde total SOD 'ı , Banford et al. (5) eritrositlerde total SOD 'ı düşük bulmuşlardır.

Marklund et all. (61), HLA - B27 ve HLA - DR4 pozitif ve negatif olguların plazma, SOD aktivitelerinde farklılık tesbit etmemişlerdir. Aynı araştırmacılar ceroid - lipofuscinosesli hastaların plazma ve serobrospinal sıvılarında SOD izoenzimlerinde de bir farklılık gözlememişlerdir (60). Disülfiramla tedavi edilen alkoliklerde plazmada EC - SOD 'da hafif yükseklik tesbit edilmiştir (80). Venöz stazda plazma EC - SOD düzeylerinin fazla değişmediği (71), plazmaya i.v. olarak heparin verilmesinin geçici süre EC - SOD artışına sebep olduğu bildirilmiştir (41).



Şekil 2.3. O⁻₂, H₂O₂, OH[•] gibi serbest radikallerin aracılık ettiği inflamasyonda SOD, katalaz ve OH[•] radikal toplayıcılarının etkileri.

Eritrosit SOD düzeyleri Fanconi anemisinde (38) düşük, Down sendromlu hastalarda (93) ,demir eksikliği anemisinde (37) ve KBY 'li hastalarda yüksek (99), β - talesemide (15) farklı bulunmamıştır.

Doğan et all. (20), psoriasisli hastaların polimorfonükleer lökositlerinde SOD aktivitesinin düşük olduğunu tesbit etmişlerdir. Kökoğlu et all. (49) lösemili hastaların lökosit SOD aktivitelerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Yasuma et all. (107), karaciğer yetmezlikli olgularda total SOD 'ın yüksek olduğunu göstermişlerdir. Oka et all. (78) kolon kanserli olgularda serum Cu, Zn - SOD 'unun yüksek olduğunu bildirmişlerdir.



3. M A T E R Y A L V E M E T O D

3.1. Kullanılan Materyal, Kimyasal Madde, Malzeme ve Cihazlar.

3.1.1. Materyal:

Çalışmamıza 1990 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi, İmmünoloji Bilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı ve Behçet Merkezinde tanısı konarak takip ve tedavi altına alınan 71'i Behçet'li, 70'i Romatoid Artritli (RA), 58'i Sistemik Lupus Eritematozuslu (SLE), 45'i Kronik Böbrek Yetmezlikli (KBY) olmak üzere 244 hasta dahil edildi.

Behçet'li hasta grubunun 35'i klinik olarak aktif olup 14'ü kadın, 21'i erkek, yaş ortalamaları 34.4 (18-60), 36'sı ise inaktif olup, 19'u kadın, 17'si erkek, yaş ortalamaları 34.3 (18-63) idi.

RA'li hasta grubunun American Rheumatism Association (ARA) kriterlerine (42) göre 40'ı aktif olup bunların 32'si kadın, 8'i erkek, yaş ortalamaları 35.6 (17-70), 30'u inaktif olup, 23'ü kadın, 7'si erkek, yaş ortalamaları 34.8 (19-58) idi.

SLE'li hasta grubunun ARA kriterlerine göre 27'si aktif olup 22'si kadın, 5'i erkek ve yaş ortalamaları 30.0 (14-49), 31'i ise inaktif olup, 26'sı kadın, 5'i erkek, yaş ortalamaları 29.5 (14-56) idi.

KBY'li hasta grubunun 15'i kadın, 30'u erkek olup yaş ortalamaları 33.4 (13-67) idi.

Herhangi bir şikayeti olmayan sağlıklı 123 kişilik kontrol grubunu, böbrek donör adayları ve gönüllü bireyler oluşturuyordu. Bunların 62'si kadın, 61'i erkek, yaş ortalamaları 33.4 (17-69) idi.

Çalışma grubunu oluşturan hasta ve kontrol olarak toplam 367 kan örneğinde, plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktiviteleri, lökosit, B ve T lenfositlerinde protein miktarları ve hemolizatlarda hemoglobin düzeyleri tayin edildi. Ayrıca Behçet'li hasta grubunda 62, kontrol grubunda 40 olguda B ve T lenfosit SOD aktiviteleri ölçüldü.

Kan örneklerinin alınması:

Bütün olgulardan, 10 ml venöz kan numunesi vakumlu heparinli tüplere alındı. Tüpler 6-7 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 2000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki plazmalar ayrılıp, kapaklı propilen tüplere konuldu. Çalışma anına kadar -70°C ' da derin dondurucuda saklandı. Tüplerin dibinde kalan sedimentler , lökositler, B, T lenfositler ve eritrositlerin ayrılmasında kullanıldı.

3.1.2. Kimyasal Maddeler:

NaCl, NaOH, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, tri sodyum sitrat 5,5 hidrat, orto - fosforik asit, Na_2CO_3 , CuCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kloroform Merck'den , acridine orange (akridin oranj), ethidium bromide, coomassi brilliant blue G-250 , sığır serum albumini (BSA, kristalize), ksantin, di sodyum EDTA, nitro blue tetrazolium (NBT) Sigma'dan , etanol Tekel'den , pH standartları (pH=7.00 ve 10.00) Russell'den temin edilmiştir.

Hazır olarak sağlanan diğer reaktifler:

Ksantin oksidaz grade III, süperoksit| dismutaz (bovin liver), Histopaque (d=1.077), Sigma'dan, Dynabeads HLA-Class I , Dynabeads HLA-Class II Dynal'dan, Giemsa's Solution Merck'den temin edilmiştir.

3.1.3. Gerekli Malzemeler:

- Vakumlu heparinli kan alma tüpü (10 ml,Grainer)
- Vakumlu t p için iğne (21G 1/2 Becton Dickinson)
- Polipropilen tüp (6, 10 ml Grainer)
- Manyetik partikül konsantratör (MPC-6, Dynal)
- Neubauer sayma kamarası (İldam)
- Terasaki mikrotitrasyon plağı (Nunck)
- Hamilton enjektörü (50  l, Hamilton)
- Hamilton repeating dispenser (Hamilton)
- Repeating dispenser (Nichiryo)
- Otomatik pipetler 10,20,50,100,200,  l'lik fiks,50-250, 200-1000  l'lik ve 1-5 ml'lik ayarlı (Socorex)
- Otomatik pipet uçları (Grainer)
- Cam malzemeler (balon joje, beher, pipet, pastör pipeti, deney tüpleri, lam, lamel)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar:

- Kan sayım cihazı (Coulter Counter, Model ZF)
- Hemoglobinemetre (Coulter Counter)
- Coulter Mixer (Coulter Counter)
- Soğutmalı santrifüj (Varifuge RF, Hareaus)
- Spektrofotometre (UV,visible, Zeiss-PM2 DL)
- Derin Dondurucu (-80  C, Biofreezer, Forma)
- Binoküler Mikroskop (Labophot-2, Nikon)
- Floresan Mikroskop (Ortophan, Leitz)
- pH metre (Model-701, Orion Research)
- Elektrikli Hassas Terazisi (Mondia)
- Vorteks (N vemix)
- Su Banyosu (SB-100, Nüve)
- Manyetik karıŐtırıcı (MK-318,Nüve)

3.2. Kullanılan Metodlar

3.2.1. Lökositlerin ayrılması :

3.2.1.1. Metodun prensibi:

Antikoagülanlı kan örneklerinden lökositler, Boyum (9) tarafından tarif edilen gradient santrifükasyon tekniği ile ayrılmıştır. Test farklı yoğunluktaki hücrelerin, bir gradient çözeltisi üzerine tabakalandırılıp santrifüjlenerek ayrılması esasına dayanır. Bu amaçla sukrozun epiklorhidrin polimeri olan Ficoll ve radyopak bir kontrast madde olan sodyum metrizoatın yoğunluğu $d=1,077$ olan hazır steril çözeltisinden oluşan Histopaque kullanılmıştır.

3.2.1.2. Reaktifler

1) Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS), pH 7,4 :

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,157 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,980 g
NaCl	8,100 g

Distile suda çözülerek hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanarak çözüldü. pH' sı 7,4' e ayarlanan çözelti $+4^\circ\text{C}$ ' da buzdolabında muhafaza edildi.

2) 2xPBS : Yukarıda verilen madde miktarları distile suda çözülerek hacim 0,5 L 'ye tamamlandı.

3) Ficoll çözeltisi (Histopaque $d=1,077$)

4) Giemsa çözeltisi

3.2.1.3. Deneyin yapılışı:

Bölüm 3.1.1. de açıklandığı gibi plazmaları ayrıldıktan sonra tüplerin dibinde kalan sedimentlerin üzerine, 5 ml PBS eklendi, tüpler alt üst edilerek karıştırıldı. 12 ml'lik plastik bir tüpe 3 ml Ficoll çözeltisi konuldu, üzerine PBS ile dilüe edilen sediment tabakalandırıldı. Tüpler santrifüj terazisinde dengelenerek açılmalı başlıklı santrifüjde (swing out rotor), 1000 g'de 15 dk.

santrifüjlendi. Daha yoğun hücreler olan eritrosit ve granülositler Ficoll ile aggrege olarak tüpün dibine çöktü. Çoğunu lenfositlerin oluşturduğu mononükleer hücreler Ficoll'ün üzerinde opak bir tabaka oluşturdu. Bu tabaka bir pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde toplanarak (0,5-1 ml) 6 ml'lik polipropilen tüpe aktarıldı. Üzerine 5 ml PBS eklendi, alt üst edilerek karıştırıldı. B ve T lenfosit ayrılacak ise, lökositler 3 ayrı tüpe eşit miktarlarda paylaştırıldı. B ve T lenfositlerin ayrımında kullanılacak 2 tüp, buzlu su içeren bir behere yerleştirilerek +4° C daki buzdolabına konuldu. Diğer tüp 1500 g'de 1 dk. santrifüjlendi. Üstteki kısım atıldı, dipte kalan kısma 5 ml PBS eklenerek pastör pipeti ile yavaşca karıştırıldı. 1000 g'de 1 dk. santrifüjlendi, üstteki kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edilerek lökositler yıkandı. Son yıkamadan sonra tüplerin dibi makroskopik olarak muayene edildi. Eritrosit kontaminasyonu varsa hipotonik şok ile bu hücreler uzaklaştırıldı (bölüm 3.2.1.4.). Hipotonik şok yapılarak eritrositleri uzaklaştırılan tüpteki lökositler PBS ile bir kez daha yıkandı. Son yıkamadan sonra tüplere 1 ml PBS eklendi, pastör pipeti ile resüspanse edildi.

Ayrılan lökositlerin canlılıkları, akridin oranj - ethidium bromid ikili boyası kullanılarak, floresan mikroskopta tayin edildi. Ayrılan hücre süspansiyonundan yayma preparatı hazırlanarak Giemsa çözeltisi ile boyandı. Bu preparatların mikroskopik incelemesi sonunda, ayrılan lökositlerin %90'ından fazlasını lenfositlerin oluşturduğu, monositlerin ise %10'dan az oldukları gözlemlendi. Lökositler, kan sayım cihazında (Coulter Counter, model ZF) sayılarak, hücre sayıları ml'de 1×10^6 'ya ayarlandı. Çalışma anına kadar -70° C'daki derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.1.4. Ayrılan lökositlerde kontamine eritrositlerin hipotonik şok ile uzaklaştırılması:

Kontamine eritrosit, lökositlerde yapılacak SOD tayinlerinde önemli bir hata kaynağıdır. Sebebi de eritrositlerdeki SOD enzim aktivitesinin lökositlere göre daha fazla olmasıdır (46,91). Hipotonik çözeltilerde eritrositler kolayca hemoliz olurken, daha dayanıklı olan lökositler etkilenmez.

3.2.1.5. Deneyin yapılışı:

Ayrılan mononükleer hücre peletinin üzerine 0.1 ml PBS eklenerek resüspanse edildi. Üzerine 1 ml 1/10 PBS konularak aynı pipetle hemen karıştırıldı, 15 saniye sonra 1 ml 2xPBS eklendi, tekrar karıştırıldı. 2 ml PBS eklenen tüpler 1 dk. 1500 g'de santrifüjlendi. Üstteki kısım atıldı. Hücreler PBS ile bir kez yıkandı.

3.2.2. Eritrosit Süspansiyonlarından Hemolizatların Hazırlanması

Lökositlerin ayrılması sırasında, Ficoll çözeltilisi üzerine tabakalandırılan heparinli kan örneğindeki eritrositler, santrifüj sonunda tüpün dibine çöküyordu. Bu eritrosit sedimentinden 1 ml alınarak 12 ml'lik plastik bir tüpe aktarıldı. Üzerine 10 ml 0,15 M NaCl çözeltilisi eklendikten sonra alt üst edilerek karıştırıldı. 1500 g'de 5 dk. santrifüjlendi. Üstteki kısım atıldı. Dipteki sedimentten 0,5 ml alındı, üzerine 4,5 ml buzlu distile su eklendi. 30 saniye vortekslenerek karıştırıldı. Böylece eritrositler hemoliz oldu. Elde edilen hemolizat örneklerindeki hemoglobin miktarları kan sayım cihazında (Coulter Counter Hemoglobinemeter) tayin edilerek % g Hb olarak kaydedildi. Çalışma anına kadar - 70 ° C'daki derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. B ve T Lenfositlerin İmmünomanyetik Yöntemle Ayrılması

3.2.3.1. B, T lenfosit ayırım teknikleri :

B ve T lenfositlerin ayrılmasında şimdiye kadar, spontan E-rozet, AET E-rozet ,papain E-rozet, neuraminidase E-rozet, naylon pamuk ve monoklonal antikor rozet (MAR) gibi teknikler kullanılmıştır (26). Fakat bu tekniklerle B ve T lenfositlerin ayrılmasında çok yüksek verimler elde edilememiştir. Son yıllara kadar B lenfositlerin ayrılmasında en iyi neticeyi veren AET E-rozet tekniğinde, B olarak zenginleştirilen hücrelerin oranı % 79,6 ± 2,3, T hücre kontaminasyonu ise % 5,5 ± 2,8

olarak bildirilmektedir (26). Naylon pamuk yöntemi ile T olarak zenginleştirilen hücrelerin oranı % 90,1 ± 10,7, B hücre kontaminasyonu ise % 7,3 ± 3,6 olarak verilmiştir (26). Kobayashi et al (48) 6 sağlıklı kişide, T ve non-T lenfositlerini tayin ettikleri çalışmalarında, T lenfositlerini spontan E-rozet tekniği ile ayırmışlar ve T hücrelerinde % 3,0 ± 3,9'u granülosit, % 1,5 ± 1,3'ü non-T, % 2,7 ± 2,5'i monosit (toplam % 7,2 ± 14,9) kontamine hücre bulmuşlar. Aynı çalışmada non-T lenfositlerinde ise, % 5,2 ± 4,2' si granülosit, % 0,8 ± 0,6'sı T hücre, % 21,3 ± 10,3'ü monosit (toplam 27,3 ± 42,4) olmak üzere kontamine hücre tesbit etmişlerdir. B ve T lenfositlerinin immünomanyetik seperasyonunda ise, ayrılan hücrelerin saflık oranı % 99,0 olup kontamine hücre % 1,0'den azdır. Bu sebeple çalışmamızda B ve T lenfositlerin ayrılması immünomanyetik yöntemle yapılmıştır.

3.2.3.2 Metodun prensibi:

Immünomanyetik hücre ayırım tekniğinde, hedef hücre için spesifik mouse monoklonal antikoriyla kaplanmış 4,5 µm çapında homojen süpermanyetik polistiren bilyeler (Dynabeads M-450), periferik kan ile inkübe edildiğinde, hedef hücrelerin yüzeylerine bağlanarak rozet teşkil ederler. Daha sonra bu hücreler bir manyet yardımı ile ayrılabilir (28,52,53). B lenfositler için, bu hücrelerin membranında mevcut HLA-Class II (-DR) beta zincir monomerik epitopuna spesifik, T lenfositler için ise, bu hücrelerin membranında bulunan CD8 antijenine karşı spesifik, mouse monoklonal antikoriyla kaplanmış paramanyetik polistiren bilyelerin, % 1 bovine serum albumini ile % 0,02 sodyum azid içeren PBS deki steril süspansiyonları olan Dynabeads HLA-Class II ve Dynabeads HLA-Class I kullanıldı. Bu yöntem heparinli, EDTA'lı, ACD'lu kan örneklerine direkt olarak uygulanabilir. Çalışmamızda B, T lenfosit ayırımlarının daha sağlıklı, reaktiflerle ayrılan hücre veriminin daha yüksek olması amacı ile tarif edilen prosedür modifiye edildi. Lökositler Ficoll ile santrifüjle ayrıldıktan sonra (bölüm 3.2.1) hücreler yıkanmadan immünomanyetik seperasyon uygulandı.

3.2.3.3. Reaktifler:

- 1) PBS, pH 7,4 (bölüm 3.2.1.2. de verilmiştir.)
- 2) Stok sodyum sitrat (% 1,2 lik): 1,2 g sodyum sitrat 100 ml distile suda çözüldü, +4° C'da buzdolabında muhafaza edildi.
- 3) % 0,6 sodyum sitratlı PBS : 50 ml 2x PBS ve 50 ml stok sodyum sitrat karıştırılarak +4° C'da buzdolabında saklandı.
- 4) Akridin oranj / ethidium bromid boya çözeltisi: (bölüm 3.2.4.2. de verilmiştir)
- 5) Dynabeads HLA-Class I (DynaI, hazır reaktif)
- 6) Dynabeads HLA-Class II (DynaII, hazır reaktif)

3.2.3.4. Deneyin yapılışı:

- 1) Heparinli kan örneklerinden ficoll ile ayrılan lökositler 2 ayrı tüpe konularak buzlu su içinde 15 dk. bekletilerek soğutuldu (Bölüm 3.2.1.3.). Bu işlem normal olarak periferik kanda bulunan fagositik hücrelerin aktivitelerinin azaltılması için gereklidir. Oda ısısında veya 37° C'da fagositik hücreler aktive olarak B lenfositlerle birlikte ayrılabilirler.
- 2) Dynabeads HLA-Class I (T lenfosit için) ve Dynabeads HLA-Class II (B lenfosit için) reaktifleri karıştırılarak resüspanse edildi. Soğukta bekletilen iki ayrı tüpteki lenfosit süspansiyonlarından birisine 50 µl Dynabeads HLA-Class I, diğerine 75 µl Dynabeads HLA-Class II eklendi.
- 3) 3-5 dk. rotatorda (Coulter Mixer) karıştırıldı.
- 4) Tüplere 4 ml soğuk % 0,6 sodyum sitratlı PBS eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı.
- 5) Tüpler kobalt-samaryumlu manyetik tüplüğe (magnetik partikül konsantratör, MPC-6 Dynal) yerleştirilerek 2-3 dk. karıştırıldı. Bu işlemle hedef hücre ile rozet teşkil eden paramanyetik polistiren bilyeler, tüplerin manyete bitişik kısmında toplandı.
- 6) Tüpler manyetik tüplükle birlikte ters çevrilerek döküldü. Rozet teşkil eden hedef hücreler tüpün manyete bitişik kısmında kaldı.
- 7) Ayrılan hücreler 4 kez aşağıdaki gibi yıkandı;
 - a) Tüpler manyetik tüplükten ayrıldı, 5 ml soğuk %0,6 sodyum

sitratlı PBS eklenerek karıştırıldı.

b) Tüpler manyetik tüplüğe tekrar yerleştirildi, 1 dk. karıştırıldı.

c) Tüpler manyetik tüplükle birlikte ters çevrilerek döküldü, daha sonraki yıkamalar PBS kullanılarak yapıldı.

8) Son yıkamadan sonra hücreler 0,1 ml PBS de resüspanse edildi.

9) Ayrılan hücreler akridin oranj/ethidium bromid boya karışımı ile Neubauer sayma kamarasında floresan mikroskopta sayıldı, aynı anda hücre canlılık oranları da tesbit edilerek kaydedildi (bölüm 3.2.4.). Ayrılan T lenfositlerin sayımları $1-3 \times 10^6$ hücre/ml, B lenfosit sayımları $0,4-1,5 \times 10^6$ hücre/ml arasında değişiyordu. Hücre canlılık oranları ise %97,0'den fazla idi. Ayrılan B ve T lenfositler çalışma anına kadar -70°C 'da derin dondurucuda saklandı.

3.2.4. Lökosit canlılık oranlarının akridin oranj / ethidium bromid boya karışımı ile tayini

3.2.4.1. Metodun prensibi:

Lökositlerin canlılık oranlarının tayin edilmesinde, tripan mavisi, eosin Y, nigrosin, floresein diasetate, karboksi floresein diasetat - propidium iyodid, akridin oranj - ethidium bromid gibi boyalar kullanılabilir (65). B ve T lenfositlerin immünomanyetik yöntemle ayrılmasında, lenfositler polistiren bilyelerle rozet teşkil etmektedir. Bu durum normal mikroskopta, tripan mavisi, eosin Y ve nigrosin ile canlılık oranlarının tayinini imkansız kılar. Tümüyle bilye ile kaplanan hücrelerin boya alıp almadıklarını görmek mümkün olmaz. Aynı sebeple bu hücrelerin normal mikroskoplarda ve partikül sayan kan sayım cihazlarında sayılmaları olanaksızdır. Bu zorluklar floresan mikroskobun kullanıldığı, floresan boyama teknikleri ile aşılabilir. Biz çalışmamızda, hem lökosit canlılık oranlarının tayini için, hemde B ve T lenfositlerin sayılmasında akridin oranj - ethidium bromid floresan boya tekniğini kullandık (65). Bu teknikte canlı hücreler, akridin oranj boyasını alarak floresan mikroskopta yeşil renkte gözükürken, ölü hücreler ethidium bromid boyasını alarak kırmızı renkte gözükürler.

