

Ratlarda diyete eklenen borun kan bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileri

Pınar BULUZ¹, Nuri Başpınar¹, Pınar Peker Akalın², Selçuk PEKKAYA³

¹ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

² Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay

³ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md. Biyokimya Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 08.12.2014, Kabul Tarihi / Accepted: 09.07.2015

Özet: Bu çalışmada; diyete eklenen borun plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileri araştırıldı. Çalışmada 8 haftalık 200-250 g canlı ağırlıkta erişkin, 36 adet erkek Sprague-Dawley ırkı rat kullanıldı. Ratlar 22±3°C de 12:12 saat aydınlık-karanlık siklusunda tutularak standart rat yemi ve su ile ad libitum beslendi. Ratlar kontrol, deneme 1 (D1), deneme 2 (D2) olmak üzere 12'şerli 3 gruba ayrıldı. Standart rat yemi öğütüldü; D1 grubuna 50 ppm, D2 grubuna 100 ppm bor olacak şekilde sodyumtetraborax ilave edilip karıştırıldı ve tekrar pellet haline getirildi. Üç aylık deneme süresince 3 haftada bir ratların canlı ağırlıkları tartılıp kuyruk venasından heparinli polietilen tüplere alınan kan örneklerinde plazma seruloplazmin ve bakır analizleri yapıldı. Çalışmada kontrol ve deneme grupları plazma bakır konsantrasyonlarının zamanla değiştiği (P<0,001), ancak gruplar arası farkın önemsiz (p>0,05) olduğu belirlendi. Örneklemeye zamanına göre seruloplazmin düzeylerindeki değişimler, bakır düzeylerindeki değişimlerle paralellik göstermekle birlikte deneme grupları plazma seruloplazmin düzeyleri kontrole göre daha düşük olup, gruplar arası fark önemli (P<0,05) bulundu. Sonuç olarak; borun plazma bakır düzeylerini etkilemeksizin seruloplazmin düzeylerini düşürdüğü; bu sebeple borun, seruloplazmin sentezini azaltarak ya da seruloplazminin yapısına bakırın bağlanmasını engelleyerek etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Bor, Seruloplazmin, Bakır

Effects of dietary boron on blood ceruloplasmin and copper levels in rats

Summary: In this study, effects of bor supplementation of diet on plasma copper and ceruloplasmin levels were investigated. Eight weeks old, male Sprague-Dawley (n=36, 200-250 g) rats were used. They were maintained in a temperature-controlled room (22°C± 3) in a 12:12 h light-dark cycle. Food (Purina rat chow) and water was provided ad libitum. Rats were divided into 3 groups as Control, Experimental 1 (E1) and Experimental 2 (E2), including 12 animals of each. Fifty (E1) and 100 ppm (E2) bor was added into the ration for 3 months. Blood samples were collected from the tail vein once with a 3 weeks interval and transferred into heparinized tubes for the determination of ceruloplasmin and copper levels. Body weight of each rat was also recorded at the same time points. Plasma copper levels in Control and Experimental groups changed significantly by time (P<0,001), but the difference between the groups were not statistically significant (p>0,05). Plasma ceruloplasmin levels decreased in groups E1 and E2 (P<0,05) compared to the control group. It was concluded that, bor might reduce plasma ceruloplasmin levels without any effect on copper, probably by decreasing synthesis of ceruloplasmin or preventing the copper content of ceruloplasmin.

