

## Anaplasmosisli Sığırlarda Isı Şok Protein (HSP), Malondialdehit (MDA), Nitrik Oksit (NO) ve İnterlökin (IL-6, IL-10) Düzeylerinin Araştırılması <sup>[1][2]</sup>

Sema ERGÖNÜL \* Tünay KONTAŞ AŞKAR \* 

[1] Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:MKÜ-BAP-07G0102)

[2] İlk isim yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir

\* Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Antakya, Hatay - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/068-A

### Özet

Kan parazit hastalıkları sığırlarda sıklıkla görülmekte olup, Türkiye'de de oldukça yaygındır. Bu hastalıklardan tropikal theileriosis en yaygın görülen kan paraziti hastalığıdır. Babesiosis ve anaplasmosis ise diğer önemli kan paraziti hastalıklarındandır. Anaplasmosis Türkiye'de her bölgede görülmektedir. Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stres ve immün sistem değişimlerinin ısı şok protein (HSP 27), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-10 (IL-10) parametreleri ile ortaya konulması amaçlanmaktadır. Çalışma, 1-3 yaş arasında 15 sağlıklı ve 15 anaplasmosisli sığırdan gerçekleştirilmiştir. Çalışmada malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri spektrofotometrik yöntemler ile, HSP 27 ve interlökin (IL-6 ve IL-10) düzeyleri ise ticari ELİSA kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Anaplasmosisli sığırlarda plazma malondialdehit ( $P<0.001$ ), nitrik oksit ( $P<0.01$ ), HSP 27 ( $P<0.01$ ) ve serum interlökin-6 ( $P<0.001$ ) düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Serum interlökin-10 aktivitesinde ise, kontrol grubu ile anaplasmosisli sığırlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Anaplasmosisli sığırlarda MDA, NO, HSP 27 ve IL-6 düzeylerindeki artış, anaplasma etkeni tarafından konak savunma sisteminin uyarıldığı ve bu esnada oluşan yangı ile birlikte oksidatif stresin meydana geldiğinin göstergesi olabilir. Elde edilen sonuçlara göre, anaplasmosiste malondialdehit, nitrik oksit, HSP 27 ve interlökin-6 düzeylerinin belirlenmesi, hastalığın tanısında faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Anaplasmosis, Sığır, Nitrik oksit, Malondialdehit, Isı şok protein, İnterlökin

## The Investigation of Heat Shock Protein (HSP 27), Malondialdehyde (MDA), Nitric Oxide (NO) and Interleukin (IL-6, IL-10) Levels in Cattle with Anaplasmosis

### Summary

Blood parasitic diseases such as tropical theileriosis in cattles are observed in Turkey. On the other hand, babesiosis and anaplasmosis are other primer tick-borne diseases. Anaplasmosis is generalised in all over the region of Turkey. In the present study, we aimed to reveal the alterations of immune system and oxidative stress in cattles with anaplasmosis by analysing heat shock protein (HSP 27), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) levels. The research has been performed on 15 healthy and 15 cattles with anaplasmosis, aged 1-3 years old. The plasma levels of malondialdehyde and nitric oxide were determined by spectrophotometric methods while the concentrations of heat shock protein and interleukin (IL-6 and IL-10) were detected by using commercial ELISA kits. The levels of plasma MDA ( $P<0.001$ ), NO ( $P<0.001$ ), HSP 27 ( $P<0.01$ ) and serum IL-6 levels were determined significantly higher in cattles with anaplasmosis than the control group. The levels of serum IL-10 was not showed significant differences between the control and the patient group. The increases in the levels of malondialdehyde, nitric oxide, HSP 27 and interleukin-6 of the cattles with anaplasmosis may indicate the stimulation of host immune system and the existence of oxidative stress. In conclusion, determination of the levels of malondialdehyde, nitric oxide, HSP 27 and interleukin-6 might be a indicator for diagnosis of cattle anaplasmosis.

