

Hümik Asitin Sıçanlarda Demir Birikimi Üzerindeki Akut Etkisi

Yasir Furkan Cagin¹ & N. Sahin² & A. Polat³ & MA Erdoğan¹ & Y. Atayan¹ & E. Eyo⁴
Bilgic¹ & Y. Seckin¹ & C. Colak⁵Geliş tarihi: 13 Haziran 2015 /Kabul tarihi: 18 Ağustos 2015 /Çevrimiçi yayın tarihi: 17 Eylül 2015
Springer Science+Business Media New York 2015

Özet Serbest demir, pro-oksidan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar. Hümik asitler (HA'lar), hücre duvarının geçirgenliğini artırır ve elektron aktarımı yoluyla bir şelatör görevi görür. Bu çalışma, HA'nın demir üzerindeki şelatör etkisinin yanı sıra demir kaynaklı hepatotoksisite ve kardiyotoksisiteye karşı antioksidan etkisini test etmek için tasarlanmıştır. Kullanılan sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı (n = 8/grup): grup I (kontrol grubu); grup II (HA grubu), oral sonda ile 10 gün boyunca hümik asit (562 mg/kg) verildi; grup III (demir grubu), demir III hidroksit polimaltoz (250 mg/kg) 10 günde intraperitoneal yoldan verildi; ve grup IV (HA artı demir grubu), demir (grup II'ye benzer) artı hümik asit (grup II ve III'tekilere benzer) grubunu aldı. Biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler için karaciğer ve kalpten kan ve ikiye doku örneği alındı. Demir birikimi, demir kaynaklı hepatotoksisite ve kardiyotoksisite histopatolojik ve biyokimyasal yolla gösterildi. Bununla birlikte, serum biyokimyasal değerlerinde önemli bir fark gözlenmedi ve

karaciğer dokusunda demir ve HA artı demir grupları arasında histopatolojik sonuçlar, ancak kalp dokusunda değil. Çalışmamızda hümik asidin demire bağlı kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etkileri gösterilmiş ancak hepatotoksisiteye karşı gösterilememiştir.

Anahtar Kelimeler Demir . hepatotoksisite Hümik asit . Şelasyon kardiyotoksisite

Giriş

Demir, demir-kükürt kompleksleri ile hemoglobin, miyogloblin ve sitokrom enzimlerinde fonksiyonel formda bulunan, vücudun esansiyel bir eser elementidir [1]. Temel demir, hem elektron verici hem de alıcı olarak hizmet edebildiği için oksijen taşınmasında, enerji üretiminde ve mitokondriyal solunumda temel bir rol oynar [2]. Bu temel fonksiyonların yanı sıra, solunum enzimleri ve RNA ve DNA sentezinde rol oynayanlar da dahil olmak üzere birçok enzim için bir kofaktör görevi görür [3]. Hem hem hem de iyonik (hem olmayan) demir duodenal enterositler tarafından emilir. Diyetle alınan hem olmayan demirdeki oksitlenmiş (Fe³⁺) form, ferreredüktaz ile ferröz demire (Fe²⁺ formu) indirgenir. Daha sonra ferröz demir, heme taşıyıcı proteinler, iki değerlikli metal taşıyıcı veya integrin-mobilferrin yolu ile hücreye taşınır [4]. Burada emilen demir ya depolanır ya da enterositten kana ferroportin ile taşınır. Daha sonra, ferröz demir, plazma transferrin tarafından bağlanmadan önce hephaestin adı verilen bir multi-bakır oksidaz proteini tarafından oksitlenir. Plazma transferrin tarafından bağlanan demir, eritrosit, karaciğer, kas ve retikuloendotelial sistemin makrofajları gibi demir için depolama organlarına taşınır. Demir, bu depolama organlarında hemoglobin, ferritin, miyogloblin veya hemosiderin şeklinde tutulur. Karaciğer tarafından transferrine bağlı demir alımına aracılık eder

* Yasir Furkan Cagin
yasir.cagin@inonu.edu.tr; yafur@hotmail.com

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, 44280 Malatya, Turkey

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Malatya, Turkey

³ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Turkey

⁴ Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İnönü Üniversitesi, Malatya, Turkey

⁵ Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Tıp Fakülte, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye

transferrin reseptörü 1 (TfR1) ve TfR2. Demirin emilimi vücudun demir depolarına, hipoksiye ve eritropoez hızına bağlıdır [5]. Genellikle demir, hepatosit tarafından üretilen hepsidin tarafından kontrol edilen ferroportin (Fpn) yoluyla ihraç edilir [6]. Hücrelerden Fpn bazlı demir salınımı, sistemik demir homeostazı için gerekli ve önemli bir sınırlayıcı adımdır. Hepsidin özellikle ferroportin aktivitelerini azaltır. Hepsidin özellikle sistemik aşırı demir yükünde Fpn'nin negatif düzenleyicisi olarak görev yapar. Hepatositte hepsidin üretimi, TfR1/HFE, TfR2 genleri ve hemojuvelin [7] aracılığıyla kontrol edilebilir.

Vücut demir alımını düzenler ve aynı zamanda fazlalığı da önler. Normal olarak terapötik dozlamada demirin %10 ila 35'i emilir. Plazmada transferrin tarafından taşınır ve serbest konsantrasyonu korumak için ferritin tarafından retikuloendotelial hücrelerde depolanır. Ayrıca taşıma ve depolama proteinleri doymuş hale gelir ve hücrel toksisite için dolaşımdaki serbest demirin artmasına neden olur. Ancak akut zehirlenmelerde bu koruyucu mekanizmalar yetersiz kalmaktadır [8]. Aşırı doz durumunda emilen demir miktarı

Bilinmeyen. Demir toksisitesi, alınan elemental demir miktarından kaynaklanmaktadır [9]. 60 mg/kg'dan fazla yutulması ciddi toksisite ile ilişkilendirilebilir. Ancak her bir demir hazırlama formunun elemental demir içeriği farklıdır. Bunun nedeni, önceki birkaç çalışmada demirin uygulama süresi, hazırlama şekli ve dozajının farklı şekilde uygulanmasıdır [1, 10-13].

Demire bağlı hepatotoksite/hepatik nekroz, alımdan 12 ila 96 saat sonra ortaya çıkar ve deneysel çalışmada tercih edilen parenteral yol nedeniyle oral alımda demir emilimi, parenteral alıma göre daha düşüktür. Doruk serum demir konsantrasyonları, terapötik doz uygulamasından 2 ila 3 saat sonra ve aşırı doz alımından 4 ila 6 saat sonra ortaya çıkar [9]. Demirin 10 günlük uygulaması, hazırlama şekli ve dozu tüm bu nedenler, daha önce yapılmış farklı çalışmalar ve bizim ön çalışmamız dikkate alınarak belirlenmiştir [1, 10-12].

