

SİĞİR SOLUNUM VİRUSLARININ (INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS=IBR, PARAINFLUENZA 3=PI-3, BOVINE ADENOVIRUS TYPE 2=BAV-2) ENFEKSİYÖZİTE GÜÇLERİ ÜZERİNE C VİTAMİNİ ETKİSİNİN İNVİTRO ARAŞTIRILMASI

Atilla Şimşek¹

Feridun Öztürk¹

Sibel Yavru¹

Rüstem Duman¹

Nuri Başpınar²

In Vitro Effect of Vitamin C on Titer of Respiratoric Viruses (Infectious bovine rhinotracheitis= IBR, Parainfluenza 3= PI-3 and Bovine adenovirus type 2=BAV-2)

Summary: It was investigated in vitro effect of ascorbic acid on titer of IBR (Infectious bovine rhinotracheitis), PI-3 (Parainfluenza-3) and BAV-2 (Bovine adenovirus type 2) which cause of respiratoric disease in cattle. Nontoxic vitamin C (ascorbic acid) concentrations for MDBK were not cause a decrease in titer of viruses.

Key words : Cattle, respiratoric viruses, ascorbic acid.

Özet : Sığırlarda önemli solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu olan IBR (Infectious bovine rhinotracheitis), PI-3 (Parainfluenza-3) ve BAV-2 (Bovine adenovirus tip 2) viruslarının enfeksiyözite güçleri (titreleri) üzerine C vitamininin (Askorbik asit) in vitro ortamda herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı araştırıldı. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü için toksik olmayan askorbik asit konsantrasyonlarının bu virusların titreleri üzerine belirgin bir etkisi olmadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler : Sığır, respiratorik viruslar, askorbik asit.

Giriş

Çeşitli viral ve bakteriyel hastalıkların etkenleri üzerine, C vitamini (Askorbik asit)'nin bir takım etkileri olduğu bilinmektedir. C vitamini özellikle solunum yolları hastalıklarının sağıtımında destekleyici madde olarak kullanılmaktadır (Şanlı ve Kaya, 1994). Son zamanlarda kanser (Blakeslee ve ark., 1985; Preobranzhenskaya ve ark., 1993) ve AIDS (Harakeh ve Jariwalla, 1991; Tang ve ark., 1993) gibi günümüzün önemli hastalıklarında da C vitamininin kullanımının olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

C vitamini kullanımı nezlenin semptomlarını önemli derecede azaltmaktadır (Walker ve ark., 1967; Wilson ve Loh, 1973; Pauling 1974; Schwerdt and Schwerdt 1975; White ve ark., 1986). Harekeh ve Jariwalla (1991); Pauling'in, insanlarda 1 ya da 2 g askorbik asit alınmasının nez-

lenin sıklık ve şiddetini azalttığını, C vitamininin koruyucu etkisinin bazen nezlenin gelişimini durdurması, bazen de semptomları önemli derecede azaltması şeklinde açıkladığını bildirmişlerdir.

Murata ve ark. (1972a, 1972b), bazı çift zincirli DNA fajları ile tek zincirli DNA ve RNA fajlarının, askorbik asit ve thiol'e indirgenen ajanlarla inkübe edilmeleri sonucu inaktive olduklarını tespit etmişlerdir.

Schwerdt ve Schwerdt (1975), askorbik asidin insan diploid hücre kültürlerinde (WI-38, human foreskin fibroblast) ve Hela hücre kültüründeki rhinovirus replikasyonunu önemli derecede inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

White ve ark. (1986), 1 mg/ml miktarındaki Cu^{+2} ile katalize edilmiş natrium ascorbate'in $37^{\circ}C$ 'de inkübe edilmeleri sonucu herpes simplex 1 ve 2 virusu, cytomegalovirus ve parainfluenza 2 viruslarının 24 saatte; respiratorik sinsitial virusunun ise 48 saatte inaktive olduğunu saptamışlardır.