Key Words: Bor, Ceruloplasmin, Copper

Giriş

Bor yarımetal ve yarı iletken bir element olup periyodik cetvelin 13. grubunda yer alır. Dünyada az bulunan elementlerdendir ve borik asit ve boraks gibi bileşiklerle birlikte bulunur. Borun hayvan ve insan beslenmesinde esansiyel olduğu; mineral metabolizması, beyin fonksiyonları, hormon regülasyonu,

osteoporoz ve osteoartritiste önemli olduğu ileri sürülmektedir [8,19,23,25]. Borun, leptin, insülin, glikoz düzeylerini düşürdüğü, T3 hormon düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir [17]. Bor, cis-hidroksil grubu taşıyan organik bileşiklerle, şekerler, polisakaritler, adenozin 5 fosfat, pridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit, piridin nükleotidleri, fosfoinoziditler, glikoproteinler ve glikolipidler ile kompleks

oluşturabilmektedir [3]. Bor yetersizliğinde mineral metabolizması, algılama fonksiyonları ve kemik yoğunluğu bozulmakta ve vitamin düzeyleri değişmektedir [8,19,23,25]. Bor toksikasyonu üreme sistemini etkilemektedir. Burukoğlu ve Bayçu [5], 70 gün süreyle içme sularında 300 mg/L boraks verilen ratlarda 70. gün sonunda spermatogoniumlarda vakuolizasyon ve rezidüel yapıların sayıca arttığını gözlemlemiştir. Ayrıca yüksek dozda borun böbrek ve testislerde hasara neden olduğu da bildirilmiştir [22].

Borun enerji metabolizmasıyla ilgili olmak üzere 26 enzimin aktivitesinde etkili olduğu ileri sürülmektedir [14]. İnsanlarda bor ilavesi bakır ve bakıra bağımlı enzimlerin seviyelerini etkiler. Diyetle 0,25 mg B/2000 kcal/gün düşük borla 63 gün süreyle beslenen 45 yaş üstü 5 erkek ve menapoz sonrası östrojen tedavisi gören 5 kadında eritrosit süperoksit dismutaz, serum seruloplazmin ve plazma bakırının yükseldiği [25], menapoz sonrası bor ilavesinin östrojen ve testosteron konsantrasyonlarını artırdığı bildirilmektedir [22].

Ratlarda diyetle alınan borun; kardiyak bakır, kalsiyum, manganez, molibdenum ve fosfor konsantrasyonlarını etkilediği bildirilmiştir [15].

Bakır oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alan bazı metalloenzimlerin fonksiyonları için gerekli olan bir eser elementtir. Bu enzimlerin en önemlileri seruloplazmin, sitokrom C oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat oksidaz, lizil oksidaz, tirozinaz [6,21], katalaz, ürikaz, delta amino levülinik asit dehidrat (ALA-D), bağ dokusunda amino oksidaz, dopamin beta hidrosilaz ve mono amin oksidaz (MAO)'dır [4,28]. Seruloplazmin, molekül ağırlığı 132 000 olan, her bir molekülünde 6 bakır atomu içeren ve % 7-8'i karbonhidrat olan bir glikoproteindir. Yapısındaki karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur [1,8]. Başlıca karaciğerde sentezlenen seruloplazmin aynı zamanda inflamasyon ve doku hasarı gibi durumlarda ılımlı yanıt gösteren bir akut faz proteinidir [10,18]. Seruloplazmin, organizmada antioksidan olarak da görev yapmaktadır. Yara, infeksiyon, inflamasyon boyunca seruloplazmin aktivitesindeki artış, serum seruloplazmininin bir akut faz reaktanı ve bir antioksidan gibi hareket ettiğini göstermektedir [9,11]. Bor, seruloplazmin düzeylerinin arttığı

inflamasyonda, immün sistem hücrelerince salınan serin proteazlarını baskılayarak, lökotrien sentezini inhibe eder ve reaktif oksijen türlerini azaltır. İnsanlarda oral bor uygulaması sonrasında, yapısında bakır bulunan δ -Amino Levülinik Asit Dehidrat (ALA-D) ve eritrosit SOD'ın plazma düzeyleri azalmakta, ayrıca bor, menapoz sonrası kadınlarda bakır, seruloplazmin ve östradiol düzeylerini etkilemektedir [13]. Önemli iz elementlerden biri olan bakır seruloplazminin yapısına katılarak kana salınır. Seruloplazmin antioksidan savunma, demir metabolizması, bakır taşınması, koagülasyon ve angiogenesisinde de etkilidir [10,18].

