

D-Galaktoz ile Oluşturulmuş Yaşlanma Modelinde Doku Faktörü Aktivitesinin ve Sialik Asit Miktarının Değerlendirilmesi

Ünsal Veli Üstündağ¹, Şehkar Oktay¹, Ebru Emekli-Alturfan¹, Ahmet Ata Alturfan², Karolin Yanar², Murat Mengi³, Tamer Cebe², Seval Aydın², Ufuk Çakatay²

¹Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Ünsal Veli Üstündağ
Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği, Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye
Elektronik posta adresi / E-mail address: uvustundag@gmail.com
Kabul tarihi / Date of acceptance: 3 Ocak 2014 / January 3, 2014

ÖZET

D-galaktoz ile oluşturulmuş yaşlanma modelinde doku faktörü aktivitesinin ve sialik asit miktarının değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada D-galaktoz ile yaşlandırılmış, doğal yaşlı ve kontrol grubu sıçanların karaciğer ve renal dokularının doku faktörü (TF) aktivitesinin ve inflamatuvar hastalıklar için değerli bir indikatör olan sialik asit (SA) miktarlarının ölçülmesi amaçlandı.

Yöntemler: Çalışmada yirmi haftalık 28 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Gruplar; 1) genç kontrol grubu (n= 8), 2) doğal yaşlı erkek grup (n= 10), 3) 6 hafta süreyle 60 mg/kg/gün i.p. D-galaktoz enjekte edilen D-galaktoz ile yaşlandırılmış grup (n= 10) şeklinde oluşturuldu. İşlemler sonunda, ratlar bir gece aç bırakılarak sakrifiye edildi ve homojenizasyon için böbrek ve karaciğer dokuları toplandı. TF aktivitesi Quick metoduna, SA miktarı ise Warren'in metoduna göre ölçüldü.

Bulgular: D-galaktoz grubu böbrek dokusunda SA miktarı kontrol ve doğal yaşlı gruplara oranla anlamlı derecede azalmış, TF aktivitesi ise anlamlı derecede artmıştır. Karaciğer dokusu SA miktarında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Karaciğer TF aktivitesi ise D-galaktoz grubunda kontrol grubuna göre artmıştır.

Sonuç: D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde böbrek ve karaciğer dokularında meydana gelen TF aktivitesi artışı ve böbrek SA seviyelerindeki azalma D-galaktozun yaşlanma ile ilgili tromboz/hemostaz çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: D-galaktoz, yaşlanma, doku faktörü, sialik asit

ABSTRACT

Evaluation of tissue factor activities and sialic acid levels in D-galactose induced aging model

Objective: The aims of this study are to evaluate the changes in tissue factor (TF) activities and sialic acid (SA) concentrations of D-galactose induced rat hepatic and renal tissues and compare with the naturally aged and the control groups.

Methods: In this study Sprague-Dawley male rats (n=28, 20 weeks old) were used. The experiment and the control groups were organized as follows: 1) young male control group (n= 8, 20 weeks old). 2) naturally aged male group (n= 10) 3) D-Galactose induced ageing group (D-galactose injected (60 mg/kg/day) for 6 weeks, n= 8, 20-week-old). At the end of the treatment, the rats were sacrificed following an overnight fast, kidney and liver tissues were immediately collected for homogenization. TF activity and SA levels were measured by the methods of Quick and Warren respectively.

Results: SA levels of kidney decreased whereas TFa (TF activity) increased significantly in the D-galactose induced aging group when compared with the control and the naturally aged groups. SA levels of liver did not change significantly between the groups. TFa of liver increased significantly compared with the control group.

Conclusion: Increased TFa (TF activity) of kidney and liver and decreased SA levels of kidney in D-galactose induced aging model show that this model can be used in studies related with aging, thrombosis and haemostasis.