Geliş Tarihi : 3.4.1996.

1. S.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, KONYA

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

Bu araştırma ile sığırlarda özellikle önemli solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu olan IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis), PI-3 (Parainfluenza-3) ve BAV-2 (Bovine Adenovirus tip2) viruslarının titreleri üzerine, solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde sıkça kullanılan askorbik asidin etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Viruslar : Araştırmada, IBR virusunun Colorado, PI-3 virusunun SF4 ve BAV-2'in 11/66 suşları kullanıldı.

Hücre Kültürü : Virusların çoğaltılması, askorbik asidin sitotoksikite deneyi ve virusların titrasyonunda MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürü kullanıldı.

Askorbik Asit (AA) : İstenilen miktar L-askorbik asit (Merck) tartılarak Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) içinde sulandırıldı. Milipor filtreden geçirilerek, sterilite kontrolü yapıldı. Alüminyum folye ile sarılmış tüplere konularak, stok solüsyon halinde -20 °C'de saklandı. Kullanılacağı zaman bu stok solüsyon, EMEM ile sulandırılarak istenilen konsantrasyondaki AA dilüsyonları hazırlandı.

Askorbik Asit'in MDBK Hücre Kültüründeki Sitotoksitesinin Tespiti : Blakeslee ve ark. (1985)'lerinin kullandığı yöntemle göre yapıldı. MDBK hücreleri 10,20,40,80,160,320,640 µm/ml AA içeren Eagle MEM vasatı içinde 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edildi ve 24 gözlü pleytin, herbir AA sulandırması için iki gözüne olmak üzere 2'şer ml konuldu. Pleytler % 5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi ve belirli miktarlarda AA içeren vasatlar günlük olarak değiştirildi. Hücre kontrol olarak bırakılan gözlemlere ise AA içermeyen normal vasat ile hazırlanmış hücre süspansiyonu konuldu. Hücre kültürlerinde meydana gelen sitopatolojik etkiler (CPE) 5. günün sonunda doku kültürü mikroskopunda değerlendirildi.

Askorbik Asit'in Virusların Titresi Üzerine Etkisinin Tespiti : AA'nın IBR, PI-3 ve BAV-2 viruslarının titreleri üzerine etkisinin tespiti, üç ayrı uy-

gulama grubunda gerçekleştirildi :

I. grupta, araştırmada kullanılan sitotoksik etki göstermeyen değerlerden seçilen 10,80 ve 160 µg/ml oranında AA içeren vasatlar ile herbir virus için ayrı ayrı olarak log 10 tabanına göre virus sulandırılmaları hazırlandı. Bu sulandırılmaların 0.1 ml'si ile hücre süspansiyonunun (3×10^5 hücre/ml) 0.05 ml'si 96 gözlü pleytlerin dörder gözüne aynı anda konuldu ve AA içeren vasatlar günlük olarak yenilenerek 5. günün sonunda CPE yönünden incelendi.

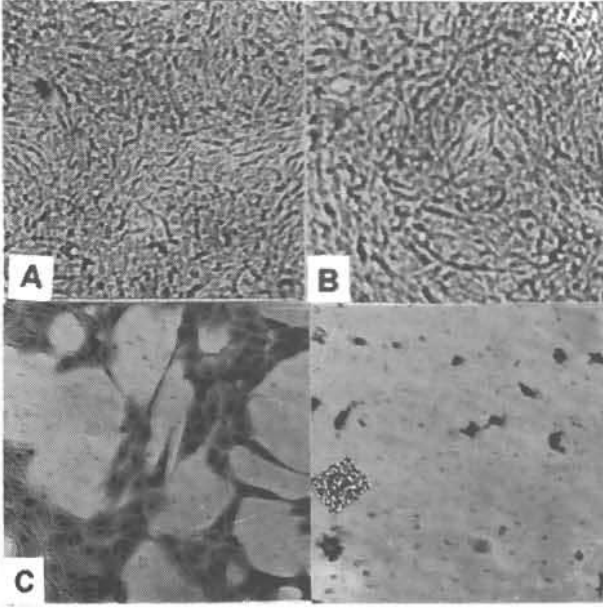
II. grupta, 0.1 ml 10,80 ve 160 µg/ml AA içeren solüsyonun herbiri dörder göze olmak üzere 0,05 ml hücre süspansiyonu ile birlikte konuldu. 24 saat sonra gözlerdeki vasatlar dökülerek yerine AA solüsyonunun herbiri ile log 10 tabanına göre sulandırılmış virus solüsyonlarından 0.1'er ml ilave edildi. Böylece hücreler, herhangi bir rezistansın söz konusu olup olmadığını tespit etmek için, virusların titrasyonu yapılmadan 24 saat önce AA solüsyonları ile karşılaştırılmış oldu. Daha sonra AA içeren vasatlar günlük olarak değiştirilerek 5. günün sonunda sonuçlar değerlendirildi.

