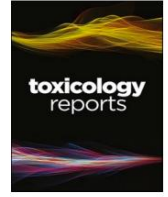




ScienceDirect'te bulunan içerik listeleri

Toksikoloji Raporları

dergi ana sayfası: www.elsevier.com/locate/toxrep

Bir fulvik ve hümik asit preparatının toksikolojik değerlendirilmesi

Timothy S. Murbach^{a,*}, Robert Glavits^{a,d}, John R. Endres^a, Amy E. Clewell^a, Gabor Hirka^{b,c},
 Ágel Vertesi^{c,1}, Erzsébet Beres^{c,1}, Ilona Pasics Szakonyin^e

^a AIBMR Life Sciences, Inc., 1425 Broadway, Suite 458, Seattle, WA 98122, ABD

^b Toxi-Coop Zrt., Berlini utca 47-49, H-1045 Budapeşte, Macaristan Toxi-

^c Coop Zrt., Aracsi út 97, 8230 Balatonfüred, Macaristan

MAKALE BİLGİSİ

Anahtar
 Kelimeler:
 Fulvik asit
 Hümik asit
 blk. 333
 Toksikite
 Güvenliği NOAEL

ÖZ

Hümik maddeler topraklarda ve sularında her yerde bulunur. Bu karmaşık üst yapılar, ölü bitki ve hayvan maddesinin ayrışmasından elde edilir ve toprak sağlığı için hayati öneme sahiptir. Heterojen bileşimleri, menşebölgelerine özgüdür ve mineralleri tutabilen ve onları bitkiler için kullanılabilir hale getirebilen zayıf bağlı küçük organik bileşikler agregatlarından oluşur. Bu nedenle, insanlar için potansiyel besin değerine sahip olabilirler ve bu amaçlara uygun olabilecek fulvik ve hümik asit ekstraksiyonları üretilebilir. Bu nedenle, Alberta, Kanada'daki bir linyit yatağından türetilen fulvik ve hümik asitlerin spesifik bir preparasyonunun (blk. 333) toksikolojik profilini değerlendirdik ve in vitro memeli kromozomal bakteriyel ters mutasyon testinde bunun genotoksik potansiyelden yoksun olduğunu bulduk. sapma testi ve in vivo memeli mikronükleus testi. 90 günlük sürekli maruz kalmanın ardından Wistar sıçanlarında genel veya organ toksisitesi gözlenmedi ve test edilen en yüksek doz olan 2000 mg/kg vücut ağırlığı/gün'de hiçbir yan etki gözlenmedi seviyesi (NOEAL) belirlendi. Sonuçlarımız, gıdada bir besin takviyesi olarak müstahzarın geliştirilmesi için daha fazla değerlendirmenin fizibilitesini göstermektedir.

1. Giriş

Hümik maddeler, biyolojik maddenin (yani bitkiler ve hayvanlar) ayrışmasından kaynaklanan ve toprakta ve sularında her yerde bulunan karmaşık, zayıf bağlı, heterojen, küçük organik bileşiklerin üst yapılarıdır [1]. Bu amorf agregatlar, herhangi bir tek moleküler yapı ile veya moleküler heterojenlikleri nedeniyle, hatta bir yapı grubu tarafından tanımlanamaz; ancak, ortalama özellikler [2] açısından ele alındığında önemli ölçüde tekdüzelik sergilerler. Hümik maddeleri stabilize eden çok sayıda ve karmaşık zayıf kuvvetler, aynı zamanda, maddelerin üretildiği küçük moleküller içinde bunların reaktivitesine ve hidrofobik ve hidrofilik alanlara da yol açar.

türetmek onların esnek konformasyonel yapılarına katkıda bulunur [3].

Tarihsel olarak, hümik asitler (HA; CAS no. 1415-93-6), hümik maddenin temel özleri asitleştirildiğinde oluşan çökeltiler olarak tanımlanırken, fulvik asitler (FA; CAS no. 479-66-3) bu süreçten sonra çözüldükten kalır [1,2]. Başka bir deyişle, HA'lar alkanin pH'ta çözünürken, FA'lar pH'tan bağımsız çözünürlük sergiler. FA'ların çözünürlüğü, çok sayıda asidik fonksiyonel grup nedeniyle küçük moleküllerin birliktelikleri içindeki hidrofiliklik ile sağlanır; oysa hümik asitler içindeki ilişkiler, nötr pH'ta stabilizasyon ve asit pH'ta topaklanma ile sonuçlanan hidrofobiktir [3]. Ancak bu tür ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen HA ve FA fraksiyonlarının doğal hümik maddede var olduğu gösterilmemiş tir ve kesinlikle içerir.

Kısaltmalar: ANOVA, varyans analizi; CDFA, Kaliforniya Gıda ve Tarım Bakanlığı; Cl-HA, klorlu hümik asit; DME, Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle'ları; EFSA, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi; FA, fulvik asit; FOB, işlevsel gözlem pili; fT4, serbest tiroksin; GLP, iyi laboratuvar uygulaması; HA, hümik asit; MPCE, mikronükleer polikromatik eritrositler; NOAEL, gözlemlenen yan etki düzeyi yok; O3-HA, ozonlanmış hümik asit; O3/Cl2-HA, ozonlanmış ve klorlanmış hümik asit; OECD, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü; S9, mitokondriyal süpernatant sonrası S9 karışımı Fenobarbital/β-naftoflavon kaynaklı sıçan karaciğeri S9 metabolik aktivasyon sistemi; SCE, kardeş kromatid değişimi; SD, Sprague-Dawley; SOP, standart işlemler prosedürü; SPF, spesifik patojen içermez; TG, test yönergesi; TSH, tiroid uyarıcı hormon.

* Sorumlu yazar.

E-posta adresi: tim@aibmr.com (TS Murbach), glavits.robert.dr@gmail.com (R. Glavits), john@aibmr.com (JR Endres), amy@aibmr.com (AE Clewell), gabor.hirka@toxicoop.com (G. Hirka), adel.vertesi@toxicoop.com (A. Vertesi), erzsebet.beres@toxicoop.com (E. Beres), ilona.pasics@toxicoop.com (I. Pasics Szakonyin'e).

¹ Kıdemli Yazarlar.

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030> 31 Mart

2020'de alındı; 25 Ağustos 2020'de revize edilmiş haliyle alındı; 27 Ağustos 2020'de kabul edildi Çevrimiçi erişim tarihi 14 Eylül 2020 2214-7500/© 2020 Yazar(lar).

Elsevier BV tarafından yayınlandı Bu, CC BY-NC-ND lisansı altında açık erişimli bir makaledir

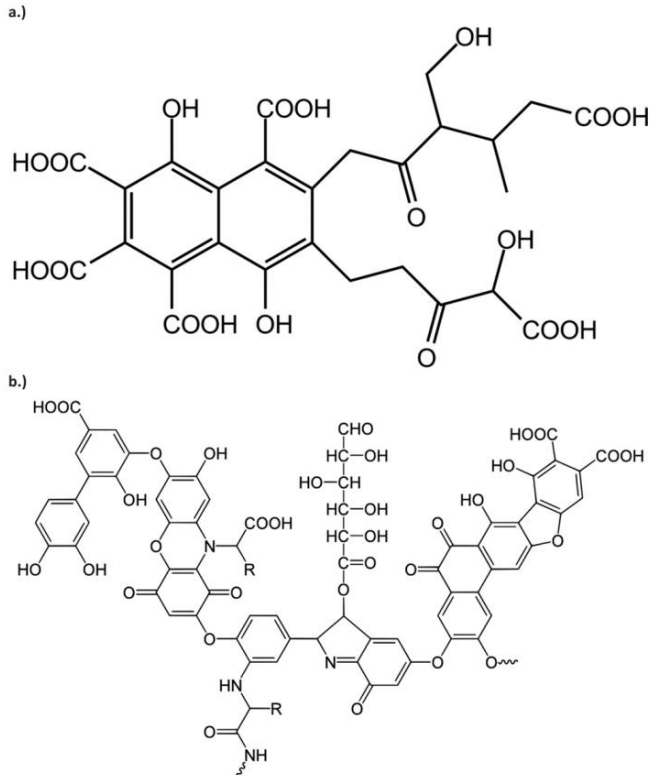
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

hümik maddenin bir parçası olmayan bileşimler ve ekstraksiyon tekniği ile üretilen alterasyon bileşimleri [2,4]. Aslında, HA ve FA'yı bu şekilde tanımlamanın, bu operasyonel tanımları geriye dönük olarak açıklama girişiminde yanlış bir humifikasyon modelinin üretilmesine yol açtığı ileri sürülmüştür [4]. Yine de bu, benzer şekilde üretilen ticari HA'lar ve FA'lar hakkında uygun bir düşünme şeklidir. Bu tür ürünler, tek olarak tanımlanabilir bileşimler değil, daha ziyade çoklu bileşimlerin kümeleridir [2]. Bu tür bileşimlerin önerilen genel sahte yapıları, Şekil 1'de gösterilmektedir.

Hem HA'ların hem de FA'ların genel özellikleri, yetenek gibi genel kimyasal özelliklerine yol açan temel bileşenleri (karbon, hidrojen, nitrojen ve kükürt) ve oksijen içeren fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksil, karbonil ve fenolik) ile ilgilidir. HA'ların FA'lara göre daha yüksek moleküler ağırlıkları çözünürlüğü, karbon ve oksijen içeriğini, pH'ı, polimerizasyon derecesini ve iyon değişim kapasitesini etkilerken, solüsyondaki iyonik partiküllerle reaksiyona girmek için kullanılır [2,5]. Özellikleri nedeniyle, HA'lar ve FA'lar, karbonun tutulması da dahil olmak üzere besin ve su kullanımının ve toprak kalitesinin iyileştirilmesi gibi çeşitli tarımsal uygulamalarda kullanılmıştır [3,5-12].

Hümik maddelerin bitki yaşamı üzerindeki etkilerine yönelik bir dizi mekanizma önerilmiş ve/veya araştırılmış olsa da, bu mekanizmaların anlaşılması eksik olduğundan öğrenilecek çok şey vardır. Böyle bir mekanizma, toprakta çözünmeyen mineral komplekslerinin oluşumunun önlenmesi yoluyla bitkiler tarafından mineral kullanımının artırılabilirliği iyon değişimidir; hümik maddeler daha sonra bitki köklerine hidrojen ve karbonik asit karşılaştırılabilir mineral iyonları sağlayabilir [5,10,11]. İyon değişim mekanizması, topraktaki zehirli metallerin tutulmasında da etkilidir. Hümik maddelerin bitki yaşamını sürdürmedeki rolü ve potansiyel olarak zararlı çevresel toksik maddeleri bağlama ve ayırma yeteneklerinden dolayı, insan beslenmesini geliştirme ve kasıtsız olarak yutulan diyet toksiklerine karşı bir miktar koruma sağlama konusunda doğal bir yeteneğe sahip olabileceklerini tahmin etmek kolaydır. elementler.

Hindistan'da insanlar tarafından antioksidan, adaptojenik ve diğer etkiler için bir FA preparatının geleneksel kullanımı rapor edilmiştir ve bunun



Şekil 1. a.) fulvik asit ve b.) hümik asidin potansiyel sahte yapıları.

antioksidan aktivite çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiş tir [13,14]; HA'nın antioksidan özellikleri de araştırılmış tir [15]. Macar turbasından elde edilen özel bir HA ve FA müstahzarı, ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne, ayrıca mineral ve zenginleştirme için ilave mineraller de içeren bir besin takviyesinde kullanılmak üzere iki başlıklı Yeni Diyet İçeriği Bildiriminin (NDIN) konusu olmuştur. İnsan vücudundaki iz element durumu [16,17]. Son NDIN [17], bu maddenin insanlarda mineral durumunu iyileştirdiği ve/veya absorpsiyonu inhibe ettiği ve toksik elementlerin atılımını iyileştirdiği bulunan 9 yayınlanmamış ve bir yayınlanmış [18] klinik değerlendirme bildirdi.

