

КІНДРАТ І.П.^{1,2✉}, ЕРСТЕНЮК Г.М.¹

¹ Івано-Франківський національний медичний університет,
Україна, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2, e-mail: erst@ukr.net

² Національний центр з токсикологічних досліджень,
США, 72079, м. Джефферсон, вул. NCTR, 3900, e-mail: Iryna.Kindrat@fda.hhs.gov

✉ Iryna.Kindrat@fda.hhs.gov, Irakindrat0603@gmail.com, +1(870)5437724

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ МЕТАБОЛІЗМУ ЗАЛІЗА ЯК МАРКЕРІВ ОРГАН-СПЕЦИФІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ

Зростаюче розповсюдження в навколишньому середовищі ксенобіотиків різноманітної природи викликає всесвітню занепокоєність щодо їх токсичного впливу на здоров'я людини [1]. Печінка та нирки є головними органами знешкодження та виведення ксенобіотиків з організму, тому вони є таргетними органами для багатьох токсичних речовин. Серед механізмів, які беруть участь у токсичних проявах ксенобіотиків на ці органи, обмін заліза залишається найменш дослідженим.

Порушений метаболізм заліза відіграє важливу роль у розвитку хронічних захворювань як печінки, так і нирок, та утворення ракових пухлин у цих органах [2, 3]. Однак, на сьогодні відсутня переконлива інформація щодо механізмів такого порушення регуляції та впливу токсичних речовин на обмін заліза. З огляду на це, ми досліджували вплив гепатотоксиканту ді-(2-етилгексил) фталат (ДЕНР) та ниркового токсиканту аристоксієвої кислоти (АА) на метаболізм заліза в печінці та нирках щурів.

Пластифікатор ДЕНР є хімічною сполукою з родини фталатів, який використовується в промисловості для виготовлення виробів із пластику. ДЕНР проявляє токсичний вплив на весь організм, проте ДЕНР є, перш за все, гепатотоксикантом і можливим гепатоканцерогеном [4]. Рослина хвилівник звичайний (*Aristolochia clematitis*) використовується у традиційній китайській медицині для лікування екземи та радикуліту. Вона містить токсичну речовину – аристоксієву кислоту. Метаболізм АА призводить до утворення cyclic N-aculnitrenium ion, який формує аддукти з ДНК в нирках, печінці та інших органах [5]. АА також здатна викликати нефропатію, що збільшує ризик інтерстиціального нефриту, ниркової недостатності та призводить до розвитку раку нирок і сечовивідних шляхів [6].

Ми показали, що гепатотоксикант ДЕНР викликав у щурів зміни в експресії генів, кодуєючих білки обміну заліза, особливо зростання *Ftl1* та зниження *Hamp*. Ці зміни супроводжувалися зростанням індикаторів пошкодження ДНК. Водночас ДЕНР не виявив токсичних проявів у нирках, як і жодних змін в обміні заліза. Нирковий токсикант АА, який показав виражений токсичний вплив на нирки, також виявив зміни в експресії генів, які беруть участь в обміні заліза, і ці зміни відповідали таким в печінці за дії ДЕНР.

Матеріали і методи

Об'єкт дослідження.

Дослідження проводилися на щурах-самцях лінії Фішер 344, які були отримані з розплідника Національного центру з токсикологічних досліджень, у віці 6 тижнів. Тварин утримували в стандартних умовах віварію. Щурі отримували NIH-41 лабораторну дієту віварію з вільним доступом до їжі та води. Тварини були розподілені на чотири групи (дві дослідні та дві контрольні), по 6 тварин у кожній групі. Дослідні тварини першої групи отримували розчин АА 5 днів на тиждень, протягом 6 тижнів у дозі 1 мг/кг маси тіла. Відповідна контрольна група отримувала 0,9 % сольовий розчин в еквівалентних кількостях. Дослідні тварини другої групи отримували ДЕНР, який змішували з кормом, у кінцевій концентрації 2,4 %. Щурів умертвляли шляхом розташування їх у камері з ізофлюорановим газом. Для подальшого аналізу забирали печінку та нирки, які негайно заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C. Всі експериментальні процедури були виконані у відповідності з протоколом досліджень тварин, затвердженим комітетом із догляду та використання тварин національного центру з токсикологічних досліджень, Джефферсон, США.

Виділення загальної РНК, зворотна транскрипція та кількісна полімеразна ланцюгова реакція.

