

## Ratlarda Periferal Kan Hücreleri Üzerine L-karnitin, Arı Sütü ve Nar Çekirdeğinin Etkileri

Nejdet ŞİMŞEK \*  Ali KARADENİZ\*\* Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU\*\*\*

- \* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE  
\*\* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE  
\*\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Yayın Kodu (Article Code): 2008/68-A

### Özet

Bu çalışma, ratlarda L-karnitin, arı sütü ve nar çekirdeğinin periferal kan hücreleri üzerine histometrik ve fizyolojik etkilerini araştırmak için yapıldı. Çalışmada kullanılan 24 Sprague Dawley rat, her grupta 6 rat olacak şekilde kontrol (K), L-karnitin (LK) (500 mg/ kg/gün, intraperitoneal, IP), arı sütü (AS, 300 mg/kg/gün, oral) ve nar çekirdeği (NÇ, 300 mg/kg/gün, oral) gruplarına ayrıldı. Eritrosit ve lökosit sayıları ile hemogloblin miktarı ve hematokrit değer hemositometrik yöntemlerle, T ve B lenfositlerinin yüzde oranı alfa naftil asetat esteraz (ANAE) boyamasıyla, eritrosit, T ve B lenfosit çapları ise *Motic Image Plus 2.0 ML* analiz paket programı aracılığı ile belirlendi. Kontrol grubuna göre LK, AS ve NÇ uygulanan gruplarda lökosit ve eritrosit sayısı ile hemogloblin ve hematokrit değerinin daha fazla olduğu tespit edildi. Kontrol grubunda total lenfosit ve ANAE pozitif lenfosit oranları sırasıyla %73.4 ve %72.8 iken bu parametreler sırasıyla LK grubunda %78.55 ve %76.44, AS grubunda %68.35 ve %63.13, NÇ grubunda ise %66.52 ve %65.25 oranında hesaplandı. Ayrıca, histometrik ölçümler sonucunda lenfosit çaplarının K grubuna göre deney gruplarında azaldığı, eritrosit çaplarının ise özellikle AS ve NÇ gruplarında arttığı saptandı. Sonuç olarak, L-karnitinin immun sistem hücrelerini aktive edici, arı sütü ve nar çekirdeğinin ise eritrosit sayısını ve çaplarını artırıcı özellikleri nedeniyle immun yetersizlik ve anemik hastalarda destekleyici antioksidan madde olarak kullanılabilceği kanaatine varıldı.

**Anahtar sözcükler:** L –karnitin, Arı sütü, Nar çekirdeği, Periferal kan hücreleri, Rat


## Effects of L-carnitine, Royal jelly and Pomegranate Seed on Peripheral Blood Cells in Rats

### Summary

This research was carry out to histometric and physiological effects of L-carnitine, royal jelly and pomegranate seed extract on blood cells in rats. Sprague Dawley rats were divided four groups, as each had 6 rats as follows: Control (C), L-carnitine (LC, 500 mg/kg/day, IP), royal jell (RJ, 500 mg/kg/day, orally), and pomegranate seed (PS, 500 mg/kg/day, orally). Red blood cell and white blood cell counts, and with haemoglobin amount and hematocrite values were determined by haemocytometric methods, and populations of B and T lymphocytes were counted by the alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) staining method, and diameters of erythrocyte, B and T lymphocytes were determined by analysis program that the *Motic Image Plus 2.0 ML*. Erythrocyte and leukocyte counts, haemoglobin amount and hematocrite values were increased in of LC, RJ and PS received groups in compared with C group. The percentage rates of total lymphocyte and ANAE positive lymphocyte were determined 73.40% and 72.80% in C group, 78.55% and 76.44% in LC group, 68.35% and 63.13% in RJ group, and 66.52% and 65.25% in PS group, respectively. Also as a result of histometric measurement, lymphocyte diameter was decrease in experimental groups compared with C group, but erythrocyte diameter was increase in RJ and PS groups, especially. These results suggest that these components might be used a supportive agents in immune deficiency and anemic patients, because of the L-carnitine activated the immune cells, royal jelly and pomegranate seed increased the erythrocyte number and diameters.

**Keywords:** L-carnitine, Royal jelly, Pomegranate seed, Peripheral blood cells, Rat

 İletişim (Correspondence)

 +90 442 631 41 93/1066

 nsimsek58@gmail.com

## GİRİŞ

Son yıllarda yaşam koşullarına, teknolojiye ve beslenme şekillerine bağlı olarak oluşan stres faktörleri; serbest radikallerin artmasına, özellikle kanser olmak üzere birçok hastalığın hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle doku ve hücrelerde serbest radikaller ve antioksidan maddeler arasındaki dengenin sağlanabilmesi amacıyla gıdalara dışarıdan selenyum, vitamin E <sup>1</sup>, alfa tokoferol <sup>2</sup>, karnitin <sup>3</sup>, arı sütü <sup>4</sup>, elajik asit <sup>5</sup>, nar çekirdeği ve nar suyu <sup>6,7</sup> gibi antioksidan maddelerin katılması yoluna gidilmektedir.

