

30364

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARIN ERİTROSİT
VE PLAZMALARINDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE
KATALAZ AKTİVİTELERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nuran İŞÇİ
Biyokimya Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ömer AKYOL

MALATYA
1997

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN :

ÜYE :

ÜYE :

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

/ / 1997
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Eđitim sřremiz boyunca bizden bilimsel desteklerini esirgemeyen ve yođun çalıőmaları arasında tezimin danıőmanlık gřrevini űstlenen Sayın Doç. Dr. Őmer AKYOL'a, desteđini gřrdřđđm Yrd. Doç. Dr. Yusuf TÜRŐŐZ'e ve diđer űđretim űyelerine, manevi desteđinden dolayı aileme ve bu tezin yazımında yardımını esirgemeyen Hacer ERDOĐAN'a teőekkřr ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller	2
2.1.1. Tanımı ve Özellikleri	2
2.1.2. Moleküler Oksijen	3
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri	3
2.2.1. Süperoksit Radikali	4
2.2.2. Hidroksil Radikali	7
2.2.3. Hidrojen Peroksit	8
2.2.4. Tekil (Singlet) Oksijen	9
2.3. Hücrede Serbest Radikallerin Oluşumu	10
2.4. Serbest Radikallerin Canlı Organizmalarda Sebebi Olduğu Reaksiyonlar	10
2.4.1. Serbest Radikallerin Sebebi Olduğu DNA Hasarı	11
2.4.2. Serbest Radikallerin Sebebi Olduğu Aminoasit ve Protein Hasarı	11
2.4.3. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri	11
2.4.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	13
2.5. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Oluşturulan Hücresel Savunma Mekanizmaları	13
2.5.1. Serbest Radikallerden Koruyucu Enzimler	17
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	17
2.5.1.2. Katalaz (CAT)	18
2.6. Romatoid Artrit	19
2.7. Romatoid Artritte Serbest Radikallerin Rolü	20

3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu	21
3.2. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar	21
3.3. Yapılan İşlemler	22
3.3.1. Kan Numunelerinin Hazırlanması	22
3.3.2. Hemoglobin Tayini	22
3.3.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini	22
3.3.4. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini	25
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. ÖZET	41
7. SUMMARY	42
8. KAYNAKLAR	43

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: Elektron transpor sistemi	6
Şekil 2: Haber-Weiss Zinciri	8
Şekil 3: Oksijen metabolizmasında H ₂ O ₂ 'nin rolü	9
Şekil 4: Moleküler ve tekil oksijenin son orbitalindeki elektron dağılımı	10
Şekil 5: Hidrojen peroksidin yıkılımında katalazın rolü	18
Şekil 6: Kontrol ve hasta gruplarının eritrositlerindeki SOD aktiviteleri	32
Şekil 7: Kontrol ve hasta gruplarının eritrositlerindeki CAT aktiviteleri	33
Şekil 8: Kontrol ve hasta gruplarının plazma SOD aktiviteleri	33

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Endojen kaynaklı antioksidanlar	15
Tablo 2: Eksojen kaynaklı antioksidanlar	16
Tablo 3: Tedavi alan RA'li hastaların eritrosit ve plazmalarında tespit edilen süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri	29
Tablo 4: Tedavi almayan RA'li hastaların eritrosit ve plazmalarında tespit edilen süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri	30
Tablo 5: Kontrol grubu şahısların eritrosit ve plazmalarında tesbit edilen SOD ve katalaz aktiviteleri	31
Tablo 6: Kontrol grubu ve hasta gruplarında eritrosit ve plazma SOD ve katalaz aktiviteleri	32
Tablo 7: Kontrol ve tedavi alan RA'li ve tedavi almayan RA'li hastaların SOD (eritrosit ve plazma) ve CAT (eritrosit) aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları	34

1. GİRİŞ

Vücutta fizyolojik şartlarda serbest radikaller belli bir oranda üretilmekte fakat hücreler arası sıvı ve dolaşım sistemi kendi yapıları içinde yer alan radikal yok edici sistemleriyle bu radikalleri enzimatik veya nonenzimatik yollarla yok etmektedirler. Dolayısıyla bu metabolizma kontrol altındadır, üretim ve tüketim denge altında tutulmaktadır. Üretimde bir artma veya üretilmiş radikallerin yok edilmesinde bir azalma olduğunda toksik etkileri ortaya çıkmaktadır.

Hücrede aktive olmuş oksijen formlarının, aşırı yapım veya tüketimindeki yetersizlik nedeniyle artması, moleküler yapının şiddetli bir şekilde hasara uğramasına yol açabilmektedir. Bunun sonucu olarak mutasyonlar, yapısal anormallikler ve sonunda hücresel hasar meydana gelebilmektedir.

Hücrelerin en önemli savunma mekanizmaları; serbest radikalleri yok edici enzimler, glutatyon, C vitamini, tokoferoller, karoten, vs gibi bazı redükleyici maddelerdir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) serbest radikalleri yok eden primer enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivitesi, bir yönüyle hücrelerin serbest radikallerden etkileniş derecesini gösterir.

Son yıllarda, esasen bir konnektif doku hastalığı ve oto-immun hastalık olarak tanımlanan romatoid artrit patogeneğinde, respiratuvar patlama yoluyla lökositlerden salınan serbest oksijen radikallerinin önemli bir rolü olabileceği savunulmaktadır. Buna ait bazı deliller vardır. Örneğin bu hastalarda, invivo serbest radikal üretim yerlerinden biri olan prostaglandin sentezindeki siklooksijenaz yolu, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ile inhibe edilince tam olmasa da, geçici ve kısmi palyatif bir tedavi sözkonusu olmaktadır.

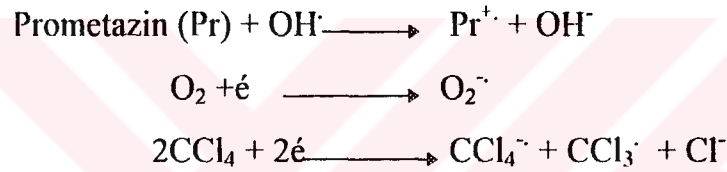
Bu çalışmada hedeflerimiz şunlardır:

- 1) Akut ve kronik eklem enflamasyonunda, bu sürecin eritrosit ve plazmadaki enzimatik antioksidan sisteme ait yansımalarını tesbit etmek.
- 2) Kronik romatoid artritli hastalarda görülen aneminin bu oksidan/antioksidan sistemindeki dengesizliklere bağlı olup olmadığını araştırmak.
- 3) Tedavinin hastalarda antioksidan sisteme bir katkısının olup olmadığını, plazma ve eritrosit enzim aktivitesi ölçümleri ile test etmek.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

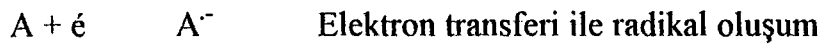
2.1.1 Tanımı ve Özellikleri: Serbest radikaller, ortaklanmamış bir elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Radikal terimi kaynağını Yunanca'da kök anlamına gelen "radiks" kelimesinden alır. Ortaklanmamış elektronlar serbest radikallere paramanyetizm gibi karakteristik özellikler kazandırdıklarından dolayı bu radikallerin kimyasal reaktiviteleri genelde yüksektir. Ortaklanmamış elektron varlığı serbest radikallerde atomun üstüne konan koyu bir nokta ile gösterilmektedir (R[•]). Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (1).



1. Tepkime de fenotiyazin tipi ilaç olan prometazin, hidroksil radikali tarafından prometazin radikal katyonuna yükseltgenmektedir.
2. Tepkime de oksijen süperoksit radikal anyonuna indirgenmektedir.
3. Tepkime de ise CCl₄ (karbon tetra klorür)'den CCl₃ (triklorometil) radikalinin oluşumu sözkonusudur.

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelebilmektedir.

- a) Normal bir molekülün kovalent bir bağının, her kısımda ortaklanmamış elektron kalacak şekilde, homolitik parçalanması
- b) Normal bir moleküle tek bir elektronun ilavesi
- c) Kollektif olarak bağlı iki atomun her iki ortak elektronunun bir atoma kalacak şekilde heterolitik parçalanması.



Elektron transferi, biyolojik sistemlerde homolitik ayrışmadan çok daha yaygındır.

2.1.2. Moleküler Oksijen

Moleküler oksijen her ne kadar canlılığın devamı açısından çok önemli olsa da bütün canlılar için toksik etkili olup atmosferdeki değerinin %20 artması ile toksisite kendini gösterir. Canlılar için oksijenin önemi, iki temel fonksiyonu görmesinden kaynaklanır. Bunlardan birincisi oksijenin yapısal bir fonksiyonu olup canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına katılması diğeri ise besin kaynağı olan maddelerin yapısındaki ana elementlerden biri olmasıdır. Oksijenin yapısal görevi bütün canlılar için geçerli olup, her canlının yapısındaki 100 atomdan yaklaşık 25 tanesi oksijen atomudur (2).

Biyolojik sistemlerde meydana gelen metabolik reaksiyonların birçoğu tek elektron alışverişinin olduğu redoks reaksiyonları şeklinde gelişir. Birçok hücre enziminin ve elektron transport sisteminin aktivitesi sırasında moleküller arasında tek elektron alışverişi şeklinde gerçekleşen bu tür reaksiyonlar sonucunda radikal yapısına sahip ara ürünler oluşur. Aerobik organizmalarda moleküler oksijen yaygın olarak bulunduğu ve radikal haline dönüşebildiğinden hücre içi serbest radikal reaksiyonları sırasında çok miktarda oksijen türevi serbest radikaller meydana gelir. Bu nedenle aerobik organizmalar açısından en önemli radikaller oksijen türevi serbest radikallerdir.

Serbest radikal biyokimyasındaki en önemli moleküllerden biri olan oksijenin elektronlarından ikisi paylaşılmamıştır. Böylece oksijen bazen diradikal olarak da kabul edilmektedir. Oksijen diradikal halde iken bir çok diğeri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir.

Serbest oksijen radikalleri, hem çevresel etmenler, hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan radikallerdir. Radikalleri indükleyen çeşitli faktörler vardır ve bunlar eksojen ve endojen kaynaklı olarak oluşabilirler (3).

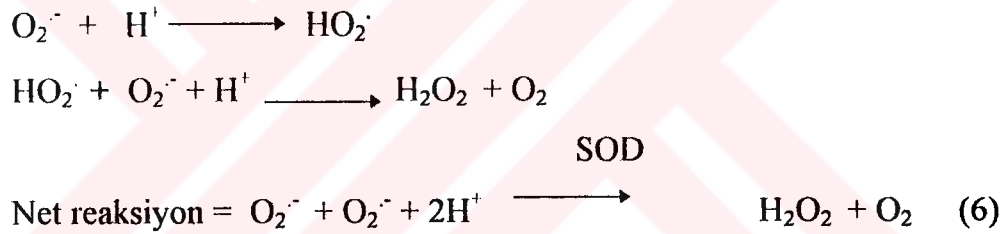
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller tartışmasız oksijen radikalleridir. Bunları şu şekilde sınıflandırmak mümkündür:

2.2.1. Süperoksit Radikali (O₂⁻):

Moleküler oksijen; dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığından, ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında, ve spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali O₂⁻) iki elektron alması ile peroksil anyonu (O₂²⁻) oluşur (4).

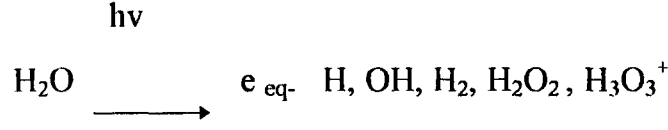
Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksil anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturabilir. Süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Ayrıca, iki süperoksit radikali birbiriyle etkileşerek biri oksitlenirken diğeri indirgenebilir ve böylece H₂O₂ ve O₂ meydana gelebilir.