3.2.4.2. Reaktifler:

1) Akridin oranj – ethidium bromid stok çözeltisi:

50 mg akridin oranj, 15 mg Ethidium bromid 1 ml etanolde çözüldü. Üzerine 49 ml distile su eklenip karıştırıldı. 6 ml' lik propilen tüplere 1'er ml konularak -70° C'da derin dondurucuda saklandı.

2) Çalışma çözeltisi:

1 ml stok boya çözeltisi üzerine 19 ml PBS eklenerek karıştırıldı (1/20 dilüsyon). Ağzı kapaklı bir şişede +4° C'da karanlıkta muhafaza edildi. Bu çözelti bir ay dayanıklıdır.

3.2.4.3. Deneyin yapılışı:

B ve T lenfositlerin canlılık oranlarının tayininde Neubauer sayma kamarası kullanıldı. Böylece aynı anda bu hücrelerin sayımı da gerçekleştirildi. Lökositlerin canlılık oranları tayini Terasaki plaklarında yapılarak, aynı anda çok sayıda örnek değerlendirildi.

a) Neubauer sayma kamarasında sayım işlemi:

1) Temiz bir tüpe iyice karıştırıldıktan sonra 10 µl lenfosit süspansiyonu konuldu. Üzerine 90 µl boya çözeltisi eklendi. Yavaşça karıştırıldı.

2) Daha önce lamel kapatılan Neubauer sayma kamarasının bir kenarından otomatik pipet yardımı ile boyalı lenfosit süspansiyonundan 10 µl eklendi.

3) Sayma kamarasındaki 4 büyük alan, floresan mikroskopta sayılarak ortalaması alındı. Aynı zamanda ölü ve canlı hücreler sayılarak, canlı hücreler % 'de olarak kaydedildi.

4) ml'deki hücre sayıları aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı;

Büyük sayma alanında lamelin altında kalan hacim, 10^{-4} ml'dir.

Hücre sayısı/ml = (ortalama sayım) $\times 10^4$ /ml $\times 10$ (dilüsyon oranı)

b) Teresaki plağında :

Teresaki plağının kuyucuğuna 1 µl lökosit süspansiyonu konuldu, üzerine 1 µl boya çözeltisi eklendi. Floresan mikroskopta kuyucuklara bakıldı. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı görölüyordu. Hücre canlılık oranları % de olarak kaydedildi. Bu yöntemle çok sayıda lökositin % de canlılık oranları, kısa sürede kolayca tayin edilebilir.

3.2.5. Protein Tayini:

3.2.5.1. Protein tayin yöntemleri:

Çalışmamızda protein tayinleri Bradford (10) tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı. Metod mikrogram düzeylerindeki proteinlerin kantitatif tayinlerinde oldukça duyarlı, hızlı ve kolayca tekrarlanabilir olması nedeniyle tercih edildi. Standart Lowry yöntemi ile protein tayininde, hataya sebep olan, K, Mg, EDTA, tris, tiol gibi maddeler ve karbonhidratlarla etkileşimin bu yöntemde daha az veya hiç olmadığı, duyarlılık açısından da 4 kez daha hassas olduğu bildirilmiştir (10). Bağlı olarak daha az duyarlı olan biüre reaksiyonunda, tris, amonyak ve gliserol gibi maddelerden etkilendiği bilinmektedir. Lowry ve biüre deneylerindeki bu problemler bazı modifikasyonlarla giderilebilirse de bu işlemler komplike ve zaman alıcıdır. Bradford yönteminde kuvvetli alkali çözeltilerin oluşturduğu hafif renklenmenin, tampon çözeltilerin kullanımı ile giderilebileceğini sadece, sodyum dodesil sülfat, triton X-100 gibi deterjanların fazla miktarlarının, non spesifik renklenmeye sebep olduğunu bildirmiştir (10).

3.2.5.2. Metodun prensibi:

Bu yöntemde reaktif olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 'nin kırmızı ve mavi olmak üzere 2 farklı formu vardır. Boyanın kırmızı renkli olan formu proteine bağlandığında, rengi maviye dönerken, maksimum absorpsiyonu da 465 nm'den 595 nm'ye doğru değişir. Boyanın proteine bağlanması 2 dakikada tamamlanır ve bir saat kadar

stabil kalır. Protein - boya kompleksinin yüksek ekstinsiyon sabitesi (extinction coefficient) protein tayin duyarlılığının da yüksek olmasını sağlar. Protein-boya kompleksi spektrofotometre küvetlerini maviye boyayarak neticeleri olumsuz yönde etkileyebilir. Biz deneylerimizde plastik disposable spektrofotometre küvetleri kullanarak bu sakıncayı berteraf ettik. Standart deney prosedüründe 5 ml boya reaktifine 0,1 ml numune konulmaktadır. Deneyleri bu miktarların 1/5 ile yaparak, 0,02 ml'lik örneklerde protein tayin edildi. Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

3.2.5.3. Reaktifler:

1) Boya reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml % 95 lik etanole eklendi. Manyetik karıştırıcıda 5-10 dk. karıştırılarak tam olarak çözünmesi sağlandı. Üzerine 100 ml % 85'lik fosforik asit eklenerek, distile su ile 1 litreye tamamlandı. Süzüldükten sonra kahverengi bir şişede oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2) Standart protein çözeltisi: 50 mg BSA, 50 ml 0,15 M NaCl'de çözülerek 1000 µg/ml'lik stok standart hazırlandı. Daha sonra , bu stoktan 10-100 µg/ml ve 100-1000 µg/ml arasında 2 seri standart dizisi, her çalışma gününde taze olarak hazırlandı.

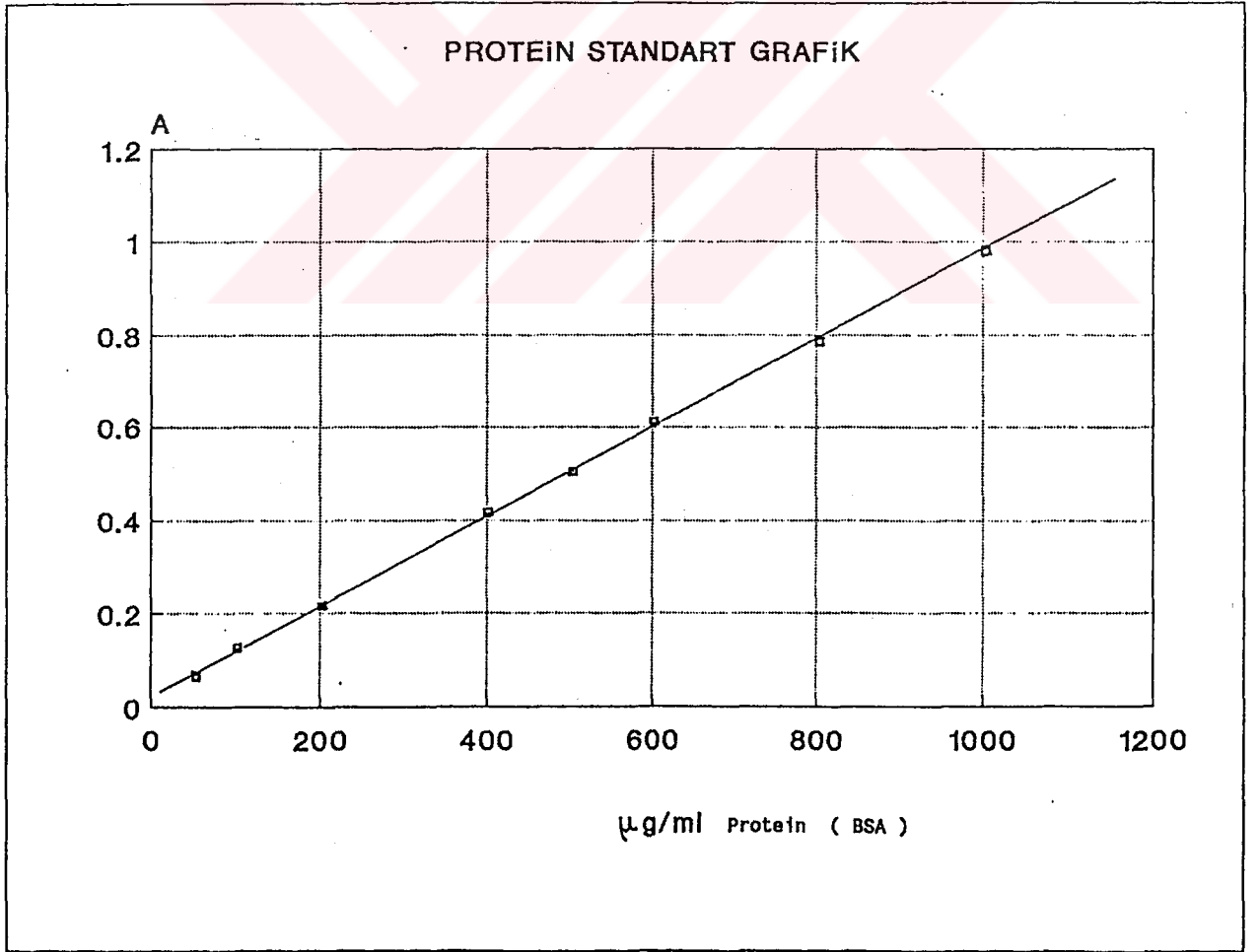
3.2.5.4. Deneyin yapılışı:

a) Standart Metod: Daha önce kör, standart ve numune olarak işaretlenen plastik spektrofotometre küvetlerine, kör için 20 µl 0,15 M NaCl ,standartlar için 20 µl protein konsantrasyonu 100-1000 µg/ml arasında değişen BSA çözeltisi , numuneler için 20 µl bilinmeyen örneklerden konuldu. Tüm küvetlere 1 ml boya reaktifi konularak karıştırıldı. 2 dk. sonra, 595 nm'de absorbands değerleri köre karşı spektrofotometrede okundu. Standartlar ve kör için 3, numuneler için 2 örnek çalışılarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. Standartların protein konsantrasyonlarına karşı, okunan absorbands değerleri lineer/lineer grafiğe geçirildi. Bilinmeyen numunelerin absorbands değerlerine karşı gelen protein miktarları grafikten bulundu. Örnek grafik Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Protein standart metod çalışma şeması

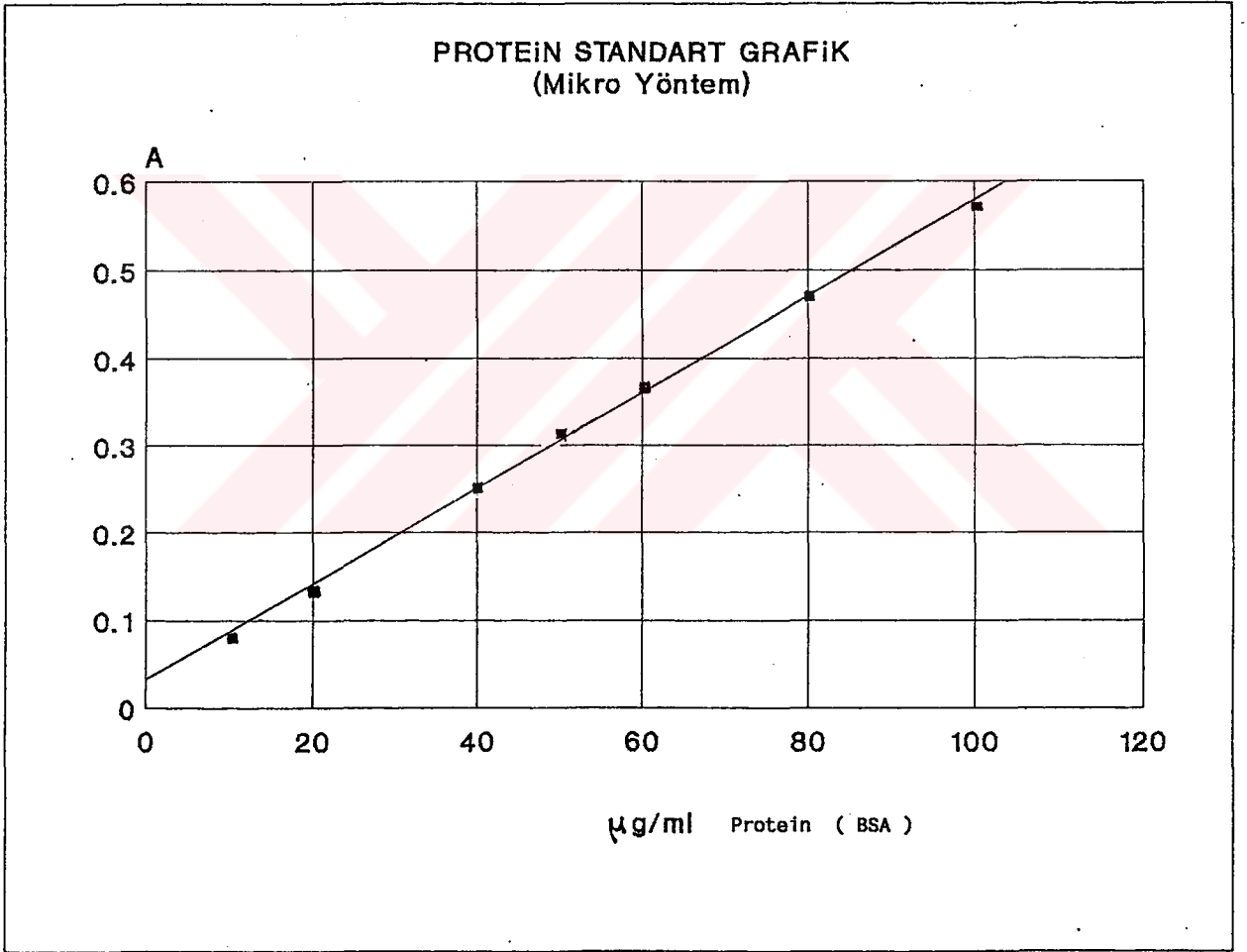
	Kör	Standart	Numune
0,15 M NaCl (µl)	20	-	-
Standart (µl)	-	20	-
Numune (µl)	-	-	20
Reaktif (µl)	1000	1000	1000

Tüm küvetler karıştırılır, 2dk. sonra 595 nm'de okunur.



Şekil 3.1. Protein standart örnek grafiği.

b) Mikro metod: Bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları 100 $\mu\text{g/ml}$ 'nin altında ise, çalışma mikro metotla tekrar edildi. Standart protein konsantrasyonları 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ arasında hazırlandı. Daha önce işaretlenen küvetlere, kör, standart ve numunelerden 100 μl konuldu, sonra üzerlerine 1 ml reaktif eklenerek karıştırıldı. 2 dk. sonra, 595 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Standart grafikten bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları bulundu. Örnek grafik Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Protein standart örnek grafiği (mikro yöntem).

Tablo 3.2. Mikro metod çalışma şeması

	Kör	Standart	Numune
0,15 M NaCl (μ l)	100	-	-
Standart (μ l)	-	100	-
Numune (μ l)	-	-	100
Reaktif (μ l)	1000	1000	1000
Tüm küvetler karıştırılır, 2 dk. sonra 595 nm'de okunur.			

3.2.6. SOD enzim aktivitesinin tayini:

Şimdiye kadar SOD'ın, serum, plazma, sinovial sıvı, idrar gibi vücut sıvılarında, eritrosit, lökosit gibi hücre ve çeşitli doku ekstarklarında tayini için birçok metod kullanılmıştır (6,7,12,14,16,18 30,38,44,46,47,48,50,51,56,57,58,59,60,63,78,79,81,90,91,98,101,104) Bu metodların herbirinin bazı avantajları olmakla birlikte, güçlükleri de vardır. Çalışmamızda kullanılacak metodun seçiminde, test materyallerine uygunluk, hassasiyet, spesifiklik, tekrarlanabilirlik, kolay ve çabuk yapılabilme gibi kriterler göz önünde bulunduruldu. Yapılan literatür taramasında, amaca en uygun olduğu düşünülen, Sun et alı. (98) ün geliştirdikleri yöntem için, gerekli reaktifler hazırlanarak aşağıdaki parametreler için ön denemeler yapıldı.

3.2.6.1. Metodla ilgili ön denemeler (33):

- Duyarlılık (prezisyon): Kullanılan metodun güvenilirliğini tesbit etmek üzere, eritrosit hemolizatlarından hazırlanan bir örnekte, aynı deney şartları sağlanarak 19 kez SOD tayini yapıldı. Bulunan neticelerin istatistiksel analiz neticeleri Tablo 3.3 'de verilmiştir.

- Hassasiyet : Deneylerde, NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna sebep olan sıgır karaciğer SOD miktarı 10 ng/ml olarak bulundu. Kullanılan metod ile, 2 - 70 ng arasındaki SOD tayininin sağlıklı bir şekilde yapılabileceği görüldü.

Tablo 3.3. Metodun duyarlılık kontrolü.

Deney sayısı	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	% de varyasyon katsayısı	Güven sınırları x+3s	x-3s
19	19,82	0,75	0,17	3,78	19,38	20,25

- Test Materyallerine uygunluk: Plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfositler için metodun uygunluğu, 3 normal kişiden alınan heparinli kan örneklerinde denendi. Plazmaları ayrılan örneklerin geriye kalan kısmından , lökosit, B, T lenfosit ve eritrositler daha önce açıklandığı gibi hazırlandı. Plazma ve eritrositlerden hazırlanan hemolizatlar etanol-kloroform karışımı ile ekstrakte edildi. Hazırlanan örneklerin değişik dilüsyonlarında SOD tayini yapıldı. Non dilüe plazmada ve hemolizatların 1/72 dilüsyonları ile tatminkar neticeler alındı. Lökosit, B ve T lenfositlerin, 1, 5, 10 x 10⁶ hücre/ml'lik süspansiyonları hazırlanıp, 4 kez - 70° C'da dondurulup, çözülerek parçalanmaları sağlandı. Santrifüjlenen bu örneklerin değişik dilüsyonlarda yapılan SOD tayinleri sonucunda, non dilüe 1x10⁶ hücre/ml'lik süspansiyonu uygun bulundu.

- Üç normal kişinin kan örneklerinden hazırlanan plazma, erit-

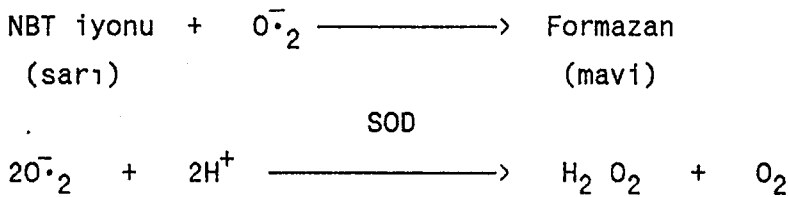
rosit hemolizat ve lökositler iki tüpe bölündü. Bunların bir bölümü +4° C'da buzdolabında bekletildi. Diğer bölümü üç kez - 70° C'da dondurulup oda ısısında çözüldü. Daha sonra bu iki grupta yapılan SOD tayinlerinde, dondurulup çözülen örneklerden hemolizatlarda % 6,0 , plazmalarda % 8,5 , lökositlerde % 8,8 daha düşük neticeler bulundu.

- Aynı örneklerde SOD tayinleri , 10 ml'lik cam ve 6 ml'lik kullanılmamış polipropilen tüplerde yapıldı ve absorbands değerleri polipropilen tüplerde % 2 oranında , cam tüplerde % 5 oranında sapma gösterdi. Bu nedenle SOD tayinleri polipropilen tüplerde yapıldı. Ayrıca Sun et al.(98) un çalışmalarında kullandıkları reaktif ve örnek miktarları 1/5 oranında azaltıldı.Böylece lökosit ve B,T lenfosit süspansiyonlarının daha az miktarlarında (bir test için 100 µl) çalışma mümkün oldu.

3.2.6.2 Metodun Prensibi:

O_2^- 'nin sürekli bir kaynağının, bu radikalın varlığını gösteren bir toplayıcı ile birleştirilmesi, SOD tayini için de bir temel sağlar. Deney; SOD ile, ortamda bulunan O_2^- için bilinen bir ortadan kaldırııcı arasındaki yarışmaya dayanır. SOD tanımlanan reaksiyonu inhibe eder. Bir SOD ünitesi,spesifik şartlarda keyfi olarak, % 50 inhibisyona sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanır (6,63,98).

Çalışmamızda, ilk olarak Beauchamp and Fridovic (6) tarafından tarif edilip, Sun et al. (98) ün geliştirdiği metod kullanıldı. Yöntemde O_2^- 'in sürekli kaynağı, ksantin - ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu, O_2^- 'i gösteren toplayıcı ise NBT'dur. Sarı renkli NBT iyonu, O_2^- ile indirgendiğinde mavi renkli formazana çevrilir. SOD ile inhibe edilen bu renk reaksiyonu aşağıdaki gibi verilir (14).



3.2.6.3. Reaktifler:

1) Ksantin oksidaz çözeltisi (167 U/l): 16,66 U/ml lik ksantin oksidazdan 20 µl alınarak, 2 ml soğuk 2M $(NH_4)_2SO_4$ 'a eklenip karıştırıldı. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2) Ksantin çözeltisi (3 mM): 0,0228 g ksantin, 50 ml 0,1 N NaOH' de çözüldü. Kullanmadan önce distile su ile 1/10 dilüe edildi. +4° C'da muhafaza edilerek bir hafta kullanıldı.

3) NBT çözeltisi (0,15 mM): 0,0123 g NBT, 100 ml distile suda çözülerek kahverengi şişede +4° C'da muhafaza edildi. Hafif sarı renkli çözelti, rengi değişene kadar kullanıldı.

4) Na_2CO_3 çözeltisi (0,8 mM): 4,2396 g Na_2CO_3 , 100 ml distile suda çözülüp +4° C'da saklandı.

