



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA FORMALDEHİTİN OLUŞTURDUĞU TOKSİK
ETKİYE KARŞI MELATONİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

SEZGİN AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLDEN ZEHRA OMURTAG

2017-İSTANBUL



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sezgin Aydemir

İmza



TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Sezgin AYDEMİR
Tez Başlığı : Sıçanlarda Formaldehitin Oluşturduğu Toksik Etkiye Karşı
Melatonin'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi
Sınav Yeri : Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 13/06/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Gülden Z. Omurtag	İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Semra Şardaş	Marmara Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
Prof. Dr. Nusret Erdoğan	Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO	
Prof. Dr. Oya Üstüner Aydal	İstanbul Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı	
Yrd. Doç. Dr. Ayfer Beceren	Marmara Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/07/2017 tarih ve 41 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Prof. Dr. Azize Sener
Vekâleten 
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü 06.07.2017

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm, insani değerleriyle her zaman örnek aldığım, bir bilim insanı adayı olarak beni yetiştiren değerli danışman hocam İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fak. Dekanı Sayın Prof. Dr. Gülden Zehra Omurtag'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Semra Şardaş'a;

Tez sürecinde biyokimyasal analizlerde yardım ve desteğini esirgemeyen, çalışma hayatımda bana yol gösteren çok değerli bilim kadını SHMYO Müdürü Sayın Doç. Dr. Meral Yüksel'e;

Çalışmalarım esnasında her zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen sevdiğim ve saygı duyduğum hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayfer Beceren'e;

Çalışma hayatımda bilgi ve becerilerini benimle paylaşan ve histopatolojik değerlendirmelerde bana yardımcı olan Sayın Hocalarım Prof. Dr. Nusret Erdoğan'a ve Yrd. Doç. Dr. Sibel Şensu'ya;

Çalışma hayatımda özverili ve çalışkan kişiliği ile kendime örnek aldığım, her türlü desteğini benden hiç eksik etmeyen ve histolojik çalışmalarda bilgilerini paylaşıp bana yardımcı olan SHMYO Müdür Yrd. Sayın Yrd. Doç. Dr. Naziye Özkan'a;

Çalışmalarım süresince beni destekleyen çalışma arkadaşlarıma;

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

Sezgin Aydemir

İstanbul-2017

Bu doktora tezi, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAPKO) tarafından SAG-C-DRP-110915-0414 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
RESİMLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Formaldehit	5
4.1.1. Formaldehitin Tarihçesi ve Özellikleri	5
4.1.2. Formaldehit Kaynakları ve Maruziyeti	6
4.1.3. Formaldehit Kullanım Alanları	7
4.1.4. Formaldehit Maruziyeti ve Maruziyet Sınır Değerleri	9
4.1.5. Formaldehit Metabolizması (Toksikokinetik)	11
4.1.6. Formaldehitin İnsan Sağlığı Üzerine Toksik Etkileri	12
4.1.6.1. Akut Maruziyet Sonucu Neden Olduğu Etkiler	12
4.1.6.2. Kronik Maruziyet Sonucu Neden Olduğu Etkiler	14
4.1.6.2.1. Solunum Sistemi Üzerine Etkiler	14
4.1.6.2. 2. Nörotoksisite	15
4.1.6.2. 3. Genotoksik ve Karsinojenik Etkiler	15
4.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	16
4.3. Glutatyon	22
4.4. Lipid Peroksidasyonu: Malondialdehit	23
4.5. Myeloperoksidaz Aktivitesi	24
4.6. Kemilüminesans Yöntemle Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçülmesi	25
4.7. Oksidatif DNA Hasarı ve Ölçüm Yöntemleri	27
4.7.1. Tek Hücre Jel Elektforezi (SCGE) Tekniği (Comet Tekniği)	28
4.7.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)	30
4.8. Melatonin	32

5. GEREÇ ve YÖNTEM	36
5.1. Kullanılan Kimyasallar	36
5.2. Deneysel Çalışma	37
5.2.1. Deneysel Grupları	37
5.2.2. Formaldehit İnhalasyon Düzenegi	38
5.2.3. Deneysel Sonlandırılması ve Örneklerinin Toplanması	38
5.3. Kan Örneklerinde DNA Hasarının İncelenmesi	39
5.3.1. Comet Tekniği ile DNA Hasarının Belirlenmesi	39
5.3.2. Plazma 8-OHdG Düzeyinin Ölçümü	40
5.4. Dokularda Biyokimyasal İncelemeler	40
5.4.1. Malondialdehit ve Glutatyon Ölçümleri	40
5.4.2. Myeloperoksidaz Aktivitesi Tayini	41
5.4.3. Kemilüminesans Ölçümleri (Luminol, lusigenin ve NO)	41
5.5. Işık Mikroskobu İncelemeleri	42
5.5.1. Hematoksilen ve Eozin Boyaması	43
5.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyaması	43
5.5.3. Gomori'nin Tek Aşamalı Trikrom (GT) Boyaması	43
5.5.4. Akciğer Dokusunda TUNEL Yöntemi (Apoptosis)	44
5.6. İstatiksel Analiz	45
6. BULGULAR	46
6.1. DNA Üzerine Etkilerin İncelenmesi	46
6.1.1. Comet Tekniği: %DNA _T Düzeyleri	46
6.1.2. Plazma 8-OHdG Düzeyleri	50
6.2. Dokularda Biyokimyasal Bulgular	50
6.2.1. Dokularda MDA Düzeyleri Bulguları	52
6.2.2. Dokularda GSH Düzeyleri Bulguları	55
6.2.3. Dokularda MPO Aktivitesi Sonuçları	57
6.2.4. Dokularda Kemilüminesans Ölçüm Sonuçları	59
6.3. Histopatolojik Bulgular	65
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
8. KAYNAKLAR	108
9. ÖZGEÇMİŞ	124

KISALTMALAR VE SİMGELER

AUC	Eğri altı alanı
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FA	Formaldehit
FDH	Formaldehit dehidrogenaz
GSH	Glutasyon
GT	Gomori'tek aşamalı trikrom boyası
H&E	Hematoksilen ve Eozin
HETAB	Hekzadesiltrimetilamonyum bromür
HMA	High Melting Agarose (Yüksek kaynama noktalı agaroz)
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
i.p.	İntraperitoneal
inh	İnhalasyon
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K	Kontrol
KL	Kemilüminesans
LMA	Low Melting Agarose (Düşük kaynama noktalı agaroz)
MDA	Malondialdehit
MEL	Melatonin
MPO	Myeloperoksidaz
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Saline
PEL	İzin verilen maruziyet sınırı
ppm	Milyonda bir kısım
REL	Önerilen maruziyet sınırı

ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
STEL	Eşik sınır değer kısa süreli maruziyet sınırı
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloro asetik asit
TLV	Eşik sınır değer
TWA	Eşik sınır değer zaman ağırlıklı ortalama
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Formaldehitin sulu çözeltisindeki siklusu	8
Şekil 2. Formaldehitin fiksasyon reaksiyonu	9
Şekil 3. Formaldehit kaynakları ve vücutta uğradığı değişiklikler	11
Şekil 4. Kimyasal bağ oluşumunda elektronların orbitallere dağılımı	17
Şekil 5. Lipid peroksidasyonu mekanizması	20
Şekil 6. Glutatyonun molekül yapısı	23
Şekil 7. Malondialdehit oluşum mekanizması	24
Şekil 8. Luminolün kimyasal yapısı	27
Şekil 9. Lusigeninin kimyasal yapısı	27
Şekil 10. Comet görünümü.	29
Şekil 11. Comet tekniğinin basamakları	30
Şekil 12. 8-OHdG oluşum mekanizması	32
Şekil 13. Melatoninin molekül yapısı	33
Şekil 14. Melatoninin sirkadyen ritm düzenlemedeki rolü	34
Şekil 15. Melatonin sentezinin basamakları	35
Şekil 16. Sıçanlardan elde edilen lenfosit hücrelerinde %DNA _T sonuçları.	46
Şekil 17. Tüm gruplara ait plazma 8-OHdG düzeyleri	50
Şekil 18. Sıçanların akciğer dokularında MDA düzeyleri	53
Şekil 19. Sıçanların karaciğer dokularında MDA düzeyleri	54
Şekil 20. Sıçanların böbrek dokularında MDA düzeyleri	55
Şekil 21. Sıçanların akciğer dokularında GSH düzeyleri	56
Şekil 22. Sıçanların karaciğer dokularında GSH düzeyleri	56
Şekil 23. Sıçanların böbrek dokularında GSH düzeyleri	57
Şekil 24. Sıçanların akciğer dokularında MPO aktivitesi sonuçları	58
Şekil 25. Sıçanların karaciğer dokularında MPO aktivitesi sonuçları	58
Şekil 26. Sıçanların böbrek dokularında MPO aktivitesi sonuçları	59
Şekil 27. Sıçanların akciğer dokularında luminol seviyeleri	60
Şekil 28. Sıçanların karaciğer dokularında luminol seviyeleri	60
Şekil 29. Sıçanların karaciğer dokularında luminol seviyeleri	61
Şekil 30. Sıçanların akciğer dokularında lusigenin seviyeleri	62

Şekil 31. Sıçanların karaciğer dokularında lusigenin seviyeleri	62
Şekil 32. Sıçanların böbrek dokularında lusigenin seviyeleri	63
Şekil 33. Sıçanların akciğer dokularında NO seviyeleri	64
Şekil 34. Sıçanların karaciğer dokularında NO seviyeleri	64
Şekil 35. Sıçanların böbrek dokularında NO seviyeleri	65



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Formaldehit maruziyet kabini	38
Resim 2. Kontrol grubunda comet görünümü	47
Resim 3. FA-inh grubunda comet görünümü	47
Resim 4. FA-inh+MEL grubunda comet görünümü	48
Resim 5. FA-ip grubunda comet görünümü	48
Resim 6. FA-ip+MEL grubunda comet görünümü	49
Resim 7. MEL grubunda comet görünümü	49
Resim 8. A, B. Akciğer dokusu, K grubunda alveol boşluğu (yıldız) ve alveolar septanın (ok) normal görünümü. H&E boyası	67
Resim 9. A, B. MEL grubunda normal alveol yapısı (yıldız). H&E boyası	68
Resim 10. A, B. FA-inh grubunda epitel dökülmesi (ok başı), intertisyel inflamasyon (yıldız), septa kalınlığında artış (a) ve hemoraji (ok). H&E boyası	69
Resim 11. A, B. FA-inh+MEL grubunda intertisyel inflamasyonda azalma, septa kalınlığında incelme ve hemorajide azalma (yıldız). H&E boyası	70
Resim 12. A, B. FA-ip grubunda alveolar septa kalınlaşması ve hemoraji (ok). H&E boyası	71
Resim 13. A, B. FA-ip+MEL grubunda alveolar septa kalınlaşması ve hemorajide azalma. H&E boyası	72
Resim 14. Akciğer dokusu: K grubunda normal alveol yapısı. PAS boyası	73
Resim 15. Akciğer dokusu: MEL grubu. PAS boyası	73
Resim 16. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası	74
Resim 17. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası	75
Resim 18. A, B. Akciğer dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası	76
Resim 19. A, B. Akciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası	77
Resim 20. Akciğer dokusu: K grubunda normal alveol yapısı. GT boyası	78
Resim 21. Akciğer dokusu: MEL grubunda normal akciğer yapısı. GT boyası	78
Resim 22. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh grubu, hafif kollajen artışı (yıldız). GT boyası	79

