



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2017; 31 (1): 01 - 04
<http://www.fusabil.org>

Tüberkülozislı Sığırlarda Antioksidan Parametrelerdeki Değişimler

Ömer KIZIL¹
Yunus KELTEK²

¹ Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Refahiye İlçe Gıda Tarım
ve Hayvancılık Müdürlüğü,
Erzincan, TÜRKİYE

Bu çalışma, tüberkülozislı sığırlarda antioksidan parametrelerdeki değişimi belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 15 tüberkülozislı ve 15 sağlıklı inekten oluşan toplam 30 adet inek kullanılmıştır. Tüberkülozisin teşhisinde deri içi purifiye protein derivatı (PPD) mamalian tüberkülin testi kullanılmıştır. Tüm hayvanların *V. jugularis*'lerinden kan örnekleri alınmış ve en kısa sürede analizleri yaptırılmıştır. Gruplar arasında malondialdehid (MDA), glutatyon peroksidaz (GSHPx), glutatyon (GSH), vitamin E ve vitamin C bakımından istatistiksel önem saptanmasına rağmen, katalaz ve vitamin A yönünden herhangi bir önem saptanmamıştır. Sonuç olarak tüberkülozislı sığırlarda lipid peroksidasyon ve antioksidan parametrelerde önemli değişimler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, lipid peroksidasyon, sığır, tüberkülozis

Changes in Antioxidant Parameters in Cattle with Tuberculosis

The study was conducted to detect the changes in antioxidant parameters in cattle with tuberculosis. The study was carried out on 30 cattle consisting of 15 cattle with tuberculosis and 15 healthy cattle. Intradermal purified protein derivative (PPD) mamalian tuberculin test was used for diagnosis of tuberculosis. Blood samples were taken from the jugular vein of the animals and analyzed as soon as possible. Although significant differences were determined in malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSHPx), glutathione (GSH), vitamin E and vitamin C levels between the groups, the significant changes were not determined in the catalase and vitamin A levels. In conclusion, important changes were determined in the lipid peroxidation and antioxidant parameters in the cattle with tuberculosis.

Key Words: Antioxidant, lipid peroxidation, cattle, tuberculosis

Giriş

Sığır tüberkülozu, gram (+) bir bakteri olan *Mycobacterium bovis*'in neden olduğu, zoonoz özellikte ve kronik seyirli bir hastalıktır (1). Sığırların yanı sıra diğer evcil hayvanları ve bir takım vahşi hayvanları da etkileyebilir. Hastalığın zoonoz özelliğinin yanı sıra, kronik ve yıkımlayıcı özelliğinden dolayı sebep olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle birçok ülkede hastalığa karşı eradikasyon programları uygulanmaktadır (2). Hastalık her ne kadar kronik zayıflatıcı bir hastalık olarak bilinse de, bazen progresif tabiatta da gelişebilir (3). Hastalık genel olarak tüberkülin olarak adlandırılan nodüler granülomların oluşumuyla karakterizedir. Bu granülomlar sarımsı renkte kazeöz veya kalsinöz karakterdedir. Lezyonlar sıklıkla kapsülle çevrilidir (4).

Semptomların ortaya çıkması aylar alabilir veya yıllarca gizli kalabilir veyahut da yaşlılık ve stresle alakalı olarak reaktif olabilir. Hastalık semptomları ilerlemeden önce sadece klinik olarak hastalığın saptanması pek mümkün değildir (4). Sığır tüberkülozunun kontrolünde en etkili strateji enfekte hayvanların belirlenmesi ve hemen sürüden çıkartılmasıdır. Bu bakımdan sığırlarda hastalığın teşhisinde çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu testlerden deri içi tüberkülin testi ülkemiz dahil birçok ülkede saha şartlarında tüberkülozun teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5). *Mycobacterium bovis* AN5 kültüründen hazırlanan purifiye protein derivatı (PPD) ülkemiz dahil birçok ülkede tüberkülin testi amacıyla kullanılmaktadır. Bu suş 1948 yılında İngiltere'deki saha suşundan izole edilmiştir (6).

