

BEHÇETLİ HASTALARDA, ERİTROSİTLERDE H₂O₂ İLE İNDÜKLENEN LİPOPEROKSİDASYONA EGb 761'İN İN VİTRO ANTİOKSİDAN ETKİSİ

In vitro antioxidant effect of EGb-761 on H₂O₂- induced lipoperoxidation in erythrocytes of Behçet patients

Kader Köse¹, Pakize Doğan², Meral Aşçıoğlu³, Özcan Aşçıoğlu⁴

Özet: Bu çalışmada antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilen Ginkgo Biloba ekstresinin (EGb 761) Behçetli hastalardan elde edilen eritrositlerde, in vitro şartlarda H₂O₂ indüksiyonu ile oluşturulan lipid peroksidasyonuna etkisi incelendi. Bu amaçla 10 erkek hasta ve aynı yaş grubunda olan 10 sağlıklı erkek kontrol grubundan elde edilen eritrosit süspansiyonlarında H₂O₂ ile lipid peroksidasyonu uyarıldı. 25 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarındaki EGb 761'in antioksidan etkisi malondialdehit (MDA) oluşumu üzerinden değerlendirildi. EGb 761'in bulunmadığı ortamda, Behçetli hasta grubunda MDA oluşumu, sağlıklı gruba nazaran istatistiksel olarak anlamlı miktarda yüksekti. Ortama EGb 761'in ilavesiyle hem hasta, hem de sağlıklı grupta, H₂O₂ ile oluşturulan MDA miktarının önemli miktarda baskılandığı gözlemlendi. Her iki grupta da MDA miktarının azalması, EGb 761 konsantrasyonu ile ilişkiliydi; yani, EGb 761 konsantrasyonu arttıkça MDA üretimindeki azalma daha fazla oldu. Sonuç olarak EGb 761'in bir antioksidan olarak Behçetli hastaların tedavisinde, olumlu etkileri olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı, Lipid peroksidasyonu, Ginkgo Biloba ekstresi (EGb-761), Eritrosit

Summary : In this study, the antioxidant effect of Ginkgo Biloba extract (EGb 761) on H₂O₂ - induced lipoperoxidation in erythrocyte suspensions of Behçet's patients was examined in in vitro conditions. Erythrocyte suspensions of 10 male Behçet's patients and 10 male healthy controls at similar ages were prepared and antioxidative effects of 25 and 250 µg/ml EGb 761 were determined by malondialdehyde (MDA) formation after H₂O₂ -induction. When compared to controls, there was a statistically significant increase in MDA formation in patients group in mediums containing no EGb 761. However, significant decreases were present in H₂O₂ -induced lipoperoxidation in erythrocyte suspensions when EGb 761 were added to incubation medium of both groups. The decrease in MDA formation was related to the concentration of EGb 761 in both Behçet's patients and controls; that is, the more increase in EGb 761 concentration led to the more decrease in MDA formation. These data indicate that EGb 761 may be an effective antioxidant in the treatments of Behçet's disease.

Key Words: Behçet's disease, Lipid peroxidation, Ginkgo Biloba extract (EGb 761), Erythrocyte

Behçet hastalığı, ağızda tekrarlayan aftlar, genital bölgede ülserasyonlar ve gözde üveit ile karakterize bir sendromdur (2). Değişik organ tutulumlarıyla multisistemik bir hastalık görünümünde olan Behçet hastalığının etyolojisi kesin olarak bilinmemekte ve altta yatan etki mekanizmaları halen açıklanamamaktadır (24). Bununla beraber, hastalık, çoğunlukla genç yaşlarda hayati tehlike taşı-

yan klinik tablolara yol açabileceğinden (36); hastaların takibi ve tedavisi, gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Behçet hastalığında kesin etyoloji bilinmediğinden, belirli bir tedavi şekli de bulunmamaktadır. Bununla beraber, mukoza, sinovya ve vaskülit patolojisinde rol oynayan, -başta lenfosit ve plazma hücreleri olmak üzere-, inflamatuvar hücre birikimini önlemek amacıyla, bu hücrelerin aktivitelerini ya da sayılarını azaltmaya yönelik tedavi şekilleri üzerinde durulmaktadır (23). Günümüze kadar, konvansiyonel tedavi olarak en sık kortikosteroid-

Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ/ Biyokimya. Uzm.Dr.1, Prof.Dr.2. Fizyoloji. Y.Doç.Dr.3. Dermatoloji. Doç.Dr.4.

