

ASETİLSALİSİLİK ASİT ve VİTAMİN C KOMBİNASYONUNUN SIĞIR NÖTROFİL FONKSİYONLARINA ETKİLERİNİN İN VİTRO ŞARTLARDA İNCELENMESİ

Ahmet Levent Baş¹ Nuri Başpınar² Muammer Elmas¹

Seyfullah Haliloğlu² Enver Yazar¹

Investigation of The Effects of Combination of Acetylsalicylic Acid and Vitamin C On Functions of Bovine Neutrophils in Vitro Conditions

Summary: In this study, the effects of combination of acetylsalicylic acid (ASA) and vitamin C at different doses on functions of bovine neutrophils (polymorphonuclear leucocyte/PMNL), and the effects of different ASA concentrations on accumulation of vitamin C in neutrophils were investigated. Neutrophils were obtained from six healthy Holstein-heifers in University Dairy Herd. Phagocytic and microbicidal activity of PMNL were measured with fluorescent microscopic technique and intracellular vitamin C levels were determined by spectrophotometer. Intracellular vitamin C levels were increased by combination of ASA and vitamin C at different concentrations, but this increase was not statistically significant. Furthermore, phagocytic and microbicidal activity of PMNL were not statistically changed by these combinations.

Key Words: acetylsalicylic acid, vitamin C, neutrophil functions, bovine

Özet: Bu araştırmada farklı dozlarda kombine edilen asetilsalisilik asit (ASA) ve vitamin C (Vit.C)'nin, nötrofil (polimorf nükleer lökosit, PMNL) fonksiyonlarına etkileri ve ASA'nın hücre içi Vit.C düzeylerine etkileri incelendi. Nötrofiller, S.Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Ünitelerinde bulunan 6 adet sağlıklı holştayn düveden elde edildi. Nötrofil etkinliklerinin belirlenmesinde floresans mikroskopik yöntem kullanıldı. Hücre içi Vit.C düzeyleri ise spektrofotometrik metot ile belirlendi. Farklı dozlarda uygulanan ASA-Vit.C karışımlarının kullanımı sonucunda hücre içi Vit.C miktarlarında artışlar görülmesine karşın elde edilen değerlerin istatistiksel açıdan önemli olmadığı görüldü. Ayrıca ASA ve Vit.C'nin kullanılan farklı dozlarının nötrofillerin fagositoz ve mikrobisidal aktivitelerinde istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: asetilsalisilik asit, vitamin C, nötrofil fonksiyonları, siğir

Giriş

Vitamin C (askorbik asit) yapısal yönden altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen bir ketolaktondur. İnsanlarda ve diğer primatlarda sentezlenmediği halde, yüksek bitkilerde ve diğer hayvanlarda D-glukozdan sentezlenir. Vitamin C (Vit.C) gelişmiş canlıların tüm dokularında bulunmasına karşın, konsantrasyonları oldukça farklıdır. Kan plazmasında μM düzeyinde iken, lökositlerde mM düzeyindedir. Bu sebeple Vit.C yetmezliğinin belirlenmesinde, lökosit Vit.C içeriği

önemli bir kriter olarak kabul edilir (McCulloch ve Vandongen, 1992).

Bir siklooksijenaz inhibitörü olan asetilsalisilik asit (ASA) ise ağır kesici, pıhtılaşmayı önleyici ve yangı önleyici özellikleri nedeni ile beşeri hekimlikte yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak parenteral farmasötik formu bulunmadığı için veteriner hekimlikte kullanımı oldukça sınırlıdır.

Vit.C ve ASA'nın bu genel özelliklerine ek olarak immun sistem üzerindeki etkileri pek çok çalışmada incelenmiştir. Gerçekleştirilen araştırmalarda Vit.C'nin, hücrel immunitenin