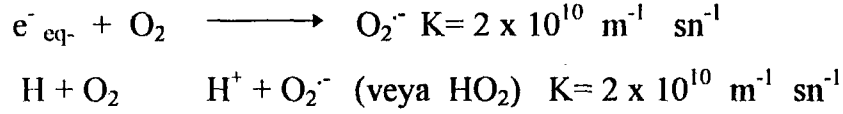
Superoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye “dismutasyon tepkimesi” denir (2). Superoksit radikali membranları kolayca geçemediğinden belirli bir tahrip edici etkisi yoktur. Doğada çoğunlukla redüktif ve H₂O₂ kaynağı olarak iş görür. Nirtik oksit (NO) ile reaksiyonu fizyolojik bir öneme sahiptir. Canlılarda süperoksit radikallerinin oluşumu farklı nedenlerden dolayı gerçekleşmektedir. Bu nedenlerin başlıcaları:

1. Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda süperoksit oluşumuna neden olurlar. Bazı koşullarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere, özellikle bütün enerjili elektro manyetik ışınlar oksijenli ortamdan süperoksit radikali oluştururlar. Yüksek enerjili ışınlardan gama, beta ve x ışınları süperoksit

radikalleri ve dolayısıyla diğer radikallerin oluşumunu da sağlarlar. Böyle bir dalga sulu ortamdan geçince suyun radyolotik parçalanmasına neden olur (2).



Sulu ortam oksijen içeriyorsa, aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşur.



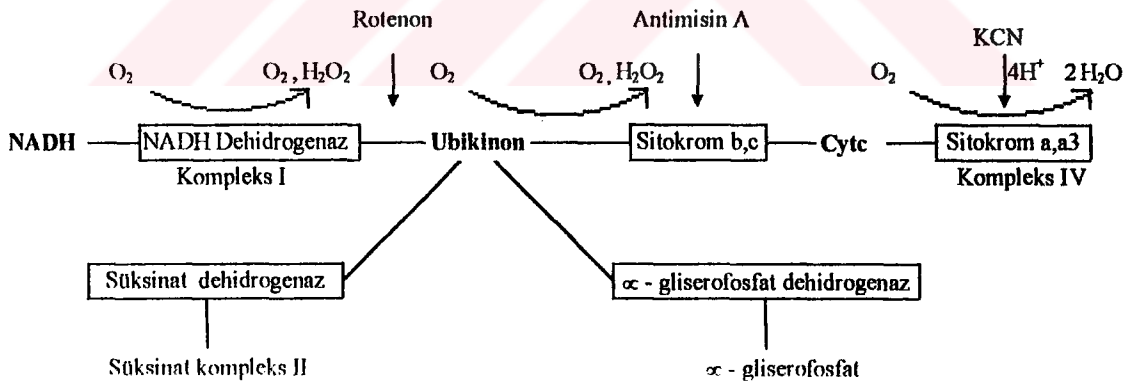
Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat daha artar. Canlı bir sistem susuz ve oksijensiz düşünülmemeyeceğine göre yüksek enerjili ışınların aynı etkiyi daha kolay göstereceği açıktır.

2. Canlı organizmalar radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile; eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorlarsa organizmalarındaki pekçok tepkimelerle O_2^- üretilir. Canlılarda O_2^- üreten başlıca önemli tepkimeler şunlardır:

- Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, tiollerin, indirgenmiş boyaların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde O_2^- üretilebilir (5).
- Çeşitli enzimatik tepkimelerde O_2^- oluşur. Bu enzimlere ksantin oksidaz, dihidroorotat dehidrogenaz (6) ve bir grup flavoprotein dehidrogenazlar örnek verilebilir.
- Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimleri de katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak O_2^- üretirler. Bunlara mikrozomal hidroksilazlar, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz örnek olarak verilebilir.
- Canlılarda süperoksit radikallerinin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküler oksijenin en önemli kullanım yerinin mitokondri iç zarındaki elektron transport sistemi olduğu hatırlanırsa, radikal üretimi beklenen bir sonuçtur. Bilindiği gibi mitokondrideki oksijen tüketiminin çok büyük bir

kısmından elektron transport sistemi sorumludur. Ve sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri iç zarındaki elektron transportu sırasında ubikinondan (koenzim Q) sonra sitokromlar elektronları taşırlar ve bu elektronlar sitokrom a₃'ün bağlandığı bir molekül oksijenin suya indirgenmesi için dört elektron gereksinmesi vardır. Bu elektronların sitokromlarda tek tek taşındığı gerçeği göz önüne alınırsa elektron transportunun son tepkimesinin (sitokrom oksidaz tepkimesinin) en önemli O₂⁻ üretim bölgesi olması beklenebilir (7). Oysa bu bölgede O₂⁻ üretildiği tespit edilmemiştir. Buna karşın mitokondri elektron transport sisteminde O₂⁻ üreten iki bölgenin bulunduğu belirlenmiştir.

Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH dehidrogenaz bölgesidir. Mitokondri zarında üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır (8). İkinci bölge ise koenzim Q - sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun oksidasyonu elektron transport sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin üçte ikisini oluşturur. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin %1-5' i O₂⁻ oluşumu ile sonuçlanır (şekil 1).

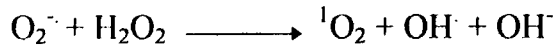


Şekil 1. Elektron transport sistemi (9).

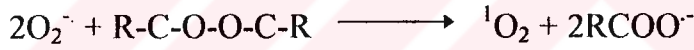
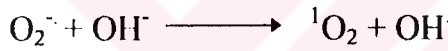
e) Ayrıca önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) tarafından amaçlı ve enzimatik olarak üretilirler (2).

Süperoksit radikali üreten tepkimelerde yapılan bu ilk radikal bir seri tepkimelerle diğer serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Ortamda biriken superoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Süperoksit radikali, kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
2. Ortamdan bir proton alarak perhidroksil radikali ($\text{HO}_2\cdot$) oluşturulabilir.
3. Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) ve tekil oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturulabilir.



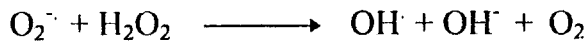
4. Diaçil peroksitlerle olduğu gibi, diğer tepkimelerle tekil oksijen yapımına neden olur.



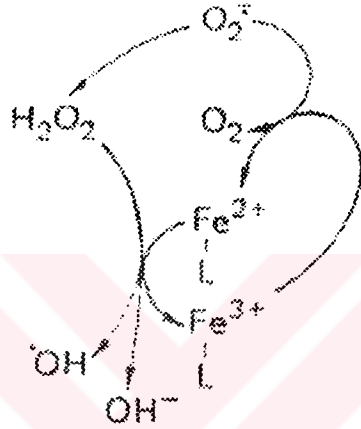
Oluşumlarına superoksit radikallerinin neden olduğu bu radikaller diğer radikalik tepkimeleri başlatırlar ve superoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkilidirler. Bu nedenle superoksit radikalleri oluştuğu anda uzaklaştırılmazlarsa diğer radikallerin oluşumu kaçınılmazdır (2).

2.2.2. Hidroksil Radikali ($\text{OH}\cdot$):

1934 yılında Haber ve Weiss hidrojen peroksidin $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermiştir (10).

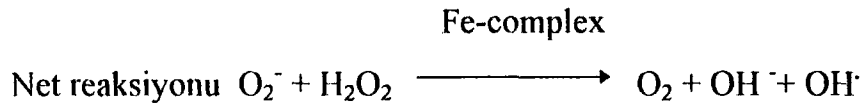
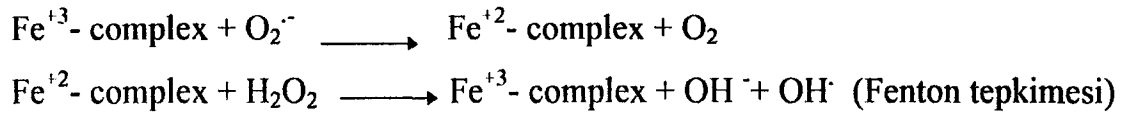


Daha sonraki yıllarda araştışıcılar canlılarda fizyolojik olarak önemli miktarda OH[•] üretilemeyeceğine inanıyorlardı. Çünkü O₂⁻ nin H₂O₂ ile etkileşiminin hız sabitinin süperoksit radikallerinin kendiliğinden dismutasyonu ile yarışamayacağını kabul ediyorlardı. 1978 yılında redoks katalizör olarak görev yapan bir metal, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda OH[•] üretildiği gösterildi (Şekil 2).



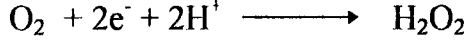
Şekil 2. Haber - Weiss zinciri (11).

Biyolojik sistemlerde hidroksil radikallerinin, bir geçiş elementinin, özellikle de demirin katalizör rolü oynadığı bir reaksiyon aracılığı ile meydana geldiği düşünülmektedir (12). Buna göre +3 değerlikli demir iyonları önce süperoksit radikali tarafından +2 değerliğe indirgenmekte ve daha sonra da elektronlarını hidrojen peroksit'e aktararak hidroksil radikali oluşmasına neden olmaktadır.

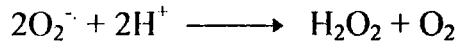


2.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂):

Hidrojen peroksit, moleküler oksijene iki elektron katılmasıyla oluşur. Membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır.

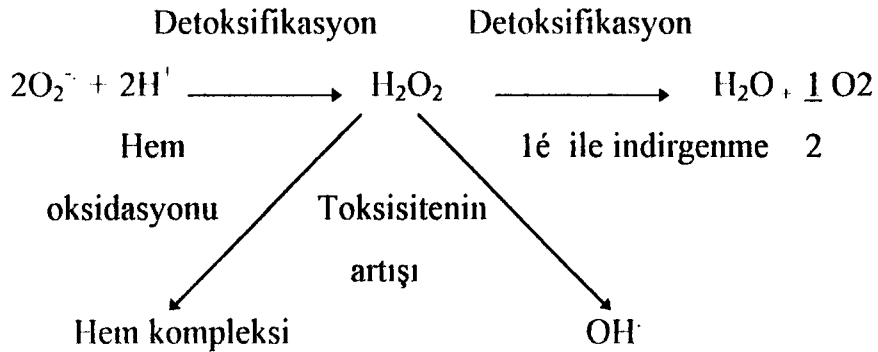


Biyolojik sistemlerde asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. Tepkime sonucunda radikal olmayan ürünler meydana geldiği için bu bir dismutasyon tepkimesi olarak bilinir.



Bu tepkime ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutazın katalizi ile gerçekleşir (13). Bir serbest radikal olmadığı halde H₂O₂ reaktif oksijen türlerinden kabul edilir ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksitle tepkimeye girerek hidroksil radikali oluşturur. Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi adı verilir. Katalizör olarak Fe kullanılır ve bu tepkime oldukça hızlıdır.

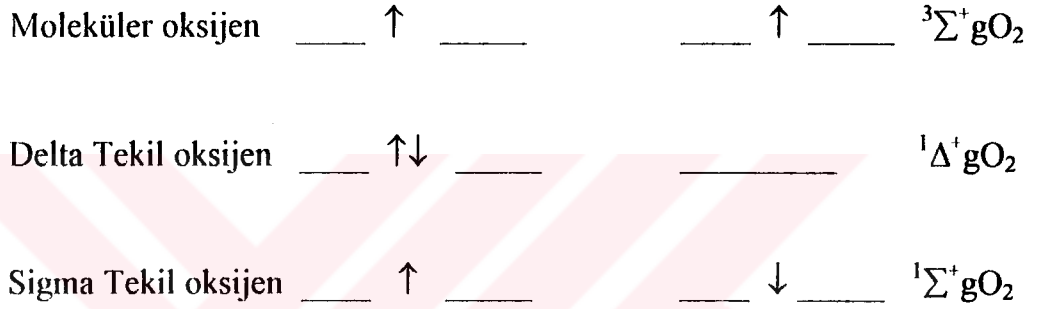
H₂O₂'nin oksijen metabolizmasındaki önemi Şekil 3'de özetlenmiştir.