Key words: D-galactose, aging, tissue factor, sialic acid

GİRİŞ

Memeliler için galaktozun en önemli besinsel kaynağı süt ve süt ürünlerinde bulunan laktozdur. Laktozun gast-

rointestinal sistemde sindirime uğraması sonucu oluşan glukoz ve galaktoz aktif transportla ince bağırsak epitel hücreleri içine alınır ve kana geçer. Glukozun epimerizasyonu sonucu oluşabilen galaktoz insülininden bağımsız ola-

rak hücre içerisine alınır. Oluşan sakkaritlerin hücre membranında bulunan lipid ve proteinlerle bağlanmaları sonucu glikozaminoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidler oluşur (1). Farelere düşük dozda D-galaktoz enjeksiyonun hızlandırılmış yaşlanmaya benzeyen belirtileri ilk kez Çin'de bildirilmiştir. Bu yaşlanma modelinde nörolojik zararlar, antioksidan enzim aktivitesinde azalma ve zayıflamış immün yanıt gösterilmiştir. Ancak bu mekanizma hakkında daha fazla verilere ihtiyaç vardır (2).

En çok hücre zarlarında bulunan sialik asit (SA), glikoprotein ve glikolipidlerin terminal karbohidrat komponentini oluşturur. Antijenik bir belirteç olarak tanımlanan SA, yüzey reseptörlerinin yapısında, glikoprotein ve glikolipidlerde antijenik bölgede yer alır. SA, kan grubu bileşikleri ile hormon, sitokin gibi endojenlerin reseptörleri için zorunlu bir bileşiktir. SA'nın 5. pozisyonunda sahip olduğu amino grubu ve ona fizyolojik koşullarda negatif özellik sağlayan 1. pozisyonadaki karboksil grubu SA'ya özel yapısal özellik kazandırır (3). SA'nın büyük kısmı akut inflamatuvar reaksiyonlarda artan akut faz proteinleri olarak bilinen proteinlere bağlıdır ve akut faz reaktanı olarak görev yapmaktadır (4-6).

Tromboplastin olarak da bilinen doku faktörü (TF), 45-kDa molekül ağırlığına sahip transmembran yapısında bir glikoproteindir. Ekstrinsik koagülasyon kaskadının asıl başlatıcısıdır ve kanın pıhtılaşmasında, inflamasyonda, embriyonik gelişimde, anjiogenezde, tümör metastazında, hücre adhezyonu/migrasyonunda ve doğuştan kazanılmış bağışıklıkta rol oynar (7). Çeşitli doku ve vücut sıvılarında TF aktivitesi gözlenmiştir (7-12). TF'nin intrasellüler bölgesinde 2 fosforilasyon bölgesi içermesi, bu proteinin intrasellüler süreçlerde rol oynadığına işaret etmektedir (7).

Damar duvarının bozulması sonucunda hücre tabakaları arasındaki TF eksprese eden hücreler kan dolaşımına katılır. Aktif faktör VIIa (FVIIa) ile bağlanmanın ardından oluşan TF/FVIIa kompleksi ekstrinsik koagülasyon yolunu başlatır (13). TF/FVIIa kompleksi FX'u FXa'ya çevirir, bu da daha sonra protrombinin trombine dönüşmesine neden olur. Son aşamada trombin, fibrinojenden fibrin oluşumunu indükler, böylece pıhtı oluşumu sağlanmış olur. TF birçok hücre tipinde bulunmaktadır. Fibroblast ve düz kas hücreleri gibi ekstravasküler dokularda eksprese edilen TF'nin rolü, vasküler hasar olduğu anda koagülasyonu aktive etmek için her zaman harekete hazır beklemektir.

Platelet, lökosit ve endotelial hücreler gibi intravasküler hücreler ekstrasellüler uyarılara ve hasara karşı TF eksprese ederek cevap verebilirler. Bu hücrelerde TF ifadesinin hemostaz gibi fizyolojik süreçlerin regülasyonunu etkilediği bilinmektedir (7-14).