Geliş Tarihi: 02.10.1997

1. S.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA.

2. S.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA.

oluşmasında görev alan monositlerde ve makrofajlarda önemli ölçüde biriktiği (De Chatelet ve ark. 1974) ve buna bağlı olarak bu hücrelerin migrasyon (Stankova, 1975) ve mikrobisidal etkinliklerinin (Oberriter ve ark. 1986) modifiye edildiği belirtilmektedir. Benzer şekilde eksojen olarak uygulanan Vit.C'nin, tekrarlayan furunkulosis olgularının sağıtımına önemli katkılar sağladığı ve zayıflayan nötrofil fonksiyonlarını da güçlendirdiği (Levy ve Schlaeffer, 1993; Levy ve ark. 1996) ifade edilmiştir. Prinz ve ark. (1977), 75 gün süre ile günde bir gram Vit.C uygulaması sonucunda insanlarda serum IgA ve IgM seviyelerinin arttığını, Helgestat ve ark. (1986) ise koloni stimüle edici faktörler tarafından kontrol edilen hemopoietik hücre proliferasyonunun Vit.C tarafından etkilendiğini bildirmişlerdir. Başpınar ve ark. (1998), in vitro şartlarda farklı dozlarda kullanılan Vit.C'nin nötrofillerde önemli oranlarda birikim yaptığı ve buna bağlı olarak fagositoz yeteneği ve mikrobisidal aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Vit.C'nin eksojen kullanımı sonucunda lökositlerdeki birikimi ve özellikle ASA'nın bu noktadaki etkisi hakkında mevcut bilgiler oldukça çelişkilidir. Wilson (1977), Vit.C'nin lökositlere girişinde; cinsiyet, yaş ve stres faktörlerinin önemli oranda rol oynadığını ve sağlıklı canlılarda Vit.C'nin lökositlere girişinin ASA tarafından engellenirken; romatoid artrit, soğuk algınlığı ve atopik solunum sistemi hastalıkları gibi durumlarda bu girişin ASA tarafından artırıldığını bildirmiştir. Aloe ve Padh (1985), enfeksiyon hastalıkları sırasında serum komplement faktörlerinin aktive olması sonucu, normal düzeyde alınsa bile dokuların yeterli Vit.C'yi elde edemeyeceğini bildirmektedirler. Bazı araştırmacılar ise, ASA'nın Vit.C ile lökosit membran reseptörleri düzeyinde yarıştığını ve kompetitif inhibisyon yolu ile Vit.C'nin lökositlere girişini engellendiğini ifade etmektedirler (Basu, 1982; Loh ve Wilson, 1970; 1973).

ASA'nın immunolojik etkileri de bazı araştırmalara konu olmuştur. Rodriguez ve ark. (1989) ASA kullanımı ile insan nötrofillerinin; kemotaksis ve fagositoz yeteneklerinin yükseldiğini; Hsia ve ark. (1989) ise, lenfositlerin IL-2 ve TNF üretiminin artırıldığını bildirmiştir. Paape ve ark.

(1991), ASA'nın sığır süt nötrofillerinin fagositoz etkinliklerini arttırdığını belirtmişlerdir. Laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen bir araştırmada ise (Baş ve ark. 1998) sığır perifer kan nötrofillerinde fagositik ve mikrobisidal aktivitenin ASA tarafından önemli oranda çoğaltıldığı görülmüştür.

Bu çalışma ile farklı dozlarda kombine edilen Vit.C ve ASA'nın sığır perifer kan nötrofil fonksiyonları ve Vit.C'nin nötrofillerde akümüasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, S.Ü.Veteriner Fakültesi Deneme Ünitesinde bulunan 8-12 aylık altı adet Holstein-Fresian ırkı düve kullanıldı. EDTA'lı vakumlu tüpler kullanılarak V. jugularis'ten 150 ml kan örneği alındı. Ömekler kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı.

Nötrofil izolasyonu: İzolasyon, Carlson ve Kaneko (1973)'nun önerdikleri yöntem esas alınarak yapıldı. Steril koşullar sağlanarak alınan kanlar (10 ml), 2000 g'de 4 °C'de 15 dk. süre ile santrifüj edildi. Plazma ve eritrosit kitlenin üst 1/4'ü uzaklaştırıldıktan sonra, dipteki eritrosit kümesinin üzerine 20 ml steril distile su eklenerek 40 sn süre ile hafifçe sallandı ve hemoliz oluşumu sağlandı. Ortamın ozmotik basıncının dengelenmesi için %2.8'lik NaCl çözeltisinden 10 ml ilave edilerek 200 g'de 4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra 0.0132 M fosfat tamponlu (pH 6.8) % 0.09'luk NaCl çözeltisinden (PBSS) 35ml eklenerek, oluşan süspansiyon santrifüj edildi. Hücreler iki kez PBSS ile yıkandıktan sonra Medium 199 (M 4530, Sigma) içerisinde homojenizasyonu sağlandı. Elde edilen hücrelerin canlılık kontrolleri Tripan mavisi (T 8154, Sigma) ile, saflık derecesi ise Giemsa boyaması ile belirlendi. Böylece hücre süspansiyonlarında % 97 canlılık sağlanırken; bu hücrelerin % 93'ünün PMNL, geri kalanlarının ise eozinofil, lenfosit ve monosit olduğu belirlendi. Hemositometre ile sayım yapıldıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonunun konsantrasyonu 3×10^7 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

Nötrofil fonksiyonlarının belirlenmesinde test

mikroorganizması olarak *C.albicans* kullanıldı. Katı besi yerinde üretilen *C.albicans* M 51, günlük olarak ihtiyaç oranında sıvı besi yerlerine ekilip 37°C'de 18 saat süre ile inkübe edildikten sonra; PBSS içerisinde süspanse edilerek 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. 2×10^{-1} mmol/L oranında metilen mavisi ile yapılan testte (Olkowski ve ark. 1990), canlılık oranları % 99 olarak bulundu. Hemositometre ile sayım yapılarak, Medim 199 içerisinde yapılan süspanسیونun konsantrasyonu 6×10^7 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

Asetilsalisilik asit ve Vitamin C: Vit.C (Merck) ve ASA (Bayer) 0.0132 M PBSS içerisinde çözdürüldü. Çalışma solüsyonları, stok solüsyonlardan taze olarak PBSS kullanılarak hazırlandı.