Виділення загальної РНК із тканин печінки та нирок проводили з використанням miRNeasy Mini Kit (Qiagen, США) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Зворотна транскрипція проводилася з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) відповідно до рекомендацій виробника. Оцінка експресії генів проводилася з використанням пресинтезованих TaqMan® Gene Expression Assay (Life Technologies, США) методом відносної експресії. Як референтний ген використовували ген β -актину. Відносну кількість кожного транскрипта мРНК визначали з використанням методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [7].

Аналіз експресії мікроРНК.

Рівень мікроРНК-122 (miR-122) і мікроРНК-34a (miR-34a) в тканинах печінки та нирок щурів визначали за допомогою qRT-PCR з використанням пресинтезованих TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, США). Рівень експресії мікроРНК нормалізовано до U87 snRNA і представлено в умовних одиницях ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) [7].

Статистичний аналіз.

Статистичні розрахунки та графічне представлення результатів аналізу проводили за допомогою статистичної програми SigmaPlot 13.0. Результати представлені у вигляді середнього значення \pm S.D, $n=6$. Статистичний аналіз проводили за допомогою t -тест і однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, парні порівняння проводилися за допомогою тесту Стьюдента-Ньюмена-Кейлса. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Результати та обговорення

Дані літератури свідчать, що гепатотоксикант ДЕНР в певних дозах може викликати незначні токсичні прояви в нирках [8]. Водночас АА, яка проявляє виражену ниркову токсичність, у певних дозах може виявляти помірну гепатотоксичність [9]. Тому ми спочатку дослідили органоспецифічність токсичних проявів ДЕНР та АА за експресією *miR-122* та маркерних генів, що кодують білки, які задіяні в механізмах печінкової токсичності – *Cyp2e1* та *Ddit3* та ниркової токсичності – *Havcr1* (*Kim1*) та *Spp1*. Як видно з рис. 1, пероральне введення ДЕНР в дозі 2,4 % призвело до зниження експресії *miR-122* більш ніж у 2 рази та 1,5 разово-

го збільшення експресії генів *Cyp2e1* та *Ddit3* в печінці щурів (рис. 1 А). Водночас АА викликала незначне підвищення експресії гена *Cyp2e1* (рис. 1 Б).

Відомо, що *miR-122* є біомаркером для токсичних уражень печінки, а її зниження спостерігається при розвитку стеатогепатитів, фіброзу печінки та при гепатоклітинній карциномі [10]. Ген *Ddit3* кодує транскрипційний фактор С/ЕВР гомологічний білок (СНОР) і є медіатором гепатотоксичності, який активується за стресу ендоплазматичного ретикулума та сприяє апоптозу [11]. СYP2E1 є ключовим ферментом, задіяним у метаболізмі більшості ксенобіотиків у печінці шляхом цитохром Р-450 залежного окислення [12]. Зростання експресії *Cyp2e1* та розширення ендоплазматичного ретикулума в печінці щурів, які отримували високі дози ДЕНР спостерігали також у роботі Parmar D. та ін., 1988 [13]. На противагу до печінки, ми не виявили змін в експресії генів-маркерів пошкодження в нирках за дії ДЕНР (рис. 1 В). Водночас АА призвела до зростання експресії генів-маркерів ниркової токсичності [14] *Havcr1* та *Spp1* в 15 та 5 разів, відповідно (рис. 1 Г). *Havcr1* (*Kim1*) кодує клітинний рецептор вірусу гепатиту А 1, експресія якого зростає на поверхні епітеліальних клітин каналців у нирках після їх ішемічного або токсичного ураження. Підвищення експресії *Spp1*, який кодує остеопонтин, спостерігав також Fuchs T.C. та ін., 2014 [15], в нирках тварин, які отримували АА в дозі 1 мг/кг на протязі 12 днів.

На наступному етапі ми дослідили вплив ДЕНР та АА на експресію генів, що кодують основні білки, які підтримують гомеостаз заліза в печінці та нирках.

Залізо посідає особливе місце серед незамінних елементів за своєю участю у життєво важливих фізіологічних та метаболічних функціях [16]. Проте вільне залізо є високореакційним елементом, здатним призводити до генерації активних форм кисню, пошкодження мембран клітин, білків та нуклеїнових кислот. Тому системний гомеостаз заліза [17] включає добре координований механізм, який забезпечується більш ніж 30 білками. Ключовими білками в обміні заліза в печінці та нирках у людей і ссавців є рецептор трансферину 1 (*Tfrc*), легкі (*Ftl1*) і важкі (*Fth1*) ланцюги феритину, феропортин (*Slc40a1*) та гепсидин (*Hamp*).