III. grupta ise, kullanılan AA sulandırılmalarının viruslar üzerine direkt bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla, viruslar ayrı ayrı AA solüsyonu içeren vasatlarla 10^{-1} oranında sulandırılarak 24 saat 37°C'de bekletildikten sonra titrasyonları yapıldı. Kontrol olarak A.A. içermeyen vasat ile 10^{-1} oranında sulandırılmış sat virus da 37°C'de bekletilerek titrasyonu gerçekleştirildi.

Ayrıca bütün bu üç grubun kontrolü amacıyla herbir virusun normal titrasyonları yapıldı.

Bulgular

Askorbik Asit'in Sitotoksitesisi : Araştırmada 10,20,40,80 ve 160 µg/ml oranında AA içeren hücre üretme vasatının MDBK hücreleri için herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ancak 320 µg/ml oranında AA içeren hücre üretme vasatının hücreler için hafif, 640 µg/ml oranında AA içeren vasatın ise şiddetli bir sitotoksikiteye neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. AA'nın MDBK hücre kültüründeki sitotoksitesi.

A. MDBK hücre kültürü kontrol.

B. 160 µg/ml oranında AA içeren vasatın MDBK hücre kültüründe meydana getirdiği sitotoksite

C. 320 µg/ml oranında AA içeren vasatın MDBK hücre kültüründe meydana getirdiği sitotoksite

D. 640 µg/ml oranında AA içeren vasatın MDBK hücre kültüründe meydana getirdiği sitotoksite

Askorbik Asit'in Virusların Titresi Üzerine Etkisi : Araştırmada kullanılan virusların titreleri üzerine farklı AA oran ve uygulamalarının etkileri Tablo I'de belirtilmiştir.

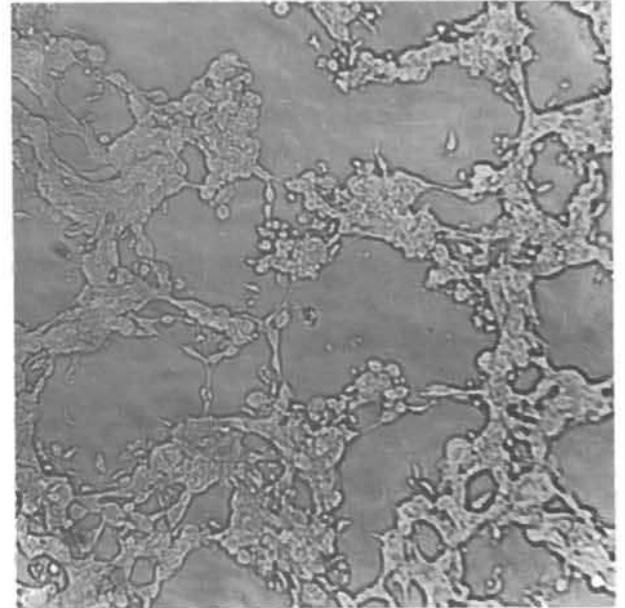
Tablo I. Farklı AA oran ve uygulamalarının virus titreleri (\log_{10} DKID₅₀/0.1 ml) üzerine etkileri.