Deneme gruplarının oluşturulması: Bileşimlerine katılan vitamin C konsantrasyonları dikkate alınarak üç deneme grubu (kontrol, 50 µM ve 100 µM) oluşturuldu. 50 ve 100 µM Vit.C içeren gruplar ise ASA'nın 50, 100 ve 150 µg/ml dozları ile kombine edilerek altı adet alt grub oluşturuldu.

Inküasyon ortamları: Total inküasyon ortamı 2 ml/tüp olacak şekilde ayarlandı. Buna göre her bir tüpe; 0.5 ml nötrofil süspanسیونu, 0.5 ml *C.albicans* süspanسیونu, 0.2 ml inaktif sığır serumu (56 °C'de 30 dk.), 0.4 ml Vit.C solüsyonu ve 0.4 ml ASA solüsyonu ilave edildi. Bütün inküasyon ortamları 37 °C'de 2 saat süre ile 4rpm'de çalkalanarak su banyosunda tutuldu.

PMNL fonksiyonlarının değerlendirilmesi: PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal etkinlikleri, florokrom boyama yöntemi ile belirlendi (Bertalanffy ve Nagy, 1962; Linther ve Eberhart, 1990a). Buna göre, inküasyondan sonra 0.1 ml inküasyon içeriği üzerine, 0.025 ml acridine orange (A 6529, Sigma) solüsyonu ilave edilerek 60 saniye beklendi. Floresans mikroskopunda; polimorfik çekirdekleri yeşil-sarı floresans veren PMNL'ler ile sitoplazmaları yeşil-sarı floresans veren *C.albicans*'lar canlı kabul edilirken, kırmızı floresans verenler ise ölü olarak değerlendirildi (Linther ve Eberhart, 1990b). Her ömekten hazırlanan ikişer preperattan tesadüfi seçilen bölgelerdeki 200 nötrofilin fagosite ettiği toplam *C.albicans*'lar ile

PMNL'lerin fagositik aktivitesi (FA), sayılan 200 nötrofilden fagositoz yapanların yüzdesi olarak ifade edildi ve aşağıdaki formül ile hesaplandı (Hogan ve ark. 1990).

$$FA (\%) = \frac{\text{Fagositoz yapan nötrofil sayısı}}{\text{Sayılan toplam nötrofil sayısı}} \times 100$$

Mikrobisidal aktivite (MA) ise, fagosite edilmiş tüm *C.albicans* miktarının, ölü *C.albicans*'lara oranı dikkate alınarak belirlendi (Hogan ve ark. 1990).

$$MA (\%) = \frac{\text{Ölü } C.albicans \text{ sayısı}}{\text{Toplam fagosite edilen } C.albicans \text{ sayısı}} \times 100$$

Vit.C düzeyinin belirlenmesi: Nötrofil Vit.C düzeyleri Denson ve Bower (1961) ve Haag (1985)'in belirttikleri metotlar esas alınarak, spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

İstatistiksel analiz: Özellikler arası farklılıklar, eşler arası farkın önem kontrolü (t testi) metodu ile SPSS 6.0 bilgisayar programı kullanılarak incelendi.

Bulgular

Floresans mikroskopik incelemelerde; nötrofillerin çekirdekleri yeşil-sarı floresans verirken, hücre içi ortamda bulunan *C.albicans*'lar kırmızı (ölü) veya yeşil (canlı) renklerde izlendi (Resim 1).

Vit.C ve ASA'nın farklı dozlarda kullanımları sonucunda elde edilen hücre içi Vit.C değerleri ve nötrofil fonksiyonlarına ait bulgular Tablo 1'de görülmektedir.

Vit.C 50 ve 100 µM/L dozlarında tek başına kullanıldığında hücre içi Vit.C düzeyi kontrole göre önemli oranda arttı ($P < 0.05$). Her iki dozda elde edilen hücre içi Vit.C konsantrasyonları ise kendi aralarında istatistiksel olarak önemli değildi ($P > 0.05$).