Resim 23. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu, kollajen miktarında azalma. GT boyası	80
Resim 24. Akciğer dokusu: FA-ip grubu. GT boyası	81
Resim 25. Akciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. GT boyası	81
Resim 26. K grubunda karaciğerin normal yapısı. H&E boyası	82
Resim 27. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. H&E boyası	82
Resim 28. Karaciğer dokusu: FA-inh grubunda hemoraji (yıldız). H&E boyası	83
Resim 29. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubunda hemorajide azalma (ok). H&E boyası	83
Resim 30. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu. H&E boyası	84
Resim 31. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. H&E boyası	84
Resim 32. K grubunda karaciğerin normal yapısı. PAS boyası	85
Resim 33. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. PAS boyası	85
Resim 34. Karaciğer dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası	86
Resim 35. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası	86
Resim 36. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası	87
Resim 37. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası	87
Resim 38. K grubunda karaciğerin normal yapısı. GT boyası	88
Resim 39. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. GT boyası	88
Resim 40. Karaciğer dokusu: FA-inh grubu. GT boyası	89
Resim 41. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. GT boyası	89
Resim 42. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu, kollajen miktarında artma. GT boyası	90
Resim 43. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu, kollajen miktarında azalma. GT boyası	90
Resim 44. K grubunda böbreğin normal yapısı. H&E boyası	91
Resim 45. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. H&E boyası	91
Resim 46. Böbrek dokusu: FA-inh grubu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız). H&E boyası	92
Resim 47. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. H&E boyası	92
Resim 48. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. H&E boyası	93
Resim 49. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. H&E boyası	93
Resim 50. K grubunda böbreğin normal yapısı. PAS boyası	94
Resim 51. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. PAS boyası	94

Resim 52. Böbrek dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası	95
Resim 53. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası	95
Resim 54. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası	96
Resim 55. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası	96
Resim 56. K grubunda böbreğin normal yapısı. GT boyası	97
Resim 57. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. GT boyası	97
Resim 58. Böbrek dokusu: FA-inh grubu. GT boyası	98
Resim 59. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. GT boyası	98
Resim 60. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. GT boyası	99
Resim 61. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. GT boyası	99



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Formaldehitin kimyasal ve fiziksel özellikleri	6
Tablo 2. Formaldehitin maruziyet sınır değerleri	10
Tablo 3. Formaldehitin kısa-sürel maruziyet sonrası insanlarda neden olduğu etkiler	12
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	36
Tablo 5. Sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve GSH düzeyleri ve MPO aktivitesi ölçüm sonuçları	51
Tablo 6. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında kemilüminesans yöntemiyle luminol, lusigenin ve nitrik oksit düzeylerinin ölçüm sonuçları	52

1. ÖZET

Sıçanlarda Formaldehitin Oluşturduğu Toksik Etkiye Karşı Melatonin'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Sezgin Aydemir

Danışman: Prof. Dr. Gülden Zehra Omurtag

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Amaç: Formaldehit (FA) genotoksik özelliği bilinen, IARC tarafından “Grup I, insanlar için karsinojen” olarak sınıflandırılan ve insanlar üzerinde sinir, solunum ve üreme sistemi gibi sistemler üzerine çeşitli toksik etkilere sahip bir kimyasaldır. Melatonin (MEL) epifiz bezi tarafından salgılanan bir nörohormon olup, temel fizyolojik fonksiyonu sirkadyen ritmi düzenlemektir. Bu çalışmada, sıçanlarda FA'nın oluşturduğu toksisiteye karşı MEL'in olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Wistar albino sıçanlar kullanıldı ve rastgele (n=8) 6 gruba ayrıldı. FA, ilgili gruplara inhalasyon yoluyla (FA-inh: günde 6ppm, haftada 5 gün, 6 hafta) ve intraperitoneal (FA-ip: 10 mg/kg/gün, 14 gün) olarak verildi. MEL, ilgili gruplara (FA-inh+MEL, FA-ip+MEL ve MEL) 10 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Kan örneklerinde comet tekniği ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin ölçümü uygulandı. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve GSH düzeyleri ölçümü, MPO aktivitesi ve kemilüminesans ölçümleri yapıldı. Histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu incelemeleri ile araştırıldı.

Bulgular: Comet tekniği sonuçlarına (%DNA_T) göre FA-inh ve FA-ip gruplarında istatistiksel olarak artmış (p<0,001) DNA hasarı belirlendi. MEL uygulaması ile FA-inh+MEL ve FA-ip+MEL gruplarında %DNA_T düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu görüldü (p<0,001). Aynı şekilde, benzer bulgular 8-OHdG düzeyleri sonuçlarından da elde edildi. Oksidatif stresin biyogöstergeleri olan MDA, MPO, NO, luminol ve lusigeninin FA-inh ve FA-ip gruplarında anlamlı şekilde arttığı, FA-inh+MEL ve FA-ip+MEL gruplarında ise azaldığı belirlendi. GSH'ın ise FA-inh ve FA-ip gruplarında anlamlı olarak azaldığı, FA-inh+MEL ve FA-ip+MEL gruplarında arttığı görüldü. Işık mikroskopu incelemelerinde dokularda histomorfolojik değişiklikler gözlemlendi ve bu etkilerin MEL ile azaldığı görüldü.

Sonuçlar: MEL'in oksidan-antioksidan durumu dengeleyerek FA'nın indüklediği oksidatif doku ve DNA hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: formaldehit, melatonin, kemilüminesans, comet tekniği, histopatoloji

2. SUMMARY

Investigation of Protective Effects of Melatonin on Formaldehyde Induced Toxicity in Rats

Sezgin Aydemir

Advisor: Prof. Dr. Gülden Zehra Omurtag

Department of Pharmaceutical Toxicology

Purpose: Formaldehyde (FA) is a chemical known to be genotoxic, classified as “carcinogenic to humans in Group 1” by IARC, and has various toxic effects on humans such as nervous, respiratory and reproductive systems. MEL is a neurohormone secreted by pineal gland and it regulates the circadian rhythm. In this study, it is aimed to investigate the potential protective effects of MEL on FA induced toxicity in rats.

Materials and Methods: Wistar albino rats were included and randomly divided into 6 groups (n=8). Related groups was exposed to FA by inhalation (FA-inh; 6 ppm, 5 day/week, 6 weeks) and intraperitoneally (FA-ip; 10 mg/kg/day, 14 days). MEL was injected at a dose of 10 mg/kg/day in related groups (FA-inh+MEL, FA-ip+MEL and MEL). The Comet assay and measurement of 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) levels were conducted with blood samples. Determinations of MDA and GSH levels, MPO activities and chemiluminescence measurements were applied in the lung, liver and kidney tissues. Histopathological changes were investigated with the light microscope.

Results: Increased DNA damage was observed in FA-inh and FA-ip groups in the comet assay (%DNA_T). MEL treatment reduced statistically %DNA_T levels in FA-inh+MEL and FA-ip+MEL groups (p<0,001). Similar findings were observed in the results of 8-OHdG levels. As biomarkers of oxidative stress, MDA, MPO, NO, luminol and lucigenin levels were increased in FA-inh and FA-ip groups, decreased in FA-inh+MEL and FA-ip+MEL groups. A significant decrease in GSH levels in FA-inh and FA-ip groups, while an increase in the FA-inh+MEL and FA-ip+MEL groups were observed. In the light microscopic investigations, histomorphological changes were observed and these effects reduced by MEL treatment.

Conclusion: Results suggests that MEL may be beneficial against FA-induced oxidative tissue and DNA damages by balancing oxidant/antioxidant status.

Keywords: formaldehyde, melatonin, chemiluminescence, comet assay, histopathology

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Formaldehit (FA) su, alkol ve eterde iyi çözünebilen, renksiz ve keskin kokusu olan, oda sıcaklığında gaz halinde bulunan, aldehit bileşik grubunun en basit üyesi olan bir kimyasaldır. FA ticari olarak genellikle % 37'lik sulu çözeltisi formunda bulunmaktadır ve bu formu “formalin” olarak adlandırılmaktadır. Formalin çözeltilerinde bir miktar da metil alkol bulunmaktadır. Oksitleyici ajanlarla hızla tepkimeye girer ve yüksek derişimlerde yanıcı bir sıvıdır (Smith, 1992; Reuss ve ark., 2000).

Formaldehit oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Endüstride kontraplak, sunta, yalıtım malzemeleri, boya ve plastik malzemelerin yapımında, tekstil sanayisinde, halı, mobilya, duvar kaplamalarında ve evlerde kullanılan temizlik ürünlerinde kullanılmaktadır. Proteinlerin tahribinin önlenmesi özelliğinden dolayı biyolojik doku örneklerinin korunması ve saklanması amacıyla tıbbi laboratuvarlarda kullanılır. Ayrıca reçine üretiminde, mumyacılıkta, böcekler ve birçok mikroorganizma üzerinde öldürücü etkisinden dolayı dezenfektan olarak ve kağıdın suya karşı dayanıklılığını arttırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Reuss ve ark., 2000; IARC, 2006; ATSDR, 1997).

Yapılan araştırmalar sonucunda toksik etkileri arasında karsinojenik özelliği vurgulanan formaldehitin, solunum sistemi, sindirim sistemi, sinir sistemi ve üreme sistemi gibi birçok sistem üzerinde zararlı etkiler gösterdiği ortaya konmuştur. Ayrıca Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından Grup I sınıfı “insanlar üzerinde karsinojen” olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 2006). Tıp alanında ise anatomide kadavranın uzun süre bozulmadan saklanması amacıyla, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında doku fiksasyonu aşamasında, diş hekimliğinde kaplamaların yapımı sırasında formaldehit maruziyetinin çalışanlarda yarattığı toksik etkilerin varlığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Dreyfuss, 2010; Scheman ve ark., 1998; Meding ve ark., 1990; Lyapina ve ark., 2012).

Melatonin (MEL) anti-inflamatuar ve antioksidan olarak birçok önemli fizyolojik fonksiyona katılan epifiz bezinden salgılanan bir proteindir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, melatonin, farklı serbest radikalleri, hidroksil radikali, tek oksijen,

peroksinitrit anyon ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen türlerini detoksifiye ettiği gösterilmiştir. MEL'in enzim aktivasyonunu stimüle ederek, süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon redüktaz gibi organizmanın total antioksidatif savunma mekanizmasını arttırıcı özellik gösterdiği bildirilmiştir (Pieri ve ark., 1994; Omurtag ve ark., 2008; Rodriguez ve ark., 2004).