Serbest radikal terimi, yapısında en az bir tane eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya molekülleri tanımlamada kullanılan genel bir terimdir (7). Aslında çoğu güçlü toksik etkili olan serbest radikaller normal metabolik faaliyetler sırasında üretilmekte ve bu radikallerin bazı fizyolojik olaylarda yararlı etkileri bulunmaktadır (8, 9). Organizma oksidanlara karşı etkili olan bazı savunma sistemlerine de sahiptir. Bu sistemde başlıca antioksidan enzimler ve zincir kıran antioksidanlar yer almaktadır. Katalaz, glutatyon peroksidaz, yağda çözünen vitamin E ve suda çözünen vitamin C bu sistemden önemli elemanlarındandır (7, 8, 10). Oksidatif stresin gelişip gelişmediğinin belirlenmesinde lipid peroksidasyonun (malondialdehid, MDA) belirlenmesi en yaygın kullanılan yöntemdir (11).

Geliş Tarihi : 15.06.2016
Kabul Tarihi : 01.07.2016

Yazışma Adresi Correspondence

Ömer KIZIL
Firat Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi,
İç Hastalıkları Anabilim
Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

omerkizil@yahoo.com

Beşeri hekimlikte tüberkülozisli hastalarda serbest radikaller ve antioksidanlar konularında çeşitli çalışmalara rastlanılmasına rağmen (12-14), veteriner hekimliği sahasında özellikle de hastalığın önemli derecede kayıplara neden olduğu sığırlar üzerinde bu tip bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle, mevcut araştırmada ülkemizde de saptanan sığır tüberkülozunda antioksidan parametrelerdeki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Erzincan yöresinde bulunan Türkvet Kayıt Sistemine kayıtlı işletmelerden sağlanan ve deri içi PPD mammalian tüberkülin testine pozitif yanıt veren 15 adet tüberkülozisli inek ile aynı teste negatif yanıt veren 15 inekten oluşan, çeşitli yaş gruplarındaki (4–7 yaş) toplam 30 adet inek üzerinde yürütülmüştür.

PPD tüberkülin testinde, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen *Mycobacterium bovis*'in üreme ve lizis ürünlerinin ısı ile işlem görmesi ile elde edilen ve aynı türden mikroorganizmalara karşı duyarlı hale getirilen bir hayvanda gecikmiş tip hipersensitivite oluşturma yeteneğine sahip 3 mL'lik Etlik Bovine Tüberkülin PPD preparatı kullanılmıştır. Bu amaçla boynun orta üçte birlik kısmı elin baş ve işaret parmağı arasında bir deri kıvrımı yapılarak kompas ile ölçülüp kaydedilmiş ve PPD Tüberkülin intradermal olarak 0.1 mL dozunda bu bölgeye enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 72 saat (± 4 saat) sonra her bir enjeksiyon bölgesinin kalınlığı ölçülerek yeniden kayıt edilmiştir. Bakanlıkça belirlenen yönetmeliğe göre değerlendirme yapılarak tüberküloz yönünden pozitif ve negatif hayvanlar belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan pozitif kan örnekleri tek tüberkülin uygulamasından 72 saat sonra kompasla ölçülen deri kalınlığı 4 mm'den kalın olan hayvanlardan alınan örneklerden oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan kan örnekleri ise tüberkülin uygulamasından 72 saat sonra kompasla ölçülen deri kalınlığı 2 mm'den fazla olmayan hayvanlardan alınan örneklerden oluşmaktadır.

Hem çalışma hem de kontrol grubundaki hayvanların *V. jugularis*'lerinden antikoagulanlı ve antikoagulanlı tüplere kan örnekleri alınmış, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra örnekler ependorf tüplere alınarak -20°C 'de dondurularak en kısa sürede analizleri yaptırılmıştır. Ayrıca plazmalar alındıktan sonra geriye kalan eritrosit kısmı 3 kez %0.9'luk NaCl çözeltisiyle yıkanarak, daha sonra 1 kısım eritrosit süspansiyonu 9 kısım distile su ile karıştırılarak %10'luk eritrosit hemolizati elde edilmiş ve bu hemolizat glutatyon peroksidaz (GSHPx) tayininde kullanılmıştır.

Lipid peroksidasyonu (MDA) tayini, Placer ve ark. (15)'nin tanımladığı yöntemle göre spektrofotometrik olarak, GSHPx tayini Lawrence ve Burk (16)'un belirttiği şekilde, glutatyon (GSH) tayini Sedlak ve Lindsay (17)'in, katalaz tayini Goth'un (18) tanımladığı yöntem kullanılmıştır.