**Keywords:** Anaplasmosis, Cattle, Nitric oxide, Malondialdehyde Heat shock protein, Interleukin



İletişim (Correspondence)



+90 326 2455845/1530



tunaykontas@yahoo.com

## GİRİŞ

Anaplasmosis tropik ve subtropik bölgelerde yüksek ateş ve anemi ile seyreden, Rickettsia'ların *Anaplasmatacea* ailesinde yer alan anaplasma etkenleri tarafından meydana getirilen protozoer bir hastalıktır <sup>1</sup>. Sığırlarda anaplasmosise sebep olan anaplasma etkenleri *Anaplasma marginale* ve *Anaplasma centrale*'dir <sup>2</sup>. Anaplasmosis sığırlarda genellikle her iki türden kaynaklanan miks enfeksiyon şeklinde ve tüm yaşlarda görülür. Ancak yaş ilerledikçe hastalığın şiddeti artar. Üç yaşından büyük hayvanlarda hastalık sıklıkla ölümlü sonuçlanır <sup>3</sup>. Yurdumuzda anaplasma enfeksiyonu diğer kan paraziti hastalıkları gibi sığırlarda yaygın olarak görülmektedir <sup>2</sup>.

Sığırlarda *A. marginale*'nin yerleştiği tek yer eritrositlerdir. Klinik semptomlar yüksek ateş (41-42°C), kilo kaybı, anemi ve sarılığı içerir <sup>2,3</sup>. Anaplasmosis olgularında genellikle hemoglobüri görülmez. Bunun nedeni, parazitli eritrositleri retikülo-endotelial sisteminin serbest hemoglobin salınmadan önce fagosite etmesidir <sup>2</sup>. Anaplasmosis tedavisi güç bir hastalıktır. Hastalığı geçiren hayvanlar hastalığa karşı uzun süre bağışıklık kazanır. Bu bağışıklığın özelliği hastalık geçtiği halde bir miktar parazitin organizmada kalması ve iç organlarda yaşamaya devam etmesidir. Hayvan bu nedenle portör konumundadır <sup>1,3</sup>.

Sitokinler birincil olarak enfeksiyon ve hastalıklara karşı konak savunmasında görev alırlar <sup>4,5</sup>. Yangı öncesi sitokinlerden olan interlökin-6 (IL-6) konak savunmasında pek çok fonksiyona aracılık eder. T lenfositleri aktive ederken, B lenfositleri için de bir farklılaşma faktörü olarak rol oynar. Kazanılmış immünitede B hücrelerinden antikor üretimini uyarır. Akut faz cevabı için merkezi bir uyarandır, hepatositlerde akut faz cevabının artmasında rol oynar <sup>6</sup>. Ayrıca IL-6 T lenfositlerinde IL-10 üretimi uyarır <sup>7</sup>. IL-10 makrofajların IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- $\alpha$  salgılamasını ve T lenfositlerin IFN- $\alpha$  salgılamasını baskılar. Bunu TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin sentezini transkripsiyonel (TNF- $\alpha$  ve IL-1) ve posttranskripsiyonel (IL-1 ve IL-6) düzeyde baskılayarak gerçekleştirir <sup>8</sup>. Böylece IL-10 genel yangı öncesi sitokinleri ve akut faz cevabını inhibe ederek, yangının şiddetinin azalmasına sebep olur <sup>9</sup>. İnterlökinler kan parazitlerine karşı konak savunmasında önemli olmalarına rağmen dengesiz ve aşırı üretimleri konak için zararlıdır. Şok, doku hasarı, ağrı kaybı ve lipid peroksidasyonuna sebep olurlar <sup>10</sup>.

Lipid peroksidasyonu hücre membranına ve malondialdehit (MDA) gibi reaktif aldehydleri üretme yolu ile

diğer hücre bileşenlerine zarar veren çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, çok miktarda doymamış yağ asitleri ihtiva ederler. Oksijen molekülünün hücre membranındaki bu doymamış yağ asitlerine karşı yüksek affinitesi vardır. Dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu, reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir. Reaktif oksijen türleri kontrolsüz bir şekilde üretildiğinde, membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerini peroksit ve peroksinitritler (NO gibi), alkoller, aldehidler (MDA gibi), hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasına sebep olur ve oksidatif hasar meydana getirir <sup>11</sup>.

Nitrik oksit (NO\*) serbest bir radikaldir. Fizyolojik ve patofizyolojik olayların önemli bir aracısıdır. Nitrik oksit sentetaz (NOS: EC 1.12.13.39) tarafından oluşturulur. Makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri en fazla oranda NO üreticileridir. İndüklenebilir NOS tarafından üretilen nitrik oksit, konağın spesifik olmayan savunma mekanizması olup, antimikrobiyal etkiye sahiptir. Aktivitesinin sepsis, astma, romatoid artrit, tüberküloz, doku reddi, multiple skleroz gibi pek çok hastalık da arttığı gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda tümör nekroz faktör, IL-1, IL-2 gibi sitokinler ile lipopolisakkaritlerin iNOS enzimini stimüle ederek nitrik oksit sentezini arttırdıkları gösterilmiştir <sup>12</sup>.