Bununla birlikte, bu ve diğer hümik müstahzarlar arasındaki potansiyel farkların yanı sıra eksojen minerallerin eklenmesi nedeniyle, bu tür sonuçların genel olarak hümik maddelere ekstrapole edilip edilemeyeceği açık değildir. Diğer hümik müstahzarlar üzerinde insan sindirimi ile ilgili klinik veya mekanik araştırma sınırlıdır ve broyler yemine bir hümik madde ekstraktının eklenmesi şeytani olmasına rağmen, bilgimiz dahilinde yukarıdaki etkilerle ilgili başkağı bir çalışma yapılmamıştır.

tavukların büyümesini iyileştirmek için planlanmış tir [19].

Hümik maddelerin heterojen yapısından dolayı, uygun bir model maddenin tanımlanması için çaba gösterilmesine rağmen, tek bir spesifik maddenin toksikolojik değerlendirmesinin bir bütün olarak gruba ekstrapolasyon için yetersiz olduğu düşünülür [20-22]. Bu nedenle, yüzey sularında düşük hümik madde seviyelerinin doğal olarak bulunması nedeniyle bunların çoğu, oluşumun ürünlerin mutajenik potansiyelini araştırma için yapılmış olsa da, çeşitli kökenlerden hümik maddelere ilişkin bir dizi toksikolojik araştırma yapılmamıştır. su kaynaklarının dezenfeksiyonu. Aslında, azalan pH ve yeterli HA ve klor konsantrasyonları koşulları altında, HA ve FA'da bulunan uçucu olmayan organik maddelerin klorlanması, bileşimlerin (mukoklorik asit ve 2,3-trikloropropenal gibi) oluşumuyla sonuçlandırılmıştır. bakteriyel ters mutasyon testlerinde mutajenik olan. Ancak genel olarak bu çalışmalar, dezenfeksiyona uğramamış, sıklıkla kontrol maddesi olarak dahil edilen veya başkağı nedenlerle araştırılan hümik maddeler açısından olumsuz sonuçtur [20,23-28].

Bununla birlikte, bazı çalışmalar hem mutajenite hem de genel toksisite testlerinde pozitif veya şüpheli sonuçlar göstermiştir tir [22,29-32]. Ek olarak, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), fareler üzerinde mineraller eklenmiş hümik ve fulvik asit karışımının yayınlanmamış bir subkronik toksisite çalışmasını değerlendirdi ve 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hiçbir yan etki gözlenmeyen seviye (NOAEL) belirledi. Histolojik değerlendirmelerin olmaması nedeniyle durdurulamayan yüksek dozlarda vücut ve organ ağırlığının azalması nedeniyle [21]. 50 mg/kg canlı ağırlık/gün'de kusma ve sulu dışkı oluşumu ve 150 mg/gün'de hafif kalp ve karaciğer lezyonları nedeniyle köpeklerde yayınlanmamış bir kronik çalışma mada 15 mg/kg canlı ağırlık/günlük bir NOAEL potasyum humat belirlenmiştir tir. kg vücut ağırlığı/gün. Bununla birlikte EFSA ayrıca, 30 gün boyunca 100 mg/kg vücut ağırlığı/gün (sıçanlar) veya 300 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozlarında hem konsantrasyona HA hem de bunun sodyum tuzunun uygulandığı farelerde veya köpeklerde hiçbir davranışsal veya klinik etkinin gözlenmediğini kaydetmiştir tir. 90 gün (köpekler).

Bu çelişkililer bilgilerin ışığında, olası endişeleri değerlendirmek için, hem hasat yeri bileşimindeki değişkenliğe hem de toksik potansiyelde farklılıklara yol açabilecek spesifik ekstraksiyon yöntemlerine ve ayrıca test protokollerinin sağlığını dikkat edilmelidir. Bu nedenle, bir besin takviyesi olarak geliştirilmesinin fizibilitesi ile ilgili olarak, bir dizi toksikolojik çalışması yürüttük (gıda içeriklerinin değerlendirilmesi için yaygın olarak önerildiği gibi [33, 34] ve düzenleyici kurumlar tarafından bir kanıtın ağırlığına katkıda bulunduğu kabul edildi). Kanada, Alberta'daki bir linyit yatağından üretilen fulvik ve hümik asitlerin özel bir preparasyonuna (blk. 333) ilişkin mevcut Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) standartlarına göre yazarların deneyimlerine dayalı değerlendirme).

2. Materyal ve yöntemler

2.1. Test ögesi

Test maddesi fulvik ve humik asit (ticari adı: blk. 333) tozuydu, Alberta, Kanada'daki bir yataktan oksitlenmiş linyitin kurutulmuş sulu özütü. Suda yüksek oranda çözünür, katı, parlak ve/veya donuk koyu ve orta kahverengi ile siyah, ince bir tozdur. Gıda sınıfı spesifikasyonları, California Gıda ve Tarım Bakanlığı (CDFA) yöntemine göre >%70 HA içeriği, <%5,0 nem ve mikrobiyal büyüme ve ağır metal içeriği limitlerini içerir. CDFA yöntemiyle tahlil edilen humik içerik (klasik tanıma göre HA içeriği olarak rapor edilir), bazı FA'ları ve diğer orta molekül ağırlıklı humik maddeleri içerebilir. Yöntem, pH 2.0'da elde edilen çökeltilde bulunan tüm humikleri ölçen bir baz/asit ekstraksiyon prosedürü kullanır; ancak, FA'ların çoğu blk içinde yer alır. 333, bu prosedürle elde edilen süzültüde çözüldü halde kalır.

Kimyasal safsızlıklar silika, alüminosilikatlar ve diğer humik olmayan organik maddeleri içerir. Tipik bir beslenme profili yaklaşık %10 protein, %33 karbonhidrat, %1 diyet lifi, <%0,25 yağ, %55 kül, %0,27 kalsiyum, %0,12 demir, %0,48 sodyum ve eser miktarda şeker ve A ve C vitaminleri içerir.

Fulvik ve humik asit tozu, gıda için mevcut iyi üretim uygulamalarına uygun olarak üretilir, paketlenir ve saklanır. Fulvik ve humik asit tozu parti no. 918-10-11 (HA içeriği CDFA yöntemiyle %83.50) burada bildirilen genetik toksisite çalışmaları için kullanılmıştır ve lot no. 90 günlük tekrarlanan doz çalışması için 17H24-1006-e73c (CDFA yöntemiyle %103.67 HA içeriği) kullanıldı.

Gerçekleştirilen çalışmalar için test çözümleri, her deney gününde hücrelerin lenmesinden veya hayvanlara doz verilmesinden hemen önce taze olarak hazırlandı. İstenen test çözümü konsantrasyonlarını elde etmek için gerekli test maddesi miktarları dikkatli bir şekilde tartıldı, araç içinde süspansiyon edildi ve homojen solüsyonlar elde etmek için karıştırıldı; test çözümleri, homojenliği korumak için dozlama sırasında sürekli karıştırıldı ve doz uygulaması, hazırlandıktan sonra 2-4 saat içinde tamamlandı. Diğer tüm yönleriyle, burada açıklanan çalışmalar OECD İyi Laboratuvar Uygulamaları İlkeleri'ne (GLP) [35] uygun olarak yürütülmüştür.

2.2. hayvancılık

Hayvan çalışmaları, Toxi-Coop Zrt. 90 günlük çalışma, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Ulusal Araştırma Konseyi Kılavuzuna [36] göre ve Macar Yasası 2011 CLVIII (Macar Yasası 1998 XXVIII'de değişiklik) ve Hükümet Kararnamesi 40/2013 ilkelerine uygun olarak yürütülmüştür. hayvanların korunmasını düzenler. Hayvan yaş ve ağırlık aralıkları, iklimlendirme, barındırma, çevre koşulları ve yiyecek (ssniff® SM R/ M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Almanya) ve su (içilebilir musluk suyu) temini, ilgili OECD test yönergeleri (TG) [37,38].

2.3. Bakteriyel ters mutasyon testi

Deneyler, OECD TG 471'e [39] göre, bir Fenobarbital/β olmadan ve bir fenobarbital ile birlikte ve bakteri test cihazı suşları (Moltox, Inc., Boone, NC, ABD) Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 ve Escherichia coli WP2 uvrA kullanılarak yapılmıştır. -naftoflavon kaynaklı siçan karaciğeri mitokondriyal süpernatant sonrası (S9) (Moltox, Inc., Boone, NC, ABD) metabolik aktivasyon sistemi (S9-mix). Araç olarak ultra saf su (ASTM Tip 1) seçildi ve ana testler için 5000, 1600, 500, 160, 50 ve 16 µg/plaka test maddesi konsantrasyonları seçildi (ilk plaka birleştirme ve doğrulama ön inkübasyon yöntemleri kullanılarak Ames ve diğerleri [40], Maron ve Ames [41], Kier ve diğerleri [42], Venitt ve Parry [43] ve Mortelmans ve Zeiger [44]'den uyarlanan prosedürler),

ön çözünürlük ve konsantrasyon aralığı bulma testlerine dayalıdır.

Merck Life Science GmbH'den (Eppelheim, Almanya) elde edilen (4-Nitro-1,2-fenilenediamin, sodyum azid ve 9-aminoakridin) ve Sigma-Aldrich Co.'dan (St. Louis, MO, ABD)) ve (2-aminoantrasen, Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, MO, ABD)) ile metabolik aktivasyon, TG ve belirtilen literatüre göre seçilmiştir.

Biyolojik geçeriğe dayalı sonuçların değerlendirilmesi için kriterler, laboratuvar tarafından TG'ye uygun olarak geliştirilmiş ve daha önce açıklanmıştır [45].

2.4. İnvitro memeli kromozomal sapma testi

Tüm deneyler, OECD TG 473 [46] ve laboratuvarın standart çalışması prosedürlerine (SOP) (Preston ve diğerleri [47] ve Brusick [48] referans alınarak geliştirilmiş) uygun olarak yapılmıştır. Test sistemi olarak takviye edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's (DME) ortamında (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Almanya) yetişirilen V79 erkek çn hamsteri akciğer hücreleri (European Collection of Authenticated Cell Cultures; Salisbury, İngiltere) kullanıldı. Deneysel koşullar, metabolik aktivasyon (yani, S9-mix) olmadan ve içeren kısa süreli (3 saat) tedaviler ve yaklaşık 1,5 (20 saat) ve 2 (28 saat; yalnızca S9-mix ile) hücre döngüsü ve uzun-20 ve 28 saatte örneklenen metabolik aktivasyon olmaksızın süreli tedaviler (20 saat). Ön çözünürlük ve sitotoksitesite testlerine dayanarak, araç olarak DME ortamı ve kısa ve uzun için 625, 1250, 2500 ve 3000 µg/mL ve 39.1, 78.2, 156.3 ve 312.5 µg/mL test maddesi konsantrasyonları kullanılmıştır. Ana test için sırasıyla S9-mix'siz süreli tedaviler ve S9-mix ile tüm tedaviler için 1250, 2500 ve 5000 µg/mL seçildi.

S9-karışımı olmadan ve birlikte kullanım için pozitif kontroller sırasıyla etil methanesulfonate (belirtilen literatüre ve laboratuvarın tarihsel veri tabanına göre seçilen bilinen bir mutajen ve klastojen) ve siklofosfamid (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Almanya). Ana testin deneyleri iki kopya halinde gerçekleştirildi.

2.5. In vivo memeli mikronükleus testi

Mikronükleus testi, Salamone ve Heddle [49] prosedürlerine atıfta bulunarak OECD TG 474 [37] uyarınca spesifik patojen içermeyen (SPF) CrI:NMRI BR fareleri (Toxi-Coop, Budapeşte, Macaristan) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir ön toksisite testine dayalı olarak, beş erkek fareden oluşan grupların her birine 0, 500, 1000 ve 2000 mg/kg bw'lik test ögesi dozları, 24 saatlik aralıklarla, 20 mL/kg bw'lik sabit bir hacimde gavaj yoluyla uygulandı; araç kontrolü damıtılmış suyu (Parma Product Kft., Budapeşte, Macaristan). Ek bir gruba, bir kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla pozitif kontrol olan siklofosfamid (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Almanya) uygulandı. Vücut ağırlığı ölçümleri, ilk dozdan önce ve kurban edilmeden hemen önce yapıldı ve hayvanlar, kurban edilene kadar her dozdan sonra düzenli aralıklarla ölüm ve toksisite belirtileri açısından gözlemlendi.

