

A Vitamininin Kızamık Hastalarının Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin Ex Vivo Araştırılması(*)

Serkan AKARSU (**), Ümran SOYOĞUL GÜRER (**), Burçak GÜRBÜZ AKARSU (**),
Hüsnü ALTUNAY (***), Adile ÇEVİKBAŞ (**), Candan JOHANSSON (****)

(*) Bu çalışma KLİMİK 99, 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde
(3-8 Ekim 1999, Antalya) sunulmuştur

(**) Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

(***) Haydarpaşa Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Servisi, İstanbul

(****) Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZET

Kızamıkta A vitamini desteğinin infeksiyonlara karşı direnci artırdığı; diyare, pnömoni, protein-enerji malnütrasyonu ve körlük gibi sekonder komplikasyonlarla ilişkili mortaliteyi azalttığı bilinmektedir.

Bu çalışmada A vitamininin, kızamıklı hastaların immün sistem hücreleri üzerine olası immünomodülatör etkilerini göstermek amacıyla; yaş ortalaması 20 olan 15 kızamıklı erkek hastaya 2 gün süre ile A vitamini (195.000 IU/gün/oral) uygulanmış ve hastaların polimorf nüveli lökosit (PNL) fonksiyonları (fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi) üzerine etkisi ex vivo olarak araştırılmıştır.

Hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası PNL'leri (1×10^7 hücre/ml), etilendiamintetraasetikasit (EDTA) içine alınan venöz kandan Ficoll-hypaque gradient santrifüj yöntemi ile ayrılmış, PNL'lerin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi tayininde *Candida albicans* ATCC 10231 kökeni kullanılmıştır.

PNL'lerin fagositik aktivitelerinin tayininde, *C. albicans* hücrelerini fagosite etmiş olan PNL'ler, hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise, PNL'ler tarafından öldürülmesi sonucu maviye boyanan *C. albicans* hücrelerini içeren PNL'ler sayılarak, yüzde cinsinden ifade edilmiştir.

Kızamık hastalarının tedavisinde hastaya 2 gün süre ile uygulanan A vitamini (195.000 IU/gün/oral) hasta PNL'lerinin fagositik aktivitesini ve hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak artırmıştır ($p < 0.05$).

Sonuç olarak kızamık hastalarının tedavisinde 2 gün süre ile uygulanan A vitamini (195.000 IU/gün/oral) PNL fonksiyonları üzerine immünomodülatör etki göstererek, hastaların daha çabuk ve komplikasyonsuz iyileşmelerini sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: A Vitamini, kızamık, polimorf nüveli lökosit fonksiyonları

SUMMARY

Ex Vivo Investigation of the Effect of Vitamin A on Polymorphonuclear Leukocyte Functions of Patients with Measles

It has been known that vitamin A supplementation in measles increases resistance against infection and decreases mortality related with secondary complications as blindness, protein-energy malnutrition, pneumoniae and diarrheae.

Vitamin A (195.000 IU/day/oral) has been administered for 2 days to 15 male patients with measles (average of age is 20) to observe its immunomodulatory effects on immun system cells. The effect of vitamin A on patient PMN functions (phagocytic and intracellular killing activity) was investigated ex vivo.

PMNs (1×10^7 cells/ml) were isolated by Ficoll-hypaque gradient centrifuge method from venous blood in ethylenediaminetetraaceticacide (EDTA) of patients with measles. *Candida albicans* (ATCC 10231) was used to determine the phagocytic and intracellular killing activities of PMNs.

For the determination of phagocytic activity of PMNs, phagocytosed yeast cells were counted on a slide under the microscope and the result was expressed as percentage. Intracellular killing activities of PMNs were determined by counting the PMNs that contain killed yeast cells (blue in colour) by PMNs. The result was expressed as percentage.

Vitamin A (195.000 IU/day/oral) which was administered for 2 days in the treatment of patients, increased phagocytic and intracellular killing activities of PMNs significantly ($p < 0.05$).

In conclusion, vitamin A (195.000 IU/day/oral) administered for 2 days in the supportive treatment of measles, produced immunomodulating effects on PMN functions without any complication.

Key Words: Vitamin A, measles, polymorphonuclear leukocyte functions.