Antioksidan vitaminlerden olan vitamin E ile vitamin A düzeyleri Fırat Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında tekniğine uygun olarak ticari test kitleri yardımıyla HPLC cihazında belirlenmiştir. Vitamin C düzeyleri ise F.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında fosfotungstik asit metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tekniğine uygun yöntemlerle (19) belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar vitamin E hariç normal dağılım göstermiştir. Gruplarda normal dağılımı bozan bireyler olduğundan istatistiksel analizlerde SPSS Ms Windows Release 20.0 programında nonparametrik "Mann-Whitney U testi" kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmada deri içi PPD mammalian tüberkülin testi uygulanan ve gerek tüberküloz yönünden pozitif, gerekse de negatif saptanan ineklerde belirlenen oksidan ve antioksidan parametrelerin ortalama değerleri ile istatistiksel önem dereceleri Tablo 1'de toplu şekilde sunulmuştur. Bu tablo incelendiğinde; gruplar arasında MDA ($P<0.01$), GSHPx ($P<0.01$), GSH ($P<0.05$), vitamin E ($P<0.001$) ve vitamin C ($P<0.01$) bakımından istatistiksel önem olduğu, katalaz ve vitamin A yönünden ise her ne kadar tüberkülozisli sığırlarda değerler düşük saptansa da, istatistiksel bir önem saptanmadığı görülmektedir.

Tablo 1. Tüberkülozlu ve sağlıklı ineklerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan parametrelerin ortalama değerleri ile istatistiksel önem dereceleri (n= 15)

Parametreler	Tüberküloz Negatif Ort±St	Tüberküloz Pozitif Ort±St	P
MDA (nmol/ml)	2.91 ± 0.48	3.68 ± 0.44	**
GSHPx (IU/L)	27.98 ± 9.33	19.88 ± 8.94	**
CAT (kU/L)	94.36 ± 17.90	93.36 ± 20.95	F.Y.
GSH (nmol/ml)	0.22 ± 0.67	0.16 ± 0.30	*
Vitamin E (mg/L)	8.13 ± 2.66	2.72 ± 0.76	***
Vitamin C (mg/L)	7.39 ± 0.76 ^a	5.84 ± 0.94	**
Vitamin A (mg/L)	0.49 ± 0.51	0.46 ± 0.16	F.Y.

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, F.Y.: $P>0.05$

Tartışma

Sığır tüberkülozu birçok ülkedeki önemli ekonomi ve sağlık problemidir. Tahminen dünyada 50 milyona yakın sığırın tüberkülozun etkeni olan *M. bovis* ile enfekte olduğu düşünülmektedir (1). Deri içi tüberkülin testi hem insanlarda hem de veteriner hekimliği sahasında çok sayıda mycobacterium türünün neden olduğu hastalığın teşhisinde kullanılan klasik testlerden biridir. Yaşayan hayvanlarda hastalığın teşhisinde ayrıca IFN- γ testleri de günümüzde kullanılmaktadır (20-22). Bu testlerden deri içi tüberkülin testi ülkemiz dahil birçok ülkede saha şartlarında tüberkülozun teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5). Deri içi tüberkülin testi basit, pahalı olmayan ve yaygın olarak kullanılan bir testtir.

Testin uygulanmasıyla ilgili bazı değişimler olmasına rağmen yaklaşık 100 yıldır testin prensibi değişmemiştir (23). *Mycobacterium bovis* AN5 kültüründen hazırlanan PPD ülkemiz dahil birçok ülkede tüberkülin testi amacıyla kullanılmaktadır. Uygulama bölgesindeki diffuz şişkinlik pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (3) ve bu şişkinlik inokulasyon bölgesine monositik hücreler ve duyarlı T lenfositlerin geçişiyle alakalı gecikmiş tip hipersensitiviteye işaretir (24).

Mevcut çalışmada da tüberkülozisli sığırları teşhis etmek amacıyla deri içi tüberkülin testi kullanılmıştır. Bu amaçla Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen *Mycobacterium bovis*'in üreme ve lizis ürünlerinin ısı ile işlem görmesi ile elde edilen ve aynı türden mikroorganizmalara karşı duyarlı hale getirilen bir hayvanda gecikmiş tip hipersensitivite oluşturma yeteneğine sahip 3 mL'lik Etlik Bovine Tüberkülin PPD preparatı kullanılmıştır.