Son tedaviden 24 saat sonra hayvanlar servikal dislokasyonla öldürüldü ve her hayvandan iki kemik iliği (femur) örneği alındı. Her numuneden hücre pelletleri hazırlandı ve mikroskop lamaları inceleme için lekelenildi, sabitlendi ve boyandı. Her hayvandan bir slayt, kör puanlama için kodlandı.

2.6. Siçanlarda 90 günlük tekrarlanan doz oral toksisite çalışması

Çalışma, OECD TG 408 [38] 'e uygun olarak, ağırlığa göre rastgele dağıtılmış SPF Han:WIST fareleri (Toxi-Coop, Budapeşte, Macaristan) gruplarında yürütüldü. On siçana/ cinsiyete/gruba, ardişik 90 (erkek) veya 91 (dişi) gün boyunca 0, 500, 1000 ve 2000 mg/kg canlı ağırlık/gün dozlarında test maddesi uygulandı (doz ve araç seçimi temel alınarak yapıldı) yayınlanmamıştır, OECD uyumlu [50]. test edilen en yüksek doza (2000 mg/kg vücut ağırlığı/gün) kadar hiç bir olumsuz etkin gözlenmediği 14 günlük tekrarlanan doz aralığı bulma çalışması. dozlar verildi

10 mL/kg vücut ağırlığı sabit bir sonda hacminde ve araç olarak ayç içek yağ (Heli anhi annui oleum raffinatum; Parma Product Kft., Budapeş te, Macaristan) seçildi çünkü test çözeltili sonda uygulaması için çok kalın/yoğun hale geldi. su veya sulu metilselölüz içinde süspanse edildiğinde 200 mg/mL'lik yüksek konsantrasyon.

Hayvanlar ölüm, klinik belirtiler, davranış ve fonksiyonel etkiler, vücut ağırlığı ve beslenme etkileri ve oftalmolojik değış iklikler açısından gözlemlendi. Fonksiyonel gözlem dizisi (FOB), Irwin'in [51] yönteminin bir modifikasyonu olarak geliş tirilen laboratuvar SOP'lerine göre tedavinin son haftasında yürütüldü .

Son tedaviden sonra bir gecelik açlığın ardından hayvanlarda Isofluran CP® anestezisi (Medicus Partner Kft, Biatorbagy, Macaristan) kullanılarak derin bir narkoz durumu oluş turuldu ve klinik patoloji değerdendirmeleerine tabi tutuldu. Büyük patolojik incelemelerin ve organ ağırlıklarının belirlenmesinin ardından, tüm hayvanlardan alınan organ ve doku örnekleri gelecekteki olası incelemeler için saklandı. Kontrol ve yüksek doz hayvanlarının tüm korunmuş organ ve dokularından alınan numunelerin histopatolojik incelemeleri yapıldı ve gözlemlenen tüm büyük lezyonların histopatolojik incelemeleri de yapıldı.

2.7. Sonuçların analizi

İ statistiksel analizler SPSS PC + yazılımı, sürüm 4 (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapıldı ve doğrusal eğilimleri kontrol etmek için Microsoft Excel sürüm 2016 (Microsoft, Macaristan) kullanıldı. Tüm testlerde P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.7.1. Bakteriyel ters mutasyon testi

Ortalama değerler, standart sapmalar ve mutasyon oranları, koloni sayılarının manuel olarak sayılmasına dayalı olarak hesaplandı ve sonuçlar biyolojik uygunluk temelinde değerdendirildi.

2.7.2. In vitro memeli kromozomal anormallik testi Tüm slaytlar

bağımsız olarak kodlandı ve kör olarak puanlandı ve çift kültürlerden elde edilen sonuçlar, istatistiksel analiz için havuzlandı. Tedavi ve eş zamanlı pozitif kontrol gruplarındaki aberasyon sayısı ve aberasyonlu hücre sayısı, Fisher kesin ve ki-kare testleri kullanılarak eş zamanlı negatif kontrol ile karşı laş tırıldı. Eş zamanlı negatif ve pozitif kontroller ve tedavi grupları da laboratuvar tarihsel kontrolleriyle karşı laş tırıldı. Veriler, hücre sayısındaki konsantrasyona bağlı artış lar için değerdendirildi.

yeterli regresyon analizi kullanarak sapmalar.

2.7.3. In vivo memeli mikronükleus testi

Mikronükleer polikromatik eritrositlerin (MPCE) sıklığındaki farklılıklar, Kruskal-Wallis parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerdendirildi. Veriler, yeterli regresyon analizi kullanılarak MPCE sıklığındaki doza bağlı artış lar için kontrol edildi.

2.7.4. Sıçanlarda 90 günlük tekrarlanan doz oral toksisite

çalış ması Bartlett'in varyans homojenliği testi, vücut ağırlığı, vücut ağırlığı artış ı, gıda tüketimi, yem etkinliği, klinik patoloji parametreleri ve mutlak ve bağlı organ ağırlığında ara grup heterojenliğini değerdendirmek için kullanıldı. veri. Heterojen veriler, Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak normallik açısından değerdendirildi. Verilerin homojen veya heterojen olması ve normal dağılıması durumunda tek yönlü ANOVA, normal dağılımaması durumunda Kruskal-Wallis parametrik olmayan tek yönlü ANOVA kullanılmış tır. Gruplar arası farklılıkların önemini değerdendirmek için post hoc analiz, ANOVA sonuçları istatistiksel olarak anlamlıysa Dun can'ın Çoklu Aralık testi kullanılarak veya parametrik olmayan ANOVA sonuçları istatistiksel olarak anlamlıysa Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Oluş um sıklıkları ş uş ekilde hesaplandı:

kantitatif olmayan parametrelerin (klinik ve fonksiyonel gözlemler, oftalmoskopi ve brüt ve histopatolojik bulgular) klinik önemini değerdendirin. Erkek ve kadın verileri ayrı ayrı değerdendirildi.

3. Sonuçlar

3.1. Bakteriyel ters mutasyon testi

Eş zamanlı pozitif kontrollerle eski haline dönen kolonilerde beklenen artış lar gözlemlendi ve tüm eş zamanlı pozitif ve negatif kontroller karşı lık gelen tarihsel kontrol aralıkları içindeydi. Test öğesiyle tedavi edilen test cihazı suş larında biyolojik olarak anlamlı (2 kat) veya eski haline dönen kolonilerde konsantrasyonla ilgili artış lar gözlenmedi

Eş zamanlı ve histolojik negatif kontrollere kıyasla metabolik aktivasyon olmadan veya ile birlikte (Ek Tablolar S1 ve S2).

3.2. İ n vitro memeli kromozomal sapma testi

Sitotoksik veya önerilen maksimum konsantrasyonlara kadar test maddesine maruz kalmanın ardından (metabolik aktivasyon olmadan veya aktivasyonla kısa süreli veya metabolik aktivasyon olmadan uzun süreli), eş zamanlı ve aberasyonlu hücrelerin sıklığında istatistiksel olarak anlamlı veya konsantrasyona bağlı artış lar olmadı ve yaklaşık 1,5 veya 2 hücre döngüsünün örnekleme zamanlarında tarihsel negatif kontroller gözlemlendi (Ek Tablo S3). Ek olarak, deneylerde hiç bir poliploidi veya endor kopyalanmış metafaz gözlenmedi.

3.3. In vivo memeli mikronükleus testi

İ lk dozdan fedakarlığı kadar geçen süre boyunca hiç bir ölüm veya anormal belirti veya davranış gözlenmedi. Mikronükleus testinin sonuçları Ek Tablo S4'te özetlenmiş tir. Olgunlaş mamış eritrositlerin toplam eritrositlere oranı, tedavi edilen ve negatif kontrol numuneleri arasında benzerdi, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir düş üş gözlemlendi. Tedavi edilen farelerin kemik iliğinde gözlemlenen MPCE'lerin sıklıkları, eş zamanlı veya geçmiş teki negatif kontrollerinkinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ve doza bağlı artış lar gözlenmedi.

3.4. Sıçanlarda 90 günlük tekrarlanan doz oral toksisite ç alış ması

3.4.1. Mortalite, klinik gözlemler ve oftalmoloji Çalış ma sırasında

mortalite meydana gelmedi. Çalış ma boyunca test maddesiyle tedavi edilen tüm gruplarda koyu renkli diş kılar gözlemlendi. Günlük kafes tarafı veya haftalık ayrıntılı gözlemler sırasında baş ka hiç bir klinik belirti, iş levsel eksiklik veya anormal davranış gözlenmedi ve FOB sırasında tüm kontrol ve yüksek doz hayvanlarında fiziksel durum, davranış ve ç eş itli uyaranlara verilen tepkiler normaldi (ç ünkü günlük ve haftalık klinik gözlemlerde hiç bir iş levsel eksiklik gözlenmedi, FOB düş ük ve orta doz grubu hayvanlara geniş letilmedi). Oftalmolojik muayenelerde gözde herhangi bir değış iklik gözlenmedi.

3.4.2. Vücut ağırlıkları ve gıda tüketimi Çalış ma

boyunca kontrollere kıyasla tedavi edilen erkeklerin vücut ağırlığı artış ında istatistiksel olarak anlamlı birkaç geçici artış gözlemlendi, ancak genel kilo alımını etkilemedi. Ortalama gıda tüketimi, kontrollere kıyasla yüksek doz erkek hayvanlarda çalış ma boyunca istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı olarak arttı ve buna bağlı olarak, genel yem verimliliği yüksek dozda biraz daha kötüydü. Bununla birlikte, vücut ağırlığı, vücut ağırlığı artış ı, klinik kimya ve organ patolojisinde ilgili değış iklikler gözlenmedi. Kontrollere kıyasla tedavi edilen diş ilerde gıda tüketiminde ve yem verimliliğinde istatistiksel olarak anlamlı birkaç değış iklik geçici olarak gözlemlendi. Ortalama canlı ağırlık, canlı ağırlık artış ı, gıda tüketimi ve yem verimliliği verileri Ek Tablolar S5-S8'de verilmektedir. Genel olarak, çalış ma sırasında erkek ve diş i sıçanların vücut ağırlığı geliş imi üzerinde olumsuz bir test maddesi etkisi gözlenmedi (Ş ekil 2).

3.4.3. Klinik patoloji

Hematolojik parametreler kontrol ve tedavi edilen erkeklerde karşı ilaç tırlabilirken, ortalama eozinofil yüzdesi ve ortalama aktive parsiyel tromboplastin süresi, kontrollere kıyasla orta doz dış ilerde sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ve arttı (Ek Tablo S9). Bu değış iklikler tarihsel kontrol aralıkları içindeydi ve dozla veya iliş kili histopatolojile iliş kisi yoktu.

Erkeklerde alanin aminotransferazda ve kadınlarda kalsiyumda istatistiksel olarak anlamlı, doza bağı düş üş ler gözlemlendi (Tablo 1).

Bu değış iklikler tarihsel kontrol aralıkları içindeydi ve histopatoloji ile iliş kili değildi. Sadece orta doz erkeklerde düş ük yoğunluklu lipoprotein ve inorganik fosfatta kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değış iklikler de gözlemlendi ve büyüklükleri düş üktü ve iliş kili bulgular yoktu.

Serbest tiroksin (sT4), orta doz grubu erkeklerde kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir ş ekilde arttı (Ek Tablo S10). Tarihsel kontrol verileri mevcut olmasa da, değış ikliğin büyüklüğü düş ük görünüyordu (%10'a karşı i kontrol) ve kontrol grubuna göre tiroid hormonlarında bir doz-tepki veya baş ka değış iklikler yoktu.

3.4.4. Organ ağırlıkları

Kontrollere kıyasla erkek hayvanlarda mutlak ve bağı böbrek ağırlıklarında doza bağı istatistiksel olarak anlamlı artış lar gözlemlendi (Tablo 2-4); ancak, bu değış iklikler laboratuvarın tarihsel kontrol verileri içindeydi ve iliş kili bulgular yoktu. Uygun kontrole göre bazı organların (erkek hayvanlarda karaciğer, timus, epididimitler, hipofiz ve adrenal bezler ve diş i hayvanlarda beyin, kalp, yumurtalıklar ve hipofiz) mutlak ve/veya görece ağırlıklarındaki diğer istatistiksel anlamlılıklar da büyüklüklerinin düş ük olması ve yüksek dozda ilgili histopatolojik bulguların bulunmaması nedeniyle toksikolojik olarak anlamlı kabul edilmemektedir.