GRUP	AA Miktarı µg/ml	IBR	PI-3	BAV-2
NVT*	0	10 ^{5.5}	10 ^{5.5}	10 ^{4.75}
	10	10 ^{5.25}	10 ^{5.5}	10 ^{4.75}
I	80	10 ^{5.5}	10 ^{5.5}	10 ^{4.5}
	160	10 ⁵	10 ^{5.5}	10 ⁴
	10	10 ^{4.5}	10 ⁵	10 ^{4.5}
II	80	10 ^{5.5}	10 ⁵	10 ^{4.25}
	160	10 ^{4.5}	10 ^{5.25}	10 ^{4.25}
	0	10 ^{4.25}	10 ^{4.5}	10 ³
	10	10 ⁴	10 ^{3.75}	10 ³
III	80	10 ^{3.75}	10 ^{3.75}	10 ³
	160	10 ⁴	10 ⁴	10 ^{2.75}

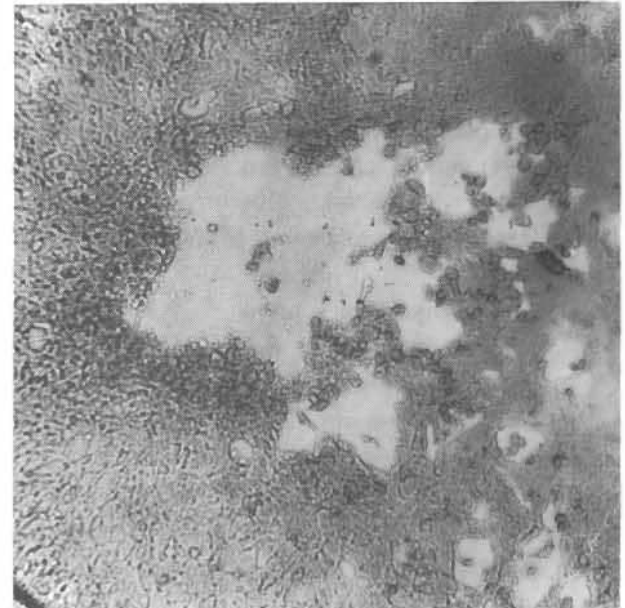
*Normal Virus Titrasyonu

Araştırmada MDBK hücresi için toksik olmayan üç farklı AA sulandırmasının IBR, PI-3 ve BAV-2 viruslarının titrasyonu üzerine dikkate değer

bir etki meydana getirmediği tespit edilmiştir. Titrasyon değerlerinde meydana gelen küçük farklılıklar önemli görülmemiştir. Ancak her üç virusun titrasyonu, CPE gözlenen en son sulandırmalara ait gözlerde meydana gelen CPE karakteri yönünden karşılaştırıldığında normal virus titrasyonu (Kontrol) ve I. grup virus titrasyonunda meydana gelen CPE'ler 5. günün sonunda oldukça yaygın olmasına rağmen, aynı günlerde II. grup virus titrasyonunda CPE'lerin sınırlı kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. PI-3 virusunun NVT ile II. grup virus titrasyonunun karşılaştırılması. A. PI-3 virusunun NVT'de MDBK hücresinde 5 gün sonunda meydana getirdiği yaygın CPE.



B. PI-3 virusunun II. grup 160 µg/ml AA içeren vasal ile yapılan titrasyonundaki 10⁵ sulandırmaya gözlenenden bir lanesinde meydana gelen sınırlı CPE.

Tartışma ve Sonuç

Askorbik asit hücre kültürü şartlarında genellikle dayanıksız bir madde olup, yan yaşamları kültür ısılarında (37°C'de) oldukça kısadır (Bissel ve ark., 1980; Harakeh ve ark., 1990). Bu nedenle, araştırma esnasında kullanılan çeşitli konsantrasyonlarda AA içeren vasatlar günlük olarak değiştirilerek hücre kültürü ortamında AA'in devamlılığı sağlanmıştır.