Oksidasyon, toksik bileşenlerin parçalanması ve yüksek sıcaklık gibi pek çok stres faktörleri bütün hücrelerde cevap olarak ısı şok proteinlerinin (HSP 27) sentezine neden olur. Isı şok proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme ve hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasında hayati önem taşır <sup>13</sup>. Stres koşulları altında hücrede ATP seviyesi hızla düşer ve proteinlerin korunmasında ilk olarak ATP'den bağımsız olarak çalışan HSP 27 ve  $\beta$ -kristallin gibi küçük moleküler ağırlığa sahip ısı şok proteinleri görev alır, daha sonra hücre enerji bakımından toparlandığında ATP bağımlı HSP 70 gibi büyük moleküler ağırlığa sahip ısı şok proteinleri devreye girer <sup>14</sup>. Bu esnada pek çok patolojik ajan da konakta immün cevap oluşturmada antijen olarak rol oynayan ısı şok proteinlerini kullanır <sup>13</sup>.

Anaplasmosis enfeksiyonunun teşhisi, genellikle klinik belirtiler ve giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik muayenesi ile yapılır <sup>2</sup>. Ancak hastalığı geçiren hayvanların portör konumunda olması ve hastalığın prognozunda yardımcı olacak, spesifik biyokimyasal parametrelere ihtiyaç vardır. *A. marginale*

enfeksiyonu ile sığırlarda çeşitli biyokimyasal değişimler meydana geldiği belirlenmiş olmasına rağmen, anaplasmosis ile ilgili biyokimyasal çalışmalar sınırlıdır<sup>15</sup>. Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stres ve immun sistem değişimlerinin HSP 27, MDA, NO, IL-6 ve interlökin-10 IL-10 parametreleri ile ortaya konulması amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışma için gerekli kan örnekleri, 2006-2007 yıllarına ait yaz dönemlerinde Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kliniğine gelen 1 yaşın üstündeki sağlıklı ve Anaplasmosisli sığırlardan alındı. Hastalığın klinik belirtileri ve Giemsa boyalı perifer kan frotileri yardımıyla 15'i sağlıklı ve 15'i hasta olmak üzere 2 grup oluşturuldu.

Sığırların V. jugularisinden tekniğine uygun olarak, heparinli tüplere ve serum tüplerine 10 ml kan alındı, serum ve plazmaları çıkarılarak MDA analizleri yapıldıktan sonra, diğer analizler için -20°C'de saklandı. Kan frotileri de hayvanların kuyruk uçlarından hazırlandı ve Giemsa ile boyandı. Frotilerde anaplasma etkenleri araştırıldı.

Plazma örneklerinde MDA tayini Yoshiko ve ark.<sup>16</sup> tarafından modifiye edilen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı. Plazma NO düzeylerinin belirlenmesinde Griess metodu kullanıldı<sup>17</sup>. Plazma HSP 27 ile serum IL-6 ve IL-10 düzeyleri ELISA test kiti (Biosource, USA; DRG, German) kullanılarak ölçüldü.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde 'SPSS 11.0 for windows' paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar student t test kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar  $X \pm SE$  olarak verildi.  $P < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## BULGULAR

Anaplasmosisli ve sağlıklı sığırların MDA, NO, HSP 27, IL-6 ve IL-10 düzeyleri *Tablo 1*'de verilmiştir. Buna göre sağlıklı sığırlarda plazma MDA düzeyi ortalama 15.23  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 38.10  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların plazma MDA düzeyi, sağlıklı sığırlardan istatistik olarak  $P < 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (*Tablo 1*).

Sağlıklı sığırlarda NO düzeyi ortalama 21.21

$\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 42.56  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların plazma NO düzeyi, sağlıklı sığırlardan istatistik olarak  $P < 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (*Tablo 1*).

Plazma HSP 27 düzeyi ise, sağlıklı sığırlarda ortalama 3.38 ng/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 4.12 ng/ml olarak ölçülmüştür. Sığırların plazma HSP-27 düzeyi anaplasmosisli sığırlarda kontrol grubundan, istatistiksel olarak  $P < 0.01$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (*Tablo 1*).

