

T1243

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA YAŞLILIĞA BAĞLI İNFLAMASYON
CEVABINDAKİ DEĞİŞİKLİĞE L-KARNİTİN'İN ETKİSİ

T1243/1-1

UZMANLIK TEZİ

DR. ARZU AĞAÇ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. V. NİMET UYSAL

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 99.01.0103.12

proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir

ANTALYA, 2001

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
2. GENEL BİLGİLER	
2. 1. YAŞLANMA	3-19
2. 2. YAŞLANMA VE İMMUN SİSTEM	20-28
2. 3. KARNİTİN	29-36
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	37-46
4. BULGULAR	47-58
5. TARTIŞMA	59-67
ÖZET	68-69
İNGİLİZCE ÖZET	70
KAYNAKLAR	71-95

KISALTMALAR

O_2^-	süperoksid anyonu
H_2O_2	hidrojen peroksid
OH	hidroksil radikali
1O_2	tek (singlet) oksijen
O_3	ozon
HOCl	hipokloröz asit
HOI	hipoiyodit
HOBr	hipobromit
NO , ONOO	reaktif nitrojen türleri
PUFA	poliansature yağ asitleri
ROS	reaktif oksijen türleri
MCO	metal ile oluşan oksidasyon
SOD	süperoksid dismutaz
CAT	katalaz
GSH-Px	glutasyon peroksidaz
Se	selenyum
GSH	redükte glutasyon
MIP-1 α	makrofaj inflamatuvar protein
TNF	tümör nekrozis faktör
DAG	diçilgliserol
IP $_3$	inositol trifosfat
PI	fosfatidilinositol

PIP	fosfatidilinositol 4-monofosfat
PIP ₂	fosfatidilinositol 4, 5-bifosfat
G-CSF	granulosit koloni stimüle edici faktör
rG-CSF	rekombinant granulosit koloni stimüle edici faktör
rIFN-gama	rekombinant interferon gama
COX	siklooksijenaz
LOX	lipoksijenaz
LPS	lipopolisakkarit
PAF	trombosit aktive edici faktör
AA	araşidonik asit
ZAS	zimosan ile aktive edilmiş serum
CPT-I	karnitin palmitol transferaz-I
CPT-II	karnitin palmitol transferaz-II
RO ⁻	lipid alkoksil radikali
MNF	mononükleer fagositler
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂
LTB ₄	lökotrien B ₄

GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşlanma, vücut fonksiyonlarının giderek artan kaybı ile karakterize fizyolojik bir süreçtir. Özellikle işitme, görme gibi duyu fonksiyonlarının azalması, renal, pulmoner ve nöronal fonksiyonlar ile kan basıncını düzenleyen mekanizmalarda oluşan yetersizlikler ve bağışıklık sistemindeki kayıplar yaşlanmanın karakteristik özelliğidir (1-4).

Yaşam süresince büyüme, yetişkinlik ve yaşlılık dönemlerinin genetik olarak programlanmış olduğunu ileri süren görüşün yanısıra, son yıllarda yapılan araştırmalar yaşlanma ile ilgili ekstrensek faktörler üzerinde yoğunlaşmış olup, elde edilen bulgular yaşlılığa ait pekçok bozukluğun sorumlusunun serbest radikaller olduğunu ortaya koymaktadır. Serbest radikaller, hücreleri lipid, protein, DNA, karbonhidrat, enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederek, oksidatif hasara uğratmaktadır (5-8). Yapılan çalışmalar, yaşlanmanın, normal aerobik metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller aracılığı ile oluşabilecek doku hasarına karşı kusurlu ya da eksik koruma sonucu meydana geldiğini göstermektedir (7, 8). Dokuların spontan otooksidasyona karşı olan dirençlerinin yaşla birlikte azalmasının, daha fazla peroksidasyona maruz kalması sonucu hasarlanmasına ve inflamatuvar reaksiyonların yaygınlaşmasına neden olduğu kaydedilmiştir (3, 9) Bunun yanısıra antioksidan verilmesi ile yaşlılığa bağlı doku hasarı seyrinin yavaşlatılabildiği gösterilmiştir (10-12).

Serbest radikallerin en önemli kaynağı hücrelerdeki elektron transport sistemleridir (13). Bunun yanısıra fagositik hücrelerin fagositoz fonksiyonları

sirasında oluşan solunumsal patlama da serbest radikal kaynakları arasındadır. Enfeksiyon etkenlerinin yıkımında kullanılan ve solunumsal patlama ürünleri olan serbest radikaller hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştıklarında dokulara zarar verirler (14-16). O halde antioksidan bir madde ile antioksidan kapasitenin desteklenmesi serbest radikallerin yaşlılıkta gözlenen bu istenmeyen etkilerini ortadan kaldıracabilecektir (10-12).

Organizmada uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri membranından taşınmasını sağlayan bir aminoasit türevi olan L-karnitin, membran stabilize edici etkisinin yanısıra, antioksidan bir maddedir (17). Aynı zamanda eikosanoid yapımını da etkilediği, özellikle PGE₂, PGI₂ ve LTB₄ yapımını arttırması nedeniyle antiinflamatuvar etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak L-karnitinin inflamatuvar hücre fonksiyonları üzerine olan etkisi hakkında çok fazla bilgi bulunmamakla birlikte, mevcut bilgiler de çelişkilidir (17-19).

Bu çalışmada, L-karnitinin yaşlanmaya bağlı olarak bozulan nötrofil, makrofaj fonksiyonlarına ve inflamatuvar değişikliklere olumlu etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. YAŞLANMA

Yaşlanma; fizyolojik fonksiyonların ilerleyici kaybı ile karakterize bir süreçtir. Yaşlanma, zamana bağımlı fonksiyon azalması olup, hücrenin oksidatif stres oluşturan olaylara karşı durma kapasitesinin azalması olarak kabul edilmektedir. Bu tanıma göre, yaşlanma birbirine bağımlı iki biyolojik olayın sonucudur: 1. Fonksiyon kaybı. 2. Strese adaptasyonun ve direncin kaybı. Bugüne kadar yaşlanma mekanizmasının yeterli bir moleküler açıklaması yapılamamıştır. Araştırmacıların çoğu biyolojik yaşlanmayı, organizmanın homeostazi sağlamadaki başarısızlığı olarak kabul eden görüşü benimsemişlerdir (5). Selüler homeostatik yetmezlik ile ilgili öne sürülen faktörler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Yaşlanmanın hücrenel nedenleri

Yaşlanmanın genomik olarak programlanmış mekanizmaları
Koordine edici sistemlerin yetmezliği
Nöral nedenler
Nöroendokrin nedenler
Endokrin nedenler
İnformasyonel yetmezlik
Bazların yer değiştirmesi veya kaybı
DNA ve RNA kaybı
Tek iplik kırılmaları (single strand breaks)
Transkripsiyonel ve translasyonel bozukluklar
Yapısal hasar veya modifikasyon
Membran hasarı ve hücre kaybı
Protein değişimleri ve glikasyon
Lipid ve karbonhidratların oksidatif modifikasyonu
Hasar oluşturuıcı maddelerin birikimi
Tamir kapasitesinin kaybı

Yaşlanma yaşam süresince oluşan hasarlar tarafından artırılan selüler ve ekstraselüler komponentlerdeki morfolojik ve fonksiyonel değişimlerle ilişkili,

genetik fizyolojik bir olaydır. Hormonal, otokrin, nöroendokrin ve immün homeostatik mekanizmaları içeren, organizmanın düzenleyici sistemlerinde ilerleyici bir dengesizliğe neden olur. Buna bağlı olarak hastalığa yakalanma eğilimi artar ve kişiler yaşlanma nedeniyle değil, farklı bir patolojik nedene bağlı olarak ölürlür (20-22). HücreSEL ve moleküler oksidatif hasarlanmanın artması hücre ölümünün en önemli nedenlerindedir (4). Yaşlanmanın kesin tanımını yapmak güçtür. Bunun yerine yaşlanmanın karakteristik özelliklerini belirtmek daha uygundur (5, 22).

YAŞLANMA HİPOTEZLERİNİN TEMELLERİ

Yaşlanma ile ilgili 300'den fazla teori vardır. Bu teoriler sebeplerine göre intrinsek ve ekstrinsek faktörler olmak üzere iki geniş kategoride toplanabilir (23). Oldukça basit görünmesine karşın, bu geniş sınıflandırma, çeşitli yaşlanma hipotezlerindeki temel moleküler değişikliklerin niteliğini belirlemeye yardımcı olmaktadır (4, 24, 25).

Yaşlanmanın İntrensek Faktörleri

Turlerin yaşam sürelerinin genetik olarak belirlendiği kabul edilmektedir. Yaşam siklusunda büyüme, yetişkinlik ve yaşlılık aktif olarak programlanmıştır (5, 26).

Yaşlanmanın Ekstresek Faktörleri

Son yirmi yıldır araştırmalar, yaşlanma ile ilgili ekstrinsek faktörler üzerinde yoğunlaşmıştır (27). Bunlar arasında en önemlileri serbest radikaller ve diyetdir (28, 29). Her ikisi de bir organizmanın normal yaşam boyu süren metabolizmasının ayrılmaz bileşenleridir. Diyet enerji için gereklidir. Serbest radikallerde oksijen metabolizması ile ilgilidir. Her iki faktör de, intrinsek genetik

komponentlerle etkileşerek yaşlanma olayını etkileyebilirler (30-32). Bu nedenle, programlanmış yaşlanma teorilerine karşıt olarak, ekstrensek faktörlere dayanan yaşlanma hipotezi, organizmanın genotipik adaptasyonu ve dış güçler tarafından değiştirilen çevreye uyum gösterebilme yeteneği ile ilgilidir. (33). DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidlerin serbest radikaller tarafından oksidatif hasara uğratıldığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Selüler hasarla ilgili bulgular, yaşlanma ve hastalık olaylarında, genetik komponentlerin ekstrensek faktörlerle oksidatif olarak değişime uğradığını göstermektedir (24).

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi ilk kez 1956 yılında D. Harman tarafından ortaya atılmıştır. Bu teoride, yaşlanmanın normal aerobik metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller aracılığı ile oluşmuş doku hasarına karşı kusurlu yada eksik bir koruma sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir (34).

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirlerdir (13).

Biyolojik sistemlerde normal oksijen metabolizması sonucu oluşan serbest radikaller; reaktif oksijen türevleri, O_2^- , H_2O_2 , OH , 1O_2 , O_3 , $HOCl$ ve reaktif nitrojen türleri, NO , $ONOO$, NO_2 v.s.'dir (4, 13).

SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

Çevresel Kaynaklar

Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksidehidler, sigara dumanı, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar ve radyasyon da serbest radikal üretimine yol açan çevresel faktörlerdir. Alışkanlık yapan maddeler, alkol ve uyuşturucular, antineoplastik ajanlar; nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine gibi ilaçlarda serbest radikal artışına yol açarlar (5). Çevresel faktörlere bağlı stres ile katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu durum, stresin, hastalıkların patogeneziindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (5, 6).

İntraselüler kaynaklar

Hücre organellerinin (endoplazmik retikulum, nükleus ve mitokondri) membranlarındaki elektron transport sistemleri serbest radikal kaynağıdır. Peroksisomlarda (ör: oksidazlar) ve plazma membranında (ör: lipoksijenazlar, prostaglandin sentetaz) bulunan enzimlerin aktivitesi bu radikallerin oluşumuna katkıda bulunur. Organizmada oksidatif strese neden olan durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) serbest radikal oluşumuna neden olurlar (4, 13).

Ayrıca aktive olmuş fagositler de, solunumsal patlama sırasında NADPH oksidaz enziminin aktivasyonu ile serbest radikal oluştururlar (13).

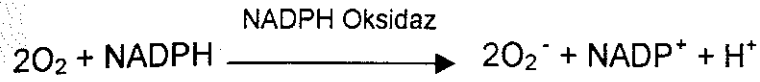
FAGOSİTOZİS VE SOLUNUMSAL PATLAMA

Fagositik hücreler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasına ve hasarına sebep olabilen, enfeksiyona karşı vücudun hücresel cevabını başlatan hücrelerdir (35).

Fagositlerde (nötrofiller, mononükleer fagositler, eosinofiller) oksijenin redüksiyon (superoksid anyonu, hidrojen peroksid, hidroksil radikalleri) ve eksitasyon ürünleri (singlet oksijen), onların sitotoksik özelliklerinden sorumludurlar. Bu maddeler, fagositöz esnasında mikroorganizmaların ve diğer yabancı hücrelerin yıkımında kullanılırlar. Bunlar hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştıklarında dokulara zarar verebilirler (35, 36, 37)

Fagositik hücreler, çözünebilir ya da partiküler bir stimulusla (opsonize mikroorganizmalar, mitojen ajanlar, sitokinler, araşidonik asit metabolizma ürünleri, kompleman fragmanı C_{5a}, bakteriyel orjinli N-formillenmiş oligopeptidler gibi) uyarıldığında bu zararlı etkenin yıkım mekanizması aktive olur (37,38). Fagositik hücre, kendisine bağlanmış olan etkeni psödopodları ile çevreleyip içine alarak, fagozom adı verilen vakuol oluşturur. Fagositlerde bulunan ve bakterisidal enzimleri içeren sitoplazmik granüller ekzositoz ile, zararlı etkeni içeren fagositik vakuollere ve interstisyel boşluğa içeriklerini boşaltırlar (degranülasyon). Bu sırada hücre zarına bağlı bir enzim olan NADPH oksidaz aktive olur ve toksik oksijen metabolitleri üretilir. Bu metabolitler lizozomal enzimlerin sindirim için yetersiz kaldığı durumlarda daha çok bakteriyi yok etmekte etkin rol oynar. Toksik oksijen metabolitleri ve granüllerinden gelen proteolitik enzimlerin bileşkesiyle fagosit çok etkili bir öldürme aygıtı halini alır (37, 38, 39)

Solunumsal patlamadan sorumlu olan NADPH oksidaz enzimi, fagositik hücre membranının iç yüzeyinde bulunur. NADPH oksidaz aktivasyonu ile indirgenmiş piridin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron, iki molekül oksijene transfer edilir. Böylece, iki molekül superoksid oluşturulur (40, 41)

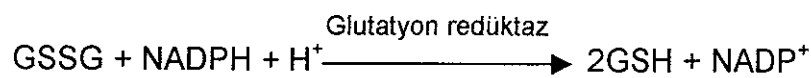
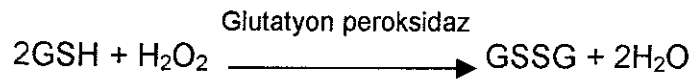


Fagositler tarafından solunumsal patlama sırasında tüketilen oksijenin çoğu, süperoksid ara ürünü oluşturulduktan sonra bakterisidal bir ajan olarak kullanılan hidrojen peroksida dönüştürülür (38, 42, 43).

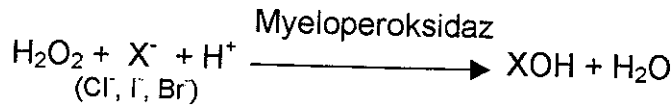


Süperoksidin sınırlı reaktivitesine rağmen, iyon komplekslerini indirgeyebilmesi ya da okside edebilmesi, metallerle ligandlar oluşturabilmesi, organik substratları okside edebilmesi ve perhidroksil radikaline dönüşmesi nedeniyle fagosit aracılı sitotoksitede önemli rol oynar (38,44).

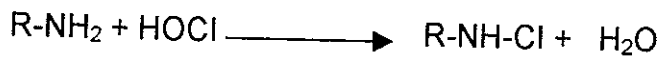
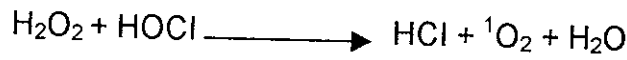
Fagositlerin stimülasyonu, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukoz oksidasyonunda artış oluşturur. Heksoz monofosfat şantı, glukozun karbon dioksit ve beş karbonlu bir şekerde okside olduğu, elektron alıcısı olarak NADP^+ 'nin görev yaptığı bir metabolik yoldur (4). Fagositik hücrelerde bu yolla glukoz oksidasyonu, NADPH 'in oksidasyonuna bağlı NADP^+ oluşum oranı ile sınırlıdır. Bu yüzden şant aktivasyonu, solunumsal patlama sırasında NADPH 'in NADP^+ 'e oksidasyonunun arttığını gösterir. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılarak, oksijenin süperoksida indirgenmesi sonucu NADP^+ üretimi artar, heksoz monofosfat yolu aktive olur. NADP^+ 'nin diğer kaynağı, hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir (4, 25).



Solunumsal patlamanın amacı, fagositler tarafından mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılacak oksidan ajanlar sağlamaktır. Bu oksidan ajanları kullanan mikrobisidal sistemlerden biri myeloperoksidaz sistemidir. Nötrofiller, primer lizozomal granullerinde bir hem enzimi olan myeloperoksidaz ihtiva ederler. Nötrofilde, antimikrobial aktiviteden sorumlu tutulan ilk oksidatif metabolizma ürünü hidrojen peroksittir. H_2O_2 myeloperoksidaz ile birlikte güçlü antimikrobial aktivite gösterir (40) Myeloperoksidaz, çeşitli bileşikler (elektron ya da hidrojen dönörleri) okside edebilen bir enzim-substrat kompleksi oluşturmak için, substratı olan hidrojen peroksid ile birleşir Myeloperoksidaz, hidrojen peroksid varlığında, florür dışındaki halojenlerin (klorür, iyodür ve bromür) oksidasyonunu katalizler Bu reaksiyonda myeloperoksidaz, halojenler'den hidrojen perokside iki elektron transferi yapar, okside halojen meydana gelir (40, 41).



Hipohalous asitler olan HOCl, HOI ve HOBr, ile bunların tuzları güçlü oksidanlardır ve biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerler H_2O_2 ile reaksiyona girerek singlet oksijeni, glukozamin ve taurin gibi aminlerle reaksiyona girerek kuvvetli oksidanlar olan klorlanmış aminleri oluştururlar.



Amonyum reaksiyonları kuvvetli bir oksitleyici olan NH_2Cl 'u meydana getirir Bu bileşik özellikle tiyol grupları için zararlıdır. Onları sulfoksitlere dönüştürerek -SH gruplarının oksidasyon/reduksiyon reaksiyonlarına katılmalarını engeller (40, 41, 44).

SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler

a. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Lipid peroksidasyonu, biyolojik sistemlerde poliansature yağ asitleri'nin serbest radikaller tarafından oksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi ve ölçülmesi, hastalıklarda serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (45).

Lipid peroksidasyonu; serbest radikallerin PUFA'lerinin metilen grubundan bir hidrojen atomu çıkartması ile başlar. Oluşan karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile konjuge dienleri oluşturur. Konjuge dien ise, oksijen ile birleşerek, peroksil radikalini oluşturur. Oluşan bu radikal, diğer bir yağ asitinden hidrojen atomu çıkartarak zincir reaksiyonunu başlatır. Üç aşamalı zincir reaksiyonunun son ürünleri, lipid hidroperoksitler ve peroksi radikallerdir. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı sonucu, peroksil radikali ve malonildialdehid gibi maddeler oluşur (46, 47).

Lipid hidroperoksitleri, fizyolojik şartlarda oldukça stabil moleküllerdir. Ancak geçiş metalleri veya metal kompleksleri varlığında yapıları bozulur. Ör; in vivo Fenton reaksiyonuna katılan tüm redoks-aktif demir kompleksleri, lipid hidroperoksit yapısındaki bozulmayı hızlandırabilmektedir (48, 49)

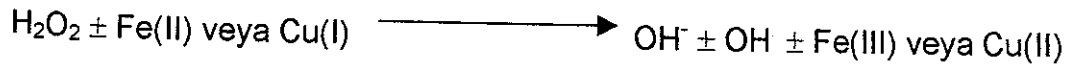
Biyolojik membranlarda yoğun lipid peroksidasyonu, akışkanlık kaybı, membran potansiyellerinde düşüş, H^+ ve diğer iyonların permeabilitesinde artışa ve sonuçta hücre membranının yırtılarak, organellerin dışarı sızmasına neden olur (47).

Lipid peroksidlerinin parçalanma ürünleri yaşla birlikte artarlar. Bu ürünlerin klasik örneği "lipofussin" ve "ceroid" dir. Bunlara "kromolipidler" veya "yaş pigmentleri" adı verilir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin, amino asit, protein, fosfolipid ve DNA'daki primer amino grupları ile reaksiyonları sonucu meydana gelirler. Yaşla birlikte lipofussin sentezi artar ve memelilerde özellikle sinir sistemi ve kalp kası hücreleri gibi postmitotik (bölünmeyen) hücrelerde birikir (4, 13).

b. Membran proteinlerine etkileri (Protein Oksidasyonu)

Aerobik organizmalar yaşam süreleri boyunca, direkt ya da indirekt olarak proteinlerde hasar oluşturabilen çeşitli reaktif oksijen türlerine maruz kalırlar. Proteinlerde hasar oluşturabilen ROS'un en fazla MCO sistemlerinin etkisi ile ortaya çıktığı gösterilmiştir (50).

Uygun bir elektron vericisinin varlığında (NADH, NADPH, askorbat, merkaptanlar), MCO sistemlerinin H_2O_2 oluşturma ve hem süperoksid bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla Fe(III) veya Cu(II)'yi indirgeyebilme yetenekleri vardır. Bu reaksiyonlarda oluşan Fe(II) veya Cu(I)'in proteinler üzerindeki metal bağlayıcı kısımlara bağlanması, OH oluşumuna yol açar (50). Bu hidroksil radikalleri özellikle, proteinlerin metal bağlayıcı kısımlarındaki amino asit rezidülerine saldırır ve karbonil gruplarının oluşumuna yol açar:



Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinler proteolitik yıkım için hedeftir; ancak, bazı okside protein formları, aynı zamanda diğer proteinlerin okside formlarının yıkımını sağlayacak proteazları da inhibe edebilme yeteneğindedir (50). Yaşlanmaya bağlı olarak oksidasyona uğramış proteinlerin birikimi ROS

oluşum hızındaki (oksidatif stres) yaşa bağlı artışı, antioksidan savunma sistemindeki azalışı, proteolitik aktivitedeki azalışı ya da tüm bu faktörlerdeki eş zamanlı değişiklikleri yansıtır (47, 50)

Karbonil gruplarının tespiti, yaşlanma ve değişik patolojilerde oksidatif stres durumları altındaki protein hasarının bir göstergesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (50).

c. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açabilirler. Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır (4, 13) Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. Yapılan çalışmalarda; aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksidin membranlardan kolayca geçerek, hücre çekirdeğine ulaşıp DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (3, 13).

d. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bu ürünler diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olayların gelişiminde etkilidirler (48, 51-59)

Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. PUFA

ve karbonhidrat oksidasyonun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği gösterilmiştir (47, 49)

Serbest radikaller, bu etkilerinden dolayı çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadırlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (51-59).

ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidan madde, okside olabilen bir substrat ile karşılaştırıldığında çok düşük konsantrasyonlarda bile, o substratın oksidasyonunu belirgin olarak geçiktiren veya önleyen bir bileşik olarak tanımlanmaktadır (6). Antioksidan maddeleri, etki mekanizmasına göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırmak mümkündür

Enzimatik antioksidanlar; süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S- transferaz, hidroperoksidaz ve mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi'dir Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; lipid fazda bulunan α - tokoferol, β -karoten ve sıvı fazda bulunan askorbik asid, melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutatyon'dur.

ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR

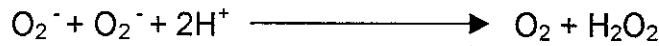
a. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksid dismutaz, aerobik ortamda hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden koruyan bir enzimdir (60)

Süperoksit radikali, aerobik canlılarda kaçınılmaz bir şekilde meydana gelir. O_2^- , oksijenin π^*2p orbitallerinden birine bir elektron girdiği zaman oluşur (49). Bu radikal başka organik radikallerin oluşumuna neden olarak toksik etki gösterebilmektedirler (60, 61)

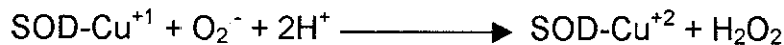
Süperoksit radikalleri, organik hidroperoksitlerle RO^- 'lerini oluşturur ve SH gruplarını disülfidlere oksitleyerek, tiyol radikallerinin oluşmasına neden olur. Oksijen radikalleri redüktan özelliklerinden dolayı Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye dönüştürür. Diaçil peroksitlerle 1O_2 üretimini sağlar (60, 61).

SOD, aşağıdaki reaksiyon yoluyla, O_2^- 'nin dismutasyonunu sağlayarak H_2O_2 ve moleküler O_2 oluşumunu sağlamaktadır (60, 62).



Yapı bakımından ve aktif merkezindeki geçiş metal iyonları yönünden enzimin hücre içinde iki değişik formu vardır. Bunlar Mn içeren SOD ve Cu-Zn içeren SOD'dur.

Cu-Zn içeren SOD: Primer olarak ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunur. Ayrıca mitokondride de yer almaktadır. 32000 dalton molekül ağırlığındadır (62). Disülfid köprüsüyle bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer adet Cu^{+2} ve Zn^{+2} içermektedir (63). Bu elementler enzim aktivitesi için mutlaka gereklidir. O_2^- dismutasyonu Cu^{+2} ile sağlanır



Eritrositler sadece Cu-Zn SOD içerirler. Cu-Zn SOD insan nötrofillerinde total SOD'nin %85'ini oluşturur ve düşük molekül ağırlıklıdır (62, 63). SOD

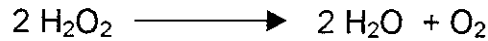
fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde rol oynar (4). Lenfositler granülositlerden daha fazla SOD içermektedir. Yapılan çalışmalarda SOD aktivitesindeki genetik ve sonradan edinilmiş değişiklikler ile hastalıklara karşı hassasiyetin birbiriyle ilişkili olabileceği kaydedilmiştir (64, 62, 63).

Mn içeren SOD: Prostetik grup olarak Mn içerir. Daha çok bakterilerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde bulunur. Bakteriyel enzim eşit büyüklükteki iki alt birimden oluşur ve her alt ünite bir Mn^{+} atomu içerir. Molekül ağırlığı 40000 daltondur. Mitokondrial enzim ise molekül ağırlığı 80000 dalton olan tetramerdir (65).

b. Katalaz (CAT)

Katalaz, 4 subunit içeren ve 240 000 D molekül ağırlığı olan bir hemoproteindir (66).

Enzim, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in, su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek ortamdaki uzaklaştırır. H_2O_2 urat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-amino asid oksidaz gibi birçok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oksijene iki elektron transfer edilmesi ile oluşur (66).



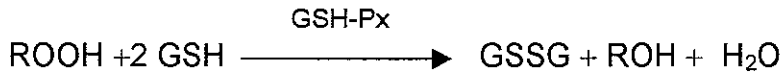
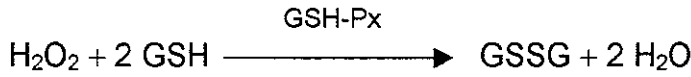
CAT karaciğerde, eritrositte, kemik iliğinde, muköz membranlarda ve böbrekte yoğun olarak bulunur. En yüksek konsantrasyonlara karaciğer ve eritrositte rastlanmaktadır. Karaciğerin CAT aktivitesinin yüksek olması, oluşan peroksitlerin etkisiz hale getirilmelerine katkıda bulunduğunu göstermektedir (67). Eritrositlerin metabolik hızlarının daha düşük olmasına rağmen buradaki yüksek CAT aktivitesi, hemoglobinin oksidasyonunun önlenmesi için gerekmektedir. Eritrositler, H_2O_2 'i su ve oksijene çeviren GSH-Px aktivitesine de

sahiptir. Bu iki enzim birbirinin eksikliğini kompanse ettiği için eritrositler oksidatif hasara karşı korunmaktadırlar (67).

c. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon Peroksidaz, dokulardaki ve vücut sıvılarındaki H₂O₂'in ve lipid hidroperoksidlerinin parçalanmasını katalizler. Böylelikle vücut dokularını oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol oynarlar (68).

Selenyum bağımlı ve Se'dan bağımsız iki tipi vardır. İnsan eritrositlerinde sadece Se'a bağımlı GSH-Px'in bulunduğu bildirilmiştir (69, 70). Eritrosit içindeki GSH-Px, hemoglobinin peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak Heinz cisimciği şeklinde presipitasyonunu engeller. Yine aynı koruyucu etkisini eritrosit membranı üzerinde de gösterir. Lökosit ve makrofaj gibi fagositik hücrelerde GSH-Px yüksek aktiviteye sahiptir. Bu enzim, hücreleri fagositoz sırasında kendi ürettikleri hidroperoksidlere karşı korur (70).



NON-ENZİMATİK ANTIOKSİDAN SİSTEM

a. Vitamin E

İnsan kan plazması ve eritrosit membranlarında lipid solubl zincir kırıcı antioksidan kapasitesinin hemen hemen tamamından vitamin E sorumludur (71, 72).

Vitamin E zincir kırıcı antioksidan etkisini gösterirken kendisi de tokoferil radikaline dönüşür. Tokoferil radikalinin tekrar aktif tokoferol durumuna

gelebilmesi için vitamin C ve tiyoller (örneğin GSH) kullanılır. Vitamin E, singlet moleküler oksijenle de reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir (72).

b. Vitamin C (Askorbik asit)

Vitamin C'nin koruyucu etkisi sitoplazmada serbest radikal temizleyici etkisine ve Vitamin E'nin tüketilmesini önleyerek veya onu yeniden yapılandırarak membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumasına bağlanmaktadır (73, 74)

C vitamini bir antioksidan olarak, suda çözünen peroksil radikallerini, singlet oksijeni, hidroksil radikalini ortadan kaldırır. Ayrıca karsinogenik nitrosaminlerin inaktif ürünlere indirgenmesini sağlar C vitamini, aktive nötrofillerin indüklediği plazma lipidlerinin peroksidasyonunu engeller (74, 75).

c. Tiyoller

Biyolojik tiyoller, sülfür metabolizması ürünleridir. Tiyoller, flavoproteinler, sitokromlar, askorbat, reaktif oksijen türleri, aminoasitler gibi intraselüler moleküllerle reaksiyon sonucu disülfidlere oksitlenirler (76).

d. Redükte glutatyon (GSH)

GSH, -SH grubu içeren protein yapısında olmayan bir tiyoldür. GSH oksidatif strese karşı önemli bir role sahiptir. Organik hidroperoksitler, intraselüler GSH'ın okside forma dönüşmesiyle zararsız hale getirilir (70).

Protein tiyollerini indirgeyerek doğrudan bir antioksidan etki gösterir. Bu önemli görevinden başka, membranlarda aminoasit transportunda ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında rolleri vardır (64). GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinin peroksidatif hasarına engel olarak, eritrositi zararlı etkilerden korur. GSH'ın hemen hemen tamamı hücre içinde yerleşmiştir (70).

e. Melatonin

Melatonin, $\cdot\text{OH}$ radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki, bunun da ortamdaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (4, 77).

Melatoninin antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısı ile hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de hemen kolayca geçer (77). Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer antioksidanlara göre çok daha üstün bir özelliğini teşkil eder (77, 78).

Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi de azalır ki, buna bağlı olarak bununda yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli rolü olabileceği kaydedilmiştir (77).

Yaşlanmaya bağlı olarak antioksidan kapasitenin azaldığı, yaşlı organizma dokularının gençlerin dokularına göre daha fazla peroksidasyona maruz kaldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (3). Antioksidan kapasitenin azalması nedeniyle doku hasarlanmasının yaşlılarda arttığı uzun süredir bilinmektedir (3, 6)

Bununla birlikte yaşlanmada antioksidan sistem aktivitesi ile ilgili çelişkili bulgular vardır. Bazı araştırmacılar tarafından katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin yaşla birlikte arttığı ileri sürülürken (4, 79), bir başka çalışmada; antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve glutatyon peroksidazın hepatik aktivitelerinde yaş ile düşme olduğu gösterilmiştir (13). Rodriguez ve ark.(70) eritrositlerde yaptıkları çalışmalarda, glutatyon peroksidaz düzeyinde değişiklik

bulamamışlar, fakat glutatyon redüktaz aktivitesinin yaşa bağlı yükseldiğini saptamışlardır. Bu araştırmacılar yaşlanma süresince antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki yükselmeyi, yükselen lipid peroksidasyonuna koruyucu reaksiyon olarak yorumlamışlardır. Ayrıca glutatyona bağlı oksidatif detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin orta yaşlarda en aza inip, yaşlanma ile oksidatif stresin artmasına bağlı olarak arttığını belirten araştırmacılar da vardır (25). Buna karşın Sohal ve ark.(64), CAT ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin ve redükte glutatyon konsantrasyonunun yaş ilerledikçe azaldığını göstermişlerdir.

Bütün bu bulgulara rağmen serbest radikallerin yaşlanmanın sebebi mi yoksa sonucu mu olduğunu söylemek zordur. Ancak serbest radikallerin en azından başlamış olan yaşlanma olayını hızlandığı ve yaşlanma ile beraber ortaya çıkan bir çok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinen bir gerçektir (6).

2. YAŞLANMA VE İMMUN SİSTEM

İmmun sistemde değişikliğe neden olan en önemli faktörlerden biri olan yaşlanma, bu sistemin fonksiyonlarının baskılanması ile birlikte enfeksiyonlara ve neoplastik hastalıklara eğilimin arttığı fizyolojik bir süreçtir (1-3, 80-84). Tablo 1'de immun sistem fonksiyonlarında yaşlanmaya bağlı değişiklikler gösterilmiştir (80, 85, 86).

Tablo-1: Yaşlanmada gözlenen immunolojik değişiklikler

B lenfositleri	T lenfositleri	Germinal Merkez
B lenf. matürasyonu ↓	Bellek T hücreleri ↑	İmmun komplekslerin oluşumu ↓
B7-2 ekspresyonu ↓	Nativ T hücreleri ↓	Dendritik hücre trafiği ↓
Repertuar dejenerasyon ↑	IL-2 üretimi ↓	Ig hipermutasyonu ↓
İdiyotipik toplanma ↓	IL-2 reseptörü ↓	
	Kalsiyum sinyalleri ↓	
	Protein kinaz sinyalleri ↓	

Yapılan çalışmalar genç ve yaşlıların immun sistem fonksiyonlarında farklılık olduğunu göstermektedir. Yaşlılarda özellikle lökosit ve lenfosit sayısının, humoral ve hücre-aracılı bağışıklığın azaldığı tespit edilmiştir (85)

Organizma sürekli olarak hastalık yapıcı etkenlere maruz kalmaktadır. Kanda bulunan lökositler ve lökositlerden türeyen doku hücreleri organizmayı bu enfeksiyöz ve toksik ajanlara karşı korumak üzere ilk savunma hattını oluşturan önemli hücrelerdir (80, 85).

NÖTROFİL VE MAKROFAJLARIN SAVUNMA FONKSİYONLARI

Nötrofiller ve makrofajlar, bakteri, virus ve diğer zararlı etkenlere karşı aşağıda belirtilen özellikleri ile karşı koyarlar

- 1- Nötrofil ve monositler aktive oldukları zaman damar duvarındaki porlardan geçebilirler (Diapedesis) (35, 87).
- 2- Nötrofil ve makrofajlarda ameboid hareket vardır. Bu hücreler 40 $\mu\text{m}/\text{dak}$ hızla hareket ederler (36, 88).
- 3- İnflamasyon olan dokudan salgılanan çeşitli kimyasal maddeler hücrelerin kendilerine doğru hareketine neden olur (Kemotaksis) (35, 39, 89) Bakteriyel ve viral toksinler (35, 88, 89), inflamasyon bölgesinden açığa çıkan ürünler (IL-1, IL-8, LTB₄, PAF, TNF, MCP 1,2,3) (35, 89, 90) ve kompleman sistemine ait ürünlerin (C_{5a}, C_{5b}, C₆, C₇, C_{3a}) (35, 90-92), kemotaksisi arttırmaktadır

Ayrıca nötrofil kemotaksisi α_1 -proteinaz inhibitörü (α_1 -antitripsin) ile düzenlenir. α_1 -proteinaz inflamatuvar sürecin regulasyonunda rol oynar. Kemotaksis üzerine yüksek konsantrasyonda (>10 mg/ml) stimülatör, düşük konsantrasyonda (<0,02 mg/ml) inhibitör etki yapmaktadır (92, 93)

- 4- Nötrofil ve makrofajlar zararlı etkeni hücre içine alarak sindirebilirler (Fagositozis). Fagositozis enfeksiyon yapan ajanlara karşı immun cevabın başlatılmasında anahtar rol oynar (35-37)

İnflamasyon Sırasında Nötrofil ve Makrofaj Cevapları

Bakteri, travma, kimyasal maddeler, ısı yada benzeri bir nedenle oluşan doku zedelenmesi, o bölgede inflamatuvar değişikliklere yol açar (35, 94).

İnflamasyon, lokal damarlarda vazodilatasyon ve buna bağlı lokal kan akımı artışı, kapiller permeabilitenin artması ile interstisyel alana büyük miktarda sıvı sızması, bu alanlara kapiller damarlardan çok miktarda fibrinojen ve öteki proteinlerin geçişi ile sıvının pıhtılaşması, hasarlanan doku ile sağlam doku arasında bir duvar oluşumu ile karakterizedir (35, 41,43,44).

Histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandinler, kompleman sisteminin birçok ürünleri bu reaksiyonlara neden olan doku ürünleridir (38, 39, 42, 43).

1-) İnflamasyonun başlangıcından sonra birkaç dakika içinde inflamasyon ürünleri ile aktive olan doku makrofajları genişleyerek, tutundukları bölgeden kopup, hareketli hale gelirler ve fagositoz yapmaya başlarlar (35, 95).

2-) İnflamasyonun başlangıcından sonraki ilk saat içinde büyük sayıda nötrofil inflamasyon bölgesine göç eder. Nötrofil göçü, inflamasyon bölgesinden salınan maddeler tarafından oluşturulur ve bu maddeler aşağıdaki reaksiyonlara neden olurlar (36, 96-98).

a) Bunlar kapiller endotel hücrelerinin ve nötrofillerin yüzeyinde adezyon moleküllerinin ortaya çıkmasını sağlar. Böylece nötrofiller inflamasyon bölgesindeki kapiller damar duvarına yapışır (marginasyon). Adezyonda, IL-1 gibi mediatörler ve nötrofil yüzeyinde bulunan L-selektin molekülü, p150-95 proteinleri, ekstraselüler matrikste bulunan laminin ve fibronektine yapışmayı sağlayan reseptörler önemli rol oynarlar (99-101). Aktive olmuş PMN'den salınan MIP-1 α , inflamasyon bölgesinde adezyon moleküllerinin ortaya çıkışını artırır (87, 93, 96). Aynı zamanda monositler için güçlü bir kemoatraktan olduğundan inflamasyonun gerilemesi sürecinde bölgede monosit/PMN oranının artmasına neden olur. Makrofajlar tarafından salgılanan IL-10 da kemokin üretimine ve PMN birikimine negatif düzenleyici etki yapar (91, 93, 96, 102).

b) Nötrofiller şekil değiştirerek damar duvarından inflamasyon bölgesine geçerler (35, 87).

c) İnflamasyonun bazı ürünleri de nötrofillerin inflamasyon bölgesine hareketini sağlarlar (fMLP, LTB₄, C_{3a}, C_{5a}, IL-8 vs) (35, 89, 90).

Doku tahribatı başladıktan sonra birkaç saat içinde bölgeye gelen nötrofil sayısında büyük artış olur. Bu hücreler ölü hücreler için toplayıcı özellik gösterir ve yabancı materyal böylece ortamdaki uzaklaştırılmış olur (95, 96).

İnflamasyonun başlangıcından sonraki birkaç saat içinde kandaki nötrofil sayısı da 4-5 kat artar (Nötrofil). Nötrofil dolaşıma giren ve kemik iliğine ulaşan inflamasyon mediatörleri tarafından oluşturulur. Bu olay inflamasyon bölgesine daha fazla nötrofil akışını sağlar (36, 96-98).

3-) İnflamasyon bölgesine ikincil makrofaj geçişi savunmanın 3 basamağını oluşturur. İnflamasyon bölgesindeki nötrofillerden salgılanan MIP-1 α 'nın etkisiyle bölgeye göç eden monositler dokuda makrofaj haline gelirler (87, 91, 93).

Dolaşımdaki monositlerin sayısı azdır ve kemik iliğindeki monositlerin depolanmış miktarı nötrofillerden daha azdır. Bu nedenle inflamasyon dokuda makrofajların yapılması nötrofillerden daha yavaş olur ve birkaç günü gerektirir (35, 37). Dokuya geçen monositler fagositik aktivite için henüz olgunlaşmamış hücrelerdir. Bu hücrelerin lizozom sayısının artması ile büyük boyut kazanmaları ve fagositosis için tam kapasiteli hale gelmeleri için 8 saat daha dokuda kalmaları gerekir. Birkaç haftaya kadar makrofajlar inflamasyon bölgesinde en önemli fagositik hücreler haline gelirler. Nedeni ise; makrofajların nötrofillere göre daha çok bakteri daha büyük partikül ve daha fazla miktarda nekrotik doku fagosit etmeleridir (35,37,40,96).

4-) Bundan sonraki aşamada kemik iliğinde granülosit ve monosit yapımının artması söz konusudur (91, 102). Bu durum kemik iliğindeki monositik ve granülositik öncül hücrelerin stimülasyonuna bağlıdır. İnflamasyon bölgesinden kana verilen mediatörler (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1) kemik iliğini daha çok hücre üretmek için uyarır ve inflamasyon bölgesine daha fazla hücre ulaştır (41, 103).

YAŞLANMA VE NÖTROFİLLER

Nötrofiller inflamatuvar reaksiyonun başlangıcında etki gösteren önemli hücrelerdir. Nötrofil fonksiyonları bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı savunmada önemlidir, çeşitli nedenlerle nötrofil sayısının azalması enfeksiyona yatkınlığı artırır (99-101,104, 105).

Yaşlılarda enfeksiyon hastalıklarından dolayı morbidite ve mortalite oranlarının genç yetişkinlerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bilinmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak nötrofil sayısında ve fonksiyonlarındaki azalma bunun en önemli nedeni olarak görülmektedir (99, 100). Yaşlılardan alınan nötrofillerin aderensleri, kemotaksisleri, fagositozisleri ve intraselüler mikrobisidal aktivitelerindeki değişiklikler incelenmiş, tüm bu fonksiyonlarda gençlerle karşılaştırıldığında azalma tespit edilmiştir (99, 100, 105).

Vasküler endotelyuma PMN'lerin yapışması inflamasyon sürecinin bileşenlerinden biridir. İnflamasyon bölgesine PMN'lerin toplanması, patojenlerin lokalizasyonunda ve savunmada önemlidir. Silverman ve ark. (106) tarafından yapılan çalışmada; naylon liflere PMN adezyonunun, yaşlı deneklerde gençlere göre daha az olduğu bulunmuştur (101,106). Bu araştırmacılar tarafından, yaşlı organizmadaki plazma faktörlerinin, nötrofillerin

endotel tabakasına yapışmasındaki azalmanın nedeni olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmalar proadeziv plazma faktörleri olan IL-1 ve TNF'nın, insan endotel hücresi üzerine PMN yapışmasında etkili olduğu gösterilmiştir (100, 107, 108). Proadeziv moleküller (ör; yüksek molekül ağırlıklı plazma faktörleri) romatizmal ve inflamatuvar hastalıklara yol açmaktadır. Yaşlı plazması %70'den daha fazla oranda nötrofil adezyonunu baskılamaktadır. Bu faktörler, yaşlı popülasyonda artmış enfeksiyon riskinde önemlidir (100, 107). Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak nötrofillerin damar endotelyumu üzerine yuvarlanma (rolling) fonksiyonunda azalma gözlenir ki bunun nedeni, L-selektin ekspresyonunun azalmasıdır (101)

İnflamasyon, kemotaktik ajanların etkisi ile PMN'lerin hızla bölgeye toplanmasıyla karakterize bir olaydır. Kemotaktik ajanlara cevaben PMN göçünün sağlıklı yaşlı insanlarda azaldığı gösterilmiştir (111, 119-121). Bunun yanısıra enfeksiyonlu yaşlılarda PMN'lerin kemotaktik aktivitesi enfeksiyon semptomu olmayan yaşlılardan önemli olarak düşük bulunmuştur (111, 119)

PMN'deki fagositoz sırasında meydana gelen solunumsal patlamanın artması, savunma sisteminin yeteneği ile ilişkili olmasına karşın fazla miktarda O_2^- salınımı dokularda ciddi ve geriye dönüşümsüz patolojik değişikliklere yol açmaktadır (122, 123)

Yaşlılarda fagositik aktivitenin azaldığı gösterilerek, fagositoz sırasındaki PMN aracılı solunumsal patlama aktivitesi süspanse ve adere hücrelerde incelenmiştir. Adere PMN'lerde etkilenmeyen O_2^- üretimi, adere olmayanlarda yükselmiş bulunmuştur. Yaşlılarda hücre adezyonunun azalması nedeniyle O_2^- salınımının etkilenebileceği ifade edilmiştir (123, 124, 125).