Bu alışma ile Wistar albino sıçanlarda inhalasyon ve intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan formaldehitin oluşturduğu toksisiteye karşı melatoninin muhtemel koruyucu etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sıçanlardan elde edilen akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stres parametreleri olarak kabul edilen MDA, MPO, NO, luminol ve lusigeninin düzeylerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Ayrıca dokularda ışık mikroskobu incelemeleri ile histopatolojik değişiklikler de araştırılmıştır. Sıçanlardan elde edilen kan örneklerinde DNA hasarı comet tekniği ve 8-OHdG düzeylerinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Formaldehit

4.1.1. Formaldehitin Tarihçesi ve Özellikleri

Formaldehit (FA, CAS Reg. No. 50-00-0) renksiz, keskin kokulu, sudaki çözünürlüğü yüksek olan aldehit sınıfında yer alan organik bir bileşiktir. IUPAC adı metanal olan FA'nın diğer adları oksimetilen, metilen oksit ve formik aldehittir. FA, ilk kez Rus bilim adamı Alexander Mikhaylovich Butlerov tarafından 1855 yılında keşfedilmiş olup, Alman kimyager August Wilhelm von Hofmann 1867 yılında metanolün dehidrasyonu ile ilk kez sentezini gerçekleştirmiştir. Ayrıca 1892 yılında Friedrich August Kekule von Stradonitz tarafından ilk kez saf olarak izole edilmiştir (Salthammer ve ark., 2010). FA yanıcı özellik taşıyan, oda sıcaklığında gaz halinde bulunan bir kimyasaldır. Kimyasal formülü CH₂O olan formaldehit, metanolün oksidasyonu sonucu elde edilir ve suda çözünmüş %37'lik çözeltisine formalin adı verilir. Formalin içerisinde bir miktarda metanol bulunur. FA'nın polimerize haldeki katı şekline paraformaldehit denir ve ısı ile depolimerize edilebilir. Elektrofilik özelliği oldukça yüksek olması nedeniyle yüksek reaktivite gösterir ve oda sıcaklığında her ortamda gaz haline geçebilme özelliği gösterir (<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad40.htm>, Erişim tarihi: 22 Eylül 2016; <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/FORMALDEHYDE.pdf>, Erişim tarihi: 22 Eylül 2016; Reuss ve ark., 2000; Smith, 1992). FA'nın havadaki konsantrasyonu "ppm" olarak ifade edilir ve çevirme faktörü 1 ppm = 1.25 mg/m³ (25°C'de ve 1 atm basınçta) olarak kabul edilir (Nielsen ve ark., 2010; IARC, 2006).

Formaldehitin ticari olarak üretimi 1889 yılına kadar dayanmaktadır ve metanolün katalitik oksidasyonu sonucu elde edilmektedir (Eşitlik 1). Gümüş katalizörlü ve metal oksit katalizörlü prosesler FA üretiminde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (IARC, 2006).



Tablo 1. Formaldehitin kimyasal ve fiziksel özellikleri.

Tanımlayıcı Bilgiler	
CAS No	50-00-0
Sistemik IUPAC Adı	Metanal
Yaygın IUPAC Adı	Formaldehit
Diğer Adları	Formalin Formol Metil aldehit Metilen oksit Oksimetilen Oksometan
EC (European Community) No	200-001-8
Özellikleri	
Kimyasal Formülü	CH ₂ O
Molekül Kütlesi	30,03 g/mol
Yoğunluk	0,8153 g/cm ³ (-20 °C)
Erime Noktası	-92 °C (-134 °F; 181 K)
Kaynama Noktası	-19 °C (-2 °F; 254 K)
Parlama Noktası	60 °C
Sudaki Çözünürlüğü	400 g/dm ³
Dağılım Katsayısı (<i>D</i>)	0,350
Buhar Basıncı	>1 atm (20°C)
Reaktivite	Peroksit, azot dioksit ve performik asit ile patlayıcı reaksiyon
Havada eşik koku limiti	0,5-1,0 ppm

4.1.2. Formaldehit Kaynakları ve Maruziyeti

Formaldehit doğal kaynaklar ve insan faaliyetleri sonucu atmosferde bulunan bir gazdır. FA'nın doğal oluşum kaynaklarının büyük kısmını atmosferin üst tabakalarında (troposfer) gerçekleşen metan ve diğer karbon bileşiklerinin

oksidasyon reaksiyonları ile orman yangınları oluşturmaktadır. Elma, armut, kayısı, üzüm, domates, havuç gibi meyve ve sebzelerde, bazı besinlerde ve alkollü içeceklerde doğal olarak 3-60 µg/kg FA bulunabilmektedir. Ayrıca insanlar dahil memelilerde de oksidatif metabolizmanın sonucunda endojen olarak oluşmaktadır (IARC, 2006; WHO, 2010; Monakhova ve ark., 2012). Bu doğal kaynaklara ilave olarak motorlu taşıtlar, güç santralleri, odun sobaları, gazyağı ısıtıcılar, rafineriler, yakma fırınları vb. gibi kaynaklardan emisyonlar mesleki olmayan dış mekan FA maruziyet kaynakları arasında yer almaktadır. Sunta ve diğer benzer yapı malzemeleri, boyalar, cilalar ve mobilyalardan salınan FA ise iç mekan maruziyet sebeplerini teşkil etmektedir. İç mekandaki FA seviyesi 0,02-2,0 mg/m³ arasında değişmekte ve prefabrik evlerde bu miktar 10 mg/m³'e kadar çıkabilmektedir. Bu sebeple iç mekanda FA'ya maruziyet dış mekandakinden (yaklaşık 0,001 mg/m³) fazla olabilmektedir. Otomobil eksozu da başlıca FA maruziyeti kaynakları arasında yer almaktadır (IARC, 2006; NTP, 2014; NTP, 2016).

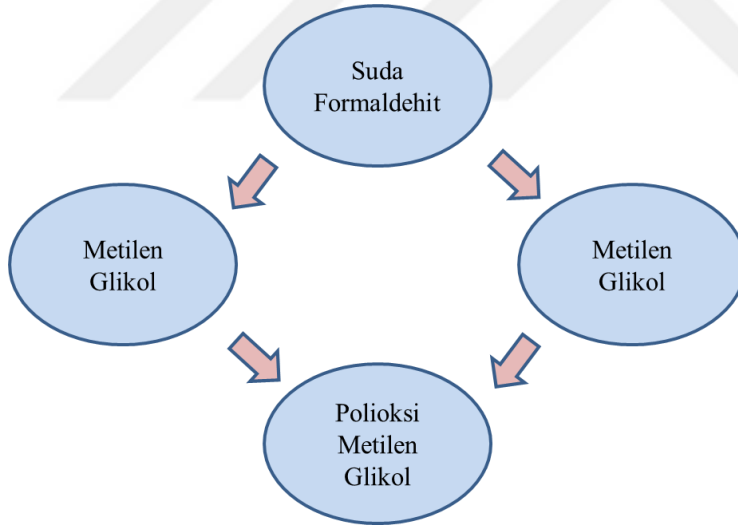
Formaldehite mesleki maruziyet oldukça değişken olup, formaldehit ve formaldehit bazlı reçineler, ahşap ve mobilya, plastik, fiberglas, laminant gibi ahşap zemin ürünleri üretimi ile yapı malzemeleri, kuru temizleme, yangın söndürücüler, kozmetik ürünleri üretimi, aşındırıcı ve tutkal üretimi gibi birçok sanayi alanında meydana gelmektedir. Aynı zamanda hastaneler ve diğer sağlık kuruluşları ile üniversitelerin histoloji, anatomi ve patoloji laboratuvarlarında çalışanlar da FA'ya maruz kalmaktadır. Mesleki maruziyet sonucu günlük FA alımının yaklaşık 8 mg olduğu tahmin edilmektedir (NTP, 2016).

4.1.3. Formaldehit Kullanım Alanları

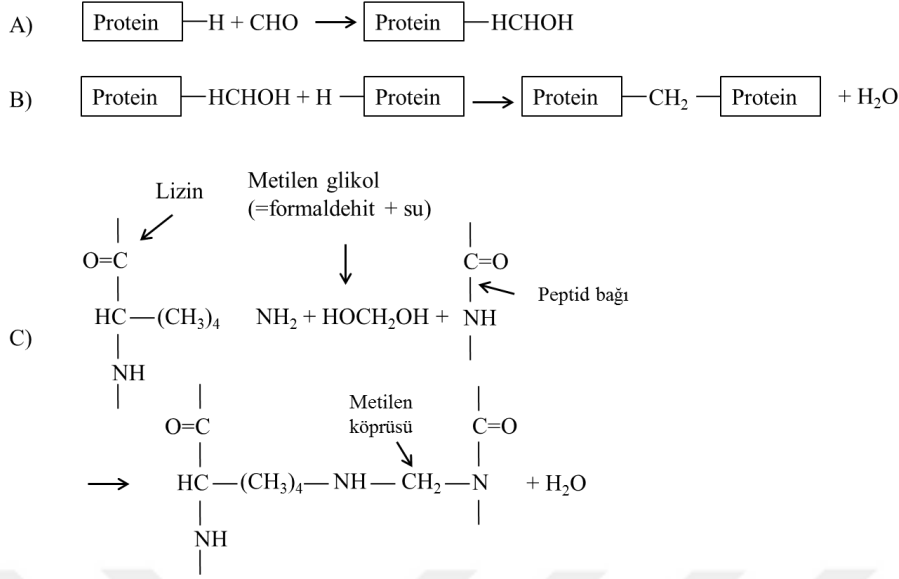
1886'da ilk olarak Loew ve Fisher tarafından FA'nın sulu çözeltisi (formalin) antimikrobiyal ajan olarak dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır (Walker, 1964). Günümüzde hala ameliyathane dezenfeksiyonu, viral aşuların hazırlanması ve tek kullanımlık hemodializ cihazlarının dezenfeksiyonunda sınırlı da olsa kullanımı bulunmaktadır. FA, günlük yaşantımızda iç içe olduğumuz oldukça yaygın ve geniş kullanım alanına sahip bir kimyasaldır. Endüstride; ara kimyasal olarak, kağıt hamuru ve kağıt, yapıştırıcı, poliester ve poliüretan plastikler, boya, inşaat, tekstil, mobilya ve kozmetik sanayilerinde, üre, melamin ve fenolik reçinelerin üretiminde

kullanılmaktadır. Ayrıca az olmakla birlikte, tarımda, kozmetikte, analitik reaktif olarak, ahşap koruyucu, fumigantlar, beton ve sıva katkı maddesi gibi kullanım alanları bulunmaktadır (Reuss ve ark., 2000; IARC, 2006; ATSDR, 1997).

Formaldehit, endüstriyel kullanımlarının yanı sıra, üniversiteler ve hastaneler ile özel sağlık merkezlerinin patoloji, histoloji, anatomi, adli tıp ve biyoloji laboratuvarlarında da kullanılmaktadır. Genellikle %10'luk nötral tamponlu formunda kadavranın saklanması ve korunması, hasta doku örneklerinin muhafazası, doku fiksasyonu ve doku boyama işlemleri gibi amaçlarla bu alanlarda sıklıkla kullanılan bir kimyasaldır (Thavarajah ve ark. 2012). Şekil 1'de gösterildiği gibi FA sulu çözeltide hidrate olarak metilen glikol adı verilen hidrate formaldehit oluşturur. Nötral tamponlu ortamda metilen glikol polimerleşerek polioksimetilen glikol oluşturur ve dokularınki gibi alkali bir ortama geçtiğinde depolimerize olarak hidrate ve non-hidrate formaldehit formlarında dokunun fiksasyonunu sağlar (Kiernan, 2000).



Şekil 1. Formaldehitin sulu çözeltisindeki siklusu (Thavarajah, 2012).



Şekil 2. Formaldehitin fiksasyon reaksiyonu (Kiernan, 2000).

Global pazarda FA üretiminin büyük kısmını, dünya ihtiyacının yaklaşık %34'ü, Asya (Çin) tarafından karşılanmaktadır ve Avrupa ülkelerinde bu oran yaklaşık %30'dur. Avrupa'da 2009 yılı verilerine göre 3.9 milyon tonun üzerinde formaldehit üretildiği bildirilmiştir (SCOEL, 2016).