Transferrinin demir bağlama kapasitesi aşılsa, transferrine bağlı olmayan demir (NTBI) oluşur. Olumlu etkilerine rağmen, kan dolaşımından NTBI oluşursa, aşırı yüklenmesi durumunda karaciğerde, pankreasta, diğer endokrin organlarda ve kalpte demir birikebilir. Hepatotoksite aşırı demir yüklenmesi olan hastalarda en sık görülen bulgudur. Serum ferritin, demir düzeyi, demir bağlama kapasitesi ve transferrin doygunluğunun yanı sıra anormal karaciğer fonksiyon testleri olabilir [14]. Demir toksisitesinin şiddetinin en iyi tahmini, akut fazda serum demir konsantrasyonu ölçülerek belirlenebilir [15]. Toplam demir bağlama kapasitesi (TIBC), kandaki transferrine bağlanabilen demir seviyesini yansıtır. TIBC değil

akut demir toksisitesinin ciddiyetini ölçmek için kullanılır [16]. Serum ferritini, demir toksisitesini tahmin etmek için en önemli belirteçlerden biridir. Kandaki ferritin düzeyi, karaciğerde bulunan demir düzeyini dolaylı olarak gösterir. Önceki bir çalışmada kullanılmış ve seviyesini arttırdığı gösterilmiştir [10]. Yine de; akut demir toksisitesi, aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz gibi karaciğer enzimleri ile değerlendirildi.

(ALT), laktat dehidrojenaz (LDH), alkalın fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT). Bu testler de çok faydalıdır. Genellikle demir toksisitesini belirtmek için kullanılırlar [11, 12]. Aşırı demir yüklenmesi durumunda, bir pro-oksidan olan serbest demir, enerji üretimi için gerekli olan birçok reaksiyon sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Demir, antioksidan sistem tarafından detoksifiye edilememekte ve biriktiği dokularda hidroksil radikalleri yoluyla oksidatif strese neden olmaktadır [17, 18]. Doku yaralanması tarafından indüklenen proinflatuar mediatörler nedeniyle fibroz ve nekroz dahil olmak üzere birçok yaralanmaya yol açar [19]. Demir döngüsünü düzenleyen dokularda demir birikimini önlemek için çeşitli şelatörler kullanılır. Desferrioksamin birçok dezavantajına rağmen en yaygın kullanılan demir şelatörüdür [20]. Bu nedenle, birçok alternatif şelatör üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır [20, 21].

Hüyük asitler (HA), toprak ve sulu sistemlerde bitki ve hayvan kalıntılarının ayrışması sonucu oluşan organik bileşikler ve hüyük maddelerin ana bileşenidir [22-24]. HA'ların çeşitli kimyasal yapıları, heterojen fonksiyonel grupların içeriği, adsorpsiyon kapasiteleri ve kompleks oluşturma yetenekleri nedeniyle çeşitli etkiler sergiledikleri gösterilmiştir [25]. Örnek olarak, hayvanlarda, ağır metaller [26, 27] ve ayrıca antioksidan [28], immün sistemi uyarıcı ve anti-guatrojenik etkiler [29] gibi farklı malzemeleri bağlama konusunda güçlü bir eğilim göstermişlerdir.

Bu çalışma, hemokromatoz, talasemi ve demir birikimi ile karakterize edilen diğer bozukluklarda kullanılabilecek alternatif şelatörlerin araştırılmasında, HA'nın demir üzerindeki şelatör etkisinin yanı sıra demir kaynaklı hepa totoksisite ve kardiyotoksisiteye karşı antioksidan etkisini test etmek için tasarlanmıştır.

Malzemeler ve yöntemler

Hayvanlar

Çalışma, İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırma Merkezi'nde (IUEARC) gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (referans numarası: 2014/A-33). Çalışma protokolü, İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından kabul edilen Uluslararası Hayvan Deneyleri Tıbbi Kurulu kurallarına uygun olarak tasarlandı. Çalışmada 32 dişi Wistar Albino sıçan (ağırlık 210-230 g; ortalama 220 g) kullanıldı. Sıçanlar IUEARC tarafından sağlandı. Sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı (her birinde sekiz sıçan). Tüm hayvanlar, standart ticari pelet diyeti ve su ad libitum ile beslendi. Sıçanlar deneyden önce 12 saat aç bırakılarak bir gün aç bırakıldı. Tüm sıçanlar, 21 ± 2 °C sıcaklık ve % 60 ± 5 nem ile standart koşullarda, 12 saatlik bir karanlık-ışık döngüsü sürdürülerek barındırıldı.

HA'nın hazırlanması

HA'nın yüzde kırk beşi Farmavet Internationals Pharmaceuticals Company'den temin edildi. Başlangıçta hümik asit, deiyonize su ile çözüldü ve ardından çözelti bir zardan süzüldü. Daha sonra 1 g hümik asit 8,5 mL 0,85 M NaOH içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı, ardından 3000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi ve tam olarak çözüldü. Hazırlanan çözeltiler 4°C'de [30] saklandı.

Demir İdaresi

Ön çalışmalarımızda oral demir alımı yeterli doku birikimini sağlayamadığı için daha kolay olduğu için intraperitoneal demir verdik. Demir III hidroksit polimaltoz 250 mg/kg dozunda 10 günde intraperitoneal yolla verildi. Akut maruziyet süresi olarak 10 günü seçtik [31].

DeneySEL tasarım

Otuz iki sıçan rastgele olarak her birinde sekiz sıçan bulunan dört gruba ayrıldı.

- Grup I (kontrol): kontrol fareleri, standart ticari pelet diyeti ve su ad libitum ile beslendi.
- Grup II (HA): 562 mg/kg (HA, %45; Farmavet Internationals Pharmaceuticals Company) dozunda hümik asit 10 gün boyunca oral sonda ile verildi.
- Grup III (demir): demir III hidroksit polimaltoz 250 mg/kg dozunda (Ferrum Hausman Vial, Abdi Ibrahim Pharmaceuticals) 10 gün boyunca intraperitoneal yolla verildi.
- Grup IV (HA artı demir): demir III hidroksit polimaltoz (250 mg/kg; ip) artı hümik asit (562 mg/kg; PO) 10 günde verildi.

Sağlık durumu tüm gruplarda deneyler boyunca izlendi ve kaydedildi. Tüm sıçanlarda anestezi altında (xylazine, 70 mg/kg ve ketamine, 10 mg/kg) 11. günde verilen son dozdan 24 saat sonra 3 cm median insizyonla laparotomi yapıldı [32]. ALT, AST, demir bağlama kapasitesi (TIBC) ve transferrin doygunluğunun (TS) ölçümü için Olympus otomatik analiz cihazı (Olympus Instruments, Tokyo, Japonya) ile kan örneği (5 mL) intrakardiyak yolla alındı. Kan örneklerinde demir tayini için, demir konsantrasyonu tayini için bir Architect 1600 atomik absorpsiyon spektrometresi kullanıldı. Aynı zamanda bu tespit için Abbott marka ticari demir analiz kiti kullanıldı. Daha sonra sıçanlar öldürüldü. Ayrıca biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler için karaciğer ve kalp örnekleri alındı.

Doku örnekleri, biyokimyasal analizler için -70 °C'de ve histopatolojik değerlendirmeler için %10 formalinde saklandı.

Doku örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra oksidatif stres ve antioksidan sistem belirteçleri analiz edildi.

Demir ve hümik asit dozları, önceki doz-yanıt çalışmalarında [27, 31].