**Tablo 1.** Sağlıklı ve Anaplasmosisli sığırların MDA, NO, HSP 27, IL-6 ve IL-10 düzeyleri

**Table 1.** MDA, NO, HSP 27, IL-6 and IL-10 levels of healthy cattles and cattles with anaplasmosis

Parametre	Sağlıklı Sığırlar (n=15)	Anaplasmosisli Sığırlar (n=15)
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	15.23 $\pm$ 2.33	38.10 $\pm$ 2.71*
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	21.21 $\pm$ 3.52	42.56 $\pm$ 4.19*
HSP 27 (ng/ml)	3.38 $\pm$ 0.35	4.12 $\pm$ 0.17†
IL-6 (pg/ml)	18.42 $\pm$ 2.11	31.49 $\pm$ 5.88*
IL-10 (pg/ml)	12.25 $\pm$ 1.13	10.71 $\pm$ 1.19

Sağlıklı sığırlar ile anaplasmosisli sığırlar arasında \*  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  ve †  $P < 0.05$  derecesinde önemlilik olduğunu göstermektedir

Serum IL-6 düzeyi, sağlıklı sığırlarda ortalama 18.42 pg/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 31.49 pg/ml olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların serum IL-6 düzeyleri, sağlıklı sığırlardan istatistik olarak  $P < 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (*Tablo1*). Serum IL-10 düzeyi ise, sağlıklı sığırlarda 12.25 pg/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda ise 10.71 olarak ölçülmüştür. Sağlıklı ve anaplasmosisli sığırların IL-10 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kan paraziti hastalıkları gibi çoğu yangısal hastalıkta görülen yüksek ateş, yangı, oksidatif stres ve hücrel hasar durumları malondialdehit (MDA) gibi aldehit yapılı bileşiklerin oluşmasına ve stres proteinlerinin ekspresyonuna sebep olur<sup>13,18</sup>. MDA düzeyinin kan paraziti hastalıklarından olan tropical theileriosis'te<sup>19</sup>, HSP 70 düzeyinin ise malarya<sup>20</sup>, theileriosis<sup>21</sup> ve babesiosiste<sup>22</sup> arttığı belirlenmiş olmasına rağmen, yapılan literatür taramalarında anaplasmosisli sığırların MDA ve ısı şok protein düzeyleri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda MDA ve HSP 27 düzeyleri sağlıklı sığırlardan yüksek bulunmuştur. Bu durum eritrosit membranının

poliansature yağ asidi yönünden zengin olması nedeni ile, enfeksiyon sırasında eritrositlerde lipid peroksidasyonunun ve oksidatif hasarının meydana gelmesine bağlı olabilir<sup>23</sup>.

Oksidatif stres esnasında HSP 27'nin hücre içi ekspresyonu artar ve fosforile olur. Parazit ısı şok proteinlerinin konak immün sistemini uyararak, TNF- $\alpha$  salınımını ve buna bağlı olarak HSP 27 ekspresyonunu artırdığı düşünülmektedir<sup>22,24</sup>. Artan HSP 27 ekspresyonu hücre içi glutasyon seviyesini arttırıp, demir içeriğini düşürerek ve buna bağlı olarak hidroksil radikallerinin ve okside proteinlerin oluşumunu azaltarak, antioksidan gibi görev yapar. Böylece TNF- $\alpha$  aracılı lipid peroksidasyonu ve ROS miktarındaki artışa bağlı olarak gelişen çeşitli negatif etkiler (ateş, yangı vs) küçük HSP'ler tarafından inhibe edilir<sup>13,24</sup>.