4.1.4. Formaldehit Maruziyeti ve Maruziyet Sınır Değerleri

Formaldehit solunum yoluyla (inhalasyon), oral yolla ve deriden absorbe olarak vücudumuza girebilmektedir. İnhalasyon ile maruziyet FA'ya en fazla maruz kalınan yol olarak kabul edilmektedir (Checkoway ve ark., 2012). FA, hem çevresel maruziyet hem de mesleki maruziyet yolları ile vücudumuza giren ve günlük hayatta iç içe olduğumuz bir maddedir. FA üretiminde ya da üretimlerinde FA kullanılan reçineler, plastikler, boyalar, parlaticılar, ahşap ürünleri, mobilyalar, tekstil ürünleri gibi birçok sanayi alanında çalışan işçiler FA'ya maruz kalmaktadır. Aynı zamanda anatomi, patoloji, histoloji ve adli tıp laboratuvarlarında dokunun bozulmadan muhafazası ve doku fiksasyonu aşamalarında kullanılmasından dolayı, doktorlar, laboratuvar teknisyenleri ve diğer ilgili sağlık çalışanları FA'ya mesleki olarak maruz kalmaktadırlar (Dreyfuss, 2010). Bu nedenle FA'ya mesleki maruziyet sınır değerlerinin ilgili otoritelerce regüle edilmesi insan sağlığı açısından önem arz etmektedir. Tablo 2'de "Occupational Safety and Health Administration" (OSHA),

“National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH), “American Conference of Governmental Industrial Hygienists” (ACGIH) kuruluşlarının FA için belirlemiş olduğu maruziyet sınır değerleri verilmiştir (https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_242600.html, Erişim tarihi: 24 Eylül 2016).

Tablo 2. Formaldehitin maruziyet sınır değerleri.

Maruziyet Limiti	Limit Değerleri
OSHA Permissible Exposure Limit (PEL) – Genel Endüstiri	TWA: 0,75 ppm STEL: 2,0 ppm
OSHA PEL- İnşaat Endüstrisi	TWA: 0,75 ppm STEL: 2,0 ppm
OSHA PEL – Tersane İşletmeleri	TWA: 0,75 ppm STEL: 2,0 ppm
National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Recommended Exposure Limit (REL)	0,016 ppm Ceiling: 0,1 ppm (15 dk.)
American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Threshold Limit Value (TLV) (2007)	Ceiling: 0,3 ppm

PEL (Permissible exposure limit): İzin verilen maruziyet sınırı.

TLV (Threshold limit value): Eşik sınır değer.

TWA (Time-weighted average): Eşik sınır değer zaman ağırlıklı ortalama; günde 8 saat, haftada 5 gün çalışma süresince çalışanların sağlığını olumsuz yönde etkilemeyeceği kabul edilen maruziyet sınır değeri.

STEL (Short-time exposure limit): Eşik sınır değer kısa süreli maruziyet sınırı; 15 dakikalık zamanda, bir günde en fazla 4 kez maruz kalınabilen aşılmaması gereken sınır değeri.

REL (Recommended exposure limit): Önerilen maruziyet sınırı.

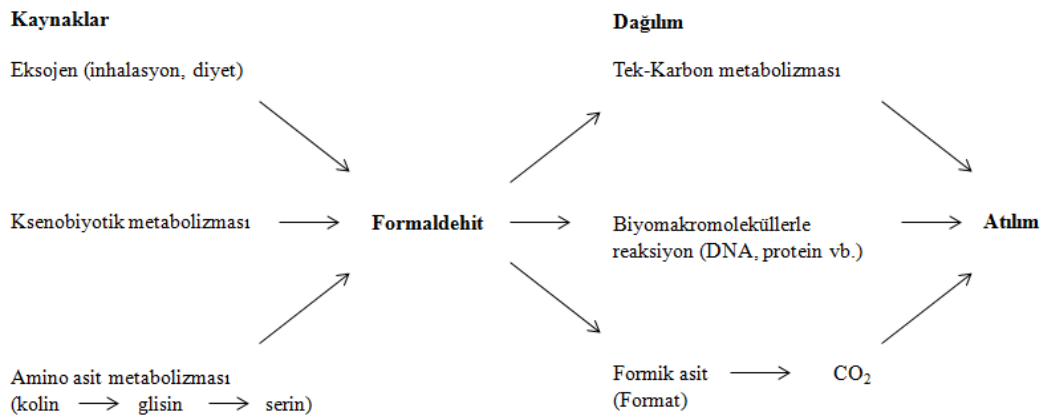
Ceiling: Eşik sınır değer, tavan. Bir çalışma gününün herhangi bir anında aşılmaması gereken değeridir.

Ülkemizde 28 Şubat 2014 tarih ve 95966346 sayı numaralı yayınlanan “Formaldehit ve Ksilen Ölçüm Standartları Hakkında Genelge” ile tıbbi patoloji laboratuvarında havadaki formaldehit düzeylerinin ölçülmesi karara bağlanmıştır. Bu

kapsamda, tıbbi patoloji laboratuvarlarında havada bulunmasına izin verilen formaldehit düzeyleri; TLV-TWA değeri: 0.75 ppm, TLV-STEL değeri: 2 ppm olarak belirlenmiştir. Ayrıca yapılacak ölçümlerin yaka kartı ya da formaldehit ölçüm cihazı kullanılarak yapılması gerektiği yine bu genelge ile kararlaştırılmıştır.

4.1.5. Formaldehit Metabolizması (Toksikokinetik)

Formaldehitin absorpsiyonunda inhalasyon başlıca vücuda giriş yolunu teşkil etmektedir. Bunun yanı sıra oral yolla gastrointestinal sistemden ve deri yoluyla da absorpsiyona uğrayabilmektedir. İnhalasyonla alınan FA hızlıca üst solunum yolunda absorpsiyona uğrayarak mukus veya hücre bileşenleriyle (proteinler, nükleik asitler, aminler, amidler, tiyoller ve hidroksiller gibi) doğrudan reaksiyona girebilir, enzimatik yollarla formik aside ya da karbon dioksite okside olabilir veya solunum yoluyla hiç değişmeden atılabilir. Üst solunum yolunda FA'nın hızlıca absorpsiyona uğramasının nedeni suda çözünürlüğünün yüksek olmasından kaynaklıdır. FA metabolizmasında formaldehit dehidrojenaz (FDH), aldehit dehidrojenaz ve sınırlı durumlarda katalaz rol almaktadır. Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) FA'yı hızlıca metabolize edebilecek enzimlere nispeten daha yüksek düzeyde sahiptir (Kimbell ve ark., 2001; Tulpule ve ark., 2013).



Şekil 3. Formaldehit kaynakları ve vücutta uğradığı değişiklikler.

Glutasyon (GSH) FA metabolizmasında kofaktör görevi gören önemli bir hücre içi bileşendir. FA ile S-hidroksimetilglutasyon konjugatı oluşturarak, intraselüler FA konsantrasyonunun kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Dokularda yeterli

miktarda GSH bulunması durumunda FA'in önemli bir kısmı GSH konjugatı olarak tutulmaktadır. Bu konjugat, FDH enziminin gerçek substratı olması nedeniyle fizyolojik açıdan önemlidir. S-hidroksimetilglutasyon FDH enzimi katalizörlüğünde oksidasyona uğrayarak formik asit şeklinde atılıma uğramaktadır. Formik asit, başlıca idrarla atılır. Ayrıca feçesle de atılabilirken, bir kısmı da CO₂'e okside olarak solunum yoluyla vücuttan atılabilir.

4.1.6. Formaldehitin İnsan Sağlığı Üzerine Toksik Etkileri

FA bulunduğu her ortamda gaz formuna dönüşebilme kabiliyetinden dolayı havaya hızlıca karışabilmekte ve solunum yoluyla insan vücuduna girmektedir. Yaygın kullanım alanına sahip olması insan sağlığı üzerine tehdit oluşturmaktadır.

Tablo 3. Formaldehitin kısa-sürelili maruziyet sonrası insanlarda neden olduğu etkiler (WHO, 2000).

Konsantrasyon (ppm)	Maruziyet Sıklığı	Genel Popülasyon Üzerine Etkiler
0,03	Tekrarlayan	Kötü koku eşik sınırı (% 10)
0,18	Tekrarlayan	Kötü koku eşik sınırı (% 50)
0,6	Tekrarlayan	Kötü koku eşik sınırı (% 90)
0,1-3,1	Tek ve tekrarlayan	Burun ve boğazda irritasyon eşik sınırı
0,6-1,2	Tek ve tekrarlayan	Gözde irritasyon eşik sınırı
0,5-2	3-5 saat	Nazal mukus sıvısı akış hızında düşüş
2,4	2 gün üst üste 40 dk.	Baş ağrısı
2,5-3,7	-	Göz ve burunda acı ve yanma hissi
3,7	Tek ve tekrarlayan	Pulmoner fonksiyonlarda azalma
5-6,2	30 dk.	30 dakikaya kadar göz yaşarması ile tolere edilebilir
12-25	-	1 saat sürebilen şiddetli göz yaşarması
37-60	-	Pulmoner ödem, pnömani, hayati tehlike
60-125	-	Ölüm

4.1.6.1. Akut Maruziyet Sonucu Neden Olduğu Etkiler

Formaldehit insan vücudunda pek çok organ ve sistem üzerine toksik etkilere neden olabilmektedir. Göz ve solunum sistemi ilk maruziyet alanı olmasından dolayı en fazla etkilenen sistemlerdir. En yaygın belirtileri gözyaşı ve göz kızarıklığı, burun ve boğazda yanma hissi, irritasyon ve akıntı, baş ağrısı ve nefes darlığı olarak

kendini göstermektedir (IARC, 2006). FA'ya düşük doz akut maruziyet sonrasında üst solunum yolunda inflamatuvar değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Franklin ve ark., 2000). Yüksek dozlarda ise hırıltılı solunum, öksürük ve nefes darlığını takiben pulmoner inflamasyon, ödem ve pnömoniye neden olmaktadır (Heck ve ark.1990).

Çin'de kimya endüstrisinde çalışan ve FA'ya mesleki olarak maruz kalan işçilerle yapılan bir çalışmada nazal membran, farenks ve korneada konjesyon görüldüğü bildirilmiştir (Zhang ve ark., 1999). Yine gönüllülerle yapılan başka bir çalışmada FA'ya 0,25-3,0 ppm aralığında maruz kalanlarda göz, burun ve boğaz irritasyonu etkilerinin ortaya çıktığı görülmüştür (Kull ve ark., 1993).

Akut FA zehirlenmesi gazının solunması ya da sıvı formunun oral yolla alınması sonucu ortaya çıkabilmektedir. Zehirlenmenin şiddeti, solunan ya da yutulan FA'nın miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Oral yolla zehirlenmede ağız ve boğazda yanıklar ve irritasyon, göğüs ve karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, diyare ve gastrointestinal hemorajiye neden olmaktadır. Ayrıca metabolik asidozis, solunum sayısında artma (taşipne), sarılık, hematüri, proteinüri ve akut böbrek yetmezliğine de neden olabilmektedir. FA'nın oral letal dozu hayvanlarda 523 mg/kg'dır.

Dermal maruziyet sonucu alerjik reaksiyonlara ve kontakt dermatite yol açtığı literatürde yer almaktadır. FA buharı veya sıvısının doğrudan cilde temas etmesi durumunda deride sert, beyaz ve pütürlü yüzey oluşumu ile birlikte kaşıntı, kızarıklık ve kabarmalar meydana gelmektedir. Bu durum özellikle tekstil ve mobilya endüstrisinde çalışanlarda FA-bazlı reçinelere temas edilmesine bağlı olarak daha sık ortaya çıkmaktadır. Doktorlar, hemşireler ve laboratuvar teknikerleri gibi sağlık sektöründe çalışan ve FA'ya maruz kalanlar arasında da mesleki kontakt dermatit görülme riski arasında belirgin bir ilişki vardır (Scheman ve ark., 1998; Meding ve ark., 1990; Lyapina ve ark., 2012). Formaldehit solunması sonucu iritan-indükte astım olarak sınıflandırılan alerjik astım, kısa süreli yüksek doz FA'ya maruz kalma durumunda ortaya çıkan ve "Reaktif Hava Yolu Disfonksiyonu Sendromu (RADS)" olarak adlandırılan astmatik tip reaksiyon gerçekleşir (Brooks ve ark., 1998).