GİRİŞ

Kızamık, Measles virüsünün (MeV) neden olduğu öksürük, nezle, ateş ve makulopapüler döküntüler ile karakterize, akut seyreden bulaşıcı bir enfeksiyondur. Kızamıkta A vitamini tedavisinin, enfeksiyonlara karşı direnci artırdığı, diyare, pnömoni, protein-enerji malnütrisyonu ve körlük gibi sekonder komplikasyonlar ile ilişkili mortaliteyi azalttığı bilinmektedir (1). A vitamini desteğinin çocuklarda sağ kalım üzerine olumlu etki yarattığı savunulmaktadır. WHO ve UNICEF gibi resmi kurumlar, A vitamini eksikliğinin endemik olduğu bölgelerde kızamığın başlangıcında 200.000 IU (100.000 IU infant) tek doz A vitamininin ağız yolu ile uygulanmasını önermektedirler (1).

Son yıllarda antimikrobik olmayan bazı ilaçların insan immün sistemini olumlu ve ya olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Son 10 yıldır yapılan epidemiyolojik ve immünolojik çalışmalar A vitamininin immün sistem üzerine önemli rolünün olduğunu göstermektedir.

A vitamininin T hücrelerine bağımlı antijenlere karşı antikor yanıtını güçlendirdiği, antijen ve mitojenlere yanıtı, lenfosit proliferasyonunu artırdığı, apoptozu inhibe ettiği ve mukozal yüzeylerinin fonksiyon ve bütünlüğünü restore ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (2).

Mikroorganizma, ilaç ve konak immün sistemi arasındaki karşılıklı ilişkileri konu alan araştırmalar, özellikle immün sistemi bozuk ve baskılanmış kişilerde görülen hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. A vitamini eksikliği, T ve B hücre fonksiyonlarında B lenfosit alt gruplarında değişiklik, antijenik proteinlere karşı bozulmuş antikor yanıtı ve mukozal yüzeylerin patolojik değişikliklerini de içine alan yaygın bozuklukla karakterize bir immün yetmezliktir. Enfeksiyon etkeni mikroorganizma, konak vücuduna girdiğinde konağın immün sistemi harekete geçer ve karmaşık bir etkileşim mekanizması ile yabancı etkeni yıkıma uğratar. Bakteri enfeksiyonlarında polimorf nüveli lökosit (PNL)'lerin konağın non spesifik savunma mekanizmasında anahtar rolü oynadığı bilinmektedir (1).

Yapılan bir çalışmada kızamığın akut evresinde MeV antijeninin PNL'ler içinde lokalize olduğu, indirekt immüno-peroksidaz tekniği ile periferik kan yaymalarında gösterilmiştir (3).

Bu çalışmada, A vitamininin immün sistem hücreleri üzerine immünomodülatör etkilerinin olup olmadığını göstermek amacı ile, yaş ortalaması 20 olan ve kızamık tanısı alan 15 hastaya 2 gün süre ile uygulanan A vitamininin (195.000 IU/gün/oral) hasta PNL fonksiyonları (fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi) üzerine etkisi ex vivo araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Grubu: Kasım 1998-Mayıs 1999 döneminde Haydarpaşa Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Servisi'nde kızamık tanısı alan ve yaş ortalaması 20 olan 15 erkek hasta çalışmaya alınmıştır.

A vitamini Tedavisi: Ticari adı Avicap (yumuşak kapsül, 30.000 IU) olan A vitamini preparatı Koçak İlaç A.Ş.'den sağlanmıştır. Kızamık tanısı alan 15 erkek hastaya 1. gün 210.000 IU (7x1), 2. gün 180.000 IU (6x1) olmak üzere 2 gün süre ile (195.000 IU/gün/oral) toplam 390.000 IU A vitamini desteği verilmiştir.

PNL'lerin Elde Edilmesi: Hastaları tedavi öncesi (kontrol grubu) ve tedavi sonrası PNL'leri venöz kandan (10 ml) Ficoll-Hypaque gradient santrifüj yöntemi ile ayrılmış, canlılık tripan mavisi boyama yöntemi ile tespit edilmiştir. PNL'ler, HBSS içinde sulandırılarak hücre yoğunluğu 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir (4).