Yapılan literatür taramalarında ratlarda rasyonla alınan bor ile plazma bakır ve seruloplazmin düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple bu çalışmada ratlarda farklı dozlarda diyetle katılan borun, plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada 8 haftalık 200-250 g canlı ağırlıkta erişkin, 36 adet erkek Sprague-Dawley ırkı rat kullanıldı. Ratlar $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ de 12:12 saat aydınlık karanlık siklusunda tutularak standart Purina rat yemi (Optima Besin Maddeleri San. Ve Tic. A.Ş.) ve su ile deneme öncesinde 1 hafta boyunca ad libitum beslendi.

Ratlar kontrol, deneme 1 (D1) ve deneme 2 (D2) olmak üzere 12'şerli 3 gruba ayrıldı. Her 3 gruba standart rat yemi öğütülerek D1 grubuna 50 ppm, D2 grubuna 100 ppm bor olacak şekilde sodyumtetra borat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ M=381 379 g/mol, Merck A716303 %99,0-103,0) ilave edilip karıştırıldı ve tekrar pellet haline getirildi. Pelletler etüvde kurutuldu ve ratlara verildi.

Üç aylık deneme süresince 3 haftada bir ratların canlı ağırlıkları tartılıp kuyruk venasından heparinli (sodyum içerikli Nevparin 5000 IU/ml) polietilen tüplere alınan kan örnekleri 3000 g'de 10 dk'da santrifüj edilerek plazmaları çıkarıldı, seruloplazmin ve bakır analizleri için -20°C 'de saklandı.

Plazma Seruloplazmin Analizi

Optimum pH ve ısı koşullarında asetat tamponunda hazırlanan P-fenilen diamin diklorid (PPD) plazma

örnekleri ile inkube edildiğinde oluşan renkli ürünün absorbanansı spektrometrede 546 nm’de okundu ve okunan absorbanstan seruloplazmin konsantrasyonları Colombo ve Richerich [7]’in formülüne göre hesaplandı.

Bakır Analizi

Standart ve test örneklerindeki bakır düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre ile ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri SPSS paket programı kullanılarak; gruplar arası farklar ANOVA ve Duncan testleriyle tespit edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada elde edilen bakır, seruloplazmin düzeyleri ile ilgili sonuçlar tablo 1, 2 ve canlı ağırlıktaki değişimler tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve deneme grupları plazma bakır düzeyleri (n=12, Ort±SH)

| Gruplar | Bakır (µg/dl) | | | | | p |
|----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----|
| | Başlangıç | 3.hafta | 6.hafta | 9.hafta | 12.hafta | |
| Kontrol | 124,2±0,006 ^{ax} | 85,2±0,006 ^{bc} | 93,9±0,005 ^{bc} | 74,4±0,05 ^c | 95,3±0,003 ^b | ** |
| Deneme 1 | 97,9±0,006 ^{ay} | 93,0±0,003 ^a | 92,8±0,003 ^a | 63,8±0,002 ^b | 90,2±0,005 ^a | ** |
| Deneme 2 | 87,8±0,005 ^{by} | 127,8±0,012 ^a | 88,3±0,004 ^b | 76,0±0,005 ^b | 91,9±0,004 ^b | ** |
| p | * | - | - | - | - | |

**p<0.001, * : p<0.05, - : Önemsiz

a, b, c: Aynı satırda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

x, y: Aynı sütunda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 2. Kontrol ve deneme grupları plazma seruloplazmin düzeyleri (n=12, Ort±SH)

| Gruplar | Seruloplazmin (mg/dl) | | | | | p |
|----------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----|
| | Başlangıç | 3.hafta | 6.hafta | 9.hafta | 12.hafta | |
| Kontrol | 68,5523±5,04 ^a | 65,3725±4,26 ^{ab} | 61,8965±4,07 ^{abx} | 43,3315±4,22 ^c | 55,2013±2,41 ^{bx} | ** |
| Deneme 1 | 57,196±5,61 ^a | 52,614±3,96 ^{ab} | 49,7305±2,62 ^{aby} | 45,1683±3,84 ^{ab} | 42,7785±3,07 ^{by} | * |
| Deneme 2 | 59,487±3,32 ^{ab} | 67,071±8,81 ^a | 51,7648±3,36 ^{bcy} | 36,972±3,51 ^c | 44,9115±4,1 ^{bcy} | ** |
| p | - | - | * | - | * | |