Şekil 3. Oksijen metabolizmasında H₂O₂'nin rolü (14).

2.2.4. Tekil (Singlet) Oksijen ($^1\text{O}_2$) :

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış dış iki elektronu ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin bu iki formuna tekil (singlet) oksijen denir. Tekil oksijenin delta formunda ($^1\Delta_g\text{O}_2$) iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır. Diğer orbital boştur. Sigma formunda ($^1\Sigma^+_g\text{O}_2$) ise elektronlar ayrı ayrı orbitallerdedir ve spinleri birbirine zıttır (15). Bu farklı formlar Şekil 4'de özetlenmiştir (6).



Şekil 4. Moleküler ve tekil oksijenin son orbitalindeki e dağılımı

Tekil oksijenin her iki formunda aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler

2.3. Hücrede serbest Radikallerin Oluşumu:

Endojen ve eksojen kaynaklar radikal oluşturabilir. Endojen olarak mitokondrial elektron transport zinciri, metal katalizli otooksidasyon reaksiyonları, prostaglandin sentezi ve oksidazlar (ksantin oksidaz, NADPH oksidaz) ve oksijenazların (sitokrom p450 sistemi) katalizlediği reaksiyonlar başlıca radikal oluşturan kaynaklardır.

Eksojen olarak uv, x ışınları, iyonize radyasyon, bazı kimyasal ajanlar (CCl_4) radikal oluşumuna neden olmaktadır.

2.4. Serbest Radikallerin Canlı Organizmalarda Sebep Olduğu

Reaksiyonlar:

Serbest radikaller ve özellikle oksijen türevi serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipitler, lipoproteinler karbohidratlar başta olmak üzere hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek geriye dönüşlü veya dönüşsüz hasar meydana getirebilirler.

2.4.1. Serbest Radikallerin Sebep Olduğu DNA Hasarı

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir. Süperokside maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir (16).

2.4.2. Serbest Radikallerin sebep olduğu Amino Asit ve protein Hasarı:

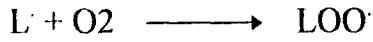
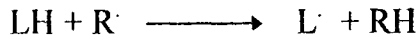
Proteinler ve nükleik asitler lipitlerden daha az serbest radikal etkisine maruz kalırlar. Sonuçta karboniller ve peroksitler oluşur. Hasarın tespitinde karboniller ölçülür. Doymamış bağ ve sülfidril grubu ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest oksijen radikallerinden daha kolay etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu tepkimeler sonucu, immunglobin G (IgG) ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getirmezler (17).

2.4.3. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Bir çok molekül serbest radikallerden etkilenir. Fakat etkilenmeye en hassas olan yapılar lipitlerdir.

Özellikle hücre membranları, poliansature yağ asitlerince (PUFA) zengindir ve serbest radikallerle kolaylıkla etkileşirler (18). Bu tepkime çok zarar verir çünkü zincirleme devam eder (19, 20). Hidroksil radikali yağ asidindeki metil karbonlarının birinden hidrojen koparıp suya dönüştürken geride karbon atomlarından biri radikal haline dönüşmüş poliansature yağ asiti kalır.

Hasar oluşum mekanizması şöyledir.



LH : hedef poliansature yağ asidi

R[·] : Olayı başlatıcı oksidan radikal

L[·] : Yağ asidi radikali

LOO[·] : peroksil radikali

LOOH: Lipid hidroperoksitler

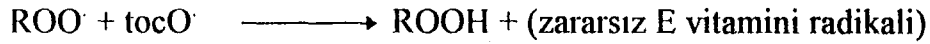
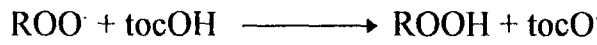
Buradaki peroksil radikalleri (LOO[·]) zincir reaksiyonunun araçlarıdır ve bir sonraki PUFA'yı okside ederek yeni zincir reaksiyonları başlatırlar. Lipid peroksitler sonunda aldehitlere çevrilirler. Biyolojik olarak aktif olan aldehitlerden en çok bilineni malondialdehidtir (MDA) (1, 21).

Membran lipidlerinden poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu membranda bir çok hasara neden olmaktadır. Poliansature yağ asitleri, çift bağın bulunduğu noktada belli bir açı yaparak dışa doğru açılırlar. Membran yapısında çift bağlı yağ asitlerinin sayısının büyüklüğü gözönüne alınırsa, bu yapılanmanın membranda akıcı bir yapı oluşturması beklenen bir durumdur. Lipid peroksidasyonu ile bu noktalar tahribe uğrayıp düzleşmeler veya halkalaşmalar olmaktadır. Sonuçta

hem membran akışkanlığı bozulmakta hem de membran ile ilgili yapılar (pompalar, taşıyıcı moleküller, iyon kanalları) dejenere olmaktadır.

Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna yol açarak hastalık oluşturmada rol oynadıklarını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (1, 22).

Vitamin E, sellüler ve subsellüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır (23). Tokoferoller, fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir poliansature yağ asidindeki serbest peroksil radikaline aktarabilmelerinin sonucu olarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan bir davranış ortaya koymaktadır.



Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında tesirlidir ve bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında fazla bulunmaktadır (24).

2.4.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıkların patolojik süreçlerinde önemli rol oynarlar.

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyalüronik asid sinoviyal sıvıda da bol bulunur. Enflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçer ve muhtemelen immun komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstrasellüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^\cdot salgırlar. Bu radikallerin in vitro olarak hyalüronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüronik asid parçalanması enflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir.

2.5. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Oluşturulan Hücresel Savunma Mekanizması

Normal düzeyde oldukları sürece zararlı etkileri olmayan serbest oksijen radikalleri ile mücadele oldukça önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki düzeylerini artırıcı etmenler olarak özellikle “oksidatif stres yapıcı nedenler” in ve risk faktörlerinin belirlenmesi ve uzak durulması mücadelede ilk yapılması gerekenlerdir.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler (25) ve enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar olarak iki kısma ayrılırlar. Eksozen ve endojen kaynaklı antioksidanlar Tablo1 ve Tablo 2’de toplu olarak gösterilmiştir. Serbest radikallere karşı koruyucu enzimlerin tümü hücre içi enzimler olduklarından, hücre dışı yapıların serbest radikal hasarından korumasında nonenzimatik antioksidan maddelerin önemli fonksiyonları vardır. SOD enzimi dışında serbest radikallere karşı koruyucu enzimlerin tümü hücre içi enzimler olduklarından hücre dışı yapıların serbest radikal hasarına karşı etkili değildirler. Hücre dışı sıvıların korunmasında nonenzimatik antioksidanların önemli fonksiyonları vardır.

Enzimatik

Süperoksid Dismutaz (SOD) (O_2^- Detoksifikasyonu)

Katalaz (H_2O_2 detoksifikasyonu)

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (H_2O_2 detoksifikasyonu)

Enzimatik olmayan

Lipid fazda çözünenler

α -tokoferol (E vitamini)

β - Karoten (A vitamini öncülü)

A vitamini

Sıvı fazda çözünenler

Glutasyon

Askorbik asit (C vitamini)

Ürik asit (Radikal süpürücü)

Sistein (Radikal süpürücü)

Bilirubin (Radikal süpürücü)

Albumin (LOOH, HOCl temizleyicisi)

Seruloplazmin (SOD'ye benzer mekanizma)

Transferrin (Dolaşımdaki demire bağlanır)

Laktoferin (Dolaşımdaki demire bağlanır)

Ferritin (Doku demirine bağlanır)

Yardımcı Enzimler

NADPH-kinon oksidoredüktaz

Epoksid hidrolaz

GSSG-redüktaz

Semidehidroaskorbat redüktaz

Methionin sülfoksid redüktaz

DNA tamir enzimleri

Konjugasyon enzimleri:

UDP-glukoronil transferaz

Sülfotransferaz

GSH-Transferaz

Tablo 1: Endojen Kaynaklı Antioksidanlar (26).

Ajan Sınıfı	Spasifik Ajan	Etki Mekanizması
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol Oksipurinol Folik asit Pterin aldehid Tungsten	(Ksantin oksidaz etkisi ile süperoksid oluşumunu inhibe ederler)
Proteaz inhibitörleri	Soya fasulyesi tripsin inhibitörü Diğer serin proteaz inhibitötü Fenilmetilsülfonil florür	Ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumunu inhibe ederler.
NADPH Oksidaz inhibitörler	Adenozin Lokal anestetikler Kalsiyum kanal blokerleri Nonsteroid antiinfl. NADPH'a karşı monoklonal Antikorlar Cetiedil Difenilin İyodür	Makrofaj ve nötrofillerde NADPH oksidaz etkisi ile Süperoksid oluşumunu inhibe ederler.
Süperoksit Dismutaz	Doğal SOD Poliyeten glikol-SOD	$O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ reaksiyonunu katalizler
Katalaz	Doğal Katalaz Poliyeten glikol-katalaz	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalizler
Nonenzimatik serbest radikal süpürücüler	Mannitol Albümin Dimetil sülfoksit (DMSO) Dimetil tiyoüre 17- Aminosteroidler Glutatyon Ürat temizleyicisi Bilirubin	HO ⁻ Temizleyicisi LOOH, HOCL $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+}$, HO ⁻ Temizleyicisi HO ⁻ , H ₂ O ₂ , HOCL temizleticisi LOOH, O ₂ ⁻ Temizleyicisi HO ⁻ , H ₂ O ₂ temizleyicisi HO ⁻ , O ₂ ⁻ , temizleyicisi
Demir redüklenmesini inhibe eden ajanlar	Desferroksamin Apotransferrin Seruloplazmin	Serbest Fe ³⁺ bağlar
Endojen antioksidanların aktivitesini artıran ajanlar	Oltipraz Ebselen Glutatyon Asetil sistein	Endojen glutatyon peroksidaz aktivitesini artırır
Antinötrofil ajanlar	Antinötrofil serum Antiadezyon etkili ajanlar	Dolaşımdaki nötrofilleri yok eder. Nötrofillerin endotele adezyonunu önlerler

Tablo 2: Eksojen kaynaklı antioksidanlar (26).

2.5.1. Serbest Radikallerden Koruyucu Enzimler

Canlı hücreleri serbest radikal hasarından koruyan enzimlerden en önemli üç tanesi (27):

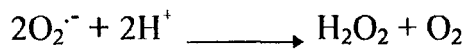
- a) Süperoksit dismutaz (SOD)
- b) Katalaz (CAT)
- c) Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Biz çalışmamıza süperoksit dismutaz ve katalazı dahil ettiğimizden sadece bunlar hakkında bilgi vereceğiz.

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikallerinin canlılarda üretildiği uzun yıllar bilinmesine rağmen, bu radikallerin temizlenmesi ile ilgili herhangi bir enzimin varlığı 1969 yılına kadar bilinmiyordu. İlk defa McCord ve Fridowich tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar daha önce alyuvarlardan saflaştırılan fakat herhangi bir enzimatik aktivitesi olduğu saptanmayan bakır içeren mavi bir proteinin (Erythrocyt) ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini buldular (5, 28).