Geliş tarihi : 05 Nisan 1994

ler olmak üzere, kolşisin, interferon, immunosupresif ilaçlar, azotiyopürin gibi sitotoksik ajanlar, siklosporin A gibi antibiyotikler kullanılmış; ve her bir tedavi şekli için, etkili veya etkisiz olduğunu ileri süren, birçok çalışma yayınlanmıştır (14,19,20,23,29,35).

Diğer taraftan, Behçet hastalığında gözlenen, (vasküler ve endotelial hücre hasarını da kapsayan), doku harabiyeti, stimüle nötrofiller tarafından aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin üretilmesine (21,29); ve aynı zamanda nötrofillerde (29) ve plazmada (28) serbest radikal tutucu aktivitenin azalmış olmasına bağlanmaktadır. Hatta, hastalığın şiddeti ile serbest radikal tutucu aktivite arasında ters bir ilişki olduğu da gösterilmiştir (28). Bu nedenle, serbest radikal toplayıcı aktiviteye sahip farmakolojik ajanların, Behçetli hastaların tedavisine katkıda bulunabilecekleri düşünülebilir. Nitekim, lipozomal süperoksit dismutaz (SOD)'ın Behçetli hastalarda tedavi etkisinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (22).

Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761) serbest radikal toplayıcı olarak önerilen farmakolojik ajanlardan biridir. İn vitro ve in vivo çalışmalar, EGb 761'in antioksidan etkiye sahip olduğunu ve serbest radikal tutucu aktivitesinin bulunduğunu göstermektedir (8). Üniversitemizde yapılan in vitro bir çalışmada da, EGb 761'in antioksidan etkisi, eritrositler üzerinde gösterilmiştir (18).

Behçetli hastalarda, EGb 761'in tedavi amacıyla kullanılabilmesi ya da en azından denenebileceği görüşünü benimsediğimizden in vitro olarak planlanan bu çalışmada, Behçetli hastalardan elde edilen eritrosit süspansiyonlarında H_2O_2 indüksiyonu ile oluşturulan lipid peroksidasyonu üzerine, EGb 761'in antioksidan etkisi araştırıldı.

METODLAR

Çalışmada kullanılmak üzere, serbest piyasadan (Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.), 100 ml'sinde 4.0 g Ginkgo biloba yaprakları kuru ekstresini içeren ve 9.6 mg Ginkgo flavoglikozid/ml olacak şekilde standardize edilmiş bir preparat (EGb 761, Tebokan® fort) seçildi.

Erciyes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dermatoloji Kliniğine başvuran ve ISG (Uluslararası Çalışma Grubu) kriterlerine (15) göre, "Komplet Tip" Behçet hastalığı tanısı konulan, 20-40 yaşlar arasında (ortalama±SD: 27.0±7.37 yaş) 10 erkek hasta çalışma kapsamına alındı. Benzer yaş grubunda (ortalama±SD: 26.4±6.72 yaş) herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan 10 erkek Tıp Fakültesi öğrencisi ve personeli de çalışmamızın sağlıklı grubunu oluşturdu.

Hastalık süresi 1-18 yıl arasında değişen hastaların kan örnekleri toplanırken, hastalığın aktif fazında olmasına ve hastalara, en azından son bir hafta içerisinde, hiç bir tedavi uygulanmamasına özen gösterildi.

Behçetli hasta ve sağlıklı kişilerden alınan heparinli kan örneklerinden eritrosit süspansiyonları elde edildi (32). 10^{-3} M Sodyum azid içeren 0.015 M fosfat tamponlu salin (PBS-azid, pH 7.4) ile 1:1 oranında dilüe edilen süspansiyonlarda, siyanomet-hemoglobin metodu ile hemoglobin (Hb) ölçümü yapıldı. Daha sonra, eritrosit süspansiyonları, final inkübasyon karışımında 3.75 mg Hb/ml olacak şekilde, PBS-azid ile tekrar dilüe edildi.