Nötrofil fonksiyonlarında intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun da önemli olduğu bilinmektedir. Yaşlanmaya bağlı nötrofil fonksiyonundaki değişiklikler ile $[Ca^{+2}]_i$ arasında ilişki gösterilmiştir (109, 110, 111) Sağlıklı yaşlılardan alınan nötrofillerde; DAG ve IP_3 'ün gençlerin nötrofilleri ile karşılaştırıldığında önemli olarak daha az üretildiği tespit edilmiştir. FMLP ile aktive edilen yaşlı nötrofilleri, genç nötrofilleri ile karşılaştırılınca, PI, PIP ve PIP_2 'in konsantrasyonlarının büyük oranda düşük olduğu gözlenmiştir. İn vitro koşullarda yapılan deneylerde IP_3 ve DAG üretimindeki düşmenin yaşlı nötrofillerde genç nötrofillerden sadece %17 düşük olduğu belirlenmiştir. Yaşlanmada, kritik önemi olan fosfoinosidlerin konsantrasyonlarındaki azalmadır, bu da anahtar ikincil habercilerin üretiminde azalma ile sonuçlanır (112-114)

Yaşlanmayla, guanine-nucleotide bağlayıcı protein (G proteinleri)'in düzeyinde de primer defekt olduğu belirtilerek, hücre içi sinyal geçiş mekanizmasındaki bozukluğun buna bağlı olabileceği ifade edilmektedir. Yaşlanma ile G_{α} altünitesinin yapısında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (110)

Hematopoetik bir sitokin olan G-CSF'nin, nötrofilik hücreler üzerine multipl biyolojik etkileri vardır. G-CSF; nötrofilik zincirdeki progenitör hücrelerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu stimüle eder. Kemik iliğinden depolanmış nötrofillerin mobilizasyonu ile periferel kan nötrofil sayısında yükselmeye yol açar. G-CSF, kemoterapiden sonra veya kemik iliği transplantasyonundan sonra nötropenili hastalarda tedavi için uygulanmaktadır (115-117). Yapılan çalışmalarda rG-CSF'nin çeşitli nedenlerle azalmış periferel nötrofil sayısını, O_2^- salınımını ve fagositik aktiviteyi normal düzeyine döndürdüğü ileri sürülmüştür. Ayrıca yaşlanmaya bağlı nötrofil fonksiyonlarındaki bozukluğu da ortadan

kaldırmaktadır. Yaşlı farelerin periton boşluklarından alınan fagositik ve kemotaktik aktiviteleri azalmış nötrofillerin, G-CSF tedavisi ile gençlerin nötrofillerindeki değerlere ulaştığı gösterilmiştir rG-CSF granülopoiesisi arttırarak, nötrofil fonksiyonlarının yaşa bağlı kaybını ortadan kaldırmaktadır (115, 117, 118).

Yuli ve ark (126)'ları plazma membran viskozitesindeki değişikliklerin nötrofil fonksiyonlarını etkilediğini göstermişlerdir. Azalmış plazma membran viskozitesi artmış kemotaksis ve azalmış süperoksid anyon üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Rivnay ve ark. (127)'ları, lenfositlerde Shinitzky (128) nöronal hücrelerde plazma membran viskozitesinin yaş ile arttığını rapor etmişlerdir. Perskin ve ark(99)'ları nötrofillerin plazma membran viskozitesinin yaş ile arttığını göstererek, nötrofil fonksiyonlarının bozulmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdir.

YAŞLANMA VE MAKROFAJLAR

Bazı yazarlar makrofaj fonksiyonlarının yaşlanmayla değişmediğini ifade ederken, bazı yazarlarda yaşlı farelerde monosit-makrofaj sisteminin fonksiyonel kapasitelerinin yükseldiğini belirtmişlerdir. Fakat genel olarak bulgular yaşlanmayla makrofaj kapasitesinin düştüğü yönündedir (129-133).

Makrofajların fibronektin ve tip I kollajene adezyonu yaşlanma süresince artar. Bu artış, makrofajın hücre yüzey reseptörlerinin konsantrasyonu ile ilişkilidir ve yaşlanma sürecinde aterogenesis oluşumuna yol açar (135, 136). Yaşlı hayvanların makrofajlarının adezyon kapasitesi yüksek olduğu halde, kemotaksis kapasitesi düşüktür (136).

Yapılan çalışmalarda rIFN-gamaya makrofaj cevabının yaşlanmayla azaldığı, makrofajın O_2^- ve TNF-alfa sekresyonu gibi iki aktivasyonu ölçülerek gösterilmiştir. Yaşlı ratlardan alınan makrofajlar IFN-gamayla induklenince sinyale cevap yeteneğinde azalma tespit edilmiştir (137, 138). Makrofajlarda üretilen IL-1, TNF ve IL-6 miktarı yaşlanmayla azalmaktadır. İmmün sistemin kontrolünde önemli role sahip bu sitokinlerin azalması, fonksiyonlarda bozukluğa yol açar (143-145).

Yaşlı farelerin makrofajlarında PGE_2 üretimi genç farelerden daha fazladır, PGE_2 araziidonik asitten, siklooksijenaz enzim aktivitesi ile oluşur. Yaşlı hayvanlardan alınan makrofajların, LPS ile stimüle edilmesi durumunda COX aktivitesi gençlerinkinden fazla bulunmuştur. LPS ile stimüle PGE_2 üretimindeki yaşa bağlı yükselme COX 2 enziminin sentezindeki artışa bağlıdır (143, 144, 145).

Yaşlanmaya bağlı olarak, makrofaj fonksiyonlarındaki değişikliğin nedenlerinin araştırıldığı çalışmalarda; rat peritoneal makrofaj membranlarının akışkanlığı ve lipid kompozisyonu incelenmiştir. Yaşlı hayvanlarda; total fosfolipid düşüp, kolesterolün yükseldiği ve buna bağlı olarak da kolesterol/fosfolipidin oranının arttığı saptanmıştır. Yaşlanmaya bağlı olarak, fosfatidilserin ve kardiyolipinin yükselmiş, fosfatidilkolin ve fosfatidilinositol düşmüş olduğu bulunmuştur. Buna karşın oleik, linoleik ve dokosaheksanoik asidin düzeyinde yükselme tespit edilmiştir. Lipid profilindeki yaşa bağlı değişiklik membranla ilgili fonksiyonlarda değişiklik beklentisine yol açmıştır (139-141)

3. KARNİTİN

İlk kez 1905 yılında keşfedilmiş olan karnitin (trimethylammonium hydroxide), molekül ağırlığı 161.2 D olan bir maddedir. Serbestçe suda çözünür ve kokusuzdur (146-149).

Karnitin organizmada sentezlenen endojen bir madde olduğu halde, besinlerle de alınabilir (148). Hayvansal besinlerde (özellikle sığır kalbi), bitkisel besinlere (özellikle pirinç) göre daha fazla oranda bulunmaktadır (147).

Karnitin biyosentezi, lizin moleküllerinin proteinlere inkorporasyonu ile başlar ve peptide bağlı E-N-trimethyllysine oluşturmak üzere S-adenosylmethionine ile metillenir. Bundan sonraki basamakta proteaz aktivitesi ile, protein bağlı E-N-trimethyllysine'den serbest E-N-trimethyllysine salınır. Serbest E-N-trimethyllysine karnitin biyosentezinde kullanılır (147, 148). Karnitin biyosentezini katalize eden 4 enzim vardır; E-N-trimethyllysine hydroxylase, β -hydroxy-E-N-trimethyllysine aldolase, aldehyde dehydrogenase ve γ -butyrobetaine hydroxylase'dir. Bu enzimlerden sadece E-N-trimethyllysine hydroxylase mitokondrial enzim olup, diğerleri sitozoliktir (146, 148, 149). Karnitin biyosentezi için demir, askorbik asit, piridoksin ve niasin kofaktör olarak gereklidir (148, 150).

E-N-trimethyllysine'i γ -butyrobetaine dönüştüren enzim olan γ -butyrobetaine hydroxylase'ın bulunduğu dokular türe özgü farklılıklar gösterir. Bu enzim sıçanlarda karaciğer ve testiste, insanlarda karaciğer, böbrek ve beyinde tesbit edilmiştir (148, 149).

Besinlerle vücuda alınan karnitinin absorpsiyon yeri ince barsaktır. Fakat az miktarda kolonda da absorbe edildiği gösterilmiştir (146-148). Hamilton ve

ark. (148), in vitro olarak insan ince barsak mukozasında karnitin absorpsiyonu için 2 mekanizmanın varlığını ileri sürmüşlerdir. Luminal karnitin konsantrasyonu 1000 μM 'dan az ise aktif transport, 1000 μM 'dan fazla ise pasif difüzyon ile absorbe olmaktadır. L-karnitin için aktif transport sodyum bağımlı olup, D-karnitin ile inhibe olabilmektedir. Fizyolojik olarak aktif transport önemlidir. Çünkü duodenal sıvıda karnitin konsantrasyonu açlık sırasında 2 ± 1 μM , yemek sonrasında 209 ± 36 μM olarak saptanmıştır. Pasif difüzyon ince barsakta gözlenmez, ancak kolonda vardır ve karnitin farmakolojik dozlarında önem kazanabilir (146, 148).

Karnitin barsak lümeninden intestinal mukozaya geçişi oldukça hızlıdır ve yaklaşık %40'ı burada asetillenir. Karnitin, serbest karnitin (L-karnitin) ve asetilkarnitin olarak dolaşıma verilir. Barsak mukozasında karnitin asetilasyonunun fizyolojik önemi bilinmemektedir (148, 149).

Karnitin portal kanla karaciğere taşınır ve sistemik dolaşıma salınır. Karnitin hücrelere girişi aktif transport ile olmaktadır. Yapılan çalışmalarda iskelet kasındaki karnitin konsantrasyonunun plazmadakinden ~70 kez fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer gradient diğer dokularla ekstraselüler sıvı arasında da mevcuttur (146, 148).

Organizmadaki karnitin %95'i iskelet kasında ve kalpte, %1'i ekstraselüler sıvıda ve %4'ü diğer dokularda (özellikle karaciğer ve böbrek) bulunur. Karnitin kullanımı için organizmada bulunan enzimler L-karnitin için spesifiktir (146, 148, 149).

Karnitin plazmadaki konsantrasyonu 25-50 μM dır. Kan karnitin düzeyi böbrekler tarafından düzenlenmektedir. Plazma karnitin düzeyi normal olan

kişilerde ultrafiltrattaki karnitinin %90 dan fazlasının proksimal tübülde reabsorbe olduğu gösterilmiştir (146, 148) Plazma karnitin konsantrasyonu arttığı zaman, renal absorpsiyonda azalma olmaktadır Yapılan çalışmalarda böbrekte sentezlenen ve tübülden reabsorbe olan karnitinin serbest karnitin veya açilkarnitin olduğu gösterilmiştir. İdrarla atılan açilkarnitin en önemli formu asetilkarnitin olup, asetilkarnitin, serbest karnitine oranı plazmadan yüksektir. Bunun nedeni serbest karnitin reabsorpsiyonunun asetilkarnitine göre daha fazla olmasıdır (146, 147)

FONKSİYONLARI

Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matriksine transportunda ve mitokondri içinde acyl CoA/CoA düzenlenmesinde önemli rol oynar (148, 149, 152). Uzun zincirli yağ asitlerinin transport ve aktivasyonu 4 ardışık reaksiyonu içerir

1) Acyl-CoA sentetaz sitozolde, uzun zincirli yağ acyl CoA, AMP ve pyrophosphate yapmak üzere, ATP ve CoA ile uzun zincirli yağ asidi reaksiyonunu katalizler.

2) Mitokondri dış membranın sitozolik yüzeyindeki CPT I karnitin ile uzun zincirli yağ acyl CoA ile karnitin reaksiyonunu katalizler, uzun zincirli yağ acylcarnitine ve CoA oluşur.

3) Carnitine-acylcarnitine translokazın etkisi, uzun zincirli yağ acylcarnitine'i iç mitokondrial membrandan-mitokondrial matrikse taşıyarak, mitokondrial matriksteki karnitin ile yer değiştirmesini sağlar

4) CPT II iç mitokondrial membranın matriks yüzeyinde bulunur. Mitokondrial matriksde CoA ile uzun zincirli yağ açilkarnitin reaksiyonunu

katalizler ve karnitin ile uzun zincirli yağ açıl-CoA oluşur ve β -oksidasyon sonucunda selüler enerji oluşur (147-149,152).

Karnitinin açilkarnitin olarak peroksizomların dışına, kısa zincirli β -oksidasyon ürünlerinin taşınmasında rolü vardır Aynı zamanda, amino asit ve sperm metabolizmasında önemlidir İnsan lenfositlerinin mitojenik stimülasyonuna verdiği proliferatif yanıtı ve PMN kemotaksisini arttırdığı gösterilmiştir (146, 148, 149) Ayrıca clusterin, fetuin veya fibrinojen gibi agregasyon proteinlerinin neden olduğu, eritrosit agregasyonunu inhibe eder (148).

Bunların yanısıra karnitinin, reaktif oksijen türlerinin organizmadaki zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda L-karnitinin Fe^{+2} ve Fe^{+3} aracılığı ile indüklenen peroksidasyona karşı şelasyon yaparak dokuyu koruduğu, OH yapımını azalttığı gösterilmiştir (148-150). Bu çalışmalarda L-karnitinin direkt radikal tutucu olmadığı ve bilinmeyen bir etki ile O_2^- yapımına etki ettiği belirtilirken, birçok araştırmacı xanthine/xanthine oxidase sistemini bloke ederek, superoksid anyon yapımını bloke ettiğini ifade etmektedirler (146). Ayrıca L-karnitin oksidatif stres ile tahrip olmuş fosfolipid tabakanın tamiratını sağlayarak, doku hasarını önlemektedir Membran stabilitesini koruyarak, iyon kanallarını veya protein ve lipidler arasındaki enzimatik aktiviteleri kontrol etmektedir (148) Karnitin hücre membranında kolesterol/fosfolipid oranını değiştirerek membran akışkanlığını arttırmaktadır (146, 149) Bunun yanısıra membran yapısına girerek membrana özel fonksiyonları modüle edebildiği de ileri sürülmektedir. Karnitin selektif Ca^{++} kanal aktivatörü gibi davranarak hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun artmasını

sağlamakta ve Ca^{++} kanal blokörlerinin kullanımı ile bu etkisi ortadan kaldırılabilmektedir (150, 151)

KARNİTİN YETMEZLİĞİ

Karnitin yetmezliği doku ve plazma karnitin konsantrasyonuna bakılarak tanımlanır. Karnitin alımının yetersizliği ve kaybın artması sonucu karnitin yetmezliği oluşur (148, 151, 153)

1) Primer karnitin yetmezliği

Intraselüler karnitin içeriğinin azalması, yağ asidi oksidasyonunda bozulma ile karakterizedir ve doku karnitini tükenmiştir. Metabolik bozukluklara neden olur (151, 153, 154).

a) Sistemik karnitin yetmezliği: Otozomal resesif geçişlidir. Infant ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkar. Progresif myopati, metabolik ensefalopati, hiperglisemi ve hiperamonyemi ile beraberdir. Kardiyak disfonksiyon ön plandadır. Kas, karaciğer ve plazma total karnitini düşüktür (151, 153). Renal tübül hücrelerinde, intestinal hücrelerde fibroblastlarda ve lökositlerde karnitin yetmezliği bulunur (148, 154).

b) Myopatik karnitin yetmezliği: Progresif proksimal kas güçsüzlüğü, egzersiz intoleransı, myalji ve myoglobininüri ile seyreder. İskelet kasında düşük karnitin düzeyi, hücrelerde lipid damlacıklarının birikimi ile karakterizedir (148, 151, 154)

c) Organik asidüriler: Açıkarnitin ve serbest karnitin oranı idrarda yükselmiştir. İdrarla karnitin atılımı artmıştır (148, 150)

2) Sekonder karnitin yetmezliği

Asemptomatik seyreder. Yetersiz alım, artmış ihtiyaç ve artmış kayıpla oluşur (153, 154). Yetersiz alım: Protein kalori malnutrisyonlarında görülür. Pirinçle beslenenlerde gözlenir, çünkü pirinç karnitin içermemektedir (148, 150, 155). Artmış karnitin ihtiyacı: Gebelik ve laktasyon durumunda ortaya çıkabilir. Artmış karnitin kaybı: Renal tübulopatiler ve kronik böbrek yetmezliğinde karnitin kaybı artar ve yetmezlik oluşur (151, 153).

Ayrıca valproik asit, pivampisilin, pivmesilamin, antrasiklinler (doksorubicin), sefaloridin, benzoik asit, lidokain alan hastalarda serum karnitin düzeyi düşmektedir. Çünkü bu ilaçlar karnitin ve açilkarnitin tübüler reabsorpsiyonunu spesifik olarak inhibe ederler (148, 151, 153, 154). Askorbik asit yetmezliğinde de karnitin yetmezliği oluşur (150, 151). Yaşlanmaya bağlı olarak da pek çok dokuda karnitin konsantrasyonu düşmektedir (156).

YAŞLANMA VE KARNİTİN

Yaşlanmaya bağlı olarak karnitin dokulardaki düzeyi azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda; serum, kalp, tibial kas, beyin, karaciğer ve idrar karnitin düzeylerinin yaş arttıkça azaldığı gösterilmiştir (156).

Yaşlılarda karnitin eksikliği ile lipofusin toplanması arasında ilişki olduğu, özellikle beyinde toplanan lipofusinin L-karnitin verilmesiyle azaldığı tesbit edilmiştir (156). Yaşlı sıçanlarda gözlenen öğrenme bozukluğu ve hafıza kaybının, yaşlanma sürecinde hipokampüste nöronal lipofusin toplanması ve nöronların kaybına bağlı olduğu ileri sürülmüştür, L-karnitin tedavisiyle yaşlanmaya bağlı lipofusin birikiminin azaldığı, hafıza kaybı ve öğrenme yeteneğinin yavaşça geri geldiği gösterilmiştir (157). Yaşlanma süresince

beyinde nörokimyasal değişiklikler de dikkati çekmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak; NMDA reseptörlerinin sayısında ve sodyum bağımlı kolin alımında azalma gözlenmektedir. Karnitin GABA'erjik ve/veya kolinerjik sistem üzerine de modulatör etki yapar. Yaşlı sıçanlara kronik karnitin verilmesi spasial öğrenme performansını düzeltir (158)

Kalp performansı yaşa bağlı azalmaktadır. Kalpte mitokondrial kardiolipin içeriğinin yaşlanmayla düştüğü, fakat yaşlı sıçanların L-karnitin ile tedavisi sonucunda mitokondrial iç membranındaki bu fosfolipidin normal düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. Kardiolipin düzeyi sitokrom oksidazın ve mitokondrideki adenin nukleotid translokazın optimal aktivitesine bağlıdır. L-karnitin tedavisiyle, bu enzim aktiviteleri normale döner, böylece kalp performansında artış olur (96).

Yapılan çalışmalarda yaşlı sıçanlarda, genç sıçanlara göre; mitokondrial membran potansiyeli ve selüler O₂ tüketimi düşük, oksidanların düzeyi daha yüksek bulunmuştur (159). Haftada birkaç kez L-karnitin ile beslenen yaşlı sıçanların mitokondrial fonksiyonlarının düzeldiği, oksidan miktarının genç sıçanların düzeyine indiği gözlenmiştir (159-161). Ayrıca sağlıklı insanlardan alınan kas örneklerinde yaşlanma ile karnitin düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (162). Yine yaşlı sıçanların karnitin ile tedavisinden sonra, yaşlı ve genç sıçanların eritrosit lipid profilleri arasında farkın ortadan kalktığı gözlenmiştir. İncelenen tüm yaş gruplarında karnitinin serbest ve esterifiye kolesterol ve araşidonik asidin plazmadaki düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir (163).

İMMÜN SİSTEM VE KARNİTİN

Yapılan çalışmalar karnitin, kemiricilerde, vasküler inflamasyon modellerinde antiinflamatuvar etkisi olduğunu göstermiştir. Karnitin PAF ile

indüklenen sıçan pençe ödemini; indometazin ve fenilbutazon kadar iyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Karnitinin antiinflamatuvar etkisi biomembranlar üzerine stabilize edici etkisine bağlanmaktadır (167, 169).

Karnitin inflamasyon mediatörlerinin salınımını düzenlemektedir. Lipid metabolizmasını etkilediği bilinen L-karnitin, hepatositlerde linoleik asitten araşidonik asid oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. AA'in metabolitleri (eikosanoidler) inflamasyonun lokal modülasyonunda önemlidir (18, 19, 164).

Karnitinin nötrofil süperoksid üretimini inhibe ederek, inflamatuvar sürecin vasküler komponentlerinde antiinflamatuvar etkisinin olduğu gösterilmiş (17) ve bu etkinin eikosanoidlerle düzenlendiği ileri sürülmüştür. L-karnitin makrofajlarda PGE₂ düzeylerini değiştirmedeği buna karşılık PGI₂ ve LTB₄ düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (18).

MNF'ler, hücre içi metabolizmasında rol oynayan karnitin asetil transferaz ve malonil Co-A-sensitif karnitin palmitoiltransferaz'ı sitoplazma ve mitokondrial fraksiyonlarda içermektedir. Bu bulgu karnitin mononükleer fagositlerin immun cevabı başlatmasında anahtar rol oynadığı göstermektedir (152, 165-167). Ancak makrofajların fonksiyonlarına karnitin etkisi ile ilgili çelişkili bilgiler vardır (17-19).

Karnitin antibakteriyel aktiviteye destek olucu etkisi de vardır. Bakteriyel enfeksiyonlu hastaların granülosit karnitin konsantrasyonlarının kontrolden yüksek olduğu bulunmuştur (166, 168).