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur (29). Hücrelerin sitozolünde, mitokondrilerinde ve plazmada bulunurlar. Bakır-çinko, mangan ve demir ihtiva eden başlıca üç tip izoenzimi vardır. İnsanda Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD izoenzimleri bulunur (30). Demir içeren SOD ökaryotik hücrelerde bulunmaz. Cu,Zn-SOD'ın plazmada bulunan şekli hücre sitozolünde bulunan şeklinden farklıdır. Bu enzimlerin katalizledikleri net reaksiyon aşağıda gösterildiği gibidir:



Cu,Zn-SOD'lar: Hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin 32.000 dalton ağırlığında ve iki subüniteden oluştuğu tesbit edilmiştir. Cu,Zn-SOD geni 21 no'lu kromozomda lokalizedir (31, 32, 33). Bu subünitelerin herbirinde bir Cu ve

bir Zn atomu bulunmaktadır. Ayrıca her alt birimde bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu bulunmaktadır (34).

Mn-SOD'lar: Doğal bakteriyel enzim birbirinin ayrı olan ve herbiri bir mangan atomu ihtiva eden yaklaşık 23.000 molkül ağırlığına sahip iki monomerden meydana gelmiştir ve mitokondride lokalizedir. CuZn SOD ile Mn-SOD ler yapı bakımından aynıdır. Fakat farklı pH'lara etkindirler.

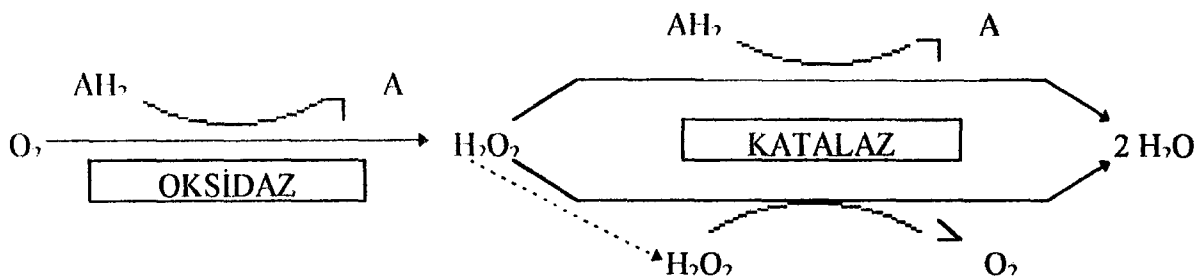
Fe SOD'lar: Enzimin yapısında +3 değerlikli demir olduğu tesbit edilmiştir. İlk kez E. Colide tesbit edilmiştir. Çevreden gelen etkilere karşı koruyucu bir fonksiyon görmektedir.

2.5.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, 4 "hem" grubu içeren bir hemoproteindir yapısında Fe III bulunur (35). Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo birçok durumda, katalazın peroksidaz aktivitesi tercih edilmektedir.



Katalaz, kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarda böbrek ve karaciğerde bulunur. Görevinin dismutaz etkisi ile oluşan hidrojen peroksidin yıkımı olduğu sanılmaktadır. Mikro yapılar veya peroksizomlar, karaciğer dahil birçok dokuda bulunur. Bunlar oksidazlar ve katalazlar açısından zengindirler. Peroksizomal enzimlere ek olarak, ksantin oksidaz ve mitokondrial ve mikrozomal elektron transport sistemleri H_2O_2 kaynakları olarak değerlendirilmelidirler.



Şekil 5. Hidrojen peroksidin yıkımında katalazın rolü (36).

2.6. Romatoid Artrit

Romatoid artrit konnektif doku hastalıkları arasında en sık görülen, etyolojisi bilinmeyen ve özellikle eklemleri tutan sistemik bir hastalıktır. Eklemlerde görülen iltihabi artrit özellikle eller, el bileği ve ayaklar gibi periferik eklemlerde, simetrik olarak görülür. Eklemlerdeki iltahabın yaygınlık derecesi, klinik seyri ve ekstra artiküler belirtileri vakalar arasında büyük bir heterojenite gösterir.

Romatoid artrit, hudutlu populasyon çalışmalarında Avrupa ve Kuzey Amerika'da %1-3 oranında görülmüştür. Kadınlarda erkeklere oranla 3 misli fazladır. İleri yaşlarda bu fark azalır. İklim, coğrafik bölge ve kültür ile belirgin bir ilişkisi yoktur. İrsiyetle de belirgin bir ilişkisi olduğunu söylemek güçtür.

Romatoid artritli hastalarda genellikle normositik, normokromik bir anemi vardır. Serum demiri düşük değildir. Fakat diğer demir eksikliği anemilerinin aksine demir bağlama kapasitesi veya transferin artmıştır. Demir tedavisine iyi cevap vermez. Başka bir deyimle demirin eritrositlere bağlanmasında bir kusur vardır, ve bunun nedeni de iyi bilinmez. Lokosit sayısı hafifçe artmıştır. Sedimantasyon hızı yüksek olup genellikle hastalığın aktivitesinin takibinde indeks olarak kullanılır.

Romatoid artrit teşhisi konulduktan sonra tedavisinde birçok ilaçlar kullanılmakla birlikte bunların hiçbirisi kesin tedavi edici ve ideal olmayıp, uzun süre kullanıldıklarında çeşitli yan etkileri görülebilmektedir. En çok kullanılanlar;

Salisilatlar: Aspirin RA tedavisindeki ilaçlar arasında ilk sırayı almaktadır. Salisilatların antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri vardır. Etkilerini prostaglandin sentezini siklooksijenaz yolundan inhibe ederek gösterirler.

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar: Fenilbutazon ve türevleri öncelikle kullanılır. Bunun yanında indometazin, diklofenak, etadolak, fenoproten ve naproxen son zamanlarda kullanılmaktadır.

Ayrıca altın tuzları, D-penisilamin, sulfazalazin türü ilaçlar da kullanılmaktadır.

2.7. Romatoid Artritte Serbest Radikallerin Rolü

Serbest radikaller çeşitli hastalıklardan patogenizinde önemli rol oynar. Bir çok hastalıkta olduğu gibi romatoid artritte de serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Oksijen radikallerinin, hyalüonik asit gibi karbonhidrat polimerlerini parçalayabildiğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (37, 38). Bu madde synovial sıvının viskozitesinin korunmasında büyük öneme sahiptir. Eklem sıvısında bulunan hyaluronik asit ve diğer proteoglikanlara ilave olarak, kollajen ve kıkırdak dokularının, iltihap hücrelerinden salınan serbest radikallerin etkisi ile parçalanmasının, romatoid artrit oluşmasında önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (39).

Fakat romatoid artrit, bir destek dokusu hastalığı ve otoimmün hastalık olarak tanımlanmakla birlikte; oksidatif stres ile oluşan bir hastalık olarak tarif edilmesi oldukça zordur. İnflamasyona uğramış bir eklemde üretilen oksidatif ürünler otoimmün bir fenomen ve konnektif doku tahribatı oluşturabilirler ve eğer antioksidan tedavi uygulanırsa romatoid sinovitisin ilerlemesi baskılanabilir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışmamıza, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Kliniğine ve Malatya Askeri Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniğine teşhis ve tedavi amacıyla gelen RA'li hastalar dahil edilmiştir. Bu hastaların 26 tanesi ilaç tedavisi alan, 8 tanesi ise teşhisi konmuş fakat ilaç tedavisi almayan hastalardan oluşmaktadır. İlaç tedavisi alan gruptaki hastaların yaşları 24 ile 75 arasında değişmekteydi (ort \pm SD 50,2 \pm 11,6). İlaç tedavisi almayan gruptaki hastaların yaşları 25 ile 58 (ort \pm SD 42,6 \pm 10,0) arasında idi.

Kontrol grubu, dahiliye polikliniğine başvuran tamamen sağlıklı şahıslardan seçilmiştir. Bu gruba dahil kişilerin yaşları 28 ile 65 arasında değişmekteydi (ort \pm SD 43,5 \pm 11,6).

Tedavi alan hastalar şu ilaçları kullanmaktaydı: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİD), Steroid, Methotrexate, D vitamini türevleri, folbiol, D-penisilamin ve çeşitli analjezik ilaçlar.

3.2. Kullanılan araç, gereç ve kimyasallar

Çalışmada Hermle Z 383 K santrifüjü ile LKB Biochrom Ultrospec Plus UV/visible Spectrophotometer kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan maddeler şunlardır: Hemoglobin reaktifi (Randox); Ksantin oksidaz enzimi, ksantin ve nitrobluetetrazolium (NBT) (Sigma); CuCl₂, bovin serum albumin, H₂O₂, EDTA, Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, Kloroform, Etanol, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.2H₂O (Merck).

İstatistik programı olarak SPS programında Kruskal Wallis ve Mann Withney U testi kullanılmıştır.

3.3. Yapılan İşlemler

3.3.1. Kan numunelerinin hazırlanması

Kan numuneleri, hasta ve normal kişilerin antekübital venlerinden alınmıştır. Aç olarak alınan kanlar 2cc'lik orjinal olarak hazırlanmış CBC tüplerine konulmuştur. Tüpler (0,8 cc'lik) Na-Sitrat içermektedir. Alınan kanlar bekletilmeden 3000 rpm'de on dakika santrifüj edildi. Plazma ayrıldıktan sonra eritrositlerin üzerinde beyaz bir tabaka halinde duran lökositler bir otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. Eritrositler izotonik NaCl çözeltisi ile üç kez yıkanarak santrifüj edildi. Çalışmada son yıkamadan sonra elde edilen eritrositler ve önceden ayrı bir tüpe alınan plazma kullanıldı. Numuneler analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-40°C) saklandı.

Eritrositler analiz öncesi ¼ oranında buz soğukluğunda distile su ile hemoliz edildi. Bu hemolizatta süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri ile hemoglobin tayini yapıldı.

3.3.2. Hemoglobin Tayini

Hemoglobin standartı kullanılarak standart grafiği çizildi. Deneye başlamadan önce reaktifin içinde bulunan cyanure/ferricyanure distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Ve üzerine 500 µl Brij 35 eklendi. Hazırlanmış olan bu çözelti oda ısısında muhafaza edildi. Çalışma yapılıncaya kadar koyu bir şişenin içinde saklandı.

İşlem: Bir deney tüpüne hazırladığımız reaktiften 2,5 ml konuldu. Üzerine önceden hazırladığımız (eritrositlerin ¼ oranında hemoliz edilmiş hali) hemolizattan 10µl eklendi. Kör olarak, hazırlanan reaktif kullanıldı. 540 nm'de, köre karşı numunenin absorbansı okundu (oluşan renk bir kaç saat sabittir). Okunan absorbansların karşılık geldiği Hb değerleri standart grafiğinden okundu.

3.3.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Deneyin prensibi: Bu metotta süperoksit dismutaz aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin NBT'yi (nitroblue tetrazolium) indirgemesinin enzim tarafından engellenmesi esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium ile reaksiyona girerek, bu maddeyi indirgemesi sonucunda 560 nm'de maksimum absorbans veren formazan oluşur. Ortama konulan numunedeki enzimin üretilen radikalleri dismutasyona uğratmaları nispetinde NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değerleride düşer. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk meydana gelememekte veya enzimin aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır (40).

Kullanılan reaktifler:

- Çalışma reaktifi:

1. 0.3 mmol/L xanthine; 9.13 mg alınıp 200 ml bidistile suda çözülür. Çözme işlemi bir kaç damla 1 M NaOH'lı ortamda hafifçe ısıtılarak yapılır.
2. 0.6 mmol/L Na₂EDTA: 25 mg alınıp 100 ml bidistile suda çözülür.
3. 150 µmol/L NBT: 12.3 mg alınıp 100 ml bidistile suda çözülür.
4. 400 mmol/L Na₂CO₃: 2.54 gr alınıp 60 ml bidistile suda çözülür.
5. 1 g/L bovine serum albumin (BSA): 30 mg alınıp 30 ml bidistile suda çözülür.