Yaşlanma çalışmalarında 6-10 hafta süreyle D-galaktoz enjekte edilen ratlarda oksidatif stres ve buna bağlı olarak böbrek dahil olmak üzere çeşitli dokularda serbest radikallerde artış gözlenmiştir (15). Bu nedenle ratlarda yaşlanma modeli oluşturulmasında D-galaktozun kullanılabilceği gösterilmiştir (15-17). Ancak D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde dokuların TF aktivitelerine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Buradan yola çıkarak çalışmamızda D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde karaciğer ve böbrek dokularının TF aktivitelerinin belirlenmesi ve SA miktarlarının ölçülmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney protokolü İstanbul Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile uygulanmıştır ve tüm deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada yirmi haftalık (309±14.7 g ağırlık) 28 adet Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 23±1 °C ve %60 nem koşulları altında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda stabil bir şekilde ad libitum ve taze çeşme suyu ile beslendi. Gruplar; 1) genç erkek kontrol grubu (n= 8), 2) doğal yaşlı erkek grup (n= 10), 3) D-galaktoz ile yaşlandırılmış grup (n= 10, 6 hafta süreyle 60 mg/kg/gün intraperitoneal (ip) D-galaktoz enjekte edilen 20 haftalık erkek sıçanlar) olacak şekilde ayrıldı. Doğal yaşlı ve kontrol gruplarına serum fizyolojik enjekte edildi. İşlemler sonunda, ratlar bir gece aç bırakılarak sakrifiye edildi ve homojenizasyon için böbrek ve karaciğer dokuları hızlı ve dikkatli bir biçimde toplandı. Dokular SA ve TF aktivitesi analizleri için -80°C de saklandı.

Sialik Asit Tayini

Böbrek ve karaciğer dokularından hazırlanan %10'luk homojenatlarda; Total SA tayini Warren'in metoduna göre yapıldı (18). Periyodik asit oksidasyonu sonucu oluşan β-formilpürivik asit 2 multiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokuldu. 549 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir

bileşik oluşturuldu. Bu ürün stabil olmadığı için, sikloheksanon fazına çekilerek spektrofotometrede 549 nm'de absorpsanlar kaydedildi. SA miktarı µg/mg protein olarak değerlendirildi.

Doku Faktörü Aktivitesi Tayini

TF aktivitesi sağlıklı kişilerden alınan plazma kullanılarak Quick metoduna göre tesbit edildi (19). TF kaynağı olarak doku homojenatı kullanıldı. CaCl₂ ilavesinden sonra fibrin oluşumu için geçen süre belirlendi. Aktivite sn olarak ölçüldü ve sonuçlar değerlendirildi. Fibrin oluşumu için geçen süre TF aktivitesi ile ters orantılıdır.

İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesi amacıyla Kruskal-Wallis testi takiben Mann Whitney U testi ve Dunn çoklu karşılaştırma testi Graph pad Prizma 4 istatistik programında kullanılarak uygulandı. P değeri <0.05 olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Böbrek dokusunda SA miktarı D-galaktoz yaşlı grubunda kontrol ve doğal yaşlı gruplarına oranla anlamlı derecede azalmıştır. TF aktivitesinde ise D-galaktoz grubunda kontrol ve doğal yaşlı gruplarına oranla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Sürenin azalması TF aktivitesinin arttığını göstermektedir (Tablo 1).

Karaciğer dokusunda gruplar arasında SA seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. D-galaktoz grubunun TF aktivitesinde Kontrol grubuna oranla bir artış gözlenirken, Doğal yaşlı grubuyla arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 2).