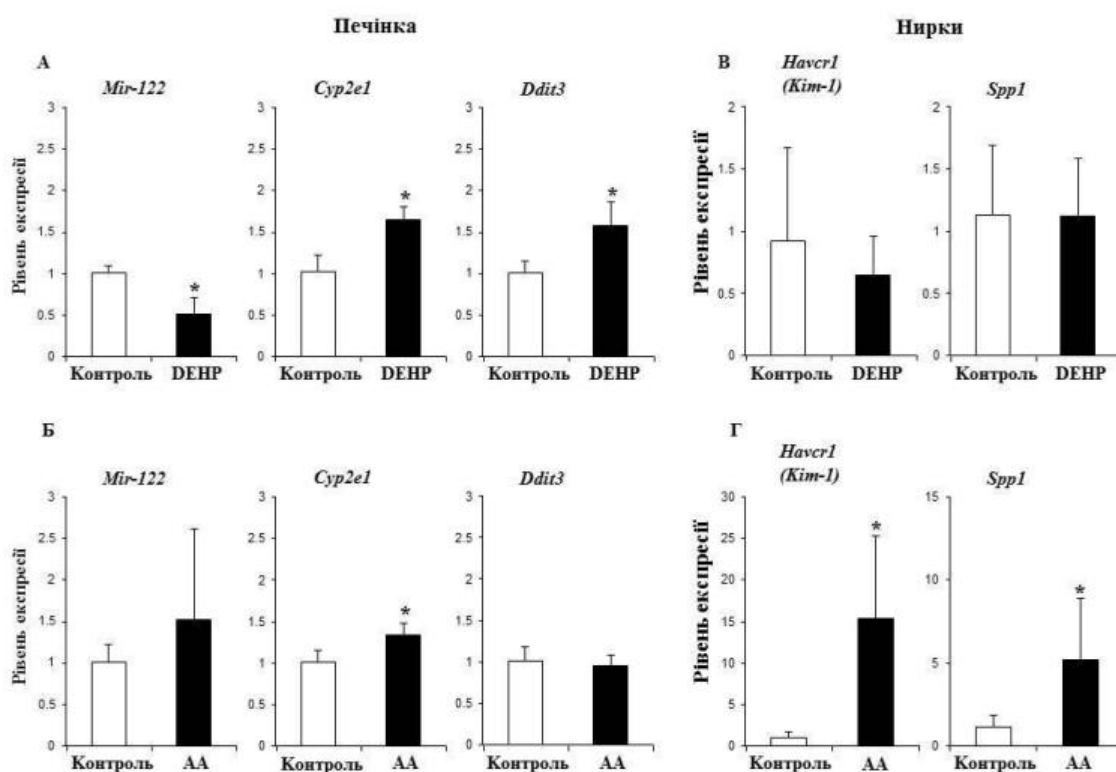


Рис. 1. Експресія генів-маркерів печінкової та ниркової токсичності за дії DEHP (А, В) і АА (Б, Г) у печінці та нирках щурів