4.1.6.2. Kronik Maruziyet Sonucu Neden Olduğu Etkiler

Yüksek düzeyde uzun-sürelili mesleki FA maruziyeti sonucu olarak alt ve üst solunum yolunda irritasyon, göz irritasyonu, dejeneratif hastalıklar, hırıltılı solunum, öksürük, vücut ağrıları, göğüs ağrısı, karın ağrısı ve iştah kaybına neden olmaktadır. Ayrıca uzun-sürelili mesleki FA maruziyeti nasal mukuzada inflamatuvar ve hiperplastik değişiklikler, farenjiyal konjesyon, kronik faranjit, görme fonksiyon bozuklukları, tremor ve letarji gibi kronik ciddi sağlık sorunlarına da yol açabilmektedir (Dai ve Bao, 1999; Li ve Chen, 2002; Fan ve ark., 2006). FA'nın, gen ekspresyonunun regülasyonu ile ilişkili mikro-RNA kalıplarını değiştirdiği (Rager ve ark., 2011) ve lökositlerde oksidatif stres ve lipit peroksidasyonunun biyogöstergesi olan malondialdehit-deoksiguanosin aduktlarının düzeylerinde artışa neden olduğu raporlanmıştır (Bono ve ark., 2010).

4.1.6.2.1. Solunum Sistemi Üzerine Etkiler

Formaldehite solunum yoluyla maruz kalma sonucu ortaya çıkabilecek etki ve şiddeti maruz kalınan konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Maruz kalınan konsantrasyon artışına bağlı olarak 0,10-25 ppm aralığında burun ve farenkste irritasyon, öksürme gibi solunum yolu şikayetleri görülmektedir. Ayrıca 20 ppm'in üzerine çıkan konsantrasyonlarda kronik FA maruziyeti sonucu akciğer ödemi ve pnömoni geliştiiği bildirilmiştir (Pabst, 1987). Sigara içmeyen tıp öğrencileri ile yapılan bir çalışmada, 1,36-2,58 ppm düzeylerinde FA'ya maruz kalmaları sonucunda gruptakilerin %82'sinde burun irritasyonu, %76'sında göz irritasyonu ve %36'sında boğaz irritasyonu şikayetleri görülmüştür (Akbar-Khanzadeh ve Mlynek, 1997). Benzer şekilde kronik olarak FA'ya maruz kalan fabrika işçileri ile yapılan bir başka çalışmada, pulmoner ventilasyonda azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca zamanla artan maruziyet sonucunda küçük hava yollarında görülen anormalliklerde artış olduğu da bildirilmiştir (Wang ve ark., 2000).

Bir çalışmada, %1-10 arası değişen düzeylerde FA inhalasyonuna maruz bırakılan sıçanların akciğer dokusunda inflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde artış olduğu görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış

ve doku GSH düzeylerinde azalış olduğu yine bu çalışmada bildirilmiştir (Murta ve ark., 2016).

4.1.6.2.2. Nörotoksisite

Kronik FA maruziyetinin sinir sisteminde fonksiyon bozukluklarına yol açarak baş ağrısı, baş dönmesi, hafıza kaybı, halsizlik ve uyku bozukluğu gibi etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2000; Tulpule ve Dringen, 2013; Songur ve ark., 2010). Toplamda 1 milyondan fazla katılımcıdan oluşan uzun-sürelili bir çalışmada, çeşitli alanlarda çalışan (eczacılar, kimyagerler, dişçiler, doktorlar, hemşireler, morg görevlileri, laboratuvar teknikerleri ve matbaa çalışanları) ve iş yerinde formaldehite maruz kalan bireylerin %34'ünde amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı görülme oranının formaldehite maruz kalmayanlara göre yüksek olduğu bildirilmiştir (Weisskopf ve ark., 2009).

Sıçanlarla yapılan deneysel çalışmalarda FA maruziyetine bağlı olarak motor sinir aktivitesinde yavaşlama olduğu görülmüştür. Yine sıçanlarda, FA'nın nöral dokularda oksidatif strese yol açarak; doku antioksidan enzim aktivitesinde düşüş ve lipid peroksidasyonunda artışa yol açtığı raporlanmıştır. Ayrıca FA uygulanan sıçanlarda öğrenme ve davranış bozukluğuna yol açtığı görülmüş ve FA'nın beyin kanserine neden olabileme potansiyelinin bulunduğu bildirilmiştir (Songur ve ark., 2010; Sorg ve Hochstatter, 1999; Stroup ve ark., 1986).

4.1.6.2.3. Genotoksik ve Karsinojenik Etkiler

Formaldehitin DNA ve kromozomlar üzerine etki ederek genotoksik özellik taşıdığı bilinmektedir. FA, kendisi doğrudan DNA ile etkileşerek genotoksik etkilerini gösterebilme kabiliyetine sahip bir ajandır. Genotoksik özelliğinin DNA-protein çapraz bağ oluşturma yeteneğinden ileri geldiği kabul edilmektedir (Casanova ve ark., 1994). Oluşan bu kovalent bağlanma kararlı bir yapıya sahiptir. Hastane patoloji laboratuvarında çalışanlar ile yapılan bir çalışmada FA maruziyeti nedeniyle lenfositlerde DNA-protein çapraz bağları sayısında ve serum p53 protein konsantrasyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir (Shaham ve ark., 2003).

Epidemiyolojik çalışmalarla yüksek formaldehit maruziyeti ile sinonazal kanser arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca nazal epitelde neoplaziye ve skuamöz hücreli metaplaziye yol açtığı da gösterilmiştir (Hansen ve Olsen, 1995). FA maruziyeti ile nazofarenjiyal kanser, nazal ve paranazal kanser ve lösemi arasında bir bağlantı olduğuna dair yeterli veri bulunmaktadır (IARC, 2006; IARC, 2012). 11 039 tekstil çalışanından oluşan bir kohort çalışmada, FA maruziyeti ve lösemi ile ilişkili ölümler arasında bir ilişki olduğu görülmüştür (Pinkerton ve ark., 2004). Ayrıca bir kaç çalışmadan elde edilen verilerle, FA maruziyeti ile oral kavite, orofarenks, hipofarenks, pankreas, larenks, akciğer ve beyin arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (IARC, 2006).

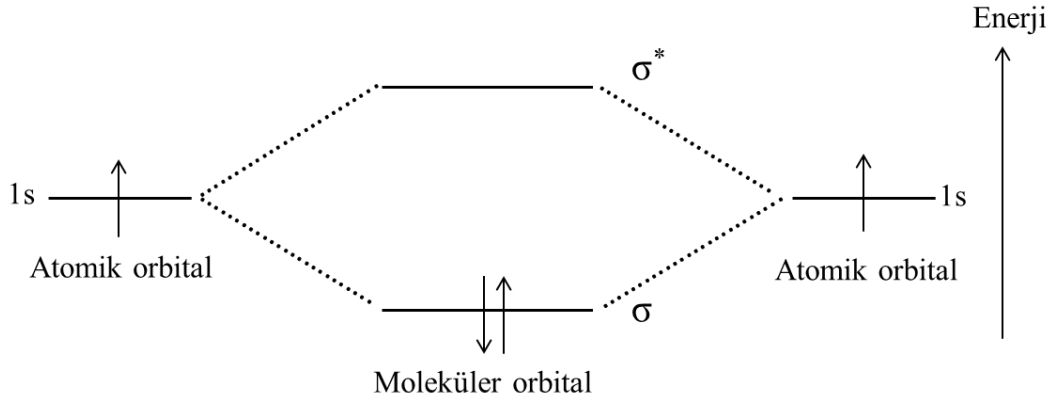
Patoloji ve anatomi laboratuvarında çalışanlarda, uzun-sürekli FA maruziyetinin (0,04-1,58 ppm arası) DNA üzerine etkileri mikroçekirdek, kardeş kromatit değişimi ve comet yöntemiyle araştırılmış, mikroçekirdek ve kardeş kromatit değişimi (SCE) insidansı ve lenfositlerde DNA hasarı oluşumunda artış olduğu bildirilmiştir (Costa ve ark., 2008).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, gastrointestinal leiomyosarkom insidansında, testislerde intertisyel adenoma ve trakeal tümör insidansında artış olduğu görülmüştür (IARC, 2006).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada FA iki farklı konsantrasyonda (2 ve 10 ppm) inhalasyon yoluyla 2 hafta, haftada 5 gün ve günde 6 saat olarak uygulamış, akciğer dokularında DNA hasarı comet yöntemi ile incelenerek artan FA konsantrasyonunun DNA hasarında artışa neden olduğu görülmüştür (Sul ve ark., 2007).

4.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

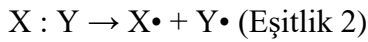
Kuantum kimyasının gereği olarak bir kimyasal bağın yapısında ancak iki elektron yer alır ve bu elektronlar ters spinli olarak yerleşmiş halde olmak zorundadır. Yani, elektronlardan biri saat yönünde dönerken, diğeri zıt yönde dönmektedir. Bu yapıdaki elektron çiftlerinin kararlılıkları oldukça yüksektir ve oluşturdukları molekül ve bileşikler kararlı yapıda bulunurlar. Serbest radikaller ise yapısında eşleşmemiş tek elektron içerirler ve bu durum onları oldukça kararsız yapmaktadır (Maruani, 1988).



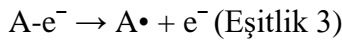
Şekil 4. Kimyasal bağ oluşumunda elektronların orbitallere dağılımı.

Kimyasal bir bağ koptuğu zaman ortaya çıkan iki durum vardır; birinci durumda elektron çifti aynı atoma katılırken, ikinci durumda ise elektron çiftleri birbirinden ayrılarak bağı oluşturan iki atom arasında paylaşılırlar. Birinci durum sonucunda iyon oluşurken, ikinci durumda ise serbest radikal oluşur. Oluşan bu serbest radikal yapısındaki eşleşmemiş elektrondan dolayı oldukça yüksek enerjili olup, kendini eşleyerek kararlı yapıya gelmek için yakınında bulunan elektronlara saldırma meylidir. Serbest radikal kendine bir elektron alarak kararlı hale geçerken, diğer elektron yeni bir serbest radikal oluşturur. Bu şekilde bir kere oluşan serbest radikal bir zincir reaksiyonunun başlamasına neden olabilir (Maruani, 1988).

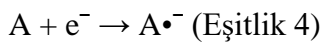
Kimyasal bağın homolitik bölünmesi:



Normal bir molekülün elektron kaybına uğraması:



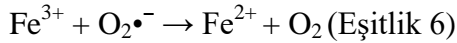
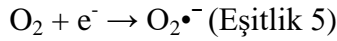
Normal bir moleküle bir elektron katılması:



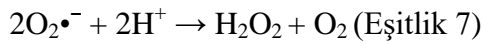
Oksijen kaynaklı olan serbest radikaller biyolojik sistemlerde canlılığın devamı açısından büyük bir öneme sahiptir. Aerobik organizmalarda hücrelerin temel enerji

yakıtı olan ATP'nin büyük bir kısmı oksijenli solunumun bir evresi olan oksidatif fosforilasyon reaksiyonları ile üretilmektedir. Bu metabolik yolakla ATP üretimi sağlanırken, elektron taşıma sistemi (ETS) olarak adlandırılan bir dizi reaksiyon sonucunda moleküler oksijenin su molekülüne indirgenmesi de gerçekleşir. Moleküler oksijen her defasında tek elektron alır ve tek elektronun oksijen molekülüne aktarılması sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan ROS'ların hücrel bileşenlere zarar vermemesi için kendi savunma sistemi bulunmaktadır ve bu sistem antioksidan savunma sistemi olarak adlandırılır (Fang ve ark., 2002; Akkuş, 1995; Clarkson ve Thompson, 2000). Oksijenin kendisi (singlet oksijen), süperoksit, hidrojen peroksit (H₂O₂), geçiş metallere iyonları ve hidroksil radikali hücre içi ROS kaynakları olarak bilinmektedir. Hücrel metabolizmanın yanı sıra özellikle oksidan özellik taşıyan kimyasal ajanlara maruziyet, UV ve X-ışınları, iskemi-reperfüzyon, inflamasyon ve yaşlanma durumunda da ROS'ların üretimleri artmaktadır.