Vit.C'nin 50 µM/L dozuna eklenen 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında ASA'nın kullanılması ile elde edilen hücre içi Vit.C düzeylerinin kontrole göre farklı oldukları ancak Vit.C'nin 50 µM/L konsantrasyonuna göre ise artışlar olmasına karşın anlamlı istatistiksel değişimin olmadığı görüldü. Grup içi değerlendirmede en yüksek hücre içi Vit.C düzeyi 50 µM/L Vit.C + 100 µg/ml ASA kom-

düzeyi 50 µM/L Vit.C + 100 µg/ml ASA kombinasyonunda elde edildi.

Vit.C'nin 100 µM/L dozuna eklenen üç farklı dozda ASA'nın inkübasyon ortamlarına ilave edilmesi ile elde edilen hücre içi Vit.C düzeyleri incelendiğinde; her üç deneme grubunda elde edilen değerlerin kontrole göre farklı olduğu ($P<0.05$) fakat kendi aralarında ve Vit.C'nin 100 µM/L dozuna göre istatistiksel açıdan bir değişimin bulunmadığı gözlemlendi. Grup içi en yüksek değer 100 µM/L Vit.C + 50 µg/ml ASA kombinasyonunda elde edildi.

Diğer taraftan 50 ve 100 µM/L. düzeylerinde Vit.C uygulanan gruplara ait alt gruplarda elde edilen hücre içi Vit.C düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklar gözlemlendi.

Nötrofillere ait fagositoz ve mikrobisidal aktivite fonksiyonlarına ait değerler incelendiğinde; gerek kontrole göre gerekse kendi aralarında 50 ve 100 µM/L'lik Vit.C dozlarının ve bunlara ait alt grupların istatistiksel olarak farksız ($P>0.05$) oldukları görüldü.

Tartışma ve Sonuç

Tablo 1: Vitamin C ve asetilsalisilik asitin farklı dozlarda kombine edilmeleri sonucunda elde edilen PMNL fonksiyonları ve hücre içi vitamin C konsantrasyonları (n= 6).

Deneme Grupları	PMNL Fonksiyonları		Hücre içi vitamin C konsantrasyonları (pg/hücre)
	Fagositoz (%)	Mik. Akt. (%)	
Kontrol	76.6 ± 1.40 ab	87.2 ± 1.90 a	0.03360 ± 0.0029 c
50 µM vit C	77.2 ± 0.80 b	87.2 ± 2.10 a	0.09690 ± 0.0017 b
50 µM vit C + 50 µg ASA	77.6 ± 1.20 ab	89.5 ± 1.00 a	0.10720 ± 0.0017 ab
50 µM vit C + 100 µg ASA	80.0 ± 1.10 ab	87.0 ± 1.90 a	0.13420 ± 0.0350 ab
50 µM vit C + 150 µg ASA	79.2 ± 0.58 ab	86.2 ± 1.50 a	0.11400 ± 0.0028 ab
100 µM vit C	79.6 ± 0.60 a	91.7 ± 1.00 a	0.13840 ± 0.0020 ab
100 µM vit C + 50 µg ASA	78.4 ± 0.75	91.3 ± 1.90 a	0.16520 ± 0.0031 ab
100 µM vit C + 100 µg ASA	78.6 ± 1.00 ab	93.0 ± 2.70	0.14800 ± 0.0015 ab
100 µM vit C + 150 µg ASA	77.6 ± 1.50 ab	87.7 ± 0.94 a	0.16040 ± 0.0017 a

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar



Şekil 1: Sığır kan polimorf nükleer lökositlerinin (PMNL) floresans mikroskopik görünüşleri (Acridine orange, x 750).

Vit.C, lökositler tarafından aktif transport ile alınır ve plazma konsantrasyonlarından 10-80 kat daha fazla oranda bu hücrelerde bulunur (Moser, 1987; Oberitter ve ark. 1986). Vit.C'nin hücre içine girişinde; ekstrasellüler ortamdaki Vit.C miktarı, pH, ortam ısısı, Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının varlığı gibi faktörler önemli rol oynar (Washko ve ark. 1990).