L-karnitin (LK), karaciğer ve böbrekte lizin ve metiyonin gibi amino-asitlerden sentezlenip diğer dokulara da taşınabilmektedir. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınmasını sağlayan bu aminin endojen olarak sentezlenebilmesi için C vitamini, niasin, demir ve B<sub>6</sub> vitaminine de ihtiyaç duyulmaktadır <sup>3,8,9</sup>. Eksikliğinde yangı, kilo kaybı, stres ve mikroorganizmalara karşı direncin düşmesi gibi yaşamı tehdit eden faktörler ortaya çıkmaktadır. Dolaşımdaki lenfositlerde çok yüksek oranlarda bulunan LK, bu hücrelerin apoptozise uğramasını geciktirmekte, mitojenik aktivitenin artmasını sağlamaktadır <sup>8</sup>. Ayrıca, ekzojen olarak verilen karnitin düşük enerjili yemlerle beslenen broyler piliçlerin timus, dalak ve sekal tonsillerinde yangı hücreleri infiltrasyonunu azalttığı <sup>9</sup>, yetişkin dişi güvercinlerde IgG ve IgM antikor yanıtlarını artırarak immun sistemi düzenlediği de bildirilmektedir <sup>10</sup>. Kraliçe arıların beslenmesi için işçi arıların hypopharyngeal ve mandibular bezlerinde üretilen arı sütü (AS); su (%66), protein (%12-15), şeker (%10-16), yağ asitleri (%3-6), serbest aminoasitler, mineraller (%0.7-1.2, demir ve kalsiyum) ve vitaminler (tiamin, niasin, riboflavin)'den zengin bir gıda maddesidir <sup>4,11</sup>. Arı sütü üzerine yapılan birçok araştırmada ratlarda humoral immunitiyi baskılayıcı, farelerde immun kompetent hücrelerin proliferasyonunu ve antikor üretimini uyarıcı <sup>12</sup>, hemo-poetik köken hücre üretimini artırıcı <sup>11</sup> ve kolesterol seviyesini düşürücü etkilerinin olduğu bildirilmektedir <sup>4</sup>. Son yıllarda doğal antioksidan olarak tüketilen nar (*Punica granatum*), nar suyu ya da nar çekirdeğinin polifenolik flavonoidler, antosiyaninler, askorbik asit, elajik asit, karotenoidler ve tanenlerden zengin olduğu bildirilmektedir <sup>5,7</sup>. Bu meyve antiproliferatif <sup>13</sup>, östrojenik, prostaglandin inhibe edici, antitümoral, antibakteriyel, proapoptotik <sup>6,14</sup> ve sıvısal savunmayı artırıcı özelliğe sahiptir <sup>13</sup>.

Hemositometrik yöntemler ve enzimhistokimyasal yöntemlerden biri olan alfa naftil asetat esterase (ANAE) boyamasıyla periferik kandaki T lenfositlerin sayılabileceği, tavuklarda <sup>15</sup>, Van kedilerinde <sup>16</sup>, Ankara tavşanlarında <sup>17</sup>, ratlarda <sup>18</sup> ve kaya kekliklerinde <sup>19</sup> yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Bu çalışmada da, L-karnitin, arı sütü ve nar çekirdeği verilen ratlarda periferik kan hücrelerinde meydana gelebilecek değişikliklerin hemositometrik ve enzimhistokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvan Materyali ve Deneysel Çalışma

Çalışmada materyal olarak 6 haftalık 24 genç Sprague Dawley dişi rat kullanıldı. Hayvanlar metal kafeslerde, 22–24°C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık bir ortamda su ve yemleri ad libitum verilerek beslendi. Çalışmada uygulanacak deneyler ve kullanılan hayvanlar Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmada kullanılan ratlar, her birinde 6'şar hayvan olacak şekilde kontrol (K), L-karnitin (LK), arı sütü (AS) ve nar çekirdeği (NÇ) gruplarına ayrıldı. Kontrol grubu ve deney grupları standart rat yemi ile beslendi (pellet yem, Bayramoğlu Yem Fabrikası, Erzurum). Ayrıca, deney gruplarından LK grubuna 500 mg/kg/gün (intraperitoneal, IP), L-karnitin (Santa Farma İlaç Sanayi AŞ, İstanbul), AS grubuna 300 mg/kg/gün arı sütü (Arı Mühendislik Tarımsal ve Hayvansal Ürünler Üretim Paz. San. ve Tic. Ltd. Şti., Ankara, Balen Arı Sütü Kapsül: 300 mg, 60 kapsül, Barkod No: 8 690 957 980061) ve NÇ grubuna ise 300 mg/kg/gün nar çekirdeği ekstraktı (Arı Mühendislik Tarımsal ve Hayvansal Ürünler Üretim Paz. San. ve Tic. Ltd. Şti., Ankara, Balen Nar Çekirdeği ekstraktı: 300 mg, 60 kapsül, Barkod No: 8 690 957 000 721) oragastrik tüp aracılığıyla 15 gün süreyle verildi.