Biyokimyasal Analiz

İki yüz miligram donmuş karaciğer ve kalp dokusu kuru buz üzerinde parçalara ayrıldı ve bir homojenleştirici (Ultra Turrax IKAT18 basic) kullanılarak doku ağırlığına göre (50 mmol/L, pH 7.4) 10 hacim buz soğukluğundaki Tris-HCl tamponunda homojenleştirildi homojenleştirme; Werke, Staufen, Almanya) 6000 rpm'de 3 dakika. Süpernatant solüsyon, eşit hacimde bir etanol/kloroform karışımı (3/5, hacim/hacim (v/v)) ile özümledi. 3000xg'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra, üst tabaka toplam doku protein seviyelerinin analizinde kullanıldı.

Malondialdehit Tayini

Homojenatların malondialdehit (MDA) içerikleri, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) varlığı ölçülerek spektrofotometrik olarak belirlendi.

[33]. Bir tüpe pipetlenen 0.5 mL homog enata 3 mililitre %1 fosforik asit ve 1 mL %0.6 tiobarbitürik asit çözeltisi ilave edildi. Karışım 45 dakika kaynar suda ısıtıldı. Karışım soğuduktan sonra renkli kısmın özü, 4 mL n-butanol içine alındı. Absorbans

532 ve 520 nm'de spektrofotometre (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile ölçülmüştür. Lipit peroksidlerin miktarı, lipid peroksidasyonun TBARS'ı olarak hesaplandı. Sonuçlar, hazırlanan standart bir grafiğe göre doku gramı başına nanomol olarak verildi.

Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin protein içeriği Lowry ve ark. [34] standart olarak sığır serum albümini kullanıyor.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Sun ve ark. [35]. Yöntemin prensibi, bir süperoksit üretici olarak ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanılarak nitrobluetetrazolium (NBT) indirgemesinin inhibisyonudur. Bir ünite SOD, NBT indirgeme oranında %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak tanımlandı. SOD aktivitesi, miligram protein başına birim olarak ifade edildi.

Katalaz Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre belirlendi [36]. Testin prensibi aşağıdakilere dayanmaktadır:

hız sabitinin ($k; s^{-1}$) veya 240 nm'de H₂O₂ ayrışma konum oranının belirlenmesi. Sonuçlar, gram protein başına k olarak verilmiştir.

Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Glutasyon peroksidaz (GPX) aktivitesinin belirlenmesi Paglia ve Valentine'in [37] yöntemiyle ölçüldü. NADPH, glutasyon (GSH), sodyum azit ve glutasyon redüktaz içeren bir tüpte enzimatik reaksiyon H₂O₂ ilave edilerek başlatıldı ve 340 nm'de absorbanstaki değişim spektrofotometre ile gözlemlendi. Etkinlik, protein gramı başına birim olarak hesaplandı.

Glutasyon İçeriğinin Belirlenmesi

Protein olmayan sülfhidril olarak karaciğer ve kalp dokusundaki GSH içeriği, daha önce tarif edilen bir yöntem izlenerek analiz edildi [38]. Doku homojenatı örnekleri cam tüplerde distile su ve %50 trikloroasetik asit ile karıştırıldı ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar, Tris tamponu (0.4 mol, pH 8.9) ile karıştırıldı ve 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit (DTNB), 0.01 mol) eklendi. Reaksiyon karışımı çalkalandıktan sonra, homojenat içermeyen köre karşı DTNB ilave edildikten sonraki 5 dakika içinde 412 nm'de absorbanı ölçüldü. Absorban değerleri, bir glutasyon standart eğrisinden tahmin edildi ve GSH ($\mu\text{mol/g}$ doku) olarak verildi.

Toplam Antioksidan Kapasitesinin Tayini

Toplam antioksidan kapasite (TAC) seviyeleri, Erel [39] tarafından geliştirilen yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde, en güçlü biyolojik radikal olan hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ile üretilir ve renksiz substrat O-dianisidin ile reaksiyona girer.

parlak sarımsı kahverengi olan dianisil radikalini üretmek için. Numunelerin eklenmesi üzerine, reaksiyon karışımında bulunan hidroksil radikallerinin başlattığı oksidatif reaksiyonlar, numunenin antioksidan bileşenleri tarafından bastırılarak renk değişimi önlenir ve böylece toplam antioksidanın etkin bir şekilde ölçülmesi sağlanır. örneğin kapasitesi. Tahlil, %3'ün altında olan mükemmel kesinlik değerlerine sahiptir. Sonuçlar litre başına milimol troloks eşdeğeri olarak verildi.

Toplam Oksidan Durumunun Belirlenmesi

Toplam oksidan durumu (TOS), Erel [39] tarafından geliştirilen yeni bir otomatik ölçüm yöntemi kullanılarak belirlendi. Numunede bulunan oksidanlar, demir iyonu-O dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından güçlendirilir. Ferrik demir renkli hale getirir

asidik bir ortamda ksilenol portakal ile kompleks. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örneklerde bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar, litre başına H₂O₂ eşdeğerinin mikromol cinsinden hesaplandı.

Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü

TOS'un TAC'ye oranı, oksidatif stres derecesinin bir göstergesi olan oksidatif stres indeksi (OSI) olarak kabul edildi [39]. OSI değeri şu formülden hesaplandı: OSI (keyfi birim) = TOS/TAC. Karaciğer ve kalp örneklerinin OSI değeri de OSI (keyfi birim) olarak verildi.

Histolojik Analizler

Karaciğer ve kalp dokusu örnekleri, %10 tamponlu formalinde sabitlendi. Fiksasyon, dehidrasyon ve parafin dahil olmak üzere rutin doku işlemeden sonra 5 mikron kalınlığında kesitler elde edildi ve hematoksilin, eozin ve Prusya mavisi ile boyandı. Tüm preparatlar gruplara kör olan bir patolog tarafından değerlendirildi.

İstatistiksel analiz

Veriler medyan (min-maks) değerler olarak ifade edildi. Değişkenler gruplar arasında Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırıldı. Anlamlı farklılıklar belirlendiğinde, Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalar yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler için Windows için IBM SPSS istatistikleri sürüm 22.0 kullanıldı. Bu çalışmada toplam 32 denekten oluşan dört grup bulunmaktadır. Bu bilgi [BAnimals](#)^ ve [BMaterials and Methods](#)^: [BThe rats](#) bölümlerinde verilmektedir.

rastgele dört gruba ayrıldı (her birinde sekiz sıçan).^ Gruplar için tanımlayıcı istatistikler Tablo 1, 2 ve 3'te verildi.