Wilson (1977), soğuk algınlığı olan bireylerden elde edilen lökositlerin bulunduğu ortama Vit.C ve ASA'nın birlikte eklenmesi sonucu lökositlere Vit.C girişinin arttığını, sağlıklı bireylerden elde edilen lökositlerde ise ASA'nın Vit.C girişini engellediğini öne sürmüştür. Loh ve Wilson (1975), benzer şekilde insanlarda 1000-2000 mg Vit.C'nin 600 mg ASA ile birlikte kullanılması sonucunda lökositlere Vit.C girişinin ASA tarafından engellendiğini bildirmişlerdir. Daş ve Nebioğlu (1992) kobaylarda in vivo şartlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 25 mg ve daha yüksek ASA dozlarının 25, 50 ve 100 mg Vit.C ile birlikte kullanımı sonrasında; lökositlere Vit.C girişinin önlendiğini ve buna bağlı olarak plazma ve idrar Vit.C düzeyinin ASA dozuna bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada inkübasyon ortamlarına 50 ve 100 μ M/L Vit.C'nin uygulanması ile nötrofillerde Vit.C düzeylerinin sırası ile 0.0969 ve 0.1384 pg/hücre olduğu ve bu değerlerin kontrole (0.0336 pg/hücre) göre istatistiksel olarak farklı ($P < 0.05$) oldukları görüldü. Vit.C'nin 50 μ M/L dozuna ilave edilen 50, 100 ve 150 μ g/ml'lik ASA kombinasyonlarında ise hücre içi Vit.C düzeylerinin sırasıyla 0.1072, 0.1342 ve 0.1140 pg/hücre olduğu belirlendi. Vit.C'nin 100 μ M/L dozuna ilave edilen üç farklı konsantrasyonda ASA'nın uygulanması sonucunda hücre içi Vit.C düzeylerinin 0.1652, 0.1480 ve 0.1604 pg/hücre olduğu tespit edildi. Vit.C'nin 50 ve 100 μ M/L'lik dozlarına ait alt gruplarda elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, farkın istatistiksel olarak ($P < 0.05$) önemli olduğu ancak sayısal artışlar olmasına karşın kendi aralarında ve Vit.C'nin tek başına uygulanması ile elde edilen değerler dikkate alındığında bu sayısal değişimlerin istatistiksel açıdan önemli olmadığı ($P > 0.05$) belirlendi. Vit.C'nin hücre içi konsantrasyonlarına ilişkin bul-

gular gözönüne alındığında, ASA'nın nötrofillere Vit.C taşınmasını engellemediği gözlemlendi. Bu sonuçlar, Vit.C'nin lökositlere girişinin ASA tarafından kompetitif inhibisyon ile bloke edildiğini önesüren araştırmacıların bulguları ile çelişmektedir. Bu durumun, araştırmalarda kullanılan hücrelerin değişik canlılardan elde edilmiş olmasından kaynaklanabileceği kanısındayız. Ayrıca, bu çalışmada % 93 saflıkta PMNL süspansiyonu kullanılırken diğer araştırmalarda total lökosit süspansiyonları kullanılmış ve bunların fraksiyonel bileşim oranları belirtilmemiştir. Bilindiği gibi mononükleer lökositlerin hücre içi Vit.C düzeyleri nötrofil lökositlere göre oldukça fazladır (Omaye ve ark. 1987). Belirtilen bu son durumda, gözlenen farklılığın oluşmasında katkı sağlamış olabilir.

Diğer taraftan, elde ettiğimiz hücre içi Vit.C düzeylerine ilişkin değerler Başpınar ve ark. (1998)'in bildirdiği değerlere büyük bir paralellik göstermektedir. Bu çalışmada kontrol grubunda ve 50 μ M/L Vit.C'nin tek başına kullanılması ile hücre içi Vit.C düzeyleri 0.03360 ve 0.09690 pg/hücre iken, Başpınar ve ark. (1998)'in elde ettiği Vit.C değerleri kontrol grubunda 0.03083 pg/hücre, 50 μ M/L Vit.C dozunda ise 0.09030 pg/hücre düzeyindedir. Ayrıca bu çalışmada 50 μ M/L Vit.C + 100 μ g/ml ASA kombinasyonunda (0.13420 pg/hücre) ve 100 μ M/L Vit.C + 50 μ g/ml ASA kombinasyonunda (0.165220 pg/hücre) elde edilen hücre içi Vit.C düzeylerine, Başpınar ve ark. (1998) ancak Vit.C'nin 150 μ M/L (0.12070 pg/hücre) ve 300 μ M/L (0.19370 pg/hücre) dozlarının kullanımı sonucunda ulaşabilmişlerdir. Bu değerlerde Vit.C'nin PMNL'lere girişinin ASA tarafından bloke edilmediğini hatta belirli kombinasyonlarda istatistiksel önem arz etmeyen artışlara neden olduğunu göstermektedir.