3.4.5. Brüt ve histopatoloji

Midede koyu renkli iç erik gözlemlendi ve küçük ve

tedavi edilen hayvanların çoğunun kalın bağırsağı ve koyu renkli iç erik, düş ük dozlu bir diş i ve iki yüksek dozlu erkeğin çekumunda ve yüksek dozlu bir erkeğin rektumunda da gözlemlendi (Ek Tablo S11). Bu bulgu, tedavi edilen hayvanlarda koyu renkli dış kılın klinik olarak gözlemlenmesiyle iliş kilendirildi ve test ögesinin rengiyle tutarlıydı. Mikroskopik incelemede herhangi bir kontrol veya yüksek doz hayvanının gastrointestinal testis yollarında iliş kili histolojik lezyonlar gözlemlenmedi.

Piyektazi, bazı kontrol, düş ük doz ve yüksek doz hayvanlarında böbreklerin birinde veya her ikisinde makroskopik olarak gözlemlendi ve böbrekte patolojik değış iklikler (örn., enflamasyon veya nekroz) olmaksızın renal pelvik dilatasyon histolojik bulgusu (Tablo 5) ile iliş kilendirildi (Tablo 5). aynı hayvanlar Görülme sıklığı düş üktü ve kontroller ile yüksek dozlu hayvanlar arasında benzerdi ve daha düş ük dozlu hayvanlar etkilenirken,

doz yanıtı yok. Uterus boynuzlarının dilatasyonu, kontrolün bazı diş ilerinde ve tüm tedavi edilen gruplarda makroskopik olarak ve aynı kontrol ve yüksek doz hayvanlarının çoğunda, iliş kili enflamatuvar veya nekrotik değış iklikler olmaksızın mikroskopik olarak gözlemlendi.

Hepatositlerin minimal, hafif veya orta derecede vakuolasyonu, kontrol ve yüksek doz erkeklerde, özellikle karaciğerin santrilobüler bölgesinde benzer sıklık ve ş iddetle mikroskopik olarak gözlemlendi. Minimal alveoler amfizem ve bronş la iliş kili lenfoid dokunun (BALT) minimal veya hafif hiperplazisi, kontrol ve yüksek doz hayvanlarının akciğerlerinde benzer düş ük frekanslarla gözlemlendi. Sırasıyla Ek Tablo S11 ve Tablo 5'te gözlemlenen ve özetlenen diğer makroskopik ve mikroskopik lezyonlar, tekil oluş umları nedeniyle ayrı bulgular olarak kabul edildi.

4. Tartış ma

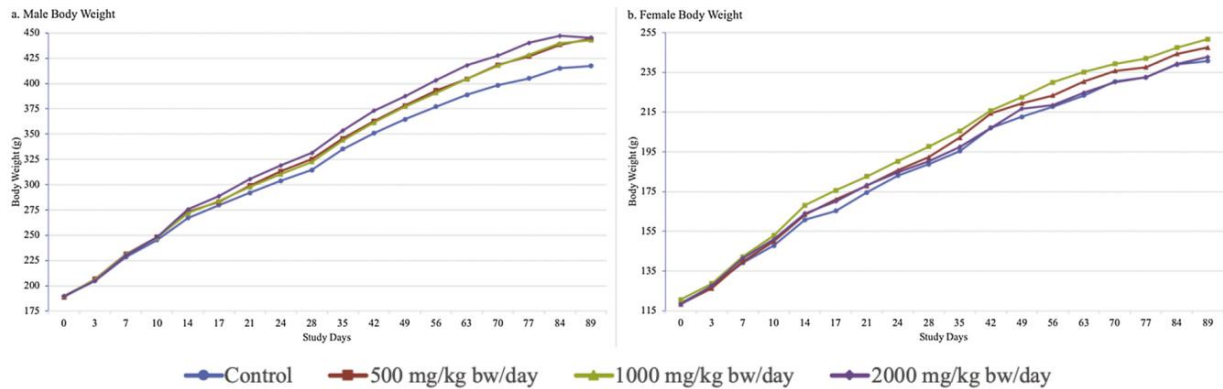
Bakteriyel ters mutasyon testimizin sonuçları,

kimyasal dezenfeksiyona tabi tutulmamış hümk test ögeleri üzerinde önceki bakteriyel ters mutasyon deneylerinin çoğunluğu [20,23-28]; ancak, Ueno ve ark. bir bakteriyel ters mutasyon testinde ozonlamanın üç farklı HA numunesi (biri turbadan, biri atık sudan ve biri topraktan) üzerindeki etkilerini araş tırdı ve her birinin mutajenik potansiyelinde farklılıklar gözlemlendi [22].

Sonuçlarımızın aksine, atık sudan izole edilen ham (yani ozonlanmamış) numune, S9 olmaksızın mutajenikti; ancak ozonlama veya S9 ile mutajenik değildi. Yazarlar, gözlenen mutajeniteden muhtemelen ozonlama ile ayrış acak olan atık su HA örneğinden hapsolmuş düş ük moleküler ağırlıklı, nitrojen açısından zengin kirleticilerin sorumlu olduğunu varsaydılar. Öte yandan, turbadan izole edilen numune, test edilen koş ulların hiçbirinde mutajenik değilken, topraktan izole edilen numune, S9'lu veya S9'suz ozonlama olmadan mutajenik değildi, ancak S9'suz ozonlama yapıldığında mutajenikti. Toprak HA, ozonlandığında mutajenik reaktif oksijen türleri ürettiği bilinen yüksek bir metal iyonu içeriğine sahipti. Böylece genel olarak, Ueno ve ark. HA'ların belirli bileş enlerinin farklı toksikolojik potansiyellere katkıda bulunduğu kavramını desteklemektedir.

Ek olarak, in vitro kromozomal sapma testi kullanılarak araş tırılan baş ka herhangi bir hümk maddeden habermiz olmasa da, potansiyel desmutajenik aktivitelerini araş tırmak için yürütülen kardeş kromatid değış imi (SCE) analizlerinde farklı HA numunelerinin mutajenik aktivitesi gözlemlenmiş tir. Cozzi ve ark. dört farklı HA örneğini değerlendirdi ve Çn hamsteri yumurtalık hücrelerinde bir in vitro SCE tahlilinde linyitten ekstrakte edilen biri dahil olmak üzere üç tanesinin açıkça mutajenik olduğunu buldu [30]. Volkanik topraktan çıkarılan numune açıkça pozitif değildi, bu da farklı kaynaklardan gelen hümk maddelerin farklı toksik potansiyeller sergileyebileceğini düş ündürüyor. Ribas ve ark. ayrıca insan lenfositlerinde yapılan bir in vitro SCE tahlilinde HA'nın mutajenik olduğunu bulmuş tur [32].

Sonuç lar her iki çalış mada da istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, ilgili yazarlar gözlemlenen mutajenitenin zayıf olduğunu düş ünmüş tür.



Ş ekil 2. Erkek ve Kadın Vücut Ağırlığı Geliş imi. (a) Erkek vücut ağırlıkları. (b) Kadın vücut ağırlıkları.

ASBKRbach

Tablo 1

Klinik Kimya Değerlendirmesinin Sonuçları.

Grup	HERŞEY	AST	ALP	TBİL	CREA ÜRE	GLUC	CHOL	HDL	İ Yİ	LDL	Pi	+ olarak	Na+	K+	Cl-	BEYAZ	TPROT A/G [g/L]			
(mg/kg vücut ağırlığı/gün)	[U/L]	[U/L]	[U/L]	[µmol/L]	[µmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mg/dL]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[g/L]	[g/L]			
Erkek																				
0 (Kontrol) Ortalama 56.50 (n = 10)		79.70	104.70	2.32	30.40	4.45	5.64	1.67	1.39	0.25	12.46	2.20	2.67	146.15	4.89	101.66	47.18	63.03	2.99	
SS 7.98		11.76	25.15	0.35	5.21	0.79	0.23	0.18	0.12	0.08	2.22	0.15	0.04	1.63	0.38	2.43	1.15	2.09	0.26	
500 ortalama 50.70		82.20	104.50	2.28	30.50	4.51	5.94	1.76	1.46	0.27	12.63	2.19	2.65	146.65	4.80	101.81	46.90	62.06	3.11	
(n = 10) SD 9.87		13.53	27.50	0.83	4.50	0.39	0.55	0.22	0.17	0.09	1.08	0.21	0.07	2.32	0.17	2.40	2.46	1.97	0.34	
1000 Ortalama 46.80		82.40	103.60	2.19	28.60	4.53	5.85	1.62	1.40	0.18	12.68	2.37	2.70	146.04	5.07	100.88	47.86	65.23	2.79	
(n = 10) SD 4.52		7.15	26.86	0.27	3.66	0.67	0.38	0.14	0.14	0.04	1.87	0.12	0.06	1.88	0.23	1.83	1.45	2.24	0.35	
SS										*		*								
2000 ortalama 41.00		84.30	112.70	1.97	30.50	4.61	5.97	1.81	1.56	0.21	12.91	2.34	2.69	146.42	5.04	102.35	47.88	65.55	2.80	
(n = 10) SD 6.96		12.34	19.03	0.40	2.84	0.74	0.63	0.25	0.24	0.05	2.06	0.14	0.06	2.30	0.40	2.55	1.48	3.87	0.54	
SS																				
Önem Testi DN		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	DN	NS	DN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Tarihsel Kontrol		26,0-70,0	65,0-131,0	62,0-209,0	0,4-2,5	20,0-35,0	3,3-8,9	4,7-9,2	1,4-3,1	KD	HAYIR	NE	1,5-2,3	2,4-2,9	141,2-148,4	4,1-5,2	96,8-103,2	40,1-47,3	59,9-70,1	1,5-2,6
Menzil																				
Diş i																				
0 (Kontrol) Ortalama 42,80 (n = 10)		80.10	57.60	2.19	31.20	5.46	5.88	1.64	1.59	0.14	15.29	1.85	2.69	143.20	4.15	100.35	53.65	67.49	3.94	
500 (n = 10) SD 8.77		17.93	12.91	0.45	2.78	0.75	0.50	0.24	0.22	0.03	2.10	0.23	0.08	1.16	0.19	2.11	2.56	3.72	0.44	
ortalama 41.90		80.00	57.20	2.28	32.30	5.22	5.55	1.52	1.52	0.11	14.62	1.75	2.67	143.65	4.21	100.78	54.39	67.09	4.29	
SD 8.27		12.88	17.48	0.34	4.06	0.80	0.62	0.16	0.14	0.03	2.23	0.25	0.08	2.68	0.31	2.54	3.16	4.13	0.24	
1000 Ortalama 34.50		78.40	52.80	1.99	31.50	4.97	5.64	1.50	1.51	0.13	13.92	1.84	2.62	142.50	4.06	99.44	53.74	67.31	4.03	
(n = 10) SD 7.09		18.62	17.84	0.33	4.17	0.62	0.40	0.31	0.28	0.05	1.73	0.16	0.03	1.36	0.25	1.72	2.17	2.42	0.56	
SS													*							
2000 ortalama 35.90		81.20	57.00	1.91	32.80	5.02	6.32	1.59	1.61	0.11	14.06	1.71	2.60	143.03	4.10	101.76	53.59	67.79	3.86	
(n = 10) SD 10.02		16.68	21.16	0.37	2.62	0.80	0.42	0.27	0.26	0.04	2.25	0.20	0.05	1.96	0.17	2.37	2.23	2.30	0.65	
SS													*							
Önem Testi		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Tarihsel Kontrol		28,0-133,0	66,0-249,0	22,0-162,0	0,5-3,6	24,0-40,0	3,8-9,5	4,0-7,3	1,1-2,8	KD	HAYIR	NE	0,8-2,1	2,4-2,9	140,9-146,5	3,1-4,6	97,6-105,0	43,8-57,6	56,5-78,9	1,7-3,7
Menzil																				

Kisaltmalar: A/G, albuminin globüline oranı; ALB, albümin; ALP, alkalın fosfataz; ALT, alanin aminotransferaz; AST, aspartat aminotransferaz; BUN, kan üre nitrojeni; Ca++, kalsiyum; CHOL, kolesterol; , klorür; CREA, kreatinin; DN, Duncan'ın çoklu aralık testi; GLUC, glukoz; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; Cl⁻, potasyum; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; Na+, sodyum; NE, laboratuvar tarihi kontrol verileri henüz belirlenmedi—OECD 408'e göre yeni parametre (25 Haziran 2018); NS, Önemli Değil; Pi, inorganik fosfor; SD, standart sapma; SS, kuyrukla karşılaştırmaya istatistiksel olarak anlamlı; TBİL, toplam bilirubin; TPROT, toplam protein; U, Mann-Whitney U testi ve kontrol.