Hepsi karıştırılır (toplam 490 ml) koyu renkli bir şişede + 4°C de saklanır.

- Ksantin oksidaz (167 u/L): 10 µl ksantin oksidaz alınıp 1 ml soğuk 2 M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılır. Tüp bir kaç kez alt-üst edilir. Enzim çalışma çözeltileri deney esnasında hazırlanır.

- 2M (NH₄)₂SO₄: 2.64 gr alınıp 10 ml bidistile suda çözülür. Buzlukta saklanır.

- 0.8 mmol/L CuCl₂: 10.8 mg CuCl₂ alınıp bir miktar bidistile suda çözülerek 100 ml ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı: Hemoliz edilmiş eritrositler 1/5 oranında sulandırıldı. Kloroform/etanol (3/5, v/v) ile bire bir oranında karıştırılarak 3000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi (41). Analizde üstte kalan berrak kısım kullanıldı. Plazmadaki ölçümler ise plazmayı herhangi bir ek işleme tabi tutmadan direkt yapıldı.

	Kör	Numune (Eritrosit veya plazma)
Çalışma çözeltisi (ml)	2.85	2.85
Süpernatant (ml)	-	0.10
Bidistile su (ml)	0.10	-
Ksantin oksidaz (ml)	0.05	0.05
25°C oda ısısında 20 dakika inkübasyon		
CuCl ₂ (ml)	1.0	1.0
Numune ve kör 560 nm dalga boyunda suya karşı okunur.		

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (kör)} - \text{Absorbans (numune)}}{\text{Absorbans (kör)}} \times 100$$

% 50 lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

$$\text{Ü/ml} = \frac{\text{AK-AN}}{\text{AK}} \times 100 \times \frac{1}{0.1} \text{ ml}$$

$$\text{Ü/ml} = \frac{\text{AK-AN}}{\text{AK}} \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

(Ünite : Bir SOD ünitesi, NBT reduksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.)

Hemoglobin başına SOD aktivitesi:

$$U/ml = \frac{AK-AN}{AK} \times 20 \times 5$$

$$U/gr Hb = \frac{\frac{AK-AN}{AK} \times 100 (\ddot{U}/mL)}{Hb (gr/mL)}$$

$$U/gr Hb = \frac{AK-AN}{AK} \times 100 \ddot{U}/gr Hb$$

3.3.4. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Deneyin prensibi: Hidrojen peroksit (H_2O_2) ultraviyole spektrumu aralığında 240 nm'de maksimum absorbanans verir. Deney ortamında katalaz enziminin katalizi ile H_2O_2 nin parçalanması sonucu, 240 nm'de absorbanansa azalma meydana gelir. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

H_2O_2 ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorpsiyon verir. Uygun tampon içinde bulunan H_2O_2 'nin numunede bulunan katalaz enziminin etkisi ile yıkılması sonucu bu maddenin 240 nm'de sebep olduğu absorbansta, azalma meydana gelir. H_2O_2 substrat olarak kullanılır. Oluşan O_2 miktarı ölçülerek katalaz miktarı ölçülmüş olur.

Kullanılan reaktifler:

1. Fosfat tamponu (pH 7) 50 mM: 7.1 g/L 600 ml Na_2PO_4 ile 6.8 g/L 400 ml KH_2PO_4 karıştırılır.
2. Fosfat tamponunda H_2O_2 çözeltisi; %30'luk H_2O_2 çözeltisinden 34 μ L alınarak daha önce hazırlanmış 100 mL fosfat tamponunda seyreltilir. Bu karışımın absorbanansı 240 nm'de yaklaşık 0.5 olmalıdır. Absorbans bu değerden daha düşük ise küçük miktarlarda H_2O_2 ilave edilerek absorbanansın 0.5 olması sağlanır (42).

Deneyin Yapılışı: Hazırlanan hemolizat 1/10 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır.

	Kör küveti	Numune küveti
Fosfat Tamponu	2.99	-
H_2O_2 çözeltisi	10 μ l	2.99 ml
Numune	-	10 μ l

240 nmde 15 sn aralıklarla 5 okuma yapılmıştır.

Yukarıdaki çalışma şemasına uygun olarak önce küvete fosfat tamponu içinde hazırlanmış H_2O_2 çözeltisi ve ardından numune eklendi. Numune ilave edildikten sonra küvet alt üst edilerek karışması sağlandı. Vakit geçirmeden

spektrofotometredeki yuvasına yerleştirildi. Göstergeden absorbanstaki azalma takip edilerek, her 15 sn de bir okuma yapıldı. Okuma işlemleri beş kez tekrarlandı.

Enzimin aktivitesinin hesaplanması

$$K = \frac{2.3}{\Delta t} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

$$\Delta t = t_2 - t_1$$

Δt ' yi biz 30 sn olarak aldık. Buna göre formülümüz

$$K_{30} = \frac{2.3}{30} \times \log \frac{A_1}{A_2} = 0,077 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

10 kat seyreltilmiş numune kullandığımız için;

$$K_{30} = 0.77 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

1 ml numunedeki enzim aktivitesi ise;

$$K_{30} = 77 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

Hb başına katalaz aktivitesi;

$$K/gHb = \frac{77 \times \log \frac{A_1}{A_2}}{Hb \text{ gr/ml}}$$

5. BULGULAR

Kontrol ve hasta gruplarındaki şahısların eritrosit ve plazmalarında ölçülen Enzim Aktiviteleri:

1) Tedavi alan Romatoid Artiritli Hastaların eritrosit ve plazmalarında ölçülen Katalaz ve SOD aktiviteleri:

Tedavi olan romatoid Artiritli hasta grubuna dahil 26 hastadan alınan kan numunelerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 3'de toplu halde gösterilmektedir.

Yapılan değerlendirme sonucunda bu gruba dahil hastaların eritrositlerinde SOD aktivitelerin 763 Ü/grHb ile 1603 Ü/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 1184 ± 1820); katalaz aktivitelerin 41,4 K/grHb ile 102,2 K/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD $66,7 \pm 14,6$) tespit edilmiştir.

Aynı gruba ait hastaların plazmalarında SOD aktivitelerinin 0.3 Ü/ml ile 4.3 Ü/ml arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 1.91 ± 1.16) bulunmuştur.

Tablo 3: Tedavi alan RA'li hastaların eritrosit ve plazmalarında tespit edilen süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri:

No	İsim	Cins	Yaş	Eritrosit		Plazma
				SOD (Ü/grHb)	Katalaz (K/grHb)	SOD (Ü/ml)
1.	H.K.	K	56	1330	67,3	2,9
2.	T.O	K	56	1134	41,4	2,1
3.	P.K	K	48	1169	81,4	1,7
4.	S.K	K	51	1269	70,9	2,2
5.	C.D	E	53	1434	75,0	2,1
6.	G.G	E	24	1252	79,7	0,5
7.	H.Y	K	38	1117	65,7	3,3
8.	M.B	K	58	1415	42,3	3,6
9.	A.G	K	58	1156	56,7	1,7
10.	M.U	E	66	1243	67,7	1,9
11.	A.S	K	50	1169	63,0	2,6
12.	A.S	E	43	1208	77,4	0,9
13.	M.K	K	56	1216	83,9	4,3
14.	P.B	K	29	1189	67,9	0,6
15.	A.U	K	54	1017	70,6	3,2
16.	G.İ	K	44	814	54,7	2,9
17.	Z.Y	K	65	1403	92,3	2,0
18.	E.Y	K	75	1077	62,7	3,7
19.	N.E	E	44	1196	58,0	1,5
20.	G.D	K	55	1147	69,2	0,2
21.	A.B	K	35	763	52,8	2,2
22.	S.K.	K	48	1375	77,1	0,5
23.	K.T.	E	34	986	45,0	2,0
24.	F.K	K	65	1119	48,5	0,4
25.	T.İ	K	55	983	60,9	0,5
26.	Z.Ç	K	46	1603	102,2	0,3
Ort ± SD			50,2 ±11.6	1184 ±182.0	66,7 ±14.6	1,91 ±1,16

2) Tedavi almayan Romatoid artritli hastaların eritrosit ve plazmalarında ölçülen Katalaz ve SOD aktiviteleri:

Tedavi olmayan RA'li hastaların kan numelerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4'de toplu halde gösterilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda bu gruba dahil hastaların eritrositlerinde SOD aktivitelerinin 1075 Ü/grHb ile 1782 Ü/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD 1220.5 \pm 214.6), katalaz aktivitelerinin 50 K/grHb ile 108 K/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 67.38 \pm 16.8) tesbit edilmiştir.

Ayrı gruba dahil hastaların plazmalarında SOD aktivitelerinin 0.5 Ü/ml ile 2.4 Ü/ml arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 1.35 \pm 0.88) hesaplanmıştır.

Tablo.4. Tedavi almayan romatoid artritli hastaların eritrosit ve plazmalarında tespit edilen SOD ve katalaz aktiviteleri

No	İsim	Cins	Yaş	Eritrosit		Plazma
				SOD (Ü/grHb)	Katalaz (K/grHb)	SOD (Ü/ml)
1.	A.Ş	K	38	1146	68,2	0,5
2.	F.P	K	35	1174	67,7	1,5
3.	F.B	K	58	1150	69,5	0,7
4.	T.K	K	41	1782	108	1,5
5.	S.P	K	41	1116	61,3	0,5
6.	S.S	E	25	1075	50	0,7
7.	B.S	E	53	1137	51,6	2,4
8.	S.K	K	50	1184	62,7	3
Ort \pm SD			42,6 \pm 10,0	1220 \pm 214,6	67,38 \pm 16,8	1,35 \pm 0,88

3) Kontrol grubuna dahil şahısların eritrosit ve plazmalarında ölçülen SOD ve katalaz aktiviteleri:

Kontrol grubuna dahil 21 şahıstan alınan kan numunelerinde yapılan analiz sonuçları Tablo 5’de toplu olarak gösterilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubuna dahil şahısların eritrositlerinde SOD aktivitelerinin 876 Ü/grHb ile 1589 Ü/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 1194,8 \pm 172,4); katalaz aktivitelerinin 31,7 k/grHb ile 106,5 k/grHb arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 64,6 \pm 15,9) tespit edilmiştir.

Aynı gruba dahil şahısların plazmalarında ölçülen SOD aktivitelerinin 0,4 Ü/ml ile 3,7 Ü/ml arasında değiştiği (ortalama \pm SD; 2,39 \pm 0,87) tesbit edilmiştir.

