

Orijinal Araştırma Makalesi

## Hümik Asidin Eser Element İçeriğine Etkisi

## Mitokondri

1Daniel Zatko, 1 Janka Vašková, 1Ladislav Vaško ve 2Peter Patlevič

1Tıbbi ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Pavol Jozef Šafárik Üniversitesi, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovak Cumhuriyeti 2Prešov Üniversitesi Beşeri ve Doğa Bilimleri Fakültesi Ekoloji Bölümü, 17 Kasım Sokak 1, 081 16 Prešov, Slovak Cumhuriyeti

## Makale Geçmişi

Geliş Tarihi: 18-9-2014

Revize: 29-9-2014

Kabul Tarihi: 28-12-2014

Sorumlu Yazar: Ladislav Vaško Tıbbi ve Klinik

Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Köşice'deki PJ Šafárik Üniversitesi, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovak Cumhuriyeti E-posta: ladislav.vasko@upjs.sk

**Özet:** Hümik asitlerin antioksidan özelliklerine, özellikle radikal yakalama aktivitelerine ve hücredeki redoks sistemini sürdürme kabiliyetine işaret eden önceki in vitro çalışmalarımıza dayanarak, çiftlik tavuğunun diyetine 42 gün boyunca %0.6 hümik asit ilavesi değerlendirildi. Hümik asitlerin uygulanması, önemli sentetik, metabolik ve oksidatif stres koşullarının ortadan kaldırılmasında doğrudan rol oynayan organların (karaciğer, böbrek) plazma ve mitokondrilerinin antioksidan durumu üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Hümik asidin açıklanan şelatlama özellikleri ile ilgili olarak, demir, bakır, manganez, çinko ve selenyumun mitokondride kofaktör olarak işlevleri dikkate alınarak mevcut seviyeleri de incelenmiştir. Bulgularımız, hümik asit uygulamasının metallere bağlanma yeteneklerini değil, rekabeti etkilemediği, selenyum kullanımında ve özellikle 42 günden fazla uygulandığında dikkate alınması gereken telafi edici tepkilerde bir düşüşe yol açtığı yönünde bir beklentiye eğilimlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Humik Asitler, Tavuk, Şelatlama, Mitokondri, Karaciğer, Böbrek

## Giriş

Hümik Asitler (HA'lar), ishal önleyici, analjezik, immüno-uyarıcı ve antimikrobiyal özellikleriyle bilinirler (Rath ve diğerleri, 2006). Avrupa'da veterinerlik pratiğinde her türlü hayvan türü ile profilakside ve terapötik ilaçlar olarak aktif olarak sadece peroral uygulama için kullanılırlar (EMA, 1999). Bununla birlikte, sağlık ve hayvancılıkla ilgili olarak sürekli olarak incelenirler. Yiyecek veya suya uygulanan humatların kümes hayvanlarında büyümeyi teşvik ettiği bulundu. Hümik maddelerin etlik piliçlerde yemden yararlanma (Kocabağlı ve ark., 2002) üzerinde ve ayrıca büyüme, et kalitesi, karkas özellikleri, kanda ve gastrointestinal kanalda belirlenen seçilmiş parametreler (Öztürk ve ark., 2010). Öztürk ve ark. (2012) ayrıca canlı ve karkas ağırlığında bir artış ve kan kolesterol seviyelerinde bir azalma olduğunu göstermiştir. HA'ların veterinerlik pratiğinde ve gıda üretim sürecinde kullanılması şüphesiz istenen olumlu etkileri üretebilse de, hümik maddeler ve HA'ların olumlu ve hatta olumsuz etkilerinin menşee kaynaklarına ve hayvanın fizyolojik durumuna bağlı olduğu da gözlenmiştir. (Steinberg ve diğerleri, 2003). Diğer çalışmalar, H2S'nin modüle edebildiğini göstermektedir.