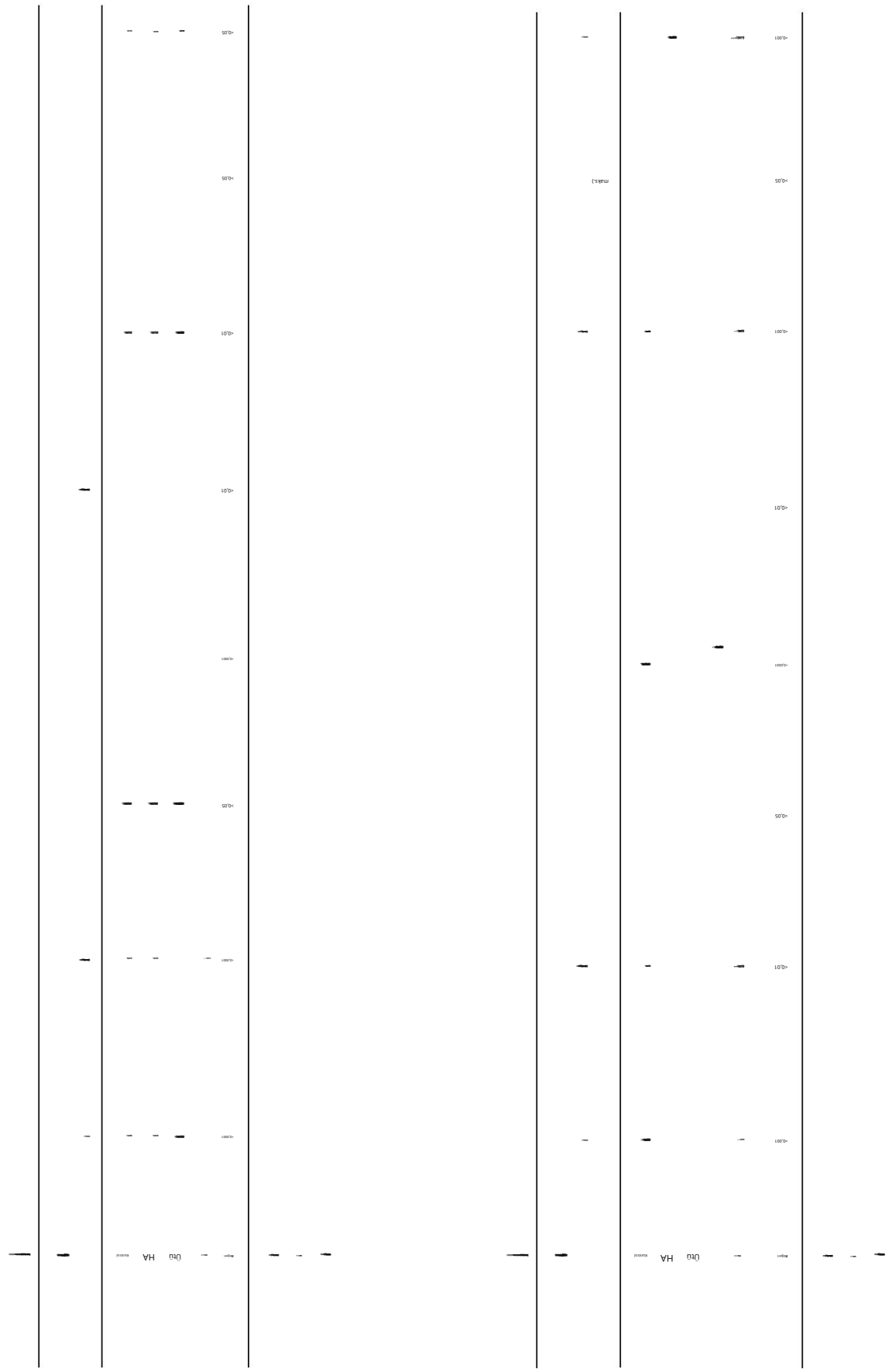
Sonuçlar

Vücut ve Karaciğer Ağırlıkları

Deney süresince hayvanların hiçbiri ölmedi. Gruplar arasında deneylerden önce ve sonra vücut ve karaciğer ve kalp ağırlıkları arasında fark yoktu (veriler gösterilmemiştir).

Biyokimyasal Sonuçlar

Karaciğer dokusuna ait prooksidan ve antioksidan sistemlerin biyokimyasal parametrelerinin sonuçları şöyledir:



Tablo 3 Çalışma grupları arasında serum biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması

Gruplar (n = 8)	TÜMÜ (U/L) Medyan (min-maks)	AST (U/L) Medyan (min-maks)	Demir (mg/dL) Medyan (min-maks)	TIBC (mg/dL) Medyan (min-maks)	TS (%) Medyan (min-maks)
Kontrol	25.00 (20.00–32.00)	50.00 (21.00–72.00)	157.500 (132.00–184.00)	110,35 (101,80–131,20)	132,60 (122,79–150,00)
HA	28.00 (14.00–52.00)	67,50 (54,00–87,00)	159,50 (103,00–182,00)*	122,00 (97,60–167,70)	135,01 (81,74–150,83)
Ütü	212,00 (138,00–436,00)*, **	278,50 (101,00–502,00)*, **	414,50 (394,0–428,0)*, **	41,00 (40,00–41,10)*, **	1009,74 (960,97–1043,90)*, **
HA + demir	63,50 (26,00–155,00)	162,50 (159,00–227,00)*	413,00 (230,00–516,00)*, **	49,05 (40,00–73,00)*, **	874,63 (323,94–1230,00)*, **
P değeri	<0,001	<0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

HA hümik asit, ALT alanin transaminaz, AST aspartat transaminaz, TIBC toplam demir bağlama kapasitesi, TS transferrin doygunluğu (demir/TIBC × 100)

*P < 0.05, grup I'e göre; Grup II'ye karşı P < 0.05

Tablo 1'de sunulmuştur. Kısaca, MDA düzeyleri demir grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (P < 0.0001). Bununla birlikte, demir ve MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

HA artı demir grupları (P > 0.05). Demir ve kontrol grupları arasında SOD, CAT, GPX ve GSH düzeyleri karşılaştırıldığında SOD, GPX ve GSH düzeylerinde anlamlı fark olduğu görüldü (P < 0.0001, P < 0.0001 ve P < 0.05, sırasıyla) (Tablo 1). Demir ve HA artı demir grupları arasında aynı parametreler karşılaştırıldığında, sadece SOD düzeylerinde anlamlı fark gözlemlendi (P < 0.005) (Tablo 1). Demir ve kontrol grubu arasında TOS, TAC ve OSI seviyeleri karşılaştırıldığında, hem TOS hem de OSI seviyelerinde anlamlı fark olduğu görüldü (P < 0.001 ve P < 0.005) (Tablo 1). Demir ve HA artı demir grupları arasında aynı parametreler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.

Kalp dokusunda MDA düzeyleri demir grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (P < 0.0001). Ayrıca demir ve HA artı demir grupları arasında MDA düzeylerinde anlamlı bir fark bulundu (P < 0.05). Demir ve kontrol grupları arasında SOD, CAT, GPX ve GSH düzeylerinde anlamlı farklılıklar vardı (sırasıyla P < 0.05, P < 0.05, P < 0.0001 ve P < 0.05) (Tablo 2). Demir ve HA artı demir grupları arasında aynı parametreler karşılaştırıldığında, SOD ve GSH seviyelerinde istatistiksel analizlerle kanıtlanmış farklılıklar vardı (sırasıyla P < 0.01 ve P < 0.05) (Tablo 2).

Demir ve kontrol grupları arasında karşılaştırma yapıldığında TOS ve OSI seviyelerinde önemli farklılıklar gözlemlendi (P < 0.05 ve P < 0.001) (Tablo 2). Demir ve HA artı demir grupları aynı parametrelerde de karşılaştırıldığında benzer farklılıklar gözlemlendi (P < 0.05 ve P < 0.05) (Tablo 2).

Demir ve kontrol grupları arasında ALT, AST, demir, TIBC ve TS düzeyleri karşılaştırıldığında, değerlendirilen tüm parametrelerde anlamlı farklılıklar bulundu. Ancak aynı parametreler demir ve HA artı demir grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir istatistiksel fark gözlemlenmedi (P > 0,05) (Tablo 3).