### Hematolojik ve Enzim-histokimyasal Metotlar

Çalışmanın bitiminden 24 saat sonra hem kontrol hem de deney gruplarında bulunan hayvanların kuyruk venasından antikoagulanlı (100 IU heparin) tüplere 1 ml kan alınarak 5 adet froti hazırlandı. Eritrositler ve lökositler hemasitometrik yöntemle, hemoglobinin değeri spektrofotometrik yöntemle, lökositlerin yüzde oranı May Grunwald-Giemsa boyama metoduyla belirlendi <sup>20</sup>.

Lenfosit ayrımında kullanılan ANAE aktivitesini belirlemek için, Mueller ve ark.'nın <sup>21</sup> metoduna göre inkubasyon solüsyonu hazırlandı [80 ml tamponlu fosfat içerisinde 0.8 ml asetonda eritilmiş 20 mg alfa naftil asetat eklendikten sonra 4.8 ml hekzazotize pararozanilin (2.4 ml %4 sodyum nitrit + 2.4 ml pararozanilin: 1 gr pararozanilin + 20 ml distile su + 5 ml HCl) katıldı] ve bu solüsyona 1 normal NaOH eklenerek pH 6.8'e ayarlandı. Gluteraldehit-aseton tespit solüsyonunda buzdolabında 3 dak. tespit edilen frotiler, distile sudan geçirilip kurutulduktan sonra inkubasyon solüsyonunda kontrollü olarak 3 saat bekletildi. Distile suyla boya kalıntıları giderildikten sonra %1 metil green ile çekirdek boyası yapıldı. Elde edilen preparatlardan her bir hayvan için ışık mikroskopta 40'luk objektif altında sayılan 200 lenfositteki kırmızı-kahverengi enzim reaksiyonunun olup olmamasına göre ANAE pozitif [ANAE (+) ve ANAE negatif (ANAE (-)) olarak değerlendirildi. Ayrıca, lenfositler ile eritrositlerin çaplarını belirlemek için *Motic Image Plus 2.0 ML* (Motic China Group CO. LTD Copyright 2001-2004) analiz programı kullanıldı. Bu amaçla, her gruptan rastgele 200 adet yuvarlak yapıda, sitoplazması ve hücre membranı belirgin eritrositler ile ANAE (+) ve (-) lenfositlerin çapları 100'lük objektif altında mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) olarak ölçüldü (*Şekil 1A*).

### İstatistiksel Analiz

Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak veril-

di. İstatistiksel analizler SPSS 11.00 paket programıyla yapıldı. Gruplar arasındaki farklılığı ortaya koymak amacıyla "Varyans analizi" ve "Duncan" testleri yapıldı.

### BULGULAR

Çalışma süresince ratlara uygulanan L-karnitin, arı sütü ve nar çekirdeği ekstraktının hayvanlarda iştahsızlık, kilo kaybı gibi metabolik düzensizliklere ya da ölüme sebep olmadığı, ancak NÇ grubundaki ratlardan alınan kan örneklerinin diğer gruplara göre daha koyu renkte olduğu gözlemlendi. Gruplardan elde edilen hematolojik, enzim-histokimyasal ve histometrik verilerin istatistiksel değerlendirmeleri de *Tablo 1*'de gösterildi.

Kontrol grubuna göre deney gruplarının tamamında eritrosit sayısı ve lökosit sayısı ile hemoglobin düzeyi ve hematokrit değerinin arttığı, total lenfosit yüzde oranının AS ve NÇ verilen gruplarda azaldığı, LK grubunda ise istatistiksel öneme sahip bir artışın olduğu saptandı ( $P < 0.05$ ) (*Tablo 1*).

Kontrol ve deney gruplarında nötrofil granulosit, eozinofil granulosit ve monositler ANAE ile diffuz boyanırken (*Şekil 1B, C ve D*), T lenfositlerin sitoplazmasında genellikle 1-4 adet kırmızı-kahverengi enzim reaksiyonunun olduğu (*Şekil 1A*), B lenfositlerin ise sadece çekirdek boyasını aldığı saptandı (*Şekil 1B*). ANAE (+) reaksiyon veren lenfosit