5) Di sodyum EDTA çözeltisi (6,0 mM): 0,2233 g di sodyum EDTA 100 ml distile suda çözüldü. Kullanmadan önce 1/10 dilue edildi. + 4° C'da saklandı.

6) Amonyum sülfat çözeltisi (2 M): 26,428 g $(NH_4)_2SO_4$ 100 ml distile suda çözülerek + 4° C'da saklandı.

7) Sığır serum albumin çözeltisi (1 g/l): 50 mg BSA, 50 ml distile suda çözülerek + 4° C'da saklandı.

8) $CuCl_2$ çözeltisi (0,8 mM): 0,0108 g $CuCl_2$, 100 ml distile suda çözülerek + 4° C'da saklandı.

9) Etanol/kloroform karışımı: 50 ml etanole 30 ml kloroform eklenerek karıştırıldı.

10) SOD standart çözeltisi: 1,3 mg protein/ml (3200 Ünite/mg protein) lik bovin eritrosit SOD'ından 0-260 ng'lık bir seri standart çözeltisi, kullanmadan önce taze olarak hazırlandı.

11) SOD deney reaktifinin hazırlanması: (50 testlik)

0,3 mM ksantin çözeltisi	10 ml	
0,6 mM di sodyum EDTA çözeltisi	5 ml	
0,15 mM NBT çözeltisi	5 ml	
0,4 M Na_2CO_3 çözeltisi	3 ml	
1 g/l'lik BSA çözeltisi	1,5 ml	karıştırılarak,

pH 10,2 'ye ayarlandı.

3.2.6.4. SOD tayini için örneklerin hazırlanması

Plazma ve hemolizatlar: -70° C'da muhafaza edilen plazma ve hemolizat örnekleri oda sıcaklığında bekletilerek çözüldü. 6 ml'lik propilen tüplere, 0,5 ml plazma veya hemolizat konuldu. Üzerlerine 0,4 ml etanol/kloroform karışımı eklenerek bekletmeden 1 dk. vortekslendi. Tüpler soğutmalı santrifüjde 5500 g'de 60 dk. santrifüjlendi. Böylece plazmadaki diğer proteinler ve hemolizattaki hemoglobin tüpün dibine çöktü. Tüpün üstündeki berrak kısımdan SOD enzim aktivitesi tayinleri aynı gün yapıldı.

Lökosit, B ve T lenfositler : -70° C'da saklanan örnekler oda sıcaklığında bekletilerek çözüldü. 1 dk. vortekslendikten sonra -70° C'da tekrar donduruldu. Bu işlemler 3 kez daha tekrar edilerek hücrelerin parçalanmaları sağlandı. Daha sonra bu örneklerden 10 μ l alınarak temiz bir lama konuldu. Lamel ile kapatılarak mikroskopta hücrelerin parçalanıp parçalanmadıklarına bakıldı. Örneklerden hazırlanan yayma preparatları Giemsa ile boyanarak da mikroskopta incelendi. Direkt olarak ve boyanarak hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesinde, lökositler ve B , T lenfositlerin % 97 'sinden fazlasının parçalanmış olduğu görüldü. Örnekleri içeren tüpler 5500 g'de, 40 dk. santrifüjlenerek hücre artıkları çöktürüldü. Üstteki berrak kısımdan SOD enzim aktivitesi ve mikroprotein tayinleri aynı gün yapıldı.

Kontrol: 5 normal kişinin eritrositlerinden hazırlanan hemolizatlar, etanol/kloroform karışımı ile ekstrakte edildi. 5500 g'de santrifüjlenerek, üstteki berrak kısımdan SOD tayini yapıldı. Dilüe edilen bu örnekten 3 farklı konsantrasyonda kontrol hazırlandı. Polipropilen tüplere 0,5 er ml konularak -70° C'da derin dondurucuda saklandı. Her deneyde numunelerle birlikte kontroller de çalışıldı.

3.2.6.5 Deneyin yapılışı :

SOD tayinleri 50 tüplük gruplar halinde yapıldı. Her deneyde numunelerle birlikte 1.3, 2,6 6.5, 13.0, 26.0, 39.0, 65.0, 97.5, 130.0 ve 260.0 ng'lık 10 standart ve kontrollerle konuldu. Numuneler 2, standart ve kontroller 3, kör için 6 tüpte deneyler yapıldı. Testlerde 6 ml 'lik polipropilen tüpler kullanıldı.

Kör, kontrol, standart ve numune olarak işaretlenen tüplere 490 µl deney reaktifi konuldu. Kör tüplerine 100 µl distile su, diğer tüplere örneklerden 100 µl eklendi. Bütün tüplere 10 µl ksantin oksidaz çözeltisi eklenip hemen karıştırıldı. Her grup deney için bu işlem 2 dk.'da tamamlandı. Tüpler 25°C'daki su banyosunda 20 dk. bekletildi. Sürenin sonunda bütün tüplere 200 µl $CuCl_2$ çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Bu işlemde 2 dk.'da tamamlandı. Oluşan mor renkli formazanın absorbansı, 560 nm dalga boyunda, distile suya karşı spektrofotometrede okunarak kaydedildi. Bütün örnekler için ortalama absorbans değerleri hesaplandı. Deneylerde kör tüpün absorbans değerleri 0,250 - 0,300 arasında bulundu. Ölçülen absorbans değerlerinden % de inhibisyon değerleri aşağıdaki gibi hesaplandı.

A= Absorbans

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A (\text{kör}) - A (\text{örnek})}{A (\text{kör})} \times 100$$

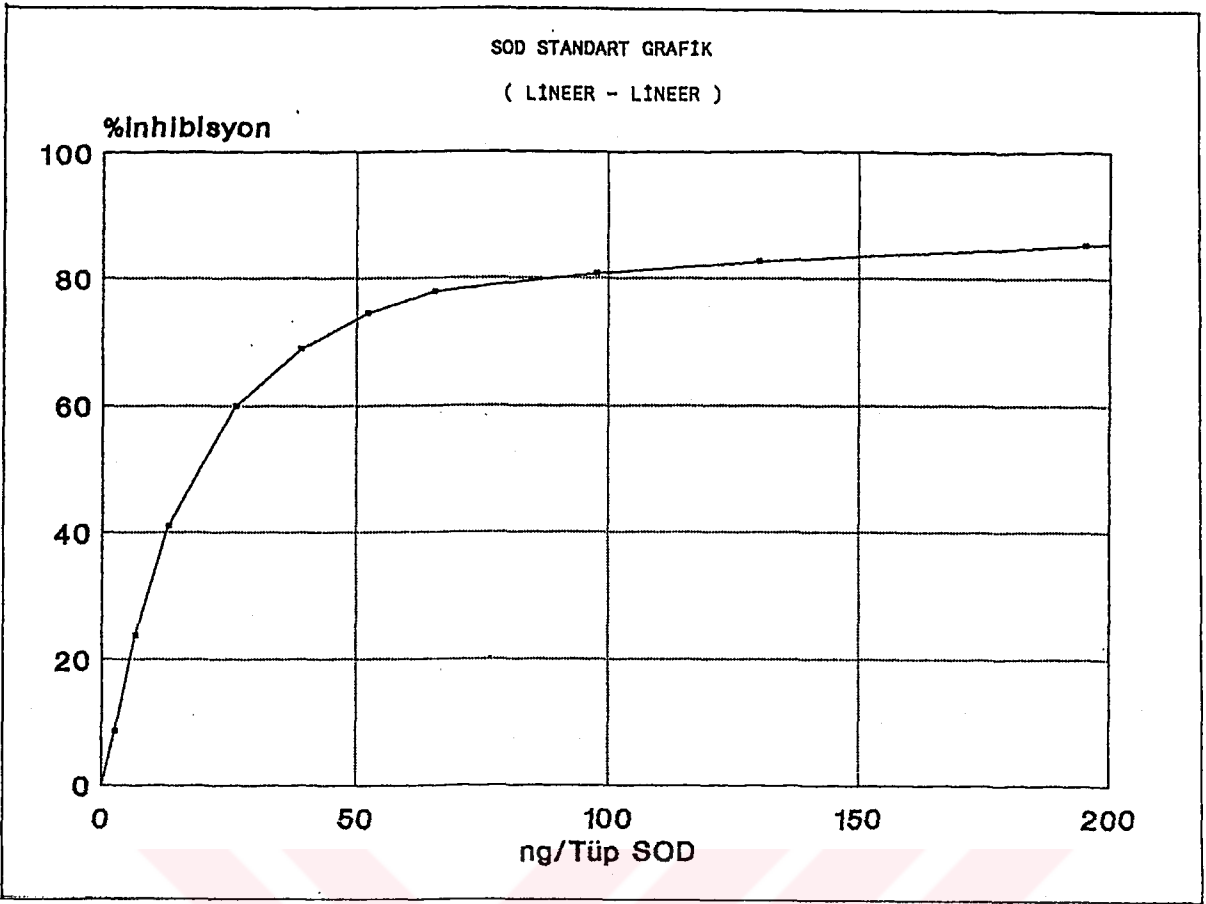
Standartların % de inhibisyon değerlerine karşı enzim protein konsantrasyonları, lineer-lineer veya lineer-log grafikten bulundu (47). Örnek grafikler Şekil 3.3. ve 3.4 'de verilmiştir. 1 SOD ünitesi, NBT indirgenme hızını % 50 oranında inhibe eden enzim protein miktarı olarak tanımlandı. SOD neticeleri plazma için µg/ml ve ünite, eritrosit hemolizatlarında litrede gram hemoglobin başına ünite [ünite / (g/l Hb)], lökosit ve B, T lenfositlerde miligram protein başına ünite (ünite / mg protein) ve mililitrede bir milyon hücrede miligram protein başına ünite (1×10^6 hücre/ml 'de ünite / mg protein) olarak verildi.

3.2.7. İstatistiksel değerlendirme :

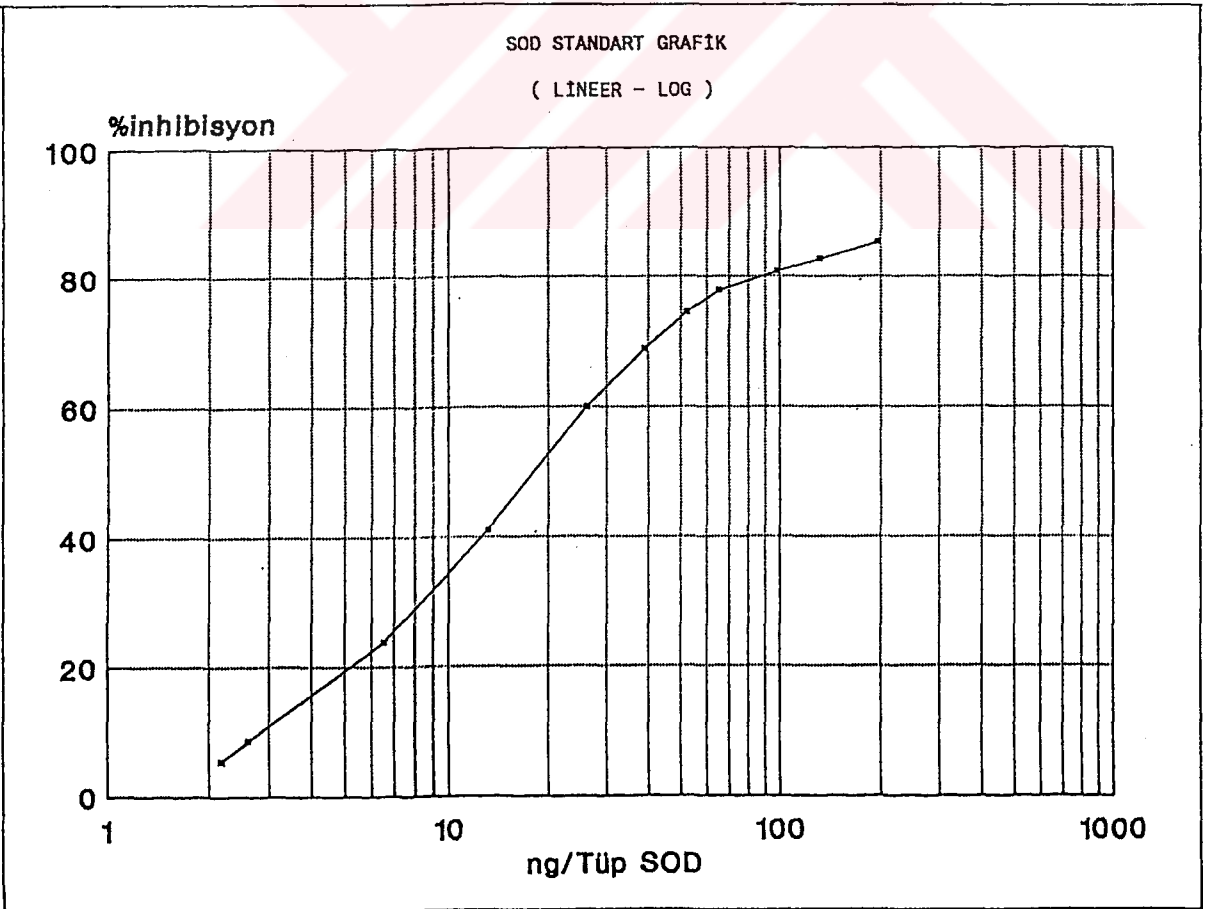
İstatistiksel analizler, Tadpole ve Microsta istatistik paket programları kullanılarak bilgisayarda yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde Student T ve Mann Whitney U testleri kullanılmış olup, korelasyon analizleri uygulanmıştır.

Tablo 3.4. SOD enzim aktivitesi çalışma şeması.

	Kör	Standart	Kontrol	Örnek
SOD reaktif (μ l)	490	490	490	490
Distile su (μ l)	100	-	-	-
Standart (μ l)	-	100	-	-
Kontrol (μ l)	-	-	100	-
Örnek (μ l)	-	-	-	100
Ksantin oksidaz (μ l)	10	10	10	10
Hemen karıştırılarak, 25° C'da 20 dk. bekletilir.				
CuCl ₂ çözeltisi (μ l)	200	200	200	200
Karıştırılarak, 560 nm. de distile suya karşı absorbansı okunur.				



Şekil 3.3. SOD standart grafik (lineer - lineer)



Şekil 3.4. SOD standart grafik (lineer - log)

4. B U L G U L A R

4.1. Kontrol Grubunda Plazma, Eritrosit, Lökosit, B ve T Lenfosit SOD aktiviteleri

Yaşları 17 - 69 arasında değişen 62'si kadın, 61'i erkek toplam 123 sağlıklı kişinin plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktiviteleri Tablo 4.1. 'de ve bu gruba ait istatistikî veriler Tablo 4.2. 'de verilmiştir.

Kontrol grubunda plazma SOD aktivite değerleri 1,9 - 15,6 Ü arasında olup ortalama $\bar{x} = 7,80$, standart sapma $Sd = 2,46$ normal sınırlar ($\bar{x} \pm 2 Sd$) ise, 2,91 - 12,71 Ü arasında bulunmuştur.

Bu grubun eritrosit SOD aktivite değerleri 1000 - 4481 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 2467,22$, $Sd = 881,48$, normal sınırlar 704,04 - 4230,18 Ü / (g/L Hb) arasındadır.

Lökosit SOD aktivite değerleri 2,8 - 57,2 Ü / mg Pr* (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 13,00$, $Sd = 8,07$, normal sınırlar ($\bar{x} \pm Sd$) 4,93 - 21,07 Ü / mg pr. arasında saptanmıştır.

Ayrıca kontrol grubunun yaşları 17 - 50 arasında değişen 20'si kadın, 20'si erkek toplam 40 kişinin plazma, eritrosit ve lökositlerin yanısıra B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri Tablo 4.3. 'de, istatistikî verileri Tablo 4.4. 'de gösterilmiştir.

Bu grupta (n = 40) B lenfosit SOD aktivite değerleri 3,4 - 23,3 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 9,81$, $Sd = 4,28$, normal sınırlar ($\bar{x} \pm 2 Sd$) 1,25 - 18,37 Ü / mg Pr. arasındadır.

* pr. = protein

Aynı grupta (n = 40) T lenfosit SOD aktivite değerleri 5,6 - 21,6 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 11,81$, Sd = 3,93 , normal sınırlar ($\bar{x} \pm 2 Sd$) 3,95 - 19,67 Ü / mg Pr. arasında bulunmuştur.

Kontrol grubunu oluşturan bireylerin yaşları ve plazma, eritrosit, lökosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p > 0,05).

Buna karşılık lökosit SOD değerleri ile B ve T lenfosit SOD değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tesbit edilmiştir (B lenfosit için r = 0,317, p < 0,05 , T lenfosit için r = 0,677 , p < 0,01).

B ve T lenfosit SOD değerleri arasında da istatistiksel olarak pozitif korelasyon saptanmıştır (r = 0,436 , p < 0,05).

Kontrol grubunda T lenfosit SOD aktivite değerlerinin B lenfosit SOD aktivite değerlerine oranı 1,21 olarak bulunmuştur. Bu oranlar aktif Behçet'li hasta grubunda 1,19 , inaktif Behçet 'li hasta grubunda 1,34 'dür.

Tablo 4.1. Kontrol grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri (Ü:Ünite, Pr.:protein, Hb : hemoglobin)

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb.}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$	10^6 hücre $\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$
1	30 K	101	7.6	3123	26.1	4.1
2	26 K	101	7.6	1753	33.5	10.2
3	30 K	68	6.0	1982	68.6	12.3
4	36 E	151	11.4	3627	19.5	5.4
5	35 K	79	5.9	3708	24.0	7.3
6	26 K	108	8.1	2970	35.2	8.8
7	28 E	86	6.5	2010	29.1	5.6
8	36 K	86	6.5	1020	17.3	6.6
9	38 E	173	13.0	3287	39.2	2.8
10	18 K	97	7.3	1041	63.5	20.5
11	21 E	101	7.6	1901	168.0	23.3
12	61 K	25	1.9	1779	27.2	4.8
13	34 E	49	3.7	2925	18.0	18.0
14	28 E	32	2.4	3357	24.0	16.0
15	31 E	79	5.9	1713	22.7	5.4
16	62 E	152	14.0	2632	25.9	6.8
17	41 E	83	6.2	2423	51.0	12.7
18	50 K	76	5.7	1974	39.7	5.7
19	24 K	101	7.6	1908	41.1	5.4
20	29 E	83	6.2	4235	61.5	23.6
21	21 E	88	6.6	2196	59.2	13.8
22	23 K	94	7.0	1091	89.3	14.6
23	31 E	79	5.9	2808	46.5	11.9
24	27 E	65	4.9	2913	56.8	17.2
25	39 K	94	7.0	3438	75.3	16.7
26	63 K	122	9.2	3276	102.3	25.5
27	51 E	72	5.8	2033	39.6	7.5
28	69 K	137	11.0	1552	62.5	12.5
29	32 E	137	11.0	1534	54.6	30.3
30	45 K	108	8.7	1915	65.5	15.2
31	28 K	115	9.3	1118	134.7	21.7
32	48 E	137	11.0	2655	35.5	5.8
33	23 E	108	8.7	3092	42.6	4.5
34	50 E	79	6.4	1053	56.5	17.1
35	19 K	104	8.4	2691	51.8	24.7
36	20 K	122	9.9	3674	77.6	26.8
37	66 E	86	7.0	1660	46.8	15.6
38	46 K	122	9.9	3591	43.0	23.9
39	32 K	50	4.1	2714	55.7	13.9
40	35 K	83	6.7	4481	71.5	25.0
41	39 K	79	6.4	4223	90.6	36.3
42	38 E	201	15.6	1739	68.2	10.8
43	40 E	100	8.1	1859	69.9	13.2
44	27 K	104	8.4	1152	29.6	8.1
45	45 K	108	8.7	1220	57.1	7.8
46	28 E	90	7.3	1114	38.1	10.0
47	30 K	104	8.4	2372	46.7	7.1
48	28 E	101	8.1	1940	33.4	6.0
49	63 E	79	6.4	1872	66.0	13.8
50	21 E	65	5.2	1152	57.0	19.0
51	21 E	86	7.0	1387	58.3	9.9
52	66 E	126	10.2	1000	32.5	4.6
53	32 K	108	8.7	1171	61.0	30.5
54	46 E	72	5.4	2075	42.0	9.2
55	47 K	58	4.3	1281	71.7	15.6
56	27 K	76	6.5	1660	24.9	4.7
57	47 E	137	11.7	2451	49.4	8.4
58	29 K	108	9.2	2286	45.4	15.1
59	37 E	79	6.8	1812	30.1	5.8
60	28 E	144	12.3	1084	32.2	5.2

Tablo 4.1. (devamı) Kontrol grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb.}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$	$10^6 \frac{\text{hücre Ü}}{\text{mg Pr.}}$
61	34 E	79	6.8	1592	44.4	9.2
62	56 K	130	11.1	1817	53.1	7.7
63	60 K	68	5.9	1343	58.7	17.3
64	50 E	122	10.5	2223	35.3	20.8
65	48 K	36	3.1	2296	37.6	12.5
66	18 K	115	9.8	2747	31.9	12.8
67	36 K	97	8.3	4320	42.9	10.5
68	60 E	104	8.9	2668	24.4	7.6
69	29 K	104	8.9	2645	29.7	4.7
70	27 K	68	5.8	2880	26.1	8.0
71	29 E	79	6.8	3730	55.3	20.7
72	55 K	104	8.9	4046	34.5	9.9
73	28 E	118	10.1	3859	26.0	13.0
74	32 E	101	8.6	2850	35.3	12.2
75	67 E	94	8.0	3021	41.4	11.8
76	28 K	83	7.7	2941	59.9	27.3
77	32 E	101	9.4	2234	32.2	7.2
78	21 E	76	7.0	4075	33.3	6.5
79	18 E	72	6.7	1905	114.4	57.2
80	26 E	79	7.4	1930	53.5	11.1
81	23 K	94	8.8	1665	39.4	10.6
82	25 K	86	8.1	1711	11.5	3.2
83	29 K	68	6.4	1687	60.8	23.3
84	27 K	90	8.4	1609	39.2	10.7
85	38 E	108	10.1	2793	36.1	5.6
86	27 K	101	9.4	2326	37.3	19.2
87	30 E	101	9.4	1915	35.4	7.0
88	35 E	83	7.7	2246	48.3	7.7
89	26 K	101	9.4	3744	40.3	15.1
90	35 K	108	10.1	3456	31.3	6.3
91	26 K	72	4.5	2770	42.9	10.0
92	21 E	65	6.1	2884	64.0	35.5
93	32 K	72	6.7	3787	60.6	16.8
94	36 K	119	11.1	4118	27.0	10.4
95	28 K	72	5.7	2016	49.5	15.5
96	32 K	65	4.1	3845	34.0	6.7
97	29 K	112	7.0	1498	38.4	9.2
98	27 E	65	4.1	1905	40.5	3.9
99	26 E	115	7.2	1880	39.1	12.2
100	38 E	72	5.7	2853	30.5	11.7
101	31 E	76	6.0	1976	35.8	8.8
102	32 E	86	6.8	2600	56.2	14.7
103	46 E	90	7.8	3899	39.7	10.2
104	18 K	173	13.6	2964	35.7	8.2
105	19 K	155	12.2	3226	61.8	7.4
106	20 E	76	6.0	2782	25.7	7.3
107	19 E	61	4.8	3614	20.4	9.6
108	17 K	79	6.2	2747	40.4	14.3
109	19 K	151	11.9	3466	30.8	14.3
110	17 K	155	12.2	2907	36.8	12.8
111	19 E	130	10.2	3400	46.9	12.9
112	28 E	119	9.4	2690	47.2	14.4
113	21 K	68	5.4	2690	40.5	14.1
114	20 K	126	9.9	3710	54.0	11.7
115	22 E	68	5.4	2560	41.1	3.0
116	18 E	130	10.2	3300	38.3	6.8
117	19 K	94	7.4	2412	52.4	29.1
118	20 E	90	7.1	2300	48.9	12.6
119	21 K	83	6.5	2420	44.7	6.0
120	28 K	40	3.0	1910	117.0	13.6
121	32 K	119	11.1	2520	27.4	18.3
122	26 E	79	7.4	2040	46.7	12.8
123	29 K	62	5.7	1802	49.0	16.7

Tablo 4.2. Kontrol, Behçet, SLE, RA, KBY gruplarının plazma, eritrosit, lökosit SOD aktivitelerine ait istatistikî veriler.