kirleticilerin toksisitesi, ksenobiyotikler ve metallerin biyoyararlanımı (Paquin ve diğerleri, 2002; Glover ve Wood, 2004; Timofeyev ve diğerleri, 2006) ve pH'ı, iyonik konsantrasyonu ve enzimatik aktiviteyi değiştirebilir (Timofeyev ve diğerleri, 2006). Slovakya'da, doğal oksihumolitten HA'ların iyi bilinen ve mevcut bir formülasyonu olan HUMAC® vardır. Ana metabolik fonksiyonları olan ve ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu organ olan sıçan karaciğer mitokondrisinde önerilen %0,1'lik profilaktik dozda (Vašková ve ark., 2011) HA'ların antioksidan özelliklerine ilişkin in vitro çalışmalar, HA'ların elektrofilik özelliklerinin olduğuna işaret etmiştir. mitokondri redoks durumunu belirgin şekilde dengeler.

Ayrıca, hidroksil radikallerine karşı ve daha az ölçüde süperoksit radikallerine karşı güçlü süpürme özellikleri bulunmuştur.

Bu veriler, istenen pozitif etkiyi elde etmek için dozun ve kullanım süresinin önemli olduğuna dair temel bir varsayım olduğundan, organizmanın HA'ların varlığında indüklenen koşullara karşı adaptif antioksidan tepkisini uzun vadeli olarak izlememize yol açmak için yeterlidir.

Antioksidan enzimler, katalitik aktivite için yaygın olarak metal kofaktörlerini kullanır. Soru, HA'ların önerilen şelatlama özelliklerinin,

antioksidan durumu ve bu elementlerin mevcut seviyeleri.

42 gün boyunca yiyeceklerde (%0.6) HA almış olan tavuklardan karaciğer, böbrek ve plazmadan mitokondri araştırdık.

## Malzemeler ve yöntemler

Deney, Velký Krtíš bölgesindeki (Slovakya) kümes hayvanı çiftliği Vinica'dan 36.000 piliç COBB 500 üzerinde gerçekleştirildi. Cıvcıvlar 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (15700 adet) 42 gün boyunca konvansiyonel yem karışımları ile beslendi. Deney grubu (20000 adet), besinin ilk gününden itibaren 42 gün boyunca %0,6 hüyük asitle zenginleştirilmiş konvansiyonel yem karışımları (Humac® Natur, Humac Ltd, Košice, Slovakya) ile beslendi. Tüm cıvcıvlar standart yönetim ve sağlık uygulamalarına tabi tutuldu. Tüm deney süresi boyunca (42 gün) yem ve su ad libitum olarak verildi.

Her iki gruptan rastgele seçilen 10 tavuk servikal dislokasyonla öldürüldü, ardından doku hasadı ve kan plazması toplandı. Karaciğer ve böbrek mitokondrileri, Fernández-Vizarra ve diğerleri tarafından açıklanan yöntemle izole edildi . (2010). Glutatyon redüktazın (GR; EC1.6.4.2) aktivitesi, daha önce Carlberg ve Mannervik (1985) tarafından açıklanan değiştirilmiş bir yöntemle göre ölçülürken, glutatyon peroksidazın (GPx; EC 1.11.1.9) aktivitesi, Flohé tarafından tarif edildiği gibi ölçüldü. ve Günzler (1984).

Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi, sağlanan kullanım kılavuzu izlenerek SOD-Assay Kit-WST (Sigma Aldrich, İsviçre) aracılığıyla ölçülmüştür. Mitokondri ve plazmadaki azaltılmış glutatyon (GSH) seviyeleri, Floreani ve ark. (1997) Ellman reaktifini kullanarak.

Ölçülen tüm parametreler , bisinkonik asit tahlili (Smith ve diğerleri, 1985) kullanılarak belirlenen mg veya g mitokondriyal protein (mgProt, gprot) başına hesaplandı.

Alev atomik absorpsiyon spektroskopisi ile toplam demir, çinko ve grafit fırın atomik absorpsiyon spektrometresi ile bakır, manganez, selenyumun toplam içeriği tespit edildi (Shimadzu AA7000). Ölçülen parametreler, üç bağımsız ölçümün ortalama  $\pm$  SEM'si olarak ifade edildi.