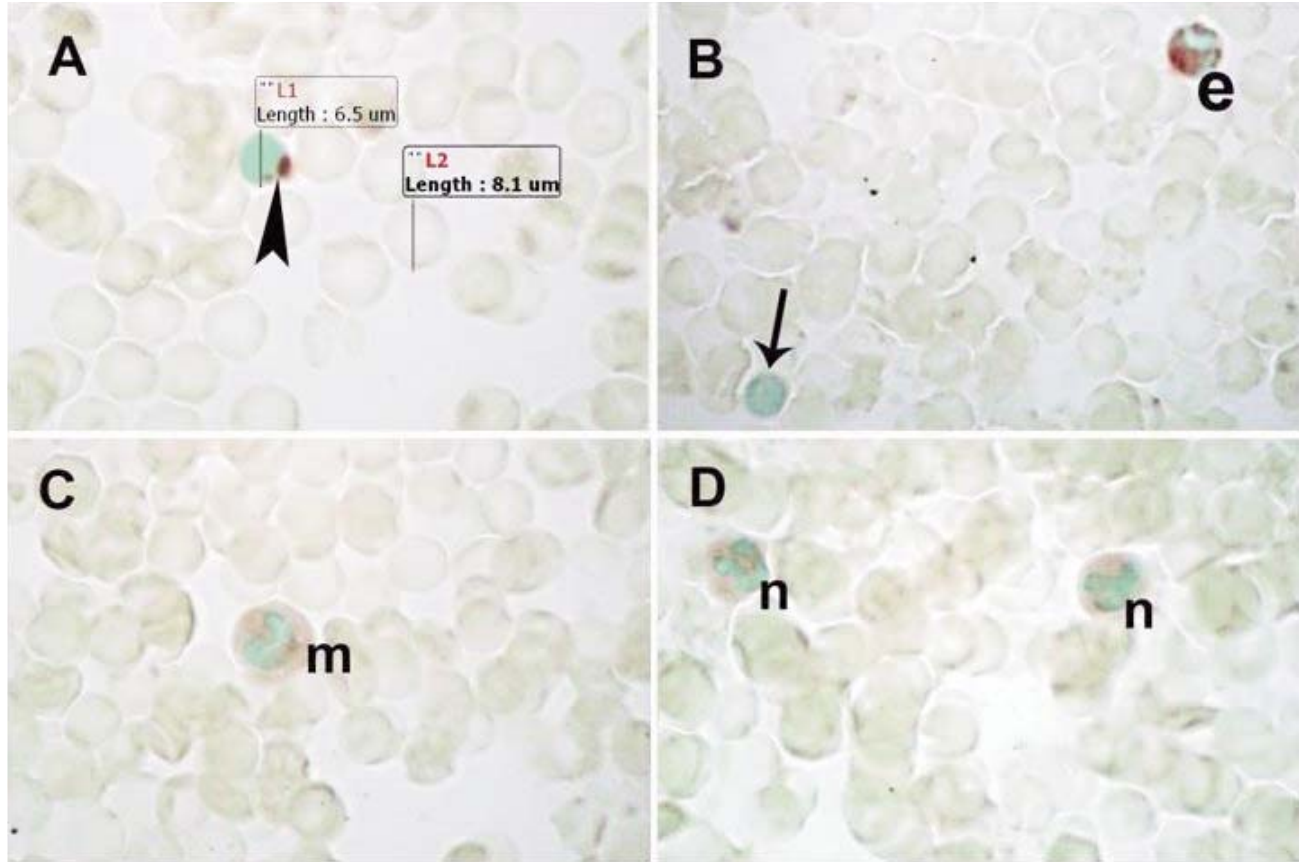
**Tablo 1.** Ratlarda periferik kan hücreleri üzerine L-karnitin (500 mg/kg/gün), arı sütü (300 mg/kg/gün) ve nar çekirdeği (300 mg/kg/gün)'nin etkileri (n = 6)

**Table 1.** Effects of L-carnitine (500 mg/kg/day), royal jelly (300 mg/kg/day) and pomegranate seed (300 mg/kg/day) on peripheral blood cells in rats (n = 6)

Gruplar		Gruplar			
		Kontrol	LK (500 mg/kg/gün L-karnitin)	AS (300 mg/kg/gün arı sütü)	NÇ (300 mg/kg/gün nar çekirdeği)
Eritrosit	$\text{mm}^3/10^6$	8.65 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	10.20 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	10.45 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	10.50 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>
	Ortalama çapı ( $\mu\text{m}$ )	6.92 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	6.61 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	7.82 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	7.39 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
	Min.-Maks. çap ( $\mu\text{m}$ )	6.10-7.90	5.10-7.60	6.90-8.50	7.00-8.20
Hb	g/dl	10.9 $\pm$ 1.45 <sup>c</sup>	13.50 $\pm$ 2.25 <sup>b</sup>	13.90 $\pm$ 1.75 <sup>b</sup>	14.25 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup>
Htc	%	38.50 $\pm$ 1.70 <sup>b</sup>	42.50 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	42.40 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	43.25 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>
Lökosit	$\text{mm}^3/10^3$	8.52 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	9.80 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	9.75 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	10.25 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>
Lenfosit	%	73.40 $\pm$ 3.50 <sup>b</sup>	78.55 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup>	68.35 $\pm$ 3.50 <sup>c</sup>	66.52 $\pm$ 4.45 <sup>c</sup>
ANAE (+) Lenfosit	%	72.80 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	76.44 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>	63.13 $\pm$ 0.52 <sup>d</sup>	65.25 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup>
	Ortalama çapı ( $\mu\text{m}$ )	8.61 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	7.38 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	6.35 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	5.94 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>
	Min.-Maks. çap ( $\mu\text{m}$ )	6.00-11.30	5.40-10.40	5.00-08.70	4.40-07.60
ANAE (-) Lenfosit	%	27.2 $\pm$ 2.64 <sup>c</sup>	23.56 $\pm$ 1.29 <sup>d</sup>	36.87 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	34.75 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>
	Ortalama çapı ( $\mu\text{m}$ )	8.46 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	6.82 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	5.82 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	5.36 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
	Min.-Maks. çap ( $\mu\text{m}$ )	7.20-9.30	4.50-9.50	4.00 $\pm$ 7.90	4.20-7.30