Vit.C ve ASA'nın özellikle hücrel immun sistem üzerindeki immunomodülatör etkileri birçok çalışmada incelenmiştir. Itze (1983), Vit.C'nin solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarında vücut direncinin artırılmasında rol oynadığını, yetersizliğinde ise morbidite ve mortalitenin arttığını bildirmiştir. Pardeu ve Thaxton (1986); interferon üretimi, T-lenfosit aktivasyonu, nötrofil fonksiyonlarının güçlendirilmesi ve sürekliliğinin

sağlanmasında Vit.C'nin önemli oranda etkili olduğunu belirtmiştir. Goldschmit (1991), skorbutik bireylerden elde edilen PMNL'lerdeki Vit.C miktarının, sağlıklı olanlara göre 16 kez düşük olduğunu ve bu yetersizliğin lökosit morfolojisinde ve fonksiyonlarında bozukluklara yol açtığını öne sürmüştür. Aynı araştırmacı (1988), skorbutik kobaylarda PMNL'ler tarafından fagosite edilen mikroorganizmaların %13'nün öldürülebildiğini, normal lökositlerde ise bu değer % 87 olduğunu bildirmektedir. Kolb ve ark. (1985) eksojen Vit.C uygulamaları ile nötrofil ve makrofajlarda; migrasyon, kemotaksis, fagositoz ve mikrobisidal aktivite gibi fonksiyonların arttığını ortaya koymuşlardır. Başpınar ve ark. (1998), in vitro şartlarda Vit.C'nin sığır PMNL fonksiyonları üzerindeki etkilerini inceledikleri araştırmalarında 300 µM/L düzeyinde Vit.C kullanımı ile fagositoz ve mikrobisidal aktivitede önemli artışlar elde edildiğini bildirmişlerdir.

Nötrofil fonksiyonları üzerinde ASA'nın etkinliğini ortaya koymaya yönelik araştırmalarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Rodriguez ve ark (1989), 100 mg/l dozundaki ASA'nın PMNL'lerde kemotaksis ve fagositozu önemli düzeyde artırdığını ancak mikrobisidal aktivitenin denenen hiç bir dozda değişmediğini bildirmişlerdir. Paape ve ark (1991), ASA kullanımı ile süt nötrofillerinde fagositik aktivitenin arttığını ancak bu durumun 500 ve 1000 µg/ml gibi çok yüksek dozlarda gerçekleştiğini iddia etmektedirler. Uhlenbruck ve ark (1983) ise in vitro koşullarda kullanılan hiç bir dozda ASA'nın nötrofil fonksiyonlarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığını ifade etmişlerdir.

Laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen bir araştırmada ise in vitro koşullarda 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında ASA'nın sığır perifer kan nötrofillerinde fagositozu, sadece 50 µg/ml düzeyinde ise mikrobisidal aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Baş ve ark. 1998).

Literatür incelemelerinde ASA ve Vit.C'nin birlikte kullanımının hücrel immun sistem üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Ancak, bir araştırmada (Hockertz ve ark. 1982) Vit.C-ASA kombinasyonunun makrofajlarda IL-6 üretimini arttırdığı ileri sürülmektedir.

Bu araştırmada elde edilen PMNL fonksiyonlarına ilişkin bulgular; eksojen Vit.C kullanımı açısından özellikle Başpınar ve ark. (1998)'nin bildirdikleri sonuçlar ile çelişmektedir. Bu durumun, elde ettiğimiz hücre içi Vit.C düzeyinin, fonksiyonel artış için gerekli olan eşik düzeyin altında kalmasından kaynaklanmış olabileceği kanısındayız. Başpınar ve ark. (1998), nötrofil fonksiyonlarında izlenen pozitif değişimin 300 µM/L düzeyindeki Vit.C kullanımı ile elde edildiğini ve bu dozda hücre içi Vit.C konsantrasyonunun ise 0.19370 pg/hücre olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan, tek başına kullanıldığında farklı nötrofil fonksiyonlarında artış yaptığı belirtilen (Paape ve ark. 1991; Rodriguez ve ark. 1989; Baş ve ark. 1998) ASA'nın, Vit.C ile birlikte kullanıldığı zaman nötrofil fonksiyonlarında herhangi bir değişim oluşturmamasının sebebi tam olarak anlaşılamamıştır.

Sonuç olarak,

- ASA ve Vit.C'nin farklı dozlardaki kombinasyonlarının, sığır perifer kan nötrofillerinin fagositoz ve mikrobisidal aktiviteleri üzerinde istatistiksel açıdan herhangi bir değişime yol açmadığı,
- Vit.C'nin nötrofil lökositlerdeki birikim düzeyleri üzerinde ASA'nın engelleyici bir etkisinin bulunmadığı,
- ASA-Vit.C kombinasyonunun immun sistem üzerindeki etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için in vitro ve özellikle in vivo araştırmaların gerçekleştirilmesi ve bu maddeler ile yangı mediatörlerinin etkileşmesinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerektiği, kanaatindeyiz.

