



Buzağılarda İmmunomodülatör Zylexis'in Kan Glutatyon, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Toplam ve Lipit Bağlı Sialik Asit Seviyelerine Etkileri

Asım KART¹, Erdoğan UZLU², Mahmut KARAPEHLİVAN³, Metin ÖĞÜN³, Oğuz MERHAN³

1. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KARS.

2. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, KARS.

3. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KARS.

ÖZET: Zylexis inaktif paropoxvirus ovis içeren non spesifik paraimmun aktivatörü olup son yıllarda çeşitli infeksiyöz hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri ve sialik asitler yangı ve bağışıklığın regülasyonunda önemli rollere sahip mediatörlerdir. Bu çalışmada Zylexis uygulamasının buzağılarda kan glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), toplam ve lipit bağlı sialik asit (TSA, LSA) seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 12 adet 6-8 aylık Montafon ırkı buzağıdan başlangıçta (0. gün) kan örnekleri alındıktan sonra 1, 3 ve 5 günlerde intramusküler olarak 2 ml Zylexis uygulandı. Son uygulamadan sonraki 1, 3 ve 5. günlerde kan örnekleri alınarak biyokimyasal analizler yapıldı. İlaç uygulamasından önceki örneklerle (0. gün) karşılaştırıldığında Zylexis uygulaması ile buzağılarda kan MDA düzeyi 1 ve 3. günlerde yükselirken, GSH seviyelerinin 1, 3 ve 5. günlerde düştüğü tespit edildi. NO düzeylerinin tüm günlerde anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edildi. Total sialik asit seviyeleri 1. günde azalırken 3 ve 5. günlerde Zylexis uygulaması öncesine göre bir fark bulunamadı. Buna karşın, lipit bağlı sialik asit seviyesi 1 ve 3. günlerde değişmezken 5. günde yükseldiği gözlemlendi. Sonuç olarak, Zylexis'in oksidatif stres ile ilgili kan parametrelerinde MDA'da yükselişe yol açarak lipit peroksidasyonuna ve GSH seviyesinde düşüşe yol açarak antioksidan seviyesinde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, nitrik oksit ve sialik asit düzeylerinde değişiklikler tespit edilmiş olup, bu değişimlerin Zylexis'in immun cevap üzerindeki etkileri ile olan bağlantılarının daha detaylı çalışmalar ile ortaya konabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler: Zylexis, Glutatyon, Nitrik oksit, Sialik asit, malondialdehit

Effect of Immunomodulator Zylexis on Blood Glutathione, Malondialdehyde, Nitric Oxide, Total and Lipid Bound Sialic Acids Levels in Calves

ABSTRACT: Zylexis is a paraimmunity activator containing inactive *paropoxvirus ovis* which has been utilised as a protective against variety of infectious diseases. Nitric oxide (NO), reactive oxygen species and sialic acids are mediators playing important roles in inflammation and the regulation of immune response. In this study, effects of Zylexis administration on blood glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total and lipid-bound sialic acid (TSA, LSA) levels were investigated in calves. For this purpose, 12 Brown Swiss breed calves at 6-8 months of age were used. Prior to the drug administration (on day 0), blood samples were collected, and then Zylexis (2 ml) was applied intramuscularly to the each calve on days 1, 3 and 5. Blood samples were also collected on days 1, 3 and 5 for biochemical analysis. In comparison to day zero samples, Zylexis increased the blood MDA levels on days 1 and 3, while GSH level was decreased on days 1, 3 and 5. NO concentration was significantly increased following Zylexis treatment on all days as compared to those of day zero samples. TSA levels decreased on day 1, while no difference was found on day 3 and 5, as compared to day zero. Moreover, LSA levels remained unchanged on days 1 and 3, while there was an increase on day 5 following Zylexis treatment. In conclusion, Zylexis could alter oxidative stress parameters leading to lipid peroxidation by increasing MDA and reduction of antioxidant status by decreasing GSH levels. Moreover, NO and sialic acid levels in the blood were also changed after drug administration. Considering the possible relationships with immune response, alterations in these parameters require further investigations.