İki grup arasındaki fark, eşleştirilmemiş bir öğrenci t-Testi kullanılarak belirlendi.

## Sonuçlar ve tartışma

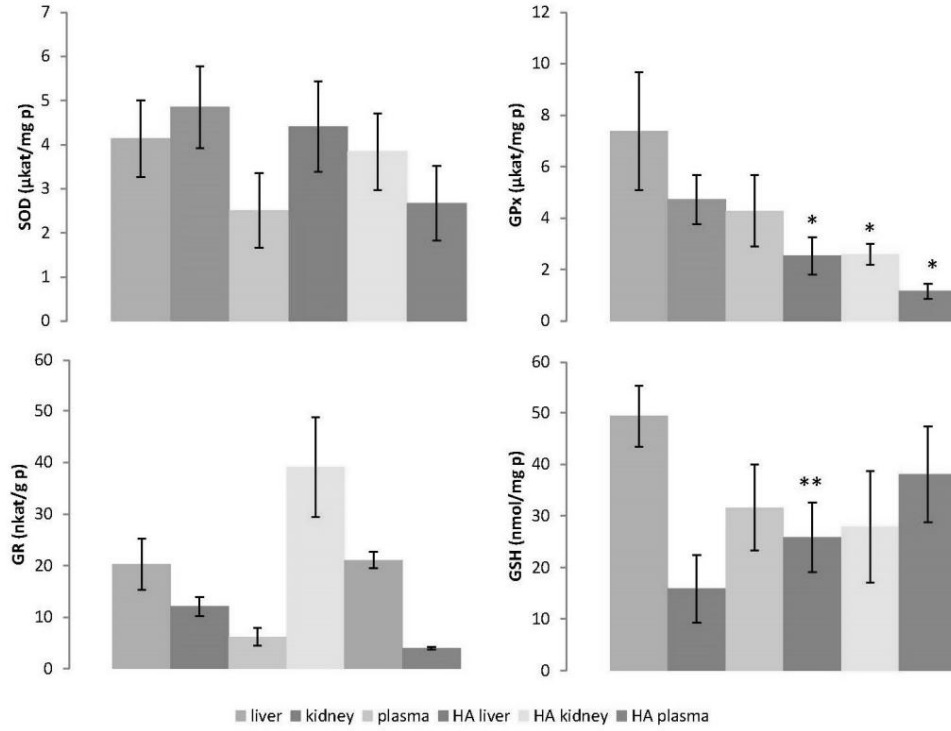
Dikkate alınması gereken bir husus, alındıktan sonra Hüyük Maddelerin (HS) organlara veya organellere göç edebilmesi ve stres tepkisi reaksiyonlarını tetikleyebilmesidir (Steinberg ve diğerleri, 2003). Hem spesifik olmayan hem de spesifik etkileri vardır. Spesifik olmayan etkiler, fiziksel ve kimyasal membran tahrişi, biyotransformasyon aktivitesinin indüksiyonu ve modülasyonu, kimyasal savunma proteinlerinin indüksiyonu, dahili oksidatif gelişimidir.

stres ve ROS savunma enzimlerinin indüksiyonu. Tüm organizmalar kendilerini kimyasal yüklerden (egzotik gıda kimyasalları, ksenobiyotikler vb.) kurtaracak araçlara sahiptir, yani biyotransformasyon denilen yollar geliştirmişlerdir. Ayrıca hüyük maddeler, biyotransformasyon yolunda kimyasal ipuçları gibi davranır. Hüyük maddeler çeşitli fonksiyonel gruplara sahip olduğu için, özellikle biyotransformasyon sisteminin (glutatyon ile konjugasyon reaksiyonları) Faz II enzimlerinin, H<sub>2</sub>S maruziyeti üzerine modülasyona tabi olduğunu varsayıyoruz (Steinberg ve diğerleri, 2003; Wiegand ve diğerleri, 2004). Ksenobiyotiklerin ve dolaşımdaki antioksidanların metabolizmasında yer alan ikinci en önemli organel olan mitokondride antioksidan enzim aktivitesini gözlemlemek ilginçtir.