(*) Aynı hastalıkta aktif ve inaktif gruplara ait değerleri arasındaki farkın önem kontrolü.
 (**) Kontrol ve hasta gruplarına ait değerler arasındaki farkın önem kontrolü.

	n	Yaş	Plazma SOD		Eritrosit SOD	Lökosit SOD	
			µg / L	Ü		Ü / (g/L Hb.)	Ü / mg Pr. (10 ⁶ hüç./ ml' de)
Kontrol	123	\bar{x} = 33,2 (17-69)	\bar{x} = 95,67 Sd = 29,49	\bar{x} = 7,80 Sd = 2,46	\bar{x} = 2467,22 Sd = 881,48	\bar{x} = 47,23 Sd = 22,79	\bar{x} = 13,00 Sd = 8,07
Aktif Behçet	35	\bar{x} = 34,7 (20-60)	\bar{x} = 398,54 Sd = 249,93 t = 13,16 ** p < 0,001	\bar{x} = 32,28 Sd = 19,01 t = 13,92 p < 0,001	\bar{x} = 2783,63 Sd = 995,17 t = 1,13 p < 0,05	\bar{x} = 30,92 Sd = 18,24 t = 3,98 p < 0,001	\bar{x} = 7,20 Sd = 3,89 t = 3,83 p < 0,001
Inaktif Behçet	36	\bar{x} = 34,3 (18-63)	\bar{x} = 92,80 Sd = 46,91 t = 0,39 p > 0,05	\bar{x} = 7,22 Sd = 4,14 t = 0,90 p > 0,05	\bar{x} = 2002,8 Sd = 654,63 t = 3,01 p < 0,01	\bar{x} = 36,82 Sd = 14,01 t = 2,89 p < 0,01	\bar{x} = 11,06 Sd = 5,70 t = 1,58 p > 0,05
Aktif SLE	27	\bar{x} = 30,0 (15-49)	\bar{x} = 361,03 Sd = 216,18 t = 13,11 p < 0,001	\bar{x} = 32,42 Sd = 19,26 t = 13,75 p < 0,001	\bar{x} = 2168,15 Sd = 638,06 t = 1,67 p > 0,05	\bar{x} = 27,21 Sd = 12,74 t = 4,50 p < 0,001	\bar{x} = 4,42 Sd = 2,28 t = 4,85 p < 0,001
Inaktif SLE	31	\bar{x} = 29,7 (15-56)	\bar{x} = 102,26 Sd = 89,55 t = 0,68 p > 0,05	\bar{x} = 8,91 Sd = 7,74 t = 1,35 p > 0,05	\bar{x} = 2279,29 Sd = 911,14 t = 1,05 p > 0,05	\bar{x} = 27,90 Sd = 11,79 t = 4,60 p < 0,001	\bar{x} = 5,05 Sd = 2,88 t = 4,82 p < 0,001
Aktif RA	40	\bar{x} = 35,5 (17-70)	\bar{x} = 441,40 Sd = 210,10 t = 17,78 p < 0,001	\bar{x} = 38,30 Sd = 17,96 t = 18,29 p < 0,001	\bar{x} = 4792,05 Sd = 2050,46 t = 10,29 p < 0,001	\bar{x} = 23,89 Sd = 12,43 t = 6,28 p < 0,001	\bar{x} = 2,84 Sd = 1,82 t = 6,90 p < 0,001
Inaktif RA	30	\bar{x} = 34,8 (19-58)	\bar{x} = 129,57 Sd = 106,68 t = 3,04 p < 0,001	\bar{x} = 11,51 Sd = 9,35 t = 3,83 p < 0,001	\bar{x} = 3536,97 Sd = 1240,30 t = 5,47 p < 0,001	\bar{x} = 29,82 Sd = 19,27 t = 3,95 p < 0,001	\bar{x} = 6,81 Sd = 6,06 t = 3,67 p < 0,001
KBY	45	\bar{x} = 33,4 (13-67)	\bar{x} = 534,60 Sd = 428,37 t = 11,33 p < 0,001	\bar{x} = 41,46 Sd = 30,83 t = 12,06 p < 0,001	\bar{x} = 4186,22 Sd = 1839,00 t = 8,10 p < 0,001	\bar{x} = 41,28 Sd = 21,38 t = 1,60 p > 0,05	\bar{x} = 13,58 Sd = 10,04 t = 0,36 p > 0,05

Tablo 4.3. Kontrol grubunda plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfositlerdeki SOD aktiviteleri (Ü : Ünite, Hb : hemoglobin, Pr : Protein, hüç. : hücre).

Olgu No	Yaş Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit			B Lenfosit		T Lenfosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr}}$	$\frac{10^6 \text{ hüç.Ü}}{\text{mg Pr}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr}}$	$\frac{10^6 \text{ hüç.Ü}}{\text{mg Pr}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr}}$	$\frac{10^6 \text{ hüç.Ü}}{\text{mg Pr}}$	
1	27 K	104	8.4	1152	29.6	8.1	19.6	5.3	31.3	11.2	
2	50 E	122	10.5	2223	35.3	20.8	24.7	8.2	40.6	21.6	
3	48 K	36	3.1	2296	37.6	12.5	12.5	18.4	10.1	12.1	
4	27 K	68	5.8	2880	26.1	8.0	24.4	8.4	36.8	9.1	
5	29 E	79	6.8	3730	55.3	20.7	20.1	5.5	65.2	21.2	
6	28 K	83	7.7	2941	59.9	27.3	30.9	16.0	62.4	21.6	
7	32 E	101	9.4	2234	32.2	7.2	20.8	5.9	38.6	8.2	
8	21 E	76	7.0	4075	33.3	6.5	20.6	6.2	38.6	7.2	
9	27 K	90	8.4	1609	39.2	10.7	24.4	7.7	48.8	12.0	
10	38 E	108	10.1	2793	36.1	5.6	29.6	10.7	47.2	5.6	
11	27 K	101	9.4	2326	37.3	19.2	20.4	11.2	44.4	18.0	
12	30 E	101	9.4	1915	35.4	7.0	22.2	12.2	38.7	9.0	
13	35 E	83	7.7	2246	48.3	7.7	20.4	11.5	44.4	8.2	
14	26 K	101	9.4	3744	40.3	15.1	26.3	23.3	43.6	13.9	
15	35 K	108	10.1	3456	31.3	6.3	24.7	5.0	34.1	7.9	
16	26 K	72	4.5	2770	42.9	10.0	26.9	8.0	48.2	12.0	
17	32 K	65	4.1	3845	34.0	6.7	22.2	3.6	42.5	6.2	
18	29 K	112	7.0	1498	38.4	9.2	19.0	6.0	46.0	10.6	
19	27 E	65	4.1	1905	40.5	3.9	22.0	14.1	40.2	14.2	
20	26 E	115	7.2	1880	39.1	12.2	21.6	3.4	44.6	9.7	
21	38 E	72	5.7	2853	30.5	11.7	17.4	4.8	31.4	14.3	
22	31 E	76	6.0	1976	35.8	8.8	20.2	6.8	39.4	10.4	
23	32 E	86	6.8	2600	56.2	14.7	28.8	12.0	58.2	14.4	
24	46 E	90	7.8	3899	39.7	10.2	18.5	6.1	47.2	11.4	
25	18 K	173	13.6	2964	35.7	8.2	19.0	7.0	39.1	13.0	
26	19 K	155	12.2	3226	61.8	7.4	33.4	8.4	62.9	11.4	
27	20 E	76	6.0	2782	25.7	7.3	16.3	6.4	31.2	7.4	
28	19 E	61	4.8	3614	30.4	9.6	26.8	10.8	43.6	9.6	
29	17 K	79	6.2	2747	40.4	14.3	22.4	7.4	46.0	15.0	
30	19 K	151	11.9	3466	30.8	14.3	33.4	19.9	32.0	13.3	
31	17 K	155	12.2	2907	36.8	12.8	21.2	12.7	32.8	13.7	
32	19 E	130	10.2	3400	46.9	12.9	21.0	12.6	52.0	12.0	
33	28 E	119	9.4	2690	47.2	14.4	26.4	15.8	48.8	15.5	
34	21 K	68	5.4	2690	40.5	14.1	20.0	12.0	46.0	15.0	
35	20 K	126	9.9	3710	54.0	11.7	28.8	10.8	56.4	8.5	
36	22 E	68	5.4	2560	41.1	3.0	22.4	11.0	43.6	9.6	
37	18 E	130	10.2	3300	38.3	6.8	20.8	12.5	37.2	8.7	
38	19 K	94	7.4	2412	52.4	29.1	23.0	13.8	42.7	9.1	
39	20 E	90	7.1	2300	48.9	12.6	25.2	8.2	50.4	11.0	
40	21 K	83	6.5	2420	44.7	6.0	20.4	11.0	48.6	9.5	

Tablo 4.4. Kontrol, aktif ve inaktif Behçet gruplarının plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivitelerine ait istatistikî veriler.

(*) Aktif ve inaktif hasta grubu değerleri arasındaki farkın önem kontrolü.

(**) Kontrol grubu ile hasta grubu değerleri arasındaki farkın önem kontrolü.

		Kontrol n = 40	Aktif Behçet n = 31		Inaktif Behçet n = 31
Plazma SOD	µg / L	$\bar{x} = 96,80$ Sd = 29,58 (36-173)	$\bar{x} = 399,12$ Sd = 248,15 (108-994)		$\bar{x} = 93,35$ Sd = 45,68 (22-230)
	Ü	$\bar{x} = 7,87$ Sd = 2,48 (3,1-13,6)	$\bar{x} = 32,87$ Sd = 19,59 (12,0-84,9)		$\bar{x} = 7,23$ Sd = 4,05 (1,9-16,2)
Eritrosit SOD	Ü / (g/L Hb.)	$\bar{x} = 2750,8$ Sd = 713,55 (1152-4075)	$\bar{x} = 2809,5$ Sd = 973,74 (1720-6854)		$\bar{x} = 1940,39$ Sd = 665,70 (1016-3211)
Lökosit SOD	Ü / mg Pr.	$\bar{x} = 40,25$ Sd = 8,93 (25,7-61,8)	$\bar{x} = 31,74$ Sd = 18,82 (6,0-74,0)		$\bar{x} = 38,43$ Sd = 13,43 (16,9-70,4)
	Ü / mg Pr. (10^6 hüç./ml'de)	$\bar{x} = 11,36$ Sd = 5,74 (3,0-29,1)	$\bar{x} = 7,74$ Sd = 3,77 (1,7-14,4)		$\bar{x} = 11,35$ Sd = 6,06 (16,9-70,4)
B Lenfosit SOD	Ü / mg Pr.	$\bar{x} = 23,11$ Sd = 4,19 (16,3-33,4)	$\bar{x} = 23,62$ Sd = 9,15 (8,7-57,2) t = 0,31 p > 0,05	t = 2,07 p < 0,05 *	$\bar{x} = 28,95$ Sd = 12,28 (13,0-69,8) t = 2,99 p < 0,01
	Ü / mg Pr. (10^6 hüç./ml'de)	$\bar{x} = 9,81$ Sd = 4,28 (3,4-23,3)	$\bar{x} = 7,31$ Sd = 2,17 (2,9-12,0) t = 2,94 p < 0,01	t = 2,78 p < 0,05 *	$\bar{x} = 9,33$ Sd = 3,43 (5,1-21,1) t = 0,47 p > 0,05
T Lenfosit SOD	Ü / mg Pr.	$\bar{x} = 44,14$ Sd = 8,55 (31,2-65,2)	$\bar{x} = 37,95$ Sd = 13,23 (15,5-65,0) t = 2,39 p < 0,05	t = 4,33 p < 0,001 *	$\bar{x} = 52,03$ Sd = 12,38 (29,6-66,9) t = 3,2 p < 0,01
	Ü / mg Pr. (10^6 hüç./ml'de)	$\bar{x} = 11,81$ Sd = 3,93 (5,6-21,6)	$\bar{x} = 8,67$ Sd = 2,96 (4,2-12,9) t = 3,63 p < 0,001	t = 3,24 p < 0,01 *	$\bar{x} = 12,53$ Sd = 5,43 (3,7-21,7) t = 0,65 p > 0,05

4.2. Behçet'li Hasta Grubunda Plazma, Eritrosit, Lökosit, B ve T Lenfosit SOD aktiviteleri

Yaşları 20 - 60 arasında değişen 14'ü kadın, 21'i erkek toplam olarak 35 klinik olarak aktif Behçet'li hasta grubu ile yaşları 18 - 63 arasında değişen 19'u kadın, 17'si erkek toplam olarak 36, klinik olarak inaktif Behçet'li hasta grubunun plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfosit SOD aktiviteleri Tablo 4.5. ve Tablo 4.6. 'da, istatistiksel verileri Tablo 4.2. ve Tablo 4.4. 'de verilmiştir.

4.2.1. Aktif Behçet'li hasta grubu :

Aktif Behçet'li hasta grubunun plazma SOD aktivite değerleri 12,0 - 84,9 Ü arasında olup $\bar{x} = 32,28$, Sd = 19,01 olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1334 - 6854 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 2783,63$, Sd = 995,17 olarak tesbit edilmiştir.

Lökosit SOD aktivite değerleri 1,4 - 14,4 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 7,20$, Sd = 3,89 olarak saptanmıştır.

Aynı hasta grubunda (n = 31) B lenfosit SOD aktivite değerleri 2,9 - 12,0 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 7,31$, Sd = 2,17 olarak bulunmuştur.

Bu grupta T lenfosit SOD aktivite değerleri 4,2 -12,9 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup, $\bar{x} = 8,67$, Sd = 2,96 'dır.

Aktif Behçet'li hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite ortalama değerleri, kontrol grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite ortalama değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek oldukları gözlenirken (plazma için $p < 0,001$,eritrosit için $p < 0,05$), bu grubun lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivite ortalama değerleri, kontrol grubunun aynı değerleri ile kıyaslandığında ise, istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük oldukları saptanmıştır (lökosit ve T lenfosit için $p < 0,001$, B lenfosit için $p < 0,01$).

Tablo 4.5. Aktif Behçet grubunda plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfositlerdeki SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit			B Lenfosit		T Lenfosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\bar{U}}{g/L\ Hb}$	\bar{U} mg Pr	10^6 hüç.Ü mg Pr	\bar{U} mg Pr	10^6 hüç.Ü mg Pr	\bar{U} mg Pr	10^6 hüç.Ü mg Pr	
1	46 E	562	48.0	1720	66.1	11.6	57.2	10.2	64.1	10.0	
2	28 E	864	73.8	2979	57.2	11.8	32.6	9.6	65.0	12.7	
3	29 K	389	33.2	3032	12.0	2.7	17.2	7.1	15.5	4.5	
4	36 K	173	15.3	2319	6.0	3.3	38.1	5.1	16.0	4.7	
5	28 K	258	25.1	1334	23.0	7.4	14.3	4.7	28.8	8.0	
6	26 K	258	24.3	1341	10.3	9.4	26.4	8.5	28.8	9.2	
7	33 E	144	12.7	2478	74.0	13.1	18.6	6.0	53.6	12.5	
8	29 E	331	29.3	2274	33.9	6.1	26.0	5.8	35.5	10.4	
9	44 E	900	79.6	2629	15.4	3.0	20.8	4.1	45.6	6.1	
10	34 E	518	51.8	2516	34.3	4.8	29.2	9.8	37.9	5.6	
11	28 K	144	14.4	2471	34.4	14.4	20.0	7.1	58.8	11.6	
12	55 K	202	20.2	2634	31.0	8.4	35.2	8.2	40.0	9.7	
13	28 E	367	36.7	2417	29.7	9.0	16.7	6.2	39.0	9.2	
14	30 K	367	36.7	2584	57.9	6.1	23.2	7.5	55.6	7.2	
15	48 E	288	23.2	2516	19.8	3.5	18.4	6.9	33.2	5.3	
16	46 K	245	19.7	2197	31.0	7.9	29.4	6.8	52.8	7.8	
17	30 E	158	12.8	2728	13.0	3.2	15.2	5.6	28.4	6.5	
18	40 E	432	36.9	3296	16.4	3.0	27.0	8.8	27.0	4.6	
19	31 E	158	13.5	3143	35.6	10.1	25.4	6.8	34.3	10.6	
20	31 E	533	45.5	2194	26.5	9.1	14.0	5.1	21.0	8.6	
21	60 E	108	19.2	1787	56.1	13.0	32.6	9.8	46.8	12.2	
22	37 E	418	35.7	2046	9.3	1.7	16.0	6.7	24.3	4.6	
23	29 E	994	84.9	2110	50.3	8.6	23.5	6.9	38.6	10.7	
24	42 K	468	40.0	2108	10.7	3.6	8.7	2.9	29.8	4.2	
25	38 K	835	48.3	2061	12.8	1.4	-	-	-	-	
26	43 E	148	12.6	3228	26.8	5.1	-	-	-	-	
27	20 K	262	23.8	3641	16.8	1.9	-	-	-	-	
28	22 K	140	12.0	4070	28.6	8.9	18.5	6.2	32.6	10.6	
29	40 E	144	12.3	3283	28.2	8.4	20.0	7.1	33.8	9.2	
30	30 E	529	30.6	4085	28.1	9.2	21.4	6.3	35.9	10.2	
31	24 E	893	51.6	4115	11.7	3.0	22.9	5.2	26.2	4.2	
32	22 E	590	34.1	6854	29.9	10.0	19.6	6.3	33.0	12.6	
33	33 E	518	30.0	3186	35.3	13.5	18.2	10.8	38.1	12.7	
34	30 E	280	16.0	2920	68.4	12.3	26.0	12.0	56.0	12.9	
35	45 E	331	26.1	3131	41.8	3.6	-	-	-	-	

Tablo 4.6. İnaktif Behçet grubunda plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit			B Lenfosit		T Lenfosit	
		µg/L	Ü	Ü g/L Hb	Ü mg Pr	10 ⁶ hüç.Ü mg Pr	Ü mg Pr	10 ⁶ hüç.Ü mg Pr	Ü mg Pr	10 ⁶ hüç.Ü mg Pr	
1	18 K	93	8.0	1296	31.8	9.8	17.2	5.1	31.1	10.3	
2	34 E	72	6.2	1789	37.0	6.6	28.1	8.4	48.9	12.0	
3	19 E	162	16.2	1546	56.3	2.3	19.1	6.9	63.6	10.8	
4	35 K	230	13.0	2203	39.1	8.7	42.2	12.9	64.6	8.0	
5	34 E	108	10.8	1576	27.4	14.4	40.0	12.1	42.4	9.7	
6	36 E	132	14.8	1016	22.0	13.9	28.8	8.6	49.6	8.9	
7	35 K	65	5.2	1372	30.0	17.7	19.5	6.5	38.0	20.0	
8	39 E	130	10.5	1896	70.4	19.0	69.8	21.1	66.2	20.4	
9	47 K	61	4.6	1485	35.6	3.9	20.2	6.7	40.1	4.1	
10	20 K	83	6.2	1069	21.6	2.1	19.7	5.6	29.6	3.7	
11	32 E	36	3.1	2075	20.2	8.7	-	-	-	-	
12	34 K	191	16.3	2108	53.2	9.8	-	-	-	-	
13	27 K	76	6.5	2696	18.7	7.7	-	-	-	-	
14	30 E	58	4.9	1956	18.4	7.7	-	-	-	-	
15	25 E	86	7.4	2407	22.7	7.5	22.5	7.0	51.3	8.6	
16	29 E	94	8.0	1266	26.0	5.6	19.4	6.5	36.8	6.2	
17	30 K	162	13.8	2523	16.9	4.6	20.7	6.9	42.2	5.9	
18	63 K	173	14.8	2218	42.5	6.0	37.2	6.0	65.2	16.2	
19	46 E	79	6.8	3211	39.3	10.2	20.0	7.0	50.0	12.5	
20	30 K	144	12.3	1299	36.4	6.4	13.0	6.2	66.2	15.2	
21	35 E	65	5.5	2075	32.6	10.5	22.7	7.3	50.0	11.0	
22	23 K	22	1.9	3182	26.0	9.6	15.6	8.2	37.2	9.7	
23	39 K	58	4.9	2822	47.3	5.8	30.6	10.2	57.2	6.2	
24	39 K	108	6.2	2696	48.5	24.1	35.2	13.6	57.2	21.7	
25	47 E	122	7.1	2997	46.5	12.2	41.3	11.7	56.0	13.7	
26	28 K	43	2.7	1584	28.9	9.3	22.4	7.2	31.1	9.3	
27	42 K	43	2.7	1347	36.1	20.0	23.2	7.0	50.8	21.2	
28	34 E	36	2.3	1533	36.3	7.3	42.0	14.0	65.1	6.8	
29	44 E	65	4.0	1614	30.5	16.9	38.8	11.4	52.2	17.6	
30	28 E	58	3.6	1728	38.1	12.0	33.5	9.8	66.4	13.2	
31	43 K	72	4.5	1296	55.2	21.2	41.8	12.3	66.4	21.4	
32	18 E	76	4.7	1254	63.0	10.5	40.2	9.6	65.8	13.2	
33	37 K	72	4.2	2947	53.6	19.5	39.2	13.6	66.9	19.7	
34	24 K	94	5.9	2600	63.1	21.0	16.6	10.2	64.3	18.8	
35	46 E	86	5.4	2795	30.6	13.3	17.0	9.8	40.4	12.6	
36	44 K	86	5.0	2664	23.7	12.5	-	-	-	-	

Aktif Behçet grubundaki hastaların (n = 31) yaşları ile eritrosit SOD değerleri arasında anlamlı negatif korelasyon tesbit edilmiştir (r = - 0,449 , p < 0,05). Yine bu grubun lökosit SOD aktivite değerleri ile T lenfosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (r = 0,929 , p < 0,001)

4.2.2. İnaktif Behçet'li hasta grubu :

İnaktif Behçet'li hasta grubunun plazma SOD aktivite değerleri 1,9 - 16,3 Ü arasında olup $\bar{x} = 7,22$, Sd = 4,14 olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1016 - 3211 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 2002,81$, Sd = 654,63 olarak tesbit edilmiştir.