**a,b,c,d:** Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel önemi gösterir ( $P < 0.05$ )

**a,b,c,d:** Different superscripts in the same line indicate statistically significant between groups ( $P < 0.05$ )



**Şekil 1.** Kontrol ve deney gruplarında ANAE<sup>(+)</sup> ve ANAE<sup>(-)</sup> kan hücreleri

**A:** ANAE<sup>(+)</sup> T lenfosit (ok başı), ANAE<sup>(+)</sup> T lenfosit çap ölçümü (L1), eritrosit çap ölçümü (L2), **B:** ANAE<sup>(+)</sup> lenfosit (ok), ANAE<sup>(+)</sup> eozinofil granulosit (e), **C:** ANAE<sup>(+)</sup> monosit (m), **D:** ANAE<sup>(+)</sup> nötrofil granulosit (n). ANAE boyama. X 1125

**Fig 1.** ANAE<sup>(+)</sup> and ANAE<sup>(-)</sup> blood cells in control and experimental groups

**A:** ANAE<sup>(+)</sup> T lymphocyte (arrow head), measurement of diameter ANAE<sup>(+)</sup> T lymphocyte (L1), measurement of diameter erythrocyte (L2), **B:** ANAE<sup>(+)</sup> lymphocyte (arrow), ANAE<sup>(+)</sup> eosinophile granulocyte (e), **C:** ANAE<sup>(+)</sup> monocyte (m), **D:** ANAE<sup>(+)</sup> neutrophil granulocyte (n). ANAE stain. X 1125

sayısı K grubunda %72.80, LK grubunda %76.44, AS grubunda %63.13 ve NÇ grubunda ise %65.25 olarak tespit edildi ( $P < 0.05$ ). ANAE<sup>(+)</sup> reaksiyon veren lenfosit sayısı kontrol grubuna göre karnitin eklenen grupta daha fazla iken, AS ve NÇ uygulanan gruplarda istatistiksel öneme sahip bir azalmanın olduğu belirlendi ( $P < 0.05$ ). Histometrik ölçümler sonucunda LK, AS ve NÇ uygulanan gruplarda ANAE pozitif ve negatif lenfositlerin kontrol grubundaki lenfositlerden daha küçük çaplarda olduğu, ayrıca AS ve NÇ içeren gruplarda eritrosit çaplarının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde arttığı da tespit edildi (Tablo 1).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Memelilerde periferal kandaki eritrosit ve lökositlerin çok azı değişik şekil ve çaplarda bulunabilir. Eritrosit sayısı, hemoglobin düzeyi, hematokrit değeri, lökosit sayısının artması ya da azalması

o canlının metabolik durumu hakkında bilgiler verebilmektedir. Eritrosit membranlarının doymamış yağ asitlerinden, sitoplazmalarının ise oksijen ve hemoglobinden zengin olması bu hücrelerin oksidatif hasarlara karşı duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Vitamin E, vitamin C<sup>1</sup>, alfa tokoferol<sup>2</sup>, karnitin, arı sütü<sup>4</sup> ve nar suyu<sup>7</sup> gibi antioksidatif maddeler serbest oksijen radikallerini inhibe ederek eritrositlerin yaşam süresini, hematokrit ve hemoglobin değerini artırmakta<sup>1,22</sup>, hemodiyaliz, anemi, lösemi ve kemoterapide destekleyici ajan olarak kullanılabilir<sup>3</sup>.

Eritrositler insanda 7.2  $\mu\text{m}$ <sup>23</sup>, farede 6.3  $\mu\text{m}$ <sup>24</sup>, ratda 6.8  $\mu\text{m}$ <sup>25</sup>, köpekte 7.3  $\mu\text{m}$ , kedide 6.2  $\mu\text{m}$ , sığırdada 5.1  $\mu\text{m}$ , koyunda 4.1  $\mu\text{m}$ , atta ve domuzda 5.3  $\mu\text{m}$  çapa sahip olup 1  $\text{mm}^3$  kanda en az sayıda tavuklarda (3.5 milyon) en fazla sayıda ise keçilerde (14 milyon) bulunmaktadır<sup>26</sup>. Antioksidan maddelerden olan L-karnitin, arı sütü ve nar çekir-