Histopatolojik Sonuçlar

Kontrol ve HA gruplarında tüm organların normal morfolojide olduğu ve demir birikimi olmadığı gözlemlendi (Şekil 1 ve 2).

Karaciğerde demir birikiminin değerlendirilmesinde kontrol ve HA gruplarında demir birikimi gözlenmezken, demir ve HA artı demir gruplarından hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmış örneklerde benzer morfolojik bulgular gözlemlendi. : portal alanlarda doku makrofajları, hepatosit sitoplazması, Kupffer hücreleri ve biliyer kanal epitelini içine alan kahverengi pigmentlerin zon 2'de daha belirgin olduğu gözlemlendi. Ayrıca hepatositlerin bazı çekirdeklerinde binükleasyon, bazılarında nükleer piknoz kaydedildi. (Şek. 1).

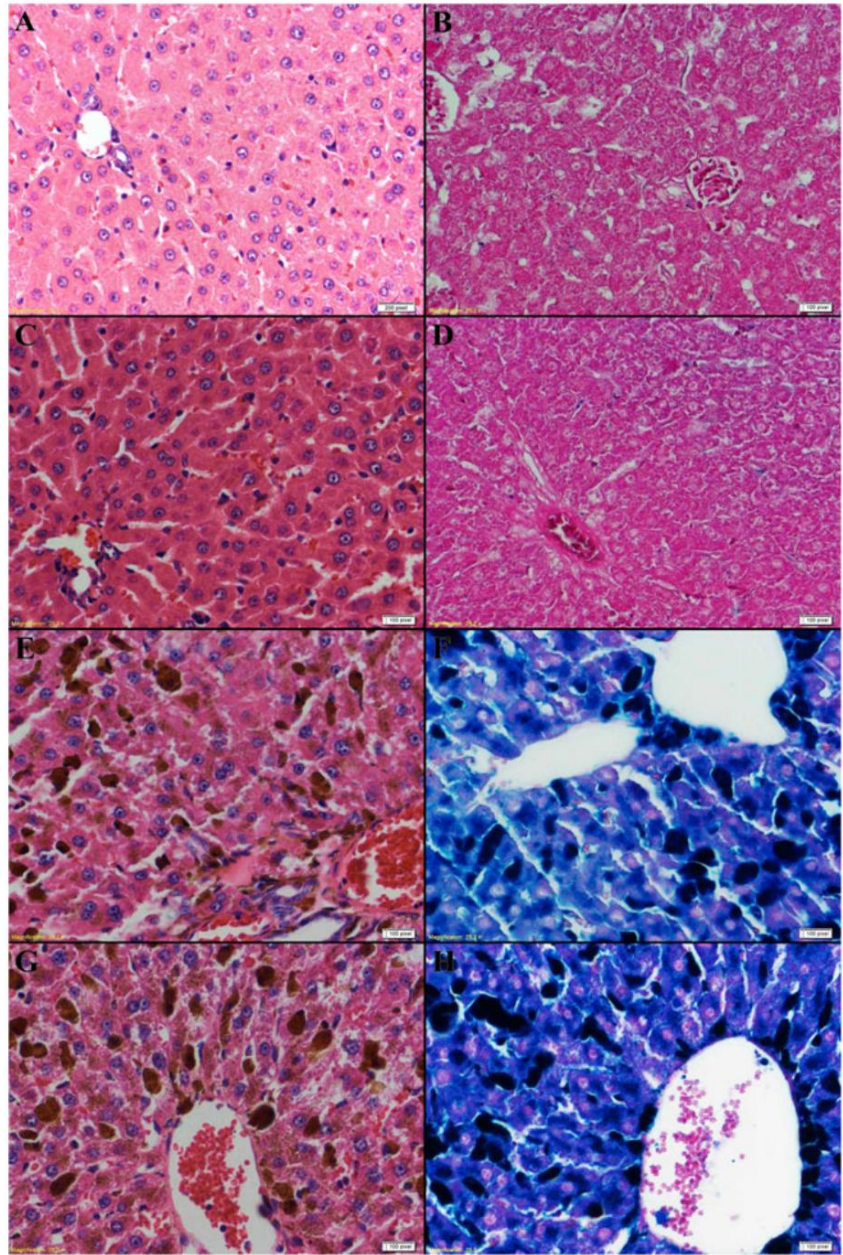
H&E- ve Prusya mavisini ile boyanmış kalp örneklerinde HA grubunda demir birikimi gözlenmezken, demir grubunda dejeneratif nükleer değişiklikler, interstisyel ödem ve inflamatuvar hücreler gözlemlendi. Miyositlerde yaygın demir birikimi tüm olgularda dikkat çekiciydi (Şekil 2).

Demir pigmentini derecelendirmek için LeSega tarafından önerilen hepatik demir biriktirme derecelendirme sistemi kullanıldı [40] (Tablo 4). Prusya mavisini ile boyanan kesitler değerlendirildiğinde makroskopik mavi renklenme dikkat çekiciydi. H&E kesitlerinde olduğu gibi, ışık mikroskopunda tüm hepatositlerin %75'inden fazlasında (LeSega derece 4) demir birikimi, bölge 2'de globüllerin daha büyük olması gözlemlendi. HA artı demir grupları.

Tartışma

Demir biriktiği dokunun çeşitli fizyolojik fonksiyonlarında bozulmalara neden olur. Demir birikiminin patolojiye neden olduğu mekanizma hakkında daha önce yapılmış ve devam eden birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda, ROS yükselmesinin demir kaynaklı hepatotoksistide önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir [41, 42]. Artan ROS, oksidatif stresi ve proinflamatuvar mediatörlerin salınmasını uyarak doku hasarına neden olur [43, 44]. Ayrıca, ROS yükselmesi yol açarak hücre ölümü

Şekil 1 a, b Kontrollerin karaciğer dokusunda pigment gözlenmedi (H&E, $\times 400$; Prusya mavisi, $\times 400$); c, d HA grubunda karaciğer dokularında sarı-kahverengi pigment gözlenmedi (H&E, $\times 400$; Prusya mavisi, $\times 400$); Demir grubunda karaciğer dokusunda diffüz sarı-kahverengi pigment dikkati çekiyordu (H&E, $\times 400$); f merkezi damar çevresinde ve tüm bölgelerde yaygın demir birikimi (Prusya mavisi, $\times 400$); g HA artı demir grubunda (H&E, $\times 400$) sarı-kahverengi pigment varlığı; h HA artı demir grubunda diffüz demir birikimi, bölge 2'de daha belirgindir (Prusya mavisi, $\times 400$)