Key words: Zylexis, glutathione, malondialdehyde, nitric oxide, sialic acid

✍ Sorumlu yazar / Corresponding author;

☎ 0 474 212 68 00,

✉ asimkart@hotmail.com

GİRİŞ

İmmunomodülatörler bağışıklık sistemini etkileyerek bu sistem üzerinde uyarıcı veya baskılayıcı etki gösteren veya immün sistem üzerinde regüle edici özelliklere sahip maddelerdir (Blecha, 1988). Pratikte immunomodülatörler immün sistemi uyarıcı immünstimulan terimi ile eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde non spesifik immünomodülatörler başta kanser tedavisi olmak üzere değişik hastalıklara karşı koruyucu ve sağaltım amacıyla kullanılan farklı orijinden bileşikler olup mikrobiyal, sentetik ve endojen kaynaklı olabilir (Blecha, 1988; Gökçe ve ark., 1997). Zylexis inaktive paropoxvirus ovis (iPPVO) içeren mikrobiyal kaynaklı nonspesifik immünomodülatör olup özellikle enfeksiyöz viral hastalıklara karşı doğal bağışıklığı (non-spesifik, innate bağışıklık) stimüle eden güçlü bir immünostimulandır. iPPVO, farelerde herpes simplex ve hepatitis B virusuna karşı sitokin (IFN-g, IL-12p40, IL-18 and TNF-a) indüksiyonunu aktive ederek bu virüslere karşı duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir (Weber ve ark., 2003). Ayrıca insan immün hücrelerinde T hücreleri ve NK hücrelerinden proinflamator ve antiinflamator sitokin salınımı üzerine etkili olduğu dolayısı ile immünostimulan etkileri yanında inflamasyon ve immün cevap üzerinde regülatör olarak da etkili olduğu rapor edilmiştir (Friebe ve ark., 2004). *In vitro* deneylerde, iPPVO canine fagosit hücrelerini aktive ederek monosit ve nötrofillerin *Listeria monocytogenes*'e karşı fagositoz oranını ve canine fagositik hücrelerde (nötrofil ve monositlerinde) oksidatif patlama olarak bilinen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (Schutze ve ark., 2009). Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROT) yangı ve bağışıklığın regülasyonunda anahtar role sahiptir. Nitrik oksitin immün sistem üzerindeki etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulamamış ise de yapılan çalışmalarda lenfosit, eosinofil, monosit ve diğer hücrelerde bir çok sitokin tipinin ekspresyonunu inhibe ettiği ve lenfosit

çoğalmasında rol aldığı bildirilmiştir (Guzik ve ark., 2003). NO ve ROT' a ek olarak, sialik asitler hücre yüzeyindeki glikolipit ve glikoproteinlerin glikan zincirlerine bağlı olarak bulunan asidik monosakkaritlerdir (Varki ve Varki, 2007). Bu yapıların fizyolojik ve patolojik olayların yanısıra immün cevabın regülasyonunda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında enfeksiyöz hastalıklara yol açan mikropların hücreye bağlanmasında, immün hücrelerin aktivasyonunda, hücreler arası haberleşmede ve hücre tanımlanmasında rol aldığı bildirilmektedir (Varki, 2008).

Bu çalışmada, inaktive paropoxvirus ovis içeren mikrobiyal kökenli immün stimulatör Zylexis'in buzağılara uygulanmasını takiben farklı günlerde alınan kan örneklerinde lipit peroksidasyonu, total ve lipit bağlı sialik asit düzeyleri, GSH ve nitrik oksit konsantrasyonlarındaki değişiklikler araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada 12 adet 6-8 aylık Montafon türü buzağı hayvan materyali olarak kullanıldı. Uygulama öncesi (0. gün) tüm buzağılardan kan örnekleri antikoagülsüz standart boş tüplerde toplandı. Daha sonra inaktive paropoxvirus ovis D1701 suşu içeren Zylexis (Pfizer, İstanbul) 1, 3 ve 5. günlerde hayvan başına standart uygulama olan 2 ml sulandırılmış solüsyonu şeklinde uygulandı. Son uygulamayı takiben 1, 3 ve 5. günlerde yine kan örnekleri standart boş tüplere toplanarak oda ısısında 3000x g de 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Elde edilen serumlar -25 °C' de analiz edilene kadar saklandı. Serum TSA ve LSA düzeyleri sırasıyla (Sydow, 1985) ile (Katopodis ve Stock, 1980)'un bildirdiği metoda göre kolorimetrik olarak ölçüldü. Serum MDA konsantrasyonları ve tam kan GSH düzeyleri sırasıyla Yoshioika ve Kawada (1979) ile (Beutler ve ark., 1963) bildirdiği metotlara göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yine serum NO düzeyleri ise (Miranda ve

ark., 2001) metoduna göre mikroplayt okuyucuda tespit edildi. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS Windows 10.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir parametre, analysis of repeated measures metodu ile test edildikten sonra post-hoc testler (günler arası karşılaştırmalar, pairwise comparisons) Bonferoni düzeltmesi kullanılmış paired samples t-testi ile yapıldı.