** : p<0.001, * : p<0.05, - : Önemsiz

a, b, c: Aynı satırda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

x, y: Aynı sütunda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 3. Kontrol ve deneme grupları canlı ağırlık değerleri (n=12, Ort±SH)

| Gruplar | Canlı Ağırlık (g) | | | | | p |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| | Başlangıç | 3.hafta | 6.hafta | 9.hafta | 12.hafta | |
| Kontrol | 207,67±5,10 ^a | 248,25±3,44 ^b | 276,50±3,03 ^c | 306,75±4,35 ^d | 324,4167±5,2 ^e | * |
| Deneme 1 | 206,17±4,48 ^a | 245,42±4,42 ^b | 270,67±6,4 ^c | 300,58±6,94 ^d | 322,83±10,48 ^e | * |
| Deneme 2 | 208,83±5,27 ^b | 242,42±5,29 ^b | 273,92±5,68 ^b | 301,25±6,06 ^a | 315,83±4,71 ^a | * |
| p | - | - | - | - | - | |

* : p<0.001, - : Önemsiz

a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir.

Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışma canlı ağırlıklardaki değişim yönünden incelendiğinde (Tablo 3) kontrol grubunda başlangıç canlı ağırlıkları 207,67± 5,1 g’den 324,42±

5,2 g’a (fark 116,75 g), deneme 1’de 206,17± 4,5 g’dan 322,83 ± 10,5 g’a (fark 116,66 g), deneme 2’de 208,83± 5,3 g’dan 315 ± 4,7 g’a (fark 107 g) yükselmiştir. Deneme sonunda canlı ağırlık düzeyleri arasındaki farklılık önemsiz olmakla birlikte

düzeyleriyle ilişkili olarak düşmüştür. Küçükkurt ve ark [17], Sprague Dawley ratlarda 100 mg B/kg dozda 28 gün boyunca diyete eklenen borun 28 günün sonunda canlı ağırlığı düşürdüğünü bildirmişlerdir. Weir ve Fisher [24], günlük; 2,6; 8,8; 26,3; 87,5 ve 263 mg bor/kg canlı ağırlık olacak şekilde 90 gün boyunca boraks ve borik asit içeren diyetle beslenen Sprague Dawley ırkı ratlarda yaptıkları araştırma sonucunda; 87,5 mg bor/kg canlı ağırlık olacak şekilde beslenen ratlarda; vücut ağırlığında düşmeler olduğunu bildirmişlerdir. Heindel ve ark. [12], 13,6; 28,5; 57,7; 94,2 mg / kg canlı ağırlık/ gün bor olacak şekilde borik asit içeren diyetle beslenen gebe Sprague Dawley ratlarda, yüksek dozda (57,7-94,2 mg / kg canlı ağırlık/ gün) canlı ağırlık artışında düşme olduğunu bildirmektedirler. Armstrong ve ark. [2] 21 günlük erkek ve dişi domuz yavrularında yapılan çalışmada 5- 15 mg/kg diyet (5- 15 ppm) borun canlı ağırlık artışını etkilemediğini gözlemişlerdir.