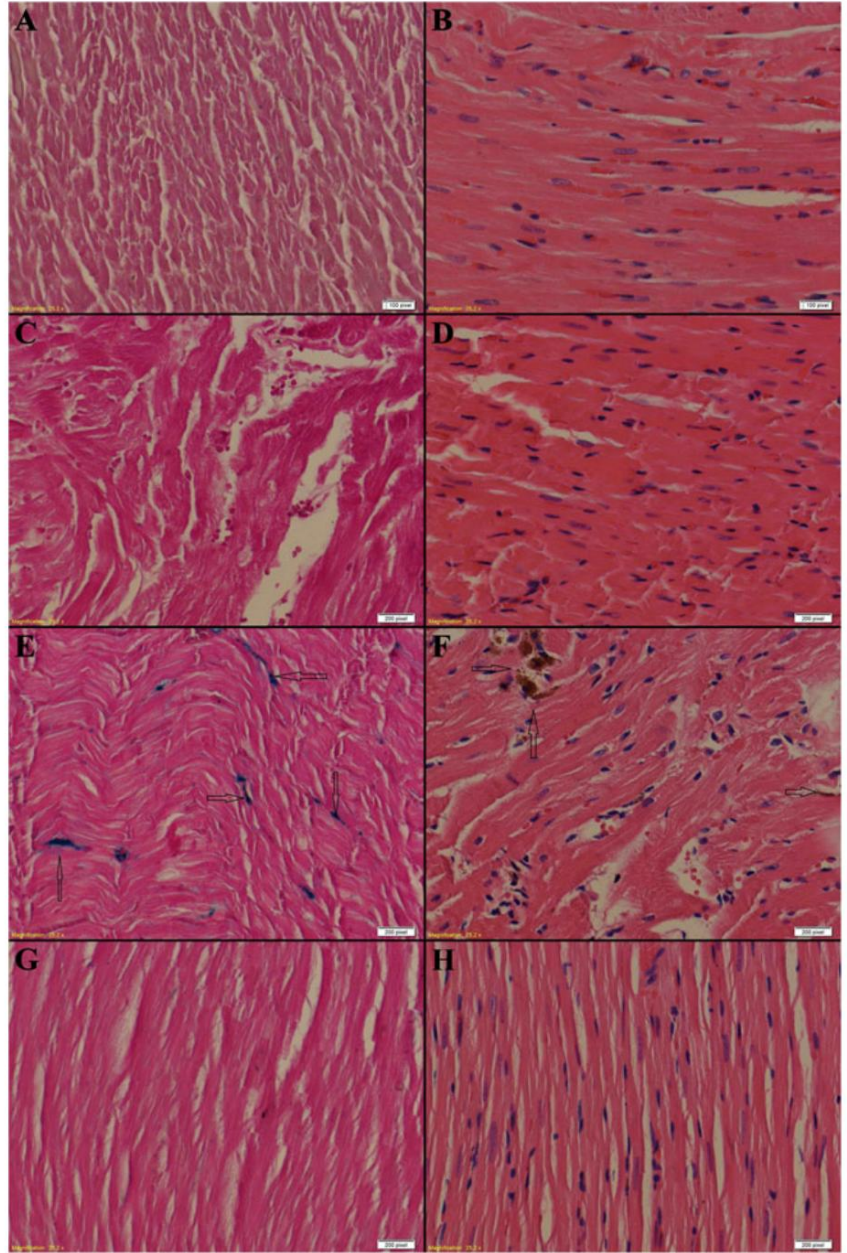
apoptoz [41]. Serbest demirden kaynaklanan ROS aktivitesini azaltmayı amaçlayan çalışmalarda birçok antioksidan, antiinflamatuvar ajan veya şelatör kullanılmıştır [21, 45]. Bu çalışmada HA ile ilgili tıp literatüründe neredeyse hiç çalışma olmadığı için şelatör ve antioksidan olarak HA kullanmayı tercih ettik. HA, suda ve toprakta doğal olarak bulunan ve elektron aktarma özelliğinden dolayı birçok işlevi olan bir bileşiktir. Bunlardan antiinflamatuvar, antioksidan ve şelasyon etkileri çalışmamızda test edilmiştir.

Karaciğer ve kalp, öncelikle çeşitli dokularda birikebilen demirden etkilenen organlardır. Her iki dokunun (karaciğer ve kalp) ekstraktlarında da MDA üretiminde önemli artışlar gözlenmiştir.

çalışmamızda kontrol grubu ile demir verilen grup karşılaştırıldı. MDA, aktif ROS'un neden olduğu hücrelipid membranda lipid peroksidasyonu sonucu salınır [12]. Bu bulgu, lipit peroksidasyonunu ve demirin neden olduğu artmış oksidatif stresi doğruladı. Demirin neden olduğu artmış lipid peroksidasyonu bulgusu önceki çalışmalarla uyumluydu [41]. Karaciğer dokusunda değil kalp dokusunda demir artı HA alan grupta demirin neden olduğu lipid peroksidasyonunda belirgin azalma gözlemlendi.

Muhtemelen bunun nedeni kalp kası hücre zarlarının ve sarkoplazmik zarların hücre dışı sıvılarla doğrudan temas halinde olmasıdır. Membranların demir toksitesine aşırı maruz kalması özellikle kolaydır [46].

Şekil 2 a, b Kontrol grubunda normal morfolojiye sahip kalp dokusu (H&E, ×400; Prusya mavisi, ×400); c, d HA grubunda kalp dokusunda demir birikimi gözlenmedi (H&E, ×400; Prusya mavisi, ×400); demir grubunda kalp dokusunda sarı-kahverengi pigment gözlendi (H&E, ×400); f demir grubunda kalp dokusunda mavi renkli demir birikimi gözlendi (Prusya mavisi, ×400); g sarı-kahverengi pigment birikimi kalp dokusunda gözlendi HA artı demir grubu (H&E, ×400); HA artı demir grubunda h mavi renkli demir birikimi gözlendi (Prusya mavisi, ×400)



Bu sonuçlar, HA'nın antioksidan aktivitesini göstermiştir. Demirin neden olduğu lipid peroksidasyonunu, dolayısıyla oksidatif stresi azaltmayı amaçlayan çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlenmiştir [20, 45].

Tablo 4 LeSega demir biriktirme sınıflandırması

Derece 0: demir birikimi yok
Derece 1: hepatositlerin %25'inden azında demir birikimi
Derece 2: hepatositlerin %25-50'sinde demir birikimi
Derece 3: hepatositlerin %50-75'inde demir birikimi
Derece 4: hepatositlerin %75'inden fazlasında demir birikimi

Bu çalışmada demir tedavisi, karaciğer ve kalp dokusu ekstraktlarında SOD, CAT, GPX aktivitelerinde ve GSH konsantrasyonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir düşüşe neden olmuştur. Biyolojik zararın bütünlüğünü oksidatif strese karşı korumak için birçok dokuda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerin bulunduğu bilinmektedir. Normalde oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge vardır. Oksidan sistemi destekleyen dengesizlik, birçok bozukluğun gelişiminde önemli bir rol oynar. SOD, CAT ve GPX, hücre zararını ROS'a karşı koruyan endojen enzimatik antioksidanlardır [10]. SOD, hidrojen peroksit oluşumunda önemli bir rol oynarken, GPX ve CAT enzimatikte rol oynar.