T hücre bağımlı immün cevapta yaşlanmaya bağlı değişiklik olduğu ve L-karnitin tedavisinin lenfosit proliferasyonunu, ayrıca immünglobulin yapımını arttırdığı tesbit edilmiştir (166, 167).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

I) GRUPLANDIRMA VE DENEY PROTOKOLÜ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Özel Hematoloji Laboratuvarı, Merkez Araştırma Laboratuvarı Morfoloji Ünitesi ve Deneysel Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 2 aylık ve 24 aylık olmak üzere iki ayrı yaş grubundan 80 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Çalışma boyunca, sıçanların bulunduğu ortam ısı $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutularak, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü uygulanmıştır. Tüm hayvanlar deney süresince standart ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir

A) GRUPLANDIRMA

Genç (2 aylık) ve yaşlı (24 aylık) sıçanlar, kontrol ve L-karnitin verilecek grup olarak ikiye ayrılmışlardır. Çalışma 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, 40 adet sıçan aşağıda belirtildiği şekilde gruplandırılmıştır.

- a) Genç kontrol grubu (n=10, 2 aylık)
- b) Genç L-karnitin tedavili grup (n=10, 2 aylık)
- c) Yaşlı kontrol grubu (n=10, 24 aylık)
- d) Yaşlı L-karnitin tedavili grup (n=10, 24 aylık)

Kalan sıçanlar, ikinci aşama deneyler için yukarıda belirtildiği şekilde gruplandırılmış ve sırt bölgesinde inflamasyon oluşturulmuştur

Kontrol grubundaki sıçanlara 30 gün süresince 1 ml distile su gavaj ile verilirken, L-karnitin tedavili gruplara ise 1 ml distile su içinde hazırlanmış 50 mg/kg dozda L-karnitin (Sigma, no: C-0283) aynı yolla uygulanmıştır.

B) DENEY PROTOKOLÜ

30 günlük tedavi sürelerinin sonunda, ilk grup deneyler için ayrılan sıçanlara 12 saat açlığı takiben eter anestezisi yapılmıştır. Peritoneal makrofajları elde etmek için, 10 ml PBS (NaCl (Merck, D-6100) 145 mM; KCl (Merck, 4935) 2.68 mM; KH_2PO_4 (anhidro Sigma, P-5379) 1.47 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, S-0876) 6.46 mM; 1 lt. distile su içinde çözülüp, pH:7.4'e ayarlanmıştır) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. 3 dakikalık bekleme süresinden sonra sıçanların abdomenleri kanama olmamasına dikkat edilerek linea alba'dan açılmış ve peritoneal sıvı heparinlenmiş (15 IU/ml) enjektörle toplanmıştır. Organlar kenara alınarak abdominal aorta açığa çıkarılmış ve heparinlenmiş (15 IU/ml) enjektörle kan alınmıştır.

Peritoneal makrofajlar ve nötrofiller izole edilip, %1 trypan blue ile canlılık testi yapıldıktan sonra, hücrelerin fagositik ve kemotaktik aktiviteleri, salgıladıkları O_2^- miktarı tespit edilmiştir. İkinci grup deneyler için ayrılan sıçanlarda inflamasyon oluşturmak için tedavi sürelerinin 26. gününde sırt derileri altına 6 ml steril hava verilerek poş oluşturulmuş, 2 günlük bekleme süresinden sonra, steril SF içinde çözülmüş 4 ml %2 Carrageenan (Sigma, no:C-1013), enjekte edilmiştir. 2 gün beklendikten sonra, 12 saat açlığı takiben eter anestezisi yapılmıştır. Küçük bir kesi ile açılan poş içinden heparinize enjektörle alınan eksudanın miktarı ve içerdiği hücre sayısı belirlenmiştir. Eksudanın 2500 rpm hızda ve 10 dk süreyle santrifuj edilmesi sonucunda elde

edilen hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve RPMI-1640 (Sigma, no:R-8758) kültür ortamı ile 5×10^6 hücre/ μ l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. %1 trypan blue ile canlılık testi yapılan hücrelerin kemotaktik ve fagositik aktiviteleri, salgıladıkları O_2^- miktarı belirlenmiştir.

II – DENEYSEL İŞLEMLER

II. A) NÖTROFİLLERE AİT PARAMETRELER

Boyum A 'nın lökosit ayırıştırma yöntemine göre (170) nötrofil izole etmek için, abdominal aortadan alınan 6 ml heparinli kan, içinde 3 ml Histopaque 1119 (Sigma, no:1119-1) bulunan tübün çeperinden, tabaka oluşacak şekilde yavaş bir hızla boşaltılmıştır. 2700 rpm'de, 30 dakika, $20^{\circ}C$ 'de soğutmalı santrifüj (Kubota 5800)'de yapılan santrifüjden sonra eritrositler tübün dibinde, Histopaque 1119 eritrositlerin üzerinde olacak şekilde tabakalanma meydana gelmiştir. Histopaque 1119 ile en üstte toplanan plazma arasında, altta granülositleri, üstte lenfositleri içeren 2 beyaz tabaka oluşmuştur. Alttaki tabaka pastör pipeti ile dikkatlice alındıktan sonra 2 ml PBS eklenip 2700 rpm'de 5 dk $+4^{\circ}C$ 'de santrifüj edilmiştir. Sonuçta üst sıvı atılıp, kalan hücreler 500 μ l RPMI-1640 kültür ortamı ile süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyondaki hücrelerin canlılıkları vital boya olan trypan blue (%1) ile belirlendikten sonra, hücre süspansiyonu kemotaktik aktivite ve salgılanan O_2^- miktarının tayini için ikiye ayrılmıştır.

Canlılık Testi

0,1 ml hücre süspansiyonu ile 0,1 ml %1'lik trypan blue karşılaştırılıp, $37^{\circ}C$ 'de 10 dk inkübe edilmiş ve süre bitimini izleyen 5 dk. içinde sayım yapılmıştır. Sayılan 100 hücreden, mavi renkte boyanmış ve şekli değişmiş

hücreler ölü hücre olarak değerlendirilmiş, ölü hücre sayısı %5'den az olanlar deneye alınmıştır.

II. A-1) KEMOTAKTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Nötrofillerin kemotaktik aktiviteleri kemotaksis banyosu (boyden chamber) kullanılarak Boyden S. V. ve ark'larının metoduna göre (171) belirlenmiştir.

Prensibi: Boyden chamber içindeki sıvıda bulunan hücrelerin kemotaktik maddeye doğru filtre porlarından göç ettiği uzaklığın mikroskop aracılığıyla belirlenmesi esasına dayanır.

Reaktifler:

- 1) RPMI-1640 Medium (Sigma, no. R-8758)
- 2) Zimosan (Sigma no: Z-4250) ve ZAS (Zimosan ile aktive edilmiş serum)
- 3) Kemotaksis banyosu (Boyden Chamber)

ZAS Hazırlanması (99);

Kontrol sıçanlardan alınan kanların serumu, 2000-2500 rpm'de santrifuj sonucu ayrılarak, serum havuzu yapılmıştır.

-1 ml serum içinde, 5 mg Zimosan çözülüp, 37°C'de 1 saat bekletilmiştir.

-Sonra 2000-2500 rpm'de 20 dk , +4°C'de santrifuj edilip, dipte çökelti oluşturan zimosanın üstünde kalan berrak sıvı 0,5 ml'lik ependorf tüplerine ayrılarak, -20°C'de saklanmıştır.

İşlemler:

5×10^6 canlı hücre/ μ l olacak şekilde hücre süspansiyonu ve (0,5ml ZAS + 2 ml RPMI-1640) RPMI-1640 kültür ortamı ile sulandırılmıştır.

Kemotaksis banyosunun ortasına, nötrofil için 3 µm por boyutlu (ME 29 Membran filter, çapı 25 mm, Ref No:400706 D-37582) filtre, makrofaj için 8 µm por boyutlu (ME 29 Membran filter, çapı 25 mm, Ref. No:400706 D-37582) filtre yerleştirilip, sıkıca kapatılmıştır. Filtrenin altında kalan bölüme 0.6 ml sulandırılmış ZAS enjekte edilmiş, üstteki bölüme ise 0,5 ml hücre süspansiyonu konulmuştur 37°C'de 45 dk. inkübatörde bekletilmiş, süre sonunda filtre alınarak hematoksilen ile boyanmıştır.

Boyama işlemi:

1-) Absolu Alkol (%99)	5 dk.
2-) Distile Su	2 dk.
3-) Hematoksilen	1 dk.
4-) Distile Su	2 dk.
5-) Musluk Suyu	10 dk.
6-) Alkol (%70)	2 dk.
7-) Alkol (%95)	3 dk.
8-) %20 Butanol-%80 Alkol	5 dk.
9-) Xylol	10 dk.

Boyama işlemi tamamlandıktan sonra lam üzerine immersiyon yağı damlatılıp filtre konulmuş, filtre üzerine de tekrar immersiyon yağı damlatılıp, en üstte lamel yerleştirilerek mikroskopta (Bousch & Lamb) x40 büyütme ile incelenmiştir.

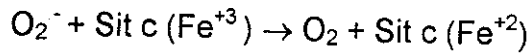
Değerlendirme: Mikroskop alanında hücreler netleştirildikten sonra, mikrovida ayarı 0'a getirilmiş, hücrelerin göç ettiği uzaklık boyunca mikrovida ilerletilmiştir. En son netleşen birkaç hücrenin bulunduğu alanda mikrovidanın

durduğu nokta μm olarak hücrelerin göç ettiği uzaklık olarak değerlendirilmiştir
Ölçüm 3 ayrı alanda yapıp ortalaması alınmıştır

II. A-2) SALGILANAN O_2^- MİKTARININ SAPTANMASI

Süperoksit radikali salınımı için, Yoshino ve ark'larının yöntemi (115) kullanılmıştır

Prensibi: Süperoksit radikali sitokrom C'yi indirger



Sitokrom C'nin indirgenmiş miktarı, O_2^- miktarını gösterir.

Reaktifler:

1) Hank's tamponu (NaCl (Merck, D-6100) 136.89 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Art 2380) 1.36 mM; MgSO_4 (Sigma, no M-7506) 1.66 mM; KCl (Merck, 4935) 5.36 mM; KH_2PO_4 anhidroz (Sigma, no P-5379) 0.73 mM; NaHCO_3 (Riedel-de Haen, no 13418) 15.12 mM; glukoz anhidroz (Sigma, G-8270) 11.18 mM; hepsi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

2) Cytochrome-C (Sigma, no C-3256): 64 μM .

3) PMA (Phorbol myristate acetate, Sigma, no. P-8139): 1 $\mu\text{g/ml}$

İşlemler: Nötrofil süspansiyonu 5×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde 1 ml Hank's tamponunda sulandırılmıştır. 1 ml hücre süspansiyona 64 μM sitokrom C (100 μl) eklenip; 37°C'de 10 dk. inkübe edildikten sonra, aynı hücre süspansiyonuna 1 μg PMA (10 μl) eklenerek, 37°C'de 15 dk. bekletilmiştir. Tüp buz içine konup, reaksiyon sonlandırılmış, 3700 rpm'de, 10 dk., +4°C'de santrifüj edildikten sonra hücreler uzaklaştırılmıştır. Kalan sıvının absorbanası 550 nm'de UV spektrofotometre'de (Schimadzu UV 1600) okunmuştur.

Preinkübasyon dönemindeki absorbanla deney sonundaki absorban arasındaki fark, salgılanan O_2^- miktarı olarak hesaplanmıştır

Hesaplama: Yoshino ve ark'larının yöntemine göre, 550 nm dalga boyunda 19.1 olan katsayı kullanılarak, süperoksid radikali miktarı pmol olarak hesaplanmıştır. Salınan süperoksid radikali konsantrasyonunu bulmak için,
 O_2^- (pmol/15 dk/5x10⁵ hücre) = $\Delta OD/EC$ formülü kullanılmıştır

ΔOD : Preinkübasyon sonrası ve deney sonundaki absorban farkı.

EC: 1 mM maddenin absorbanı: 19.1

II. A-3) FAGOSİTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Orpogen Pharma şirketinin phagotest (Opsonize E. Coli-FITC) ticari kiti kullanılarak yapılmıştır

Prensibi: Floresan boya ile işaretli opsonize bakteri (E.Coli-FITC) kullanılarak, bakteriyi fagosite eden monosit ve granulositlerin yüzdelerinin belirlenmesi esasına dayanır. Ayrıca bu yöntemle hücrel fagositik aktivite (hücre başına düşen bakterilerin sayısı)'nin saptanması da mümkün olmaktadır.

Reaktifler:

- 1) Stabilize ve opsonize FITC-işaretli E coli süspansiyonu.
- 2) Reaksiyon durdurma solüsyonu (Bakterinin boyanma reaksiyonunu durdurmak için).
- 3) DNA boyama solüsyonu (Bakterilerin sitometrik ayrımı için)
- 4) Lizis solüsyonu (Eritrositleri parçalamak için).
- 5) Yıkama solüsyonu.

İşlemler: Fagositosis ölçümü için, heparinize kan örnekleri 10 dk. buz üzerinde inkübe edilmiştir $0^{\circ}C$ 'de hazırlanmış, iki tübe 20 μl bakteri

süspansiyonu eklendikten sonra 2-3 sn. düşük hızda vortekslenmiştir. Tüplerden biri 37°C'deki su banyosuna 10 dk konulup, diğeri kontrol olarak buzda bırakılmıştır. İnkübasyon zamanının sonunda, alınan tüm örnekler fagositozisi durdurmak için buz üzerine konulmuş, yıkama solüsyonu eklenip, 1500 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Oda ısısında (20-25°C) lizis solüsyonu, ardından DNA boyama solüsyonu eklenmesinden 60 dk sonra hücrelerin fagositik aktivitesi flow cytometry ile kantitatif ölçülmüştür.

Flow Cytometry'de Analiz için, hücelere mavi-yeşil uyarma ışığı uygulanmış, verileri alırken kırmızı floresans kullanılmıştır.

Hesaplama: Ortamdaki floresans ile işaretli bakterileri (E coli) yutan hücrelerin yüzdeleri ve her bir hücre tarafından yutulan bakteri miktarı belirlenmiştir. Lökositler scatter diagram (lin FSC vs lin SSC) programına geçirilmiştir ve yeşil floresans histogramında (FL1) analiz edilmiştir (Ortalama floresans birebir lökosit başına düşen bakterilerin sayısı ile koreledir)

II. B) PERİTONEAL MAKROFAJLARA AİT PARAMETRELER

II. B. 1) KEMOTAKTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Peritoneal lavaj ile elde edilen, peritoneal makrofajların kemotaktik aktiviteleri Boyden ve ark'larının yöntemine göre (171) tayin edilmiştir.

İşlemler: Peritoneal hücreler iki kez santrifüj edilerek yıkanmış, %1'lik Trypan Blue ile canlılık testi yapılmıştır. Hücreler RPMI-1640 Medium ile 5×10^6 hücre/ μ l olacak şekilde süspansiyon edilerek, kemotaksis tayini daha önce belirtilen yöntemine göre yapılmıştır. Makrofajlar için 8 μ m por boyutlu (ME 29 Membran filter, çapı 25 mm (Ref. No: 400706 D-37582) filtre kullanılmıştır.

II. B-2) SALGILANAN O₂⁻ MİKTARININ SAPTANMASI

Peritoneal makrofajların salınan O₂⁻ miktarı Yoshino ve ark'larının yöntemine göre (115) belirlenmiştir. Makrofajlar 5X10⁵ hücre/ml olacak şekilde Hank's tamponu ile suspanse edilip, daha önce belirtilen yöntemine göre ortama salınan O₂⁻ miktarı saptanmıştır.

II. B-3) FAGOSİTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Orpogen Pharma şirketinin phagotest (Opsonize E.Coli-FITC) ticari kiti kullanılmıştır. Periton lavajıyla elde edilen, periton sıvısındaki makrofajların fagositik aktiviteleri daha önce belirtildiği şekilde flow cytometry ile ölçülmüştür.

II. C) İNFLAMASYON BÖLGESİNDEKİ HÜCRELERE AİT

PARAMETRELER

İnflamasyon oluşturulan 4 gruptaki tüm sıçanların, sırt derileri dikkatlice açılıp, inflamasyon bölgesinde toplanmış eksuda heparinli enjektörle alınmıştır.

1) Eksuda Miktarı; Her bir sıçandan alınan eksuda miktarı "ml" olarak belirlenmiştir.

2) Hücre Miktarı; Eksuda içersindeki hücre miktarı sayılarak, mm³'deki hücre sayısı belirlenmiş ve %1'lik Trypan Blue ile canlılık testi yapılmıştır.

II. C-1) KEMOTAKTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Eksuda içindeki hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra, RPMI-1640 Medium ile 5X10⁶ hücre/μl olacak şekilde suspanse edilmiştir. Bu hücrelerin kemotaktik aktiviteleri, kemotaksis banyosunda, por boyutu 3 μm olan filtre (ME 29 Membran Filter, çapı 25 mm (Ref. No:4000706 D-37582) kullanılarak, daha önce belirtildiği şekilde Boyden S V. ve ark'larının yöntemine göre (171) tayin edilmiştir.

II. C-2) SALGILANAN O₂⁻ MİKTARININ SAPTANMASI

PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 5X10⁵ hücre/ml olacak şekilde Hank's tamponu ile suspanse edilen, eksuda hücreleri tarafından salınan O₂⁻ miktarı, daha önce belirtildiği şekilde Yoshino ve ark 'larının yöntemine göre (115) tayin edilmiştir.

II. C-3) FAGOSİTİK AKTİVİTENİN SAPTANMASI

Reaktifler:

1) RPMI-1640 Medium (Sigma, no R-8758)

2) %1 Activated charcoal (Sigma no: C-9157); RPMI-1640 kültür ortamında hazırlanmıştır.

İşlemler: 100 µl, %1 Aktif kömür süspansiyonu ve 100 µl hücre süspansiyonu tüpte karşılaştırılmış ve 37⁰C'de, 1 st , inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda, thoma lamına konulan hücre süspansiyonunda x100 büyütme ile (Bousch&Lamb) 100 adet makrofajın, yuttuğu aktif kömür parçacıkları sayısı tespit edilmiştir.

Değerlendirme: Fagositik aktivite, 100 makrofajın yuttuğu aktif kömür sayısının ortalaması olarak belirlenmiştir (172).

III) İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. Sonuçların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve gruplar arası değerlendirme Tukey testi ile yapıldı. p<0.05 üzeri değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

1. VÜCUT AĞIRLIĞI DEĞİŞİMİ

Tedavi sürecinin başında ve sonunda yapılan ölçümlerle tespit edilen vücut ağırlıkları esas alınarak, başlangıç ağırlıklarına göre % değişim hesaplanmıştır. Elde edilen değerler incelendiğinde yaşlı sıçanlardaki ağırlık artışının genç sıçanlara göre daha az olduğu ve L-karnitin uygulanmasının, hem genç hem de yaşlı grupta ağırlık artışını değiştirmedeği dikkati çekmiştir (Tablo-1).

Tablo-1: Vücut ağırlıklarındaki değişim (Ort±SH)

	Genç-Kontrol	Genç-Karnitin	Yaşlı-Kontrol	Yaşlı-Karnitin
Başlangıç (g)	198.50±5.32	202.00±5.97	409.00±11.49	415.00±0.97
Bitiş (g)	308.33±17.67	278.12±7.78	415.00±15.32	413.75±6.79
Ağırlık değişimi (%)	60.78±6.97	41.20±3.45 ⁺	5.54±3.56 ^{***}	-2.24±2.03

+p<0.05; genç-kontrol grubu ile genç-karnitin grubunun karşılaştırılması

***p<0.001; genç-kontrol grubu ile yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması

2. NÖTROFİLLER İLE İLGİLİ PARAMETRELER

2. 1. Nötrofil Sayısı:

Tablo-2'de tüm deneklerden alınan kan örneklerine ait lökosit ve nötrofil sayıları gösterilmiştir (Tablo-2). Gruplar arasında hücre sayıları açısından fark bulunamamıştır.

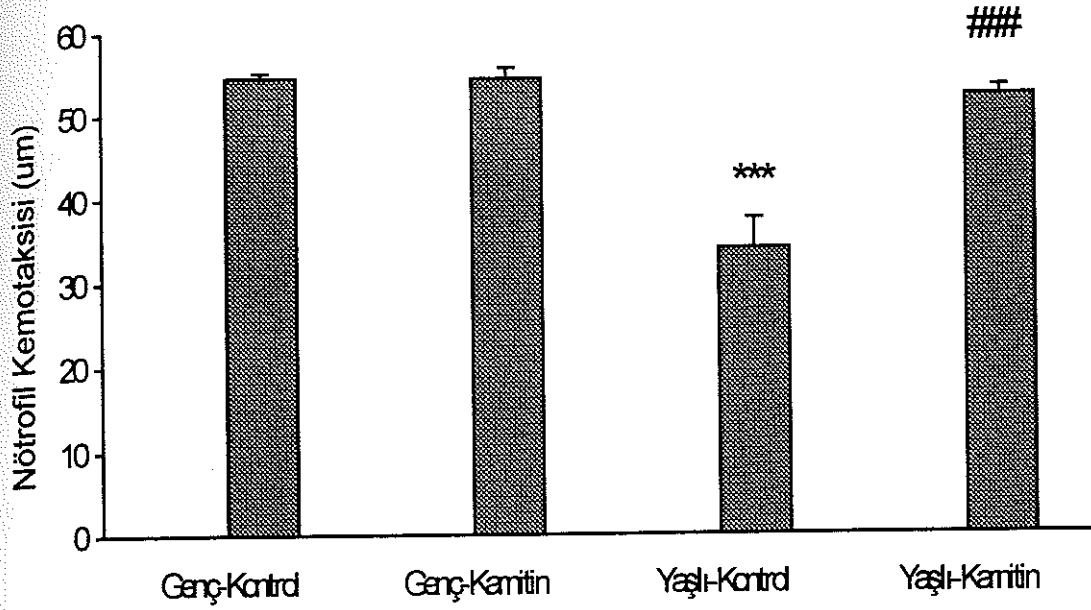
Tablo-2: Lökosit ve nötrofil sayıları (Ort±SH)

Kan hücreleri	Genç-Kontrol	Genç-Karnitin	Yaşlı-Kontrol	Yaşlı-Karnitin
Lökositler (mm ³ 'de)	8105 7±592 0	6700 0±556 8	6742 9±493 7	8225 0±1031 0
PMN (mm ³ 'de)	721 9±191 2	800 0±300 0	1366 7±305 1	1250 0±266 1

2. 2. Nötrofil Kemotaktik Aktivitesi

Fonksiyonları incelenmek üzere deneklerin kanlarından izole edilen nötrofillerin, canlılık oranları genç-kontrol grubunda %96.3, genç-karnitin grubunda %96.2, yaşlı-kontrol grubunda %95.6, yaşlı-karnitin grubunda %96.1 olarak tespit edilmiş, gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunamamıştır.