Kaynaklar

- Aloe, J.J., Padh, H. (1985). Inhibition Of Ascorbic Acid Uptake By Endotoxin, Evidence Of Mediatin By Serum Factor (S). Proc Soc Exp Biol Med, (179), 128-31.
- Basu, T.K.(1982). Vitamin C Aspirin Interactions. Int J Nutr Res, 23 (Suppl), 83-90.
- Baş, A.L., Traş, B., Elmas, M., Keskin, E., Yazar, E. (1998). The Effects Of Acetylsalicylic Acid On The Phagocytic Function Of Bovine Neutrophils In Vitro. Revue

- De Medecine Veterinaire 149 (8-9), 857-862.
- Başpınar, N., Baş, A.L., Hacıoğlu, S., Elmas, M., Yazar E. (1998). The Effects Of Intracellular Vitamin C Concentrations On Bovine Neutrophils Functions In Vitro. *Revue De Medecine Veterinaire* 149 (10), 931-938.
- Bertalanffy, F.D., Nagy, K.P. (1962). Florence Microscopy And Photography With Acridine Orange. *Medical Radiography And Photography*, 38, (3), 82-91.
- Carlson, G.P., Kaneko, J.J. (1973). Isolation Of Leucocytes From Bovine Peripheral Blood. *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine*, (142), 853-856.
- Daş, N., Nebioğlu, S. (1992). Vitamin C Aspirin Interactions In Laboratory Animals. *J Clin Pharm Therap*, (17), 343-46.
- De Chatelet, I.R., McCall, C.E., Cooper, M., Shirley, P.S. (1974). Ascorbic Acid Levels In Phagocytic Cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 145 (4), 1170-1173.
- Denson, K.W., Bower, E.F. (1961). The Determination Of Ascorbic Acid In White Blood Cells. A Comparison Of W.B.C. Ascorbic Acid Phenolic Acid Extraction In Elderly Patients. *Clin Sci*, (21), 157-162.
- Goldschmidt, M.C. (1991). Reduced Bactericidal Activity In Neutrophils From Scorbutic Animals And The Effect Of Ascorbic Acid On These Target Bacteria In Vivo And In Vitro. *Am J Clin Nutr*, (54), 1214-1220.
- Goldschmidt, M.C., Masin, W.J., Brown, L.R., Wyde, P.R. (1988). The Effect Of Ascorbic Acid Deficiency On Leucocyte Phagocytosis And Killing Of *Actinomyces Viscosus*. *Int J Vit Nutr Res*, 58, (3), 326-334.
- Haag, W. (1965). Zur Methodik Und Praktischen Bedeutung Der Vitamin C-Bestimmung Beim Rind In Vergangenheit Und Gegenwart. Inaugural Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen.
- Helgestad, J., Storm-Mathisen, I., Lie, S.O. (1986). Vitamin C And Thiol Reagents Promote The In Vitro Growth Of Murine Granulocyte/Macrophage Progenitor Cells By Neutralizing Endogenous Inhibitor(S). *Blut*, 52 (1), 1-8.
- Hockertz, S., Schettler, T., Rogalla, K. (1992). Effect Of Acetylsalicylic Acid, Ascorbate And Ibuprofen On The Macrophage System. *Drug Res*, 42 (8), 1062-68.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Schockey, W.L. (1990). Relationships, Among Vitamin E, Selenium, And Bovine Blood Neutrophils. *Journal Of Dairy Science*, (73), 2372-2378.
- Hsia, J., Sarin, N., Oliver, J.H., Goldstein, A.L. (1989). Aspirin And Tymosin Increase Interleukin-2 And Interferon-Gamma Production By Human Peripheral Blood Leucocytes. *Immunopharmacology*, (17), 167-173.
- Itze, L. (1984). Ascorbic Acid Metabolism In Ruminants, In "Ascorbic Acid In Domestic Animals Proceedings". Ed. I. Wegger, F. Tagwerker, J. Moustgaard. P. 120-130, The Royal Danish Agricultural Society, Copenhagen.
- Kolb, E. (1985). Neuere Erkenntnisse Zur Bedeutung Und Zum Stoffwechsel Der Ascorbinsäure Bei Haustieren (Übersichtsreferat). *Vet Med*, (40), 489-494
- Levy, R., Schlaeffer F. (1993). Successful Treatment Of A Patient With Recurrent Furunculosis By Vitamin C, Improvement Of Clinical Course And Of Impaired Neutrophil Functions. *International Journal Of Dermatology*, 32, (11), 832-34.
- Levy, R., Shriker, O., Porath, A., Reisenberg, K., Schlaeffer, F. (1996). Vitamin C For The Treatment Of Recurrent Furunculosis In Patient With Impaired Neutrophil Functions. *J Infect Dis.*, (173), 1502-1505.
- Linther, P.J., Eberhart, R.J. (1990a). Effect Of Bovine Mammary Secretion During Early Nonlactating Period And Antibiotics On Polymorphonuclear Neutrophil Function And Morphology. *Am J Vet Res*, 51, (4), 524-532.
- Linther, T.J., Eberhart, R.J. (1990b). Effect Of Antibiotics On Phagocyte Recruitment, Function And Morphology In The Bovine Mammary Gland During The Early Nonlactating Period. *American Journal Of Veterinary Research*, 51, (4), 533-542.
- Loh, H.S., Wilson, C.W.M. (1970). The Origin Of Ascorbic Acid Stored In The Leucocytes. *British J Pharm*, 40, 169P.
- Loh, H.S., Wilson, C.W.M. (1973). The Effects Of Acetylsalicylic Acid On The Metabolic Availability Of Ascorbic Acid In Human Beings. *J Clin Pharm*, (13), 480-86.
- Loh, H.S., Wilson, C.W.M. (1975). The Interaction Of Acetylsalicylic Acid On The Metabolic Availability Of Ascorbic Acid In Normal Man. *J Clin Pharm*, (15), 36-45.
- Mc Culloch, R.K., Vandongen, R. (1992). Measurement Of Ascorbic Acid In Platelets And Its Relationship To Polymorphonuclear Leucocyte Levels. *Clin Chem Acta*, (213), 15-22.
- Moser, U. (1987). Uptake Of Ascorbic Acid By Leucocytes. *Ann NY Acad Sci*, 498, 200-215.
- Obermitter, H., Glatthaar, B., Mosser, U., Schmidt, K.H. (1986). Effect Of Functional Stimulation On Ascorbate