BULGULAR

Buzağılardan alınan kan örneklerinde Zylexis uygulaması öncesi (0. gün) ve uygulamayı takiben 1, 3 ve 5. günlerde oluşan biyokimyasal değişimler Tablo 1 gösterilmiştir. Serum MDA konsantrasyonlarında

Zylexis uygulaması ile buzağılarda 1 ve 3. günlerde artış gözlenirken 5. günde alınan örneklerde ilaç uygulaması öncesine (0. gün) göre bir fark bulunamadı. Kan GSH seviyeleri 1, 3, ve 5. günlerde ilaç uygulaması öncesine göre anlamlı bir düşüş gösterdi bu düşüş 1. günde en yüksek seviyede tespit edilirken düşüş 3 ve 5. günlere doğru tedrici bir azalma gösterdi. Serum NO konsantrasyonları ilaç uygulamasını takiben 1, 3 ve 5. günlerde anlamlı bir şekilde yükseliş gösterdi. Bu yükseliş 1. günde en belirgin olarak saptandı. Total kan sialik asit seviyeleri 1. günde ilaç uygulaması öncesine göre azalırken 3 ve 5. günlerde bir fark bulunamadı. Fakat lipit bağlı sialik asit seviyesi 1 ve 3. günlerde değişmezken 5. günde yüksek olarak tespit edildi.

Tablo 1. Zylexis'in kan glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), toplam ve lipit bağlı sialik asit (TSA, LSA) seviyelerine etkileri.

Table 1. Effects of Zylexis on blood glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total and lipid bound sialic acids (TSA, LSA) levels.

Parametre	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün
MDA $\mu\text{mol/L}$	5.36 \pm 0.13 ^c	7.31 \pm 0.09 ^a	6.40 \pm 0.13 ^b	5.68 \pm 0.10 ^c
GSH mg/dL	70.11 \pm 0.61 ^a	51.64 \pm 0.63 ^d	62.62 \pm 1.35 ^c	65.31 \pm 0.73 ^{bc}
NO $\mu\text{mol/L}$	7.98 \pm 0.22 ^d	13.72 \pm 0.24 ^a	12.17 \pm 0.22 ^b	9.36 \pm 0.16 ^c
TSA mg/dL	48.68 \pm 1.05 ^a	41.45 \pm 1.81 ^b	45.41 \pm 1.67 ^{ac}	45.87 \pm 1.87 ^{ac}
LSA mg/dL	10.08 \pm 0.44 ^b	12.85 \pm 1.00 ^{ab}	14.13 \pm 1.44 ^{ab}	14.46 \pm 0.85 ^a

Aynı sıra içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır, (p<0.05).

Values with different letters within the same row indicates significant differences (p<0.05).

TARTIŞMA

Zylexis immun sistemi uyararak özellikle enfeksiyöz hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılan ve inaktive parapoxvirus ovis içeren mikrobiyolojik kökenli bir paraimmunité aktivatörüdür (Schutze ve ark., 2010). Nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerinin yangı ve immun cevap üzerinde farklı modüle edici etkileri bilinmektedir. NO bu sistem üzerinde başlıca hücresel proliferasyon ve büyüme üzerine etkili genlerin inhibisyonuna yol açmaktadır. Ayrıca NO, anti-apoptotik etkiye ve özellikle yardımcı