TARTIŞMA

Kemirgenlerde D-galaktoz enjeksiyonunun nörolojik zararlara neden olabileceği ilk defa Çin'de yapılan bir araştırmada karbonhidratlarda subakut toksite test edilirken bulunmuştur (20). Sonraki çalışmalarda ise D-galaktoz enjeksiyonunun nöromusküler aktivitede, antioksidan enzim aktivitesinde ve immün yanıtta azalışa, serbest radikal üretiminde ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (20,21). Normal yaşlanma sürecine olan benzerliği nedeniyle yaşlanma ve ilaç çalışmalarında D-galaktoz ile oluşturulan modeller fare ve ratlarda kullanılmıştır (21). Geçen 10 yıl içinde Çin'de, bu modelin kullanıldığı yüzden fazla yayın bulunmaktadır. Bu modelde hayvanlar fizyolojik ve patolojik olarak diğer 16-24 aylık yaşlı hayvanlara benzerdir (20). Ancak bu mekanizma hakkında daha fazla verilere ihtiyaç vardır.

D-Galaktozamin (D-GalN) karaciğerde galaktoz yolağı ile metabolize olan bir amino şekerdir ve selektif bir hepatotoksindir (22). D-GalN'in i.p uygulanması hepatositlerde intrasellüler uridin trifosfat havuzunu azaltarak RNA ve protein sentezini engeller (23). Sıçanlarda i.p uygulandığında serum transaminaz düzeylerinin artışına, hepatic nekroza ve komaya yol açar (24). D-GalN'in neden olduğu

Tablo 1: böbrek dokusunda grupların sialik asit miktarları ve doku faktörü aktiviteyi

	Kontrol Grubu	Doğal Yaşlı Grubu	D-galaktoz Yaşlı Grubu	p ^a
SA µg/mg protein	10.54 ± 1.72	9.04 ± 1.65	6.48 ± 1.28* ^Δ	p=0,0003
TFa (sn)	48.00 ± 4.66	48.30 ± 6.13	39.30 ± 7.58* ^Δ	p=0,0129

Değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmektedir. p değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. ^aÜç grubun karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır.

*p<0.05; Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ^Δp<0.05; Doğal yaşlı grubuyla karşılaştırıldığında.

SA: Sialik asid, TFa: Doku Faktörü aktivitesi, Saniyede artış TF aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

Tablo 2: Karaciğer dokusunda grupların SA miktarları ve TF aktiviteyi

	Kontrol Grubu	Doğal Yaşlı Grubu	D-galaktoz Yaşlı Grubu	p ^a
SA µg/mg protein	13,15 ± 2,11	16,21 ± 3,91	14,56 ± 6,22	p>0,05
TFa (sn)	124,00 ± 11,00	108,20 ± 18,62	106,00 ± 15,02*	p=0,0424

Değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmektedir. p değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. ^aÜç grubun karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır.

*p<0.05; Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

SA: Sialik asid, TFa: Doku Faktörü aktivitesi, Saniyede artış TF aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

karaciğer lezyonlarının morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin insan viral hepatit lezyonlarına birçok açıdan benzediği bildirilmiştir (23).

İleri yaş bir pro-inflamatuar durumdur, inflamasyonun yükselmesi ile karakterizedir ve ileri yaşa bağlı kronik koşullarda birçok inflamatuvar ve hemostaz belirteçlerinin artışı gözlenir. Hayvan ve insan deney modellerinde yaşlılarda koagülasyon-fibrinoliz ve inflamasyon yanıtının arttığı bildirilmektedir. Bu durum ilerleyen yaşla beraber gelişen kardiyovasküler hastalıklar ve tromboz ile ilişkilidir (25). Diğer taraftan böbrek fonksiyonlarında azalma ve yaşa bağlı renal yetmezlikte artma yaşlanmanın ortak semptomlarıdır. Ayrıca genel olarak fonksiyonel renal kitelerde, yaşla birlikte azalma meydana gelir. Rat ve insanlarda yaşlılığa bağlı olarak renal yaşlanma glomerulusların filtrasyon hızının azalmasına neden olur (26).