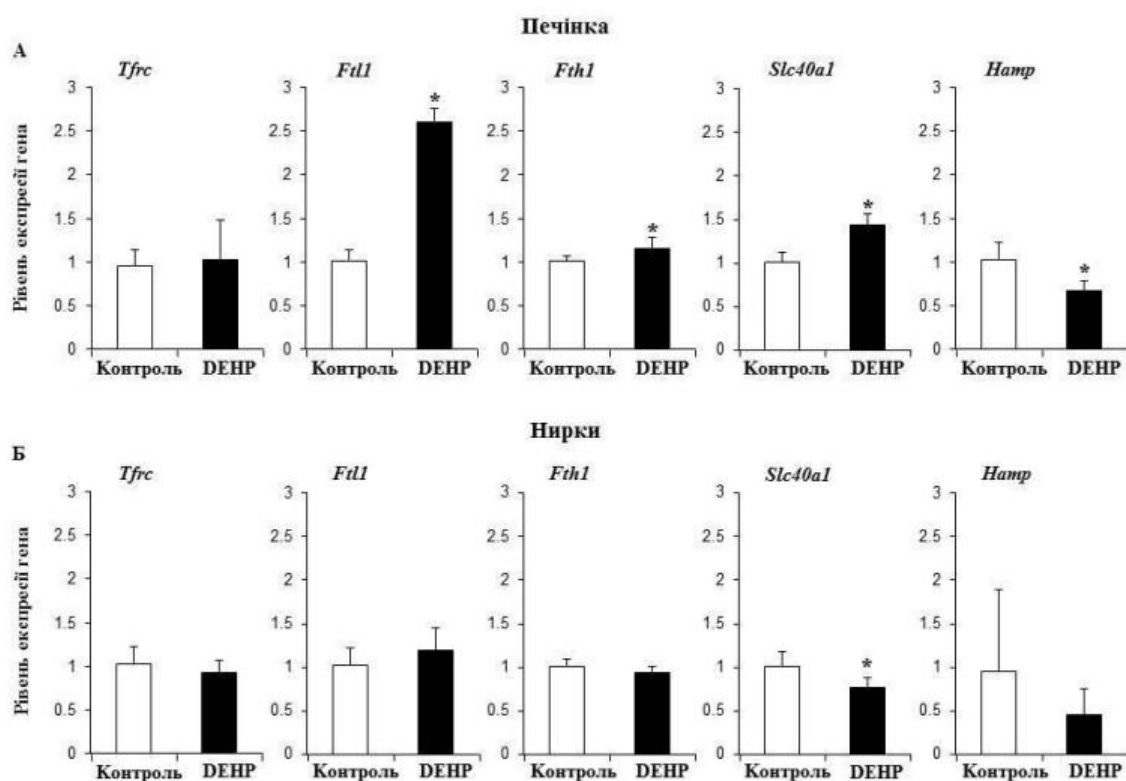


Рис. 2. Експресія генів, що кодують білки гомеостазу заліза, *Tfrc*, *Ft1l*, *Fth1*, *Slc40a1* і *Hamp* у печінці (А) та нирках (Б) щурів за дії DEHP

У нашому дослідженні гепатотоксикант ДЕНР, як видно на рис. 2 А, призвів до збільшення експресії *Ftl1*, *Fth1*, *Slc40a1* у печінці щурів зокрема легкі ланцюги феритину зросли більш ніж в 2,6 рази. На противагу цьому, рівень експресії *Hamp* знизився більш ніж в 1,5 рази у щурів досліджуваної групи. Водночас, ми не спостерігали значних змін в експресії цих генів у нирках щурів, які отримували ДЕНР (рис. 2 Б). Винятком є *Slc40a1*, який кодує феропортин і експресія якого була знижена. На відміну від ДЕНР, АА викликала зміни білків обміну заліза в нирках (рис. 3 Б) і ці зміни, окрім експресії *Tfrc*, корелювали з такими в печінці за дії ДЕНР. Водночас АА не викликала в печінці змін в експресії генів, що кодують білки гомеостазу заліза, за винятком зниження експресії *Slc40a1* та підвищення експресії *Tfrc* (рис. 3 А).

Як відомо, феритин є білком системи депонування іонів заліза та найбільш інформативним індикатором запасу заліза в організмі. Молекула феритину складається із 24 субодиниць двох типів: Н (heavy) та L (light), синтез яких детермінується *Fth1* та *Ftl1* генами. Декілька досліджень показали, що збільшення концент-

рації заліза в печінці та нирках є причиною підвищення експресії *FTL* та *FTH* [18]. В печінці вміст феритину змінюється при низці патологічних процесів. Було показано, що легкі ланцюги феритину були раніше визначені в якості кандидатів ниркових біомаркерів клітинної карциноми [19].

Ген *Slc40a1*, експресія якого була підвищена в печінці за дії ДЕНР (рис. 2 А) та в нирках за дії АА (рис. 3 Б), кодує трансмембранний білок феропортин, який є єдиним експортером клітинного заліза в гепатоцитах печінки [20] та епітелію клубочків і проксимальних каналців у нирках [21]. Відомо, що його експресія може активуватися при збільшенні заліза з метою виведення надлишків заліза з клітин [22]. Збільшення феропортину може бути зумовлене також зменшенням його інтерналізації та деградації іншим білком обміну заліза – гепсидином [23], порушення синтезу якого викликає розлади в обміні заліза. Гепсидин синтезується переважно у гепатоцитах, проте, дані останніх років свідчать, що він не є специфічним тільки для печінки, а може також відігравати певну роль у нирках [24].