Parazit veya diğer enfeksiyon ajanlarına bağlı olarak doku hasarının meydana gelmesi sonucu non-spesifik bir savunma reaksiyonu olan akut faz cevabı uyarılır. Akut faz cevabı, doku hasarının olduğu bölgede aktive edilmiş lökositlerden salınan IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflatör sitokinler tarafından stimüle edilir. Shoda ve ark.<sup>25</sup> ve Goff ve ark.<sup>26</sup> TNF- $\alpha$ 'nın makrofajları aktive ederek, makrofajlardan NO ve ROS salınımını uyardığını göstermiştir. Shoda ve ark.<sup>25</sup> akut enfeksiyon sırasında bu aktif makrofajların fagositozla ve NO, peroksinitrit ve süperoksit gibi toksik mediatörleri üretme yoluyla parazitleri öldürdüğünü bildirmişlerdir. Stich ve ark.<sup>27</sup> ve Kondaş ve Salmanoğlu<sup>28</sup> babesiosisli sığırlarda, Ayerdem ve ark.<sup>29</sup> ise *T. annulata* enfeksiyonunda NO düzeyinin arttığını belirlemişlerdir. Nitrik oksit aktif makrofajların kan parazitlerine karşı anti-paraziter etki meydana getirmesinde görev alan önemli bir mediatördür<sup>29</sup>. Theileria enfeksiyonunda NO'in theileria trofozoitlerinin makroşizontlara dönüşmesini baskılayarak ve apoptosisi indükleyerek antiparaziter etki gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca NO sporozoitlerin konak hücrelerine girişinin önlenmesinde de rol oynar<sup>30</sup>. Bu çalışmada anaplasmosisli sığırların plazma NO düzeyi, sağlıklı sığırlardan istatistik olarak P<0.001 önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Tablo 1). Anaplasmosis'li sığırlarda görülen bu yükselme, anaplasma etkenlerinin sığır makrofajlarında NO üretimini uyarmaları ve salınımını arttırmalarından kaynaklanabilir.

IL-6 da, TNF- $\alpha$  ve NO ile birlikte, paraziter hastalıklara karşı bağışıklıkta ve akut enfeksiyonda klinik belirtilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynar<sup>31</sup>. Grab ve ark.<sup>32</sup>, *Anaplasma phagocytophilum* enfeksiyonunda IL-6 düzeyinin arttığını bildirmiştir. Benzer şekilde bu

çalışmada da anaplasmosisli sığırlarda IL-6 düzeyi yüksek bulunmuştur. IL-6 düzeyindeki bu artış, anaplasma etkeninin makrofajları uyarması sonucu yangı öncesi sitokinlerin sentezinin artmasına bağlı olabilir.

IL-6 doğal kazanılmış bağışıklıkta rol oynarken, T lenfositlerinde IL-10 üretimi de uyarır. IL-10 hücre aracılı immün cevabın engellenmesinde rol oynar. Yangı öncesi sitokinleri ve akut faz cevabını inhibe ederken, B hücrelerinin plazmositlere dönüşümünü sağlar<sup>7</sup>. Brown ve ark.<sup>33</sup> *B. bovis* enfeksiyonunda, Abbott ve ark.<sup>34</sup> ise anaplasmosiste IL-10 düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Fakat bu çalışmada sağlıklı ve anaplasmosisli sığırlarda IL-10 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. IL-10 düzeylerinin sağlıklı ve anaplasmosisli sığırlarda değişmemesi ve IL-6 düzeyinin hasta grubunda artış göstermesi, enfeksiyonun gelişme evresinin başında olması ve IL-6'nın IL-10 sentezini henüz uyarmamasına bağlı olabilir.

Anaplasmosisli sığırlarda MDA, NO, HSP 27 ve IL-6 düzeylerindeki artış, anaplasma etkeni tarafından konak savunma sisteminin uyarıldığı ve bu esnada oluşan yangı ile birlikte oksidatif stresin meydana geldiğinin göstergesi olabilir. Sonuç olarak, MDA, NO, HSP 27 ve IL-6 düzeylerinin belirlenmesi, anaplasmosisin tanısında faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Kocan KM, Blouin EF, Barbet AE: Anaplasmosis control: Past, present, and future. *Ann NY Acad Sci*, 916, 501-509, 2000.
2. Sevinç F: Sığırlarda Anaplasmosis. *Erciyes Univ Vet Fak Derg*, 1 (2): 113-118, 2004.
3. Stokka GL, Falkner R, Boening JV: Anaplasmosis. <http://www.oznetiksu.edu./library/lvstk2/MF212.pdf>. Accessed: 20.09.2008
4. Kishimoto T, Akira S, Taga T, Narazaki M: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-1254, 1995.
5. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T: The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*, 4 (3): 233-242, 2002.
6. Rader DJ: Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med*, 343, 1179-1182, 2000.
7. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F: IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 157,12-20, 1996.
8. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY: IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, 160, 3555-3561, 1998.
9. Bortesi L, Rossato M, Schuster F, Raven N, Stadlmann J, Avesani L, Falorni A, Bazzoni F, Bock R, Schillberg S, Pezzotti