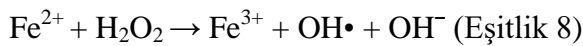
Oksijen molekülünün bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O₂•⁻) oluşur (Eşitlik 5). Hücrelerde H₂O₂ kaynağını teşkil eder ve aynı zamanda metal iyonlarının indirgenmesini sağlar (Eşitlik 6).

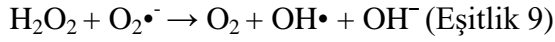


Süperoksit radikali, SOD enziminin katalizörlüğünde H₂O₂'e dönüştürülür (Eşitlik 7).



Hidrojen peroksit, demir (Fe²⁺) ve diğer geçiş metal iyonları (kobalt, bakır, krom vb.) varlığında Fenton reaksiyonu sonucu reaktivitesi oldukça yüksek olan hidroksil (OH•) radikalinin oluşmasına neden olur (Eşitlik 8). Ayrıca H₂O₂, O₂•⁻ varlığında Haber-Weiss reaksiyonu vererek de OH• oluşmasına yol açar (Eşitlik 9).

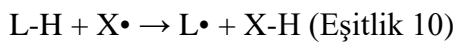




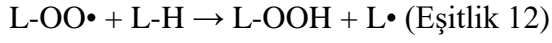
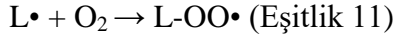
Hidroksil radikali Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının son ürünüdür ve oldukça toksik bir radikaldir. Toksisitesi lipit peroksidasyonu, proteinler ve DNA'nın oksidasyonları gibi biyomoleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek yol açtığı hasarlardan kaynaklanmaktadır (Davies, 1995; Leeuwenburgh ve Heinecke, 2001). Reaktif oksijen türleri, biyolojik sistemlerde bulunan lipit, protein ve nükleik asitler gibi birçok molekül ve hücre bileşeninin yapısında değişikliğe neden olarak doku hasarına yol açarlar. Reaktif oksijen türlerinin aşırı artması durumunda ortaya çıkan tabloya oksidatif stres denir. Oksidatif stres durumunda lipit peroksidasyonu sonucu hücre membran yapısında bozukluklar, DNA ile etkileşme sonucu adduktlar ve mutasyon oluşabilir, enzimlerin yapısında bulunan aminoasitlerle etkileşme sonucunda ise enzimatik reaksiyonlarda durma ve hücre metabolizmasında düzensizlikler ortaya çıkabilir (Davies, 1995).

Reaktif oksijen türleri membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açarak lipit peroksidasyonuna sebep olurlar. Lipit peroksidasyonu ve lipit kırılmaları sonucunda membran permeabilitesi ve gradiyentinde değişiklikler ortaya çıkabilir ve nihayetinde hücre bütünlüğünde bozulma ile sonuçlanabilir (Dix ve Aikens, 1993).

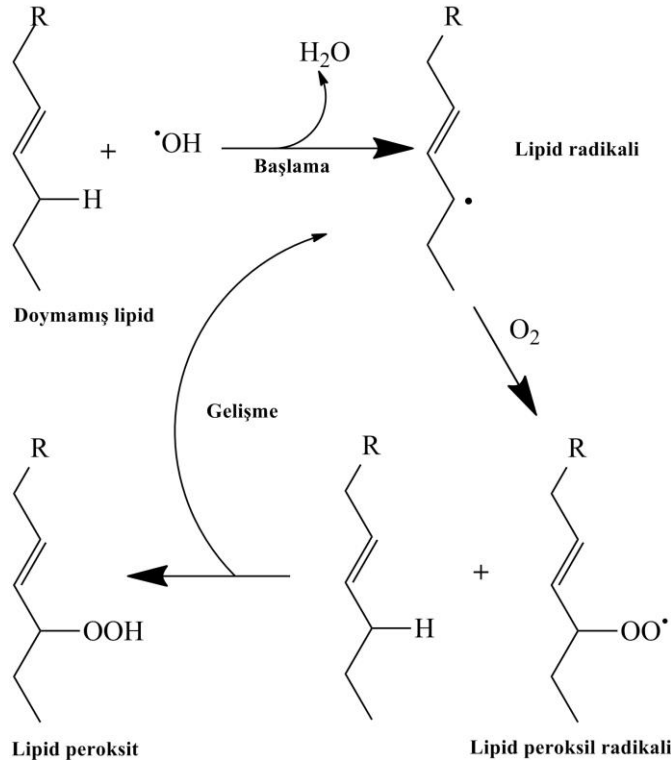
Lipit peroksidasyonu; başlangıç, ilerleme ve sonuç şeklinde üç basamaktan oluşmaktadır. Başlangıç basamağında, bir radikal (X^{\bullet}) ile yağ asidinin (LH) reaksiyonu sonucu bir lipit radikali (L^{\bullet}) oluşmaktadır. Yağ asidinde bulunan çifte bağ, kendisine bitişik konumdaki karbon (C) ve hidrojen (H) arasındaki (metilen grubu, $-\text{CH}_2-$) bağı elektronları kendisine doğru çekerek zayıflattığı için H atomunun metilen grubundan koparılması ile başlar (Eşitlik 10). Karbon üzerinde tek elektron kaldığı için lipit radikali oluşur.



İlerleme aşamasında, oluşan L^{\bullet} radikalının karbon merkezine oksijen eklenmesiyle peroksil radikali (LOO^{\bullet}) oluşmaktadır (Eşitlik 11). Peroksil radikali diğer bir yağ asidi (LH) molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeni lipit radikallerine dönüşmektedir (Eşitlik 12).



Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonları ortamda zincir kırıcı bir antioksidan varlığı olana kadar devam etmektedir. Sonuç aşamasında ise oluşan radikaller birbiriyle reaksiyona girerek radikal olmayan, aldehit, keton, ester, eter ve alkol gibi kararlı bozunma ürünlerine dönüşmektedir (Yin ve ark., 2011; Porter, 1985). Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan lipit peroksitleri son ürünler olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal aldehitlerine dönüşür (Esterbauer, 1991).



Şekil 5. Lipit peroksidasyonu mekanizması.

Oldukça yüksek reaktiviteye sahip olan OH• radikali başta olmak üzere, ROS proteinlere saldırarak geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olarak oksidatif hasara neden olurlar. Serbest radikaller, proteinlerin yapısını oluşturan aminoasitlerden bir H atomunun koparılmasıyla karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar ve bu radikal O₂ ile hızlı bir reaksiyon vererek alkilperoksit oluşur. Bir dizi reaksiyon sonucu oluşan ara ürünler olan alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikalleri aynı proteinin diğer aminoasit kalıntılarıyla ya da başka proteinlerle yan reaksiyon vererek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumunu tetikleyebilir (Şekil 5). Sonuç olarak protein yapısı bozulur ve protein karbonil türevleri oluşur. Protein karbonil türevleri aynı zamanda oksidatif stres ve hastalıklar sonucu oluşan protein oksidasyonunun değerlendirilmesinde kullanılır (Berlett ve Stadtman, 1997; Dalle-Donne ve ark., 2003).

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek nötralize eden kimyasal maddelerdir. Serbest radikallerin diğer molekülleri oksidasyona uğratmalarına engel olarak kanser dahil birçok hastalığı önleyen veya etkilerini minimize eden moleküllerdir. Antioksidan madde serbest radikalle reaksiyona girerek onu etkisizleştirdikten sonra yeni bir radikal veya oksidan özellik taşıyan yeni bir molekül oluşturmaz, bu yüzden antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak da adlandırılmaktadır (Fang ve ark., 2002). Antioksidanlar, hem hücre içerisinde endojen olarak hem de çeşitli ajanlara maruziyet sonucu eksojen olarak oluşan ROS'larla etkileşerek onların yol açacağı hücre hasarından korunmak için büyük bir öneme sahiptirler. Antioksidan maddeler kaynaklarına göre endojen ve eksojen olarak iki grupta sınıflandırılmaktadırlar. Endojen antioksidanlar vücudun sahip olduğu antioksidan savunma sistemini oluştururlar ve enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan maddeler olarak alt gruplara ayrılırlar. Enzimatik olarak görev yapan antioksidanlar SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GPx), sitokrom oksidaz, glutatyon S transferaz (GST), ksantin oksidaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleridir. Oksidatif stres durumunda bu enzimlerin aktivitelerinde artış görülmektedir. Bu sebepten dolayı özellikle SOD, CAT ve GPx enzimleri oksidatif stres ve antioksidan özellik araştırmalarında yaygın olarak incelenen parametrelerdir (Kohen ve Nyska, 2002; Silva Macedo ve ark., 2016). GSH, seruloplazmin,

transferrin, albümin, ürik asit, haptoglobinler, melatonin ve laktoferrin enzimatik olmayan endojen antioksidan moleküllerdir.

Askorbik asit (Vitamin C), Vitamin E, β -karoten, α - tokoferol, flavanoidler ve fenolik asitler eksojen olarak dışarıdan aldığımız antioksidan maddelerdir. Askorbik asit, suda çözünebilir ve zincir kırıcı bir antioksidandır. $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} radikallerinin temizlenmesinde önemlidir. α -Tokoferol yağda çözünen temel antioksidandır ve lipit peroksidasyonuna karşı etkilidir. Bu özelliğinden dolayı membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesinin önlenmesini sağlamaktadır (Carr ve ark., 2000).

4.3. Glutasyon

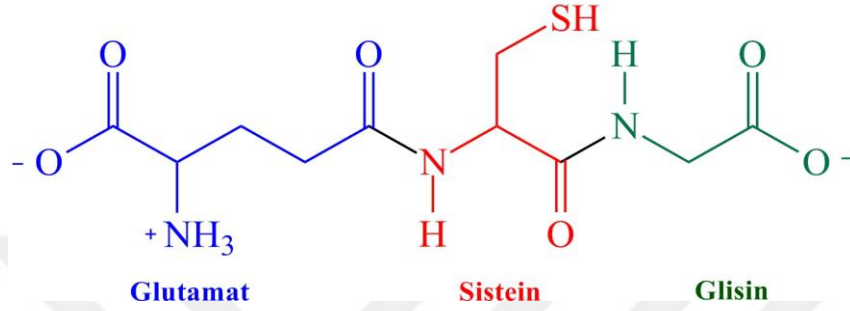
Glutasyon (GSH) biyolojik sistemlerde bulunan önemli bir antioksidan moleküldür. ROS'lar, serbest radikaller, peroksitler ve lipit peroksitleri gibi birçok oksidan maddenin hücrelerde oluşturabileceği hasarın engellenmesinde aktif bir rol almaktadır. Yapısında glisin, sistein ve glutamik asit aminoasitleri bulunur (Pompella ve ark., 2003).