Şekil 1'de gösterildiği gibi, kontrole kıyasla SOD aktivitesinde kanıtlanmış bir değişiklik yoktu, ancak GPx aktivitesi HA'lı grupta önemli ölçüde daha düşüktü. HA'larla desteklenmiş grupta GR aktivitesi karaciğer ve böbreklerde anlamlı olarak yüksekti ve GSH seviyesi karaciğerde anlamlı derecede azaldı. Enzimlerin aktiviteleri ile GSH seviyeleri arasındaki karşılıklı bağımlılıklar ve üç cisim arasındaki karşılaştırma dikkate alındığında, sonuçlar olumludur. GSH'nin redoks potansiyeli ne böbrekte ne de dolaşımdaki plazmada kaybolmaz, bu da HA'ların antioksidan etkisini gösterir.

Dikkate alınması gereken ikinci husus, şelatyon gibi diğer HA özelliklerinin varlığıdır. Şimdiye kadar, bir in vivo sistemdeki HA'ların şelatlama özellikleri ile biyolojik aktiviteleri arasındaki bağlantıyı düşünmedik . Bu nedenle, bunu daha fazla araştırmak için işlenmiş biyolojik materyal kullandık. Tao ve diğerleri tarafından yapılan deneyler . (2000), suda Fulvik Asit (FA) varlığında balıkların solungaçları yoluyla alımı için Cu mevcudiyetinin azaldığını göstermiştir. Sanmanee ve Areekijsee (2010), FA tedavisinin memeli hücreleri-domuz yumurta kanalı epitel hücrelerinde Cu toksisitesini azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte, Fe, Zn, Mn ve Cu, hücresel işlevi sürdürmek için gerekli olan temel iz elementler grubuna dahil edilir ve çok sayıda metal içeren enzimin ayrılmaz bileşenleridir (Rajkowska ve Protasowicki, 2013). Antioksidan enzimler genellikle katalitik aktivite için metal kofaktörlerin oksido-redüksiyon özelliklerini kullanır. Burada, metallerin HA'lar tarafından absorpsiyon kabiliyetinin ve kompleksleşmesinin, hayvan için mevcut olan biyolojik olarak önemli elementlerin adsorpsiyonunu azaltıp azaltamayacağını sorgulamak oldukça mantıklıdır. Böylece Cu, Zn, Mn, Fe ve ayrıca metal olmayan kofaktör Se'nin dağılımını inceledik.

Atomik absorpsiyon spektrometresi ile tespit edilen metal seviyeleri, mevcut metal miktarlarında özellikle önemli değişikliklere işaret etti (Tablo 1). Cu, karaciğer ve plazmada daha yüksek, ancak böbreklerde daha düşüktü. Mn gibi Zn miktarları da karaciğer ve böbreklerde azalmıştır. Fe seviyeleri eşit olarak önemli ölçüde yüksekti. Se, böbreklerde önemli ölçüde daha yüksek, ancak plazmada daha düşüktü. Bulgularımızı tüm vücutlarımla karşılaştırmak da arzu edilir.



Şekil 1. Karaciğer ve böbrekten izole edilen plazma ve mitokondride antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidad, glutatyon redüktaz ve indirgenmiş glutatyon aktiviteleri. Hüyük asit Vs alan grupların karşılaştırılması. hüyük asitsiz (\*p<0,05; \*\*p<0,01 - kontrol)

Tablo 1. Karaciğer ve böbrekten izole edilen plazma ve mitokondrilerdeki ortalama Zn, Cu, Mn, Fe ve Se konsantrasyonlarının dağılımı (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001 kontrole karşı)