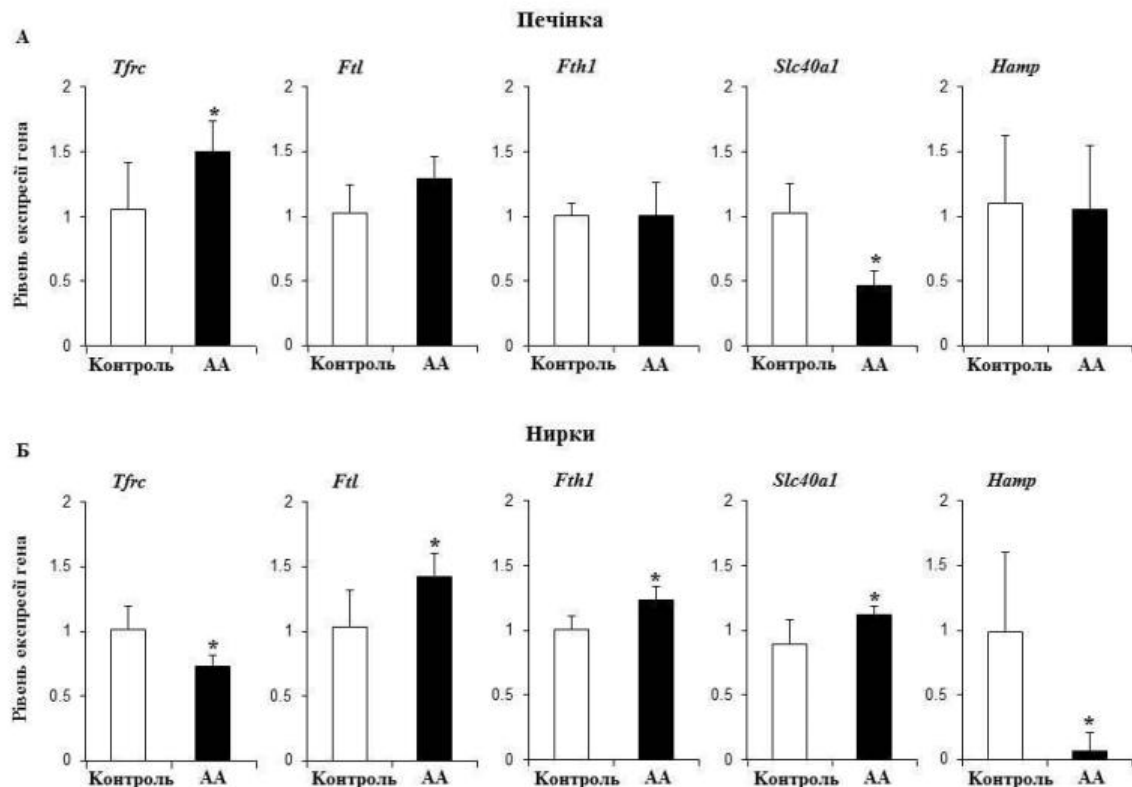


Рис. 3. Рівень експресії генів, що кодують білки гомеостазу заліза, *Tfrc*, *Ftl1*, *Fth1*, *Slc40a1* і *Hamp* у печінці (А) та нирках (Б) щурів, які отримували АА

Експресія *Tfrc* була зменшена в нирках за дії ниркового токсиканту АА (рис. 3 Б). Відомо, що цей ген кодує рецептор трансферину 1 (TfR), який відповідає за надходження трансферинвмісного заліза в більшість клітин [25]. У нирках TfR забезпечує реадсорбцію трансферину з фільтрату, що може бути основним механізмом, за допомогою якого клітини каналців отримують залізо, яке вони потребують [25].