Lökosit SOD aktivite değerleri 2,1 - 24,1 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 11,06$, Sd = 5,70 olarak saptanmıştır.

Aynı hasta grubunda (n = 31) B lenfosit SOD aktivite değerleri 5,1 - 21,1 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 9,33$, Sd = 3,43 olarak bulunmuştur.

Bu grupta (n = 31) T lenfosit SOD aktivite değerleri 3,7 - 21,7 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 12,53$, Sd = 5,43 olarak tesbit edilmiştir.

İnaktif Behçet hasta grubunun eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüklük gözlenirken (p < 0,01), bu grubun plazma, lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri ortalamaları, kontrol grubunun aynı değerlerinin ortalamaları ile kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p > 0,05).

İnaktif Behçet hasta grubunun lökosit SOD aktivite değerleri ile B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (B lenfosit için ; r = 0,543 , p < 0,01 ve T lenfosit için ; r = 0,839 , p < 0,001).

Bu grubun B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tesbit edilmiştir ($r = 0,390$, $p < 0,05$).

4.2.3. Aktif ve inaktif Behçet'li hasta gruplarındaki bulguların karşılaştırılması :

Aktif Behçet hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değer ortalamaları, inaktif Behçet hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değer ortalamaları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek oldukları gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivite değer ortalamalarının, inaktif grubun aynı değerleri ortalamaları ile kıyaslandığında ise anlamlı derecede düşük oldukları saptanmıştır ($p < 0,01$).

4.3. SLE 'li Hasta Grubunda Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD Aktiviteleri

Yaşları 15 - 49 arasında değişen 22'si kadın, 5'i erkek toplam 27 ARA kriterlerine göre aktif SLE 'li ve yaşları 15 - 56 arasında değişen 26'sı kadın, 5'i erkek toplam 26 inaktif SLE 'li hastanın plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktivite değerleri Tablo 4.7. ve Tablo 4.8. 'de, istatistiki verileri Tablo 4.2. 'de verilmiştir.

4.3.1. Aktif SLE 'li hasta grubu :

Aktif SLE 'li hasta grubunda plazma SOD aktivite değerleri 10,1 - 82,0 Ü arasında olup $\bar{x} = 32,42$, $Sd = 19,26$ olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1041 - 3466 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 2168,15$, $Sd = 638,06$ olarak tesbit edilmiştir.

Tablo 4.7. Aktif SLE grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	Ü g/L Hb	Ü mg Pr.	10 ⁶ hücre Ü mg Pr.
1	15 E	562	48.0	2609	42.0	2.9
2	33 K	691	59.1	2102	54.1	5.4
3	22 K	97	10.7	2340	48.9	8.3
4	17 K	100	11.0	2880	32.5	8.2
5	32 K	619	52.9	3229	29.3	3.9
6	42 K	245	21.7	2599	26.8	5.9
7	37 K	209	18.5	2506	36.6	5.4
8	37 K	367	36.7	2383	56.0	8.4
9	21 K	288	28.8	2325	33.8	5.4
10	21 K	821	82.0	2556	36.4	1.2
11	41 E	562	56.2	2685	26.7	6.7
12	38 K	410	33.0	1516	21.1	3.6
13	26 K	302	24.4	1229	15.1	1.0
14	21 K	432	36.9	1739	16.0	3.9
15	35 K	562	48.0	1718	15.1	3.6
16	17 K	482	41.2	1213	14.0	3.7
17	40 E	590	50.5	1041	14.1	1.8
18	41 E	619	52.9	1816	31.7	3.4
19	24 K	148	13.8	1218	18.3	1.3
20	26 K	108	10.1	2134	22.9	5.7
21	36 K	172	16.7	2362	22.6	4.1
22	32 K	101	10.6	2326	7.3	1.0
23	17 K	194	15.9	1220	19.2	4.1
24	37 K	176	17.1	3466	27.0	8.3
25	33 E	201	17.9	2286	29.1	5.8
26	20 K	143	14.0	2769	28.7	4.0
27	49 K	547	46.8	2273	9.3	2.3

Tablo 4.8. İnaktif SLE grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$	10^6 hücre $\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$
1	36 K	382	32.6	2443	41.8	5.0
2	25 E	353	31.2	2081	34.4	4.5
3	30 K	310	27.4	3884	54.6	10.5
4	41 K	94	9.4	2851	24.3	3.8
5	30 K	72	7.2	2190	19.2	3.2
6	23 K	72	5.8	2270	21.8	2.4
7	20 K	54	4.4	1875	33.7	3.3
8	43 K	198	16.0	1812	22.4	2.7
9	28 K	137	11.0	1135	16.8	3.4
10	35 K	29	2.2	1491	23.0	9.2
11	39 K	43	3.7	1213	9.1	2.8
12	30 K	43	4.0	1078	26.3	3.0
13	21 K	94	8.8	2438	16.5	2.5
14	17 K	72	6.7	2832	34.0	12.7
15	56 K	47	4.0	1311	28.8	2.9
16	33 K	43	3.7	2531	13.3	3.7
17	16 K	90	8.4	1664	18.5	3.1
18	25 E	101	6.3	2438	26.7	3.8
19	28 E	72	4.5	2438	54.2	6.8
20	31 K	94	8.8	2680	20.0	9.5
21	21 K	94	8.7	1500	15.0	4.3
22	21 K	50	4.7	1119	36.5	6.4
23	26 E	65	6.1	1426	30.4	8.9
24	29 K	65	6.1	3291	45.6	10.6
25	36 K	36	3.4	2668	40.2	6.4
26	30 K	43	4.0	3956	14.7	3.9
27	41 K	101	9.4	4887	29.3	3.5
28	28 K	68	6.4	1651	25.8	2.5
29	45 K	130	10.2	3251	45.6	5.6
30	15 E	86	8.1	1765	18.9	3.0
31	22 K	32	3.0	2489	23.6	2.7

Lökosit SOD aktivite değerleri 1,0 – 8,4 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 4,42$, $Sd = 2,28$ olarak saptanmıştır.

Aktif SLE 'li hasta grubunun plazma SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun plazma SOD aktivite değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun aynı değerlerinin ortalaması ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0,001$).

Bu grubun eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Aktif SLE 'li hasta grubunun eritrosit SOD aktivite değerleri ile lökosit SOD değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($r = 0,520$, $p < 0,01$).

4.3.2. İnaktif SLE 'li hasta grubu :

İnaktif SLE 'li hasta grubunda plazma SOD aktivite değerleri 2,2 – 32,6 Ü arasında olup $\bar{x} = 8,91$, $Sd = 7,74$ olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1078 – 4887 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 2279,29$, $Sd = 911,14$ olarak tesbit edilmiştir.

Lökosit SOD aktivite değerleri 2,4 – 12,7 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 5,05$, $Sd = 2,88$ olarak saptanmıştır.

İnaktif SLE 'li hasta grubunun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüklük gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalamalarının kontrol grubundaki aynı değerler ortalaması ile kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bu grubu oluşturan hastaların yaşları ve plazma, eritrosit, lökosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

4.3.3. Aktif ve inaktif SLE 'li hasta gruplarındaki bulguların karşılaştırılması :

Aktif SLE 'li hasta grubunun plazma SOD aktivite değerleri ortalaması, inaktif SLE 'li hasta grubunun aynı değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek oldukları saptanmıştır ($p < 0,001$).

Aktif ve inaktif SLE 'li grubun eritrosit ve lökosit SOD aktivite değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4.4. RA 'li Hasta Gruplarında Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD Aktiviteleri

Yaşları 17 - 70 arasında değişen 32'si kadın, 8'i erkek toplam 40 ARA kriterlerine göre aktif RA 'li ve yaşları 19 - 58 arasında değişen 23'ü kadın, 7'si erkek toplam 30 inaktif RA 'li hastanın plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktivite değerleri Tablo 4.9. ve Tablo 4.10. 'da , istatistiki verileri Tablo 4.2. 'de verilmiştir.

4.4.1. Aktif RA 'li hasta grubu :

Aktif RA 'li hasta grubunda plazma SOD aktivite değerleri 8,3 - 98,5 Ü arasında olup $\bar{x} = 38,30$, $Sd = 17,96$ olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1119 - 9120 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 4792,05$ $Sd = 2050,46$ olarak tesbit edilmiştir.

Tablo 4.9. Aktif RA grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$	10^6 hücre Ü mg Pr.
1	23 K	468	41.4	5132	27.6	2.1
2	28 K	590	50.5	4928	20.4	0.8
3	28 E	648	55.4	2991	19.4	0.8
4	32 K	417	36.0	5620	3.2	1.1
5	50 K	389	33.2	5959	45.7	8.4
6	51 E	619	52.9	8305	53.6	5.9
7	23 K	1152	98.5	7682	50.3	5.7
8	34 K	619	52.9	4815	32.3	1.9
9	30 K	172	27.2	7591	39.2	3.9
10	21 K	389	33.2	3172	28.5	4.5
11	20 K	864	73.8	5382	20.4	0.8
12	25 K	284	24.9	9019	14.2	0.9
13	31 E	281	24.9	8067	21.9	2.0
14	20 K	151	13.4	6639	39.9	2.5
15	29 E	295	26.1	5994	20.3	1.1
16	36 K	504	44.6	4215	17.5	1.5
17	29 K	241	21.4	2526	21.9	3.4
18	48 E	518	45.9	4113	33.7	5.3
19	17 K	310	31.0	4056	8.9	1.3
20	38 K	446	44.6	2878	17.7	1.9
21	52 K	245	24.5	4725	29.4	3.5
22	28 K	279	17.9	9120	21.2	2.7
23	43 K	286	18.6	4736	36.5	3.6
24	29 K	347	34.7	6209	24.5	2.9
25	70 K	151	12.2	3239	40.0	5.8
26	50 E	183	8.3	3557	38.1	3.5
27	33 K	533	45.5	3541	18.1	1.7
28	26 K	518	44.3	4661	10.3	1.5
29	52 K	533	45.5	4505	25.8	3.4
30	28 E	533	45.5	4786	8.2	2.3
31	30 K	619	52.9	1291	17.4	2.2
32	55 K	612	52.3	1203	36.3	3.1
33	62 K	619	52.9	1119	17.7	7.3
34	30 E	439	37.5	2223	26.7	2.4
35	57 K	662	56.6	3842	15.1	1.6
36	53 K	583	49.8	4862	6.5	2.1
37	28 K	417	35.7	3320	6.9	1.0
38	38 K	432	36.9	7559	16.1	3.2
39	25 K	168	15.4	3887	9.0	2.2
40	20 K	140	13.1	4213	15.3	1.7

Tablo 4.10. İnaktif RA grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	$\frac{\text{Ü}}{\text{g/L Hb}}$	$\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$	10^6 hücre $\frac{\text{Ü}}{\text{mg Pr.}}$
1	53 K	290	10.5	6265	54.0	8.7
2	38 K	38	2.3	2747	25.3	5.7
3	26 E	94	9.4	3637	31.4	6.1
4	31 K	43	14.3	3762	72.6	28.1
5	34 K	108	9.6	3580	20.5	8.2
6	40 E	174	13.1	2810	67.1	11.6
7	40 K	533	47.2	3127	7.0	1.5
8	36 K	122	12.2	2923	9.0	2.7
9	32 K	162	16.2	5203	6.1	2.9
10	58 E	281	28.1	4373	49.9	4.3
11	28 K	140	14.0	4589	60.0	13.9
12	19 K	288	23.2	4865	30.2	4.1
13	50 K	247	26.8	4796	31.2	9.4
14	31 K	65	5.5	1041	34.9	9.4
15	34 K	94	8.8	3330	16.1	3.2
16	58 K	76	7.1	4862	7.7	2.5
17	30 K	50	4.7	2697	20.6	4.9
18	28 K	29	2.7	2668	24.9	3.4
19	19 K	115	10.8	1312	25.5	3.0
20	35 E	101	9.4	1277	40.9	5.4
21	29 E	76	6.5	3568	57.8	19.3
22	26 K	101	8.6	3762	34.4	8.2
23	46 K	68	5.4	2520	16.7	2.1
24	24 E	94	8.8	1876	17.0	2.1
25	25 K	166	13.0	4107	17.5	2.7
26	51 K	29	1.8	2975	9.9	2.3
27	36 K	94	8.8	3944	21.5	3.5
28	30 K	72	5.7	5328	10.5	4.3
29	28 K	47	3.7	4251	16.8	3.4
30	30 E	90	7.3	4914	57.5	17.4

Lökosit SOD aktivite değerleri 0.8 – 8.4 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 2,84$, $Sd = 1,82$ olarak saptanmıştır.

Aktif RA 'li hasta grubu plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalamaları, kontrol grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalamaları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun aynı değerlerinin ortalaması ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0,001$).

Bu grubu oluşturan hastaların yaşları ile lökosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur ($r = 0,549$, $p < 0,01$).

4.4.2. İnaktif RA 'li hasta grubu :

İnaktif RA 'li hasta grubunda plazma SOD aktivite değerleri 1,8 – 47,2 Ü arasında olup $\bar{x} = 11,51$, $Sd = 9,35$ olarak bulunmuştur.

Bu grupta eritrosit SOD aktivite değerleri 1041 –6265 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 3536,97$, $Sd = 1240,30$ olarak tesbit edilmiştir.

Lökosit SOD aktivite değerleri 1,5 – 28,1 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 6,81$, $Sd = 6,06$ olarak saptanmıştır.

İnaktif RA 'li hasta grubu plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalamaları, kontrol grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalamaları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun aynı değerlerinin ortalaması ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0,001$).

Bu grubu oluşturan hastaların yaşları ve plazma, eritrosit, lökosit SOD aktivite değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4.4.3. Aktif ve inaktif RA 'li hasta gruplarındaki bulguların karşılaştırılması :

Aktif RA 'li hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması, inaktif RA 'li hasta grubunun aynı değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek oldukları saptanmıştır (plazma için $p < 0,001$, eritrosit için $p < 0,01$).

Aktif RA 'li grubun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, inaktif RA 'li grubun aynı değer ortalamaları ile karşılaştırıldığında ise, anlamlı derecede düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0,001$).

4.5. KBY 'li Hasta Grubunda Plazma, Eritrosit ve Lökosit SOD Aktiviteleri

Yaşları 13 - 67 arasında değişen 15'i kadın 30'u erkek toplam 45 KBY 'li hastanın plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktivite değerleri Tablo 4.11. 'de , istatistik verileri Tablo 4.2. 'de verilmiştir.

Bu grupta plazma SOD aktivite değerleri 8,6 -115,2 Ü arasında olup $\bar{x} = 41,46$, $Sd = 30,83$ olarak bulunmuştur.

Eritrosit SOD aktivite değerleri 1271 - 8600 Ü / (g/L Hb) arasında olup $\bar{x} = 4186,22$, $Sd = 1839,00$ olarak tesbit edilmiştir.

Lökosit SOD aktivite değerleri 2,1 - 43,2 Ü / mg Pr. (1 milyon hücrede) arasında olup $\bar{x} = 13,58$, $Sd = 10,04$ olarak saptanmıştır.

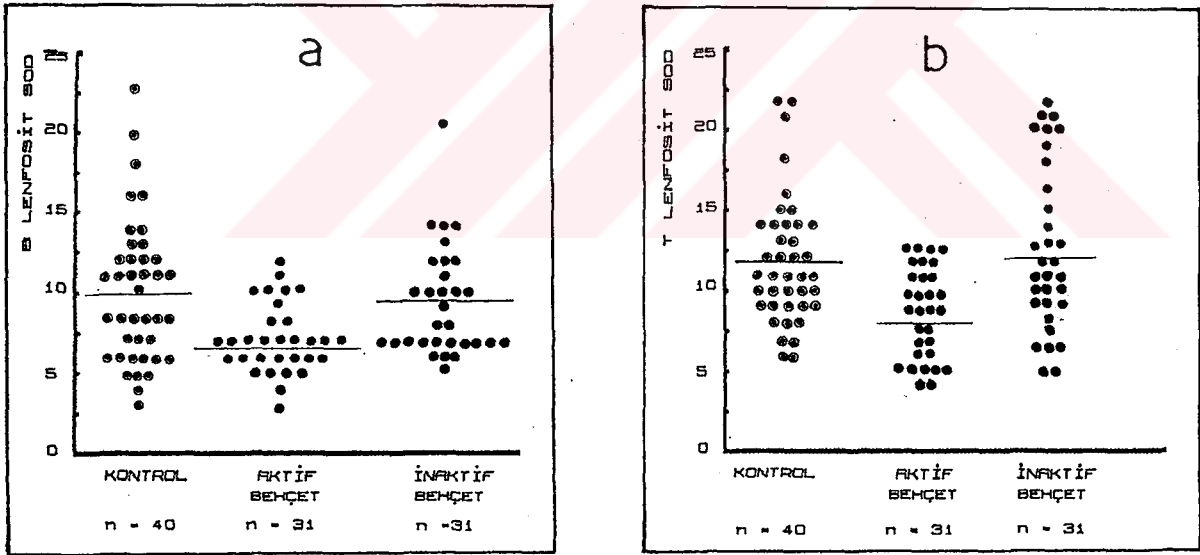
Tablo 4.11. KBY grubunda plazma, eritrosit, lökosit SOD aktiviteleri.