Mehdi ve ark. (27) yaşlanmaya bağlı olarak eritrosit membranında SA içeriğinin azaldığını plazmada ise arttığını bildirmiştir. Araştırmacılar yaşlanmaya bağlı gelişen oksidatif hasarın membran SA bileşimini etkileyip membrandaki birçok enzimatik ve transport faaliyetlerini değiştirebileceğini öne sürmüşler ve plazma SA miktarının tanılmasını vurgulamışlardır.

Benzer çalışmalarda da hücre membran SA reaktivitesinin organizmanın yaşlanmasına bağlı olarak azaldığını gösterilmiştir (28-30). Çalışmamızda, D-galaktoz ile yaşlandırılan grupta böbrek dokusunda SA miktarında diğer gruplara oranla önemli derecede bir azalma gözlenmiş olup aynı azalma karaciğer dokusunda gözlenmemiştir. Bulgularımızdan farklı olarak Aydın ve ark. (16) yaptıkları çalışmada D-galaktoz ile oluşturdukları yaşlanma grubunda ve doğal yaşlı grupta böbrek SA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmiştir. Yazarlar bu bulgularını

nı böbrek dokusunda glikoprotein hemostazının sıkı bir şekilde korunmasına bağlamışlardır.

Çakatay ve ark. (31) sıçanlarda D-galaktoz ile oluşturdukları yaşlanma modelinde hepatik SA miktarının kontrol grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar desializasyonun hem glikoproteinlerin yapı ve fonksiyonunu etkilediğini hem de serbest SA miktarını arttırarak dokularda hasara neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu bulgular yaşlanmanın moleküler bozulmaya neden olarak hücre hasarı ve bunu takiben doku ve organların fonksiyonel olarak zayıflamaya neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde hem böbrek hem de karaciğer TF aktivitelerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Hiperkoagülasyon ve tromboza eğilim bazı stres faktörleri tarafından indüklebilir durumlardır. Klinik olarak yaşlı ve obez kişilerin, strese bağlı trombotik durumlara daha fazla maruz kaldığı bildirilmiştir. Yamamoto ve ark (32) yaşlı ve obez farelerde TF geninin stres ile indüklendiğini göstermişlerdir. Çalışmamızın sonuçlarına göre böbrek ve karaciğer dokularında artan TF aktivitesi yaşlanma ile beraber gelişen tromboza eğilimi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde böbrek ve karaciğer dokularında meydana gelen TF aktivitesi artışı, D-galaktoz ile oluşturulan bu modelin yaşlanma ile ilgili tromboz ve hemostaz çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca D-galaktoz ile oluşturulmuş yaşlanma grubunda SA miktarında meydana gelen azalma, SA'nın yine bu tarz çalışmalarda hücre hasarı ve organ fonksiyonları hakkında bilgi sağlayabilecek inflamatuvar bir belirteç olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Lai, Kent, Louis J. Elsas, and Klaas J. Wierenga. Galactose toxicity in animals. *IUBMB life*. 2009; 61(11): 1063-1074.
- Song X, Bao M, Li D, Li YM. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev*. 1999; 108(3): 239-251.
- Traving C, and R. Schauer. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci*. 1998; 54(12): 1330-1349.
- Varki Ajit. Sialic acids in human health and disease. *Inorg Chem*. 2008; 14(8): 351-360.
- Varki Nissi M, and Ajit Varki. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab invest*. 2007; 87(9): 851-857.
- Kökoğlu E, Sönmez H, Uslu E, Uslu I. Sialic acid levels in various types of cancer. *Cancer Biochem Biophys*. 1992; 13(1): 57-64.
- Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood*. 1988; 71: 1-8.
- Yarat A, Tunali T, Pisiriciler R, Akyuz S, Ipbuker A, Emekli N. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. *Clin Oral Invest*. 2004; 8(1): 36-39.

9. Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Yarat A. Tissue factor activities of streptozotoc in induced diabetic rat tissues and the effect of peanut consumption. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23(8): 653-658.
10. Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Yarat A. Peanutsim prove blood glutathione, HDL-cholesterol level and change tissue factor activity in rats fed a high-cholesterol diet. *Eur J Nutr.* 2007; 46(8): 476-82.
11. Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Alturfan AA, Pisiriciler R, Yarat A. Effect of samplestorage on stability of salivary glutathione, lipid peroxidation levels, and tissue factor activity. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23(2): 93-98.
12. Emekli-Alturfan E, Basar I, Malali E, Elemek E, Oktay S, Ayan F, Emekli N, Noyan U. Plasma tissue factor levels and salivary tissue factor activities of periodontitis patients with and without cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2010; 37(2-4): 77-81.
13. Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Yarat A. Effects of oleic acid on the tissue factor activity, blood lipids, antioxidant and oxidant parameters of streptozotoc in induced diabetic rats fed a high-cholesterol diet. *Med Chem Res.* 2010; 19(8): 1011-1024.
14. Morrissey JH. Tissue factor and factor VII initiation of coagulation. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 89-102.
15. Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose induced brain aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(4): 1082-1087.
16. Aydın S, Yanar K, Atukeren P, Dalo E, Sitar ME, Uslu E, Çakatay U. Comparison of oxidative stress biomarkers in renal tissues of d-galactose induced, naturally aged and young rats. *Biogerontology.* 2012; 13(3): 251-260.
17. Liu A, Ma Y, Zhu Z . Protective effect of selenoarginine aganist oxidative stress in D-galactose-induced aging mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(7): 1461-1464.
18. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Bio Chem.* 1959; 234: 1971-5.
19. Ingram GIC, Hills M. Reference method for the one stage prothrombin time test on human blood. *Thromb-Haemostas.* 1976; 36: 237-238.
20. Zhang X, Li WB, Zhang BL. Biochemical changes in D-galactose induced subacute toxicity and mimetic aging in mice. *Chinese J Pharm Toxicol.* 1990; 4: 309-310.
21. Gong GQ, Xu FB, 1991. Study of aging model in mice. *J China Pharm Univ.* 1992; 22: 101-103.
22. Li WB, Wei F, Fan M, Zhang JL, Zhang BL, Ma XC, Yang WP, Wei W. Mimetic brain aging effect induced by D-galactose in mice. *Chinese J Pharm Toxicol.* 1995; 9: 93-95.
23. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transplantation.* 2000; 6(1): 21-31.
24. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol.* 1968; 9(2): 279-290.
25. Wilkerson WR, Sane DC. Aging and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28(6): 555-568.
26. Muntané J, Montero JL, Marchal T, Perez-Seoane C, Lozano JM, Fraga E, et al. Effect of PGE1 on TNF-alpha status and hepatic D-galactosamine-induced apoptosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998; 13(2): 197-207.
27. Mehdi MM, Singh P, Rizvi SI. Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: correlation with markers of oxidative stress. *Dis Markers.* 2012; 32(3): 179-186.
28. Gumus A, Balcan E. Determination of Glycoconjugate Residues of Erythrocytes at Different Age Groups of Rats. *International Journal of Hematology and Oncology.* 2000; 20(1): 6-13.
29. Greenwalt TJ, Steane EA. Quantitative haemagglutination. 5. Influence of in vivo aging and neuraminidase treatment on the M and N antigens of human red cells. *Br J Haematol.* 1973; 25: 217-226.
30. Gattegno L, Bladier D, Cornillot P. Aging in vivo and neuraminidase treatment of rabbit erythrocytes: influenceon half-life as assessed by 51Cr labelling. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975; 356: 391-397.
31. Cakatay U, Aydın S, Atukeren P, Yanar K, E Sitar M, Dalo E, Uslu E. Increased Protein Oxidation and Loss of Protein-Bound Sialic Acid in Hepatic Tissues of D-galactose Induced Aged Rats. *Current Aging Science.* 2013; 6(2): 135-141.
32. Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. *Blood.* 2002; 100(12): 4011-4018.