değinin ratlardaki etkisini belirlemek için yapılan bu çalışmada, kontrol grubunda eritrosit sayısı  $\text{mm}^3$ 'te 8.65 milyon hesaplanırken, deney gruplarında eritrosit sayısının yaklaşık 10 milyon (LK: 10.20, AS: 10.45 ve NÇ: 10.50 milyon) olduğu belirlendi. L-karnitin verilen hemodiyaliz hastalarında eritropoiezis uyarılarak hemogloblin ve hematokrit oranlarının artması sağlanmakta ve eritrositlerin yaşam süresi uzatılabilmektedir<sup>3,22</sup>. Patel ve ark.<sup>27</sup>, 60 mg/kg nar ekstraktının eritrosit sayısını az da olsa artırdığını, 200 ve 600 mg/kg uygulamalarının ise önemli bir değişikliğe sebep olmadığını bildirirse de, çalışmamızda LK, AS ve NÇ uygulanan gruplarda Kitamura ve ark.<sup>3</sup> ile Arduini ve ark.<sup>22</sup>'nin bildirdiği gibi bu antioksidanların eritrosit sayısı, hemogloblin ve hematokrit değerinde bir artış oluşturduğu tespit edilmiştir. Eritrosit çaplarının metabolizmaya göre değişebileceği, farelerde aspirinin eritrosit çapını 6.3  $\mu\text{m}$ 'den 7.5-8  $\mu\text{m}$  çapına<sup>24</sup>, ratlarda ise dektranın eritrosit çapını 6.8  $\mu\text{m}$ 'den 8-12  $\mu\text{m}$  çapına<sup>25</sup> çıkardığı yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır. Bu çalışmalara paralel olarak AS ve NÇ uygulanan gruplarda eritrosit çaplarının diğer gruplara göre (LK: 5.10-7.60  $\mu\text{m}$   $\leq$  K: 6.10-7.90  $\mu\text{m}$  <NÇ: 7-8.20  $\mu\text{m}$  <AS: 6.90-8.50  $\mu\text{m}$ ) daha fazla olduğu, ayrıca, NÇ grubunda eritrositlerin hiperkromatik yapıda görüldüğü de belirlendi. Bu sonuçlara göre, özellikle AS ve NÇ 'nin kemik iliğinde eritrosit yapım hızını artırabileceği, eritrosit çaplarını ve hemogloblin miktarını artırarak daha fazla oksijen taşınımına aracılık edebileceği düşünüldü.

Fonksiyonlarına ve köken aldığı organa göre T ve B tipleri bulunan lenfositlerin çapı 6-8  $\mu\text{m}$  olanlarına küçük tip lenfositler, 9-12  $\mu\text{m}$  arasında olanlara orta tip lenfositler, 12-15  $\mu\text{m}$  olanlara ise büyük tip lenfositler de denilmektedir<sup>26</sup>. Küçük lenfositler bakteriler, antijenler ve sitokinler aracılığıyla bölünerek büyümekte ve antijenik olarak uyarılmış reaktif lenfositler olan orta ve büyük tip lenfositlere dönüşebilmektedirler<sup>28</sup>. Lenfositler, insanlarda 4.8-11.8  $\mu\text{m}$ <sup>29</sup>, farelerde 2.5-3.0  $\mu\text{m}$ <sup>30</sup>, ratlarda 8.5-17  $\mu\text{m}$  çapa sahip hücrelerdir<sup>31</sup>. Ayrıca, Grossi ve ark.<sup>32</sup>, insanlarda IgG ve IgM yüzey reseptörlerine sahip lenfositlerin %95'inin ortalama 9.3  $\mu\text{m}$  çapındaki ANAE<sup>(+)</sup> lenfositler olduğunu da bildirmektedir. Çalışmamızdaki histometrik ölçümleri yapılan kontrol grubu ratlarda ANAE<sup>(+)</sup> lenfositlerin 6.00-11.30  $\mu\text{m}$  çapında, ANAE<sup>(-)</sup> lenfositlerin 7.20-9.30  $\mu\text{m}$  çapında küçük ve orta tip lenfositlerin bulunduğu saptandı.

Periferel kanda bulunan lenfositler çoğunlukla otoimmün hastalıklar, ilaç reaksiyonları, immunizasyon, radyasyon, hormon ve stres gibi faktörlerin sebep olduğu durumlarda sayılarını artırmaktadırlar. Ayrıca, bu tip lenfositlerde asit fosfataz, fosforilaz ve nonspesifik esteraz miktarı da artmaktadır<sup>28</sup>. Yapılan bazı çalışmalarda da periferel kandaki lenfosit sayısının yaş, cinsiyet ve ırka bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir<sup>19,33</sup>. Daha önceden yapmış olduğumuz Wistar ırkı erişkin dişi ratlarda ANAE<sup>(+)</sup> lenfosit oranını %68 olarak belirlememize rağmen<sup>18</sup>, genç Sprague Dawley ırkı dişi ratlarla yapılan bu çalışmada ANAE<sup>(+)</sup> lenfosit oranının %72.8 olduğu saptanmıştır.

Antioksidan maddelerden olan L-karnitinin immun sistem üzerine etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da kemik iliği hücre proliferasyonunu<sup>10</sup>, antikor yanıtlarını<sup>8</sup>, polimorf çekirdekli hücrelerin kemotaktik hareketlerini, mononükleer hücrelerin fagositik aktivitesini, primer ve sekonder IgG yanıtlarını artırarak etkisini gösterdiği bildirilmektedir<sup>34</sup>. Ayrıca, savunma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan karnitin T ve B lenfositlerin apoptozisinin inhibisyonunda<sup>34</sup>, lenfositlerin proliferatif yanıtlarının<sup>8</sup> ve periferel kanda pseudoeozinofil sayısının artırılmasında da oldukça etkili olduğu bildirilmektedir<sup>9</sup>. Bu araştırmalara paralel olarak çalışmamızda da kontrol grubuna göre karnitin eklenen gruptaki ratların lökosit sayısı, total lenfosit oranı ve ANAE<sup>(+)</sup> T lenfosit oranının arttığı belirlenmiştir.