PNL'lerin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitelerinin Tayini: PNL'lerin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini ölçmek için klinikte elde edilmiş olan bir C. albicans kökeni kullanılmıştır. Maya canlılığı metilen mavisi boyama yöntemi ile tespit edilerek C. albicans süspansiyonu taze insan serumu ile (4:1) 37°C'de 30 dk. opsonize edilmiştir. İnkübasyondan sonra hasta PNL'leri üzerine opsonize maya hücreleri konulmuş ve tekrar 30 dk. aynı ortamda inkübe edilmiştir. Karışımın son hücre yoğunluğu 5×10^6 PNL/ml ve 5×10^6 maya/ml ol-

muştur. İnkübasyonun 25. dakikasında her tüpe ölü mayaların boyanması için (1:1) metilen mavisi (%0.01) eklenmiştir. Fagositik aktivite tayininde, 100 adet PNL içinde maya hücrelerini fagosit etmiş olan PNL'ler , hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise, içinde PNL'ler tarafından fagosit edilmiş ve öldürülmüş maya hücreleri (mavi boyanmış) bulunan PNL'ler sayılarak % cinsinden ifade edilmiştir (5,6).

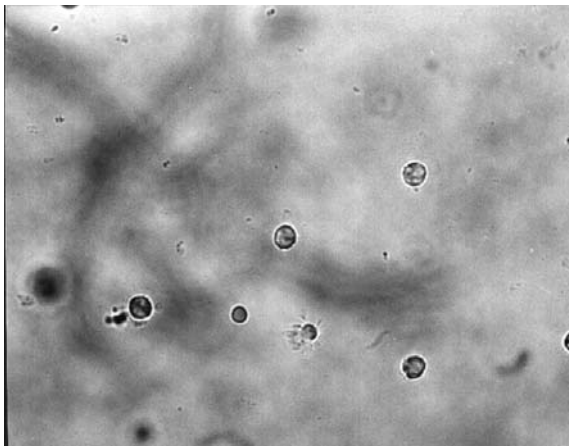
Kızamık infeksiyonu geçirmekte olan hastalara A vitamini tedavisi (195.000 IU/gün/oral/2 gün) uygulanımının tamamlanmasından 8 saat sonra, tedavi öncesi koşullarda yapılan deneyler ex vivo koşullarda aynı şekilde tekrarlanmıştır.

BULGULAR

Hastaların venöz kanından ayrılan PNL'lerin canlılık oranı % 98, maya canlılığı ise % 99 olarak tespit edilmiştir.

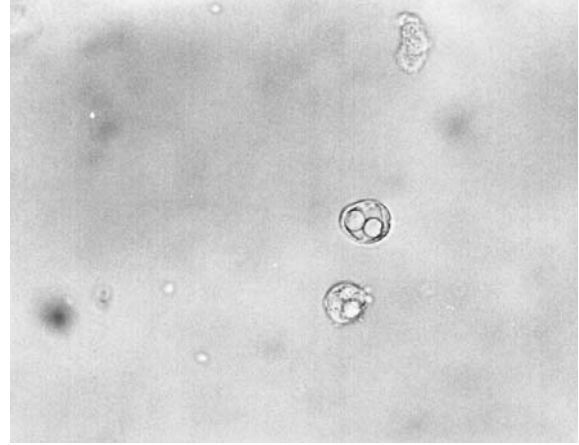
Ex vivo koşullarda A vitamini (195.000 IU/oral/2 gün) kızamıklı hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini ve hücre içi öldürme aktivitesini aynı hastaların tedavi öncesi kontrol PNL'lerine göre anlamlı olarak artırmıştır ($p<0.05$) (Tablo 1, Resim 2,3).