		HA olmadan	HA
Zn (µg/g)	Plazma	59.62±2.97	60,16±4,36
r=0,9996	Böbrek	49.67±3.10	29,188±2,01***
Tespit. lim 0,001 mg/L	Karaciğer	63.86±4.50	50,35±3,33*
Cu (ng/g) r=0,9976 Det.	Plazma	50.99±0.01	56,27±0,03***
lim 0,0004 mg/L Mn (ng/	Böbrek	73.16±0.04	55,21±0,08***
g) r=0,9860 Det. lim	Karaciğer	33.34±0.03	112,58±0,04***
0,0002 mg/L Fe (µ g/g)	Plazma	44.14±0.27	71,03±0,33***
r=0,9998 Det. lim 0,004	Böbrek	127.28±0.65	46,54±0,56***
mg/L Se (ng/g)	Karaciğer	124.79±0.11	50,04±0,31***
	Plazma	1.52±0.03	3,84 ±0,05***
	Böbrek	0.79±0.01	2,98±0,02***
	Karaciğer	2.12±0.08	3,51±0,02***
	Plazma	535.13±0.04	199,24±0,03***
r=0,9971	Böbrek	107.17±0.05	1163,27±0,04***
Bu. yapıstırıcı 0,0009 mg/L	Karaciğer	limitin altında	51,95±0,01

Zralı ve Písaříková (2010) tarafından elde edilen sonuçlar, hayvanlara sodyum humat verilmesinin incelenen organ ve dokulardaki Cu veya Zn içeriği üzerinde önemli bir olumsuz etkisinin olmadığını doğruladı ve aynı bulgulara sahip birçok başka yazara atıfta bulundu. Öte yandan, domuz dokularında eser elementlerin yüksek konsantrasyonları López-Alonso ve ark. (2007). Kan serumunda tespit edilen iz element seviyeleri, hayvanlara verilen mevcut diyet mineral tedarik seviyesini yansıtıyordu ve Stowe ve ark.'nın bulgusu ile tutarlıydı .

(1992), Kim ve Mahan (2001) ve diğerleri. En yüksek

Hayvanlara diyet mineral tedarikinin değerlendirilmesi için kas dokusundan daha yüksek tanısıl değere sahip bir depo organı olan karaciğerde Se dışındaki eser elementlerin içeriği tespit edildi. Bu çalışmada en yüksek selenyum konsantrasyonlarının tespit edildiği böbrekler, selenyum atılımında yer alan en önemli organdır (López-Alonso ve ark., 2007).

Sodyum humat beslemesi nedeniyle, kan serumundaki Mn ve hepsinden önemlisi Se seviyeleri önemli ölçüde azaldı (Zralı ve Písaříková, 2010). Vücutlardaki ve mitokondrilerdeki gözlemler ortak bir

pek çok benzerlik var, ancak genel redoks durumu ve öğelerin kullanımı üzerinde temel bir etkiye sahip olması muhtemel farklılıklar da var.

Demir ve manganez veya demir, bakır ve çinko vb. arasındaki potansiyel karşıt etkileşimler de dikkate alınmalıdır (Creech ve diğerleri, 2004). Mitokondri, hücrel Fe-S kümeleri sağlar ve akonitaz gibi oksidan kararsız Fe-S enzimlerini korumak için GR gereklidir. Bu nedenle, toplam Fe konsantrasyonunun artacağını varsaymak mantıklıdır. Artan Fe miktarı, yalnızca oksidatif strese katkıda bulunabilir, ancak aynı zamanda antioksidan enzimlerin sentezi için demire bağımlı enzimlerin aktivitesinin artmasına da katkıda bulunabilir, bu nedenle mitokondride Cu, Zn ve Mn kullanımıyla doğrudan ilişkilidir. SOD'un disülfidler oluşturmak üzere oksidasyonu için koşullar, SOD'nin aktivitesi ve aktif bölgeye Cu transferi için gereklidir. Yakın tarihlili in vivo çalışmalar, SOD1 için bakır koruyucunun, O<sub>2</sub>'ye yanıt veren bir aşamada bu disülfidin oluşumunu kontrol ettiğini göstermiştir (Brown ve diğerleri, 2004). Hala birçok mekanik alternatif olmasına rağmen, bu metallochaperone, bakır şaperon, Cu vermekten çok daha fazlasını yapar: hem sülfidril oksidaz hem de protein disülfid izomeraz aktivitelerine sahiptir ve bu aktivitelere yanıt olarak daha yüksek düzeyli fizyolojik düzenleme tiplerine izin verir görünmektedir. oksidatif stres (Culotta ve diğerleri, 2006). Cu'nun bağlanması, Zn'nin kullanımı için sınırlayıcı adımdır.