ROS'un katabolizması. [12]. GPX, traselüler hidrojen peroksite zararlı birikimini önlemede yer alan çok önemli bir antioksidan enzimdir. Pek çok fizyolojik koşul altında hücre içi peroksite uzaklaştırılmasında katalazdan daha etkili olduğu bulunmuştur [47]. Bulgularımız, demir kaynaklı doku hasarının, antioksidan sistemi tüketen ROS ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir. Demir, iyi bilinen bir ROS indükleyicisidir. Oksidasyon başına lipidi artıran ROS, hücre disfonksiyonuna yol açabilir. ROS kaynaklı oksidatif baraj ile ilişkilendirilen demirin zararlı etkileri

yaş önceki çalışmalarda gösterilmiştir [12]. Demir tedavisi ile birlikte HA tedavisi, sıçan kalbindeki demir grubuna göre SOD ve GSH düzeylerinde önemli bir artışa neden olurken, karaciğerde sadece SOD'de önemli bir artışa neden oldu. Muhtemelen bu durum kalp kası hücre zarları ve sarkoplazmik zarların hücre dışı sıvılarla doğrudan temas halinde olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak demirin olumsuz etkilerine karşı kullanılan HA'nın enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemi geliştirdiği gösterilmiştir. Bu, HA'nın demir kaynaklı doku hasarında koruyucu ve terapötik olabilecek umut verici bir bileşik olduğunu düşündürür. Naik ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, demire bağlı hepatotoksistide lipid peroksidasyonunun arttığı ve enzimatik antioksidan sistemin azaldığı gösterilmiştir [48]. Bu sonuç çalışmamızla uyumluydu.

Ek olarak, önceki farklı çalışmalarda, HA'nın bir fokal serebral iskemi modelinde SOD'yi önemli ölçüde artırdığı ve MDA düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bunun nedeni oksidatif stresin azalması olabilir [49]. Bu sonuçlar mevcut çalışma ile uyumluydu. Önceki başka bir çalışmada, hümik asit tedavisinden sonra SOD'de önemli bir azalma da gözlemlenmiştir [28].

GSH döngüsü en önemli hücre içi antioksidan savunma mekanizmasıdır. Çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesi için substrat olarak kullanılır. Özellikle GPX, glutatyonla bağımlı bir enzimdir. Glutatyonun azalması veya tükenmesi durumunda GPX aktivitesinin azalmasının oksidatif stresi artırarak toksik ürünlerin birikmesine neden olduğu bilinmektedir [12]. Bu çalışmada demir, hem karaciğer hem de kalp dokularında GPX ve GSH düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar

önceki çalışmalarda uyumlu olarak [48].

Bu çalışmada tek başına demir alan grupta kalp ve karaciğer dokularında TOS ve OSI düzeylerinde artış, TAC düzeyinde ise azalma görüldü. Ancak, TOS ve OSI seviyeleri karaciğer dokularında değil kalpte anlamlı olarak azalırken, TAC seviyesi HA artı demir alan grupta tek başına demir alan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermedi. Muhtemelen bu, kalp kası hücre zarlarının ve sarkoplazmik zarların hücre dışı sıvılarla doğrudan temas halinde olmasından kaynaklanmaktadır. Bu, HA azalırken demirin arttığını gösterdi.

oksidatif stres [50]. Bu çalışmada, HA'nın kalpte oksidatif stresi azalttığı ve anti-oksidatif stresi arttırdığı görülmektedir. karaciğerden iyidir.

Bu çalışmada demir alan gruplar ile kontroller arasında ALT, AST, demir, TIBC ve TS düzeyleri karşılaştırıldığında tüm parametrelerde anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır. Bu bulgu deneysel bir modelin başarıyla tasarlandığını doğrulamıştır. El-Baky ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, demir kaynaklı toksite sırasında çeşitli biyokimyasal parametrelerin arttığı gösterilmiştir [45]. Yine Jensen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada demir ve karaciğer enzimleri veya TS [51] arasında bir ilişki gözlemlendi. Çalışmamızda tek başına demir ve HA artı demir alan gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir.

Sonuçlarımız yukarıda belirtilen çalışmalarda uyumludur.

Doku yaralanmasının değerlendirilmesinde histopatolojik inceleme altın standarttır. Histopatolojik olarak demir alan grup kontrollerle karşılaştırıldığında, periportal alanda demir birikiminin gösterilmesi ve buna bağlı patolojik değişikliklerin daha belirgin olmasıyla gösterilen, demir alan grupta belirgin değişiklikler olduğu görüldü. karaciğerin 2. bölgesinde. Sonuçlarımız Gao ve ark. [52]. Demir birikimine bağlı hastalıklarda görülür. Ancak bizim çalışmamızda 10 günden fazla demir verildi ve akut değişiklikler daha belirgindi. Demire ek olarak HA alan grupta değişikliklerin devam ettiği görüldü. Bu çalışmada, demirin histopatoloji ile dejeneratif değişikliklere, inflamasyona, ödem ve demir birikimine neden olduğu ve demir birikiminin ana etkisinin, dejeneratif nükleer değişiklikler, interstisyel ödem, inflamasyon olarak ortaya çıkan oksidatif strese sekonder doku hasarı olduğu bulundu. yanı sıra tüm hücrelerde diffüz demir birikimi. Demirin neden olduğu doku hasarı, demir birikimi ile ilgili önceki çalışmalarda desteklenmektedir.

Demir alan deneklerde belirgin doku hasarı gösterilirken, HA artı demir alan grupta hiçbir histopatolojik değişiklik gözlenmedi. İkinci grupta, HA'nın lipid peroksidasyon ürünleri ve antioksidan sistem üzerinde bazı etkilerinin olduğu gözlemlendi. MDA'yı artırarak ve SOD, GPX, CAT ve GSH'yi azaltarak demirin, oksidatif stres yoluyla hücre zarlarındaki nükleik asitleri, lipidleri ve proteinleri etkileyerek ROS ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir.

Çözüm

Sonuç olarak, çeşitli dokularda yüksek dozlarda demir birikebilir. Bu birikim, dokunun fizyolojik fonksiyonlarını değiştirir. Bu çalışma, HA'nın hem histo-patolojik hem de biyokimyasal düzeyde antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkileri ile demir kaynaklı hepatotoksisteye ve kardiyotoksisteye karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Muhtemelen, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve geliştirilmiş enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler gibi antioksidan özellikler yoluyla ROS aktivitesini azaltarak bu etkiyi uygular. HA'nın demir kaynaklı karaciğer hastalıklarına karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz.

ve kalp yaralanması. Bununla birlikte, HA'nın demir kaynaklı hepatotoksisite ve kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini göstermek için daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması Yazarlar bu makalenin yayınlanmasıyla ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Referanslar