AA'in hücre için zararlı etkisi, AA'in hücre sel oksidasyonu sonucu şekillenen hidrojen peroksidin çeşitli hücre tiplerine karşı sitotoksitesinden kaynaklanmaktadır (Bissel ve ark. 1980). AA'in hücreler üzerine sitotoksitesinin tespiti amacıyla Harakeh ve ark. (1990) tarafından H9/HTLV -IIIB hücreleri (AIDS Virüsü ile enfekte T-lenfositik H9 hücreleri) üzerine 0-400 µg/ml oranında değişen AA konsantrasyonlarının 4 günlük periyod içerisinde etkileri incelenmiş olup, ortamda 5-150 µg/ml AA varlığında toksisite görülmediği, 200-300 µg/ml AA varlığında hücre gelişiminde hafif bir inhibisyonun şekillendiği, 400 µg/ml ve daha fazla miktardaki AA varlığında ise önemli bir sitotoksite gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada da MDBK hücreleri üzerine 320 µg/ml ve daha fazla AA içeren vasatın sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Schwerdt ve Schwerdt (1975)'in yaptıkları çalışmada, ekstraselüler rhinovirus partiküllerinin AA tarafından inaktive olmamasına rağmen, bu virüsün hücredeki replikasyonunun AA varlığında baskılandığı bildirilmiştir. Araştırmada da, III. grup uygulamada AA solüsyonu ile hücreler ortamda karşılaştırılan IBR, PI-3 ve BAV-2 viruslarının titrelerinde herhangi bir önemli değişiklik meydana gelmemesine rağmen, II. grup uygulamada sınırlı bir CPE gözlemlenmiştir. İleride yapılacak olan çalışmalarda, hücrelerin AA ile önceden karşılaştırılmaları sonucu CPE odaklarının sınırlı kalıp kalmadığının daha iyi anlaşılabilmesi için plak test kullanılarak plak sayısında gerçekten azalma olup olmadığının tespitinin yapılması uygun olacaktır.

Schwerdt ve Schwerdt (1975), AA ve glutathione kanşımının, RV20 (Rhinovirus tip 20)'nin gelişiminin ilk siklusu esnasında 36°C'de WI-38

hücrelerinde çoğalmasına zıt bir etki yapmadığı, ancak virus replikasyonunun takip eden siklusları esnasında glutathione ilave edilen AA'in 48 saatte kısmi bir baskılanmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu baskılanmanın muhtemelen interferon tarafından meydana getirildiği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada interferon tespiti yapılmadığından dolayı, II. grup titrasyonunun CPE meydana gelen en son sulandırılmalarda oluşan sınırlı CPE'lerin interferondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı saptanamamıştır. Harakeh ve Jariwalla (1991) tarafından yapılan bir çalışmada ise HIV ile akut olarak enfekte VB hücrelerinde askorbik asitin (0.568 mmol/L) sinsitial dev hücreleri oluşumunu %93 oranında azalttığı saptanmış, buna karşın virus süspanسیونunun 37°C'de 1 saat AA'e maruz kalması sonucu HIV virüsünün reverse transcriptase aktivitesi ve sinsitial dev hücreleri oluşturma kapasitesinde bir değişiklik meydana gelmediği gözlemlenmiştir. Aynı araştırmacılar (Harakeh ve Jariwalla, 1991) ortamda ascorbate'in olmaması durumunda virus replikasyonu yeniden başladığından dolayı HIV'in baskılanması için ortamda ascorbate'in devamlı bulunmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Salo ve Cliver (1978) AA ve sodyum bisüfit tarafından enterovirusların inaktivasyon oranını çeşitli faktörlerin etkilediğini bildirmişlerdir. Ortamda serum bulunmasının inaktivasyon oranını azalttığını, ısının bu oranı artırdığını belirterek AA ve bisüfit solüsyonlarının pH değerinin poliovirus tip 1 (Po-1)'in inaktivasyon oranını etkilediğini, inaktivasyonun pH 5'de pH 7'dekinden daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bu etkinin birinci derecede hidrojen iyonu konsantrasyonundaki artışa bağlı olmadığı, çünkü AA ve bisüfit'in ortamda bulunmaması durumunda Po-1'in inaktivasyon oranının pH 4-7 arasında aynı olduğu belirtilmiştir. Ancak Vrijsen ve ark. (1988) tarafından antioksidant ascorbate varlığı ve yokluğunda quercetin'in antipoliovirus aktivitesini tespit etmek için yapılan başka bir çalışmada ise 3 mM gibi yüksek bir konsantrasyonda bile ascorbate'in tek başına herhangi bir antiviral aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde White ve ark. (1986) tarafından da HSV-1 (Herpes simplex virus tip 1) ve HSV-2 (Herpes simplex virus tip 2)'nin Cu⁺² ile katalize edilen ascorbate ile inak-