5.0 ml eritrosit süspansiyonu içeren deney tüplerine sırasıyla, deney ortamında ml'sinde 25 ve 250 µg konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan Ginkgo biloba ekstresinden 1'er ml ilave edildi. Kontrol olarak 5.0 ml eritrosit süspansiyonu ve 1.0 ml PBS-azid karışımı kullanıldı. EGb 761 ve PBS-azid içeren karışımlar, 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra, lipid peroksidasyonunu indüklemek amacıyla ortama 5 ml 20 mM H_2O_2 ilave edilerek, 1 saat daha 37 °C'de inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonucunda, karışımlarda oluşan lipid peroksidasyonu, tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli bir kompleks yapan malondialdehit (MDA, peroksidasyon yıkım ürünü) üzerinden tayin edildi (32) ve sonuçlar nmol MDA/g Hb olarak verildi.

Sağlıklı kontrol ve Behçetli hasta gruplarından elde edilen veriler "Student's t" testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca, her iki grup, kendi içlerinde varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında, F değeri önemli bulunduğundan, ortalamalar arasındaki

farklılıklar, daha sonra POST-ANOVA (Scheffe's procedure) testi ile değerlendirildi (6).

BULGULAR

PBS-azid (kontrol), düşük (25 µg/ml) ve yüksek (250 µg/ml) konsantrasyonlarda EGb 761 içeren, Behçetli hasta ve sağlıklı kişilerin eritrosit süspansiyonlarında, H₂O₂ ile bir saatlik inkübasyon sonucunda oluşan MDA üretimi, Tabloda gösterilmiştir.

Hem Behçetli, hem de sağlıklı gruplarda EGb 761'siz ortamda çalışılan kontrollerle (MDA üretimi % 100) karşılaştırıldığında; 25 µg/ml ve 250 µg/ml EGb 761'in MDA oluşumunu, Behçetli has-

talarda sırasıyla % 23 ve % 55 oranında (p<0.001); sağlıklı kişilerde sırasıyla % 20 ve % 58 (p<0.001) oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca, istatistiki karşılaştırmalar sonucunda, peroksidasyona karşı, EGb 761'in eritrositler üzerindeki koruyucu etkisinin, her iki grupta da konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmektedir (p<0.001).

Behçetli hastalar ve sağlıklı kişilerde, H₂O₂ ile indüklenen lipid peroksidasyonunun derecesi (kontrol deneyleri) birbiriyle karşılaştırıldığında; Behçetli hastalarda, sağlıklı kişilere göre, MDA oluşumu daha üst seviyede bulunmuştur (p<0.001). Ayrıca, düşük ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılan EGb 761'in, sağlıklı grup üzerinde, istatistiki bakımdan, daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (p<0.01, p<0.001).

Tablo 1. Behçetli hasta ve sağlıklı kişilerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarında, H₂O₂-indüksiyonu ile oluşturulan MDA üretimi üzerine, EGb 761'in in vitro antioksidan etkisi

EGb 761 Konsantrasyonu	SAĞLIKLI GRUP (n=10)			BEHÇETLİ GRUP (n=10)		
	MDA Üretimi			MDA Üretimi		
	nmol MDA/g Hb	%	İnhibisyon %	nmol MDA/g Hb	%	İnhibisyon %
Kontrol (PBS azid)	785.39±29.55	100	0	907.40±75.38 ^Δ	100	0
25 µg/ml	632.06±37.63 [*]	80	20	698.13±58.46 ^{*,*}	77	23
250 µg/ml	327.05±45.38 ^{*,a}	42	58	400.45±33.38 ^{*,*,a}	45	55