Bununla birlikte, mitokondriyal Mn seviyesi normalde Fe'den 1-2 merteye daha azdır (Cobine ve diğerleri, 2004). Şu anda, Fe'deki bir artış ve dolayısıyla MnSOD sentezinin azalması nedeniyle SOD bağlanması için metal rekabeti olup olmadığını söyleyemeyiz; bununla birlikte, plazmadaki yüksek Mn seviyeleri, arginaz aktivitesinin bozulmasını ve nitrozatif stresi önleyebilir. Son olarak, plazmada GSH seviyeleri dengelendi. Hümkik asit ve selenyum arasındaki ilişki ile ilgili olarak, içme suyunda bulunan hümkik maddeler tarafından inhibisyonu nedeniyle insanlarda selenyumun mevcudiyeti de bozulmuştur (Wang ve diğerleri, 1992). HA'ların bu özelliği bulgularımızdan sorumlu olabilir, çünkü mitokondrideki GPx aktivitesi her iki organdan da mitokondride önemli ölçüde azaldı ve azalma en çok plazmada belirlendi.

Böbrekte artan Se seviyelerine rağmen, dolaşımdaki glutatyon izoformları sadece böbrekte olduğundan, toplam Se seviyesi kontrol grubunda önemli ölçüde daha düşük olabilir. Bu, selenoprotein P veya albümine bağlı gibi diğer taşıma biçimlerinin varlığı düşünüldüğünde bile geçerli olabilir.

## Çözüm

İzole karaciğer mitokondrieleri üzerindeki in vivo deneylerin sonuçları, omurgalı sınıflarının temsilcileri arasındaki farklara bakılmaksızın in vitro bulunanlarla hemen hemen aynıdır. HA'ların uygulanmasının metallere bağlanma kabiliyetini etkilemediği, aksine rekabeti etkilediği yönünde bir beklenti vardır.

Se kullanımındaki düşüş, bir dizi telafi edici yanıt üretir. 42 günlük alım yararlı etkiyi sınırlıyor gibi görüldüğünden, HA'ların güvenli kullanım süresinde önemli bir faktör olabileceğinden, daha ileri çalışmalar bunu açıklığa kavuşturmaya odaklanacaktır.

## Teşekkür

Çalışma, Slovak Cumhuriyeti Eğitim, Bilim, Araştırma ve Spor Bakanlığı Bilimsel Hibe Ajansı no. VEGA 1/1236/12.

## Yazar Katkıları

Daniel Žatko: Satın almaya önemli katkı veri, makale taslağı.

Janka Vašková: Verilerin analizi ve yorumlanması, makalenin taslağının hazırlanması, entelektüel içeriğin gözden geçirilmesi, makalenin nihai onayı.

Ladislav Vaško: Konsept ve tasarıma önemli katkı, entelektüel içerik için eleştirel olarak gözden geçirme, makalenin nihai onayı.

Peter Patlevič: Verilerin elde edilmesine, verilerin analizine ve yorumlanmasına önemli katkı.

etik

Yazarlar, yayınlanan verilerle herhangi bir mali/ticari çıkar çatışması beyan etmemektedir.

## Referanslar

Brown, NM, AS Torres, PE Doan ve TV

O'Halloran, 2004. Oksijen ve bakır şaperon CCS, Cu, Zn süperoksit dismutazın çeviri sonrası aktivasyonunu düzenler. Proc. Nat. Acad. bilim AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ, 101: 5518-5523.

DOI: 10.1073/pnas.0401175101

Carlberg, I. ve B. Mannervik, 1985. Glutatyon redüktaz. Methods Enzymology, 113: 484-485.