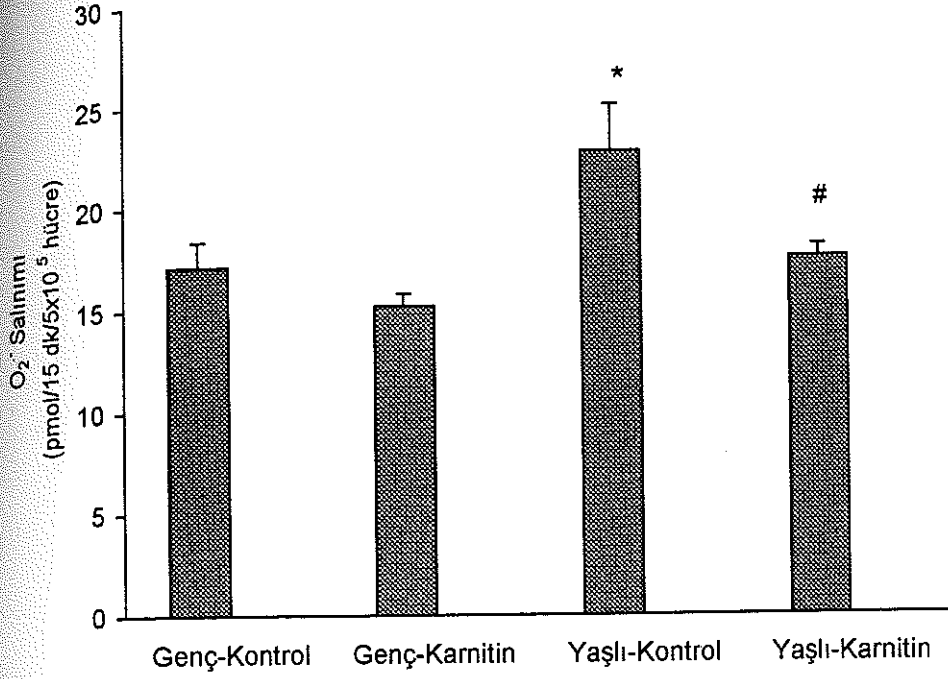
Zimozan ile aktive serum kullanılarak, nötrofillerin kemotaktik aktiviteleri incelendiğinde, genç hayvanlarda 54.24 ± 0.58 μm olarak tespit edilen aktivitenin yaşlanmaya bağlı olarak belirgin düştüğü (33.82 ± 3.63 μm) gözlenmiş ve bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). L-karnitin uygulanması genç sıçanlara ait nötrofillerin kemotaktik aktivitelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı halde, yaşlı sıçanlarda aktiviteyi arttırarak, genç kontrol grubunun değerlerine ulaşmasını sağlamıştır ($P < 0.001$, yaşlı-kontrol grubuna göre) (Şekil-1). L-karnitin uygulanmasına bağlı olarak nötrofil kemotaktik aktivitesi genç-karnitin grubunda 54.08 ± 1.41 μm , yaşlı-karnitin grubunda 52.11 ± 1.00 μm olarak belirlenmiştir (Şekil-1)



Şekil-1: Genç ve yaşlı sıçanlara ait nötrofillerin kemotaksis değerleri. *** $p < 0.001$; genç-kontrol grubu ile yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması ### $p < 0.001$; yaşlı-kontrol grubu ile yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması.

2. 3) Nötrofiller Tarafından Salgılanan O_2^- Miktarı

Genç sıçanlardan izole edilen nötrofillerin buldukları ortama salgıladıkları O_2^- miktarı 17.04 ± 1.25 pmol iken, yaşlı sıçanlara ait nötrofillerin daha fazla miktarda O_2^- salgıladıkları (22.71 ± 2.34 pmol) gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). L-karnitin verilmesi, genç sıçanlara ait nötrofillerin O_2^- salınımında herhangi bir değişikliğe neden olmazken (15.14 ± 0.61 pmol), yaşlı sıçanlarda artmış olan O_2^- salınımı genç kontrol grubu sıçanlardan elde edilen değere düşürmüştür (17.51 ± 0.59 pmol). L-karnitin tedavisine bağlı olarak yaşlı sıçanlarda saptanan bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$, Şekil-2).



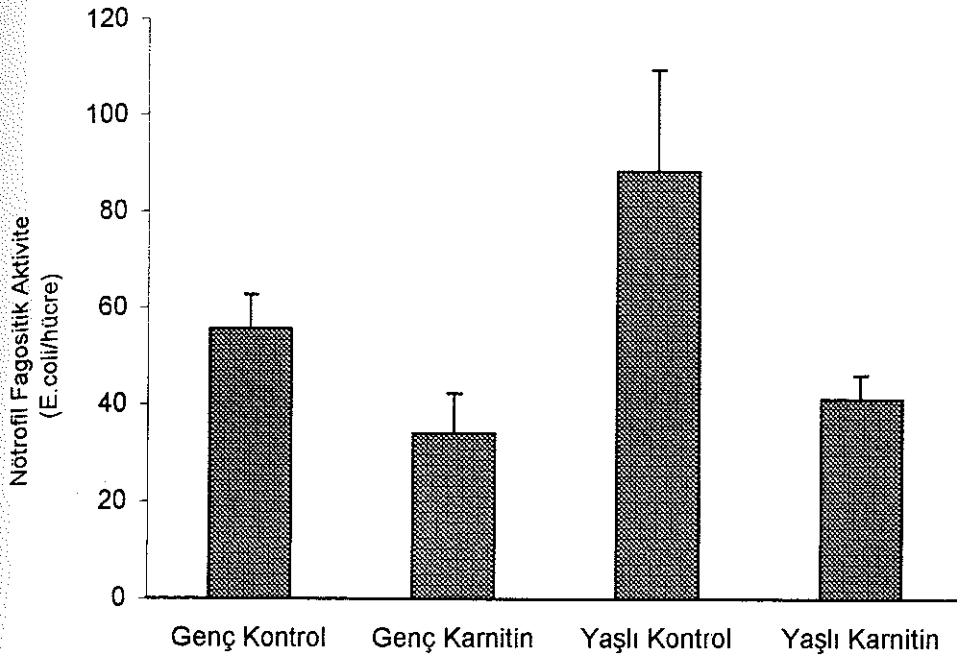
Şekil-2: Nötrofiller tarafından salgılanan O₂⁻ miktarı *p<0.05; genç-kontrol grubu ile, yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması #p<0.05; yaşlı-kontrol grubu ile, yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması.

2. 4. Nötrofillerin Fagositik Aktiviteleri

Genç kontrol grubunun nötrofillerinde 55.55±7.08 E. coli/hücre olarak belirlenen fagositik aktivitenin, yaşlılığa bağlı olarak değişmediği (88.47±21.02 E. coli/hücre) gözlenmiş, L-karnitin tedavisine bağlı olarak hem genç (34.10±8.24 E. coli/hücre), hem de yaşlı grupta (41.24±4.9 E. coli/hücre) istatistiksel olarak önemli olabilecek bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil-3)

Tablo-3: Fagozitozis yapan nötrofillerin yüzdesi (Ort±SH)

	Genç-kontrol	Genç-karnitin	Yaşlı-kontrol	Yaşlı-karnitin
Fagozitozis (%)	45.8±30.7	33.3±31.1	51.1±34.1	43.4±32.5



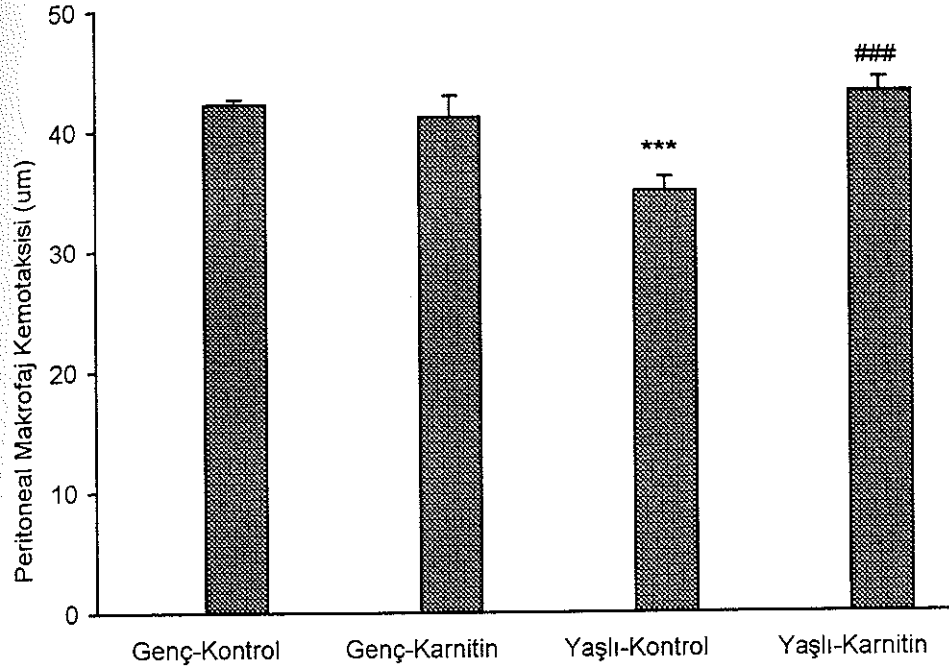
Şekil-3: Nötrofillerin fagositik aktiviteleri

3. PERİTONEAL MAKROFAJLAR İLE İLGİLİ PARAMETRELER

Deneklerin periton sıvısından izole edilen makrofajların canlılıkları incelendiğinde, genç kontrol grubunda %95.9, genç karnitin grubunda %96.0, yaşlı kontrol grubunda %95.0, yaşlı karnitin grubunda %96.3 olarak saptanmıştır.

3. 1. Peritoneal Makrofajların Kemotaktik Aktiviteleri

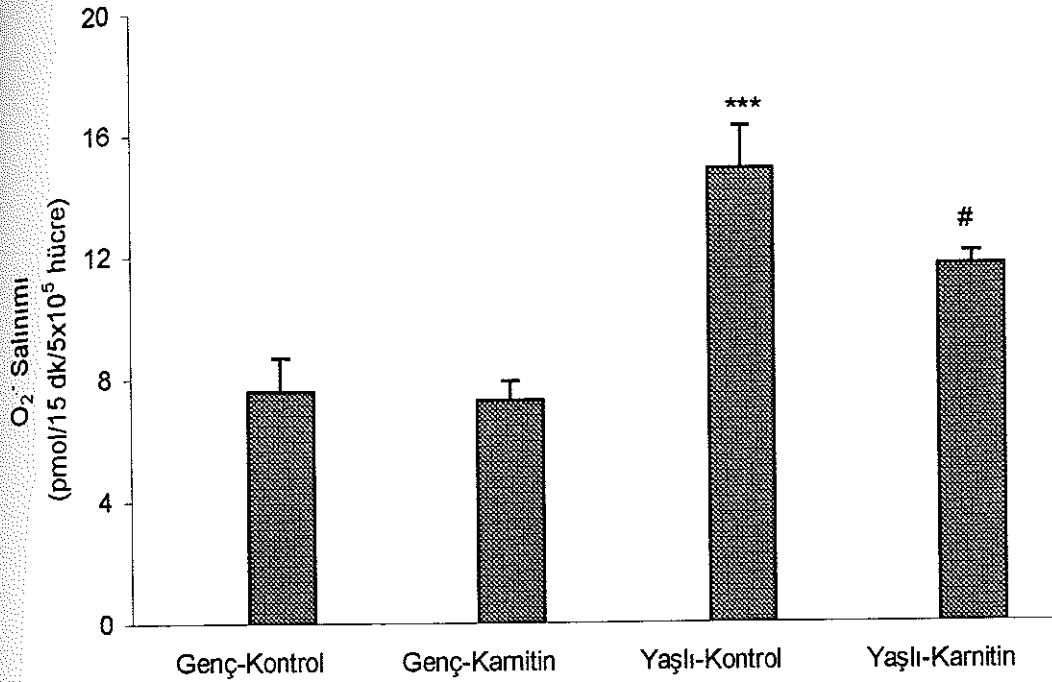
Peritoneal makrofajların kemotaktik aktiviteleri genç kontrol grubunda $42.09 \pm 0.43 \mu\text{m}$ iken; yaşlı kontrol grubunda $34.91 \pm 1.18 \mu\text{m}$ 'ye düşmüş ve bu düşüşün istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.001$) L-karnitin ile tedavi edilen genç sıçanlarda, kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen ($41.08 \pm 1.77 \mu\text{m}$), yaşlı karnitin grubunda istatistiksel olarak önemli bir yükselme ($43.18 \pm 1.36 \mu\text{m}$) tespit edilmiştir ($P < 0.001$, Şekil-4).



Şekil-4: Peritoneal makrofajların kemotaktik aktiviteleri *** $p < 0.001$; genç-kontrol grubu ile yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması. ### $p < 0.001$; yaşlı-kontrol grubu ile yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması

3. 2. Peritoneal Makrofajların Salgıladığı O_2^- Miktarı

5×10^5 peritoneal makrofaj tarafından 15 dakikada salgılanan O_2^- miktarı; genç-kontrol grubunda 7.59 ± 1.08 pmol iken, yaşlı sıçanlarda 14.85 ± 1.40 pmol'e yükselmiştir ($P < 0.001$). L-karnitin tedavisi genç sıçanların peritoneal makrofajlarına O_2^- salınımı yönünden herhangi bir etki yapmamasına rağmen (7.28 ± 0.64 pmol), yaşlılığa bağlı olarak artmış O_2^- salınımını önemli ölçüde azaltmıştır (11.71 ± 0.42 pmol, $P < 0.05$) (Şekil 5).



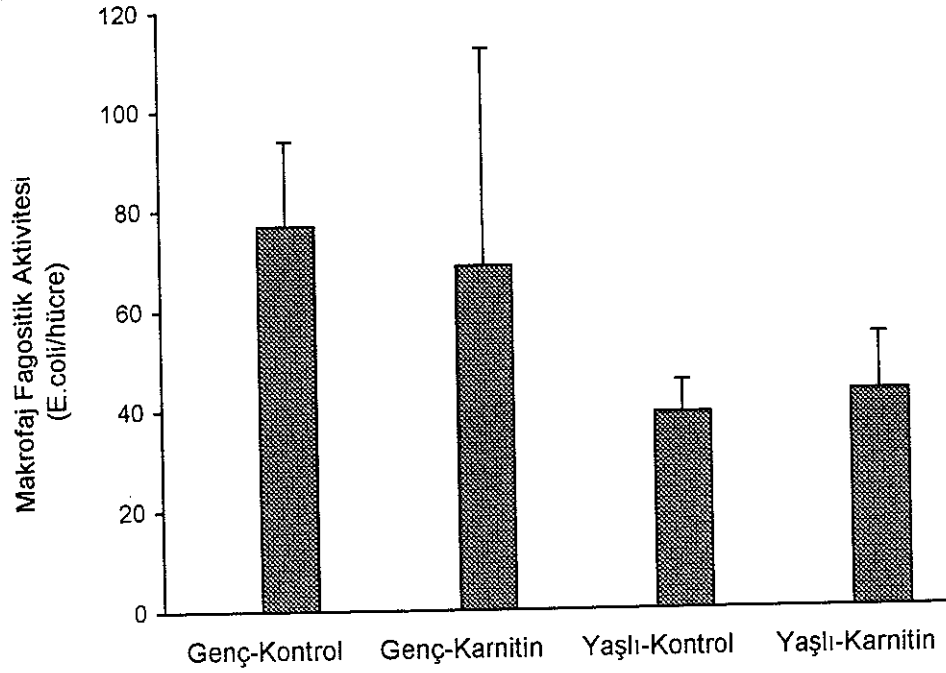
Şekil-5: Peritoneal makrofajlar tarafından salgılanan O₂⁻ miktarı. ***p<0.001; genç-kontrol grubu ile yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması #p<0.05; yaşlı-kontrol grubu ile yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması.

3. 3. Peritoneal Makrofajların Fagositik Aktiviteleri

Peritoneal makrofajların fagositik aktivitelerinde yaşlılığa ve L-karnitin tedavisine bağlı farklılık saptanamamıştır. Genç-kontrol grubunda 76.96±16.93 E.coli/hücre olan makrofaj fagositozisi, genç-karnitin grubunda 68.80±43.68 E.coli/hücre, yaşlı-kontrol grubunda 38.9±6.57 E.coli/hücre, yaşlı-karnitin grubunda 43.04±11.37 E.coli/hücre olarak belirlenmiştir (Şekil-6).

Tablo-4: Fagositozis yapan peritoneal makrofajların yüzdesi (Ort±SH).

	Genç-Kontrol	Genç-Karnitin	Yaşlı-Kontrol	Yaşlı-Karnitin
Fagositozis (%)	55.8±26.6	33.0±20.4	56.6±23.9	48.0±21.6



Şekil-6: Peritoneal makrofajların fagositik aktiviteleri

4. İNFLAMASYON BÖLGESİNDEKİ HÜCRELERE AİT PARAMETRELER

4. 1. İnflamasyon bölgesindeki eksuda miktarı

Genç ve yaşlı sıçanların sırt derisi altında carrageenan ile oluşturulan steril inflamasyon bölgesinden toplanan eksuda miktarı Tablo-5'de gösterilmiştir. L-karnitin tedavisinin, genç ve yaşlı sıçanlarda eksuda miktarını değiştirmedeği saptanmıştır.

4. 2. Eksuda İçindeki Hücre Miktarı

İnflamasyon bölgesinden alınan eksuda içindeki hücrelerin canlılıkları genç-kontrol grubunda %95,6, genç-karnitin grubunda %95,4, yaşlı-kontrol grubunda %95,8, yaşlı-karnitin grubunda %95,7 olarak tespit edilmiştir. İnflamasyon bölgesinden alınan eksuda içindeki hücre miktarının, yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre belirgin azalmış olduğu tespit edilmiş ($P < 0.001$), L-karnitin verilmesi hem genç ($P < 0.001$), hem yaşlı ($P < 0.05$) sıçanlarda hücre miktarını belirgin olarak arttırmıştır.

L-karnitin verilmiş yaşı sıçanların eksudalarındaki hücre miktarı genç-kontrol grubu sıçanların ki ile aynı bulunmuştur (Tablo-5)

Tablo-5: İnflamasyon bölgesinden alınan eksuda miktarı ve eksuda içindeki hücre miktarı (Ort±SH)

	Genç-Kontrol	Genç-Karnitin	Yaşlı-Kontrol	Yaşlı-Karnitin
Eksuda miktarı (ml)	2 150±0 342	3 000±0.552	1 630±0.195	1 690±0.0 303
Eksudadaki hücre miktarı (mm ³ 'de)	4711±80 98	5911±112 35 ^{***}	3860±65.31 ^{***}	4322±193.48 [#]

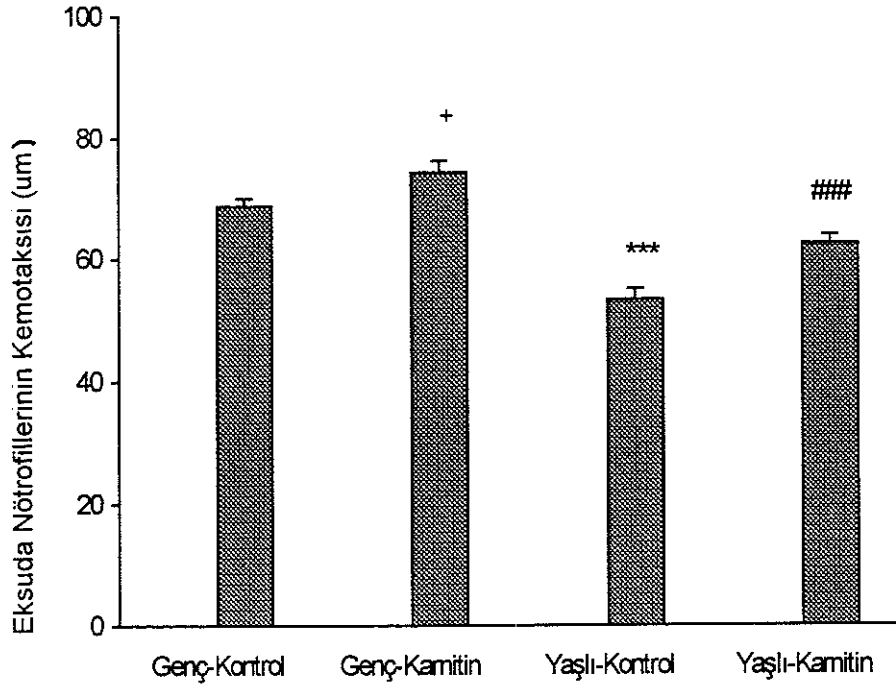
^{***}p<0 001; genç-kontrol grubu ile yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması

^{***}p<0 001; genç-kontrol grubu ile, genç-karnitin grubunun karşılaştırılması

[#]p<0 05 ; yaşlı-kontrol grubu ile yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması.