MDA değerleri aritmetik ortalama ve standart sapma (X±SD) şeklinde gösterildi

Önemlilik Testleri,

1. Student t testi kullanarak, sağlıklı ve Behçetli hasta grupları arasında
 - Kontrollerin birbiriyle (Δ:p<0.001)
 - EGb 761 konsantrasyonlarının birbiriyle (*:p<0.01; **:p<0.001)
2. ANOVA ve post-ANOVA testlerini kullanarak, sağlıklı ve Behçetli hasta gruplarının kendi içlerinde
 - Kontrole göre (*:p<0.001)
 - EGb 761 konsantrasyonuna (25-250 µg/ml) göre (a:p<0.001) karşılaştırılması şeklinde yapıldı.

n: Denek sayısı

TARTIŞMA

Değişik organ tutulumlarıyla multisistemik bir hastalık görünümünde olan Behçet hastalığının etyolojisi kesin olarak bilinmemekle beraber, PMN aktivitesi ile hastalık atakları arasındaki ilişki, anormal kemotaksi, fagositoz, nötrofil ömrünün kısalması ve bazı nötrofil lizozomal enzim aktivitelerindeki değişiklikler, aşırı serbest radikal üretimi, son yıllarda dikkati çeken araştırma konularıdır (16,21,34); ve PMN antioksidan savunma sistemlerinin hastalığın etyopatogenezi ile ilgili olabileceği sanılmaktadır (29).

Üniversitemizde Behçetli hastalar üzerinde yapılan bir araştırmada da, PMN lökositlerin fonksiyonlarının bozulduğu ve antioksidan sistemde yer alan enzim aktivitelerinin azaldığı gözlenerek; serbest radikal üretiminin çok arttığı ve doku harabiyetine yol açtığı kanısına varılmıştır (10). Ayrıca, nötrofillerde (29) ve hatta plazmada (28) serbest radikal tutucu aktivitenin azalması, hastalığın şiddetiyle ters ilişkili olarak bulunmuştur. Bu nedenle, Behçetli hastaların tedavisinde, serbest radikal toplayıcı ajanların önemi giderek artmaktadır.

Bitkisel kökenli bir bileşik olan BG-104'ün, rekombinant SOD aktivitesi ile karşılaştırılabilen, serbest radikal tutucu aktiviteye sahip olduğunu belirleyen Pronai ve Arimori (27); daha sonra, bu bileşiği tedavi amacıyla Behçetli hastalar üzerinde denemişler ve etkisini, gene bu hastalara uygulanan vitamin E ile karşılaştırmışlardır: Tedavi öncesi çok düşük olarak buldukları plazma serbest radikal tutucu aktivitenin; BG-104 ya da vitamin E uygulanmasından sonra, hızla yükseldiğini gözlemişlerdir (28).

Günümüzde, serbest radikal toplayıcı olarak önerilen farmakolojik ajanlardan biri de Ginkgo biloba ekstresidir. Yaklaşık 5000 yıl önce, Çinlilerin ilk farmakopesinde yer alan Ginkgo biloba'nın yapraklarından elde edilen ekstratlar (8), yüzyıllardır terapötik amaçla kullanılmakta (11) ve 1965'den bu yana da standardize edilmiş ticari preparatları hazırlanmaktadır (31).

Standardize Ginkgo biloba ekstresi, EGb 761, % 24 oranında ginkgoflavoglikozidleri (kaemferol,

quercetin, izorhamnetin) ve % 6 oranında terpenoidleri (ginkgolid A, B, C ve bilobalid) içeren kompleks bir üründür (17); ve bu aktif bileşenlerin hepsi, çeşitli derecelerde EGb 761'in farmakolojik etkilerine katılmaktadır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, EGb 761'in antioksidan etkiye sahip olduğunu ve serbest radikal tutucu aktivitesinin bulunduğunu göstermektedir: EGb 761'in ratların beyinde (4) ve karaciğer mikrozomlarında (26) lipid peroksid oluşumunu inhibe ettiği, gene ratlarda retinayı lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu (12), reperfüzyon hasarını önlediği (33) bildirilmiştir. İnsanlarda, karaciğer mikrozomlarında siklosporin A ile *in vitro* olarak indüklenen lipid peroksidasyonunun (1) ve solubl bir agonistle uyarılan nötrofillerden serbest oksijen radikal salınımının (25), Ginkgo biloba ekstresi tarafından konsantrasyona bağlı olarak önlediği gösterilmiştir.