DOI: 10.1016/S0076-6879(85)13062-4

Cobine, PA, LD Ojeda, KM Rigby ve DR Winge, 2004. Maya, mitokondriyal matriste proteinli olmayan bir bakır havuzu içerir. J. Biol. Chem., 279: 14447-14455. DOI: 10.1074/jbc.M312693200 Creech, BL, JW Spears, WL Flowers, GM Hill ve KE Lloyd ve diğerleri, 2004. Diyet eser mineral konsantrasyonunun ve kaynağının (inorganik ve şelatlı) performans, mineral durumu ve dışkı minerali üzerindeki etkisi süttten kesmeden bitirmeye kadar domuzlarda atılım. J.

hayvan Sci., 82:2140-2147. PMID: 15309962

Culotta, VC, M. Yang ve TV O'Halloran, 2006.

Süperoksit dismutazların aktivasyonu: Metalin pedala basılması. Biyokimya. biyografiler. Açta, 1763: 747-758.

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.003

- EMEA, 1999. Veteriner tıbbi ürünler komitesi hümik asitler ve bunların sodyum tuzları özet raporu. Avrupa Tıbbi Ürünlerin Değerlendirilmesi Ajansı.
- Fernández-Vizarra, E., G. Ferrín, A. Peréz-Martos, P. Fernández-Silva ve M. Zeviani ve diğerleri, 2010. Biyogenetik çalışmalar için mitokondri izolasyonu: Bir güncelleme. Mitokondri, 10: 253-262. DOI: 10.1016/j.myth.2009.12.148 Flohe, L. ve WA Günzler, 1984. Glutatyon peroksidaz tahlilleri. Yöntemler Enzymol., 105:114-120. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1 Floreani, M., M. Petrone, P. Debetto ve P. Palatini, 1997. Memeli dokularında indirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyon tayini için farklı yöntemler arasında bir karşılaştırma. Serbest Radikal. Res., 26: 449-455. DOI: 10.3109/10715769709084481
- Glover, CN ve CM Wood, 2004. Gümüş ve hümik maddelerin Daphnia magna'daki fizyolojik etkileşimleri: Akut bir gümüş tehdidinin ardından üreme ve gümüş birikimi üzerindeki etkiler. Zorunlu biyokimya Fizyol. C Toksikol. Pharmacol., 139: 273-280. DOI: 10.1016/j.cca.2004.12.005 Kim, YY ve DC Mahan, 2001. Organik ve inorganik selenyumun yüksek diyet seviyelerinin büyüyen-bitiren domuzların selenyum toksisitesi üzerindeki karşılaştırmalı etkileri. J. Animasyon Sci., 79: 942-948. PMID: 11325201 Kocabağlı, N., M. Alp, N. Acar ve R. Kahraman, 2002. Diyete humat ilavesinin piliç büyümesi ve karkas verimi üzerine etkileri. Kümes Hayvanları Bilimi, 81: 227-230. DOI: 10.1093/ps/81.2.227 López-Alonso, M., M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández ve M. García-Vaquero ve diğerleri, 2007. İspanya'nın kuzeybatısındaki Galiçya'da kesim sırasında domuzların karaciğeri, böbrekleri ve kaslarındaki zehirli ve temel metaller. Gıda Katkısı. Contam., 24: 943-954. DOI: 10.1080/02652030701216719
- Öztürk, E., N. Ocak, A. Turan, G. Erener ve A. Altop ve diğerleri, 2012. Hümik madde katkılı yemlerle beslenen piliçlerin performans, karkas, gastrointestinal sistem ve et kalitesi özellikleri ve seçilmiş kan parametreleri. J. Sci. Gıda Tarım., 92: 59-65. DOI: 10.1002/jsfa.4541 Öztürk, E., N. Ocak, İ. Coşkun, S. Turhan ve G. Erener, 2010. İçme suyuna verilen hümik madde ilavesinin piliçlerde performans, karkas özellikleri ve et kalitesi üzerine etkileri. Animasyon Fizyol. Animasyon Nutr. (Berl), 94: 78-85. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2008.00886.x Paquin, PR, JW Gorsuch, S. Apte, GE Batley ve KC Bowles ve diğerleri, 2002. Biyotik ligand modeli: Tarihsel bir bakış. Karşılaştırmalı Biyokimya Fizyol. Bölüm C: Toksikol. Pharmacol., 133: 3-35. DOI: 10.1016/S1532-0456(02)00112-6