*
** p < 0.05. p <
0.01.

! !

Tablo 2

Tablo 2

Organ Ağırlıkları.

Grup (mg/kg vücut ağırlığı/gün)		Vücut ağırlığı ve Organ ağırlığı (g)														
		Vücut ağırlığı	Beyin	Karaciğer	böbrekler	Kalp	Timüs	Dalak	testisler	epididimitler	Seminal veziküller	Hipofiz	adrenal bezler	Tiroid		
Erkek	0 (Kontrol) (n = 10 ^b)	Kötü	411,20	2,17	9,88	2,12	1,02	0,39	0,68	3,56	1,53	2,27	0,0078	0,071	0,017	
		SD	19,90	0,07	0,85	0,15	0,07	0,09	0,07	0,27	0,19	0,29	0,0013	0,011	0,003	
	500 (n = 10)	Kötü	435,50	2,20	10,71	2,36	1,08	0,40	0,71	3,68	1,65	2,45	0,0077	0,069	0,018	
		SD	31,63	0,07	1,06	0,19	0,08	0,08	0,07	0,19	0,12	0,35	0,0009	0,010	0,002	
		SS				*										
	1000 (n = 10)	Kötü	435,90	2,18	11,19	2,40	1,10	0,40	0,71	3,73	1,69	2,44	0,0085	0,070	0,018	
		SD	34,66	0,09	1,45	0,34	0,11	0,09	0,13	0,22	0,13	0,38	0,0016	0,011	0,003	
		SS			*	*					*					
	2000 (n = 10)	Kötü	435,90	2,18	10,87	2,46	1,08	0,29	0,69	3,63	1,55	2,42	0,0096	0,082	0,019	
		SD	37,82	0,08	1,20	0,19	0,09	0,07	0,09	0,40	0,13	0,30	0,0014	0,007	0,002	
		SS				**		*				**	*			
	Önem Testi		NS	NS	DN	DN	NS	DN	NS	NS	DN	NS	DN	DN	NS	
	Tarihsel Kontrol Aralığı		363,0-548,0	2,00-2,35	8,20-14,60	1,95-3,19	0,93-1,37	0,25-0,59	0,51-0,93	2,99-4,43	1,20-1,91	1,46-3,25	HAYIR	0,041-0,091	HAYIR	
	Diş i	0 (Kontrol) (n = 10)	Kötü	236,3	1,97	7,18	1,46	0,73	0,31	0,48	yumurtalıklar	Rahim		0,0097	0,078	0,021
			SD	20,15	0,10	1,24	0,07	0,05	0,07	0,07	0,084	0,74		0,0016	0,009	0,003
500 (n = 10)		Kötü	242,0	2,02	6,97	1,54	0,74	0,31	0,50	0,105	0,78		0,0108	0,085	0,024	
		SD	23,08	0,09	0,92	0,19	0,06	0,06	0,09	0,025	0,13		0,0019	0,015	0,006	
1000 (n = 10)		Kötü	244,9	2,05	7,32	1,55	0,73	0,32	0,53	0,118	0,77		0,0098	0,087	0,021	
		SD	16,58	0,06	0,91	0,14	0,06	0,05	0,08	0,031	0,13		0,0012	0,008	0,003	
		SS		*						**						
2000 (n = 10)		Kötü	237,5	1,95	6,51	1,47	0,68	0,29	0,46	0,105	0,75		0,0110	0,088	0,020	
		SD	21,96	0,07	0,71	0,14	0,06	0,05	0,05	0,020	0,17		0,0013	0,011	0,002	
Önem Testi			NS	DN	NS	NS	NS	NS	NS	DN	NS		NS	NS	NS	
Tarihsel Kontrol Aralığı			208-297,0	1,83-2,17	5,18-8,53	1,36-2,34	0,63-0,85	0,18-0,47	0,32-0,56	0,07-0,14	0,42-1,11		HAYIR	0,063-0,104	HAYIR	

Kısıtlamalar: DN, Duncan'ın çoklu aralık testi; NE, laboratuvar tarihsel kontrol verileri henüz belirlenmedi—OECD 408'e göre yeni parametre (25 Haziran 2018); NS, Önemli Deği; SD, standart sapma; SS, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı.

Açıklamalar: Eş leş tirilmiş organlar birlikte tartıldı.

^a Seminal vezikül pıhtılaş ırıcı bez ve prostat (bir bütün olarak). Kontrol grubu erkekleri

^b adrenal bezleri için n = 9 (bir kontrol erkek hayvanının adrenal bezleri n = 9'daki kesim nedeniyle) dirim. p < 0,01.

**

! !

Table 3

Tablo 3

Vücut Ağırlığına Göre Organ Ağırlıkları.

Grup (mg/kg vücut ağırlığı/gün)		Vücut ağırlığına göre organ ağırlığı (%)											
		Beyin	Karaciğer	böbrekler	Kalp	Timüs	Dalak	testisler	epididimiler	Seminal veziküller	Hipofiz	adrenal bezler	Tiroid
Erkek													
0 (Kontrol) (n = 10b)	Kötü	0,528	2.403	0,515	0,248	0,094	0,166	0,866	0,374	0,551	0,0019	0,0170	0,0041
	SD	0,019	0,170	0,029	0,014	0,021	0,017	0,065	0,050	0,067	0,0003	0,0028	0,0006
500 (n = 10)	Kötü	0,508	2.457	0,543	0,247	0,092	0,163	0,848	0,380	0,567	0,0018	0,0158	0,0042
	SD	0,035	0,094	0,029	0,012	0,017	0,017	0,075	0,043	0,096	0,0002	0,0027	0,0004
1000 (n = 10)	Kötü	0,501	2,558	0,550	0,253	0,092	0,162	0,860	0,389	0,560	0,0019	0,0162	0,0042
	SD	0,035	0,139	0,051	0,015	0,019	0,020	0,069	0,035	0,088	0,0004	0,0027	0,0005
2000 (n = 10)	Kötü	0,504	2.493	0,565	0,249	0,066	0,158	0,837	0,357	0,556	0,0022	0,0188	0,0042
	SD	0,056	0,149	0,043	0,009	0,012	0,017	0,103	0,039	0,063	0,0003	0,0021	0,0003
	SS			*		**					*		
Önem Testi		NS	NS	DN	NS	DN	NS	NS	NS	NS	DN	NS	NS
Tarihsel Kontrol Aralığı		0,403-0,606	2,055-3,156	0,452-0,634	0,211-0,284	0,063-0,129	0,119-0,194	0,642-0,963	0,279-0,424	0,360-0,716	HAYIR	0,009-0,020	HAYIR
Diş i													
0 (Kontrol) (n = 10)	Kötü	0,838	3.032	0,623	0,307	0,132	0,202	0,035	0,315		0,0041	0,0333	0,0091
	SD	0,077	0,433	0,048	0,015	0,029	0,021	0,009	0,062		0,0006	0,0035	0,0014
500 (n = 10)	Kötü	0,839	2.876	0,634	0,305	0,127	0,207	0,043	0,322		0,0044	0,0350	0,0097
	SD	0,084	0,208	0,035	0,015	0,021	0,025	0,007	0,055		0,0005	0,0057	0,0021
1000 (n = 10)	Kötü	0,840	2.987	0,632	0,297	0,130	0,218	0,048	0,315		0,0040	0,0357	0,0084
	SD	0,050	0,280	0,028	0,019	0,014	0,032	0,011	0,056		0,0005	0,0036	0,0009
	SS							**					
2000 (n = 10)	Kötü	0,828	2,743	0,621	0,285	0,122	0,196	0,044	0,318		0,0046	0,0371	0,0086
	SD	0,081	0,206	0,052	0,017	0,019	0,023	0,008	0,080		0,0005	0,0045	0,0013
	SS				**			*			*		
Önem Testi		NS	NS	NS	DN	NS	NS	DN	NS		DN	NS	NS
Tarihsel Kontrol Aralığı		0,731-1,000	2,183-3,189	0,508-0,951	0,236-0,333	0,078-0,169	0,139-0,227	0,029-0,054	0,161-0,465		HAYIR	0,025-0,045	HAYIR

Kısaltmalar: DN, Duncan'ın çoklu aralık testi; NE, laboratuvar tarihsel kontrol verileri henüz belirlenmedi—OECD 408'e göre yeni parametre (25 Haziran 2018); NS, Önemli Değil; SD, standart sapma; SS, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı.

Açıklamalar: Eş leş tirilmiş organlar birlikte tartıldı.

a Seminal vezikül pihitlaş tırıcı bez ve prostat (bir bütün olarak). Kontrol grubu erkeklerin

b adrenal bezleri için n = 9 (bir kontrol erkek hayvanının adrenal bezleri otopsideki kayıpla karşılaştırılmadı). p < 0.05. p < 0.01.

**

Table 3

Tablo 4

Tablo 4 .

Beyin Ağırlığına Göre Organ Ağırlıkları.

Grup (mg/kg vücut ağırlığı/gün)	Vücut ağırlığı	Beyin ağırlığına göre vücut ağırlığı ve Organ ağırlığı (%)											
		Karaciğer	böbrekler	Kalp	Timüs	Dalak	testisler	epididimitler	Seminal veziküller	Hipofiz	adrenal bezler	Tiroid	
Erkek													
0 (Kontrol) (n = 10 ^b)	Kötü	18975.6	455,67	97,78	47,01	17,86	31,55	164,10	70,69	104,36	0,36	3,23	0,78
	SD	675.12	32,74	6,11	3,29	4,23	3,42	10,37	7,83	11,06	0,06	0,46	0,14
500 (n = 10)	Kötü	19776.2	486.45	107.30	48.82	18.10	32.15	166.85	74.66	111.27	0.35	3.12	0.84
	SD	1451,96	47,97	7,90	2,72	3,79	2,34	6,64	5,06	14,70	0,04	0,49	0,10
	SS			*									
1000 (n = 10)	Kötü	20040.8	513.91	110.33	50.59	18.49	32.57	171.80	77.87	111.86	0.39	3.22	0.84
	SD	1345.49	57,95	13,46	4,05	4,21	5,53	11,59	6,87	16,06	0,06	0,42	0,13
	SS		*	**				*					
2000 (n = 10)	Kötü	20062.1	500.42	112.79	49.88	13.32	31.67	166.94	71.08	111.20	0.44	3.74	0.85
	SD	2257.41	65,46	8,81	5,30	2,93	4,36	19,76	6,75	14,80	0,07	0,35	0,09
	SS			**		*					**	*	
Önem Testi		NS	DN	DN	NS	DN	NS	NS	DN	NS	DN	DN	NS
Tarihsel Kontrol Aralığı		16500,0-24796,4	375,45-660,63	88,64-144,34	42,73-61,99	11,31-26,29	22,47-41,15	146,64-196,02	55,16-85,65	65,47-154,76	HAYIR	1,95-4,27	HAYIR
Dış i								yumurtalıklar	Rahim				
0 (Kontrol) (n = 10)	Kötü	12016,9	364,96	74,50	36,91	15,89	24,36	4,26	37,61	0,49	3,99	1,09	
	SD	1010,67	62,28	3,97	3,25	4,30	3,81	1,23	6,63	0,08	0,52	0,15	
500 (n = 10)	Kötü	12023,8	345,72	76,35	36,58	15,30	24,98	5,20	38,60	0,54	4,21	1,17	
	SD	1203,76	42,81	9,88	3,33	3,26	4,08	1,21	7,10	0,09	0,83	0,32	
1000 (n = 10)	Kötü	11941,0	356,81	75,48	35,46	15,58	25,90	5,77	37,56	0,48	4,26	1,01	
	SD	743,17	40,51	5,75	2,26	2,06	3,43	1,55	6,61	0,06	0,46	0,15	
	SS							*					
2000 (n = 10)	Kötü	12180,9	333,80	75,38	34,68	14,84	23,80	5,39	38,19	0,56	4,50	1,04	
	SD	1219,24	38,34	6,89	3,28	2,46	2,81	1,01	8,40	0,07	0,58	0,12	
Önem Testi		NS	NS	NS	NS	NS	NS	DN	NS	NS	NS	NS	
Tarihsel Kontrol Aralığı		10000,0-13686,6	263,82-408,74	66,67-125,81	30,29-44,09	8,96-21,86	17,11-28,87	3,49-7,00	20,85-51,63	HAYIR	2,99-5,56	HAYIR	

Kısıtlmalar: DN, Duncan'ın çoklu aralık testi; NE, laboratuvar tarihsel kontrol verileri henüz belirlenmedi—OECD 408'e göre yeni parametre (25 Haziran 2018); NS, Önemli Değil; SD, standart sapma; SS, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı.