Bu çalışmada da, Behçetli hastalardan ve sağlıklı kişilerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarında, H_2O_2 ile indüklenen lipid peroksidasyonunun, EGb 761 konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. H_2O_2 ile indüksiyon sonucunda, Behçetli hastalara ait eritrosit süspansiyonlarında, MDA oluşumunun, sağlıklı kişilerdekine göre daha fazla olması; buna karşılık, her iki grupta da EGb 761 tarafından hemen hemen eşit oranlarda inhibe edilmesi, dikkat çeken bulgulardır. Yapılan literatür taraması sonucunda, bizim çalışmamıza benzer bir çalışmaya rastlayamadığımız için, bulgularımızı karşılaştırma imkanımız olmamıştır. Ancak, EGb 761'in antioksidan özelliklerini ve çeşitli deney sistemlerinde lipid peroksidasyonunu önlediğini gösteren çalışmalar, bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Diğer taraftan serbest oksijen radikallerinin, eritrositlerde peroksidasyonun yanısıra, membran bütünlüğünü bozduğu eritrosit-enzimlerini inaktive ettiği ve hemoglobini denature ettiği de bilinmektedir (5). Behçetli hastalarda, indüklenme sonucu, MDA oluşumunun daha fazla olması, bu hastalardan serbest radikal üretiminin iyice arttığını ve eritrositlerin de bu radikaller tarafından hasar görmüş olabileceğini yansıtabilir. EGb 761'in rat eritrositlerinde osmotik frajilitiyi azaltarak, membranı stabilize ettiği ve eritrosit agregasyonunu önleyerek kan akışkanlığını artırdığı (13); ayrıca, hem lipofilik, hem de hidrofilik özellikleri nedeniyle (8), eritrosit membranlarındaki fosfoli-

pid bölgelerine kolaylıkla penetre olduğu gösterilmiştir (13). Bu bulgular, hem Behçetli hastalarda, hem de sağlıklı kişilerde, EGb 761'in, MDA oluşumunu etkilemesini açıklayabilir.

Robak ve Gryglewski (30)'ye göre, EGb 761'in içerdiği flavonoid antioksidanlar O_2^{\bullet} üretimini azaltırken, ekstrenin ginkgolid bileşenleri, OH^{\bullet} radikalinin neden olduğu daha ileri serbest radikal zincir reaksiyonlarında MDA oluşumunu önlemektedir. Böylece EGb 761, flavonoid bileşenleriyle O_2^{\bullet} anyonlarını toplayarak, EDRF mekaniz-

masını korumakta (7); ginkgolide bileşenleriyle de PAF'la indüklenen platelet agregasyonunu ve O_2^{\bullet} üretimini önlemektedir (3). Ayrıca, son zamanlarda EGb 761'in SOD aktivitesine sahip olduğu da gösterilmiş ve SOD'nin ekstrenin antioksidan, serbest radikal tutucu ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkilerinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (10).