Hücrelerde total GSH %85-90 oranında sitozolde bulunurken %10-15' mitokondride ve çok az kısmı da diğer organellere dağılmıştır. Total GSH, hücrelerde serbest veya proteinlere bağlı olarak bulunur (Ookhtens ve ark., 1998; Meredith ve ark., 1982). Redükte halde bulunan GSH, oksidatif stres durumunda okside formuna (GSSG) dönüşmektedir (Eşitlik 14). GSSG daha sonra glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar redükte formuna dönüştürülür (Eşitlik 15).



GSH özellikle OH^{\bullet} radikalının süpürülmesinde önemli bir rol üstlenmekte olup, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobin oluşumunun engellenmesi ve proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının indirgenmiş halde tutularak oksidasyona karşı korunmaları açısından önemli bir endojen antioksidan moleküldür. GSH aynı zamanda ksenobiyotik metabolizmasının Faz 2 reaksiyonlarında da rol almaktadır.

Ksenobiyotiklerin oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları (Faz 1) sonucu değişikliklere uğratılması sonucu oluşturulan polar metabolitler GSH ile konjugasyona uğrayarak atılıma uğrarlar. Ayrıca Faz 1 reaksiyonlarında oluşabilen epoksitler gibi reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunda da önemli bir yere sahiptir (Liska, 1998).



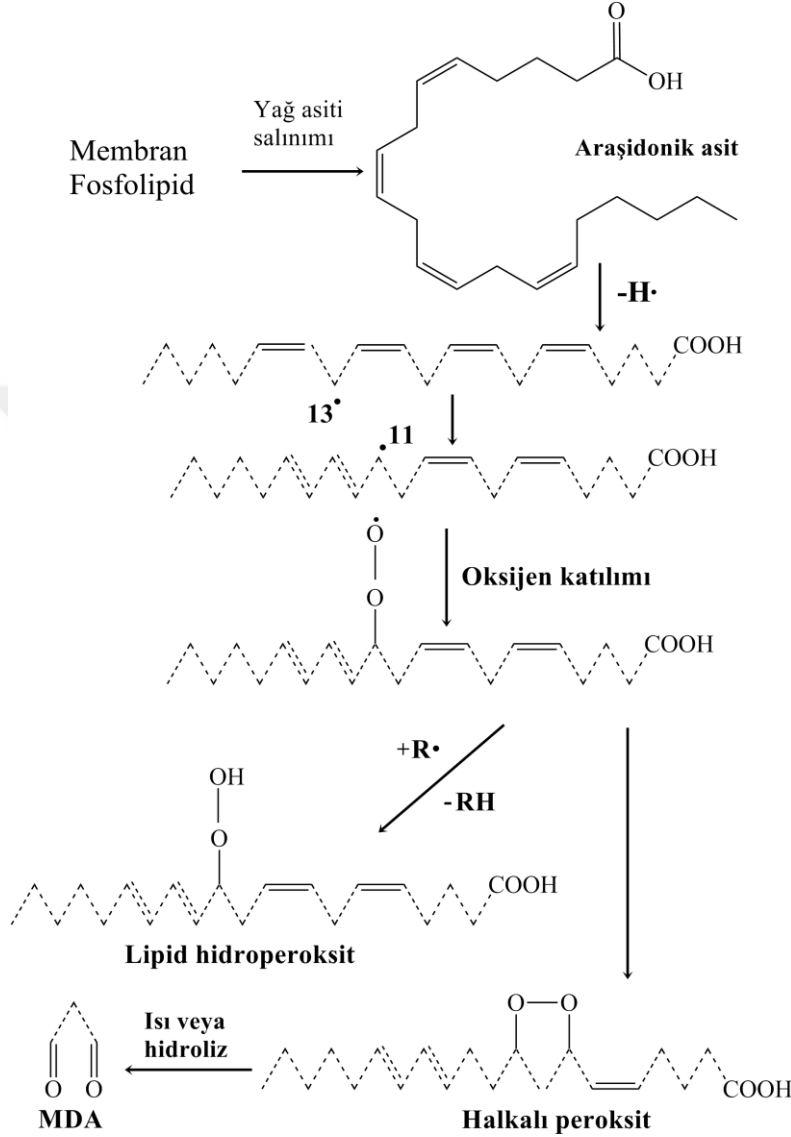
Şekil 6. Glutatyonun molekül yapısı.

Glutatyonun toksikoloji açısından önemi asetaminofen (parasetamol) zehirlenmelerindeki rolüdür. Yapısında bulunan sistein içerdiği -SH grubundan dolayı nükleofilik özellik gösterir ve asetaminofen molekülünün toksik metaboliti olan N-asetil-p-benzo-kinonimin ile sistein üzerinden konjugat oluşturarak detoksifikasyonunu sağlar. Yüksek dozda asetaminofen alınması durumunda karaciğerde bulunan GSH havuzu tüketildiği için toksik metabolit karaciğer hasarına yol açabilmektedir. Bu yüzden klinikte, GSH prekürsörü olan N-asetil-sistein ile tedavi uygulanarak GSH sentezinin artması sağlanmaya çalışılmaktadır (Pompella ve ark., 2003; Hodgman ve Garrard, 2012).

4.4. Lipit Peroksidasyonu: Malondialdehit

Malondialdehit, lipit peroksidasyonunda oluşan son ürünlerden biridir ve lipit peroksidasyonunun gösterilmesinde yaygın olarak kullanılan bir göstergedir. Üç veya daha fazla çifte bağ içeren veya uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur (Ayala ve ark., 2014). MDA, küçük molekül yapısı nedeniyle vücudun diğer bölümlerine kolayca difüzlenebilmektedir. Reaktivitesi yüksek olduğu için proteinlerle ve DNA ile etkileşerek çapraz bağlar oluşturur ve

fonksiyonlarında bir takım bozukluklara yol açar. DNA’da oluşturduğu adduktlar nedeniyle mutajenik özellik taşımaktadır (Marnett, 1999).



Şekil 7. Malondialdehit oluşum mekanizması.

4.5. Myeloperoksidaz Aktivitesi

Myeloperoksidaz (MPO), memelilerde nötrofillerin granüllerine yerleşmiş olan bir peroksidaz enzimidir. Fagositoz sırasında mikroorganizmaların (özellikle bakterilerin) öldürülmesinde rol alan bir enzimidir. Solunum patlaması ile oluşturulan H_2O_2 ile vücut sıvılarında bulunan Cl^- iyonunu kullanarak hipokloröz asit (HOCl) sentezini sağlar (Eşitlik 16). Üretilen HOCl güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye

sahiptir. Ayrıca diğerk halojenürlerle de benzer şekilde etki gösterdiği ve antibakteriyel etkisinin arttığı bilinmektedir (Klebanoff, 2005). MPO aktivitesinin arttığı patolojik durumlarda sürekli HOCl üretimine bağılı olarak dokularda olumsuz durumlar ortaya çıkmaktadır. HOCl, oksidan özellik taşıyan, lipitler, DNA ve proteinlerle etkileşerek oksidatif çapraz bağlanmalara yol açabilen, halojenizasyon ve nitrasyon reaksiyonları meydana getirebilen toksik bir maddedir (Schuller-Levis ve Park, 2003).



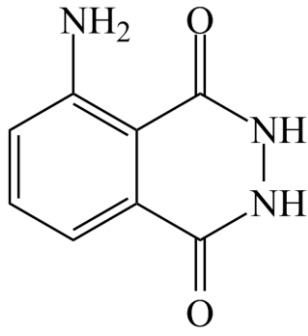
Nötrofillerin içerdiği yüksek miktardaki HOCl'nin zararlı etkilerinden korunması için taurin ile nötralize edilir. HOCl, nötrofillerin sitoplazmalarında bulunan taurin ile reaksiyona girer ve kendisinden daha az toksik olan taurin kloramine (Tau-Cl) dönüşür (Klebanoff, 2005).

4.6. Kemilüminesans Yöntemle Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçülmesi

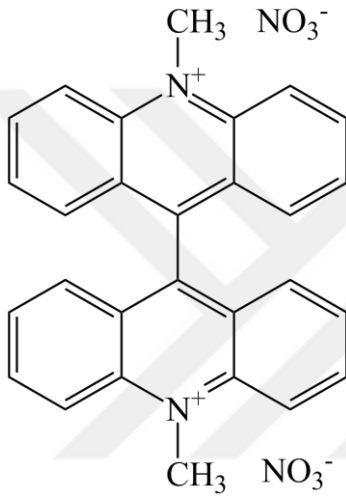
Kararsız haldeki uyarılmış bir atom veya molekülün elektronu temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisini ışık şeklinde atarak “lüminesans” olarak isimlendirilen ışık yayılması yapar. Bu yayılma bir kimyasal tepkime ile sağlanıyorsa buna “kemilüminesans” (KL) adı verilir (Greenwald, 1985). KL yöntem, yüksek hassasiyet, geniş lineer aralık, basit ve ucuz enstrümantasyon, kontrol edilebilir emisyon hızı ve arka plan gürültüsünde azalma gibi önemli avantajlara sahiptir. Işık, sıcaklık, hücre konsantrasyonu, pH ve kullanılan prob konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler KL yöntemi etkileyebilmektedir. ROS'lar kararsız yapıları ve yüksek reaktivite özelliği taşımaları nedeniyle *in vivo* olarak miktarları doğrudan ölçülememektedir. Ayrıca doku konsantrasyonlarının düşük olması nedeniyle düşük emisyon yapıları da miktarlarının ölçümlerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle biyolojik sistemlerde ROS düzeylerini ölçmek için KL sinyalini arttırmak amacıyla luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-fitalazin-dion) ve lusigenin (bis-N-metil akridinyum nitrat) problemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Luminol probu hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hidroperoksil ve hipoklorit için seçici, lusigenin probu ise superoksit radikali için seçicidir (Lu ve ark., 2006).

Nitrik oksit, memelilerde birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir fonksiyonu olan bir radikaldir. Yapısında bulundurduğu eşleşmemiş elektron azot ve oksijen atomları arasında delokalize şeklinde bulunduğu için diğer radikallere göre daha uzun ömürlüdür. Dışarıdan vücudumuza giren nitro bileşiklerinin metabolizmaları sonucu oluşabilirken, endojen olarak nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi tarafından L-argininin oksidatif deaminasyonu sonucu üretilmektedir (Alderton, 2001). NOS enziminin üç izoenzimi vardır; nöronal (nNOS), endotel (eNOS) ve indüklenbilir (iNOS). Organizmada üretilen NO molekülünün sentezlendiği enzim türüne göre farklı fizyolojik fonksiyonları bulunur. eNOS ve nNOS sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası iletim (haberci) fonksiyonunda rol alır ve nörotransmitter olarak da sınıflandırılmaktadır. iNOS izoformu ise çoğunlukla fagositik lökositlerde (makrofajlar, nötrofiller vb.) bulunur. iNOS ekspresyonu, bakteriyel lipopolisakkaritler (endotoksinler), belli sitokinler (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), hipoksi ve oksidatif stres durumunda artış gösterir (81). Fagositoz sırasında yüksek miktarda NO ve süperoksit radikali üretilir. NO ve süperoksitin reaksiyonu sonucunda peroksinitrit (ONOO $^-$) oluşur ve fagosite edilmiş olan bakterileri öldürür (Liew ve ark., 1990).