Olgu No	Yaş/ Cins	Plazma		Eritrosit	Lökosit	
		µg/L	Ü	Ü g/L Hb	Ü mg Pr.	10 ⁶ hücre Ü mg Pr.
1	43 E	612	61.2	2503	46.5	22.2
2	28 E	101	8.6	6704	37.5	12.1
3	31 K	403	34.4	2983	34.6	31.5
4	29 E	1296	110.7	4399	42.3	21.1
5	41 E	94	9.4	3147	50.6	5.9
6	40 K	648	64.8	5546	46.5	6.3
7	20 K	1145	114.5	3686	44.0	10.2
8	35 E	1152	115.2	2492	49.3	10.3
9	17 K	785	78.5	3920	121.0	43.2
10	38 E	576	57.6	5558	41.8	23.2
11	45 E	691	55.7	2340	76.3	19.1
12	28 E	295	29.5	3744	48.7	9.4
13	33 K	115	9.3	2245	28.8	5.7
14	60 E	162	13.1	1931	49.2	14.5
15	42 E	389	31.4	1991	49.2	9.3
16	31 E	374	30.2	1271	66.4	34.9
17	18 E	173	17.0	1508	46.5	7.3
18	40 K	137	13.7	2058	56.8	13.2
19	44 E	410	35.1	3532	28.1	5.7
20	52 K	698	59.7	1920	52.0	15.3
21	23 K	533	45.5	2279	27.4	12.5
22	30 E	547	31.6	4478	28.9	7.2
23	26 K	266	22.8	4320	27.2	5.3
24	21 E	310	26.5	4896	43.5	15.5
25	35 K	130	11.1	5141	20.0	11.1
26	28 E	356	30.5	5544	16.2	6.2
27	28 K	173	14.8	7891	31.6	6.9
28	13 E	158	13.5	5256	19.2	7.4
29	67 E	698	59.7	4378	14.6	2.8
30	32 E	288	22.7	3744	16.0	2.8
31	34 E	274	21.5	4320	46.0	5.8
32	23 E	172	15.7	3920	12.3	7.7
33	28 E	243	13.4	1991	10.4	6.5
34	34 E	590	34.1	5760	74.8	29.9
35	35 K	1872	108.2	4318	69.8	29.0
36	45 E	1166	67.4	8600	53.3	10.2
37	27 K	144	11.3	4104	13.2	3.6
38	24 E	173	13.6	6595	69.9	10.0
39	61 E	243	13.4	5688	38.4	10.4
40	26 K	972	56.2	7632	16.1	7.3
41	40 E	1620	93.6	3629	42.5	10.1
42	31 K	1008	58.3	3888	12.2	2.1
43	36 E	490	43.3	2960	43.6	27.6
44	17 E	1087	62.8	7960	54.6	36.7
45	23 E	288	24.6	5610	39.8	16.3

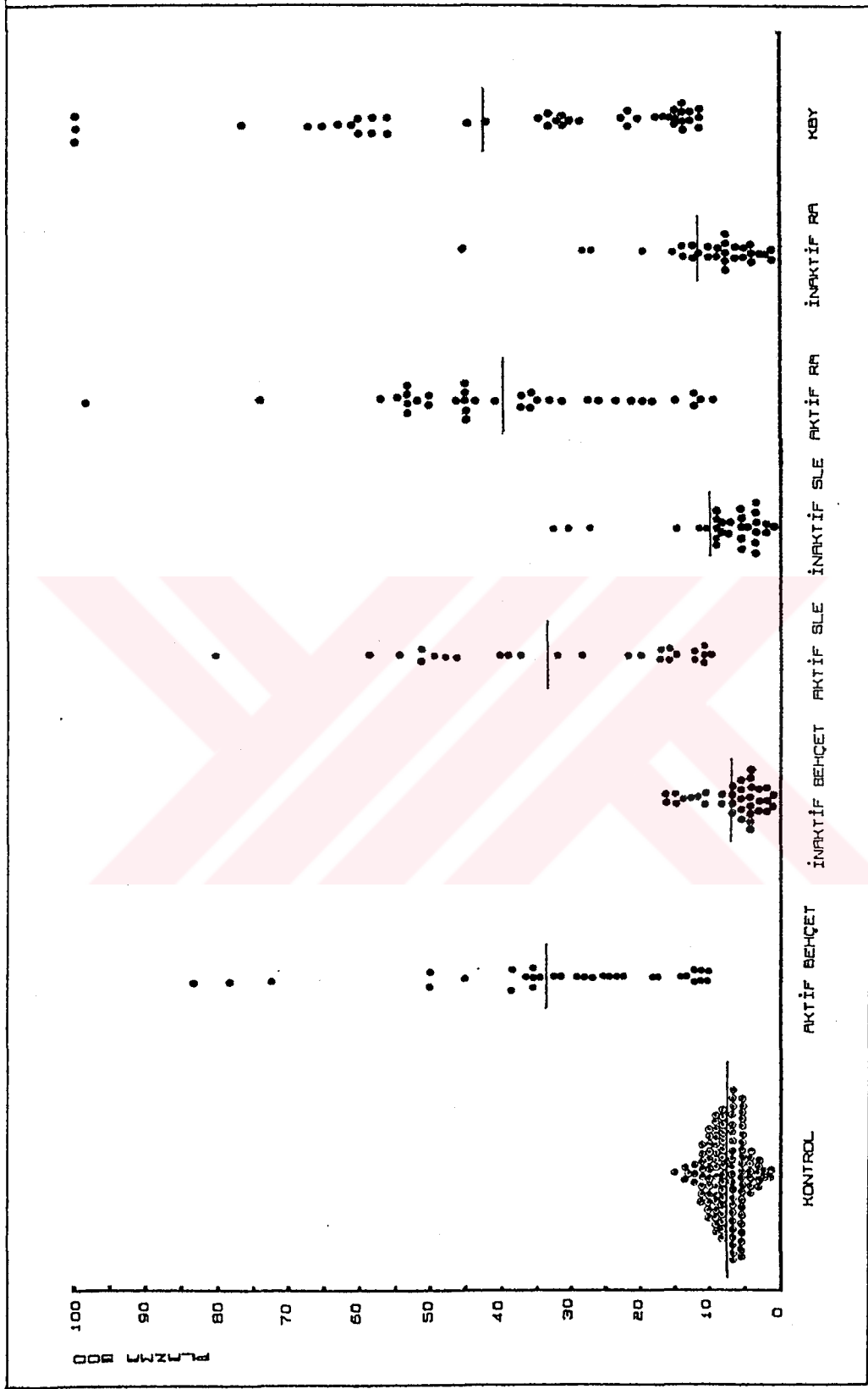
KBY 'li hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri ortalaması ile karşılaştırıldığında, istatiksels olarak anlamlı yükseklikler gözlenirken ($p < 0,001$), bu grubun lökosit SOD aktivite değerleri ortalaması, kontrol grubunun aynı değerleri ortalaması ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir ($p > 0,05$).

Bu grubu oluşturan hastaların plazma ve lökosit SOD değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($r = 0,32$, $p < 0,05$).

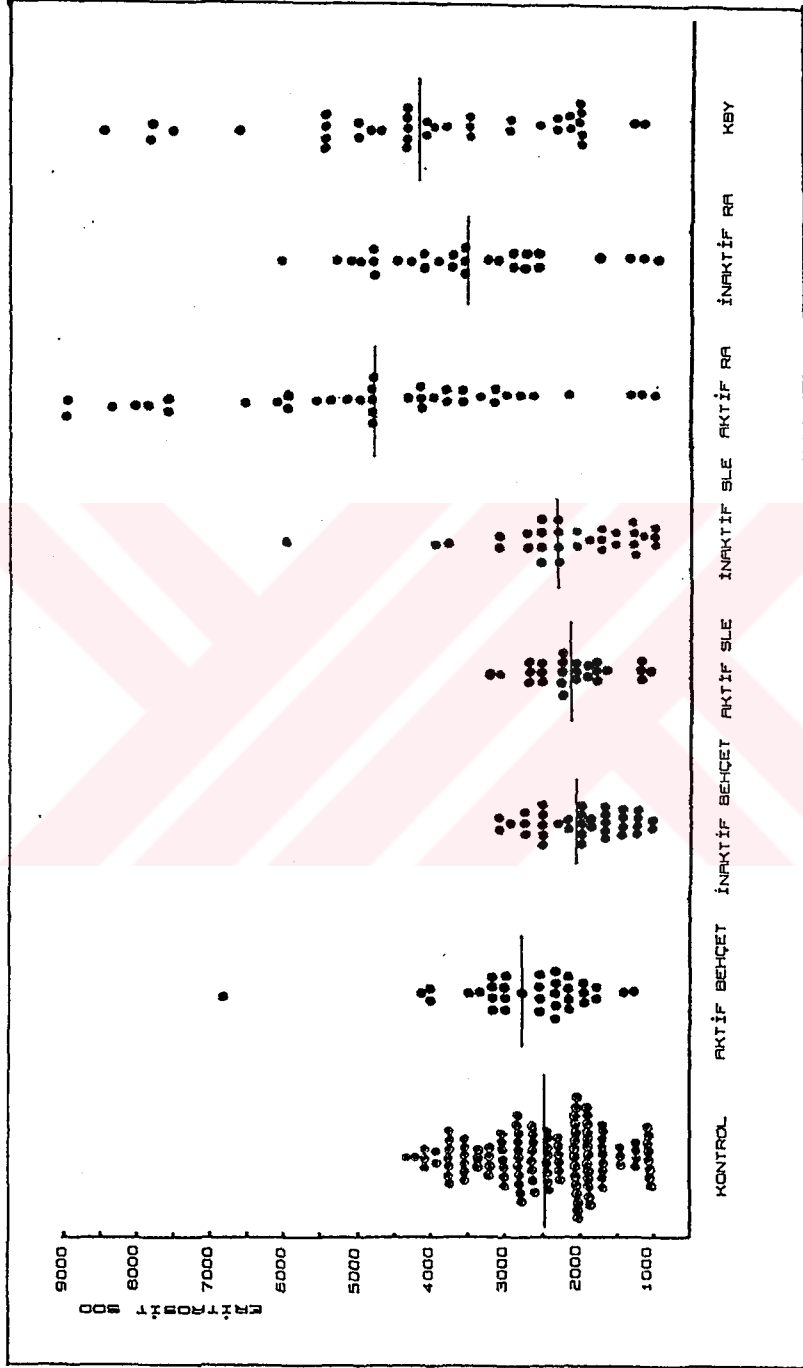
Kontrol ve hasta gruplarına ait plazma, eritrosit, lökosit SOD aktivite değerlerinin dağılımı Şekil 4.1. , 4.2. ve 4.3. 'de , kontrol ve Behçet'li hasta gruplarındaki B ve T lenfosit SOD aktivite değerlerinin dağılımı Şekil 4.4 'de gösterilmiştir.



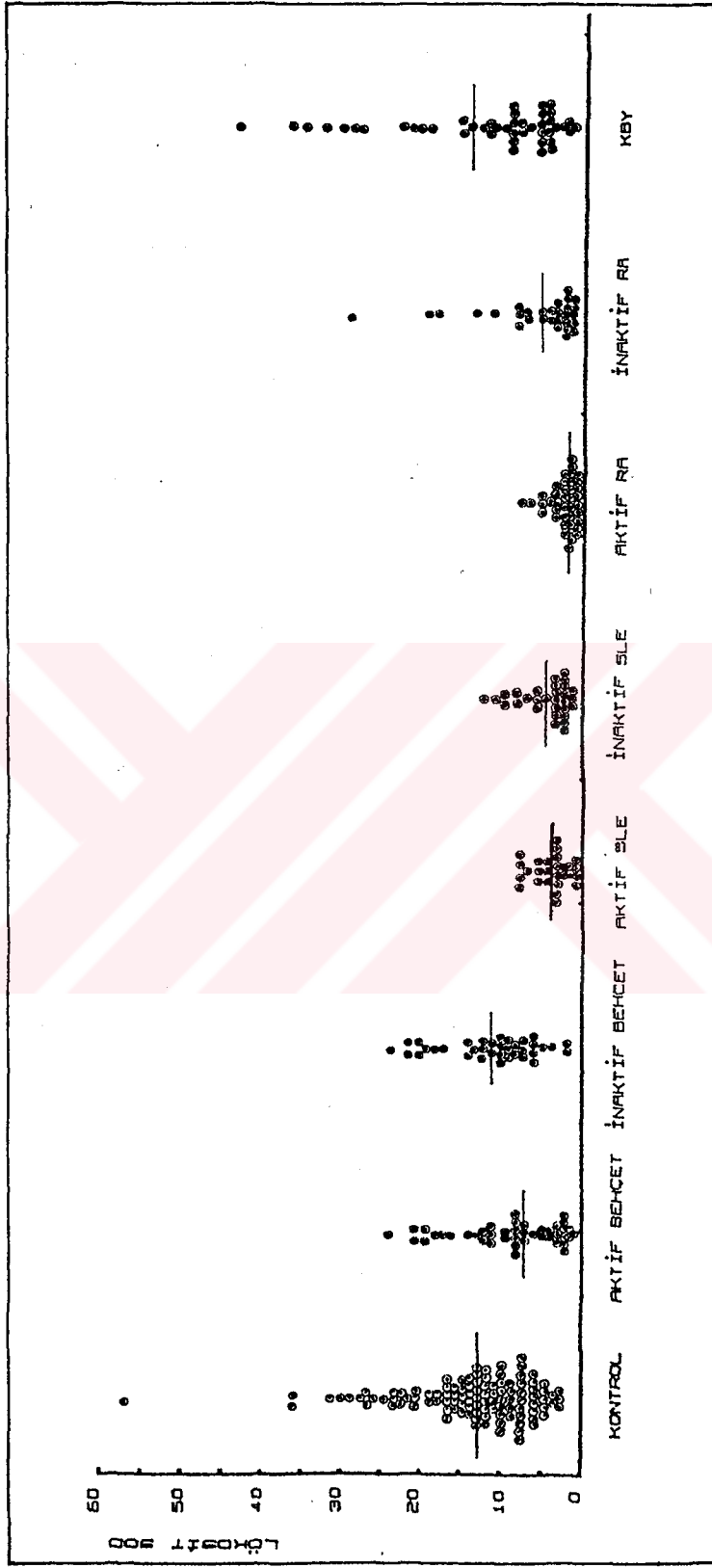
Şekil 4.4. Kontrol ve Behçet 'li hasta grubunda a) B lenfosit b) T lenfosit SOD aktivite değerlerinin dağılımı.



Şekil 4.1. Kontrol ve hasta gruplarında plazma SOD aktivite değerlerinin dağılımı.



Şekil 4.2. Kontrol ve hasta gruplarında eritrosit SOD aktivite değerlerinin dağılımı.



Şekil 4.3. Kontrol ve hasta gruplarında lökosit SOD aktivite değerlerinin dağılımı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

1969 yılında Mc Cord ve Fridovic (63) tarafından süperoksit radikalinin dismutasyonunu katalizleyen SOD 'ın enzimatik aktivitesinin gösterilmesinden bu yana geçen sürede gerek süperoksit radikali gerekse SOD üzerindeki çalışmaların giderek yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Çeşitli hastalıklarda, plazma , eritrosit ve lökosit SOD aktivitelerinin, hastalıkların oluşumunda ve değişik evrelerindeki durumu araştırılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinin bu parametrelerden bir veya ikisinin ölçüldüğü görülmüştür. Bizde bu çalışmamızda, kontrol grubu ile birlikte aktif ve inaktif evredeki Behçet, SLE, RA 'li hastalarla, KBY 'li hastalarda plazma, eritrosit ve lökosit SOD aktivitelerini tayin ettik. Ayrıca kontrol grubunun bir kısmında ve Behçet'li hastalarda bunlara ek olarak B ve T lenfosit SOD aktivitelerini de inceledik.

Inflamasyon sırasında polimorf nükleer ve mononükleer lökositler tarafından hücre hasarına sebep olan O_2^- üretilir (4,13,17,31,39,45, 54,83,96,102). Çözünebilir veya partiküler maddeler polimorf nüveli hücrelerden reaktif bir radikal olan O_2^- 'in salınımını artırırılar (13,14,83). Kemotaktik faktörler ve aggregate olmuş immünglobulinler de polimorf nüveli lökositlerden O_2^- salınımını uyarırlar (4,13,31,39,83,91). Polimorf nükleer lökositlerde reaktif oksijen bileşikleri başlıca iki enzim sistemi ile oluşturulur. Bunlardan birincisi süperoksit radikali oluşturan membrana bağlı NADPH oksidaz, ikincisi de hipohalöz asiti oluşturan myeloperoksidazdır (17,45,74,83,102). Süperoksit radikali dismutasyonla H_2O_2 ve daha reaktif bileşikler olan hipohalöz asitleri (HOX), hidroksil radikali ve 1O_2 'ne dönüşür (68,84, 102). Reaktif oksijen bileşikleri hücrelerde protein ve lipidlerde hasar oluştururlar (14,17,23,35,62,64,68,77). Bu bileşiklerden O_2^- ve H_2O_2 'in enzimlerle regüle edilmelerine karşılık, $OH\cdot$, 1O_2 ve HOX enzimlerle direkt olarak regüle edilmezler (17,45,102). Bu nedenle başta O_2^-

olmak üzere ilgili diğer serbest radikalleri kartilaj, kollajen parçalanması gibi bağ dokusu harabiyeti ile ilgili otoimmün bir hastalık olan RA 'in patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (35,55,59). Bütün memeli hücrelerinde mevcut hücre içi bir enzim olan SOD 'ın görevi, O_2^- 'nin dismutasyonunu sağlayarak aerobik hücreleri oksijen toksisitesine karşı korumak, yani sitotoksiteyi önlemektir (63). Böylece SOD, hücrede O_2^- 'ne karşı önemli bir savunma mekanizması oluşturur (63).

Invitro çalışmalarda, O_2^- ve H_2O_2 'in hyalüronik asit, kollajen ve kartilajı etkiledikleri, sinovial sıvıyı tahrip ettikleri tesbit edilmiştir. Sinovial sıvıda SOD 'ın bulunduğu da gösterilmiştir (59,96).

Kronik inflamatuvar eklem hastalıklarında, inflamatuvar eklemlerde, serbest oksijen radikallerinin üretimini sağlayan bol miktarda polimorf nüveli (PMN) ve mononükleer lökositler (MN) bulunmaktadır (96). Eklem inflamasyonunda immün kompleksler, bakteriyel ürünler ve kristaller bu hücreleri aktive ederek serbest oksijen radikallerinin salınmasına neden olurlar (13,22,41,59). Bu radikaller de sinovial sıvı ve kartilajdaki hyalüronik asit ile diğer proteoglikanları, kollajen ve elastini kolayca degrade ederler (59,89,96). RA 'li hastalarda, plazmada, lökositlerde, eritrositlerde ve sinovial sıvıda SOD aktivitesi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (5,13,59,82,86,87,88,108). Marklund (59), RA 'li hastaların sinovial sıvılarında EC - SOD, Cu, Zn - SOD ve siyanide dirençli SOD aktivitelerinin kontrol grubunun sinovial sıvısındaki göre düşük olduğunu tesbit etmiştir. Aynı çalışmada kontrol grubunda, sinovial sıvıdaki SOD aktivitesinin aynı grubun plazma SOD aktivitesinden üç katı fazla olduğu da bildirilmiştir. Rister and Bauermeister (87,88) RA 'li çocukların polimorf nükleer lökositlerinde total SOD aktivitesinde düşüklük saptamışlardır. Pasquier et al (82) ise yetişkin RA 'li hastaların polimorf nükleer lökositlerinde Mn - SOD 'ın düşük olduğunu, total SOD düzeylerinde farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Youssef and Baron (108), RA 'li hastalarda lökosit total SOD aktivitesini polimorf nükleer lökosit ve mononükleer hücrelerde, kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Bu bulgu diğer çalışmalara uygunluk göstermemektedir. Diğer bir çalışmada RA 'li hastaların eritrositlerindeki SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu bildirilmiştir (5).

Çalışmamızda, 40 aktif RA 'li ve 30 inaktif RA 'li hastanın plazma SOD aktiviteleri, 123 kişiden oluşan kontrol grubuna göre , aktif hastalarda daha belirgin olmak üzere yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Aktif hasta grubunun plazma SOD aktivitesinin inaktif hasta grubuna göre de yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). RA 'li hastalarımızda plazma SOD aktivite değerlerinin hastalık aktivitesi ile paralellik gösterdiği dikkati çekmektedir.

RA 'li hastalarımızın hepsi non steroid anti inflamatuvar (NSAİ) ilaç almaktaydı ve buna ilave olarak aktif grupta 3 hasta, inaktif grupta 4 hasta steroid tedavisi altındaydı. İnaktif hasta grubunda steroid kullanımı (2,5 - 10 mg / gün) uzun süredir devam ediyordu. Bazı NSAİ ilaçların , fagositlerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu baskılayabilecekleri bildirilmiştir (86). Steroid grubu ilaçların da O_2^- üretimini inhibe ettikleri gösterilmiştir (70). Bu nedenle steroidin SOD aktivitesi üzerine etkisinin indirekt olabileceği düşünülebilir. Ancak glikokortikoid kullanan RA 'li hastalarda PMN SOD aktivitesinin NSAİ ilaç kullanan gruba göre daha yüksek olduğunu bildiren bir çalışma da mevcuttur (108).

RA 'li aktif ve inaktif hastalarda lökosit SOD aktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ($p < 0,001$). Aktif hasta grubundaki lökosit SOD değerlerinin inaktif gruptakinden daha düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$). Bulgularımız, Rister et all. (87,88) ve Pasquier et all. (82) 'ün bulguları ile uyuşmakta, ancak Yousseff and Baron (108) 'un bulgularıyla zıtlık göstermektedir. Ayrıca lökosit SOD aktivite değerlerimizin de hastalık aktivitesi ile paralellik gösterdiği dikkatimizi çekmiştir. Buna karşın Yousseff and Baron (108), PMN ve MN lökosit SOD aktivite değerleri ile hastalık aktivitesi arasında bir ilişki saptanamadığını bildirmişlerdir.

RA 'li hasta grubunda lökosit SOD aktivite değerlerinde tesbit ettiğimiz düşüklüğü, tam olarak açıklayacak bilgilerden şu anda yoksunuz. Ancak RA 'da tüm lökositlerin % 30 'unu teşkil eden lenfositlerde

fonksiyonel bozuklukların mevcut olduğu bildirilmektedir (42,69,72). RA 'li hastaların lökosit SOD değerlerinde tesbit edilen bu düşüklüğün, inflamasyon olayının çeşitli derecelerde kronik olarak devam ettiğinin bir göstergesi olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda RA 'li hastalarda eritrosit SOD aktivitesi aktif olgularda daha belirgin olmakla birlikte inaktif olgularda da kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Literatürde Aurothiomalate alan RA 'li hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin düştüğü, bu hücrelerdeki düşüklüğün eritrosit sedimantasyon hızı ile ilgili olmadığı tesbit edilmiştir (86) . Bizim çalışma grubumuzdaki hastalardan sadece ikisi Aurothiomalat tedavisi altında idi. Sülfasalazin tedavisi altında olan hastalarda ise, eritrosit SOD aktivitelerinin başlangıçta kontrol grubundan farklı değilken, 6. haftadan itibaren bir düşme gösterdiği ve 12 - 24. haftalarda ise başlangıç değerlerine döndüğü bildirilmiştir (86) . Çalışmamızda RA 'li hastalarda eritrosit SOD aktiviteleri bir kez ölçüldüğünden tedavi boyunca herhangi bir dalgalanma olup olmadığını bilemiyoruz. Jansson et al. (37) demir eksikliği anemisinde eritrosit SOD aktivitesini kontrol grubuna göre yüksek bulduklarını, bu durumun artan oksidan baskının bir sonucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. RA 'li hastalarda NSAİ ilaçların gastrointestinal sisteme etkisi sonucu kronik kan kaybı ile hafif derecede demir yetmezliği anemisinin görülebileceği bildirilmiştir (42) . Bu durum RA 'li hastaların eritrosit SOD aktivite değerlerinde tesbit ettiğimiz yüksekliğin muhtemel sebeplerinden biri olabilir. Eritrosit SOD aktivitesinin rolünün tam olarak açıklanabilmesi için ileri çalışmalara gerek vardır.