tive olduğunu buna rağmen sadece ascorbate ile muamele edilen bu virusların titrelerinde, kontrollerle karşılaştırıldığında bir etki gözlenmediği ifade edilmiştir.

Murata ve Kitagawa (1973) AA'in fajlar üzerine inaktivasyon etkisinin oksijene bağlı olduğunu ve A.A.'in otooksidasyonu sonucu şekillenen serbest radikallerin bu olaydan sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bissel ve ark. (1980) AA'in etki mekanizması hakkında üç ihtimal öne sürmüşlerdir: Birincisi; AA primer ve sekonder enfeksiyonları azaltmak için virüsü direkt olarak inaktive edebilir. Bu araştırmada kullanılan AA dilüsyonlarının IBR, PI-3 ve BAV-2 viruslarına karşı bu tür bir inaktivasyonu şekillenmemiştir.

İkincisi; hücrelerin AA ile önceden muamele edilmeleri bilinmeyen bir mekanizma ile (Örneğin kollajen sentezinin artması ile bir "koruyucu matrix" şekillenebilir ve enfeksiyonları önleyebilir) viral enfeksiyonların karşı rezistans kazanmalarına neden olabilir.

Üçüncüsü ise AA hücre metabolizmasını değiştirerek ve viral komponentlerin biraraya gelmeleri ile virus salınımı esnasındaki bazı basamakları engelleyerek, viral replikasyonu ve enfektiviteyi önleyebilir. Bu araştırmada MDBK hücrelerinin, virus titrasyonları yapılmadan 24 saat önce AA ile karşılaştırıldığı grupta meydana gelen hafif inhibisyon, yukarıda bahsedilen son iki ihtimalden birine atfedilebilir.

Harakeh ve ark. (1990) ise, ascorbate tarafından lenfositlerdeki HIV'in baskılanmasındaki moleküler mekanizmanın tam olarak açıklanamadığını, bunun sebebini enfekte lenfosit hücreleri üzerine ascorbate'in etkisinin muhtemel mekanizması olarak serbest integre olmamış viral DNA ya da HIV'in her bir replikasyon siklusu esnasında yeni sentezlenen viral RNA'ların, viral protein sentezinin azalması ile sonuçlanan yıkıma hassas hale gelmelerine; diğer bir mekanizma olarak da proteinin işlenmesinde görev alan viral enzimlerin ascorbate tarafından engellenmesiyle HIV'in çoğalmasının baskılanmasına bağlamışlardır.

Bissel ve ark. (1980), yüksek kon-

santrasyondaki A.A.'in, kromozom hasarları ve muhtemel karsinojenlerin miktarlarındaki artış gibi istenilmeyen yan etkilerinin vurgulanması gerektiğini, AA'in şaşılacak derecede çok yönlü mekanizma ya da mekanizmalar hakkında araştırılacak çok şey olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak IBR, PI-3 ve BAV-2 viruslarının titreleri üzerine AA'in invitro ortamda belirgin bir etkisinin gözlenmediği tespit edilmiş, ancak çeşitli mekanizmaların rol oynadığı invivo ortamda AA'in bu virusların enfeksiyözite güçleri üzerine herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı konusunda araştırmalara ihtiyaç olduğu ortaya konmuştur.