- Rajkowska, M. ve M. Protasowicki, 2013. Kuzeybatı Polonya'da farklı ganimetlere sahip iki gölde balık dokularında metallerin (Fe, Mn, Zn, Cu) dağılımı. çevre. Monit. Değerlendir., 185: 3493-3502. DOI: 10.1007/s10661-012-2805-8
- Rath, NC, WE Huff ve GR Huff, 2006. Etlik civcivler üzerinde humik asidin etkileri. Kanatlı Bilimi, 85: 410-414. DOI: 10.1093/ps/85.3.410 Sanmanee, N. ve M. Areekijseree, 2010. Fulvik asidin domuz yumurta kanalı epitel hücrelerinde bakır biyoyararlanımı üzerindeki etkileri. Biol. Elem'i İzleyin. Res., 135: 162-173. DOI: 10.1007/s12011-009-8508-5
- Smith, PK, RI Krohn, GT Hermanson, AK Mallia ve FH Gartner ve diğerleri, 1985. Bisinoninik asit kullanılarak protein ölçümü. Anal. Biochem., 150: 76-85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Steinberg, CEW, A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt ve R. Klöcking ve diğerleri, 2003. Saf hümik maddeler, ksenobiyotik kimyasallar olarak hareket etme potansiyeline sahiptir- bir inceleme Fresenius Çevresi. Bull., 12: 391-401.
- Stowe, HD, AJ Eavey, L. Granger, S. Halstead ve B. Yamini, 1992. Besleyici domuzlarda selenyum toksikozu. J. Am. Bilmek. İle. Doç., 201: 292-295. PMID: 1500326
- Tao, S., S. Xu, J. Cao ve R. Dawson, 2000. Görünür fulvik asitle komplekslenmiş bakırın balık solungaçlarına biyoyararlanımı. Boğa. çevre. Kontaminasyon Toxicol., 64: 221-227. DOI: 10.1007/s001289910033
- Timofeyev, MA, ZM Shatilina, AV Kolesnichenko, DS Bedulina ve VV Kolesnichenko ve diğerleri, 2006. Doğal Organik Madde (NOM), tatlı su amfipodları Gammarus lacustris Sars ve Gammarus tigrinus'ta (Sexton) oksidatif strese neden olur. bilim Toplam Çevre., 366: 673-681. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.02.003
- Vašková, J., B. Velika, M. Pilátová, I. Kron ve L. Vaško, 2011. Hümik asitlerin in vitro etkileri. Vitro Hücre. Dev. Biol. Anim., 47: 376-382. DOI: 10.1007/s11626-011-9405-8
- Wang, W., Z. Wang, CH Yang ve AN Peng, 1992. Hümik maddeler ve Kaschin-Beck hastalığı. Küresel çevrede bulunan hümik maddeler ve insan sağlığı üzerindeki etkileri. Davetli ve gönüllü bildiri özetleri. Monopoli (Bari) İtalya.
- Wiegand, C., N. Meems, M. Timofeyev, CEW Steinberg ve S. Pflugmacher, 2004. Organizmalar Üzerinde Biyoenerjetik Olarak Hareket Eden Humik Maddeler İçin Daha Fazla Kanıt. İçinde: Hümik Maddeler: Doğanın En Çok Yönlü Malzemeleri. Davies, G. ve E. Ghabbour (Eds.), Taylor ve Francis, New York, ISBN-10: 0203487605, s: 349-363.
- Zrali, Z. ve B. Písaříková, 2010. Sodyum humatın sütten kesilmiş domuz yavrularının organlarındaki iz elementlerin içeriği üzerindeki etkisi. Açta Vet. Brno, 79: 73-79. DOI: 10.2754/avb201079010073