Resim1. Kızamıklı hasta PNL'leri (x 40)

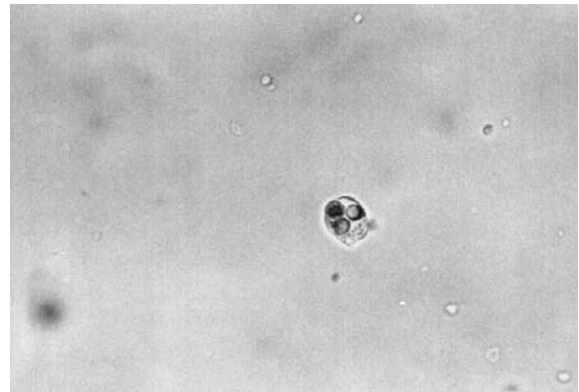


Değerler % oranı \pm standart sapma olarak ve n=15 kızamıklı hastanın deney ortalaması alınarak verilmiştir.

Resim 2. Kızamıklı hasta PNL'leri tarafından C. albicans'ın fagositasyonu (x 40)



Resim 3. Kızamıklı hasta PNL'leri tarafından C. albicans'ın hücre içinde öldürülmesi [ölü maya hücresi, metilen mavisi ile mavi boyanmış (metilen mavisi x 40)]



Tablo 1: A vitamininin kızamıklı hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine ex vivo etkisi (n=15).

Deney	Tedavi Öncesi (Kontrol)	A vitamini Tedavi Sonrası
Fagositik Aktivite	55,26 \pm 9,40	75,73 \pm 8,98*
Hücre içi öldürme aktivitesi	3,86 \pm 2,64	7,53 \pm 3,56*

* $p<0,05$ Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi.

TARTIŞMA

1913 yılında keşfedilen A vitamini insan organizmasında görme, üreme, gelişme, epitel hücrelerin integrasyonu ve immün sisteme adjuvan etkileri vardır. A vitamini antikor yanıtını etkilediği gibi fagositik fonksiyonları ve properdin seviyelerini de değiştire-

bilmektedir. A vitamini, zayıf immünojenlere karşı immün yanıtı ve bilinen çoğu adjuvanın insanlar için bir çok yan etkisi olmasına karşın, yan etkisi olmaksızın antikor ve hücre aracılı immüniteyi artırmaktadır. A vitamini eksikliği ise infeksiyon hastalıklarında önemli rol oynayan beslenme eksikliklerinden biridir (7,8).

A vitamini eksikliğinin ciddi bir sonucu, immün yetersizliktir. İmmünite bozukluğu, kızamık, pnömoni ve infeksiyöz diyare benzeri yaygın infeksiyonlar nedeniyle yüksek mortaliteye yol açar. Diyetle A vitamini takviyesi mortaliteyi % 20 – 30'lara düşürür (9,10).

Hof ve ark.(11) çalışmalarında, koyun eritrositleri ile immünize edilmiş, *Listeria monocytogenes* ile infekte edilmiş ve altı ay A vitamininden yoksun diyet ile beslenen farelerin karaciğer içeriklerinin belirgin bir şekilde azaldığını ancak ne immün sistemin ne de mononükleer fagositik sistemin olaya karışmadığını; buna karşılık yüksek doz A vitamini ile tedavi olan farelerde koyun eritrositlerine karşı antikor üretiminin arttığını ve aynı zamanda *L. monocytogenes* ile infeksiyona karşı artan bir direnç gösterdiklerini ve sonuç olarak da A vitamininin bazı anti-infektif özelliklerinin bulunduğunu göstermişlerdir.

Aktif viral infeksiyonlarda, PNL fonksiyonları, kemotaksi ve miyeloperoksidaz aktivitesi akut periyod süresince göze çaracak şekilde baskılandığından, bakterilerle oluşan süper infeksiyonlara eğilim kısmen de olsa artmaktadır. A vitamini eksikliğinin neden olduğu immün bozukluk, lenfosit membran glükoproteinlerindeki değişiklikler, yardımcı T hücre fonksiyonları, epitel dokusu ya da diğer mekanizmalar üzerine ters etkileri yüzünden olabilmektedir. Çocuklarda A vitamini, kızamık ve beslenme arasındaki ilişkiyi açıklayan bir çalışmada, kızamık ve kötü beslenmenin plazma retinol ve albümin konsantrasyonunu da baskıladığı gösterilmiştir (12,13).