İşçi arıların hypopharyngeal ve mandibular bezlerinden elde edilen arı sütü, farelerde (0.5-1.5 g/kg/gün) kemik iliği hücrelerini koruyucu, anti-tümöral, antibakteriyel ve antioksidan etkisiyle dikkati çeken bir maddedir<sup>35</sup>. Yüksek dozlarda (75-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) IL-2 üretimini baskılamakta<sup>36,37</sup>, daha düşük dozlarda (0.5-2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) T hücre proliferasyonunu uyarıcı role sahiptir<sup>37</sup>. Bu antioksidan maddede farelerde PGE<sub>2</sub> seviyesini azaltarak ve baskılayıcı T lenfositleri inhibe ederek makrofajların ve nötrofillerin aktifleşmesine<sup>35</sup>, B hücre fonksiyonlarının artmasına neden olarak immunitiyi uyarmaktadır<sup>11,12</sup>. Arı sütünün immun baskılayıcı rolü ise timusta IgE, IgG, IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini inhibe ederek T hücre üretiminin baskılanması<sup>4</sup>, ratlarda baskılayıcı T lenfositlerinin aktivasyonu ile humoral immunitenin inhibisyonu<sup>12</sup>, içerdiği yüksek konsantrasyondaki yağ asitleri sayesinde T hücrelerini inaktifleştirmesi<sup>36</sup> şeklindedir. Çalışmamızda, arı sütü verilen gruplarda total len-

fosit sayısı, ANAE (+) T lenfosit oranı ve lenfosit çaplarının kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı tespit edildi ( $P<0.05$ , *Tablo 1*). Elde edilen bulgulara göre 300 mg/kg/gün AS'nün Vuçevic ve ark.<sup>36</sup>, Gasic ve ark.<sup>37</sup> ve Taniguchi ve ark.<sup>4</sup> nın bildirdiği gibi immunitiyi baskıladığı hatta periferik kanda ANAE (+) T lenfosit ve çapları küçülmüş inaktif lenfosit oranını artırdığı saptanmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nar, nar suyu ve nar çekirdeğinin kanser hücrelerini öldürücü, antiproliferatif<sup>13</sup>, pro-apoptotik ve antiinflamatuvar etkisinin olduğu bildirilmektedir<sup>6,14</sup>. Farelere verilen nar çekirdeği yağı, dalaktaki CD4+ (yardımcı T lenfosit), CD8+ (sitotoksik T lenfosit) ve CD45R (B lenfosit) yüzey reseptörlerine sahip lenfosit popülasyonunu etkilemezken, lenfositlerdeki IgG ve IgM reseptör sayısını çoğaltarak B lenfosit fonksiyonlarını artırabilmektedir<sup>13</sup>. Nar içerisinde bulunan elajik asitin %1.4 oranında 90 gün süreyle ratlara verilmesi durumunda, lökosit ve eritrosit sayısında önemli bir değişiklik görülmesi de, lenfosit oranını erkeklerde az da olsa arttırdığı bildirilmektedir<sup>5</sup>. Ayrıca, Patel ve ark.<sup>27</sup>, 60 mg/kg nar ekstraktı verilen dişi ratlarda sadece lökosit sayısının istatistiksel açıdan önemli derecede, lenfosit oranının ise kısmen de olsa azaldığını bildirmektedirler. Bu çalışmada, NÇ ekstraktı verilen grupta araştırmacıların bulgularının aksine lökosit oranında bir artış gözlenirken, total lenfosit oranı, ANAE (+) T lenfosit oranı ve lenfosit çaplarının kontrol grubuna göre istatistiksel öneme sahip bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ratlarda L-karnitin immun sistemi uyarıcı, arı sütü ve nar çekirdeğinin ise immun baskılayıcı etki gösterebileceği tespit edildi. Ayrıca, arı sütü ve nar çekirdeğinin eritrosit sayı ve çaplarının yanı sıra hemoglobinin düzeyleri ve hematokrit değerini artırıcı özellikleri nedeniyle eritrositlerin korunması ve aneminin düzeltilmesinde destekleyici antioksidan madde olarak kullanılabilirliği düşünüldü.