4. 3. Eksuda İçindeki Hücrelerin Kemotaktik Aktiviteleri

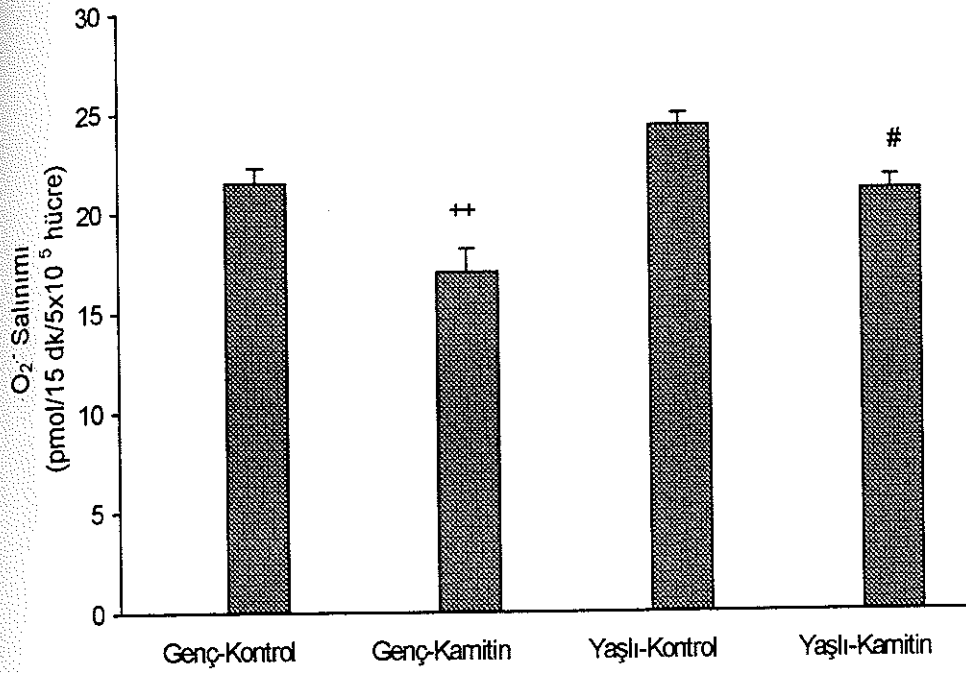
İnflamasyon bölgesinden alınan eksudadaki hücrelerin kemotaksisinin, yaşlı kontrol sıçanlarda (53.40±1.72 µm), genç kontrol sıçanlara göre (68.90±1.23 µm) istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu tespit edilmiştir (P<0.001). L-karnitin uygulanmasına bağlı olarak hem genç (74.44±2.02 µm, P<0.05), hem yaşlı sıçanlarda (62.70±1.42 µm, P<0.001) kemotaksisin yükseldiği ve yaşlı sıçanlardaki değerlerin, genç kontrol grubundakine yaklaştığı dikkati çekmiştir (Şekil-7).



Şekil-7: Eksudadaki hücrelerin kemotaktik aktiviteleri. *** $p < 0.001$; genç-kontrol grubu ile, yaşlı-kontrol grubunun karşılaştırılması. + $p < 0.05$; genç-kontrol grubu ile, genç-karnitin grubunun karşılaştırılması. ### $p < 0.001$; yaşlı-kontrol grubu ile, yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması

4. 4. Eksuda İçindeki Hücrelerin Salgıladıkları O_2^- Miktarı

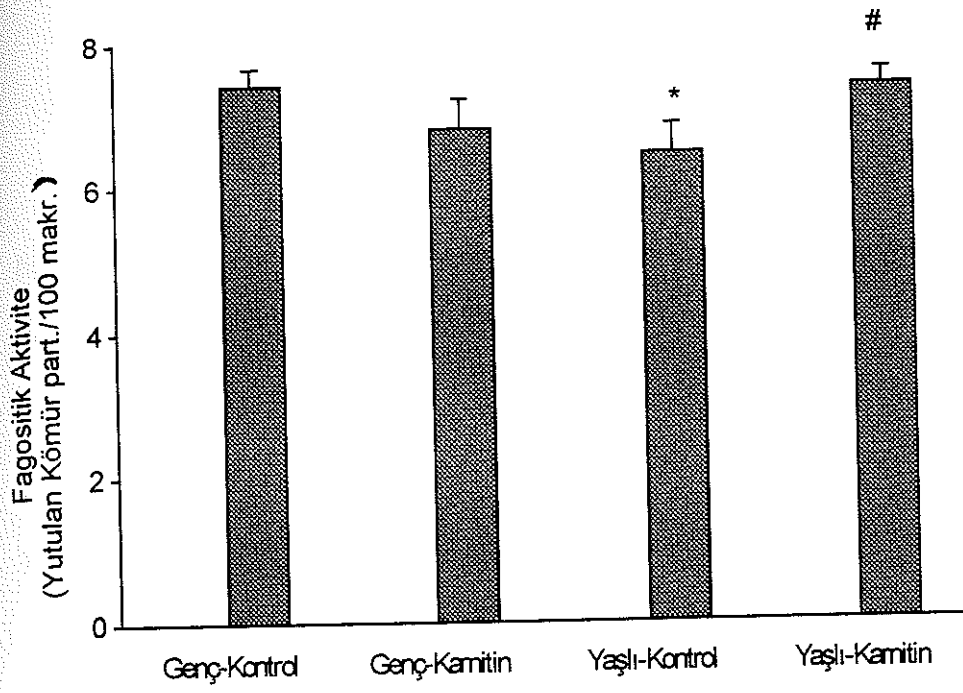
İnflamasyon bölgesinden alınan eksudadan izole edilen 5×10^5 hücrenin 15 dakikada salgıladığı O_2^- miktarı incelendiğinde, L-karnitin hem genç hem yaşlı sıçanlarda azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Genç-kontrol grubundaki süperoksit salınımı miktarı 21.42 ± 0.76 pmol iken, genç-karnitin grubunda 16.93 ± 1.17 pmol'e düşmüştür ve bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Öte yandan, yaşlı-kontrol grubundaki O_2^- salınımı miktarı 24.24 ± 0.62 pmol iken, yaşlı-karnitin grubunda ise 21.00 ± 0.69 pmol'e düşmüş ve bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$) (Şekil-8).



Şekil-8: Eksudadaki hücrelerin salgıladıkları O₂⁻ miktarı, **p<0.01; genç-kontrol grubu ile genç-karnitin grubunun karşılaştırılması #p<0.05; yaşlı-kontrol grubu ile yaşlı-karnitin grubunun karşılaştırılması

4. 5. Eksuda İçindeki Hücrelerin Fagositik Aktiviteleri

İnflamasyon bölgesinden alınan eksudadaki hücrelerin fagositozis değerleri yaşlı sıçanlarda düşük bulunmuş ve bu değer L-karnitin ile genç kontrol düzeyine yükseltilmiştir. Genç-kontrol grubunda 7.36 ± 0.24 part olan fagositik aktivite, yaşlı-kontrol grubunda 6.09 ± 0.28 part'e düşmüş (P<0.05), L-karnitin tedavisi genç sıçanlarda sonucu değiştirmezken (7.06 ± 0.33 part), yaşlı sıçanlarda yükselmeye (7.32 ± 0.23 part) neden olmuştur (P<0.05) (Şekil-9)



Şekil-9: Eksudadan elde edilen makrofajların fagositik aktiviteleri * $p < 0.05$; genç-kontrol grubu, ile yaşı-kontrol grubunun karşılaştırılması. # $p < 0.05$; yaşı-kontrol grubu, ile yaşı-karnitin grubunun karşılaştırılması

TARTIŞMA

Bağışıklık sistemi üzerine etkili en önemli faktörlerden biri olan yaşlanma, bu sistemin fonksiyonlarının baskılanması ile birlikte enfeksiyonlara ve neoplastik hastalıklara eğilimin arttığı fizyolojik bir süreçtir (1, 2, 3). Yaşlılıkta ortaya çıkan bağışıklık sistemi fonksiyonlarındaki bozukluğa, L-karnitinin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmamızda 50 mg/kg/gün dozda L-karnitin 30 gün süreyle oral yolla verilmiştir. Bu doz, antioksidan olduğu bilinen L-karnitinin sıçanların bağışıklık hücrelerindeki fonksiyon bozukluğuna etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan dozdur (19). Bunun yanısıra Jirillo ve ark'ları (168) tarafından yapılan insan lenfositlerinin antibakteriyel aktivitesi üzerine L-karnitinin etkisi ve De Simone C. ve ark'ları (173) tarafından yapılan AIDS'li hastaların mononükleer hücrelerine L-karnitinin etkisi konulu çalışmalarda benzer dozlar kullanılmış olup, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını belirgin olarak düzelttiği gösterilmiştir.

Kullanılan dozda L-karnitin vücut ağırlığına etkisi incelendiğinde, 30 günlük süre sonunda genç kontrol grubunda %60'lık artış tespit edilmiş, L-karnitin tedavisi ağırlık artışında düşüşe neden olmuştur. Bulgumuz, L-karnitini aynı dozda kullanan diğer araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur (174, 175). Yaşlı kontrol grubunda, 30 günlük süre içerisinde vücut ağırlığında herhangi bir değişiklik tespit edilmemiş olup, L-karnitin tedavisinin ilave bir etkisi gözlenmemiştir.

Çalışmamızda yaşlanmaya bağlı olarak kan lökosit sayısında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Buna karşın nötrofil/lökosit oranı yaşlı sıçanlarda

(0.2027), genç sıçanlara göre (0.0890) artmış olup, L-karnitin tedavisi bu oranda herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. Yaşlılığa bağlı olarak lökosit sayısında değişiklik olmadığını, fakat nötrofil sayısının arttığını gösteren Yoshino ve ark'ları (115), yaşlı organizmalarda lenfositik ve megakaryositik serideki öncül hücrelerin proliferatif ve farklılaşma yeteneklerinin azalmış olduğunu ileri sürerek, bu iki hücre tipindeki azalmaya karşın, nötrofil sayısındaki artış nedeniyle lökosit sayısının değişmemiş olabileceğini belirtmişlerdir. Bulgularımız, bu konuda yapılmış çalışmalarla uyum içindedir (115, 105, 19).

Yaşlı bireylerin gençlere göre yüksek bir enfeksiyon riskine sahip olduğu bilinmektedir (111-120). Araştırmacılar tarafından, bu durumun enfeksiyon yapıcı etkenlere karşı savunma kapasitesindeki azalmaya bağlı olduğu ileri sürülmektedir (111). Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı primer sellüler korunmada nötrofiller önemli rol oynamaktadır. Yaşlılarda nötrofil fonksiyonlarının incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda yaşlı bireylere ait nötrofillerin mikrobisidal aktivitesi genç bireylerle karşılaştırılmış, fagositozis, kemotaksis, degranülasyon, ve süperoksit anyon üretiminin göstergesi olan nitroblue tetrazolium redüksiyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (99, 100, 105, 111, 115, 119, 120). Fagositlerin hareket kapasitesindeki azalmanın, yaşlı bireylerde yabancı etkenlere karşı savunma kapasitesinin azalmasına neden olarak enfeksiyona eğilimi arttırdığı ifade edilmektedir (136). Bizim çalışmamızda da yaşlılığa bağlı olarak nötrofil kemotaktik aktivitesinde belirgin düşme tespit edilmiştir. L-karnitin tedavisi ile nötrofil fonksiyonundaki bu bozukluk ortadan kaldırılmış, yaşlı sıçanların kemotaktik aktivitesinin genç kontrol grubunun değerine ulaştığı gözlenmiştir.

Rivnay ve ark'ları (127) lenfositlerde, Shinitzky (128) nöronal hücrelerde plazma membran vizkositesinin yaş ile arttığı rapor etmişlerdir. Perskin ve Cronstein ise bu araştırmacıları destekleyen çalışmalarında nötrofil membran vizkositesinde yaşa bağlı artışı ve buna bağlı olarak fonksiyon bozukluğunu göstermişlerdir (99) Yuli ve ark'ları (126), plazma membran vizkositesinde azalmaya neden olan ajanları kullanarak yaptıkları çalışmada membran viskositesindeki azalmanın nötrofil kemotaktik aktivitesinde artışa ve süperoksid anyonunun yapımında azalışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Arienti ve ark'ları (176) sıçan beyinde, yaşlanmaya bağlı olarak artan lipid peroksidasyonun yol açtığı membran vizkositesindeki artışın, L-karnitin tarafından ortadan kaldırıldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da tespit ettiğimiz yaşa bağlı olarak gelişen nötrofil fonksiyon bozukluğunun, L-karnitin ile düzeltilmiş olması, L-karnitinin membran stabilize edici etkisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir (19).

Bilindiği gibi, fagositler (nötrofil ve monosit/makrofaj), oksidatif veya solunumsal patlama olarak adlandırılan, NADPH oksidaz enzimi ile katalize edilen reaksiyon sonucunda büyük miktarda reaktif oksijen türlerini oluştururlar (38, 43, 44, 124, 177). Aktive olmuş fagositlerden, fazla miktarda salgılanan reaktif oksijen türleri ve proteolitik enzimler çevre dokuda hasarlanmaya neden olmaktadır (35, 87) Yaşlılığa bağlı olarak süperoksid radikali salınımı ile ilgili bulgular oldukça çelişkilidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, süperoksid radikali yapımının değişmediğini (114, 125), azaldığını (99, 105, 115, 117, 123, 117) ve daha fazla oranda da arttığını (118, 120, 122, 124, 138, 177) gösteren bulgular tespit edilmiştir. Çalışmamızda da yaşlanmaya bağlı olarak nötrofiller tarafından yapılan O_2^- miktarı artmış bulunmuş ve çevre doku için zararlı

olabilecek bu artmış aktivitenin L-karnitin tedavisi ile genç kontrol değerine azaldığı tespit edilmiştir.

Süperoksid anyonunun yapımının artmış olması araştırmacılar tarafından değişik mekanizmalarla açıklanmaktadır. Tortorella ve ark'ları (122) yaşlı bireylerden aldıkları nötrofillerde, adezyon moleküllerinin azaldığını gösterip, adhere olmuş hücrelerin daha az O_2^- salgılayacağını ileri sürerek, O_2^- miktarındaki yaşlılığa bağlı artışı adezyon moleküllerinin azalması ile açıklamışlardır. Seres ve ark'ları (118) ise nötrofillerde, O_2^- yapımında görevli G proteinlerinin aktivasyonunda yaşlanmaya bağlı artış tespit etmişlerdir. Mohacsi ve ark'ları (124) yaşlı nötrofillerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarının arttığını tespit ederek, hücre içi sinyal mekanizmalarındaki değişiklik sonucu O_2^- yapımında artış olabileceğini ifade etmişlerdir. Fulöp ve ark'ları (38) ise yaşlılıkta PLC aktivasyonundaki artışa bağlı olarak NADPH oksidaz enziminin daha fazla işlev yaptığını ve bu nedenle de hem bazal hem de stimüle edilmiş nötrofillerde O_2^- yapımının gençlere göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda yaşlılığa bağlı olarak artmış olan O_2^- salınımının L-karnitin tedavisi ile geri döndürüldüğü tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, son yıllarda yapılan çalışmalarda protein kinaz C aktivasyonunu kompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır (179, 180). Bu özelliği nedeniyle yaşlı bireylerin nötrofillerinde protein kinaz C aracılı solunumsal patlama aktivasyonunu inhibe edebileceği ileri düşünülmektedir.

Yaşlılığın makrofaj kemotaksis fonksiyonuna etkisi ile ilgili çalışma sayısı oldukça yetersizdir. Bu konuda çalışan bazı araştırmacılar yaşlılarda makrofaj kemotaksisinin azaldığını ifade ederken (133, 136, 139), azalmadığını, aksine

arttığını belirtenler de vardır (129, 131) Bizim çalışmamızın bulguları makrofaj kemotaktik aktivitesinin yaşlılığa bağlı azalmayı gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda makrofaj kemotaktik aktivitesindeki yaşlılığa bağlı düşüşün, membran yapısındaki değişiklik nedeniyle yalancı ayak oluşturma kapasitelerinin azalması ile açıklanmaktadır. Alvarez ve ark'ları (136) yaşlı bireylerin peritoneal makrofajlarının membranlarında kolesterol artışına ve fosfolipid azalması sonucu kolesterol/fosfolipid oranının arttığını, buna bağlı olarak membran akışkanlığının azalması sonucu membranla ilişkili fonksiyonlarda azalma olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara uygun şekilde makrofaj kemotaksisindeki azalmanın nötrofil kemotaksisindeki azalmaya eşlik ettiği ifade edilmektedir (136)

Çalışmamızda tespit ettiğimiz, kemotaksiste yaşlılığa bağlı bu değişiklik L-karnitin tedavisi ile ortadan kaldırılarak, kemotaktik aktivite genç kontrol grubu sıçanlardaki değerine ulaşmıştır. L-karnitin bu etkisinin, daha önceki çalışmaların bulguları göz önüne alınarak, membran stabilize edici etkisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir

Aktive makrofajlar tarafından yapılan serbest oksijen radikalleri inflamatuvar mediatörler olarak önemli rol oynamaktadır. Daha önceki çalışmalarda peritoneal makrofajların O_2^- salınımının yaşlılığa bağlı olarak azaldığı (141, 181, 182) veya arttığı (138, 183) şeklinde bulgular tespit edilmiştir. Bizim bulgularımız da O_2^- salınımının arttığını gösteren çalışmaları desteklemektedir. Membran stabilize edici ve antioksidan etkisinin yanısıra protein kinaz C aktivasyonunu inhibe edici özelliği olan L-karnitin verilmiş yaşlı

sıçanlarda peritoneal hücrelerin O_2^- salınımı, nötrofillerdeki benzer şekilde azalmış olarak bulunmuştur.

İnflamasyon bölgesindeki reaktif oksijen metabolitleri ile antioksidan kapasite arasındaki dengenin bozulması çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır (88, 184). Sağlıklı bireylerde oksijen radikaliyle bağlı harabiyet plazma, sinovial sıvı ve diğer dokularda bulunan yeterli miktardaki antioksidan maddeler tarafından önlenmektedir. Çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin yapımının artması veya antioksidan kapasitenin azalması doku harabiyeti ile sonuçlanan kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıklara yol açmaktadır (51-59, 88). Yaşlılık antioksidan kapasitenin azalmasıyla birlikte, oksidatif stresin dokular üzerindeki harap edici etkisinin gözlemlendiği bir süreçtir. Klinik gözlemler ve yapılan çalışmalar yaşlanma süresince inflamatuvar hastalıklara eğilimin arttığını göstermektedir (51-59). Elliott ve ark'ları (18) bunun nedeninin başta süperoksid radikalleri olmak üzere; IL-1, IL-6, TNF, LTB_4 ve PGE_2 gibi inflamasyon mediatörlerinin miktarındaki artış ve antioksidan kapasitedeki azalış olarak açıklamışlar, antioksidan maddelerle tedavi edilebileceğini ortaya koymuşlardır. L-karnitin ise bir yandan fagositlerden reaktif oksijen metabolitlerinin yapımını inhibe ederken (17, 185), bir yandan da membran stabilize edici özelliği nedeniyle antiinflamatuvar etki göstermektedir (164, 169, 181, 185). Schinetti ve ark'ları (128) tarafından yapılan çalışmada in vitro koşullarda L-karnitin NADPH ile indüklenen lipid peroksidasyonunu önlediği tespit edilmiştir. Franceschi ve ark'ları (167) tarafından oksidatif strese maruz kalan hücreleri koruduğu ifade edilmiştir. Garrelds ve ark'ları (19) L-karnitin insan nötrofillerinde süperoksid yapımını

inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun, araşidonik asitten eikosanoid yapımının modülasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir.

Belirtilen etkileri nedeniyle L-karnitin, yaşlılığa bağlı olarak daha şiddetli gözlenen inflamatuvar reaksiyonları azaltıcı etkisinin olabileceğini düşünerek yaptığımız çalışmada sıçanlarda carageenan ile oluşturulan inflamasyon modelinde L-karnitin kullanımına bağlı olarak hücrelerin fonksiyonlarında beklentimize uygun sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda, Amico-Roxas ve ark'larının (17) yaptıkları çalışmanın bulgularına uygun olarak inflamasyon bölgesindeki eksuda miktarı gruplar arasında farklı bulunmamıştır. Eksuda içindeki inflamatuvar hücrelerin miktarının yaşlı sıçanlarda azaldığını gösteren bulgumuz ise Yoshino ve ark'nın (115) bulgularını destekler nitelikte olup, L-karnitin tedavisi ile bu azalmanın ortadan kalktığı ve sayının genç kontrol grubundaki sayıya yükseldiği tespit edilmiştir. Bu bulgunun, L-karnitin, nötrofil ve makrofaj kemotaktik aktivitelerini arttırdığını gösteren bulgularımız ile ve bu konuda mevcut literatür bulguları (186, 187, 188) ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Inflamasyon bölgesinden izole edilen hücrelerin süperoksid anyonu yapımı yaşlı kontrol grubu sıçanlarda artmaya eğilim gösterdiği halde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. L-karnitin tedavisi ise daha önceki bulgularımızı destekler nitelikte hem genç, hem de yaşlı sıçanların eksuda hücrelerinden salgılanan O_2^- miktarında azalmaya neden olmuştur.

Fagositoz inflamasyonda en önemli immunolojik parametrelerden biridir ve immün cevabın başlatılmasında anahtar rol oynar. Fagositik fonksiyonun yaşlılığa bağlı olarak azaldığı pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiş ve

membrana bağlı bir fonksiyon olduğu belirtilerek, yaşlılıktaki immün sistem hücrelerinin membran yapısındaki değişikliğin bunun nedeni olabileceği ifade edilmiştir (100, 105, 179). Intravasküler nötrofiller enfeksiyon odağına ulaşmak için, inflamatuar bölgeye bitişik kapiller ve venüllerin endotel hücrelerine adere olurlar ve enfeksiyon bölgesine ulaşıp, fagositozis, öldürme ve mikroorganizmaları sindirme işlemini yaparlar (99-101, 104, 105)

Polignano ve ark.'ları (105) ve ayrıca Perskin ve ark.'ları (99) yaşlı donörlerden izole ettikleri nötrofillerin, kemotaksislerini, aderenlerini, fagositozislerini ve intraselüler mikrobisidal aktivitelerini incelemişlerdir ve yaşlanmaya bağlı azaldığını g rmuşlerdir. Yuli ve ark.'ları (126), yaşlanmayla nötrofillerin plazma membran vizkositelerinin artması nedeniyle nötrofillerin yeterince adere olamadıklarını ve fonksiyonlarının bozulduğunu ileri sürmektedirler. Ayrıca Yoshino ve ark.'ları (115), yaşlanmaya bağlı hem fagositik hücre sayısının azaldığını, hem de bunların fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak, fagositik aktivitelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Çalışmamızın bulguları da bu bulgular doğrultusunda olup, yaşlılığa bağlı olarak fagositik aktivitede azalma tespit edilmiş, L-karnitin ile normale d nd r lm şt r

Bulgularımız değerlendirildiğinde, inflamasyonun en önemli parametrelerinden biri olan o bölgede toplanmış hücre miktarının, yaşlılarda hücrelerin kemotaktik aktivitelerinin azalmasına bağlı olarak azalmış olduğu, fakat bu hücrelerin O_2^- salınımındaki artış ve fagositozis yapma kapasitelerindeki azalış nedeniyle inflamatuar hastalıklara eğilimin artabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Yaşlılığa bağlı olarak değerşen tüm bu membrana bağlı fonksiyonlar (O_2^- salınımı, kemotaktik aktivite ve fagositik aktivite) dokulardaki

reaktif oksijen ürünlerini tuttuğu ve membran stabilize edici etkisi olduğu bilinen L-karnitin tarafından genç kontrol değerlerine döndürölmüştür. Bu bulgulara dayanarak L-karnitinin bağışıklık sistemi hücrelerindeki yaşıllığa bağlı fonksiyon bozukluğunu ortadan kaldırdığını söylemek mümkündür.