Kaynaklar

Bissell, M.J., Hatie, C., Farson, D.A., Schwarrz, R.I. and Soo, W. J (1980). Ascorbic acid inhibits replication and infectivity of avian RNA tumor virus. Proc. Natl. Acad. Sci., 77,5,2711-2715.

Blakeslee, J.R., Yamamoto, N., and Hinuma, Y. (1985). Human T-cell leukemia virus I induction by 5-iodo-2'-deoxyuridine and N-methyl-N2-nitro-N-nitrosoguanidine: Inhibition by retinoids, L-ascorbic acid and DL-&-tocopherol, Cancer Research, 45,3471-3476.

Harakeh, S., Jariwalla, R.J. and Pauling, L. (1990). Suppression of human immunodeficiency virus replication by ascorbate in chronically and acutely infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 87,8,7245-7249.

Harakeh, S. and Jariwalla, R.J. (1991). Comparative study of the anti-HIV activities of ascorbate and thiol-containing reducing agents in chronically HIV-infected cells, Am. J. Clin. Nutr., 54, 6, 1231-1235.

Murata, A., Kitagawa, K., Inmaru, H. and Saruno, R. (1972a). Inactivation of bacteriophages by thiol reducing agents, Agr. Biol. Chem., 36,6,1065-1067.

Murata, A., Kitagawa, K., Inmaru, H. and Saruno, R. (1972b). Inactivation of single-stranded DNA and RNA phages by ascorbic acids and thiol reducing agents, Agr. Biol. Chem., 36,13,2597-2599.

Murata, A. and Kitagawa, K. (1973). Mechanism of inactivation bacteriophage J 1 by ascorbic acid, Agric. Biol. Chem., 37, 1145-1151.

Pauling, L. (1974). Are Recommended Daily Allowances for Vitamin C Adequate?, Proc. Nat. Acad. Sci., 71,11,4442-4446.

Preobranzhenskaya, M.N., Bukhman, V.M., Korolev, A.M. and Efimov, S.A. (1993). Ascorbigen and other in-

dole-derived compounds from brassica vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents, *Pharmac. Ther.*, 60, 301-313.

Salo, R.J. and Cliver, D.O. (1978). Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36,1,68-75.

Schwerdt, P.R. and Schwerdt, C.E. (1975). Effect of ascorbic acid on rhinovirus replication in WI-38 cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148,1237-1243.

Şanlı, Y. ve Kaya, S. (1994). Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri, Medisan Yayınevi, II. baskı, Ankara, 535-537.

Tang, A.M., Graham, N.M.H., Kirby, A.J., McCall, L.D., Willet, W. C. and Saah, A.J. (1993). Dietary micronutrient intake and risk of progression to acquired im-

munodeficiency syndrom (AIDS) in human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-infected homosexual men, *Am. J. Epidemiol.*, 138,11,937-951.

Walker, G.H., Bynoe, M.L. and Tyrrell, D.A. (1967). Trial of ascorbic acid in prevention of colds, *Br. Med. J.*, 1,540,603-606.

White, L., Freeman, C.Y., Forrester, B.D. and Chappell, W.A. (1986). Invitro effect of ascorbic acid on infectivity of herpesviruses and paramyxoviruses, *J. Clin. Microbiol.*,24, 4, 527-531.

Wilson, C.W.M. and Loh, H. S. (1973). Common cold and vitamin C, *Lancet*, 1, 638-641.

Wrijsen, R., Everaert, L. and Boeye, A. (1988). Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate, *J. Gen. Virol.*, 69, 7, 1749-1751.