#### KAYNAKLAR

1. Şentürk ÜK, Gündüz F, Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalçın Ö, Bor-Küçükkatay M, Yeşilkaya A, Başkurt OK: Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol*, 91, 1999-2004, 2001.
2. Ajith TA, Usha S, Nivitha V: Ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: A comparative study. *Clin Chim Acta*, 375, 82-86, 2007.
3. Kitamura Y, Satoh K, Satoh T, Takita M, Matsuura A: Effect of L-carnitine on erythroid colony formation in mouse bone marrow cells. *Nephrol Dial Transplant*, 20, 981-984, 2005.
4. Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M: Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/NGA mice. *Int Immunopharmacol*, 3, 1313-1324, 2003.
5. Tasaki M, Umamura T, Maeda M, Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Kuroiwa Y, Hirose M, Nishikawa A: Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 46, 1119-1124, 2008.
6. Lansky EP, Newman RA: Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*, 109, 177-206, 2007.
7. Yüce A, Aksakal M: Ratların karaciğer ve testis dokusundaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkisi. *Firat Univ Sağ Bil Derg*, 21, 253-256, 2007.
8. Deng K, Wong CW, Nolan JV: Long-term effects of early-life dietary L-carnitine on lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 90, 81-86, 2006.
9. Karadeniz A, Simsek N, Cakir S: Haematological effects of dietary L-carnitine supplementation in broiler chickens. *Revue Méd Vét*, 8-9, 437-443, 2008.
10. Janssens GPJ, Mast J, Goddeeris BM, Cox E, Hesta M, De Wilde ROM: Enhanced specific antibody response to bovine serum albumin in pigeons due to L-carnitine supplementation. *Br Poult Sci*, 41, 448-453, 2000.
11. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M: Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci*, 5, 2029-2045, 2003.
12. Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I: A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19, 31-38, 1996.
13. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, Imamura J, Tachibana H, Yamada K: Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutr*, 22, 54-59, 2006.
14. Syed DN, Afaq F, Mukhtar H: Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol*, 17, 377-385, 2007.
15. Aşti RN, Alabay B, Kurtdele N, Altunay H, Ergün L: Farklı hayvan türlerinin periferik kan lökositlerinde alfa naftil asetat esteraz aktivitesinin belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 43, 129-133, 1996.
16. Yörük M, Aşti RN, Kurtdele N, Ağaoğlu Z, Altunay H: Light and electron microscopic studies on alpha-naphthyl acetate esterase activity of the peripheral blood T-lymphocytes in Van cat. *Anat Histol Embryol*, 27, 289-292, 1998.
17. Özcan Z: Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes in Angora rabbits. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 881-884, 2005.
18. Simsek N, Karadeniz A, Karaca T: Effects of the Spirulina platensis and Panax ginseng oral supplementation on

- peripheral blood cells in rats. *Revue Méd Vét*, 158, 483-488, 2007.
19. **Dönmez HH, Sur E:** Hematology and enzyme histochemistry of the peripheral blood leucocytes in Rock Partridges (*Alectoris graeca*). *Poult Sci*, 87, 56-60, 2008.
  20. **Schermer S:** The Blood Morphology of Laboratory Animals, 3rd edition. pp. 43-49. Davis, Philadelphia, PA. 1967.
  21. **Mueller J, Brun Del Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H:** Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol*, 5, 270-274, 1975.
  22. **Arduini A, Bonomini M, Clutterbuck EJ, Laffan MA, Pusey CD:** Effect of L-carnitine administration on erythrocyte survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 2672, 2006.
  23. **Gregersen MI, Bryant CA, Hammerle WE, Usami S, Chien S:** Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves. *Sci*, 157, 825-827, 1967.
  24. **Modi DN, Merchant MA:** In vitro effects of aspirin and salicylate on erythrocytes: size and  $Na^+/K^+$  ATPase activity. *Indian J Pharmacol*, 35, 27-31, 2003.
  25. **Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC:** Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H113-H120, 2004.
  26. **Sağlam M, Aştı RN, Özer A:** Genel Histoloji. Genişletilmiş 6. baskı Yorum Matbaacılık Ankara. s. 209-222, 2001.
  27. **Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG:** Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol*, 46, 2728-2735, 2008.
  28. **Simon MW:** The atypical lymphocyte. *Int Pediatr*, 18, 20-23, 2003
  29. **Loiko VA, Ruban GI, Gritsai OA, Berdnik VV, Goncharova NV:** Mononuclear cells morphology for cells discrimination by the angular structure of scattered light. *Tenth International Conference on Light Scattering by Non-spherical Particles*, 105-108, 2007.
  30. **Majstoravich S, Zhang J, Nicholson-Dykstra S, Linder S, Friedrich W, Siminovitch KA, Higgs HN:** Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*, 104, 1396-1403, 2004.
  31. **Berke HL, Wilson GH, Berke ES:** Size distribution changes in peripheral lymphocytes of the rat after x-irradiation. *Radiat Res*, 37, 181-191, 1969.
  32. **Grossi CE, Webb SR, Zicca A, Lydyard PM, Moretta L, Mingari MC, Cooper MD:** Morphological and histochemical analyses of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG. *J Exp Med*, 1405-1417, 1978.
  33. **Durgun Z, Eksen M, Serpek P, Keskin E:** Değişik yaş gruplarındaki yerli hibrit tavuklarda bazı hematolojik değerler. *Türk Vet Hekimliği Derg*, 7, 11-18, 1990.
  34. **Mast J, Buysel J, Goddeeris BM:** Dietary L-carnitine supplementation increases antigen-specific immunoglobulin G production in broiler chickens. *Br J Nutr*, 83, 161-166, 2000.
  35. **Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CAV, Luengo MB, Queiroz MLS:** Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: Relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int Immunopharmacol*, 5, 679-688, 2005.
  36. **Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, Colic M:** Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol*, 7, 1211-1220, 2007.
  37. **Gasic S, Vucevic D, Vasilijic S, Antunovic M, Chinou I, Colic M:** Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 29, 521-536, 2007.