ÖZET

Yaşlanma, bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere organizmanın pekçok sisteminde fonksiyon azalması ile karakterize bir süreçtir. L-karnitin yağ asitlerinin mitokondri içine taşınmasını sağlayan bir amino asit türevi olmasının yanı sıra, antioksidan ve membran stabilize edici etkileri nedeniyle, yaşlanmaya bağlı olarak bağışıklık sistemi hücrelerinin fonksiyonlarında meydana gelen fonksiyon bozukluklarını ortadan kaldırayabileceği düşünülerek planlanan çalışmamızda 2 aylık (genç) ve 24 aylık (yaşlı) olmak üzere iki grup sıçan kullanılmıştır. Her iki gruba ait sıçanların yarısına, kontrol olarak 30 gün süresince gavajla distile su verilirken, kalan kısma aynı şekilde 50 mg/kg/gün dozda L-karnitin uygulanmıştır.

Çalışmamızın ilk aşamasında, tedavi süresi sonunda deneklerin kanlarından izole edilen nötrofillerin ve periton sıvılarından izole edilen makrofajların kemotaksis, fagitozis ve O_2^- salınımı fonksiyonları incelenmiştir.

Yaşlı-kontrol grubunun nötrofil ve makrofajlarına ait kemotaktik aktivite değerlerinin genç-kontrol grubuna göre düşük olduğu bulunmuş, L-karnitin tedavili yaşlı sıçanlarda bu fonksiyonun artarak, genç-kontrol düzeyine ulaştığı dikkati çekmiştir. L-karnitin tedavili genç sıçanların hücrelerine ait kemotaksis değerlerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Nötrofil ve makrofajların, fagositik aktivitelerinin yaşa ve L-karnitin tedavisine bağlı olarak değişmemesine karşın, salgıladıkları O_2^- miktarının yaşlı kontrol grubunda arttığı ve L-karnitin tedavisi ile genç-kontrol düzeyine düştüğü gözlenmiştir. L-karnitin tedavili genç sıçanların hücrelerine ait O_2^- salınımının kontrol grubundan farksız olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında, yukarıda belirtildiği şekilde 4 gruba ayrılan sıçanların sırt bölgesinde %2 carrageenan ile inflamasyon oluşturulmuş, bu bölgeden alınan eksuda miktarı, eksuda içindeki hücre sayısı ve bu hücrelerin kemotaksis, fagositozis ve O_2^- salınımı fonksiyonları incelenmiştir.

İnflamasyon bölgesinden alınan eksuda miktarının yaşa ve L-karnitin tedavisine bağlı olarak değişmemiş olmasına karşın, hücre sayısının yaşlı sıçanlarda daha az olduğu ve L-karnitin verilmesi ile sayının arttığı dikkati çekmiştir. L-karnitin genç sıçanlarda da etkili olmuş ve inflamasyon bölgesindeki hücre sayısını belirgin arttırmıştır. İnflamatuar hücrelerin kemotaktik ve fagositik aktivitelerinin yaşlanmaya bağlı olarak azaldığı ve L-karnitin tedavisi ile artarak genç kontrol düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. İnflamatuar hücrelerin O_2^- salınımının yaşlı sıçanlarda artmaya eğilimli olduğu, L-karnitin tedavisi ile genç kontrol düzeyine azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bulgularımız; L-karnitinin fagositik hücrelerin yaşlanmaya bağlı olarak bozulan kemotaksis, fagositozis ve O_2^- salınımı fonksiyonlarını düzelttiğini göstermektedir.

SUMMARY

The data on the ability of carnitine to modulate cell functions is limited. The influence of L-carnitine on neutrophil, macrophage functions and inflammatory process was investigated in aged rats. L-carnitine (50 mg/kg/day) or control vehicle into young (2 months old) and aged rats (24 months old) were given for 30 consecutive days. The functions of neutrophils isolated from blood and macrophages isolated from peritoneal fluid were examined.

The neutrophils and macrophages in aged rats exhibited a decline of chemotactic activity as compared with young rats. However, superoxide anion (O_2^-) release increased in both cells of aged rats. The chemotactic activity in aged rats was significantly increased to young control value by L-carnitine treatment which was accompanied by a significant decline of O_2^- release. There was no difference in phagocytic activity of elderly or young phagocytic cells due to L-carnitine treatment.

In an other series of experiments, we studied the effect of L-carnitine in inflammatory response induced by carrageenan in elderly or young rats. No differences were observed in quantity of exudate of the all groups. The exudate cells from the aged rats exhibited a decline of phagocytic and chemotactic activity as compared with the young rats. The functions were significantly enhanced by L-carnitine treatment. However O_2^- release was seen to be increased in both cells of aged rats and decreased by L-carnitine treatment.

These findings demonstrate that L-carnitine is capable of restoring the age-related changes of neutrophil and macrophage functions.

KAYNAKLAR

- 1) Meyer K.C , Ershler W., Rosenthal N.S., Lu X.G , Peterson K.; Immune dysregulation in the aging human lung ; Am J Respir Crit Care Med. Mar 153(3): 1072-9, 1996.
- 2) Pawelec G , Solana R , Remarque E , Mariani E ; Impact of aging on innate immunity. J Leukoc Biol Dec 64(6): 703-12, 1998.
- 3) Wu D , Mura C , Beharka A.A , Han S.N., Paulsan K.E , Hwang D., Meydani S.N.; Age-associated increase in PGE₂ Synthesis and cox activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. Am J Physiol 275(Cell Physiol 44): C661-C668, 1998.
- 4) Sohal R. S. and Weindruch R ; Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. Science. Vol.273. 5 july,59-63, 1996.
- 5) Holliday R ; The ancient origins and causes of ageing News Physiol Sci; 7: 38-40,1992.
- 6) Halliwell B ; Reactive oxygen species in living Systems: Source, biochemistry, and role in human disease Am J Med; 91(Suppl 3C): 14S-22S, 1991.
- 7) Sahnoun Z , Jamoussi K., Zeghal K.M ; Free radicals and antioxidants: Physiology, human pathology and therapotic aspects. Therapie Jul. Aug 53(4): 315-39, 1998.
- 8) Shuedora A.A., Kisin E.R., Kagan V.E., Karol M.H., Increasead lipid peroxidation and decreased antioxidants in lungs of guinea pigs following on allergic pulmonary response Toxicol Appl.Pharmacol. May;132(1): 72-81, 1995.

- 9) Emerit J., Klein J.M., Coutellier A., Congy F.; Free radicals and lipid peroxidation in cell biology: physiopathologic prospects: *Pathol. Biol (Paris)* Apr 39(4): 316-27, 1991
- 10) Gorini A., Ghigini B., Villa R.F.; Acetylcholinesterase activity of synaptic plasma membranes during ageing: effect of L-acetylcarnitine *Dementia* May Jun;7(3): 147-54, 1996.
- 11) Hagen T.M., Ingersoll R.T., Wehr C.M., Lykkesfeldt J., Vinarsky V., Bartholomeur J.C.; Acetyl-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* Aug 4;95(16): 9562-6, 1998.
- 12) Tagliatela G., Caprioli A., Giuliani A., Ghirardi O.; Spatial memory and NGF levels in aged rats: natural variability and effects of acetyl-L-carnitine treatment *Exp Gerontol* Sep-Oct 31(5): 577-87, 1996.
- 13) Von Zoglinicki T. and Brunk U. T.; Intracellular Interactions under Oxidative Stress and Aging: a Hypothesis. *Z Gerontologie* 26: 215-220, 1993.
- 14) Cronstein B.N.; Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J App Physiol* 76(1): 5-13, 1994.
- 15) Rodenas J., Mitjavila M.T., Carbonell T.; Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol* 274(Cell Physiol. 43):C827-C830, 1998
- 16) Kelly S., Goldschmidt-Clermont P.J., Milliken E.E., Arai T., Smith E.H., Bulkey G.B.; Protein tyrosine phosphorylation mediates TNF-induced endothelial-neutrophil adhesion in vitro. *Am J Physiol* 276 (Heart Circ. Physiol. 43): H513-H519, 1998

- 17) Amico-Roxas M., Caruso A., Cutuli V.M.C., De Bernardis E., Leonardi G.; Inhibitory Effects of Propionyl-L-Carnitine on Plasma Extravasation Induced By Irritants in Rodents. *Drugs Exptl Clin Res.* XIX(5) 213-217, 1993.
- 18) Elliott G.R., Lauwen A.P.M., and Bonta I.L.; The Effect of Acute Feeding of Carnitine on Basal and A23187-stimulated Eicosanoid Release from Rat Carrageenan-Elicited Peritoneal Macrophages. *Brit J Nutr.* 64: 497-503, 1990.
- 19) Garrelds I.M., Elliott G.R., Zijlstra J.F., and Bonta I.L.; Effects of Short- and Long-term Feeding of L-carnitine and Congeners on the Production of Eicosanoids from Rat Peritoneal Leucocytes. *Brit J Nutr.* 72: 785-793, 1994.
- 20) Harman D.; The aging process: Major risk factor for disease and death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88; 5360-5363, 1991.
- 21) Harman D.; Free Radical Theory of Aging: History; Free Radicals and Aging ed. By I Emerit & Chance. Birkhauser Verlag Basel Switzerland 1992.
- 22) Harman D.; Free Radical Theory of Aging: Mutation Research; 275; 257-266, 1992.
- 23) Medvede Z.; An attempt at rational classification of theories of ageing: *Biol Rev;* 65: 375-398, 1990.
- 24) Yu B.P.; Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radical Bio Med* 21(5): 651-668, 1996.
- 25) Feuers R.J., Weindruch R., Hart R.W.; Caloric Restriction, Aging and Antioxidant Enzymes. *Mutation Research.* 295:191-200, 1993.

- 26) Yu B.P.; Putative intervention. In: Masoro E.J., ed. Handbook of Physiology, Sect II Aging. New York, Oxford University Press; 613-631, 1995
- 27) Eichhorn G.L.; Aging, Genetics and environment, potential of errors introduced in to genetic information transfer by metal ions. Mech Ageing Dev; 9: 291-301, 1979.
- 28) Orr W.C., Sohal R.S.; Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase. Science; 263: 1128-1130, 1994
- 29) Kehler J.P., Smith C.V.; Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In: Frei B., ed. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego, Academic Press; 25-62, 1994
- 30) Mote P.I., Grizzle J.M., Walford R.L., Spindler S.R.; Influences of age and calorie restriction on expression of hepatic genes for xenobiotic and oxygen metabolizing enzymes in the mouse. J Gerontol; 46: B95-B100, 1991.
- 31) Chaudhry A.K., Nobubo M., Reddy G.R., Yeola S.N., Morrow J.D., Blair I.A., Marnett L.J.; Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. Science; 265: 1580-1582, 1994
- 32) Pahlavani M.A., Haley-Zitlin V., Richardson A.; Influence of dietary restriction on gene expression: Changes in transcription of specific genes. In: Yu B.P., ed. Modulation of aging processes by dietary restriction. Boca Raton F.L., CRC Press; 143-156, 1994
- 33) Corpas E., Harman S.M., Blackman M.R.; Human growth hormone and human aging. Endocrin Rev; 14: 20-39, 1993
- 34) Harman D.; Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol; 11: 298-300, 1956

- 35) Giovanni R.; Host Tissue Damage by Phagocytes. *Ann NY Acad Sci.* Dec 15; 832: 426-448, 1997.
- 36) Wuyts A , Proost P , Put W , Lenaerts J P , Paemen L Van Damme J ; Leukocyte Recruitment by Monocyte Chemotactic Proteins (MCPs) Secreted by Human Phagocytes. *J Immunol Methods.* 174: 237-247, 1994.
- 37) Nagata K , Tsuji T , Todoroki N , Katagiri Y , Tanoue K , Yamazaki H , Hanai N. And I. Tatsuro ; Activated Platelets Induce Superoxide Anion Release by Monocytes and Neutrophils through P-Selectin (CD62) *J Immunol* 151; 3267-3273, 1993
- 38) Fülöp T , Jr Varga Z., Nagy J. T. and Foris G.; Studies on Opsonized Zymosan, FMLP, Carbachol, PMA and A_{23187} Stimulated Respiratory Burst of Human PMNLs. *Biochem Int.* Vol.17, No 3, 419-426, Sept 1988.
- 39) Dahlgren C ; Temporal Adaptation of Human Neutrophil Metabolic Responsiveness to the Peptide Formylmethionyl-Leucyl Phenylalanine: A Comparison Between Human Neutrophils and Granule-Depleted Neutrophil Cytoplasts *Cell Biochem Funct* Vol.8: 57-64, 1990.
- 40) Ahuja A , Oh N., Chao W., Spragg R.G. and Smith R. M.; Inhibition of the Human Neutrophil Respiratory Burst by Native and Synthetic Surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 496-503. 1996.
- 41) Allen R C., Stevens P.R., Price T.H., Chatta G S and Dale D.C.; In Vivo Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Oxidative Functions in Normal Human Volunteers *J Infect Dis.* 175: 1184-92 1997

- 42) Catz S.D. and Sterin-Speziale N.B.; Bradykinin Stimulates Phosphoinositide Turnover and Phospholipase C but not Phospholipase D and NADPH oxidase in Human Neutrophils. *J Leukoc Biol* 59: 591-597. 1996
- 43) Bergstrand H., Erichsson T., Hallberg A., Johansson B., Karabelas K., Michelsen P. and Nybom A.; Modulation of Neutrophil Superoxide Generation by Inhibitors of Protein Kinase C, Calmodulin, Diacylglycerol and Myosin Light Chain Kinases, and Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerase. *J Pharmacol Exp Ther.* Vol.263, No.3,1334-1346 1992
- 44) DeLeo F.R. and Quinn M.T.; Assembly of the Phagocyte NADPH Oxidase: Molecular Interaction of Oxidase Proteins. *J Leukoc Biol.* 60: 677-691. 1996
- 45) Gutteridge J.M.C., Hallwell B.; The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*; 15: 129-135. 1990.
- 46) Gutteridge J.M.C.; Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41: 1819-1825. 1995.
- 47) Kuehl F.A., Egan R.W.; Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 210: 978-984. 1980.
- 48) Gutteridge J.M.C.; Iron Promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from hemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*; 20: 291-295. 1986.
- 49) Gutteridge J.M.C.; The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS Lett*; 150: 454-458, 1982
- 50) Stadtman E.R., Berlett B.S.; Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabol Rev.* 30(29): 225-243 1998.

- 51) Sies H., Murphy M. E.; Oxidative Stress Oxidants and Antioxidants In Oxidative Stress 29(11) 15-22. 1991.
- 52) Stocker R., and Frei B.; Endogeneous Antioxidant Defenses in Human Plasma. In Oxidative Stress. 11(8) 213-245 1991
- 53) Halliwell B.; Drug Antioxidant Effects. A Basis for Drug Selection? Drugs. 42: 569-605. 1991.
- 54) Greenwald R.A., Moy W.W., Lazarus D.; Degradation of Cartilage Proteoglycans and Collagen by Superoxide Radicals Arthritis Rheum 19: 799-805. 1976.
- 55) Halliwell B. and Gutteridge M.; Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, London. Ed Bergmeyer H U.; Vol. 45, pp.543. 1989
- 56) Clark I.A., Hunt N H and Cowden W B ; Oxygen-derived Free Radicals in the Pathogenesis of Parasitic Disease. Adv. Parasitol. 25: 1-44. 1981
- 57) Peterhans E.T.W. Jungi and Stocker R.; Autotoxicity and Reactive Oxygen in Viral Disease. In Oxyradicals in Molecular Biology and Pathology 543-562 1981.
- 58) Miesel R.S., Koerner R., Spinnler C., Weser U. and Ehrenfeld U; Phagocytic Response Modifying of Enzymatic Cell Wall Digests of Nocardia Opaca. Immunol Lett 26: 31-36 1990
- 59) Staal F.J.T., Roederer M., Herzenberg L.A.; Intracellular Thiols Regulate Activation of Nuclear Factor κ B and Transcription of Human Immunodeficiency Virus. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9943-9947. 1990
- 60) Sun Y., Oberley L.W., Lu Y; A simple method for clinical assay superoxide dismutase. Clin Chem. 34(3): 457-500. 1988.

- 61) Toshiaki M., Taketo O ; Lipid peroxidation of the erythrocyte membrane caused by stimulated polymorphonuclear leukocytes in the presence of ferritin. *Chem Pharm Bull* 39(6): 1507-1509. 1991
- 62) Saik L.A., Hsieh H.L., Baricos W.H., Shapira E.; Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *Pediatr Res*; 16: 933-937. 1982
- 63) Hartz J.W., Deutsch H.F.; Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 247: 7043-7050. 1972.
- 64) Sohal R.S., Arnold L., and Orr W.C.; Effect of Age on Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Reductase, Inorganic Peroxides, TBA-Reactive Material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila Melanogaster*. *Mech Ageing Dev*. 56: 223-235. 1990.
- 65) Vance P.G., Keele B.B.; Superoxide dismutase from streptococcus mutants *J Biol Chem*. 247: 4782-4786. 1972
- 66) Harton A.A., Feurburst S.; Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRR Crit Rev Toxicol*. 18(1): 27-73. 1987
- 67) Aebi H.E.; Catalase of Enzymatic Analysis.; Volume III Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases Ed Bergmeyer H.U., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 273-285. 1987.
- 68) Fairbanks V.F., Klee G.G.; Biochemical Aspects of Hematology, In *Textbook of Clinical Chemistry*, ed By Tietz N.W. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 1498-1535. 1986.

- 69) Takahashi K., Cohen H.J.; Selenium dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes *Blood*; 68: 640-645. 1986
- 70) Rodriguez-Martinez M A and Ruiz-Torres A.; Homeostasis Between Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Healthy Human Aging. *Mech Ageing Dev.* 66: 213-222. 1992.
- 71) Meydani S N , Hayek M and Coleman L.; Influence of Vitamins E and B₆ on Immune Response. *Nutr Immunol Lab* 125-140, 1996
- 72) Sies H., Murphy M E ; Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B Biol*; 8: 211-224 1991.
- 73) Rose R.C.; Transport of ascorbic acid and other water soluble vitamins. *Biochim Biophys Acta* 947: 335-366. 1988
- 74) Shorah C J ; The transport of vitamin C and effects of disease *Proc Nutr Soc* 51: 189-198 1992
- 75) Niki E ; Vitamin C as an antioxidant in selected vitamins, minerals and functional consequences of maternal malnutrition. *World Rev Nutr Dietetics.* 64: 2-30, 1991.
- 76) Stamler J.S , Slivka A.; Biological chemistry of hiols in the vasculature and in Vascular-related diseases *Nutr Rev.* 54: 1-30. 1996.
- 77) Winrow V R , Winyard P G , Morris C J , Blake D.R ; Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction *Brit Med Bull.* 49 (3), 506-522 1993

- 78) Waneen W. Spirduso, EdD; Physical Dimensions of Aging. QP 86. S65, 5-325, 1995
- 79) Centre for Biomedical Sciences Human Physiology and Anatomy
3:Teaching Resources Student Discussion Papers. Aging and the Effects of Oxidative Stress and Caloric Restriction Nutr Rev 12(2), 50-15. 1999
- 80) Pawelec G., Wagner W., Adibzadeh M., Engel A.; Tcell immunosenescence in vitro and in vivo. Exp Gerontol. 34: 419-429. 1999.
- 81) Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto MF., Martorelli V., Quaglino D.; The immune system in the elderly: II. Specific cellular immunity. Immunol Res 20(2) 109-13. 1999.
- 82) Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto MF., Quaglino D.; Immunological changes in the elderly Aging(Milano). Oct,11(5): 281-6. 1999.
- 83) Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto MF., Quaglino D.; The immune system in the elderly:III. Innate immunity. Immunol Res. 20(2),117-26 1999.
- 84) Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto MF., Corsi MP, Quaglino D.; The immune system in the elderly:I Specific humoral immunity Immunol Res. 20(2):101-8. 1999.
- 85) Miller Richard A; The Aging Immune System: Primer and Prospectus. Science July 273: 70-74. 1996.
- 86) Khanna K.V., Markham R.B.; A perspective on cellular immunity in the elderly. Clin Infect Dis Apr;28(4): 710-3. 1999

- 87) Babior B M ; Neutrophil Function as Related to Neutrophil-Endothelial Cell Interactions. *Nouv Rev Fr Hematol.* 34: S29-S35 1992.
- 88) Miesel R and Haas R ; Reactivity of an Active Center Analog of Cu_2Zn_2 Superoxide Dismutase in Murine Model of Acute and Chronic Inflammation *Inflammation.* Vol.17, No. 5. 1993.
- 89) Ferrante A, Hauptmann B, Seckinger P, & Dayer J-M ; Inhibition of Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α)-Induced Neutrophil Respiratory Burst by a TNF Inhibitor *Immunology.* 72: 440-442. 1991
- 90) Nakagawa H. and Komorita N ; Complement Component C3-Derived Neutrophil Chemotactic Factors Purified from Exudate of Rat Carrageenin-Induced Inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(3): 1181-1187. 1993
- 91) Meagher L C., Cousin J M, Seckl J.R and Hasleett C ; Opposing Effects of Glucocorticoids on the Rate of Apoptosis in Neutrophilic and Eosinophilic Granulocytes *J Immunol.* 156: 4422-4428. 1996.
- 92) Aoshiba K, Nagai A, Ishihara Y, Kagawa J and Takizawa T ; Effects of α_1 -proteinase Inhibitor on Chemotaxis of Polymorphonuclear Leukocyte Recruitment in Human Subjects. *J Lab Clin Med* 122: 333-40 1993.
- 93) Kasama by T., Strieter R.M., Standiford T.J., Burdick M.D. and Kunkel S.L ; Expression and Regulation of Human Neutrophil-Derived Macrophage Inflammatory Protein 1 α . *J Exp Med.* 178: 63-72 1993.
- 94) Spisani S, Giuliani L A, Cavalletti T, Zaccarini M, Milani L, Gavioli R and Traniello S ; Modulation of Neutrophil Functions by Activated Platelet Release Factors *Inflammation.* 16(2),325-335. 1992

- 95) Zagorski J and Wahl S M; Inhibition of Acute Peritoneal Inflammation in Rats by a Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant Receptor Antagonist. *The Journal of Immunology*. 159: 1059-1062. 1997.
- 96) Ajuebor M N., Das A M., Virag L., Flower R J, Szabo C. and Perretti M.; Role of Resident Peritoneal Macrophages and Mast Cells in Chemokine Production and Neutrophil Migration in Acute Inflammation: Evidence for an Inhibitory Loop Involving Endogenous IL-10 *J Immunol*. 162: 1685-1691. 1999
- 97) Pruijboom W.M., Van Dijk A.P.M., Tak C.J.A.M., Zijlstra F.J., Bonta I.L. and Wilson J.H.P.; Inflammatory Mediators and Activity of Human Peritoneal Macrophages *Agents Actions* 38: C86-C88. 1993
- 98) Manara F.S., Chin J. and Schneider D.L.; Role of Degranulation in Activation of the Respiratory Burst in Human Neutrophils *J Leukocyte Biol* 49: 489-498. 1991.
- 99) Perskin M.H. and Cronstein B.N.; Age-Related Changes in Neutrophil Structure and Function *Mech Ageing Dev*. 64 :303-313. 1992
- 100) Damtew B., Spagnuolo P.J., Goldsmith G.G.H., and Marino J.A.; Neutrophil Adhesion in the Elderly: Inhibitory Effects of plasma From Elderly Patients. *Clin Immunol Immunop*. 54,247-255. 1990
- 101) Eeden S.F., Bicknell S., Walker B.A.M. and Hogg J.C.; Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am J Physiol*. 272: H401-H408. 1997.