RA 'li aktif ve inaktif hastalarla kontrol grubu arasında, plazma eritrosit ve lökositlerdeki SOD aktivitesi değişikliklerinin istatistiksel olarak anlamlı olması , SOD aktivite tayininin hastalık aktivitesi hakkında fikir verebileceğini düşündürmektedir.

Otoimmün bir hastalık olan SLE 'de damar hasarı önemli bulgular-
dan biri olup, bu hasarın oluşumunda, yani inflamasyonda, nötrofil ve
immün komplekslerin rolü büyüktür (42). Doku hasarının oluşmasına neden
olan immün komplekslere karşı nötrofillerden aktif oksijen bileşikleri ve
lizozomal enzimler salgılanır. Bunlar otooksidatif doku hasarının
oluşmasında rol oynarlar (17,23,35,42,75,76,95,102). Süperoksit radi-
kalının üretimindeki artış ile otoimmün veya immün kompleks hastalıkları-
nın patogenezi arasındaki muhtemel ilişkiler tartışılmaktadır. SLE 'deki
immün kompleksler komplemanın da işbirliği ile nötrofillerden süperoksit
radikallerinin salgılanmasına yol açmaktadır (76,84,95). Invitro olarak
serumda immün kompleks mevcudiyeti ile, artmış O_2^- üretiminin birlikte
bulunduğu gösterilmiştir (76,95). Given et al. (29) SLE 'li hasta
serumlarında düşük molekül ağırlıklı faktörlerin, nötrofilleri aktive
ederek doku hasarında etkili olduğunu savunmaktadırlar.

SLE gibi bazı otoimmün hastalıklarda doku hasarını arttıran
klastojenik faktörlerin bulunduğu, bunların ısıya hassas , süperoksit
radikali ile aktive olabildiği ve SOD ile inhibe edildiği ifade edil-
mektedir (22). SLE 'li hasta serumlarının nötrofiller ile inkübe
edilmesi sonucunda, nötrofillerden aktif oksijen radikallerinin üretimi-
nin arttığı saptanmıştır (76,95).

Biz çalışmamızda, aktif SLE 'li 27 hastada plazma SOD aktivite-
sini, inaktif SLE 'li 21 olguya ve 123 kişilik kontrol grubuna göre
anlamli olarak yüksek düzeylerde bulduk ($p < 0,001$). Aktif SLE 'li
hastalardaki bu yüksek plazma SOD aktivitesi, nötrofillerden salınan
aktif oksijen bileşiklerinin üretimlerindeki artışın, enzim proteininin
sentezini indüklemesinin bir sonucu olabilir. Bununla birlikte ekstra-
sellüler ortamda oluşan serbest oksijen radikallerinin tam olarak kontrol
edilemediği bildirilmiştir (102). Bir makalede SLE 'nin genetik ve
çevresel faktörlerle oluşan bir serbest radikal hastalığı olduğu da ileri
sürülmektedir (17). Aktif SLE 'li olgularda tesbit edilen yüksek plazma
SOD aktiviteleri doku hasarını desteklemektedir. Elde edilen sonuç, doku
hasarı ile nötrofil aktivasyonu ve nötrofil ürünü olan serbest oksijen

radikal üretiminin arttığını, buna sekonder olarak da SOD düzeylerindeki artışın eşlik ettiğini düşündürmektedir.

SLE 'li hastalarda eritrosit SOD aktivitelerini gerek aktif gerekse inaktif olgularda kontrol grubundan farklı bulmadık.

Lökosit SOD aktivitelerini aktif vakalarda daha belirgin olmak üzere, hem aktif hem de inaktif SLE ' li olgularda kontrol grubundan düşük olduğunu saptadık ($p < 0,001$). İnaktif olgulardaki düşük lökosit SOD aktiviteleri, hastaların tedavi amacı ile önce yüksek dozda daha sonra idame dozuna düşerek kullanılan steroid grubu ilaçların etkisi olarak değerlendirildi. Bu grup ilaçların nötrofil fonksiyonlarını etkiledikleri bilinmektedir (42). Steroidlerin lökositlerdeki süperoksit radikal üretimini azalttığı bildirilmiştir (70). İn vivo çalışmalarda günde 20 mg prednison veya 400 mg kortizol alan hastalarda granülosit adheransında azalma, spesifik granül sekresyonunda baskılanma gösterilmiştir (70). İntravenöz kortizolün 48 saatte supresyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (70). Kortizol ile inkübe edilen nötrofillerin bakteri öldürme gücünün azaldığı saptanmıştır (70). SOD 'nin substratı olan süperoksit radikalinin üretiminin azalması sonucunda lökositlerdeki SOD aktivitesinde de azalma beklenebilir. SLE 'li hastalarda lökosit SOD aktivitesi ile ilgili çalışmalar yetersizdir. Bu konudaki çalışmalarla gerek vardır.

Yaptığımız literatür taramasında SLE hastalarda SOD aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlayamadık. Bu sebeple sonuçlarımızı karşılaştırma imkanı bulamadık. Ancak elde ettiğimiz bulgularda, plazma SOD düzeylerindeki istatistiksel olarak anlamlı yükselme ve lökosit SOD seviyelerindeki anlamlı düşüklüğün, aktif ve inaktif vakaların ayrılmasında faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Renal iskemî, akut böbrek yetmezliğinin sık rastlanılan bir sebebidir (11,17,84). Polimorfonükleer lökositlerden ve muhtemelen glomerüler mesangial hücrelerden kaynaklanan serbest oksijen radikallerinin akut böbrek yetmezliğinin patogeneğinde, muhtemelen immün komplekslerden ileri gelen glomerulonefritlerin ve deneysel akut faz nefrotoksik nefritlerin erken dönemindeki proteinüri esnasında önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir (11,17). Serbest oksijen radikallerinin renal iskemide önemli rolleri vardır. Bu sebeple transplantasyonda organ korunmasında SOD 'ın kullanılabileceği düşünülmüştür (17,64,84). Amiloid oluşumunda da serbest oksijen radikallerinin etkili olduğu bildirilmiştir (11,17). Literatürde KBY 'li hastaların plazma ve eritrosit SOD aktivitesinin yüksek düzeylerde bulunduğunu bildiren çalışmalar vardır (98, 99). Hemodiyaliz tedavisi uygulanan hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (43). Bir başka çalışmada, hemodiyaliz sonrası serbest oksijen radikallerinde artış olduğu tesbit edilmiştir (92). Bu durumun eritrositlerin hemolizini arttırdığı ileri sürülmüştür (92,105).

Çalışmamızda KBY 'li 45 hastanın plazma ve eritrosit SOD aktivitelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek düzeylerde bulduk ($p < 0,001$). Bu grubun lökosit SOD aktivite değerlerinde kontrol grubundan farklı değildi. Eritrosit SOD aktivite sonuçlarımız Trznadel et all. (99) 'in bulguları ile uygunluk göstermektedir.

Behçet hastalığı, sistemik kronik tekrarlayan inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi kesin olarak bilinmemektedir. Bu hastalarda önce mononükleer sonra polimorf hücre infiltrasyonu ile karakterize non spesifik bir vaskülit gözlenmektedir. Behçet'li hastaların polimorf nüveli lökositlerinden serbest oksijen radikallerinin üretiminin arttığı ve bu radikallerin vaskülit oluşumunda etkisi olabileceği ileri sürülmüştür (75,106). Fagositik hücrelerin membranlarının uyarılması ile bu hücrelerde serbest oksijen radikallerinin üretimini de içeren bir dizi biyokimyasal değişim oluşur. Bu değişimlerden birisi de arasıdonik asit salınımının uyarılmasıdır. Oksidatif metabolizma oksijen alımının hızla artarak süperoksit radikalının salınımı ile karakterize edilir

(106). Bu radikal, elektron donörü olarak NADPH kullanılarak oksijenin indirgenmesi sonucunda oluşur (74). Oluşan süperoksit radikalinin büyük bölümü SOD ile hidrojen peroksit'e çevrilir. Serbest oksijen radikallerinden süperoksit radikali, daha reaktif oksijen ürünlerine ($OH\cdot$, HOX , 1O_2 gibi) dönüşebildiğinden, bu radikali ortadan kaldıran SOD 'ın bu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ön çalışmaların başlamasına da neden olmuştur (21,67,77,84,106). Behçet hastalığında polimorf nüveli lökositlerin hiper aktif olduğu gösterilmiştir (75). Polimorf nüveli lökositlerden salgılanan faktörlerin , inflamatuvar doku hasarında rol oynadığı, yine bu grup hastalarda süperoksit radikal üretiminin arttığı, tedavileri amacıyla kullanılan Kolşisin ve steroid grubu ilaçların ise süperoksit radikali ve lizozomal enzimlerin üretimini baskıladıkları saptanmıştır (75). İnaktif Behçet'li hastalarda süperoksit radikal üretiminin orta derecede yükselmiş olduğu bildirilmiştir (75).

Çalışmamızda aktif Behçet'li 35, inaktif devrede 36 hastada ve 123 kontrolde plazma SOD aktiviteleri tayin edildi. Aktif hastaların plazma SOD aktiviteleri kontrol grubu ve inaktif hasta grubuna göre yüksek bulundu ($p < 0,001$). İnaktif hasta grubunda SOD aktivite değerleri kontrol grubu ile farklılık göstermedi.

Aktif Behçet'li hasta grubunun eritrosit SOD değerleri kontrol grubuna göre hafif ($p < 0,05$), inaktif hasta grubuna göre daha belirgin olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$). İnaktif hasta grubunun eritrosit SOD değerleri, kontrol grubundan düşüktü ($p < 0,01$). Eritrositlerin çevresindeki uyarılmış nötrofillerden salınan süperoksit radikalinin ortadan kaldırılmasında, SOD 'ın önemli düzenleyici rolünün olduğu, daha reaktif oksijen bileşiklerinden $HOCl$ ve $OH\cdot$ oluşumuna engel olabileceği ileri sürülmektedir (102,105).

Lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivite değerlerini, aktif Behçet'li olgularda kontrol grubu ve inaktif olgulara göre anlamlı derecede düşük düzeylerde saptadık. İnaktif olguların lökosit B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri ile kontrol grubu arasında bir farklılık gözlenmedi.

Aktif ve inaktif Behçet'li hastaların lökosit SOD aktivite değerlerinin B ve T lenfosit SOD aktivite değerleri ile büyük ölçüde paralellik gösterdiği saptanmıştır. B ve T lenfositlerde SOD aktivitesinin tayini ile ilgili 1979 yılında Kobayashi et all. (48) 'nin 6 normal kişinin lökositlerinden T lenfositleri E - Rozet tekniği ile ayırdığı bir çalışma dışında başka bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu çalışmada T lenfositlerdeki SOD aktivitesinin non - T lenfositlere göre 1,8 katı yüksek olduğu, granülositlerdeki SOD aktivitesinin ise T lenfositlerine kıyasla 1 / 7 oranında düşük olduğu bildirilmiştir (48). T lenfositlerin ömürleri B lenfositlerden daha uzundur (108) . Bizim çalışmamızda normal grup T lenfosit SOD aktivite değerleri B lenfosit SOD aktivite değerlerine kıyasla 1,2 misli yüksek bulunmuştur. B ve T lenfositlerin ayrılmasında kullandığımız immünomanyetik ayırma tekniğinde kontamine hücre oranı % 1 'den azdır. Kobayashi et all. (48) 'ün çalışmalarında hücre kontaminasyon oranları T lenfositler için % 0 - 8,1 , non T lenfositler için % 0 - 12,9 olarak bildirilmiştir. Bu kontaminasyon oranı bizim çalışmamıza göre oldukça yüksektir. Bununla beraber kontrol grubumuzdaki bulgular bu çalışma ile uygunluk göstermektedir.

Aktif Behçet'li hasta grubunda lökosit, B ve T lenfosit SOD aktivitelerinde tesbit ettiğimiz anlamlı düşüklük, bu hastalarda serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının artmasına sebep olabilir. Aktif evredeki hastaların plazma SOD aktivitelerinde tesbit ettiğimiz yükseklik ise, daha çok hücreselel harabiyetin bir sonucu olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde Behçet hastalığında SOD aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu bakımdan burada da sonuçlarımızı karşılaştırma imkanımız olmadı. Ancak elde ettiğimiz bulgular, hastalığın aktivitesi ile SOD enzim aktivitesindeki değişmeler arasında bir ilişkinin olduğu kanısını uyandırdı.

Bu sonuçlara dayanarak plazma, eritrosit , lökosit, B ve T lenfositlerde yapılacak SOD enzim aktivite tayinlerinin Behçet hastalığında aktivite kriteri olarak yararlı olabileceğini düşünüyoruz.

6. Ö Z E T

Çalışmamızda Behçet, sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA) ve kronik böbrek yetmezlikli (KBY) hastalar ve kontrol grubunun plazma, eritrosit ve lökositlerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayin edildi. Kontrol grubu ve Behçetli hasta grubunda ayrıca B ve T lenfosit SOD aktiviteleri de incelendi. Behçet, SLE ve RA 'li hastalar klinik olarak aktif ve inaktif olgulardan oluşuyordu.

Behçet'li hasta ve kontrol grubunda B ve T lenfositlerin ayrılması immünomanyetik yöntemle yapıldı. Bu yöntemle ayrılan hücrelerdeki kontaminasyon % 1 'den azdı.

Aktif Behçet'li hasta grubunun plazma ve eritrosit SOD aktivite değerlerinin, kontrol grubu ve inaktif Behçet'li hasta gruba göre yüksek olduğu bulundu. Aynı hastalarda lökositler, B ve T lenfositlerdeki SOD aktivitelerinde ise, kontrol grubu ve inaktif hasta grubuna göre önemli bir düşme tesbit edildi. İnaktif Behçet'li gruptaki SOD değerlerinde ise kontrol grubuna göre bir fark görülmedi. Bu bulgular Behçet hastalığında plazma, eritrosit, lökosit, B ve T lenfositlerde SOD enzim aktivitesindeki değişmelerin, aktif ve inaktif olguların ayrılmasında bir tanı kriteri olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

SLE 'li aktif hasta grubunda plazma SOD değerleri, inaktif grup ve kontrol grubuna göre yüksek, lökosit SOD değerleri ise düşüktü. Plazma SOD aktivite değerlerinin hastalığın aktivasyonu ile paralellik gösterdiği tesbit edildi.

RA 'li hastalarda hem aktif hem de inaktif grubun plazma ve eritrosit SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre yüksek, lökosit SOD değerleri ise düşüktü. Aktif ve inaktif gruplardaki plazma, eritrosit ve lökosit SOD değerleri de farklılık gösteriyordu ve bu değişmeler hastalığın aktivasyonu ile paraleldi.

SLE ve RA'li hastalarda elde edilen bu bulgular SOD aktivite tayinlerinin bu hastalıkların hem teşhisi ve hem de aktif ve inaktif vakaların ayrılmasında faydalı olabileceğini göstermektedir.

KBY 'li hastalarda plazma ve eritrosit SOD aktivite değerleri kontrol grubuna göre yüksekti . Lökosit SOD değerleri ise kontrol grubuna göre bir fark göstermedi.



S U M M A R Y

Superoxide Dismutase (SOD) Activities of Plasma, Erythrocytes Leucocytes, B and T Lymphocytes in the Patients with Behçet's Syndrome, Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Chronic Renal Failure

In this study, SOD activities were determined in plasma, erythrocytes and leucocytes from the patients with Behçet's syndrome (BS), systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA) and chronic renal failure (CRF) and, from normal subjects. In addition, SOD activities in B and T lymphocytes of the patients with BS and of the control subjects were investigated. The patients with BS, SLE and RA consisted of clinically active and inactive groups.

Separations of B and T lymphocytes of the patients with BS and of the control subjects were carried out by immunomagnetic method. Contamination by this method was less than 1 % .

It has been found that plasma and erythrocytes SOD activities of the patients with active BS were higher compared to the values of the patients with inactive BS and of the control subjects. In the same patient group, SOD activities of the leucocytes, and B and T lymphocytes were found to be lower than those of the inactive patient and control groups. However there were no differences found between SOD activities of inactive BS group and control one. This findings indicate that changes in the SOD activities of plasma, erythrocytes and B and T lymphocytes can be used in the differantation of the inactive and active BS.

In the active SLE group, plasma SOD values were higher than those of both inactive patient and control groups. Leucocyte SOD activities of these groups however were lower the SOD values of patient and control group. We established a parellelism between plasma SOD levels and activities of the disease.

In the patients with RA, plasma and erythrocyte SOD activities of both active and inactive groups were higher than these of the control group, but leucocyte SOD activities were lower than controls. Furthermore, SOD values of erythrocytes and leucocytes of active and inactive groups were also different and the activities exhibited parellelism with the activation degree of the disease.

Those findings obtained in the patients with SLE and RA suggest that determination of SOD activity may give rise useful results for both clinical diagnosis and identification of the active and inactive subjects.

Plasma and erythrocyte SOD values of the patients with CRF were higher than these of the control subjects. Regarding of leucocyte SOD activities however, no meaningful difference was observed between patients and control subjects.

8. K A Y N A K L A R

- 1 - ADACHI, T., MARKLUND, S.L. : Interaction between Human Extracellular Superoxide Dismutase C and Sulfated Polysaccharides. J. Biol. Chem. 264:8537-8541, 1989.
- 2 - ARAI, K., IIZUKA, S., MAKITA, K., OIKAWA, K., and TANIGUCHI, N., : Purification of Cu, Zn - SOD from Human Erythrocytes by Immunoaffinity Chromatography Evidence for the Presence of Isoelectric Heterogeneity. J. Immunol. Methods. 91:139-143, 1986.
- 3 - ASANO, M.M., ITO, K., IKEDA, H., SEKIGUCHI, S., : Purification of Copper - Zinc - Superoxide Dismutase and Catalase from Human Erythrocytes by Copper - Chelate Affinity Chromatography. J. Chromatog. 370:501-507, 1986.
- 4 - BABIOR, M.B., KIPNES, S.R., CURNUTTE, J.T. : Biological Defence Mechanism: The Production by Leukocytes of Superoxide, A potential Bactericidal Agent. J. Clin. Invest. 52:741-744, 1973
- 5 - BANFORD, J.C., BROWN, D.H., HAZELTON, R.A., McNEIL, C.J., STURROCK, R.D., SMITH, W.E. : Serum Copper and Erythrocyte Superoxide Dismutase in Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 41:458-462, 1982.
- 6 - BEAUCHAMP, C., FRIDOWICH, I.: Superoxide Dismutase : Improved Assay and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Anal. Biochem. 44:276-287, 1971.
- 7 - BECKMAN, G., LUNDGREN, E., TARNVIK, A. : Superoxide Dismutase Isozymes in Different Human Tissues, Their Genetic Control and Intracellular Localization. Hum. Hered. 23:338-345, 1973.

- 8 - BILIADERIS, C.G., WESELAKE, J.R., PETKAU, A., FRIESEN, A.D. :
A calorimetric Study of Human CuZn Superoxide Dismutase. *Biochem. J.*
248:981-984, 1987.
- 9 - BOYUM, A. : Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supp.) : 77, 1968.
- 10 - BRADFORD, M.M. : A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation
of Protein Utilising the Principle of Protein - Dye Binding.
Anal. Biochem. 72:248-254, 1976.
- 11 - CANAVASE, C., STRATTA, P., VERCELLENO, A : The Case of Oxygen Free
Radical in the Pathogenesis of Ischemic Acute Renal Failure.
Nefron. 49:9-15, 1988.
- 12 - CARRARO, C., PATHOK, M.A. : Characterization of Superoxide Dismu-
tase from Mammalian Skin Epidermis. *J. Invest.Dermatol.* 90:31-36,
1988.
- 13 - CENCETTI, A., DE MARINO, M., GRAZIANI, E., : Superoxide Anion
Production by Circulating Polymorphonuclear Leucocytes in Rheuma-
toid Arthritis. *Clin. Rheumatol.* 9:51-55, 1990.
- 14 - COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. : Oxygen Radicals in Biological System
In : *Methods in Enzymology.* New York, Academic Press, Vol : 105, pp.
3-35, 88-92, 93-104, 457-462, 1984.
- 15 - CONCETTI, A., MASSEI, P., ROTILIO, G., BRUNORI, M., RACHMULEWITZ,
E.A. : Superoxide Dismutase in Red Blood Cells : Methods of Assay
and Enzyme Content in Normal Subjects in Patients with β - Thalas-
semia (Major and Intermedia). *J. Lab. Clin. Med.* 87:1057-1064,
1976.
- 16 - CORBISIER, P., HOUBION, A., REMACLE, J. : A New Tecnique for Higly
Sensitive Detection of Superoxide Dismutase Activity by Chemilu-
minescence . *Anal. Biochem.* 164:240-247, 1987.