Yapılan literatür taramalarında, borun ratlarda plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileriyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnsanlarda bor ile yetersiz beslenme sonrasında bor takviyesinin serum SOD, seruloplazmin ve bakır düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bor eksikliği sonrası bor takviyesinin eritrosit SOD, serum seruloplazmin ve bakır düzeylerini yükselttiği, tek başına bor yetersizliğinde ise bir değişim gözlenmediği rapor edilmiştir [24]. Huel ve ark. [13], fazla miktarda bora maruz kalan hamile annelerde (n=197) doğumda plasental dokuda ve göbek kordonu kanında bor seviyesinin normalin üç kat olduğunu, bakırlı bir enzim olan δ -Amino Levülinik Asit Dehidratat (ALA-D) düzeylerinin önemli oranda düştüğünü; kan bor seviyesi ile ALA-D düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar bir Lewis asidi olan borun, hidroksil grubu taşıyan organik moleküllerle kompleks yaparak ALA-D'yi inhibe edici etkisiyle açıklanmıştır.

Sunulan çalışmada kontrol ve deneme 2 grubuna ait seruloplazmin düzeyleri 4. örneklere kadar düşmüş fakat 5. örneklerde tekrar yükselmiş buna karşın deneme 1 grubunda başlangıçtan itibaren azalma göstermiştir. Her üç grupta da 5. örnek seruloplazmin düzeyleri başlangıç düzeylerine göre önemli oranda azalmış ve deneme 1 ve deneme 2

gruplarındaki düşmeler kontrol grubuna göre önemli (P<0,05) bulunmuştur (Tablo 2). Deneme gruplarındaki seruloplazmin düzeylerindeki düşüşün borun insanlarda bakırlı enzimlerden olan ALA-D [13] ile negatif korelasyon göstermesi ile uyumlu görünürken, sonuçlar Nielsen ve ark. [25]'in bulgularıyla uyumsuz olmuştur; borun türler ve cinsiyetler arasında farklı etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada plazma bakır düzeyleri örnekleme zamanlarına göre önemli (P<0,001) düzeyde farklılıklar göstermesine karşın gruplar arası fark önemsiz bulunmuştur. Hunt ve Herbel [15], STZ diyabetik ratlarda diyetle alınan borun (0,06 mg B/kg) kardiyak bor konsantrasyonlarını etkilemediğini ancak kardiyak bakır, kalsiyum, manganez, molibdenum ve fosfor konsantrasyonlarını etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada borun bakır düzeylerini etkilemeksizin serum seruloplazmin düzeylerini düşürücü etkisi, bakırın seruloplazmin dışında başka proteinler tarafından taşındığını gösterebilir. Seruloplazmin, plazma bakırının %70-90'lık kısmının taşınmasından sorumlu kabul edilen bir protein olmasına karşın albümin ve transkuprein de bakır taşınmasında etkili proteinlerdir. Ayrıca memelilerde bakır taşınmasından sorumlu multicopper oksidazlar, hephaestin, zyklopen gibi birçok protein rapor edilmiştir [26]. Meyer ve ark. [20] aseruloplazmik farelerde bakırın emilim, taşınım ve dağılımında değişim olmadığını bildirmiştir. Sunulan çalışmada bakır düzeyleri değişmeksizin seruloplazmin düzeylerinin bor tarafından düşürülmesi, ratlarda bakır taşınımında seruloplazmin dışında başka proteinlerin varlığını desteklemektedir.

Sonuç olarak ratlarda rasyonla alınan 50 ve 100 ppm borun plazma bakır düzeylerini etkilemeksizin seruloplazmin düzeylerini düşürdüğü; bu sebeple borun, seruloplazmin sentezini azaltarak ya da yapısına bakırın bağlanmasını engelleyerek etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu konu üzerinde yapılacak benzer çalışmalarda kan bor seviyelerinin de belirlenmesinin ve uygulama süresinin daha uzun tutulmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Teşekkür

Sunulan çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 07 202 030).