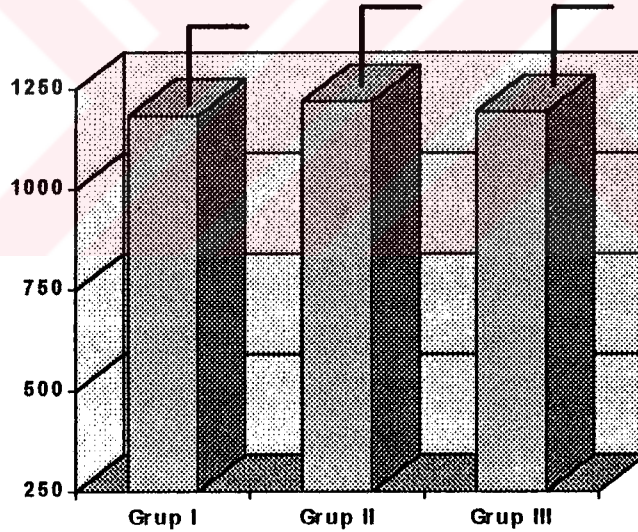
Tablo 5. Kontrol grubu şahısların eritrosit ve plazmalarında tespit edilen SOD ve katalaz aktiviteleri:

No	İsim	Cins	Yaş	Eritrosit		Plazma
				SOD (Ü/grHb)	Katalaz (K/grHb)	SOD (Ü/ml)
1.	D.H	K	28	876	50,6	2,9
2.	E.O	E	44	1160	61,1	2,8
3.	B.S	K	32	1110	44,2	3,3
4.	M.K	E	32	1510	85,4	3,2
5.	N.A	K	68	1215	70,7	1,5
6.	A.S	E	39	1115	67,7	3,3
7.	M.B	K	49	1163	67,7	0,8
8.	E.T	E	38	1280	63,3	3,7
9.	H.T	K	60	1021	61,3	2,8
10.	A.K	K	45	1087	31,7	3,0
11.	M.K	E	36	1200	67,9	2,7
12.	F.G	E	48	1271	56,9	1,7
13.	İ.Z	E	54	1123	73,8	2,4
14.	H.D	K	58	1427	71,2	2,8
15.	İ.T	K	44	1310	37,9	1,7
16.	N.D	K	65	1589	106,5	2,4
17.	A.A	K	36	1165	71,9	1,2
18.	B.Ö	E	28	961	52,5	3,3
19.	G.T	E	32	1362	78,5	2,2
20.	C.T	E	35	1150	70,3	2,1
21.	M.Ö	E	42	997	65,7	0,4
Ort \pm SD			43,5 \pm 11,6	1194,8 \pm 172,4	64,6 \pm 15,9	2,39 \pm 0,8

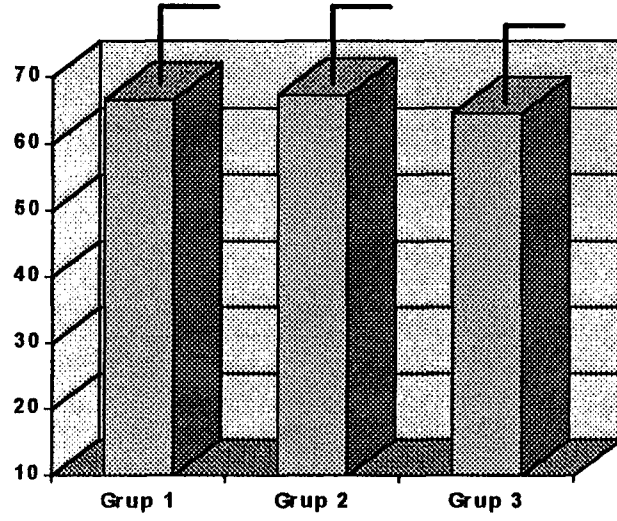
Tablo 6: Kontrol Grubu ve Hasta Gruplarında Eritrosit ve Plazma SOD, Cat Aktiviteleri

GRUPLAR	ERİTROSİT		PLAZMA
	SOD U/gr Hb	CAT K/gr Hb	SOD U/ml
Tedavi alan (I) (n= 26)	1184 ± 182.0	66.7 ± 14.6	1.91 ± 1.16
Tedavi almayan (II) (n= 8)	1220 ± 214.6	67.38 ± 16.8	1.35 ± 0.88
Kontrol (III) (n= 21)	1194 ± 172.4	62.6 ± 15.9	2.39 ± 0.87

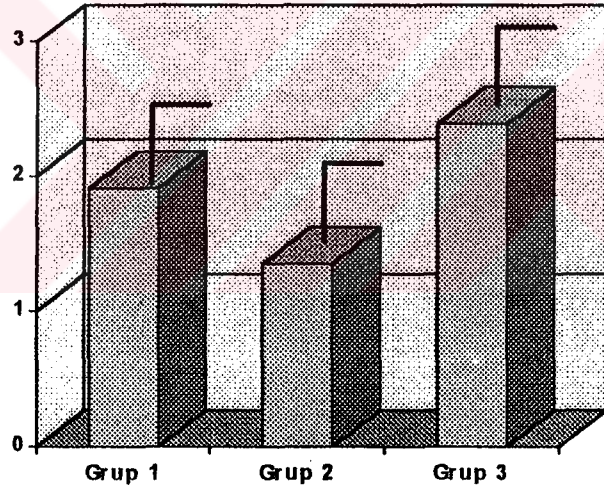
Kontrol ve tedavi alan RA'li ve tedavi almayan RA'li hasta gruplarına dahil şahısların eritrosit katalaz ve SOD aktiviteleri ile, plazma SOD aktivitelerinin ortalama ± SD'ları Tablo 6'da toplu olarak verilmiştir.



Şekil 6: Kontrol ve hasta gruplarının eritrositlerindeki SOD aktiviteleri



Şekil 7: Kontrol ve hasta gruplarının eritrositlerindeki CAT aktiviteleri



Şekil 8: Kontrol ve hasta gruplarının plazmalarında SOD aktiviteleri

Tablo 7: Kontrol ve tedavi alan RA'li ve tedavi almayan RA'li hastaların SOD (eritrosit ve plazma) ve CAT (eritrosit) aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları (Mann Witney U testi)

	ERİTROSİT		PLAZMA
	SOD	CAT	SOD
1-2	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
1-3	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
2-3	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$

- 1- Tedavi alan RA'li hastalar
- 2- Tedavi almayan RA'li hastalar
- 3- Kontrol hastaları

Kontrol ve tedavi alan RA'li hastalar ile tedavi almayan RA'li hastaların eritrositlerinde ölçülen SOD ve katalaz ile plazmalarında ölçülen CAT enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları tablo 7'de toplu olarak gösterilmektedir. Tablo 7'de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almayan RA'li hastaların plazmalarında ölçülen SOD enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Tedavi almayan hastalarda plazma SOD enzim aktivitesi kontrol grubundan düşük olarak bulunmuştur ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Romatoid artrit etyolojisi tam olarak bilinmeyen sistemik otoimmün bir bozukluktur. En önemli ayırıcı özelliği periferik eklemlerde kronik, simetrik ve erozif sinovitis olmasıdır. Hastaların büyük bir kısmında serum romatoid faktör titrasyonlarında yükselme vardır. Eklem hastalığının şiddeti zamanla değişebilir fakat şimdiye kadar yapılan gözlemlerden anlaşıldığı kadarıyla hastalık progressif bir gidişe sahiptir ve eklem harabiyeti, deformite ve sakatlıkla sonuçlanabilmektedir. Eklem dışı ek bulgular şunlardır: Subkutanöz nodüller, vaskülit, perikardit, pulmoner nodüller veya intestinal fibrozis, mononöritis multipleks, episklerit veya daha az sıklıkla sklerit.

Oksijenden kaynaklanan serbest radikallerin inflamasyon sürecinde önemli bir rol aldıkları düşünülmektedir. Bakır içeren bir enzim olan SOD ve tiol grupları (RSH) bu hayli aktif bileşiklerin yok edilmesinde muhtemelen önemli bir rol oynayarak oluşacak hasara karşı koruyucu fonksiyon üstlenmektedirler (43).

İnflamasyon gibi fizyolojik stresler, başta çok fonksiyonlu bakır proteini olan seruloplazmin olmak üzere akut faz reaktanları olarak adlandırılan proteinlerin plazma seviyesini arttırmaktadır (44). Seruloplazmin artışında oluşturulacak bir sınırlama inflamatuvar hasarı hızlandırabilecektir, bu bakımdan bu proteinin inflamatuvar hasarı inhibe ettiği iddia edilmektedir (45, 46).

Aktif romatoid artritli hastalarda eritrositlerin ömürlerinin azaldığı rapor edilmektedir (47). İmmunolojik bir çalışmada romatoid artritli hastaların perifer kanındaki T lenfositlerin insan kemik iliğinden köken alan eritrosid koloninin büyümesini suprese ettiği bulunmuştur (48). Bu bulgular şöyle bir hipotezin gelişmesine yol açmıştır: Romatoid artrit ile ilgili olarak gelişen aneminin sebebi eritrositlerde endojen olarak üretilen süperoksitlerin hücre iskeletini hasara uğratması ile yakından ilgilidir.

Polimorfonükleer lökositlerin, bakteri ve immün komplekslerin sindirimi esnasında O_2^- , H_2O_2 ve OH^- ürettikleri bilinmektedir (49). Romatoid artrit gibi herhangi bir inflamatuvar olayda lökositler sinovial sıvıda birikir. Romatoid sinovial

sıvının non-inflamatuar sıvıdan daha çok demir içerdiği bildirilmiştir (50, 51). Bu fazla demir sinovial membranlarda depo edilmektedir (52). Lökositler tarafından üretilen O_2^- ve H_2O_2 eğer derhal süpürülmezse birbirleri ile $OH\cdot$ oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Bu en son oluşan radikal atak yaparak hyaluronik asiti yıkıma uğratar, böylece sinovial sıvı viskozitesini yitirerek eklemde daha fazla sürtünmeye sebep olur (51). Hücrelerde O_2^- , SOD enzimi ile H_2O_2 ise katalaz enzimi ile süpürülür (53). O_2^- ayrıca askorbik asitle reaksiyona girerek yok edilir (54). Tartışmalı olmasına rağmen O_2^- 'nin sinovial sıvıda da bulunan ekstra sellüler protein olan seruloplazmin ile süpürüldüğüne inanılmaktadır (55). Seruloplazminin normal sıvılara oranla romatoid artritli sinovial sıvıda daha fazla miktarda bulunduğu tesbit edilmiştir (56).

Polimerfonükler lökositler konakçının savunulmasında önemli bir rol oynasa bile doku inflamasyonu ile görülen doku zedelenmesinin de major bir sebebidir (57, 58). D-penisilamin bakır kompleksi, superoksit dismutaz etkisine sahiptir ve bu nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç O_2^- üretimini engeller (59, 60, 61). Puig-Parellada ve Planas (61); steroid antiinflamatuvar ilaçların terapötik etkinliğinin serbest radikaller üzerine olan etkileriyle ilgili olmadığını buldular. Bununla beraber D-penisilaminle tedavi edilen hastalarda SOD aktivitesinde bir artış olmadı. Sinovial sıvı SOD aktivitesindeki artış; polimerfonükler lökositlerin nonspesifik bir membran değişimine ve bu enzimin sinovial sıvı içine akışına bağlıdır. Bu da göstermektedir ki SOD aktivitesi romatoid artritte inflamatuvar fazı göstermektedir (62).