- 17 - CROSS, E.C., HALLIWELL, B., BORISH, E.T., PRYOR, W.A., AMES, B.N., SAUL, R.L., McCORD, J.M., HARMAN, D. : Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann. Inter. Med.* 107:526-545, 1987.
- 18 - DE CHATELET, L.R., McCALL, C.E., McPHAIL, L.C., JOHNSTON JR, R.B., Superoxide Dismutase Activity in Leukocytes. *J. Clin. Invest.* 53:1197-1201, 1974.
- 19 - DEMITRAS, G.C., RUSS, C.R., SALMON, J.F., WEBER, J.H., WEISS, G.S. Inorganic Chemistry. Engle Wood Cliff N.J. Prentice Hall Inc. pp. 425-459, 1972.
- 20 - DOĞAN, P., SOYUER, Ü., TANRIKULU, G. : Superoxide Dismutase and Myeloperoxidase in Polymorphonuclear Leukocytes, and Serum Ceruloplasmin and Copper Levels, in Psoriasis. *Brit. J. Dermatol.* 120: 239-244, 1989.
- 21 - EMERIT, J., JENY, C., EMERIT, I., HOANG, P.L., CAEN, O.L., PELLETIER, S., MOLLET, M., CONGY, F. : Preliminary Result of Superoxide Dismutase Treatment on Seven Patients with Behçet's Syndrome. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 302:243-246, 1986.
- 22 - EMERIT, I., LEAVY, A., CAMUS, J.P.,: Monocyte - Derived Clastogenic Factor in Rheumatoid Arthritis. *Free. Radic. Biol. Med.* 6:245-250, 1989.
- 23 - FARBER, L.J., KYLE, E.M., COLEMAN, J.B. : Biology of Disease : Mechanism of Cell Injury by Activated Oxygen Species. *Lab. Invest.* 62:670-679, 1990.
- 24 - FEE, A.J., BULL, C. : Steady - State Kinetic Studies of Superoxide Dismutases. *J. Biol. Chem.* 261:13000-13005, 1986.
- 25 - FRIDOVIC, I. : Superoxide Dismutases. *Adv. Enzymol.* 58:61-97, 1986.

- 26 - GAROTTA, G., NERI, T.M. : HLA - DR Typing by Complement Dependent B Lymphocyte Lysis. *Immunol. Methods.* 2:163-185, 1981.
- 27 - GARTNER, A., HARTMAN, H.J., WESER, U. : A Simple and Efficient Isolation of Erythrocyte Cu_2Zn_2 - Superoxide Dismutase. *Biochem.J.* 221:549-551, 1984.
- 28 - GAUDERNACK, G., LEIVESTAD, T., UGELSTAD, J., THORSBY, E., : Isolation of Pure Functionally Active CD8+ T Cells. Positive Selection with Monoclonal Antibodies Directly Conjugated to Monosized Magnetic Microspheres. *J. Immunol. Methods.* 90:179-187, 1986.
- 29 - GIVEN, W., EDELSON, H., KAPLAN, H., FREED, R., ABRAMSON, S. : Neutrophil Aggregation in SLE : Evidence for a New , Low - Molecular - Weight Factor. *Arthritis. Rheum.* 26:s12, 1983.
- 30 - GELLER, B.L., WINGE, D.R. : A Method for Distinguishing Cu, Zn and Mn - Containing Superoxide Dismutases. *Anal. Biochem.* 128:86-92, 1983.
- 31 - GOLDSTEIN, I.M., CERQUEIRA, M., LIND, S., KAPLAN, H.B. : Evidence that the Superoxide - Generating System of Human Leucocytes Is Associated with the Cell Surface. *J. Clin. Invest.* 59:249-254, 1977.
- 32 - GONZALES, R., AUCLAIR, C., EMMANUELLE, V., GAUTERO, H., DHERMY, D., BOIVIN, P. : Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathion Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignan Diseases. *Cancer. Res.* 44:4137-4139, 1984.
- 33 - GÖKHUN, İ.H. : Klinik Biyokimyada Analitik Kalite Kontrolü. Ankara, TSE yayınları No : 2, s.3-17, 1989

- 34 - HALLEWELL, R.A., LARIA, I., TABRIZI, A., CARLIN, G., GETZOFF, E.D., TAINER, J.A., COUSENS, L.S., MULLENBACK, G.T. : Genetically Engineered Polymers of Human Superoxide Dismutase Biochemistry and Serum Half - Lives. J. Biol. Chem. 264:5260-5268, 1989.
- 35 - HALLIWELL, B. : Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage, and Antioxidant Therapy. Lancet. i:1396, 1984.
- 36 - ISHIKAWA, T., HUNAITI, A.R., PIECHOT, G., WOLF, B., : Isolation and Characterization of Basic Superoxide Dismutase Consisting of Mr - 2500 Subunit in Rat Liver. Eur. J. Biochem. 170:317-323, 1987.
- 37 - JANSSON, L.T., PERKKIO, M., WILLIS, W.T., REFINO, C.J., DALMANN, P. T. : Red Cell Superoxide Dismutase Is Increased in Iron Deficiency Anemia. Acta. Haemat. 74:218-221, 1985.
- 38 - JOENJE, H., FRANTS, R.R., ARWERT, F., DE BRUIN, G.J.M., KOSTENSE, P.J., VAN DE KAMP, J.J., DE KONING, J., ERIKSSON, A.W. : Eritrocyte Superoxide Dismutase Deficiency in Fanconi's Anemia Established by Two Independent Methods of Assay. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 39:759-764, 1979.
- 39 - JONSTON, R.B., KEELE, B.B., MISRA, H.P., LEHMEYER, J.E., WEBB, L.S., BAEHNER, R.L., RAJAKOPOLAN, K.V. : The Role of Superoxide Anion Generation in Phagocytic Bactericidal Activity : Studies with normal and Chronic Granulomatous Disease Leukocytes. J. Clin. Invest. 55:1357-1372, 1975.
- 40 - KAJIHARA, J., ENOMOTO, M., SEYA, K., SUKENAGA, Y., KATOH, K., : Physicochemical Properties of Charge Isomers of Recombinant Human Superoxide Dismutase. J. Biochem. 104:638-642, 1988.
- 41 - KARLSON, K., MARKLUND, S.L. : Heparin - Induced Release of Extracellular Superoxide Dismutase to Human Blood Plasma. Biochem. J. 242:55-59, 1987.

- 42 - KELLEY, N.W., HARRIS, E.D., RUDDY, S., SLEDGE, C.B. : Textbook of Rheumatology. 3 th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co. pp. 943-945, 1132-1133, 1319-1320, 1989.
- 43 - KESTENBAUM, R.S., CARUSO, C., BERLYNE, G.M. : Reduced Superoxide Dismutase Activity in Erythrocyte of Dialysis Patients : A Possible Factor in the Etiology of Uremic Anemia. Nephron. 55:251-253, 1990.
- 44 - KIRBY, T.W., FRIDOWICH, I. : A Picomolar Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase. Anal. Biochem. 127:435-440, 1982.
- 45 - KLEBANOFF, S.J. : Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes. Ann. Inter. Med. 93:480-489, 1980.
- 46 - KOBAYASHI, Y., ISHIGAME, K., ISHIGAME, Y., USUI, T. : Superoxide Dismutase Activity of Human Granulocytes and Lymphocytes. Lancet. i:865-866, 1977.
- 47 - KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., TANABE, K., USUI, T. : Use of Logit Paper in Determination of Superoxide Dismutase Activity in Human Blood Cells. J. Immunol. Methods. 24:75-78, 1978
- 48 - KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., SAKANO, T., TANABE, K., USUI, T., : Superoxide Dismutase Activity of T Lymphocytes and Non - T Lymphocytes. FEBS Lett. 98:391-393, 1979.
- 49 - KÖKOĞLU, E., AKTUĞLU, G., BELCE, A. : Leucocyte Superoxide Dismutase Levels in Acute and Chronic Leukemias. Leuc. Res. 13:457-488, 1989.
- 50 - KUTHAN, H., ULLRICH, V. : A Quantitative Test for Superoxide Radicals Produced in Biological System. Biochem. J. 203:551-558, 1982.

- 51 - KUTHAN, H., HALLISMAN, H.J., WERRINGLOER, J. : A Spectrophometric Assay for Superoxide Dismutase Activities in Crude Tissue Fractions *Biochem. J.* 237:175-180, 1986.
- 52 - KVALHEIM, G., FODSTAD, O., PHIL, A., NUSTAD, K., PHARO, A., UGELSTAD, J., FUNDERUT, S. : Elimination of B Lymphoma Cells from Human Bone Marrow. Model Experiments Using Monodisperse Magnetic Particles Coated with Primary Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* 47:846-851, 1987.
- 53 - LEIVESTAD, T., GAUDERNACK, G., UGELSTAD, J., THORSBY, E. : Positive Selection of Activated T Cells of the T8 (CD8) Sub-Type by Immunomagnetic Separation. *Tissue Antigens.* 28:41-45, 1986.
- 54 - LEWIS, J.G., ADAMS, D.O. : Inflammation, Oxidative DNA damage, and Carcinogenesis. *Environ. Health. Persp.* 76:19-27, 1987.
- 55 - LUNEC, J. : Free Radicals : Their Involvement in Disease Processes. *Anal. Clin. Biochem.* 27:173-182, 1990.
- 56 - MALY, E.F., NAKAMURA, M., GAUCHAT, J.F., UNWYLER, A., WALKER, C., DAHINDEN, C.A., CROSS, A.R., JONES, O.T.G., DE WECK, A.L. : Superoxide - Dependent Nitroblue Tetrazolium Reduction and Expression of Cytochrome b-245 Components by Human Tonsillar B Lymphocytes and B Cell Lines. *J. Immunol.* 142:1260-1267, 1989.
- 57 - MARKLUND, S.L. : Spectrophotometric Study of Spontaneous Disproportionation of Superoxide Anion Radical and Sensitive Direct Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 251: 7504-7507, 1976.
- 58 - MARKLUND, S.L. : Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissue and Human Cell Lines. *J. Clin. Invest.* 74:1398-1403, 1984.
- 59 - MARKLUND, S.L., BJELLE, A., ELMQVIST, L.G. : Superoxide Dismutase Isoenzymes of the Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis and in Reactive Arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 45:847-851, 1986.

- 60 - MARKLUND, S.L., HEISKALA, H., WESTERMARCK, T., SANTAVUORI, P. : Superoxide Dismutase Isoenzymes in Cerebrospinal Fluid and Plasma from Patients with Neuronal Ceroid - lipofuscinoses. Clin. Sci. 71:57-60, 1986.
- 61 - MARKLUND, S.L., REPO, H., KOSKIMIES, S. : Superoxide Dismutase Isoenzymes, Glutathione Peroxidase and Selenium in Blood from HLA - B₂₇ Positive and Negative Subjects. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. 95:107-111, 1987.
- 62 - MASLEN, C., STEVENS, T.R.J., HALL, N.D. : The Generation of Lipid Peroxides by Stimulated Human Neutrophils. J. Immunol. Methods. 98:71-76, 1987.
- 63 - MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. : Superoxide Dismutase : An Enzymic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein). J.Biol.Chem. 224:6049-6055, 1969.
- 64 - MERRY, P., WINYARD, P.G., MORRIS, C.J., GROOTVELD, M., BLAKI, D.R.: Oxygen Free Radicals, Inflammation, and Synovitis : The Current Status. Ann. Rheum. Dis. 48:864-870, 1989.
- 65 - MISKELL, B.B., SHIIGI, S.M. : Selected Methods in Cellular Immunology. New York, W. H. Freeman and Co. pp. 20-22, 1980.
- 66 - MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. : The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and A Simple Assay for Superoxide Dismutase. J. Biol. Chem. 217:3170-3175, 1972.
- 67 - MIZUSHIMA, Y. : Recent Research into Behcet's Disease in Japan. Int. J. Tiss. React. 2:59-65, 1988.
- 68 - NAQUI, A., CHANGE, B. : Reactive Oxygen Intermediates in Biochemistry. Ann. Rev. Biochem. 55:137-166, 1986.

- 69 - NATVIG, J.B. : Different Lymphocyte Population in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 37:416-420, 1978.
- 70 - NELSON, H.D., WENHOLD, A.R. : Inhibition of Leukocyte Superoxide Anion Production by Cortisol Administration to Normal Subject. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46:702-705, 1978
- 71 - NILSSON, S., MARKLUND, S.L. : Effect of Venous Stasis and Physical Exercises on Plasma Extracellular - Superoxide Dismutase. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 48:441-444, 1988.
- 72 - NISHIDA, Y., TANIMOTO, K., AKAOKA, I. : Effect of free Radicals on Lymphocyte Response to Mitogens and Rosette Formation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 19:319-324, 1981.
- 73 - NISHIKIMI, M., RAO, N.A., YAGI, K. : The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:849-854, 1972.
- 74 - NISIMOTO, Y., TAMURA, M., LAMBETH, J.D. : A Menadion - Stimulated Pyridine Nucleotide Oxidase from Resting Bovine Neutrophil Membrane Purification Properties and Immunochemical Cross Reactivity with the Human Neutrophil NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* 263:11657-11663, 1988.
- 75 - NIWA, Y., MIYAKE, S., SAKANE, T., SHINGU, M., YOKOHOMA, M. : Auto-Oxidative Damage in Behçet's Disease - Endothelial Cell Damage Following the Elevated Oxygen Radicals Generated by Stimulated Neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 49:247-255, 1982.
- 76 - NIWA, Y., SAKANE, T., SHINGU, M., MIYACHI, Y. : Role of Stimulated Neutrophils from Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Tissue Injury, with Special Reference to Serum Factors and Increased Active Oxygen Generated by Neutrophils. *Inflammation.* 9:163-172, 1985.

- 77 - NIWA, Y. : Lipid Peroxides and Superoxide Dismutase Induction in Skin Inflammatory Diseases, and Treatment With SOD Preparation. *Dermatologica*. 179:101-106, 1989.
- 78 - OKA, S., OGINO, K., MATSUURA, S., YOSHIMURA, S., YAMAMATO, K., OKAZAKI, Y., TAKAMOTO, T., KATO, N., UDA, T. : Human Serum Immuno-Reactive Copper, Zinc - Superoxide Dismutase Assayed with an Enzyme Monoclonal Immunosorbent in Patients with Digestive Cancer. *Clinica. Chimica. Acta*. 182:209-220 , 1989.
- 79 - OYANAGUI, Y. : Reevaluation of Assay Methods and Establishment of Kit for Superoxide Dismutase Activity. *Anal. Biochem*. 142:290-296, 1984.
- 80 - ÖHMANT, M., MARKLUND, S.L. : Plasma Extracellular Superoxide Dismutase and Erythrocyte Cu, Zn - Containing Superoxide Dismutase in Alcoholics Treated with Disulfiram. *Clin. Sci*. 70:365-369, 1986.
- 81 - PAOLETTI, F., ALDINUCCI, D., MOCALL, A., CAPPARINI, A. : A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extract. *Anal. Biochem*. 154:536-541, 1986.
- 82 - PASQUIER, C., MACH, P.S., RAICHVARS, D., SARFATI, G., AMOR, B., DELBARRE, F. : Manganese Containing Superoxide Dismutase in Polymorphonuclear Leukocytes of Adults with Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 8:27-32, 1984.
- 83 - PATTY, B.P., GRAEFF, R.W., MATHES, S.J., HUNT, T.K. : Superoxide Production by Wound Neutrophils. *Arch. Surg*. 125:65-69, 1990.
- 84 - PETKAU, A. : Scientific Basis for the Clinical Use of Superoxide Dismutase. *Cancer Treatment Reviews*. 13:17-44, 1986.
- 85 - PETKAU, A. : Role of Superoxide Dismutase in Modification of Radiation Injury. *Br. J. Cancer*. 55:87-95, 1987

- 86 - PULLAR, T., ZOMA, A., CAPPEL, H.A., KHAN, M.F., BROWN, D.H., SMITH, W.E. : Alteration of Thiol and Superoxide Dismutase Status in Rheumatoid Arthritis Treated with Sulphasalazine. *Brit. J. Rheum.* 26:202-206, 1987.
- 87 - RISTER, M., BAURMEISTER, K., GRAVERT, U., GLADKE, E. : Superoxide Dismutase Deficiency in Rheumatoid Arthritis. *Lancet.* 1:1094, 1978.
- 88 - RISTER, M., BAURMEISTER, K. : Superoxid - Dismutase und Superoxid-Radikal - Freisetzung bei Juveniler Rheumatoider Arthritis. *Klin. Wochenschr.* 60:561-565, 1982.
- 89 - ROBERTS, N.A., ROBINSON, P.A. : Copper Chelates of Antirheumatic and Anti - Inflammatory Agent : Their Superoxide Dismutase - Like Activity and Stability. *Brit. J. Rheum.* 24:128-136, 1985.
- 90 - ROTH, E.F., GILBERT, H.S. : The Pyrogallol Assay for Superoxide Dismutase : Absence of a Glutathione Artifact. *Anal. Biochem.* 137: 50-53, 1984.
- 91 - SALIN, M.L., McCORD, J.M. : Superoxide Dismutases in Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Clin. Invest.* 54:1005-1009, 1974.
- 92 - SCHMIDMANN, S., BAEHR, R.V., PRECHT, K. : Free Radicals Induce Increased Lysis of Red Blood Cells After Hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 5:600-603, 1990.
- 93 - SCHWAIGER, H., WEIRICH, H.G., BRUNER, P., RASS, C., KAUFFMANN, M.H., GIONER, Y., SCHWAIGER, M. : Radiation Sensitivity of Down's Syndrome Fibroblast might be due to Overexpressed Cu / Zn - Superoxide Dismutase. *Eur. J. Cell. Biol.* 48:79-87, 1989.
- 94 - SHIH HO, Y., CRAPO, J.D. : Isolation and characterization of Complementary DNA's Encoding Human Manganese Containing Superoxide Dismutase . *FEBBS lett.* 229:256-260, 1988

- 95 - SHINGU, M., ORIBE, M., TODOROKI, T., TATSUKAWA, K., TOMO-OHA, K., YASUDA, M., NOBUNAGA, M.: Serum Factors from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Enhancing Superoxide Generation by Normal Neutrophils. *J. Invest. Dermatol.* 81:212-215, 1983.
- 96 - SHINGU, M., TODOROKI, T., NOBUNAGA, M. : Generation of Superoxide by Immunologically Stimulated Normal Human Neutrophils and Possible Modulation by Intracellular SOD and Rheumatoid Factors. *Inflammation* 11:143-151, 1987.
- 97 - SLATER, T.F. : Free Radicals and Tissue Injury : Fact and Fiction. *Br. J. Cancer.* 55:5-10, 1987.
- 98 - SUN, Y., OBERLAY, L.W., LI, Y. : A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* 34:497-500, 1988.
- 99 - TRZNADEL, K., PAWLICHI, L., KEDZIORA, J., LUCIAK, M., BASZCZYK, J., BUCZYNSKI, A. : Superoxide Anion Generation, Erythrocytes Superoxide Dismutase Activity, and Lipid Peroxidation During Hemoperfusion and Hemodialysis in Chronic Uremic Patients. *Free. Radic. Biol. Med.* 6:393-397, 1989.
- 100- UMEKI, S., SUMI, M., NIKI, Y., SCEJIMA, R. : Concentration of Superoxide Dismutase and Superoxide Anion in Blood of Patients with Respiratory Infections and Compromised Immun System. *Clin Chem.* 33:2230-2233, 1987.
- 101- WEISIGER, R., FRIDOVICH, I. : Superoxide Dismutase Organelle Specificity. *J. Biol. Chem.* 248:3582-3592, 1973.
- 102- WEISS, S.J. : Oxygen , Ischemia and Inflammation. *Acta Physiol. Scand.* 548:0-37, 1986.
- 103- WESELAKE, R.J., CHESNEY, S.L., PETKAU, A., FRIESEN, A.D. : Purification of Human Copper, Zinc - Superoxide Dismutase by Copper Chelate Affinity Chromatography *Anal. Biol. Chem.* 155:193-197, 1986.

- 104- WINTERBOURN, C.C., HAWKINS, R.E., BRIAN, M., CARELL, R.W. : The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity. *J. Lab. Clin. Med.* 85:337-341, 1975.
- 105- WINTERBOURN, C.C., STERN, A. : Human Red Cell Extracellular Hydrogen Peroxide and Inhibit Formation of Hypochlorous Acid and Hydroxyl Radical. *J. Clin. Invest.* 80:1486-1491, 1987.
- 106- YAMADA, M., SHICHI, H., YUASA, T., TANOUCI, Y., MIMURA, Y. : Superoxide in Ocular Inflammation : Human and Experimental Uveytis. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 2:111-117, 1986.
- 107- YASUYAMA, T., INOME, K., KOJIYAMA, T., SASAKI, H. : Activities, Electrophoretic Profiles and Immunolocalization of Superoxide Dismutase in Human Liver Specimens. *Jpn. J. Med.* 27:34-41, 1988.
- 108- YOUSSEFF, A.A.R., BARON, D.N. : Leucocyte Superoxide Dismutase in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 42:558-562, 1983.

T E Ő E K K Ő R

Tez çalıřmamdaki deęerli katkıları, eęitimim sűresince yakın desteęini gűrdűęűm danıřmanım ve Biyokimya Anabilim Dalı Bařkanı Sayın Prof.Dr. Zűhal YURTARSLANI 'na, Biyokimya Anabilim Dalı űęretim űyeleri Sayın Prof.Dr. İsmail Hakkı GűKHUN 'a ve Sayın Yrd.Doç.Dr.Sumru TAŐMAN'a bu çalıřma için bana imkan saęlayan, yakın desteęini esirgemeyen Dahili Tıp ve İmműnoloji Bilim Dalı Bařkanı Sayın Prof.Dr. Gűner TOKGűZ 'e ve İmműnoloji Bilim Dalı űęretim űyesi Sayın Prof.Dr. Nurřen DűZGűN 'e teőekkűrű bir borç bilirim.