Markowitz ve ark. (14) çalışmalarında, 5 yaş ve 5 yaşın altındaki kızamıklı çocukların, serumdaki A vitamini seviyesini HPLC yöntemi ile tayin etmişler ve 5 µg/dl'nin altında bulmuşlardır. Araştırmacılar ölümle sonuçlanan vaka oranının % 26 olduğunu bildirmişlerdir. İki yaşın altındaki çocuklarda, hastanede kaldıkları süre içinde görülen, lenfopeni, düşük A

vitamini seviyesi ve pnömoni komplikasyonları takip edilip ölüm ile olan ilişkileri gösterilmiştir. Bu konuda yapılan retrospektif çalışmalarda da 5 µg/dl'den düşük A vitamini seviyesinin, 2 yaş altı kızamıklı çocuklardaki mortalite ile ilişkisi saptanmıştır. Araştırmacılar çocuklardaki düşük A vitamini seviyesini ve kızamığa bağlı ölümü önlemede, A vitamini desteğinin tedavideki rolünü gösterecek, daha ileri çalışmalara gerek olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sijtsma ve ark. (15), bir günlük piliçlerin diyetlerine dört hafta süre ile A vitamini desteği (120 retinol equivalent/kg, 1200 retinol equivalent/kg) vermişler ve hiç A vitamini verilmeyen (avitaminoz) piliçleri de dördüncü hafta sonunda Newcastle disease virus (NDV) ile infekte etmişlerdir. İnfeksiyondan 11-12 gün sonra piliç periton makrofajlarında fagositik aktiviteyi ölçmek için, fagositik aktivite indikatörü olarak floresein izotiyosiyenat ile işaretli maya hücrelerini saymışlar, hücrelerde nitroblue tetrazolium (NBT) redüksiyonunu ölçerek mikroorganizmanın oksijene bağımlı öldürülmesini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarında avitaminoz olan infekte ve infekte edilmemiş piliçlerde NBT redüksiyonunun ve fagositozun bozulduğunu, A vitamini desteği alan infekte ve infekte olmayan piliçlerin makrofajlarında fagositoz ve NBT redüksiyonunun arttığını, bu artışın infekte grupta daha çok olduğunu bildirmişlerdir.

Wiedermann ve ark. (16), avitaminoz sıçanları enterotoksin A oluşturan *Staphylococcus aureus* suşu ile infekte ettikten 18 gün sonra, sıçanlarda oluşan artritin görülme sıklığını %86, kontrol sıçanlarda ise % 44 bulmuşlardır. A vitamini desteği alan sıçanlarda *Staphylococcus aureus*'a karşı T hücre yanıtının kontrol sıçanlarına göre daha yüksek olduğunu, avitaminoz sıçanlarda fagositik hücrelerin sayısında bir değişim olmamasına karşın fagositoz ve hücre içinde öldürme kapasitesinin anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir.

Twining ve ark. (17), avitaminoz sıçanlarda, terapötik dozda A vitamini uygulanan sıçanlarda ve yüksek doz A vitamini uygulanan sıçanlarda, A vitamininin PNL kemotaksisi üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, avitaminoz sıçanların ve yüksek doz A vitamini desteği alan sıçanların PNL

kemotaksisini, terapötik dozda A vitamini alan sıçanların PNL kemotaksisine göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Aynı çalışmada avitaminoz sıçanlarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın nötrofillere adezyonunun, fagositozun ve oluşan oksidatif moleküller oranının, A vitamini desteği alan sıçan nötrofillerine göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar avitaminoz sıçanlara sekiz gün süre ile A vitamini desteği uyguladıklarında sıçanların nötrofillerindeki aktif oksidan maddelerin artışı ile birlikte, nötrofiller tarafından *P. aeruginosa*'nın fagositozunda da artış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca avitaminoz sıçanların nötrofillerinde katepsin G'nin, kontrol nötrofillere göre anlamlı olarak azaldığını da bildirilmişlerdir.