Отже, за дії ДЕНР та АА ми спостерігали зміни в експресії генів, що кодують основні білки, які підтримують гомеостаз заліза в печінці та нирках. Відомо, що в цих органах порушення гомеостазу заліза, як його накопичення так і дефіцит, [26] може призводити до оксидативного стресу та пошкодження ДНК [27]. Тому

ми дослідили стан пошкодження ДНК під впливом ДЕНР та АА в нирках та печінці (рис. 4). Для цього ми вибрали два загальноприйняті маркери на пошкодження ДНК – експресію гена *Apx1* та *miR-34a* [27, 28]. В печінці ДЕНР призвів до триразового збільшення в експресії гена *Apx1* (рис. 4 А), що кодує ключовий фермент, який запускає механізм ексцизійної репарації основ BER [27]. На противагу до ДЕНР, в нирках АА не викликала змін в експресії *Apx1* (рис. 4 Б). Однак АА призвела до більш ніж 4 кратного підвищення рівня *miR-34a* (рис. 4 Г). Відомо, що *miR-34a* активується в регенеруючих проксимальних ниркових каналцях за умов оксидативного стресу, викликаного дією заліза *in vivo* [29].

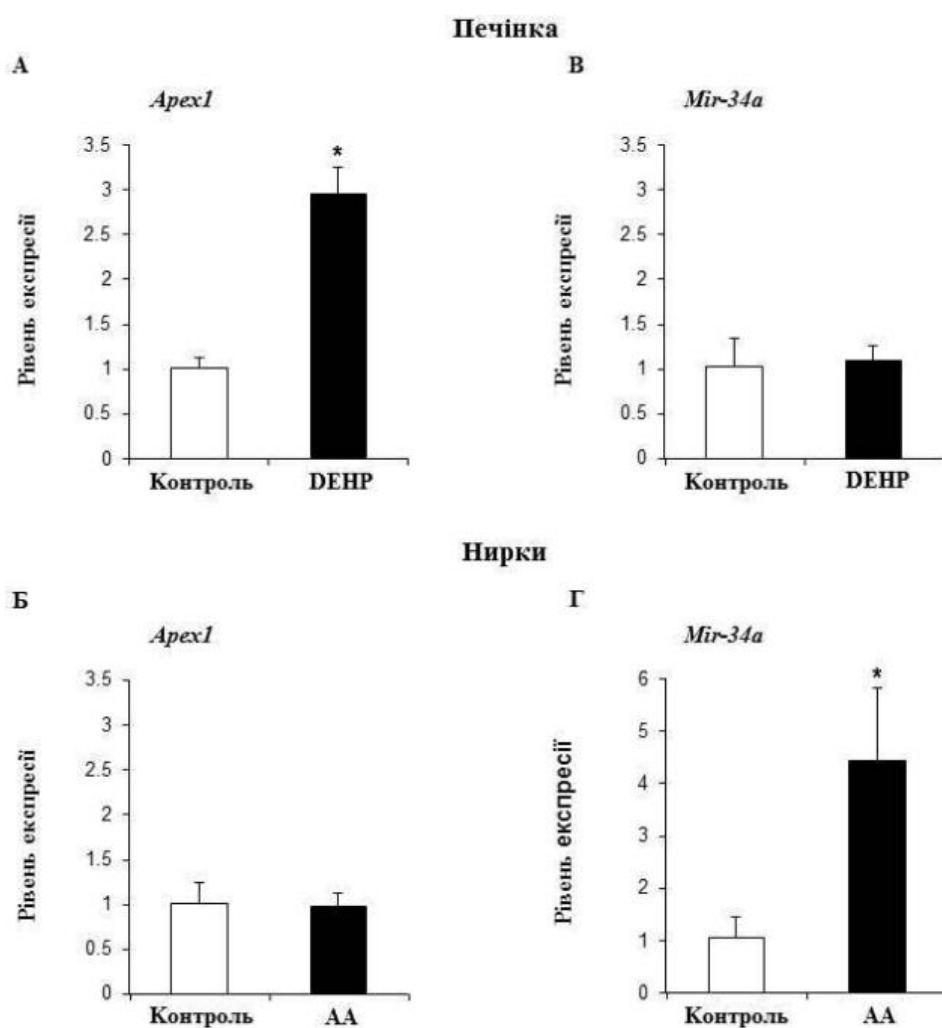


Рис. 4. Експресія генів-маркерів на стан пошкодження ДНК, *Apx1* та *miR-34a* у печінці за дії ДЕНР (А, В) та нирках щурів, які отримували АА (Б, Г)

Висновки

Результати нашого дослідження вказують на орган-специфічні зміни метаболізму заліза за дії гепатотоксиканту ДЕHP або ниркового токсиканту АА в печінці та нирках щурів. Ці зміни супроводжуються зростанням маркерів на пошкодження ДНК – Арех1 в печінці за дії ДЕHP та

miR-34a в нирках за дії АА. Подальші дослідження необхідні для розкриття молекулярних механізмів, які викликають зміни обміну заліза в таргет органах, а також з'ясування ролі змін обміну заліза в канцерогенному ефекті досліджених речовин.