- Reddy ACP, Lokesh B (1996) Zerdeçal ve öjenölün sıçanlarda demir kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerindeki etkisi. *Toksikoloji* 107(1):39–45
- Tandara L, Salamunić I (2012) Demir metabolizması: güncel gerçekler ve gelecekteki yönler. *Biochemia Medica* 22(3):311–328
- Singh N, Haldar S, Tripathi AK, Horback K, Wong J, Sharma D, Beserra A, Suda S, Anbalagan C, Dev S (2014) Brain iron homeostasis: from moleküler mekanizmalar klinik öneme ve daha sonra apeutik fırsatlara. *Antioksidanlar ve Redoks Sinyali* 20(8): 1324–1363
- Garrick MD, Garrick LM (2009) Hücrel demir taşıma. *Biyokimya ve Biyofizik Açta (BBA)-Genel Konular* 1790(5): 309–325
- Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK (2006) Normal demir metabolizması ve aşırı demir yükü bozukluklarının patofizyolojisi. *Clin Biochem Rev* 27(1):5
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC (2005) Demir ihracatçısı ferroportin/Slc40a1, demir homeostazi için gereklidir. *Cell Metab* 1(3):191–200
- Bresgen N, Eckl PM (2015) Oksidatif stres ve demir metabolizmasının homeodinamikleri. *Biomolecules* 5(2):808–847
- Chyka PA, Butler AY (1993) Laboratuvar ve klinik gözlemlerle akut demir zehirlenmesinin değerlendirilmesi. *Amerikan Acil Tıp Dergisi* 11(2):99–103
- Liebelt EL, Kronfol R, Ewald MB, Traub SJ, Wiley JF (2008) Akut demir zehirlenmesi. Güncel. Son güncelleme Eyl 9 10.
- Das A, Chaudhuri D, Ghate NB, Panja S, Chatterjee A, Mandal N (2015) İsviçre albino farelerinde demir kaynaklı oksidatif stres ve hepatotoksisiteye karşı *clerodendrum colebrookianum* yapraklarının koruyucu etkisi. *Indian J Exp Biol* 53:281–291
- SA EL-M, Rizk SM, MM ES (2009) Sıçanlarda aşırı demir yüklenmesinin neden olduğu biyokimyasal değişikliklere karşı krosin ve kurkuminin hepatoprotektif potansiyeli. *Afr J Biochem Res* 3(5):215–221
- Pari L, Karthikeyan A, Karthika P, Rathinam A (2015) Hesperidin'in demir kaynaklı hepatik ve renal toksisitede oksidatif stres, dislipidemi ve histolojik değişiklikler üzerindeki koruyucu etkileri fareler. *Toksikoloji Raporları* 2:46–55
- Tapia G, Troncoso P, Galleano M, Fernandez V, Puntarulo S, Videla LA (1998) Akut aşırı demir yükünün kupffer hücre işlevi ve izole edilmiş hepatotoksisite üzerindeki etkisinin zamana bağlı çalışması perfüze edilmiş sıçan karaciğeri. *Hepatology* 27(5):1311–1316
- Ramm GA, Ruddell RG (2005) Karaciğer hastalığında seminerler, 2005. cilt 04. İçinde: Aşırı demir yüklenmesinin hepatotoksisitesi: demir kaynaklı hepatik fibrojenez mekanizmaları. *Telif hakkı © 2005, Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, ABD, s. 433–449*
- Marx J, Walls R, Hockberger R (2013) Rosen'in acil tıp kavramları ve klinik uygulaması. *Elsevier Sağlık Bilimleri, Londra*
- Madiwale T, Liebelt E (2006) Demir: iyi huylu bir terapötik ilaç değildir. *Curr Opin Pediatr* 18(2):174–179
- Ackerman Z, Pappo O, Link G, Glazer M, Grozovski M (2014) Tiyasetamidin karaciğer toksisitesi, hepatoselüler demir yüklenmesi ile artar. *Biological Trace Element Research* 1:8 18. Fibach E, Rachmilewitz EA (2010) Talasemide oksidatif stresin tedavisinde antioksidanların ve demir şelatörlerinin rolü. *Ann NY Acad Sci* 1202(1):10–16
- Wang QM, Du JL, Duan ZJ, Guo SB, Sun XY, Liu Z (2013) Hem oksijenaz-1'in inhibe edilmesi, demir birikimini ortadan kaldırarak sıçan karaciğer fibrozunu azaltır. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 19(19):2921–20. Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H, Taravati F (2010) Silymarin ve deferoxamin profilaktik etkisinin sıçanlarda aşırı demir yüklenmesine bağlı hepatotoksisite üzerinde karşılaştırılması. *Tıbbi Toksikoloji Dergisi* 6(1):22–26
- Breitbart R, Abu-Kishk I, Kozler E, Ben-Assa E, Goldstein LH, Youngster I, Berkovitch M (2011) Sıçanlarda akut demir zehirlenmesi için intra raperitoneal N - asetilsistein. *Drug Chem Toxicol* 34(4):429–432
- Çetin E, Güçlü BK, Çetin N (2011) Yumurtlayan tavuklarda yüksek stoklama yoğunluğunun neden olduğu sosyal stres üzerine diyet humat ve organik asit takviyesinin etkisi. *J Anim Vet Adv* 10(18):2402–2407
- Moura MN, Martın MJ, Burguillo FJ (2007) Humik asit, fulvik asit ve fenolün *Bacillus subtilis* ve aktif çamur üzerine adsorpsiyonunun karşılaştırılması. *J Hazard Mater* 149(1):42–48
- Sağbaşı S, Kantar C, Şahiner N (2014) Poli (humik asit) parçacıklarının hazırlanması ve sulu ortamlardan toksik organo-fenolik bileşik gideriminde kullanımları. *Su Hava Toprak Kirliliği* 225(1):1–10
- Madronová L, Kozler J, Čezíková J, Novák J, Janoš P (2001) Kuzey bohemia kömür sahası kömüründen humik asitler: III. Humik asitlerin metal bağlama özellikleri — bir sütun düzeninde ölçümler. *React Funct Polym* 47(2):119–123
- Zralı Z, Písaříková B, Navrátilová M (2008) Humik asidin tavuk organlarında ve kas dokularında cıva birikimi üzerindeki etkisi. *Çekçe J Anim Sci* 53:472–478
- Zralı Z, Písaříková B, Trčková M, Navrátilová M (2008) Humik asitlerin tavuk organlarında ve kaslarında kurşun birikimi üzerindeki etkisi. *Veteriner Yasası Brno* 77(3):439–445
- Vašková J, Veliká B, Pílátová M, Kron I, Vaško L (2011) Humik asitlerin in vitro etkileri. *Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 47(5–6):376–382
- Vucskits A, Hullár I, Bersényi A, Andrásföszky E, Kulcsár M, Szabó J (2010) Fulvik ve humik asitlerin performans, bağışıklık yanıtı ve Sıçanlarda tiroid fonksiyonu. *J Anim Physiol Anim Nutr* 94(6):721–728
- Ma B, Yu W, Jefferson WA, Liu H, Qu J (2015) Humik asit kirlenmesini azaltmak için nano ölçekli sıfır değerlikli demir katmanlarla ultrafiltrasyon membranının modifikasyonu. *Su Res* 71:140–149
- Seymen O, Seven A, Candan G, Yiğit G, Hatemi S, Hatemi H (1997) Demir takviyesinin L-tiroksinde eritrositlerin GSH seviyeleri, GSH Px ve SOD aktiviteleri üzerindeki etkisi yönetim. *Açta Med Okayama* 51(3):129–133
- Altıntaş R, Parlakpınar H, Beytur A, Vardi N, Polat A, Sagır M, Odabaşı GP (2012) Dekspantenolün koruyucu etkisi sıçanlarda iskemi reperfüzyon kaynaklı renal hasar üzerinde. *Böbrek Kan Basıncı Res* 36(1):220–230
33. Uchiyama M, Mihara M (1978) Tiyobarbitürik asit testi ile dokularda malonaldehit öncüsünün belirlenmesi. *Anal Biyokimya* 86(1): 271–278
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Folin fenol reaktifi ile protein ölçümü. *J Biol Kimya* 193(1): 265–275
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988) Süperoksit dismutazın klinik analizi için basit bir yöntem. *Clin Chem* 34(3):497–500
36. Aebi H, Suter H (1969) Katalaz. Enzimatik analiz yöntemleri 77:325