Oksidatif stres bir çok hastalıkta sekonder olarak etkileyen ve durumu kötüleştiren bir faktör olarak etkilendir. Reaktif oksijen türlerine karşı koyan oksidatif savunma sistemi yetersiz kaldığında klinik semptomlar ve hastalık ortaya çıkabilmektedir (25, 26). Lipid peroksidasyonun belirlenmesi (MDA konsantrasyonunun) oksidatif stresin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan metodlar arasındadır. Lipid peroksidasyonu başlıca doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu temeline dayanan enzimatik olmayan bir zincir reaksiyonudur ve plazmada artan MDA konsantrasyonu lipid peroksidasyonun göstergesidir (27). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yan ürünler hücre membranının özelliklerini etkiler ve bu yan ürünlerden en yaygın olanı da MDA'dır. Özellikle eritrosit membranı doymamış yağ asitlerinden zengindir ve lipid peroksidasyona karşı oldukça duyarlıdır (28).

Mikobakteriler fagositlerin aktivasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) şekillenmesini uyarabilirler ve her ne kadar bu reaksiyon konakçı savunmasında önemli ise de, artan ROS üretimi doku hasarını ve yangıyı artırabilir. Bu durum özellikle antioksidan kapasitesi bozulmuş olan hastalarda immunsupresyona neden olabilir (29-31). İlaveten tüberkülozisli hastalarda gelişen malnutrisyon durumu antioksidan kapasitede bozulmaya neden olabilir (32).

Mevcut çalışmada, tüberkülozisli sığırlarda kontrollere nazaran saptanan yüksek MDA düzeyleri

hastalık esnasında gelişen oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilebilir. Çalışmada tüberkülozisli sığırlarda katalaz düzeylerinde kontrollere nazaran düşük değerler saptanmış olmasına rağmen, bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Oysa GSHPx ve GSH düzeylerinde gruplar arasında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Her ne kadar katalaz düzeylerindeki azalmalar önemli bulunmamış olsa da, bu enzim düzeyi ile GSHPx ve GSH düzeylerindeki tüberkülozisli sığırlarda saptanan azalmaların hastalık esnasında gelişen oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan radikalleri etkisizleştirmek adına kullanımlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lipid peroksidasyonun önlenmesinde askorbik asit ile α -tocopherol arasındaki sinerjizm oldukça iyi bilinmektedir. Vitamin C, vitamin E'nin antioksidan etkisini artırırken, aynı zamanda tüketimini de azaltmaktadır (33-35). Normal şartlarda erişkin sığırların karaciğeri tarafından askorbik asit sentezlenebilmekte ve bu sentez fizyolojik ihtiyaçlar için yeterli olmaktadır. Yine de ruminantlar, askorbik asitin rumen mikroflorası tarafından yıkılmanması nedeniyle eksikliklere karşı duyarlıdır (36). Askorbik asit yetersizliği de vücudun enfeksiyonlara karşı savunma gücünü azaltmaktadır (37, 38).

Mevcut çalışmada tüberkülozisli sığırlarda kontrollere karşılaştırıldığında vitamin E ve C düzeylerinin önemli derecede azalmış olduğu dikkati çekmektedir. Bu durumun nedeninin hem hastalık esnasında gelişmesi muhtemel olan yem tüketimi azalması hem de gelişen oksidatif strese bağlı artan kullanımlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Vitamin A düzeyleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel önem saptanmamıştır. Bu durum gelişen oksidatif stres esnasında öncelikle E ve C gibi vitaminlerin kullanımıyla alakalı olabilir.

Yapılan araştırmalarda tüberkülozisli sığırlarda oksidatif stres durumunun belirlendiği başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnsanlar üzerinde yürütülen değişik çalışmalar mevcut olup (12-14), bu çalışmalarda tüberkülozisli insanlarda MDA düzeylerinde artış, glutatyon ve katalaz düzeylerinde azalma (12, 14) ile vitamin E ve vitamin C düzeylerinde azalmalar (13) saptanmıştır.