- Content In Phagocytes Under Physiological And Pathological Conditions. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, (81),46-50.
- Olkowski, A.A., Gooneratne, S.R., Christensen, D.A. (1990). Effects Of Diets Of High Sulphur Concent And Varied Concentrations Of Copper, Molybdenum And Thiamin On In Vitro Phagocytic And Candidacidal Activity Of Neutrophils In Sheep. *Research In Veterinary Science*, (48), 82-86.
- Omaye, S.T., Schaus, E.E., Kutnink, M.A., Hawkes, W.C. (1987). Measurement Of Vitamin C Blood Components By High Performance Liquid Chromatography. Implication In Assessing Vitamin C Status. *Ann NY Acad Sci.*, (498), 389-401.
- Paape, M.J., Miller, R.H., Ziv, G. (1991). Pharmacologic Enhancement Or Suppression Of Phagocytosis By Bovine Neutrophils. *American Journal Of Veterinary Research*, (52), 363-366.
- Panush, R.S., Delafuente, J.J., Katz, P., Jhonson, J. (1982). Modulation Of Certain Immunologic Responses By Vitamin C III. Potentiation Of In Vitro And In Vivo Lymphocyte. *Int J Vit Nutr Res*, (23), 35-39.
- Pardeu, S.L. And Thaxton, J.P. (1986). Ascorbic Acid In Poultry. *Worlds Poultry Sci J*, 42, (2), 10-123.
- Prinz, W., Bortz, R., Bregin, B., Hersch, M. (1977). The Effect Of Ascorbic Acid Supplementantion Of Some Parameters Of The Human Immunological Defence System. *Int J Vit Nutr Res*, (47), 248-257.
- Raghoobar, M., Huisman, J.A.M., Van Den Berf, W.B., Van Ginneken, C.A.M. (1987). Characteristics Of The Transport Of Ascorbic Acid In To Leucocytes. *Life Sci*, (40), 499-510.
- Rodriguez, A.B., Barriga, C., De La Fuente, M. (1989). Effects Of Acetylsalicylic Acid On The Phagocytic Function Human Polymorphonuclear Leucocytes In Vitro. *General Pharmacology*, (20), 151-155.
- Samuk, B., Eratalay, K., Şengün, D., Ciliv, G. (1987). Juvenil Ve Hızlı İlerleyen Periodontitisli Plazma Ve Lökosit C Vitamini Düzeyleri İle Nötrofillerin Fagositik Etkinliklerinin İncelenmesi. *Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 11, (2), 119-129.
- Stankova, L., Gerhard, H.B., Napel, L., Bigley, R.H. (1975). Ascorbate And Phagocyte Function. *Infect Immun*, (12), 252-256.
- Uhlenbruck, G., Lötzerich, H., Bemhardt, J., Rogalla, K. (1983). Acetylsalicylic Acid Has No Effects On Various Isolated Immuno Cells In Vitro. *European Journal Of Applied Physiology*, (66), 473-476.
- Washko, P., Rotrosen, D., Levine, M. (1990). Ascorbic Acid Accumulation In Plated Human Neutrophils. *Febs Let*, 260, (1), 101-109.
- Wilson, C.W.M. (1977). Pharmacological Aspects Of Vitamin C In Health And Disease In "Re-Evaluation Of Vitamin C". Ed. Hanck, A. and Ritzel, G. 267-85, Verlag