Açıklamalar: Eşleştilmiş organlar birlikte tartıldı.

^a Seminal vezikül pıhtılaşma bez ve prostat (bir bütün olarak). Kontrol grubu^b erkeklerin adrenal bezleri için n = 9 (bir kontrol erkek hayvanının adrenal bezleri dışındaki kayıplar nedeniyle)landırıldı. p < 0,05.

**

! !

Tablo 5
Histopatoloji Bulgularının Özeti.

organlar	Doz grubu (mg/kg canlı ağırlık/gün) gözlemler	Kontrol (0)		500 1000 2000	
		(n = 10) Yok/	A	Yok (n = 10)	
Erkek					
	Mikroskobik bulguları olmayan hayvanlar	3/10 Yok/	A	Yok 3/10	
böbrekler:	Pelvik dilatasyon, hafif, bir veya iki taraf	1/10 5/5 / 1/10			
karaciğer:	Setrilobüler vakuolasyon, minimumdan orta dereceye 10	61-3 /10 // 71-3 /			
akciğerler:	Alveolar amfizem, minimal 21 /10 // 11 /10 21-2 /10 // 12 /10				
BALT hiperplazisi, minimalden hafife					
Karın:	Ülserasyon, orta	0/10	13 /	0/10	
			1		
Diş i					
	Mikroskobik bulguları olmayan hayvanlar	7/10 N/	A	Yok 3/10	
böbrekler:	Pelvik dilatasyon, hafif, her iki tarafta	0/10 2/2 / 1/10			
akciğerler:	Alveoler amfizem, minimal 11 /10		// 0/10 // 0/10 //		
BALT hiperplazisi, minimum 11 /10			12 /10		
Mezenterik lenf düğümleri:	Kanama, hafif 0/10				
Yumurta kollar:	Corpora lutea eksikliği	1/10	// 0/10 // 6/10 //		
Rahim:	dilatasyon	2/10	1/10 //		
	adenom	0/10			
Karın boş luğu: Lipom		1/1			/

Kısaltmalar: /, incelenmemiş ; BALT, bronş la iliş kili lenfoid doku; N/ A, uygulanamaz (yalnızca büyük lezyonlar incelenmiş tir).

Veriler, gözlem insidansını temsil eder (incelenen hayvan sayısı baş ina gözlem yapılan hayvan sayısı).

10/10 kontrol ve yüksek doz hayvanlarında lezyonu olmayan veya otopside büyük lezyonu olmayan organlar gösterilmemiş tir.

Üst simgeler lezyon derecelerini temsil eder: 1 = minimal, 2 = hafif, 3 = orta, 4

= ş iddetli.

pozitif kontroller veya diğer bilinen mutajenlerle karşı ılaştırıldığında. Cozzi ve ark. numune hazırlama sırasında bir mutajenle kontaminasyon veya "bazı klorlama etkisi"nden kaynaklandığını düş ündükleri için sonuçlarına a ş ırmış göründüler, ancak Ribas ve ark. Cozzi ve diğerlerinin görüş ünü onaylayın. deneylerinde "hümkik asidin ne zaman ve nasıl klorlanmış olabileceğini destekleyen güvenilir bir kanıt" olmadığını kabul ettiler.

Bir in vivo kromozomal sapma çalış masında, Bernacchi ve ark. 100 mg/kg vücut ağırlığı/gün oranında tek bir HA dozu ile tedavi edilen farelerin bağırsak hücrelerinde yapısal sapmalar ve anöploidi ve kemik iliğinde anöploidi (istatistiksel anlamlılık olmasa da) gözlemlenmiş tir [29]. Yazarlar, HA'nın 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroksi-2(5 H)-furanona bağırsak klorlanmasının, bağırsak hücreleri üzerindeki klastojenik etkilerden sorumlu olabileceğini ancak kemikte beklenmeyeceğini öne sürdüler. hızlı in vivo biyotransformasyonun yanı sıra sınırlı doku dağılımı ve uygulanan düş ük dozda HA nedeniyle kemik iliği; ancak, bilgimize göre, HA'nın bağırsakta klorlanması kanıtlanmamış tir.

Bildiğimiz kadarıyla, bizimki hümkik bir madde üzerinde yapılmış ilk mikronükleus testidir; yine de, Bernacchi ve diğerleri tarafından yapılan in vivo kromozomal sapma testinin aksine. Yukarıda tartış ıldı gibi, çok daha yüksek uygulanan dozlarda MPCE frekanslarına dayalı olarak fare kemik iliğinde test ögemizin klastojenik veya anöjenik bir etkisini gözlemlemedik ve yapısal veya sayısal kromat gözlemlemedik.

yüksek konsantrasyonlarda in vitro mozomal aberasyonlar. Hem bizim hem de Bernacchi ve ark.'nın in vivo testlerinde, test solüsyonlarımızın Bernacchi ve ark.

Bazı HA numunelerinin zayıf mutajenik aktivitelerini gösteren in vitro SCE analizlerine ve in vivo kromozomal sapma testine rağmen, ticari bir HA preparatı (Fluka, İ sviç re), toplam 0,5 g'a karşı ılık gelen konsantrasyonlarda test maddesini iç me suyunda alan farelerde kanserojen olmamış tir. 24 ay boyunca organik karbon/L [27]. Test maddesi klorlandığında gözlemlenen sonuçların bazıları ş üpheli kabul edilebilirken, klorlanmamış HA alan erkek veya diş i farelerde kötü huylu tümör vakalarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi.

Siçanlarda test ögemizin tekrarlanan doz toksisitesini araş tırıldı ve çeş itli parametrelerde düş ük büyüklükte ve toksikolojik endiş e taş ımadığı düş ünülen birkaç istatistiksel olarak anlamlı değiş iklim gözlemledik. İ lginç bir ş ekilde hümkik maddelerin tiroid üzerindeki etkileri ile ilgili olarak Daniel ve ark. subkronik bir toksite çalış masında kontrol maddesi olarak tek doz ticari bir HA preparatı (Fluka, İ sviç re) uygulanan erkek Sprague-Dawley (SD) siçanlarında histolojik tiroid lezyonlarında (kolloid tükenmesi, minimum ş iddet ve foliküler kistler) insidanda artış gözlemlendi. ozonlama (O3-HA) veya hem ozonlama hem de klorlama (O3/ Cl2-HA) uygulanan aynı HA'nın; ancak çalış mada tiroid hormonu düzeyleri ölç ülmemiş tir [31]. Yüksek doz O3/Cl2-HA grubu erkeklerde daha düş ük insidanda tiroid kolloid tükenmesi de gözlenirken, tamponlu su kontrolü veya O3-HA yüksek doz gruplarında tiroid lezyonları gözlenmedi .

Spekülatif olmakla birlikte, Daniel ve diğerleri tarafından kullanılan HA testi ögesinin olması mümkündür. ozonlama ile inaktive edilmiş bir guatrojen veya diğer tiro-toksik madde iç erir. Çalış mamızda ne tiroid uyarıcı hormon (TSH) düzeylerinde değiş iklim ne de benzer lezyonlar gözlenmediğinden, orta doz erkeklerde ft4'te gözlemlenen artış ın test ögesinin uygulanmasıyla ilgili olduğundan ş üphelenmek için hiç bir neden yoktur, çünkü sporadik olarak meydana gelmiş tir. TSH, serbest triyodotironin veya tiroid ağırlığı üzerinde bir doz yanıtı veya ilgili etkiler ve herhangi bir iliş kili histopatoloji olmaksızın.

Mevcut çalış mada olduğu gibi, Condie ve ark. ayrıca 90 gün boyunca klorlu HA (Cl-HA) uygulanan SD siçanlarda doza bağı olarak mutlak ve bağı böbrek ağırlıklarındaki artış ları bildirmiş tir; bununla birlikte, bu değiş iklimlere renal pelviste kristal birikintilerinin insidansı ve ciddiyeti ve iliş kili hematüri eş lik etmiş tir [52]. Yazarlar, gözlemlenen renal etkilerin muhtemelen SD farelerde Cl-HA ile hızlanmış olabilecek böbrek değiş iklimlerine yönelik türe özgü bir yakınlıkla iliş kili olduğu sonucuna varmış lardır (yine de benzer etkiler SD fareler ve aynı ticari HA kaynağı). Mevcut çalış mada, böbrek ağırlıklarında gözlemlenen değiş iklimler, laboratuvarın tarihsel kontrol aralığı içinde kaldı ve klinik kimya parametrelerinde veya iliş kili histopatolojide ilgili değiş iklimler olmadan meydana geldi ve bu nedenle toksikolojik önemi olmadığı kabul edildi.

Mevcut çalış mada hem kontrollerde hem de tedavi edilen hayvanlarda doz yanıtları olmadan meydana gelen birkaç büyük ve histolojik lezyon gözlemledik.

Renal pelvik dilatasyon, tedavi edilmemiş siçanlarda [53-57] ve laboratuvarın tarihsel kontrol hayvanlarında ve uterus dilatasyonunda (bir doz-yanıt olduğunda bir test ögesinin östrojenik etkisinin göstergesi olabilen) ortaya çıkan türe özgü bir arka plan lezyonudur. . dejeneratif değiş iklimler ve/veya diğer iliş kili bulgular gözlenir), östrojen tarafından uyarılmaya bağı olarak cinsel döngünün proöstrus ve östrus fazlarında normal bir olaydır [58-61].

Mevcut çalış mada gözlemlenen hepatositlerin vakuolasyonu, diyetle yağ alımına yanıt olarak ortaya çıkabilen etkilenen hepatositlerin enerji metabolizmasının bozulmasıyla bağıantılı hafif geri dönüş ümlü bir karaciğer hasarı olan hepatik lipidozun [62] bir göstergesi olarak kabul edildi [63,64] . Hem kontrol hem de yüksek doz erkeklerde benzer sıklıkta ve ş iddette meydana gelmesi nedeniyle, test ögesiyle ilgili olmaksızın ayç iç ek yağ aracına bir yanıt olarak kabul edildi.

BALT'in alveoler amfizemi ve hiperplazisinin her ikisi de geçmiş kontrol hayvanlarında benzer sıklıklarla gözlenmiş tir ve siçanlarda bilinen arka plan lezyonlarıdır [65-67]; ilki kan kaybı prosedürüne bağı olarak kabul edilirken, ikincisi muhtemelen kommensal floraya bağı olarak kabul edilmiştir, çünkü bununla iliş kili değildir.

TS Murbach ve ark.

Toksikoloji Raporları 7 (2020) 1242-1254

enflamatuar lezyonlar.

5. Sonuçlar

Negatif ve pozitif kontrollerin doğrulanması da dahil olmak üzere ilgili kabul kriterlerini karşılayan tüm genetik toksisite testleri, çerçeve kayması veya baz çifti ikame mutasyonları veya in vitro veya in vivo kromozomal hasar gözlenmediğinden test ögesinin genotoksik potansiyele sahip olmadığı belirlendi. Yukarıda tartışıldığı gibi, Bernacchi ve ark., yutulmuş HA'nın gastrointestinal klorlanması için bir potansiyel önerdi [29], ancak, bildiğimiz kadarıyla, bu herhangi bir deneyde gösterilmemiştir. Bu nedenle, mevcut test ögesinin mide-bağırsak yolu içinde klorlamaya maruz kalma potansiyeline yönelik daha fazla araştırma düşünülebilir ve doğrulanırsa, bağırsak hücrelerinde genotoksik potansiyelin in vivo bir araştırması yapılabilir. Bununla birlikte, Bernacchi'nin test ögesinin aksine, mevcut test ögesi, üretimi sırasında hidroklorik asit ile işlenmedi ve fareler üzerinde yapılan 2 yıllık bir çalışmada, klorlama olsun veya olmasın, başka bir HA preparatı kanserojen değildi (ancak sonuçlar sadece erkeklerde lösemi insidansı açısından klorlu HA için şüpheli kabul edilmelidir)

[27]. Bu nedenle, bu tür ek soruşturmaların gerekli olup olmadığı şüphelidir.