Література

- Gianfreda L., Rao M.A. Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity // *Crit Rev Environ Sci Technol.* – 2008. – V. 38. – P. 269–310. doi: 10.1080/10643380701413526.
- Sorrentino P., D'Angelo S., Ferbo U., Micheli P., Bracigliano A., Vecchione R. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis // *J Hepatol.* – 2009. – V. 50. – P. 351–357. doi: 10.1016/j.jhep.2008.09.011.
- Kew M.C. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma // *Cancer Lett.* – 2009. – V. 286. – P. 38–43. doi: 10.1159/000343856.
- Nakajima T., Hopf B.N., Schulte A.P. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) // *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* – 2000. – V. 77. – P. 41–148.
- Stiborová M., Sopko B., Hodek P., Frei E., Schmeiser H.H., Hudecek J. The binding of aristolochic acid I to the active site of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 explains their potential to reductively activate this human carcinogen // *Cancer Lett.* – 2005. – V. 229 (2). – P. 193–204. doi: 10.1016/j.canlet.2005.06.038.
- Sidorenko V.S., Attaluri S., Zaitseva I., Iden C.R., Dickman K.G., Johnson F., Grollman A.P. Bioactivation of the human carcinogen aristolochic acid // *Carcinogenesis.* – 2014. – V. 35 (8). – P. 1814–1822. doi: 10.1093/carcin/bgu095.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat Protoc.* – 2008. – V. 3. – P. 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Rusyn I., Corton J.C. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate // *Mutat Res.* – 2012. – V. 750 (2). – P. 141–158. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.12.004.
- Merrick B.A., Witzmann F.A. The role of toxicoproteomics in assessing organ specific toxicity // *EXS.* – 2009. – V. 99. – P. 367–400. doi: 10.1007/978-3-7643-8336-7_13.
- Thakral S., Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir // *Curr Gene Ther.* – 2015. – V. 15 (2). – P. 142–150. doi: 10.2174/1566523214666141224095610.
- Oyadomari S., Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress // *Cell Death Differ.* – 2004. – V. 11 (4). – P. 381–389. doi: 10.1038/sj.cdd.4401373.
- Lu Y., Cederbaum A.I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – V. 44 (5). – P. 723–738. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004.
- Parmar D., Srivastava S.P., Seth P.K. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on hepatic mixed function oxidases in different animal species [Electronic resource] // *Toxicol Lett.* – 1988. – V. 40 (3). – P. 209–217. – Mode of access: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(88\)90043-4](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(88)90043-4).
- Lane B.R. Molecular markers of kidney injury // *Urol Oncol.* – 2013. – V. 31 (5). – P. 682–685. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.05.007.
- Fuchs T.C., Mally A., Wool A., Beiman M., Hewitt P. An exploratory evaluation of the utility of transcriptional and urinary kidney injury biomarkers for the prediction of aristolochic acid-induced renal injury in male rats // *Vet Pathol.* – 2014. – V. 51 (3). – P. 680–694. doi: 10.1177/0300985813498779.
- Waldvogel-Abramowski S., Waeber G., Gassner C., Buser A., Frey B.M., Favrat B., Tissot J.D. Physiology of iron metabolism // *Transfus Med Hemother.* – 2014. – V. 41 (3). – P. 213–221. doi: 10.1159/000362888.
- Bogdan A.R., Miyazawa M., Hashimoto K., Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease // *Trends Biochem Sci.* – 2016. – V. 41 (3). – P. 274–286. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.
- Ahmad S., Moriconi F., Naz N., Sultan S., Sheikh N., Ramadori G., Malik I.A. Ferritin L and ferritin H are differentially located within hepatic and extra hepatic organs under physiological and acute phase conditions [Electronic resource] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2013. – V. 6 (4). – P. 622–629. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3606851>.
- Kim D.S., Choi Y.P., Kang S., Gao M.Q., Kim B., Park H.R., Choi Y.D., Lim J.B., Na H.J., Kim H.K., Nam Y.P., Moon M.H., Yun H.R., Lee D.H., Park W.M., Cho N.H. Panel of candidate biomarkers for renal cell carcinoma // *J Proteome Res.* – 2010. – V. 9 (7). – P. 3710–3719. doi: 10.1021/pr100236r.
- De Domenico I., Ward D.M., Kaplan J. Hcpidin and ferroportin: the new players in iron metabolism // *Semin Liver Dis.* – 2011. – V. 31 (3). – P. 272–279. doi: 10.1055/s-0031-1286058.
- Veuthey T., D'Anna M.C., Roque M.E. Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin, and DMT1 in anemic mice // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2008. – V. 295 (4). – P. F1213–1221. doi: 10.1152/ajprenal.90216.2008.
- Anderson E.R., Shah Y.M. Iron homeostasis in the liver // *Compr Physiol.* – 2013. – V. 3 (1). – P. 315–330. doi: 10.1002/cphy.c120016.