Sonuç olarak, tüberkülozisli sığırlarda lipid peroksidasyon ve antioksidan parametrelerde önemli değişimler belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. Hope JC, Villarreal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 31: 77-100.
2. Quinn PJ, Markey BK. Concise review of Veterinary Microbiology. UK: Blackwell Publishing, 2003.
3. OIE. "Bovine tuberculosis". "http://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf/ 10.02.2016.
4. Palmer MV, Waters WR. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Vet Microbiol* 2006; 112: 181-190.
5. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech* 2001; 20: 71-85.
6. Inwald J, Hinds J, Palmer S, et al. Genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains used for the

- production of purified protein derivative. J Clin Microbiol 2003; 41: 3929-3932.
7. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. FASEB J 1987; 1: 441-446.
 8. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990; 15: 129-135.
 9. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002; 30: 620-650.
 10. Osada H, Watanabe Y, Nishimura Y, et al. Profile of trace element concentrations in the fetoplacental unit in relation to fetal growth. Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81: 931-937.
 11. Moore K, Roberts LC. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res 1998; 28: 659-671.
 12. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. Indian J Tub 2004; 51: 213-218.
 13. Madebo T, Lindtjorn B, Aukrust P, Berge RK. Circulating antioxidants and lipid peroxidation products in untreated tuberculosis patients in Ethiopia. Am J Clin Nutr 2003; 78: 117-122.
 14. Akiibinu MO, Ogunyemi EO, Shoyebo EO. Levels of oxidative metabolites, antioxidants and neopterin in Nigerian pulmonary tuberculosis patients. Europ J Gen Med 2011; 8: 213-218.
 15. Placer AZ, Linda LC, Johnson B. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondialdehyde) in biochemical systems. Anal Biochem 1966; 16: 359-364.
 16. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1976; 71: 952-958.
 17. Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. Anal Biochem 1968; 25: 192-205.
 18. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991; 196: 143-152.
 19. Kyaw A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. Clin Chim Acta 1978; 16: 151-157.
 20. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. Lancet 2003; 361: 1168-1173.
 21. Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1994; 40: 125-135.
 22. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, et al. Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. Eur J Immunol 1998; 28: 3949-3958.
 23. De La Rúa-Domenec R, Goodchild AT, Vordermeier HM, et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci 2006; 81: 190-210.
 24. Waters WR, Palmer MV, Pesch BA, et al. Lymphocyte subset proliferative responses of Mycobacterium bovis infected cattle to purified protein derivative. Vet Immunol Immunopathol 2000; 77: 257-273.
 25. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. Free Radic Res Commun 1993; 19: 141-158.
 26. Kızıl O, Özdemir H, Karahan M, Kızıl M. Oxidative stress and alterations of antioxidant status in goats naturally infected with Mycoplasma agalactia. Rev Med Vet 2007; 158: 326-330.
 27. Castillo C, Hernandez J, Lopez-Alonso M, Miranda M, Benedito JL. Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: Preliminary observations. Arch Anim Breed 2003; 46: 227-233.
 28. Moore K, Roberts LC. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res 1998; 28: 659-671.
 29. Jack CI, Jackson MJ, Hind CR. Circulating markers of free radical activity in patients with pulmonary tuberculosis. Tuber Lung Dis 1994; 75: 132-137.
 30. Grimble RF. Malnutrition and the immune response. Impact of nutrients on cytokine biology in infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 615-619.
 31. Nathan CF, Brukner LH, Silverstein SC, Cohn ZA. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. J Exp Med 1979; 149: 84-99.
 32. YN Reddy, SV Murthy, DR Krishna, MC Prabhakar. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. Indian J Tuberc 2004; 51: 213-218.
 33. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990; 15: 129-135.
 34. Leung HW, Vang MJ, Mavis RD. The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. Biochim Biophys Acta 1981; 664: 266-272.
 35. Vannucchi H, Jordoa-Junior AA, Igléssias AC, Morandi MV, Chiarello PG. Effects of different dietary concentrations of vitamin E on lipid peroxidation in rats. Arch Latinoam Nutr 1997; 47: 34-37.
 36. Doba T, Burton GW, Ingold KU. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. Biochim Biophys Acta 1985; 835: 298-303.
 37. Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. J Biol Chem 1984; 259: 4177-4182.
 38. Madanat A, Zendulkova D, Pospisil Z. Contagious agalactia of sheep and goats: A review. Acta Vet 2001; 70: 403-412.