Günümüze kadar, romatoid artritli hastaların eritrositlerinde serbest radikal metabolize edici enzimler ve lipid peroksidasyonu ile ilgili yapılan araştırmaların çoğu romatoid artritli hastalarda görülen aneminin etyolojisini araştırmaya yöneliktir. Bu nedenle eritropoietin seviyesi ile birlikte anemiyi etkileyecek bütün faktörler gözden geçirilmiştir. Sonuçlarımız birçok araştırma ile çelişmekle birlikte bazıları ile uyumlu çıkmıştır. İmayada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (63) eritrosit süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri romatoid artritli hastalarda kontrollerden anlamlı ölçüde düşük çıkmıştır. Aynı sonuca

Benford ve arkadaşları da varmıştır (64). Her iki grup araştırmacı da eritrositlerde meydana gelen bu antioksidatif sistem defektini aneminin bir sebebi olarak göstermektedir. Ancak konunun tartışmaya açık olduğunu, kesin birsey şöylemenin zor olduğunu söylemektedirler. Bizim araştırmamızda eritrosit SOD ve katalaz enzimleri açısından istatistiksel olarak hasta ve kontrol grubunda herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Aynı sonuca Scudder ve arkadaşları (65), Abella ve arkadaşları (66), Peretz ve arkadaşları (67), Olivieri ve arkadaşları (68) varmıştır. Adı geçen araştırmacılar ve bizim sonuçlarımızın ışığında, eritrositlerde romatoid artrit bağlı oksidatif stresin veya antioksidatif stresteki herhangi bir azalmanın anemi oluşturacak derecede hemoliz yapabileceği kanaatinde değiliz. Ayrıca Olivieri ve arkadaşları, romatoid artritli hastalardan ve kontrol grubundan aldıkları eritrositleri H₂O₂ ile 2 saat inkübasyona tuttuktan sonra TBARS seviyelerinde herhangi bir farklılık bulamamışlardır. Bu da hasta eritrositlerinin en az sağlam şahısların eritrositleri kadar lipid peroksidasyonuna dayanıklı olduğunu ve dolayısıyla peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit ve diğer ürünlerin membran yapısında fazla artmayacağını göstermektedir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların hemogloblin değerleri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında herhangi önemli bir farklılığın olmadığı gözlenmektedir. İlaç tedavisi alan grupta 11,7 ± 2,1, kontrol grubunda ise 12,8 ± 2,7'dir. İki hastanın Hb değerleri 9,1 g/dL ve 9,6 g/dL idi. Bu hastalar tek olarak eritrosit enzimleri açısından değerlendirildiğinde antioksidan sistemde önemli bir azalmanın olmadığı görülmektedir. Diğer araştırmalara bakıldığında hastaların hemogloblin değerlerinin önemli oranda düşük olduğu göze çarpmaktadır. Yani hafif dereceli bir anemi sözkonusudur. Bu aşamada antioksidan enzimlerin düşük olduğunu bulan araştırmacılarla çalışmamız arasındaki farklılığı izah edebilecek iki durum düşünüyöruz:

- 1) Hastalarımızda zaten anemi sözkonusu olmadığından, enzim aktivitelerimiz kontrole yakın çıkmıştır. (Burada antioksidan enzimlerin azalmasının anemiye sebep olacağı "tezini" kabul etme şartı sözkonusudur)
- 2) İmayada ve arkadaşlarının çalışması hariç diğer araştırmacılar enzim aktivite birimi olarak sadece U/gr Hb birimini kullanmışlardır. Böyle bir birim ifadesi

normal insanlarda ve anemili olmayan romatoid artritli hastalarda kullanılabilirse de anemik hastalarda yanlış sonuçlara sebebiyet vereceğinden kullanılmaması daha uygundur. Bunun yerine hücre sayısı başına ünite birimi çok daha güvenilir bir ifade tarzıdır (Ü/ 10^9 eritrosit hücresi gibi). Eritrosit başına düşen hemoglobin miktarı anemili hastalarda azaldığı için spesifik aktiviteye çevirirken bölünen Hb değeri gerçeği yansıtmayacağından yanlış sonuç çıkmasına sebep olabilir.

Son yıllarda süperoksit ve hidrosil radikallerinin romatoid artritte enflamasyon yapan gerçek sebep olduğuna dair bir hayli yayınlanmış araştırma vardır. Bu radikallerin yok edilmesini sağlayan antioksidan enzimlere ve diğer bileşiklere ait çalışmalar mevcuttur. Blake ve arkadaşları yaptıkları araştırmada (69) sinovial sıvıda süperoksit dismutaz aktivitesi tesbit edemediler, ancak sıvıda kendileri enzim ekledikten sonra enzim aktivitesi tesbit ettiler. Bunu şu amaçla yaptılar: Sinovial sıvıda bu enzimi inhibe edecek herhangi bir inhibitörün mevcut olup olmadığını anlamak. Sonuçta süperoksit enziminin olmadığı kanaatine varılmıştır. Igari ve arkadaşları (62) sinovial sıvıda 0,1 - 1,7 ünite/mg protein miktarında enzim aktivitesi bulmuşlardır ve bu düzey osteoartritli hastaların sinovial sıvılarında olan aktiviteden oldukça yüksektir. Bu düzeyde bir aktivitenin; inflamasyon sürecinin bir parçasını oluşturan, polimorfonükleer lökositlerin sinovial invazyona ve nonspesifik bir membran değişimi sonucu olduğu hakkında fikir belirtmişlerdir. Sonuçta romatoid artritte süperoksit dismutaz aktivitesinin hastalığın şiddeti ile korele olduğu belirtilmiştir.

Enflamatuar eklem hastalıklarında gözlenen yıkılım süreci SOD ve CAT ile inhibe edilir. Bu durum göstermektedir ki $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 tek başlarına polisakkaritlerin depolimerizasyonuna sebep olmaz, her ikisinin aynı anda bulunması gerekir. Gerçek depolimerizasyon ürünleri $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in reaksiyonu ile sekonder olarak oluşan OH \cdot ile olmaktadır. Bu, Haber-Weiss tarafından önerilen reaksiyonla gerçekleşmektedir.

Hücre membranında bulunan ve klinik olarak en önemli olan yağ asidi araşidonik asittir. Bu bileşik aynı zamanla prostaglandin ve lökotrien sentezi için substrattır (70). Araşidonik asit metabolizmasının primer ürünleri olan

hidroperoksitler daha sonra siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz'ın oksijenasyonuna uğrarlar (71). Bu oksijenasyonlar sonucunda aynı zamanda pro-inflamatuar bileşikler olan prostaglandin E₂ ve lökotrien B₄ gibi bileşikler oluşur. Bu bileşiklerin miktarı ve tipi, kullanılan hidroperoksitlerin miktarını azaltan ajanlarca modifiye edilebilir (72). Bu ajanların en çok bilinenleri SOD, CAT ve GSH-Px (Glutasyon peroksidaz)'dır.

Bu konu ile ilgili romatoid artritli hastaların plazmalarında da lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler çalışılmıştır. Biz plazmada katalaz aktivitesi tesbit edemedik. SOD aktivitesi ise tedavi alan hasta grubunda $1,91 \pm 1,16$ Ü/mL iken tedavi almayan grupta $1,35 \pm 0,88$ Ü/mL bulunmuştur. Her iki değer de kontrol grubunda olana göre bir hayli düşüktür, fakat istatistiksel açıdan tedavi almayan gruptaki değer anlamlıdır ($p < 0,05$). Özgüneş ve arkadaşları (73) romatoid artritli hastaların plazmalarında malondialdehit seviyesini $3,42 \pm 0,8$ µmol/L olarak tesbit etmişlerdir. Bu seviye kontrol plazmalarına göre yüksektir ($p < 0,01$). Bir antioksidan olan seruloplazmin seviyesinde romatoid artritli hastalarda daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). Artışlar birbiriyle korelasyon göstermiştir, dolayısıyla seruloplazmin lipid peroksidasyonundaki artışa karşılık koruyucu faktör olarak artmıştır. Aynı sonuca Köse ve arkadaşları (18) da varmıştır. Marklund ve arkadaşları (74) romatoid artritli hastaların plazmalarında ekstrasellüler SOD'ı kontrole göre oldukça düşük bulmuşlardır (4 kat düşük). Buna karşılık CuZnSOD'ı hemen hemen aynı düzeyde bulmuşlardır.

Bizim sonucumuzla uyumlu olan SOD izoenzimi ekstrasellüler SOD'dır. Honkanen (75), glutasyon peroksidazın romatoid artritteki plazma seviyesini ölçmüş ve kontrol grubu ile aynı bulmuştur. Halbuki bazı araştırmacılar bu enzimin serum düzeyinin önemli oranda azaldığını tesbit etmişlerdir (76). Serum ve plazma arasındaki fark trombositlerden kaynaklanan GSH-Px olabilir.

Bizim plazmada katalaz aktivitesi bulamamıza karşılık Kokkaliari ve arkadaşları (77) hem romatoid artrit hem de kontrol grubu serumlarında aktivite tesbit etmişlerdir (ortalama 8 µmol O₂ /dak/ml serum). Fakat hasta grubunda herhangi önemli bir fark bulamamışlardır.

Bu araştırmacılar RA'li hastalarında kontrole göre yüksek oranda hemogloblin tesbit ettiler. Bunun sebebi eritrositlerin fragilitesindeki artıştır. Katalaz aktivitesindeki artışlar bu sebebe bağlı olabilir.

Sonuçlarımız literatürdeki bulgular ve değerlendirmelerle karşılaştırıldığında şu genellemeleri yapabilmemiz mümkündür:

1. Romatoid artritte eklem sıvısında polimorfonükleer lökositlerden salgılanan serbest oksijen radikalleri burada ve dolaşımda lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Bunun neticesinde hem eklem sıvısı hem de plazmada malodialdehit seviyeleri yüksek bulunabilir.
2. Ekstrasellüler sıvının antioksidanları primer olarak vitaminler (E, C vitaminleri) ve plazmada normalde bulunan bazı yapılardır (seruloplazmin, bilirubin, transferrin vb.). bunların seviyelerinin peroksidasyon olan bölgede veya dolaşımda artması beklenebilir. Fakat tamponlama esnasında ve sonrasında yıkılım sonucu bunların miktarları zamanla azalabilir. Bazı çalışmalarda romatoid sinovial sıvısında E vitamini seviyesinin düşük bulunması bu konuya delil teşkil edebilir.
3. Aynı durum plazmadaki antioksidan enzimler için de geçerli olabilir. Biz, süperoksit radikallerini hidrojen peroksite eviren süperoksit dismutaz seviyesini, degradasyon sonucu azalmış olarak bulabiliriz. Bu tezimizi haklı çıkaracak bir bulgu, tedavi alan hastaların plazma SOD aktivitesinin kontrol grubu ortalamasına yaklaşmasıdır. Tedavi ile oksidatif stres azaldığından plazmadaki SOD değrasyonu azalıp rölatif bir azalma gösterip normal düzeylere ıkımış olabilir.

6. ÖZET

Bu çalışmada tedavi alan (n= 26) ve tedavi almayan (n= 8) romatoid artritli hastaların eritrosit ve plazmalarında antroksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. SOD aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile, katalaz aktivitesi ise H₂O₂'in ultraviyole spektrum aralığında absorbanasının azalması ile tesbit edildi. SOD ölçümünde ayrıca etanol/kloroform (w/w, 5/3) ekstraksiyonu yapılarak görülebilir alandaki ölçümlerde olabilecek artefaktlar önleildi. Bulunan sonuçlar kontrol grubunun (n= 22) enzim aktivite değerleri ile karşılaştırıldı.

Plazmada katalaz aktivitesi tesbit edilemedi. Tedavi alan romatoid artritli hasta grubunda eritrosit SOD aktivitesi 1184 ± 182 Ü/gr Hb, CAT aktivitesi 66,7 ± 14,6 K/gr Hb bulundu. Bu grupta plazma SOD aktivitesi ise 1,91 ± 1,16 Ü/gr Hb idi. Tedavi almayan romatoid artritli hasta grubunda eritrosit SOD aktivitesi 1220,0 ± 214,6 Ü/gr Hb, CAT aktivitesi 67,4 ± 16,8 K/gr Hb olarak bulundu. Bu grupta plazma SOD aktivitesi 1,35 ± 0,88 Ü/ml (p < 0,05) idi. Kontrol grubunda eritrosit SOD ve CAT aktiviteleri sırasıyla 1194 ± 172,4 U/gr Hb ve 62,6 ± 15,9 K/gr Hb idi. Ayrıca bu grubun plazma SOD aktivitesi 2,39 ± 0,87 U/mL olarak ölçüldü. Sadece tedavi almayan grubun plazma SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu. Sonuçlar literatürün ışığında tartışıldı. Eritrosit içi antioksidan enzim aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan fark bulunmaması, romatoid artritli hastalarda ortaya çıkan aneminin etyolojisinde bu enzimlerin herhangi bir fonksiyonunun olmadığını düşündürdü.