23. Ganz T., Nemeth E. Hpcidin and iron homeostasis // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1823 (9). – P. 1434–1443. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014.
24. Kulaksiz H., Theilig F., Bachmann S., Gehrke S.G., Rost D., Janetzko A., Cetin Y., Stremmel W. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney // *J Endocrinol*. – 2005. – V. 184 (2). – P. 361–370. doi: 10.1677/joe.1.05729.
25. Prá D., Franke S.I., Henriques J.A., Fenech M. Iron and genome stability: an update // *Mutat Res*. – 2012. – V. 733 (1–2). – P. 92–99. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2012.02.001.
26. Walter P.B., Knutson M.D., Paler-Martinez A., Lee S., Xu Y., Viteri F.E., Ames B.N. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – V. 99 (4). – P. 2264–2269. doi: 10.1073/pnas.261708798.
27. Powell C.L., Swenberg J.A., Rusyn I. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage // *Cancer Lett*. – 2005. – V. 229 (1). – P. 1–11. doi: 10.1016/j.canlet.2004.12.002.
28. Saito Y., Nakaoka T., Saito H. microRNA-34a as a Therapeutic Agent against Human Cancer // *J Clin Med*. – 2015. – V. 4 (11). – P. 1951–1559. doi: 10.3390/jcm4111951.
29. Dutta K.K., Zhong Y., Liu Y.T., Yamada T., Akatsuka S., Hu Q., Yoshihara M., Ohara H., Takehashi M., Shinohara T., Masutani H., Onuki J., Toyokuni S. Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent // *Cancer Sci*. – 2007. – V. 98 (12). – P. 1845–1852. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00619.x.

KINDRAT I.P.^{1,2}, ERSTENYUK A.M.¹

¹ *Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine, 76018, Ivano-Frankivsk, Galytska str., 2, e-mail: erst@ukr.net*

² *National Center for Toxicological Research, U.S.A., 72079, Jefferson, NCTR str., 3900, e-mail: Iryna.Kindrat@fda.hhs.gov*

EXPRESSION OF IRON METABOLISM GENES AS MARKERS OF ORGAN TOXICITY

Aim. An increasing number of toxicants in the environment causes harmful effects on organism, resulting in broad range of metabolic disturbances, including iron metabolism. Perturbations in iron homeostasis may lead to the development of various pathological states, including organ injury and carcinogenesis. In this study, we investigated the effect of liver toxicant, bis-(2-ethylhexyl) phtalete (DEHP), and kidney toxicant, aristolochic acid (AA), on tissue-specific iron metabolism in rats. **Methods.** Gene expression in the livers and kidneys of Fischer 344 rats was determined by quantitative reverse transcription-PCR. **Results.** DEHP treatment increased the expression of liver toxicity and DNA damage marker genes, and iron-related genes, *Ftl1*, *Fth1*, *Slc40a1*, and decrease the expression of miR-122 and *Hamp* in the livers, but not in the kidneys. In contrast, AA increased the expression of kidney toxicity and DNA damage markers, and iron homeostasis genes, *Ftl1*, *Fth1*, *Slc40a1* in the kidneys. **Conclusions.** Our results indicate an existence of organ-specific changes in the expression of iron metabolism genes in rats treated with DEHP and AA, respectively. These changes were accompanied by increasing of DNA damage and toxicity markers in the liver of DEHP-treated rats and in the kidneys of rats treated with AA.

Keywords: Toxicity, iron metabolism, liver, kidney.