T hücrelerine (Th) ve sitokin salınımı üzerine ve dolayısı ile humoral ve alerjik cevap üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (Guzik ve ark., 2003). Çalışmamızda Zylexis uygulamasını takiben buzağılarda serum NO düzeyleri anlamlı bir şekilde yükseldiği bu yükselişin zaman ilerledikçe azaldığı tespit edilmiştir. Weber ve ark. (2003) iPPVO virüsünün oto regülatör bir biçimde sitokin üretimini indüklediği bu şekilde IL-2, IL-18 ve IFN- γ ekspresyonunu önce stimüle edip daha sonra

baskıladığını göstermişlerdir. Buna paralel olarak, yapılan çalışmalarda NO'nun Th1 hücre üremesini ve IL-2 ve IFN- γ üretimini baskıladığı rapor edilmiştir (Sternberg ve Mabbott, 1996). NO yanında, ROT özellikle fagositik hücrelerde (lökositler, monositler ve makrofajlar) fagositoz sırasında patojenlerin yok edilmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Oksidatif patlama olarak tabir edilen bu olay sırasında belli miktarda superoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üretilerek fagositoz ile alınan patojenler yok edilir. Üretilen ROT ayrıca yangı mediyatörlerinin, kemokin ve sitokinlerin salgılanmasında ve lenfosit aktivasyonunda da rol alır (Guzik ve ark., 2003). Çalışmamızda, Zylexis uygulaması ile buzağılarda kan MDA düzeyi yükselirken, GSH seviyelerinin düştüğü tespit edildi. MDA dokularda yüksek oranda oluşan ROT'a bağlı olarak lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan ve lipit peroksidasyonun ölçümünde kullanılan bir indikatördür (de Zwart ve ark., 1999). Zylexis verilen buzağılarda artan MDA seviyeleri üretilen yüksek miktarda ROT'a bağlı olarak oluşan lipit peroksidasyonunu göstermektedir. Benzer şekilde, Shutze ve ark. (2009; 2010) *in vitro* olarak iPPVO'nin canin lökositlerinde (nötrofil ve monositlerde) oksidatif patlamayı ve bu yolla fagositozu artırdığını göstermişlerdir. MDA seviyesindeki artış uygulanan paraimmunité aktivítöründeki antijene karşı akut yanıt şeklinde oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşüncesini paylaşmaktayız.. Bir kısım immun cevabın oluşumunda pro-oksidant salgılayan fagositik hücrelerin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Fagositik hücreler ve buna ek olarak B ve T lenfositler yapılarında NADPH oxidase gibi enzim kompleksleri içermekte olup bu enzim kompleksleri bağışıklık sisteminin uyarılmasını takiben ROT üretiminde görev alırlar. İmmun cevap oluşumun başlangıcında fagositlerde O₂ alımı artarak NADPH oxidase, NADP⁺ a yükseltgenir. Bu sırada 2 elektron salınarak, O₂, süperoksit radikaline çevrilir. Oluşan

süperoksit radikali aslında diğer bir dizi ROT üretimini tetikler. Bağışıklık hücrelerinin diğer güçlü pro-oksidanları, örneğin hidrojen peroksit, hipokloröz asit, peroksinitrit ve hidroksil iyonu salgıladıkları tespit edilmiştir (Carreras ve ark., 1994; Constantini ve Moller, 2009). Constantini ve Dell'Omo (2006) kanatlılarda yaptıkları bir çalışmada immun uyarının reaktif oksijen metabolitlerini artırdığını ve total antioksidan seviyede düşüşe yol açtığını rapor etmişlerdir. ROT üretiminin immun cevap üzerinde olumlu etkileri yanında yüksek miktarda oluşumu dokular ve bizzat immun hücreler üzerinde hasar verici etkiye de yol açabilir. Bu dengenin sağlanmasında antioksidan moleküllerin devreye girmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Victor ve ark., 2004; Constantini ve Moller, 2009). GSH antioksidan bir madde olup canlılar için ROT kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Bu yolla oluşan fazla miktarda ROT' nin eliminasyonu gerçekleştirilir (Wu ve ark., 2004). Çalışmamızda Zylexis uygulamasını takiben GSH seviyesindeki düşüş iPPVO kaynaklı ROT üretimine bağlı olarak oluşan oksidatif stresi dengelemek ve akut kullanıma bağlı olarak olmuş olabileceği düşüncesini paylaşmaktayız. Oksidatif strese bağlı olarak immun cevap sırasında GSH seviyesinde değişiklikler oluşabileceği bildirilmektedir (Perricone ve ark., 2009). Çalışmamıza paralel şekilde, Abu-El-Saad ve Abdel-Moneim (2005) iPPVO verilen farelerden elde edilen makrofajlarda IL-10 miktarını artırırken antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz enziminin aktivitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, total kan sialik asit seviyeleri 1. günde azalırken 3 ve 5. günlerde Zylexis uygulaması öncesine göre bir fark bulunamadı. Diğer taraftan, lipit bağlı sialik asit seviyesi 1 ve 3. günlerde değişmezken 5. günde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi. Sialik asitler hücre yüzeyinde bulunan glikan molekülünün terminal pozisyonunda yer alan 9-karbonlu asidik monosakkaritlerdir (Severi