Abramowitz ve ark. (3), kızamıkta, PNL'ler ile makrofajların viral antijenik materyali fagosite etme yeteneklerini basit ve hızlı tanı yöntemi olan immüno-peroksidaz boyama ile göstermişlerdir. İnfeksiyonun ekzantem döneminde, hastaların periferik kan yaymalarında, MeV antijeninin PNL'ler içinde lokalize olduğunu, iyileşme döneminde ise yok olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, antijenik olarak MeV ile yakın ilişkili olan Canine Distemper Virüs ile infekte ettikleri köpeklerin PNL'lerinde de, viremi sonrası viral antijenin varlığını göstermişlerdir. İnsan PNL'lerinde MeV antijeninin gösterildiği gibi, köpek PNL'lerinde de Canine Distemper Virüs antijeni varlığı, viral antijenin fagositozla ilişkili olabileceğini göstermektedir. T ve B lenfositleri ve monositlerin MeV'in replikasyonuna duyarlı oldukları da belirtilmiştir.

Çalışmamızda MeV ile duyarlı hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi ex vivo olarak araştırılmıştır. Kızamık infeksiyonlu hastalara iki gün süre ile uygulanan A vitamini (195.000 IU/gün/oral) desteği, hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak artırmıştır ($p<0.05$). Ayrıca hastaların daha çabuk ve komplikasyonsuz iyileşmelerini sağlamıştır.

Gerek kaynak bilgilerin gerekse çalışmamızdan aldığımız sonuçların ışığında A vitamininin kızamıklı hastalarda dikkate değer bir immünomodülatör etkiye sahip olduğu görülse de, kızamığın şiddeti ve sonraki klinik belirtileri üzerine A vitamini ile daha fazla aydınlatıcı araştırmalar yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

SA-1998/99 nolu proje kapsamında olan bu çalışmamızı destekleyen Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonuna, Haydarpaşa Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Servisi çalışanlarına ve Koçak İlaç A.Ş.'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Rumore M: Vitamin A as an immunomodulating agent. Clin Pharm 12:506(1993).
2. Dennert G, Lotan R: Effect of retinoic acid on the immun system : stimulation of T killer cell induction. Eur J Immunol 8:23 (1978).
3. Abramowitz A, Tamir I, Livni N, Lotan C, Morag A: Polymorphonuclear leukocyte-associated antigenemia in measles. J Med Virol 13: 293 (1984).
4. Alexander JW, Windhorst DB, Good RA: Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. J Lab Clin Med. 72:136 (1968).
5. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. Scand J Clin Lab Invest 97:77(1968).
6. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA: Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. Antimicrob Agents Chemother 34 :196 (1990).
7. Dennert G, Lothan R: Effect of retinoic acid on the immune system: Stimulation of T killer cell induction. Eur J Immunol 8:23 (1978).
8. Hatun Ş., Teziç T.: Vitamin A status of healthy infants in Ankara Turkey. Türk J Pediatr 37:187 (1995).
9. Kumar V, Cotran R, Robbins S: Basic Pathology. p. 246, 6. ed., WB Saunders Company, Philadelphia (2000).
10. Stephensen B Charles: Vitamin A, infection and immun function. Annu Rev Nutr 21:167 (2001).
11. Hof H, Wirsing C.H.: Anti-infective properties of vitamin A. Ernahrungswiss 18:221 (1979.)
12. Rumore M: Vitamin A as an immunomodulating agent. Clin Pharm 12 : 506 (1993).
13. Salmeron E, Ruiz A, Nunez J, Aguayo J, Molina J: Reduction of the function of polymorphonucleocytes: Chemotaxis and myeloperoxidases in viral infections in

childhood. *An Esp Pediatr* 21:113 (1984.)

14. Markowitz LE, Nzilambi N, Driskell WJ, Sension MG, Rovira EZ, Nieburg P, Ryder RW: Vitamin A Levels and Mortality Among Hospitalized Measles Patients. *J Trop Pediatr* 35:109 (1989).

15. Sijtsma SR, Rombout JH, Dohmen MJ, West CE, Van Der Zijpp AJ: Effect of vitamin A deficiency on the activity of macrophages in Newcastle Disease Virus-infected chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 28:17

(1991).

16. Wiedermann U, Tarkowski A, Bremell T, Hanson LA, Kahu H, Dahlgren UI: Vitamin A deficiency predisposes to *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun* 64: 209-(1996).

17. Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL, Mulder JE: Vitamin A deficiency alters Rat Neutrophil function. *J Nutr* 127: 558 (1997).