90 günlük çalışmamız, test ögesinin herhangi bir tirotoksisitesini düşündürmezken, Daniel ve ark. test ögelerinde guatrojen varlığının veya gastrointestinal kanalda HA tarafından iyot sekestrasyonunun göstergesi olabilecek tiroid lezyonları gözlenmiştir [31]. Bilinen bazı guatrojenik maddelerin hümitik maddelerin bozunma ürünleri olduğu bildirildiğinden [68], blk'nin toksikolojik potansiyeli hakkında daha fazla araştırma yapılmalıdır. 333, simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında bilinen guatrojenik maddeler için bir tahsil edilebilir. Gastrointestinal iyot sekestrasyonu ile ilgili olarak, tiroid üzerindeki etkisinin olmamasına ek olarak, meme dokusunda östrojenik lezyonlar gibi böyle bir etkiyi düşündürdü herhangi bir ilişki bulgu gözlemlenmedi. Ancak, test maddesini sondayla uyguladığımız çalışmamızın aksine, Daniel ve ark. test ögelerinin içme suyunda uyguladılar ve sonda yolu kullanıldığında bu tür etkilerin daha az belirgin olabileceği veya hiç olmayacağı varsayılabilir. Bu tür etkiler, bir bağlanma afinite çalışması ve/veya içme suyunda uygulama ile subkronik veya kronik tekrarlanan doz çalışması yoluyla daha fazla araştırılabilir. 90 günlük çalışmada gözlemlenen koyu renkli dışkı ve bağırsak içeriğinin, test ögesinin renginden kaynaklandığı ve toksik olmadığı kabul edildi.

mantıksal alaka. Ek olarak, istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı biraz daha yüksek gıda tüketimi, klinik kimya değişimlikleri ve böbrek ağırlıklarının da düşük büyüklükleri ve ilişki bulguların bulunmaması nedeniyle toksikolojik alaka düzeyi olmadan meydana geldiği kabul edildi. Gözlemlenen histolojik bulgular doz ilişkisi içermiyordu ve genellikle tedavi edilmemiş laboratuvar farelerinde (mevcut çalışmanın kontrol hayvanları dahil) patolojik değişiklikler olmaksızın yaygın olarak gözlemlenen lezyonlardı; erkek kontrol ve yüksek doz hayvanlarının karaciğerlerinde gözlenen hepatositlerin vakuolasyonu ise aşğıdakilerle bağlantılı olarak kabul edildi: ayaç çekme aracı; bu nedenle, bunların test ögesiyle ilgili olduğu ve toksikolojik alakalarının olmadığı kabul edildi.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı test ögesinin (Kanada, Alberta'daki bir linyit yatağından türetilen blk. 333 fulvik ve hümitik asit müstahzarı) uygulanan test koşulları altında mutajenik veya klastojenik olmadığını ve NOAEL'in erkek ve dişi Han'da olduğunu belirledik. : WIST sıçanları 2000 mg/kg vücut ağırlığı/gün idi, sondayla 90 gün süreli maruziyetin ardından test edilen en yüksek doz.

Finansman

Yazarlar, burada açıklanan araştırma için mali desteğin sponsor tarafından sağlandığını açıklar: BLK International, LLC, 26565 Agoura Road, Suite 205, Calabasas, CA 91302 ABD. Sponsor, çalışmamızın tasarımlarında yer almamıştır; verilerin toplanması, analizi ve yorumlanması; veya bu makalenin dayandığı resmi laboratuvar raporlarının yazılması

dayanır. Sponsor, bölüm 2.1'deki test ögesinin doğru açıklamasıyla ilgili olarak ilgili yazara geri bildirim sağlamak dışında bu makalenin yazılmasına katılmadı. Sponsor, makaleyi yayına hazırlamak ve sunmak için AIBMR Life Sciences, Inc.'i tuttuğundan ve yazarların gönderim için Toksikoloji Raporlarını seçmesini onayladığından, makalenin yayına sunulması kararında yer almıştır.

Veri kullanılabilirliği

Bu çalışmamızın bulgularını desteklemek için oluşturulan ve istatistiksel analizler için kullanılan ortalama veri setleri makale içinde veya ek bilgi dosyalarında yer almaktadır. Bu çalışmamızın bulgularını desteklemek için kullanılan diğer tüm ham ve işlenmiş veriler talep üzerine ilgili yazardan temin edilebilir.

CRedit yazarlık katkı beyanı

Timothy S. Murbach: Yazma - orijinal taslak, Görselleştirme, Robert Biçimsel Glavitler: analiz, Veri iyileştirme, Yazma - gözden geçirme ve düzenleme. John R. Endres: Kavramsallaştırma, Finansman edinme, Yazma - inceleme ve düzenleme, Finansman edinme. Amy E. Clewell: Yazma - inceleme ve düzenleme. Gabor Hirka: Kaynaklar, Denetim, Proje yönetimi. Ilona Pasics Szakonyine: Doğrulama, Biçimsel analiz, İnceleme, Veri iyileştirme, Yazma - gözden geçirme ve düzenleme, Görselleştirme, Denetim, Proje yönetimi, Felsefi, Etik ve Standartlar, Görselleştirme, Denetim, Proje yönetimi. Ilona Pasics Szakonyine: Metodoloji, Doğrulama, Resmi analiz, Araştırma, Veri iyileştirme, Yazma, Denetim, Proje yönetimi.

Rekabetçi Menfaat Beyanı

Yazarlar Timothy Murbach, John Endres ve Amy Clewell, AIBMR Life Sciences, Inc.'in (Seattle, WA, ABD) maaşlı çalışanlarıdır. AIBMR, uygun çalışmamızın protokollerini ve doz seçimlerini belirlemek, çalışmaları yerleşik tirmek, çalışmamızın planlarını onaylamak ve burada açıklanan toksikolojik çalışmaları izlemek ve elde edilen verileri analiz etmek, yorumlamak ve el yazması. Yazar Gabor Hirka, Toxi-Coop Zrt'nin sahibi ve Genel Müdürüdür. (Budapeşte'deki test tesisleri (90 günlük çalışmamız) ve Balatonfüred (genotoksikite çalışmaları), Macaristan'da Toxi-Coop'un bir ortaklığıdır. Toxi-Coop'un maaşlı çalışanlarıdır; ve yazar Robert Glavits, Toxi-Coop'un bağımsız bir yüklenicisidir. Toxi-Coop, çalışmamızın planlarını geliştirmek ve burada açıklanan toksikolojik çalışmaların sonuçlarını yürütmek, analiz etmek, yorumlamak ve raporlamak için AIBMR ile sözleşme imzaladı. Yazarlar, çalışmamızın yayınlanmasından önce bir ek çıkarılma beyanı beyan etmemektedir.

teşekkürler

Yazarlar, aşğıdaki kişilere katkılarından dolayı teşekkür eder: çalışmamızın katılan araştırmacılar Viktoria Polgar-Balogh, Erika Binbaşı, Biermann, Ibolya Bogdan, Tamás Buda, Katalin Csendes, Timea resim, Kata Eszter Dioszegi, Monika Fekete, Stella Fekete, Zsuzsanna Frank, Irén Somogyi Harin'e, Ildiko Hermann, Brigitta Horvath, István Horvath, Balint Zsolt Juhari, Kornelia Sereg Juracsik'n'e, Judit Kalmán, Aranka Öpücüğü, Victoria Koesi, Klarae, Fritz Kovács'n'e, Nora Pongr Kurdi, Marcell Mader, Madar, Victoria Matina, Aniko, L'egrad, Maurer, Anita Mayer, Edit Kovács, Mesterházi, Aniko, renko, egzozlar Schüllerne, Janos, Stahl, Anett Szegner, Akosn'e Szabo, Lang-Szabo, Zsuzsanna Szabo, Mariann Lennert Szabon'e, Edit Szám, Olga Szasz, márti performansı için Tenk ve Erika Miskó Vargán'e

deneysel görevler, veri toplama, istatistiksel analizler ve/veya kalite güvencesi; ve makalenin hazırlanmasında idari destek için Jared Brodin.

Ek A. Tamamlayıcı veriler

Bu makaleyle ilgili ek materyal ş u adreste bulunabilir:

çevrimiçi sürüm, doi'de:https://doi.org/10.1016/j.tjtoxrep.2020.08.030.