- 102) Guidot D M , Hybertson B M , Kitlowski R P and Repine J E ; Inhaled NO Prevents IL-1 Induced Neutrophil Accumulation and Associated Acute Edema in Isolated Rat Lungs. *Am J Physiol* 271: L225-L229. 1996
- 103) Valerius T , Repp R , de Wit TPM, et al Involvement of the High-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI;CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of Neutrophils During Granulocyte Colony-Stimulating Factor Therapy. *Blood* 82: 931-9. 1993
- 104) Eeden S.F., Klut M E., Walker B A M., Hogg J.C.; The use of flow cytometry to measure neutrophil function *J Immunol Metods*. 232 23-43. 1999.
- 105) Polignano A , Tortorella C , Venezia A , Jirillo E. and Antonaci S.; Age-associated changes of neutrophil responsiveness in a human healthy elderly population. *Cytobios*. 80: 145-153. 1994.
- 106) Silverman E M. and Silverman A G ; Granulocyte Adherence in the Elderly. *Amer J Clin Pathol* 67. 49-52 1977
- 107) Whyte M K B , Meagher L.C., Mac Dermot J. and Haslett C.; Impairment of Function in Aging Neutrophils is Associated with Apoptosis *J Immunol* 150 5124. 1993
- 108) Wichtel M.G , Anderson K L , Johnson T.V., Nathan U and Smith L ; Influence of Age on Neutrophil Function in Foals. *Eq Vet J*. 23 (6) 466-469. 1991.
- 109) Higuchi H , Nagahata H , Hiroki M and Noda H ; Relationship between Age-Dependent Changes of Bovine Neutrophil Functions and Their Intracellular Ca²⁺ Concentrations. *J Vet Med Sci* 59(4): 271-276 1997

- 110) Fülöp T., Barabas G., Varga Z., Jozsef C., Csabina S., Szucs S., Seres I., Szikszay E., Jeney Z. and Penyige A.; Age-Dependent Changes in Transmembrane Signalling: Identification of G Proteins in Human Lymphocytes and Polymorphonuclear Leukocytes. *Cell Signal*. 5(5): 593-603 1993
- 111) Pawinska M., Wroblewski T., Kaca E.; Chemotactic Activity of Neutrophil Granulocytes in Old People in Health or With Symptoms of Infection. *Fasc*. 1(77), 1991.
- 112) Lipschitz By D.A., Udupa K.B., Indelicato S.R. and Das M.; Effect of Age on Second Messenger Generation in Neutrophils. *Blood*. 78(5) (Sep 1): 1347-1354. 1991
- 113) Cannon J.G., Fiatarone M.A., Fielding R.A. and Evans W.J.; Aging and Stress-Induced Changes in Complement Activation and Neutrophil Mobilization. *J Appl Physiol* 76(6): 2616-2620 1994.
- 114) Fülöp T., Jr Fouquet C., Allaire P., Perrin N., Lacombe G., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Gagne D., Wagner J.R., Khalil A., Dupuis G.; Changes in Apoptosis of Human Polymorphonuclear Granulocytes with Aging. *Mech Aging Dev*. 96: 15-34. 1997.
- 115) Yoshino T., Tamura M., Kawabe M., Nomura H., Imai N. And Ono M.; Effect of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Functions in Aged animals. *Br J Haematol* 82. 664-670. 1992
- 116) Chatta G.S., Price T.H., Stratton J.R. and Dale D.C.; Aging and Marrow Neutrophil Reserves. *J Am Geriatr Soc*. 42: 77-81. 1994.

- 117) Wiedermann C J., Niedermühlbichler M., Beimbold H. and Braunsteiner H; In Vitro Activation of Neutrophils of the Aged by Recombinant Human Growth Hormone. *J Infect Dis.* 164: 1017-20 1991.
- 118) Seres I, Csongor J, Mohacsi A, Leövey A, Fulöp T.; Age-Dependent Alterations of Human Recombinant GM-CSF effects on Human Granulocytes. *Mech Ageing Dev.* 71: 143-154. 1993.
- 119) Esposito A L., Poirier W J., Clark C.A.; In vitro Assessment of Chemotaxis by Peripheral Blood Neutrophils from Adult and Senescent C57BL/6 Mice: Correlation with in vivo Responses to Pulmonary Infection with Type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Gerontology.* 36: 2-11. 1990
- 120) Mello S.B.V, Farsky S.H.P., Sannomiya P. and Garcia-Leme J.; Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with a plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. *J Leukoc Biol* 51: 46-52 1992.
- 121) Sato E, Simpson K.L., Grisham M.B., Koyama S., Robbins R.A.; Inhibition of MIP-1 α Induced Human Neutrophil and Monocyte Chemotactic Activity By Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites. *J Lab Clin Med* 135: 161-169. 2000.
- 122) Tortorella C, Ottolenghi A, Pugliese P, Jirillo E, and Antonaci S; Relationship Between Respiratory Burst and Adhesiveness Capacity in Elderly Polymorphonuclear cells. *Mech Ageing Dev.* 69: 53-63 1993.

- 123) Kuroiwa A, Miyamoto K, Okabe N. and Shibuya T.; Re-evaluation of the Phagocytic Respiratory Burst in the Physiological or Inflammatory State and in Ageing J Clin Lab Immunol. 29. 189-191. 1989
- 124) Mohacsi A, Fülöp T, Jr., Kozlovsky B., Seres I., and Leövey A.; Superoxide Anion Production and Intracellular Free Calcium Levels in Resting and Stimulated Polymorphonuclear Leukocytes Obtained From Healthy and Arteriosclerotic Subjects of Various Ages. Clin Biochem. 25, 285-288. 1992.
- 125) Johnson D.D., Renshaw H.W., Warner D H., Browder E J., Williams J.D.; Characteristics of the Phagocytically Induced Respiratory Burst in Leukocytes from Young Adult and Aged Beagle Dogs Gerontology. 30: 167-177. 1984
- 126) Yuli I., Tomonaga A. and Snyderman R.; Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 5906-5910 1982.
- 127) Rivnay B, Bergman S, Shinitzky M. and Globerson A.; Correlations between membrane viscosity, serum cholesterol, lymphocyte activation and aging in man Mech Ageing Dev 12: 119-126. 1980
- 128) Shinitzky M; Patterns of lipid changes in membranes of the aged brain Gerontology. 33:149-154. 1987
- 129) De La Fuente M., Munoz M L; Impairment of Phagocytic Process in Macrophages from Young and Old Mice by Protein Malnutrition. Ann Nutr Metab 36: 41-47. 1992

- 130) Meszaros A J , Reichner J S and Albia J E ; Macrophage Phagocytosis of Wound Neutrophils J Leukocyte Biol. 65, 35-42 1999.
- 131) Ortega E , Forner M A , Barriga C , and De la Fuente M ; Effect of Age and of Swimming-Induced Stress on the Phagocytic Capacity of Peritoneal Macrophages from Mice. Mech Ageing Dev. 70: 53-63. 1993.
- 132) Ortega E , Forner M.A , Barriga C , and De la Fuente M ; Effect of Physical Activity Stress on the Phagocytic Process of Peritoneal Macrophages from Old Guinea Pigs. Mech Ageing Dev. 65: 157-165 1992.
- 133) De La Fuente M , Martin M I ,and Ortega E ; Changes in the Phagocytic Function of Peritoneal Macrophages from Old Mice After Strenuous Physical Exercise Comp Immunol Microbiol, Infect, Dis 13(4) 189-198. 1990
- 134) Ben Mandi M H , Gozin A , Driss F , Andriev V , Christen M O , Pasquier C ; Anethole dithiolethione regulator oxidant-induced tyrosine kinase activation in endothelial cells Antioxid Redox Signal 2(4): 789-99, 2000
- 135) Liyama M , Shimada Y , Kita T and Ito H ; Effect of Aging on Macrophage Adherence to Extracellular Matrix Proteins Mech Ageing Dev. 66 149-158 1992.
- 136) Forner M.A , Collazos M.E , Barriga C , De la Fuente Rodriguez A B , Ortega E ; Effect of Age on Adherence and Chemotaxis Capacities of Peritoneal Macrophages. Influence of Physical Activity Stress Mech Ageing Dev. 75: 179-189 1994.

- 137) Ottaviani E; Some Facts and Speculation on the Origin of the Immunoneuroendocrine System and Its Correlation with Aging. *Ann NY Acad Sci* 331-334 1996.
- 138) Davila D R, Edwards C K, III, Arkins S, Simon J; Interferon-gamma-Induced Priming for Secretion of Superoxide Anion and Tumor Necrosis Factor-alpha Declines in Macrophages from aged Rats. *FASEB J.* 4: 2906-2911. 1990.
- 139) Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Santa Maria C, Machado A; Age-Dependent Modification of Lipid Composition and Lipid Structural Order Parameter of Rat Peritoneal Macrophage Membranes. *Mech Ageing Dev.* 71: 1-12. 1993.
- 140) Guimaraes A R P, Costa Rosa L.F.B.P., Safi D A and Curi R; Metabolic and Functional Changes in Macrophages of rats Fed Polyunsaturated or Fatty Acid Rich-Diets During Ageing. *Biochem Int* 27(1), 9-16, June 1992.
- 141) Chen Y, Solem L. and Johnson A. G.; Activation of Macrophages from Aging Mice by Detoxified Lipid A. *J Leukocyte Biol.* 49: 416-422. 1991.
- 142) Mouithys-Mickalad A M, Zheng S X, Deby-Dupont G P., Deby Lamy M.M, Reginster J Y, Henrotin Y.E; Invitro study of the antioxidant properties of non steroidal anti-inflammatory drugs by chemilumines and electron spin resonance (ESR) *Free Radical Res.* Nov; 33(5): 607-21 2000.

- 143) Chen Y and Johnson A G ; In Vivo Activation of Macrophages by Prolactin from Young and Aging Mice Int. J. Immunopharmacol. 15(1):39-45. 1993.
- 144) Chen Y. and Bradley S F ; Aging and Eliciting Agents: Effect on Murine Peritoneal Macrophage Monokine Bioactivity Exp Gerontol 28, 145-159. 1993.
- 145) Rollo E E & Denhardt D.T.; Differential Effects of Osteopontin on the Cytotoxic Activity of Macrophages from Young and Old Mice. Immunology. 88: 642-647. 1996.
- 146) De Simone C , Famularo G.; Molecular Biology Intelligence Unit. Carnitine Today Heidelberg, Germany. International Copyright Landes Bioscience Austin, Texas, USA pp 95-117, 1997
- 147) Haeckel R , Kaiser E. , Oellerich M , Siliprandi N.: Carnitine: metabolism, function and clinical application. J Clin Chem Clin Biochem. 28: 291-95. 1990.
- 148) Tanphaichitr V., Leelahagul P.: Carnitine metabolism and human carnitine deficiency Nutrition. 9(3), May/June,150-156 1993.
- 149) Bremer J , De Simone C , Famularo G ; Molecular Biology Intelligence Unit. Carnitine today , Landes bioscience Austin, Texas, USA pp 1-37. 1997.
- 150) Rebouche C.J: Ascorbic acid and carnitine biosynthesis Am J. Clin. Nutr. 54: 1147-52. 1991.

- 151) De Simone C , Famularo G ; Molecular Biology Intelligence Unit. Carnitine Today Heidelberg, Germany. International Copyright Landes Bioscience Austin, Texas, USA pp 119-161, 1997.
- 152) Sugden M.C. and Holness M.J ; Interactive Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Complex and the Carnitine Palmitoyltransferase System. FASEB J 8: 54-61 1994.
- 153) Editorial: Carnitine deficiency. The Lancet 335(17), 631-33 1990
- 154) Weaver L.T , Rosenthal S.R , Gladstone W., Winter H.S.; Carnitine deficiency: a possible cause of gastrointestinal dysmotility. Acta Pediatr. 81: 79-81 1992.
- 155) Brass E.P.; Carnitine transport in L-carnitine and its role in medicine from function to therapy Ed: Ferrari R , Di Mauro S , Sherwood G., Academic press ltd , New York, pp.21-36. 1992.
- 156) Maccari F , Arseni A , Chiodi P , Ramacci M.T and Angelucci L ; Levels of Carnitines in Brain and Other Tissue of Rats of Different Ages: Effect of Acetyl-L-Carnitine Administration. Exp Gerontol. 25: 127-134. 1990.
- 157) Caprioli A , Ghirardi O , Ramacci M.T , and Angelucci L ; Age-Dependent Deficits in Radial Maze Performance in the Rat: Effect of Chronic Treatment with Acetyl-L-Carnitine. Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat. 14: 359-369 1990.
- 158) Davis S , Markowska A L , Wenk G.L and Barnes C.A ; Acetyl-L-Carnitine : Behavioral, Electrophysiological and Neurochemical Effects. Neurobiol Aging 14: 107-115. 1993.

- 159) Ames B.N.; Micronutrients Prevent Cancer and Delay Aging Toxicol Lett. Dec 28: 102-103. 1998.
- 160) Hagen T.M., Wehr C.M., Ames B.N.; Mitochondrial Decay in Aging Reversal through Supplementation of Acetyl-L-Carnitine and N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitrone Ann N Y Acad Sci Nov 20;854-: 214-23. 1998.
- 161) Hagen T.M., Ingersoll R.T., Wehr C.M., Lykkesfeldt J., Vinarsky V., Bartholomew J.C., Song M.H., Ames B.N.; Acetyl-L-carnitine Fed to Old Rats Partially Restores Mitochondrial Function and Ambulatory Activity. Proc Natl Acad Sci USA. Aug 4;95(16): 9562-6. 1998.
- 162) Costell M., O'Connor J.E. and Grisolia S.; Age-Dependent Decrease of Carnitine Content in Muscle of Mice and Humans. Biochem Bioph Res Co. 161(3): 1135-1143. 1989
- 163) Ruggiero F.M., Cafagna F., Gadaleta M.N. and Quagliariello E.; Effect of Aging and Acetyl-L-Carnitine on the Lipid Composition of Rat Plasma and Erythrocytes Biochem Bioph Res Co. 170(2): 621-626. 1990
- 164) Elliott G.R., Lauwen A.P.M. and Bonta I.L.; Acute Administration of Rats Modified the Basal and A23187-Stimulated Release of Eicosanoids from 4 Day Carrageenin-Elicited Peritoneal Macrophages. Agents and Actions. 32(1/2): 88-89. 1991.
- 165) Kurth L., Fraker P., Bieber L.; Utilization of Intracellular Acylcarnitine Pools by Mononuclear Phagocytes. Biochim Biophys Acta 1201: 321-327. 1994

- 166) Demirkol M., Sewell A.C., Bohles H.; The variation of Carnitine Content in Human Blood Cells During Disease a Study in Bacterial Infection and Inflammatory Bowel Disease. *Eur J Pediatr* Aug;153(8): 565-8 1994
- 167) Franceschi C., Cossarizza A., Troiano L., Salati R., Monti D.; Immunological Parameters in Aging: Studies on Natural Immunomodulatory and Immunoprotective Substances. *Int J Clin Pharmacol Res.* 10(1-2): 53-7. 1990
- 168) Jirillo E., Altamura M., Munno I., Pellegrino N.M., Sabato R., Di Fabio S. & De Simone C.; Effects of Acetyl-L-Carnitine Oral Administration on Lymphocyte Antibacterial Activity and TNF- α Levels in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. A Randomized Double Blind Versus Placebo Study. *Immunopharm Immunot.* 13(1&2): 135-146 1991.
- 169) Caruso A., Cutuli V.M., De Bernardis E., Leonardi G., Amico-Roxas M.; Protective Effect of Propionyl-L-Carnitine Against PAF-Induced Rat Paw Oedema. *Pharmacol Res.* Jan 31(1): 67-72. 1995.
- 170) Boyum A.; Separation of leukocytes from blood and bone marrow *Scand. J. Clin Lab Invest.* 21:suppl 97: 77-168. 1956.
- 171) Boyden S.V.; The chemotactile effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Experimental Med.* 115: 453. 1962.
- 172) Hudson L., Hay F.C.; Initial preparations in Practical Immunology. Hackwell Scientific Publications. Oxford London. pp.1-23 1976.

- 173) De Simone C , Maretti S , Alesse E. Zozzeroni F. ; Effect of L-carnitine on Human Immunodeficiency Virus-1 Infection-Associated Apoptosis: A pilot Study. *Blood* 91, 10(May 15): 3817-3824 1998
- 174) Villani R.G , Gannon J , Self M , Rich P A ; L-Carnitine supplementation Combined with aerobic training does not promote weight loss in moderately obese women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* Jun: 10(2) 199-207. 2000.
- 175) ClouDET P , Sempore G , Tsoko M , Gresti J , Demarquoy J , Niot I , Bezard J , Martin-Privat P ; Effect of short- and long-term treatments by a low level of dietary L-carnitine on parameters related to fatty acid oxidation in wistar rat *Biochim Biophys Acta*. Jan 19; 1299(2): 191-7, 1996
- 176) Arienti G , Ramacci M.T , Maccari F , Casu A , Corazzi L ; Acetyl-L-carnitine influences the fluidity of brain microsomes and of liposomes made of rat brain microsomal lipid extracts. *Neurochem Res* Jul; 17(7): 671-5. 1992.
- 177) Ito Y , Ponnappan U , Lipschitz D.A ; Excess formation of lysophosphatidic acid with age inhibits myristic acid-induced superoxide anion generation in intact human neutrophils. *FEBS Letters* 394: 149-152 1996
- 178) Tortorella C , Polignano A , Piazzolla G , Serrone M , Jirillo E. and Antonaci S ; Lipopolysaccharide, granulocyte-monocyte colony stimulating factor and pentoxifylline-mediated effects on formyl-methionyl-leucine-phenylalanine-stimulated neutrophil respiratory burst in the elderly *Microbios* 85:189-198 1996

- 179)** McIntyre T.M , Reinhold S.L , Prescott S.M , Zimmerman G.A ; Protein kinase C activity appears to be required for the synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ by human neutrophils. *J Biol Chem* Nov 15; 262(32): 15370-6 1987.
- 180)** Biselli R , Farrace S , De Simone C , Fattorossi A ; Potentiation of human polymorphonuclear leukocyte activation by atrial natriuretic peptide Inhibitory effect of carnitine congeners *Inflammation* Feb; 20(1): 33-42. 1996
- 181)** Alveraz E , Maria C S. and Machado A.; Respiratory Burst Reaction Changes with age in Rat Peritoneal Macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1179:247-252. 1993
- 182)** Alvarez E , Machado A , Sobrino F and Santa Maria C ; Nitric Oxide and Superoxide Anion Production Decrease with Age in Resident and Activated Rat Peritoneal Macrophages. *Cell Immunol* 169: 152-155 1996.
- 183)** Lavie L , Weinreb O.; Age and Strain-Related Changes in Tissue Transglutaminase Activity in Murine Macrophages: The Effects of Inflammation and Induction by Retinol *Mech Ageing Dev.* 90: 129-143. 1996.
- 184)** Heinzelmann M , Simmen H.P , Battaglia H , Friedl H.P., Trentz O ; Inflammatory Response after Abdominal Trauma, Infection, or Intestinal Obstruction Measured by Oxygen Radical Production in Peritoneal Fluid. *Am J Surg.* 174: 445-447. 1997.
- 185)** Thomas S , Fischer F.P , Mettang T , Pauli-Magnus C , Weber J , Kuhlmann V ; Effects of L-carnitine on leukocyte function and viability in

hemodialysis patients: A double-blind randomized trial. *Am J Kidney Dis*,
Oct; 34(4): 678-87 1999.

- 186) Conte A., Bianchi I., Guazzeli M., Taponeco G., Bertelli A., Ronca G.;
Effect of L-propionyl carnitine on some properties of erythrocytes and
leukocytes of alcohol abusers. *Int J Tissue React.* 17(1): 21-31. 1995
- 187) Emmrich J., Seim H.; Stimulation of leukocyte migration by L-carnitine
Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch 112(3): 373-81, 1985.
- 188) De Simone C., Ferrari M., Lozzi A., Meli D., Ricca D., Sorice F.;
Vitamins and immunity: II. Influence of L-carnitine on the immune system.
Acta Vitaminol Enzymol; 4(1-2): 135-40. 1982.

INDEX