ve ark., 2007). Sialik asitler birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda, örneğin patojenik mikroorganizmaların bağlanması, immun sistemin regülasyonunda, malignan kanserlerin ilerlemesi ve yayılmasında rol aldığı bildirilmektedir. Sialik asitler, immun sistem içinde lökositler, plateletler ve endotelyum tarafından açığa çıkarılan selektin reseptörleri için ligant görevi görerek patojenlerin tanınmasında ve doğal bağışıklığın oluşumunda önemli görevler alır (Varki ve Varki, 2007; Shauer, 2009). Sialik asitlerin ekspresyonu immun cevap oluşumunun değişik safhalarında farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin B hücrelerinin gelişimi sırasında şeker molekülüne α 2-6 bağlı sialik asitlerin ekspresyonunun arttığı buna karşın genelde immun hücrelerin aktivasyonu sırasında hücre yüzeyindeki sialik asitlerin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Varki, 2008).

Sonuç olarak, uygulamayı takiben iPPVO içeren paraimmunité aktivatörü Zylexis oksidatif stress ile ilgili bazı kan parametrelerinde, nitrik oksit ve sialik asit düzeylerinde değişikliklere yol açtığı bu değişikliklerin Zylexis'in immun cevap üzerinde bildirilen etkileri ile olan bağlantılarının daha detaylı çalışmalar ile ortaya konabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-El-Saad A.A., Abdel-Moneim A.S., 2005. Modulation of macrophage functions by sheeppox virus provides clues to understand interaction of the virus with host immune system. *Virol J.*, 2, 22.
- Beutler E., Duron O., Kelly B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.*, 61, 882-888.
- Blecha F., 1988. Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *J Anim Sci.*, 66, 2084-2090.
- Carreras M.C., Pargament G.A., Catz S.D., Poderoso J.J., Boveris A., 1994. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.*, 341, 65-68.
- Constantini D., Moller A.P., 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp Biochem Physiol A.*, 153, 339-344.
- Constantini D., Dell'Omo G., 2006. Effects of T-cell mediated immune response on avian oxidative stress. *Comp Biochem Physiol A.*, 145, 137-142.
- de Zwart L.L., Meerman J.H., Commandeur J.N., Vermeulen N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.*, 26, 202-226.
- Friebe A., Siegling A., Friederichs S., Volk H.D., Weber O., 2004. Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol.*, 78, 9400-9411.
- Gökçe G., Irmak K., Sural E., Uzlu E., 1997. Koyun çiçeğinde immunomodülatörlerin sağaltıcı ve koruyucu etkileri üzerine klinik gözlemler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 3, 217-221.
- Guzik T.J., Korbust R., Adamek-Guzik T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.*, 54, 469-487.
- Katopodis N., Stock C.C., 1980. Improved method to determine lipid bound sialic acid in plasma or serum. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*, 30, 171-180.
- Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.*, 5, 62-71.
- Perricone C., De Carolis C., Perricone R., 2009. Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev.*, 8, 697-701.
- Schutze N., Raue R., Buttner M., Alber G., 2009. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol.*, 137, 260-267.
- Schutze N., Raue R., Buttner M., Kohler G., McInnes C.J., Alber G., 2010. Specific antibodies induced

- by inactivated parapoxvirus ovis potently enhance oxidative burst in canine blood polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Microbiol.*, 140, 81-91.
- Severi E., Hood D.W., Thomas G.H., 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology.*, 153, 2817-2822.
- Sternberg M.J., Mabbott N.A., 1996. Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon-gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase. *Eur J Immunol.*, 26, 539-543.
- Sydow G., 1985. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochim Acta.*, 44, 1721-1723.
- Varki A., 2008. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 14, 351-360.
- Varki N.M., Varki A., 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.*, 87, 851-857.
- Victor M.V., Rocha M., De la Fuente M., 2004. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol.*, 4, 327-347.
- Weber O., Siegling A., Friebe A., Limmer A., Schlapp T., Knolle P., Mercer A., Schaller H., Volk H.D., 2003. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol.*, 84, 1843-1852.
- Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.*, 134, 489-492.
- Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M., 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 135, 372-376.