Referanslar

- [1] A. Piccolo, Hüyük maddelerin supramoleküler yapısı: bir roman humus kimyasının anlaşılması ve toprak bilimindeki etkileri, *Av. Agronomi* 75 (2002) 57-134.
- [2] P. MacCarthy, Hüyük maddelerin ilkeleri, *Soil Sci.* 166 (11) (2001) 738-751.
- [3] A. Piccolo, Toprakta organik maddenin doğası ve küresel değişimlerle mücadele etmek ve tarımsal üretkenliği sürdürmek için yenilikçi toprak yönetimleri, *Tarım Topraklarında Karbon Tutulması*, Springer-Verlag, 2011, s. 1-19.
- [4] J. Lehmann, M. Kleber, Toprak organik maddenin çeşitli doğası, *Nature* 528 (7580) (2015) 60-68.
- [5] C. Malan, Derleme: hüyük ve fulvik asitler. Pratik bir yaklaşım. Sürdürülebilir Toprak Yönetimi Sempozyumu, 2015, s. 21.
- [6] R. O'Donnell, Leonarditten elde edilen hüyük müstahzarların oksijen benzeri etkileri, *Toprak Bilim* 116 (2) (1973) 106-112.
- [7] F. Stevenson, Topraktaki organik madde: havuzlar, dağılım, dönüşümler ve işlev. In: *Humus Chemistry: Genesis, Bileşim, Reaksiyonlar*, Wiley, 1994, s. 1-23.
- [8] B. Eyeraguibel, J. Silvestre, P. Morard, Organik atık geliştirmeden elde edilen hüyük maddelerin mısırın büyümesi ve mineral beslenmesi üzerindeki etkileri, *Bioresour. Teknoloji* 99 (10) (2008) 4206-4212.
- [9] JD Mao, RL Johnson, J. Lehmann, ve diğ., Topraklarda bol ve kararlı char kalıntıları: toprak verimliliği ve karbon tutulması için çıkarımlar, *Environ. bilim Teknoloji* 46 (17) (2012) 9571-9576.
- [10] M. Rose, A. Patti, K. Little ve diğ., Hüyük maddelere karşı bitki büyümesi tepkisinin bir meta-analizi ve incelemesi: tarım için pratik çıkarımlar, *Adv. Agronomi* 124 (2014) 37-89.
- [11] ZH Shah, HM Rehman, T. Akhtar, ve diğ., Hüyük maddeler: belirleme bitkilerdeki potansiyel moleküler düzenleyici süreçler, *Ön. Bitki Bilimi* 9 (2018) 263.
- [12] K. Qin, D. Leskova, Triploid karpuzda hüyük madde uygulaması ve eksik sulamanın değerlendirilmesi, *HortScience* 55 (5) (2020) 716-721.
- [13] SP Agarwal, R. Khanna, R. Karmarkar, ve diğ., Shilajit: bir inceleme, *Phytother. Res.* 21 (5) (2007) 401-405.
- [14] J. Winkler, S. Ghosh, Kronik inflamatuvar hastalıklar ve diyabette fulvik asidin terapötik potansiyeli, *J. Diabetes Res.* 2018 (2018) 5391014.
- [15] J. Vaskova, B. Velika, M. Pilatova, et al., Effects of hüyük asitler in vitro, *In Vitro Hücre. Dev. Biol. Animasyon* 47 (5-6) (2011) 376-382.
- [16] Corvina Natural Products Inc., FDA, NDIN 91. Humifulvate, içinde, 2001.
- [17] Humet Plc., FDA, NDIN 169. Humifulvate, içinde, 2003.
- [18] A. Hudak, M. Naray, I. Nagy, ve ark., Mesleki kadmiyum maruziyeti durumlarında bağırsak mikro elementlerle hüyük asit tüketiminin etkisi, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 3 (3) (1997) 175-186.
- [19] A. Dominguez-Negrete, S. Gomez-Rosales, ML Angeles, et al., Effect of the iki besleme rejimi altında etik pillerle büyüme destekleyici olarak hüyük maddelerin eklenmesi, *Hayvanlar (Basel)* 9 (12) (2019).
- [20] RJ Bull, M. Robinson, JR Meier, et al., Dezenfeksiyon yan ürünlerinin nispi kanserojen tehlikelerini değerlendirmek için biyolojik analiz sistemlerinin kullanımı, *Environ. Sağlık Perspektifi.* 46 (1982) 215-227.
- [21] Gıda Eklenen Gıda Katkı Maddeleri ve Besin Kaynaklarına İlişkin EFSA Paneli (ANS), Krom(III)-, demir(II)- ve selenyum-hüyük asit/fulvik asit şelat ve gıda takviyelerine beslenme amacıyla eklenen humifulvat, *Efsa J.* 1147 (2009) 1-12036.
- [22] H. Ueno, T. Segawa, K. Nakamura, ve diğ., Farklı kökenlerden hüyük asitlerin sulu ozonlanmasıyla oluşan ürünlerin mutajenitesi ve tanımlanması, *Chemosphere* 19 (12) (1989) 1843-1852.
- [23] KP Kringstad, PO Ljungquist, F. De Sousa ve diğ., Hüyük asidin klorlanması mutajen oluşumu üzerine, *Environ. bilim Teknoloji* 17 (9) (1983) 553-555.
- [24] RT LaLonde, S. Xie, Hüyüklerin su içinde klorlanmasından kaynaklanan mutajenik 2(5H)-furanonların Glutasyon ve N-asetilistein inaktivasyonları, *Chem. Res. Toksikol.* 6 (4) (1993) 445-451.
- [25] JR Meier, RD Lingg, RJ Bull, Hüyük asidin klorlanmasından sonra mutajen oluşumu. İnceleme suyu artırımı sırasında mutajen oluşumu için bir model, *Mutat. Res.* 118 (1-2) (1983) 25-41.
- [26] JR Meier, HP Ringhand, WE Coleman, et al., Hüyük asidin klorlanması sırasında oluşan mutajenik bileşimlerin tanımlanması, *Mutat. Res.* 157 (2-3) (1985) 111-122.
- [27] BL Van Duuren, S. Melchionne, I. Seidman, et al., Chronic bioassays of B6C3F1 farelerinde klorlu hüyük asitler, *Environ. Sağlık Perspektifi.* 69 (1986) 109-117.
- [28] M. Watt, R. Malcolm, M. Hayes, et al., Chemistry and potansiyel mutajenite için İngiltere ve İrlanda'daki farklı havzalardan gelen sularındaki hüyük maddeler, *Water Res.* 30 (6) (1996) 1502-1516.
- [29] F. Bernacchi, I. Ponzanelli, M. Minunni ve diğ., Doğal hüyük asidin in vivo sitogenetik etkileri, *Mutagenesis* 11 (5) (1996) 467-469.
- [30] R. Cozzi, M. Nicolai, P. Perticone ve diğ., Doğal hüyük asitlerin desmutajenik aktivitesi: mitomisin C ve maleik hidrazid mutajenitesinin inhibisyonu, *Mutat. Res.* 299 (1) (1993) 37-44.
- [31] F. Daniel, M. Robinson, H. Ringhand, ve ark., Sprague-Dawley sıçanlarında ozonlanmış ve ozonlanmış /klorlanmış hüyük asitlerin subkronik toksite çalışması: içme suyu dezenfeksiyonu için bir model sistem, *Environ. bilim Teknoloji* 25 (1) (1991) 93-98.
- [32] G. Ribas, E. Carbonell, A. Creus, ve diğ., Kültürlenmiş insan lenfositlerinde hüyük asidin genotoksitesi ve bunun alıklar ve maleik hidrazid herbisitler ile etkileşimi, *Environ. Mol. mutajen.* 29 (3) (1997) 272-276.
- [33] Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS), İnkeler ve Yöntemler Gıdalardaki Kimyasalların Risk Değerlendirmesi. 4. Tehlike Tanımlama ve Karakterizasyon: Toksikolojik ve İnsan Çalışmaları (Çevresel Sağlık Kriterleri 240), içinde, FAO, WHO, 2009, s. 187.
- [34] Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması İlişkin Uluslararası Konferans Beşeri İlaçların Tescilli (ICH), FDA, İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (CDER), ve diğ., Endüstri Rehberi. S2(R1) İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlar İçin Genotoksite Testi ve Veri Yorumlama, içinde, 2012, s. 31.
- [35] OECD, OECD İnceleme Laboratuvar Uygulamaları İnkeleri, OECD Yayınları, Paris, 1998.
- [36] Ulusal Araştırma Konseyi, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberi, İnceleme, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberinin Güncellenmesi Komitesi, Laboratuvar Hayvanları Araştırma Enstitüsü, Dünya ve Yaşam Çalışmaları Anabilim Dalı, Ulusal Araştırma Konseyi, 2011, s. 1-220.
- [37] OECD, Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines Kimyasalların Test Edilmesi için, içinde, 2016, s. 21.
- [38] OECD, Test No. 408: Kemirgenlerde Tekrarlanan Doz 90 Günlük Oral Toksikite Çalışması, OECD Kimyasalların Test Edilmesi için Kılavuz İnkeler, Bölüm 4, içinde, 2018, s. 16.
- [39] OECD, Test No. 471: Bakteriyel Ters Mutasyon Testi, OECD Yönergeleri Kimyasalların Test Edilmesi, Bölüm 4, 1997'de.
- [40] BN Ames, J. McCann, E. Yamasaki, Kanserijenleri saptamak için yöntemler ve Salmonella/memeli mikrozomu mutajenite testi ile mutajenler, *Mutat. Res.* 31 (6) (1975) 347-364.
- [41] DM Maron, BN Ames, Salmonella mutajenite testi için gözden geçirilmiş yöntemler, mutasyon uğramış. Hiç bir şey. 113 (3-4) (1983) 173-215.
- [42] Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, et al. memeli mikrozomal deneyi. ABD Çevre Koruma Ajansı gen-toks programı Mutat'in bir raporu. *Res.* 168 (2) (1986) 69-240.
- [43] S. Venitt, J. Parry, Mutajenite Testing, a Practical Approach, IRL Press Limited, Eynsham, Oxford England, 1984.
- [44] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames Salmonella/mikrozom mutajenite testi, *Mutat. Res.* 455 (1-2) (2000) 29-60.
- [45] T. Murbach, R. Glavits, J. Endres, ve diğ., A toksikolojik değerlendirme metilberberin (Dynamine®), *J. Toxicol.* (2019) 25, cilt. Ürün Kimliği 4981420.
- [46] OECD, Test No. 473: In Vitro Memeli Kromozomal Aberasyon Testi, OECD Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik Yönergeler, içinde, 2016, s. 22.
- [47] RJ Preston, W. Au, MA Bender ve diğ., Mammalian in vivo ve in vitro sitogenetik tahliller: ABD EPA'nın gen-toks programı Mutat'in bir raporu. *Res.* 87 (2) (1981) 143-188.
- [48] D. Brusick, Bölüm 14. Genetik toksikoloji, içinde: A. Hayes (Ed.), İnkeler ve Toksikoloji Yöntemleri, ikinci baskı, Raven Press, 1989, s. 407-434.
- [49] M. Salamone, J. Heddle, Bölüm 4. Kemik iliği mikronükleus tahlili: gözden geçirilmiş bir protokolün gerektirdiği, içinde: F. de Serres (Ed.), *Chemical Mutagens*, Plenum Press, 1983, s. 11-149.
- [50] OECD, Test No. 407: Kemirgenlerde Tekrarlanan Doz 28 Günlük Oral Toksikite Çalışması, OECD Kimyasalların Test Edilmesi Yönergeleri, Bölüm 4, içinde, 2008.
- [51] S. Irwin, Kapsamlı gözlemsel değerlendirme: ia. Farenin davranışsal ve fizyolojik durumunu değerlendirmek için sistematik, nicel bir prosedür, *Psychopharmacologia* 13 (3) (1968) 222-257.
- [52] LW Condie, RD Laurie, JP Berz, Sıçanlarda klorlamanın ardından hüyük asidin subkronik toksikolojisi, *J. Toxicol. çevre. Sağlık* 15 (2) (1985) 305-314.
- [53] G. Hard, C. Alden, R. Bruner, ve ark., Sıçanlarda böbrek ve alt üriner sistem proliferatif olmayan lezyonları, *Guides Toksikolojik Patol.* (1999) 1-32.
- [54] M. Johnson, S. Gad, Sıçan. İnceleme: Toksikolojide Hayvan Modelleri, CRC Press, 2007, s. 147-276.
- [55] K. Frazier, J. Seely, Bölüm 12. Üriner sistem. İnceleme: Toksikolojik Patoloji. Klinik Diş ve Güvenlik Değerlendirmesi, CRC Press, 2013, s. 421-484.
- [56] R. Johnson, R. Spaet, D. Potenta, Bölüm 8. Kontrol hayvanlarında toksite çalışmalarında kullanılan spontane lezyonlar. İnceleme: Toksikolojik Patoloji. Klinik Diş ve Güvenlik Değerlendirmesi, CRC Press, 2013, s. 209-254.
- [57] NTP, DHHS, Neoplastik Olmayan Lezyon Atlası. Böbrek, Pelvis - Dilatasyon, 2014 yılında.
- [58] J. Leininger, M. Jokinen, 27. Oviduct, uterus ve vajina, içinde: G. Boorman, S. Eustis, M. Elwell, W. MacKenzie (Eds.), In: *Pathology of the Fischer Rat: Referans ve Atlas*, Academic Press, 1990, s. 443-459.
- [59] J. Vidal, M. Mirsky, K. Colman, ve diğ., Bölüm 18. Üreme sistemi ve meme bezleri. İnceleme: Toksikolojik Patoloji. Klinik Diş ve Güvenlik Değerlendirmesi, CRC Press, 2013, s. 717-830.
- [60] D. Dixon, R. Alison, U. Bach ve ark., Sıçan ve fare diş üreme sisteminin çoğalmayan ve çoğalan lezyonları, *J. Toxicol. Patol.* 27 (3-4 Ek) (2014) 15-107S.
- [61] NTP, DHHS, Neoplastik Olmayan Lezyon Atlası. Rahim - Genişleme, 2014 yılında.
- [62] J. Foster, Karaciğer. In: *Boorman's Pathology of the Rat*, 2. baskı, Elsevier, 2018, 81-105.

TS Murbach ve ark.

Toksikoloji Raporları 7 (2020) 1242-1254

- [63] BG Hammond, DA Mayhew, MW Naylor, ve diğ., Schizochytrium sp.'den DHA bakımından zengin mikroalglerin güvenlik değerlendirmesi, Regul. Toksikol. Eczane. 33 (2) (2001) 192-204.
- [64] JK Kramer, HW Hulan, HL Trenholm, ve ark., Growth, lipid metabolizması ve yüksek yağlı diyetlerle beslenen iki fare türünün patolojisi, J. Nutr. 109 (2) (1979) 202-213.
- [65] J. Vandenberghe, Wistar Rats Crl:(WI) BR'de Karsinogenesis Testinde Yaş am Boyu Veriler ve Tarihsel Veriler. Ek 5.8, içinde, Janssen Araş tırma Vakfı, Toksikoloji Departmanı, Charles River Deutschland, 1990.
- [66] G. Boorman, S. Eustis, Lung, içinde: G. Boorman, S. Eustis, M. Elwell, W. MacKenzie (Eds.), İ içinde: Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas, Academic Press, 1990, s. 339-367.
- [67] W. Haschek, C. Rousseaux, M. Wallig, 6. Solunum sistemi. Yapı ve hücre biyolojisi. Fizyoloji ve iş levsel hususlar - lenfoid doku. İ içinde: Toksikolojik Patolojinin Temelleri, Elsevier, 2009, s. 98.
- [68] R. Cooksey, E. Gaitan, R. Lindsay, ve diğerleri, Hümk maddeler, olası bir çevresel glutrojen kaynağı, Org. Jeokimya. 8 (1) (1985) 77-80.