7. SUMMARY

In the present study, antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined in erythrocytes and plasma taken from the patients with rheumatoid arthritis. The patients were divided into two groups; group 1 received the classical treatment (n= 26) and group 2 no treatment for rheumatoid arthritis. SOD activity was determined via xanthine/xanthine oxidase system. CAT activity was determined by the decrease of H₂O₂ absorbance at ultraviolet spectrum. In the determination of SOD activity, the ethanol/chloroform extraction (w/w, 5/3) was also used to prevent the artefacts originated from the red colour of haemoglobin. The results were compared with enzyme activities of the control group (n= 22).

No catalase activity was determined in the plasma taken from both the patient groups and the control groups. Erythrocyte SOD activity was 1184 ± 182 U/g Hb and CAT activity was $66,7 \pm 14,6$ K/gr Hb in the patients with rheumatoid arthritis receiving classical treatment (Group 1). In group 2, receiving no treatment for rheumatoid arthritis, SOD and CAT activity were $1220,0 \pm 214,6$ U/gr Hb and $67,4 \pm 16,8$ K/gr Hb respectively. Plasma SOD activity in this group was $1,35 \pm 0,88$ U/ml ($p < 0,05$). In control group erythrocyte SOD and CAT activities were $1194 \pm 172,4$ U/gr Hb and $62,6 \pm 15,9$ K/gr Hb respectively and plasma SOD activity was $2,39 \pm 0,87$ U/mL. As seen, diminishing of plasma SOD activity was significant in the patient group receiving no treatment. The results of the study were discussed in considering literature. As a conclusion, it has suggested that antioxidant enzymes do not play an important role in the etiology of anemia in rheumatoid arthritis, because no significant enzyme activity was determined when compared with control group in our study.

8. KAYNAKLAR

1. Slater T.F. Free radicals and tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222: 1-15
2. Kılınç K. Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, *Biyokimya Dergisi* 1985; 10 (2): 60-89.
3. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Clin Wochenschr* 1991; 69: 965-968.
4. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem* 1975, 44: 147-159.
5. Fridovich I. Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Ann Rev. Pharmacol Toxicol.* 1983; 23: 239-57.
6. Aleman V. and Handler P. Dihydroorotate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1967; 242 (18): 4087-4096.
7. Turrens J.F. and Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191:421-427.
8. Fridowich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1970; 25: 4053-4057.
9. Sohal R.S., and Brunk U.T. Mitochondrial production of prooxidants and cellular senescence. *Mutation Research.* 1992; 275: 295-304.
10. Sothorn P.A, Powis G. Free radicals in medicine. I.chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988; 63: 381-389.
11. Deby C. and Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochemical Pharmacology.* 1990; 39: 399-405.
12. Auer D.E., NG C.J. and Seawright A.A. Effect of pallosein (süperoxide dismutase) and catalase upon oxygen derived free radical induced degradation of equine synavial fluid. *Equine Veterinary Journal* 1990; 22 (1): 13-17.
13. Britgan B.E., Pou S., Rosen G.M., Lilleg D.M. and Buettner G.R. Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990; 265 (29): 17533-17538.

14. Elstner E.F. Oxygen radicals. Biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr.* 1991; 69: 949-956.
15. Wefers H. Singlet oxygen in biological systems. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1987; 18: 91-104.
16. Akkuş İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları Konya 1995.
17. Lunec J. Free radicals: Their involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 173-182.
18. Köse K., Doğan P., Kardaş Y.; Sarayman R. Lipid peroxidation and antioxidant activity in rheumatoid arthritis. *Tr. J. of Medical Sciences.* 1994; 22: 31-34.
19. Horrobin D.F. Is the main problem in free radical damage caused by radiation, oxygen and other toxins the loss of membrane essential fatty acids rather than the accumulation of toxic materials? *Medical Hypotheses.* 1991; 35: 23-26
20. Bendich A. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J. Dairy Sci.* 1993; 76: 2789-2794.
21. Atamanalp S.S., Polat M., Yıldırğan M.I., Er E., Bakan N., Akçay F. The effects of superoxide dismutase deferoxamine and their combination on gastric mucosal damage due to ischemia-reperfusion. *Doğa Tr. J. of Medical Sciences.* 1993; 17: 201-205.
22. Picot C.L., Nicole A., Clement M., Bourre J.M., and Sinet P.M. Age related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutation Research.* 1992; 275: 281-293.
23. Duthie D.G. and Wahle K.J. Smoking, Antioxidants, essential fatty acids and coronary heart disease. *Biochemical Society Transactions* 1990; 18: 1051-1054.
24. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *A Lange Medical Book,* 1995, p: 709.
25. Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Roes M., Zachary M.D., Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development.* 1990; 51: 283-297.

26. Tamirgan G., Koldaş M. and Uras F. Serbest radikaller, Haseki Tıp Bülteni. 1994; 32 (4): 92-93.
27. Guemouri L., Artur Y., Herberth B., Jeandel C., Cundy G., and Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. Clin. Chem. 1991; 37/11: 1932-1937.
28. McCord J.M., Fridovich I. Süperoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte J. Biol Chem . 1969, 244: 6049-6055.
29. Oberley L.W., Clair D.K., Aitor A.P., and Oberley T.D. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after x-irradiation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1987; 254 (1): 69-80.
30. Sun Y., Oberley L.W., Elwell J.H., and Rivera E.S. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. Int J. Cancer. 1989; 44: 1028-1033.
31. Aitor A.P. Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 1981; 257 (5): 2713-2718.
32. Mavella I., Rigo A., Federico R., Ciriolo M.R., and Rotho G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. Biochem J. 1982; 204: 535-540.
33. Bolann J.B., Ulvik R.J. Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of süperoxide dismutase activity. Clin Chem 1991, 34/11: 1993-1999.
34. Fridovich I. Superoxide Dismutases. Adv. Enzymol 1986, 58: 61-97.
35. Percy M.E. Catalase: An old enzyme with a new role? Biochem J. 1984; 62: 1006-1014.
36. Murroy RK, Grammer DK, Mayes PA, Radwell VW. A Lange Medical Book, 1995, p: 142.
37. Greenwold R.A., Moak S.A. Degradation of hyaluronic acid by polymorphonuclear leukocytes. Inflammation 1986; 10:15-30.
38. Greenwold R.A., Moy W.W. Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. Arthritis Rheum. 1980; 23: 455-563.

39. Chorazy PA, Schumacher HR and Edling TD. Role of glutathione peroxidase in rheumatoid arthritis analysis of enzyme activity and DNA polymorphism. *DNA and cell Biology* 1992; 11 (3): 221-225.
40. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay for superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
41. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical Biochemistry* 1984; 142: 2090-296.
42. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer, U., ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Press, 1974; PP.673-677
43. Del Maestro R.F: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand*. 1980, 492 (supple): 153-68
44. Cousins R.J., Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 1985, 31, 238-309
45. Denko C.W.: Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions*. 1979, 9, 333-336
46. Samokyszyn V.M.; Miller D.M.; Aust S.D.: Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruplasmin. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 21-26
47. Richmond J, Alexander ERM, Potter J.L, Duthie JJ: The nature of anemia in rheumatoid arthritis. V. Red cell survival measured by radioactive chromium. *Ann Rheum Dis*. 1961; 20:133-7
48. Sugimoto M, wakabayashi Y, Hirose S, Takaku F; Immunological aspects of the anemia of rheumatoid arthritis. *Am. J. Hematol* 1987; 25:1-11
49. Babior B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal of Medicine*. 1978; 205, 323-329
50. Senator G.B., Murden K.D., Balazs N.: Concentration of iron in synovial membrane, synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis and other joint diseases. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1968; 27, 49-54
51. Wong S.F., Halliwell B., Richmand R., Skowroneck W.R.: Role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1981, 14;127-134

52. Murden K.D.: The anaemia of rheumatoid arthritis: significance of iron deposits in the synovial membrane. *Australian Annals of Medicine*. 1970; 2, 97-104
53. Halliwell B.: Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biology International Reports*. 1978; 2, 113-128
54. Nishikimi M.: Oxidation of ascorbic acid with superoxide generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1976, 63, 463-468
55. Goldstein I.M., Kaplan H.B., Edelsen H.S., Weissman G. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *Journal of Biological Chemistry*. 1979, 254, 4040-4045
56. Scudder P.R., Altimimi D., McMurray W., While A.G., Zoob B.C., Dormandy T.L. Serum copper and related variables in rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1978, 37, 67-70
57. Weismann G., Zurier R.B., Spieler P.J and Goldstein I.M.: Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. *J. Exp. Med.* 1971; 134:149s.
58. Weismann G.: Lysosomal mechanisms of tissue injury in arthritis. *N. Engl. J. Med.* 1972; 286:141
59. Lengfelder E, and Elstner E.F.: Determination of the superoxide dismutase activity of D-penicillamine copper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1978, 359:75
60. Lengfelder E., Fuchs C., Younes M and Weser U.: Functional aspects of the superoxide dismutase action of Cu-penicillamine *Biochim. Biophys. Acta*. 1979, 567:492
61. Puig-Parellada P and Planas J.M.: Synovial fluid degradation induced by free radicals. In vitro action of several free radical scavengers and anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 1977; 27:535
62. Igari T, Kazeda H, Horiuchi S and Ono S. A Remarkable Increase of superoxide dismutase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1982, 162: 282-287.

63. Imadaya A, Terasawa K, Tosa H, Okamoto M and Tarizuka K. Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 1988; 15: 1628-1631.
64. Banford JC, Brown DH, Hazelten RA, McNeil CJ, Sturrock RD, Smith WE. Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid disease. *Rheum Dis* 1982; 41: 458-62.
65. Scudder P, Stracks J, Dormandy TL. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and erythrocyte copper levels in normal subjects and in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 1976; 69: 397-403.
66. Abella A, Clarc D, Chalos J, Baret A, Leluc R, Lindenbaum A. Concentrations of superoxide dismutase (copper, manganese) catalase and glutathion peroxidase in red cells, platelets and plasma of patients with rheumatoid polyarthritis. *Ann. Biol. Clin.* 1987; 45: 152-155.
67. Peretz A, Neve J, Vertangen F, Famaey JP, Molle L, Selenium status in relation to clinical variables and corticosteroid treatment in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 1987; 14: 1104-7.
68. Olivieri O, Girelli D. Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1991; 18:8.
69. Blake DR, Hall ND, Treb DA, Halliwell B and Gutteridge JMC protection against superoxide and hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clinical science* 1981; 61: 483-486.
70. Irvine R.F.: How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J.* 1982, 204: 3-16
71. Hemler M.E., Lands WEM.: Evidence for a peroxide initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. *J. Biol Chem.* 1980: 255: 6253-61
72. Lands W., Lee R., Smith W.: Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins. *Ann NY Acad Sci.* 1971; 180: 107-22
73. Özgüneş H, Gürer H and Tuncer S. Correlation between plasma malondialdehyde and ceruloplasmin activity values in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* 1985; 28 (2): 193-194.

74. Marklund SL, Bjelle A and Elmaust G. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1986; 45: 847-85.
75. Honkanen VE.A. The factors affecting plasma glutathion peroxidase and selenium in rheumatoid arthritis. A multiple linear regression analysis. *Scand J. Rheumatol* 1991; 20: 385-391.
76. Johansson U, Portinsson S, Akesson A et al. Nutritional status in girls with juvenile chronic arthritis. *Hum. Nutr Clin Nutr.* 1986; 40 (1): 57-67.
77. Kokkaliari M, Fawibe O, Berry H and Baum H. Serum catalase as the protective agent against inactivation of proteinase inhibitor by hydrogen peroxide; comparison between normal and rheumatoid sera. *Biochemistry international* 1992; 28 (2): 219-227.