- M:** Viral and murine interleukin-10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco. *BMC Biotechnology*, 9 (22): 1-13, 2009.
- 10. Dinerello CA:** Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2): 503-508, 2000.
- 11. Serarslan G, Altuğ E, Kontas T, Atik E, Avci G:** Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol*, 32, 709-715, 2007.
- 12. Erel Ö, Koçyiğit A, Bulut V, Gürel SM, Avci Ş, Aktepe N:** Şark çıbanlı hastalarda reaktif nitrojen ve oksijen radikal metabolizması. *Klinik Bilimler*, 5 (3): 298-302, 1999.
- 13. Aşkar TK, Ergün N, Turunç V:** Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 13 (1): 109-114, 2007.
- 14. Jaattela M:** Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annali Medici*, 31, 261-271, 1999.
- 15. Allen PC, Kuttler KL, Amerault TE:** Clinical chemistry of anaplasmosis: Comparative serum protein changes elicited by attenuated and virulent *Anaplasma marginale* isolates. *Am J Vet Res*, 42 (2): 326-8, 1981.
- 16. Yoshiko T, Kawada K, Shimada T:** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol*, 135, 372-376, 1979.
- 17. Cortas NK, Wakid NW:** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, 36, 440-43, 1990.
- 18. Yagi K:** Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phy Lipids*, 45 (2-4): 337-51, 1987.
- 19. Grewal A, Ahuja CS, Singha SPS, Chaudhary KC:** Status of lipid peroxidation, some antioxidant enzymes and erythrocytic fragility of crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Res Commun*, 29 (5): 387-94, 2005.
- 20. Fakruddin JM, Biswas S, Sharma YD:** Metalloprotease activity in a small heat shock protein of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*, 68 (3): 1202-1206, 2000.
- 21. Mason PJ, Shiels BR, Tait A, Beck P, Hall R:** Sequence and expression of a gene from *Theileria annulata* coding for a 70-kilodalton heat-shock protein. *Mol Biochem Parasitol*, 37 (1): 27-35, 1989.
- 22. Carcy B, Precigout E, Valentin A, Gorenflot A, Reese RT:** Heat shock response of *Babesia divergens* and identification of the HSP 70 as an immunodominant early antigen during ox, gerbil and human babesiosis. *Biol Cell*, 72, 93-102, 1991.
- 23. Rezaei Asri S, Dalir-Naghadeh B:** Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol*, 142, 179-186, 2006.
- 24. Ferns G, Shams S, Shafi S:** Heat shock protein 27: Its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol*, 87 (4): 253-274, 2006.
- 25. Shoda KM, Palmer GH, Florin-christensen J, Forin-christensen M, Godson DL:** *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 $\beta$ , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect Immun*, 68 (9): 5139-5145, 2000.
- 26. Goff WL, Jonhson WC, Valdez RA:** 12-14 and TL-10 inhibition of IFN-gama and TNF-alfa dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merazoides. *Vet Immun Immunopathol*, 84 (3-4): 237-251, 2002.
- 27. Stich WR, Shoda LKM, Dreewess M, Adler B, Thomas W:** Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Immun*, 66 (9): 4130-4136, 1998.
- 28. Kontaş T, Salmanoğlu B:** Tumour necrosis factor- $\alpha$ , adenosine deaminase and nitric oxide levels in cattle babesiosis before and after treatment. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 485-487, 2006.
- 29. Ayerdem B, İnci A, Uyanık F, İça A, Çakmak A, Yıldırım A:** Sığırlarda doğal *Theileria annulata* enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri. *J Health Sci*, 15 (2): 116-121, 2006.
- 30. Richardson JO, Forsyth LMG, Brown CGD, Preston PM:** Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Vet Res Commun*, 22, 31- 45, 1998.
- 31. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M:** Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*, 72 (10): 5630-5637, 2004.
- 32. Grab DJ, Elvis Nyarko, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS:** *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (11): 1420-1424, 2007.
- 33. Brown WC, Mcelwain TF, Ruef BJ, Suarez CE, Shkap V, Chitko-mckown CG, Tuo W, Rice-ficht AC, Palmer GH:** *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect Immun*, 64 (8): 3341-3350, 1996.
- 34. Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC:** Rapid and long-term disappearance of CD4 T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *J Immunol*, 174, 6702-6715, 2005.