Kaynaklar

1. Aouffen M, Paquin J, De Grandpre E, Nadeau R, Mateescu MA, (2001). *Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuroprotective properties. Biochem Cell Biol.* 79: 489-497.
2. Armstrong TA, Spears JW, Crenshaw TD, Nielsen FH, (2000). *Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. J Nutr.* 139: 2575-2581.
3. Bolanos L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D, (2004). *Why Boron? Plant Physiol and Biochem.* 42: 907-912.
4. Bremmer I, (1979). *The toxicity of cadmium, zinc and molybdenum and their effects on copper metabolism. Pro Nutr Soc.* 38: 325.
5. Burukoğlu D, Bayçu C, (2009). *Borun sıçan testis dokusuna etkisi. Anadolu University Journal of Science and Technology.* 10: 145-150.
6. Chan S, Gerson B, Subramaniam S, (1998). *The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. Clin Lab Med.* 18: 673-85.
7. Colombo JP, Richterich R, (1964) *Zur bestimmung des caeruloplasmin im plasma. Schweiz Med Wschr.* 94:715-720.
8. Dupre JN, Keenan MJ, Hegsted M, Brudevold AM, (1994). *Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D deficient diet. Env Health Perspect.* 102: 55-58.
9. Fleming RE, Whitman IP, Gitlin JD, (1991). *Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxida. Am J Physiol.* 260: 68-74.
10. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E, (1995). *Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. Life Sci.* 56: 1749-58.
11. Gitlin JD, (1988). *Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. J Biol Chem.* 263: 6281-6287.
12. Heindel JJ, Price CJ, Field EA, Marr MC, Myers CB, Morrissey RE, Schwetz BA, (1992). *Developmental toxicity of boric acid in mice and rats. Fund Appl Toxicol.* 18: 266-277.
13. Huel G, Yazbeck C, Burnel D, Missy P, Kloppmann W, (2004). *Environmental Boron Exposure and Activity of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALA-D) in a Newborn Population. Toxicol Sci.* 80: 304-309.
14. Hunt CD, (1998). *Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. Biol Trace Elem Res.* 66: 205-225.
15. Hunt CD, Herbel JL, (1992). *Boron affects energy metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat. Magnesium Trace Elem.* 10: 374-386.
16. Hunt CD, Nielsen FH, (1981). *Interaction between boron and cholecalciferol in the chick. McHowell J, Gawthorne JH, White CL. eds. Trace Elements in Man and Animals. Australian Academy of Science, Canberra, Australia p. 597-600.*
17. Kucukkurt I, Akbel E, Karabag F, Ince S, (2013). *The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. Toxicol Ind Health.* 31: 255-260.
18. McPearson RA, (1996). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method Henry JB. eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 237-257.*
19. Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL, (1994). *Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. Environ Health Perspect.* 7: 79-82.
20. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL, (2001). *Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. J Biol Chem.* 39: 36857-36861.
21. Milne DB, Burtis CA, Ashwood ER, (1999). *Trace Elements. In: Environ Health Perspect. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 1029-1055.*
22. Nacar A, Yasin Selçuk Y, Okuyan HM, Sefil NK, Deligönül E, Nacar E, (2014). *Borik asit uygulamasının sıçan böbrek ve testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı Omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisinin histopatolojik olarak incelenmesi. Dicle Tıp Dergisi.* 41: 385-390
23. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, (1987). *Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. FASEB J.* 1: 394-397.
24. Nielsen FH, (1992). *Biochemical and physiological consequences of boron deprivation in humans. North Dakota International Symposium on Health Effects of Boron and Its Compounds, University of California, Irvine, California. pp: 9-63.*
25. Nielsen FH, (1994). *Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. Environ Health Perspect.* 102: 59-63.
26. Prohaska JR, (2011). *Impact of Copper Limitation on Expression and Function of Multicopper oxidases (Ferroxidases). Adv Nutr.* 2: 89-95.
27. Weir RJ Jr, Fisher RS, (1972). *Toxicologic studies on borax and boric acid. Toxicol Appl Pharmacol.* 23: 351-364.
28. Yorbik Ö, (1999). *Otistik bozukluğu olan çocuklarda antioksidan enzimlerin ve bunlarla ilgili eser elementlerin araştırılması. Uzmanlık tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara.*