Sonuç olarak, EGb 761'in Behçetli hastalarda, tedavi amacıyla uygulanmasının faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Barth SA, Inselmann G, Engemann R, Heidemann HT. Influence of Ginkgo biloba on cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver microsomes in comparison to vitamin E, glutathione and N-acetyl-cysteine. *Biochem Pharmacol* 41:1521-1526,1991.
2. Behçet H. Über Residivierende Aphthose, durch ein virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dermatol Wochenschr* 105:1152-1157,1937.
3. Braquet P, Hosford D. Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. *J Ethnopharmacol* 32:135-139,1991.
4. Chatterjee SS, Gabard B. Protection of doxorubicin toxicity by an extract of Ginkgo biloba. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 319 (Suppl), abstr 57,1982
5. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipid* 45:251-268,1987.
6. Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Basic and Clinical Biostatistics*. Appleton and Lange, Connecticut 1990, pp 101-103, 124-141.
7. Defeudis FV. EDRF-update. *Drugs Today* 25:115-117,1989.
8. Defeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological Activities and Clinical Applications. Editions Scientifiques Elsevier, Paris, 1991, pp 1-8, 25-94.
9. Diwok M, Kuklinski B, Ernst B. Superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Z Gesamte Inn Med* 47:308-311, 1992.
10. Doğan P, Soyuer Ü, Tanrikulu G, Utaş S. Serum and polymorphonuclear leukocyte antioxidant systems in Behçet's disease. *Invest Dermatol* 93:297,1989.
11. Dricu K. Preparation and definition of Ginkgo biloba extract. *Presse Med* 15:1455-1457,1986.
12. Droy-Lefaix MT, Bonhomme B, Doly M. Protective effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on free radical-induced changes in the electroretinogram of isolated rat retina. *Drug Exp Clin Res* 23: 225-234,1991.
13. Etienne A, Hecquet F, Clostre F, De Feudis FV. Comparison des effets d'un extrait de Ginkgo biloba et de la chlor-promazine sur la fragilité osmotique, in vitro, dérythrocytes de rat. *J Pharmacol (Paris)* 13:291-298,1982.
14. Fierlbeck G. Morbus Behçet: Therapie mit rekombinantem interferon-gamma. *Dtsch Med Wochenschr* 114:1769,1989.
15. International Study Group for Behçet's Disease: Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 335:1078-1080,1990.
16. James DW, Walker JR, Smith JD. Abnormal polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 38:219-221,1979.
17. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba. *Lancet* 340:1136-1139,1992.
18. Köse K, Doğan P. The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on H₂O₂-induced lipoperoxidation in human erythrocyte membranes in comparison with alpha-

- tocopherol and uric acid. *Tr J of Medical Sciences* 20: (in press), 1994.
19. Masuda K, Nakajima A, Urayama A, et al. Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behçet's disease. *Lancet* i:1093-1096,1989.
 20. Müftüoğlu AÜ, Pazarlı H, Yurdakul S, et al. Short term cyclosporin A treatment of Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 96:275-282,1987.
 21. Niwa Y, Miyake S, Sakane T. 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.
 22. Niwa Y, Semiya K, Michelson AM, Puget K. Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen related human disorders. A preliminary study. *Free Rad Res Commun* 1:137-153,1985.
 23. O'duffy JD. Behçet's syndrome. *Current Therapy in Dermatology* Provost TT, Farmer ER (Eds). Philadelphia, BC Decker Co,1985,97-101.
 24. O'duffy JD. Behçet's Syndrome. *N Eng J Med* 322:326-327,1990.
 25. Pincemail J, Thirion A, Dupuis M, et al. Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. *Experientia* 43:181-184,1987.
 26. Pincemail J, Deby C. Antiradical properties of Ginkgo biloba extract (EGb 761). IN: Fünfgeld FW (ed). *Rokan (Ginkgo biloba). Recent Results in Pharmacology and Clinic.* Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 1988, pp 71-82.
 27. Pronai L, Arimori S, Nakazawa H. Superoxide scavenging activity of BG-104 before and after sonication-determined by ESR spin trapping method. *Biotherapy* 2:63-68, 1990.
 28. Pronai L, Arimori S. BG-104 enhances the decreased plasma superoxide scavenging activity in patients with Behçet's disease, Sjogren's syndrome or hematological malignancy. *Biotherapy* 3:365-371, 1991.
 29. Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, Arimori S. Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clin Exp Rheumatol* 9:227-233,1991.
 30. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37: 837-841,1988.
 31. Sticher O. Quality of ginkgo preparations. *Planta Med* 59:2-10,1993.
 32. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit J Haematol* 20:95-111,1971.
 33. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P. Free radical mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGb 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* 23:225-234, 1991.
 34. Yamada M, Namba K. Lysosomal enzymes from patients with Behçet's disease. In: Inaba G, ed. *Behçet's disease. Jap Med Res Found Pub No 18,1981,pp 259-267.*
 35. Yazıcı H, Pazarlı H, Barnes CG, et al. A controlled trial of azathioprine in Behçet's syndrome. *N Eng J Med* 322:281-285, 1990.
 36. Zouboulis Ch C. Morbus Adamantiandes-Behçet: nekrotisierende system vaskulitis mit letalem Ausgang. *Hautarzt* 42:451-454, 1991.