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen azot merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında azot atomuna ait ise de, bu elektronun hem azot hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından daha uzun ömürlüdür. NO, metal bulunduran merkezlerle reaksiyona girebilir. Örneğin, Fe-S grubunda bulunan Fe'in yerini alarak Fenton reaksiyonunu tetikleyebilir. Radikallerle de etkileşebilme özelliği vardır. O $_2^{\bullet-}$ ile girdiği reaksiyon sonucunda peroksinitrit (ONOO $^-$) oluşturur. ONOO $^-$, OH \bullet radikali benzeri bir reaktiviteye sahip olduğu için biyomoleküllerin oksidasyonuna ve nitrasyonuna yol açabilmektedir. Hem grubu ve sülfidril gruplarına yüksek afinite gösterir. Normal koşullarda hücrelerde ONOO $^-$ oluşumu sınırlıdır. iNOS ekspresyonunda artış olması durumunda NO üretiminin baskın hale gelmesi ile ONOO $^-$ üretimi artar ve oksidatif strese katkıda bulunur. Bu özelliklerinden dolayı oksidatif stresin değerlendirilmesinde bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır (Pierini ve Bryan, 2015).



Şekil 8. Luminolün kimyasal yapısı.



Şekil 9. Lusigeninin kimyasal yapısı.

4.7. Oksidatif DNA Hasarı ve Ölçüm Yöntemleri

Oksidatif strese bağlı DNA hasarının başta kanser olmak üzere nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalığın patogenezisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. ROS'lar DNA yapısında yer alan bazların çift bağlarına H atomu eklenmesi veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve metil gruplarından H atomu çıkarılması yoluyla DNA molekülü ile etkileşime girerler. Sonuçta oluşan peroksil radikalleri indirgenerek timin glikol, 5-formilurosil ve hidroksihidroperoksit gibi oksidasyon ürünleri oluşur. DNA baz mutasyonları arasında en yaygın bilineni 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)'dir. 8-OHdG, OH• radikalının guanin bazının 8. pozisyonunda etkileşime girmesi sonucu oluşmaktadır. 8-OHdG aynı zamanda doku ve kanda tayini yapılabilen ve DNA hasarının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir biyogöstergedir (Henle ve ark.,

1995; Goto ve ark., 2008). Oksidatif stres durumunda ortaya çıkabilen bir diğer DNA hasarı türü de DNA-protein çapraz bağlarının oluşmasıdır. DNA yapısında oluşan baz radikalleri proteinlerin aromatik aminoasitleri ile etkileşmesi sonucu DNA-protein çapraz bağları oluşmaktadır (Barker ve ark., 2005).

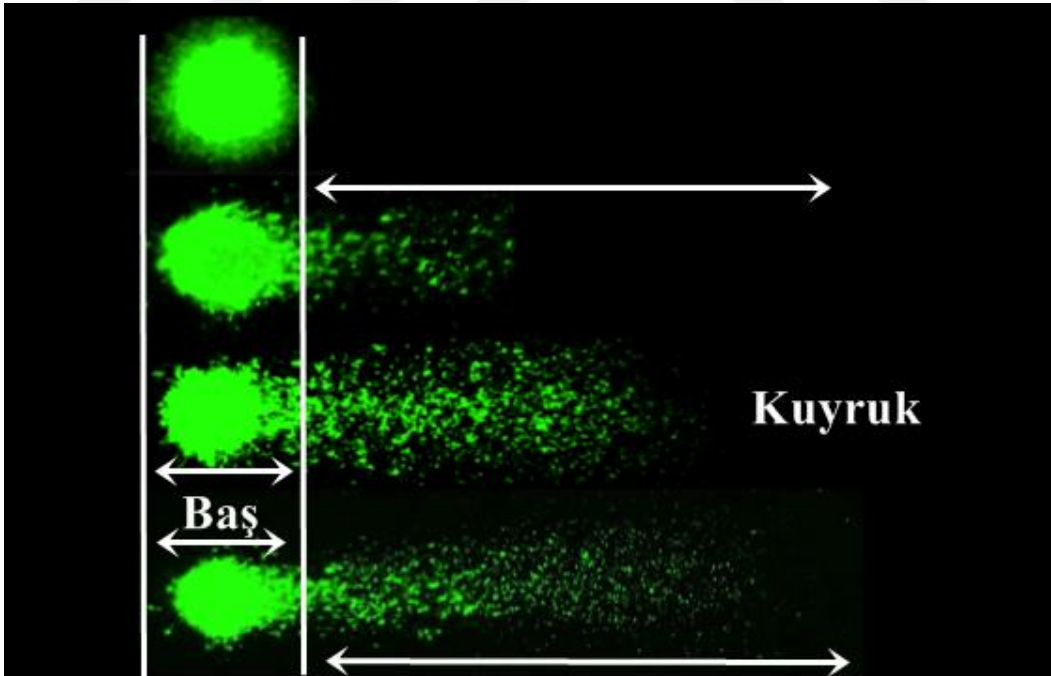
Guanin (G) bazının okside formu olan 8-OHdG, adenin (A) ve sitozin (C) ile baz çifti oluşturabilmesinden dolayı, A:T 'i C:C'e veya G:C'i T:A'e değişimi şeklinde mutasyonlara yol açabilmektedir (T: timin). Baz çiftlerinde oluşan bu tür mutasyonlar DNA polimeraz enzimi tarafından baz eksizyon onarım mekanizması ile onarılmaktadır. Ancak oksidatif stres kaynağına devam eden maruziyet sonucunda onarım mekanizması yetersiz kalabilir ve mutasyonun şiddeti ve patolojik durumda değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Aynı zamanda, DNA onarımında rol oynayan enzimlerin ROS'lar tarafından hasara uğratılması da mutasyonların artmasına neden olabilmektedir. Oksidatif stres sonucu DNA'da çift-zincir kırıkları ve kümelenmiş DNA lezyonları gibi mutasyonlar da oluşmaktadır. DNA'da oluşan mutasyonlar onarılamadığında hücre apoptoza uğrayabilir ya da yaşamını sürdürerek genetiği farklılaşmış hücrelere dönüşerek tümör oluşumuna, nihayetinde de kansere yol açabilmektedir (Barzilai ve Yamamoto, 2004; Kohen ve Nyska, 2002; Kryston ve ark., 2011).

4.7.1. Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Tekniği (Comet Tekniği)

Tek hücre jel elektroforezi tekniği aynı zamanda "comet tekniği" olarak da adlandırılmaktadır. SCGE tekniği ilk defa Rydberg ve Johanson tarafından geliştirilmiş olup, birey hücrelerinin radyasyona maruz bırakılması sonucu DNA sarmalında oluşan hasarın tespitinde kullanılmıştır. Hücreleri lam üzerinde agaroz gömerek orta derece alkali ortamda lize ederek DNA sarmalının açılmasını takiben akrinin oranj ile boyayıp mikroskop ile değerlendirmişlerdir (Rydberg ve Johanson, 1978). Rydberg ve Johanson'un uyguladığı bu teknik, orta dereceli alkali şartlarda hücredeki tüm proteinlerin alkali ortama geçmemesi gibi nedenlerden dolayı yaygın olarak kullanılmamıştır. Ostling ve Johanson, "Mikrojel elektroforezi" olarak adlandırılan teknikte, benzer şekilde hücreleri lam üzerinde agaroz gömerek nötral deterjan solüsyonu ile lizis işlemi sonrası nötral şartlar altında elektroforeze tabi tutuktan sonra akrinin oranj ile boyayarak mikroskopta değerlendirmişlerdir (Ostling

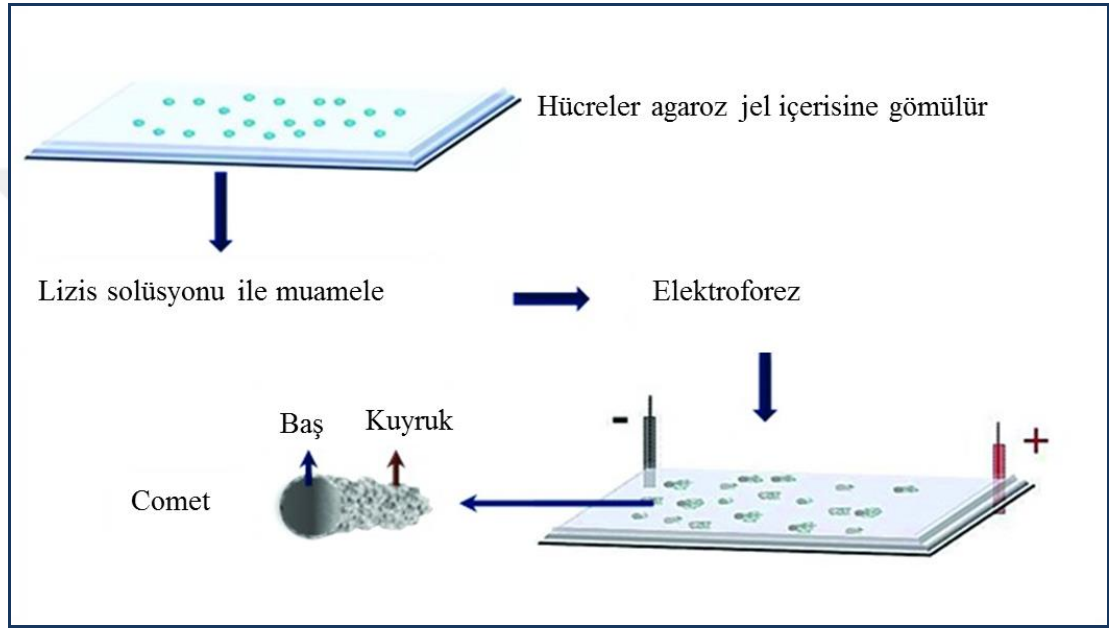
ve Johanson, 1984). DNA sarmalında kırık olması durumunda elektroforez esnasında (-) yüklü DNA'daki hasarlı kısımlar çekirdekten anoda doğru göç eder. Mikroskopta çekirdek merkez, baş ve göç eden kuyruk kısmı oluşturarak kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Kuyruklu yıldız görüntüsü nedeniyle bu yönteme "comet tekniği" adı verilmiştir. Bu yöntem ile DNA sarmalının her iki kolundaki kırıklar tespit edilebilmekte iken, tek kolda oluşan kırıklar tespit edilememektedir. Ayrıca nötral şartların, alkali şartlar kadar hassas olmaması da bu yöntemin bir deavantajıdır.

Singh ve ark., mikrojel elektroforezi tekniğini modifiye ederek alkali ortamda DNA tek kolunda oluşan hasarın değerlendirilmesini sağlamışlardır (Singh ve ark., 1988). Elektroforez esnasında hasarlı DNA parçaları çekirdekten serbest hale geçer. DNA'nın büyüklüğüne ve hasar şiddetine bağlı olarak DNA'nın göç etme kabiliyeti değişiklik gösterir. Hasar düzeyi düşükse hasarlı DNA göçten ziyade çekirdekte gergin görünüm oluşturur. Hasar düzeyi yüksek olduğunda ise kuyruk ve baş iyice ayrılır (Fairbairn ve ark., 1995). Singh ve ark.'nın oluşturduğu comet tekniği protokolü bazı modifikasyonlarla günümüzde en yaygın kullanılan protokoldür.



Şekil 10. Comet görünümü.

DNA'daki hasar durumunun değerlendirilmesinde floresan mikroskopu ile gözle skorlama yapılırken hücreler kuyruk uzunluklarına göre; hasarsız, az hasarlı, hasarlı ve çok hasarlı olarak gözle skorlama yapılabilir. Floresan mikroskobuna bağlı kamera ataçmanı kullanarak bilgisayarla görüntü analiz programları kullanarak kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi (%DNA_T) gibi parametrelerin de belirlenmesi mümkündür (Collins, 2002).



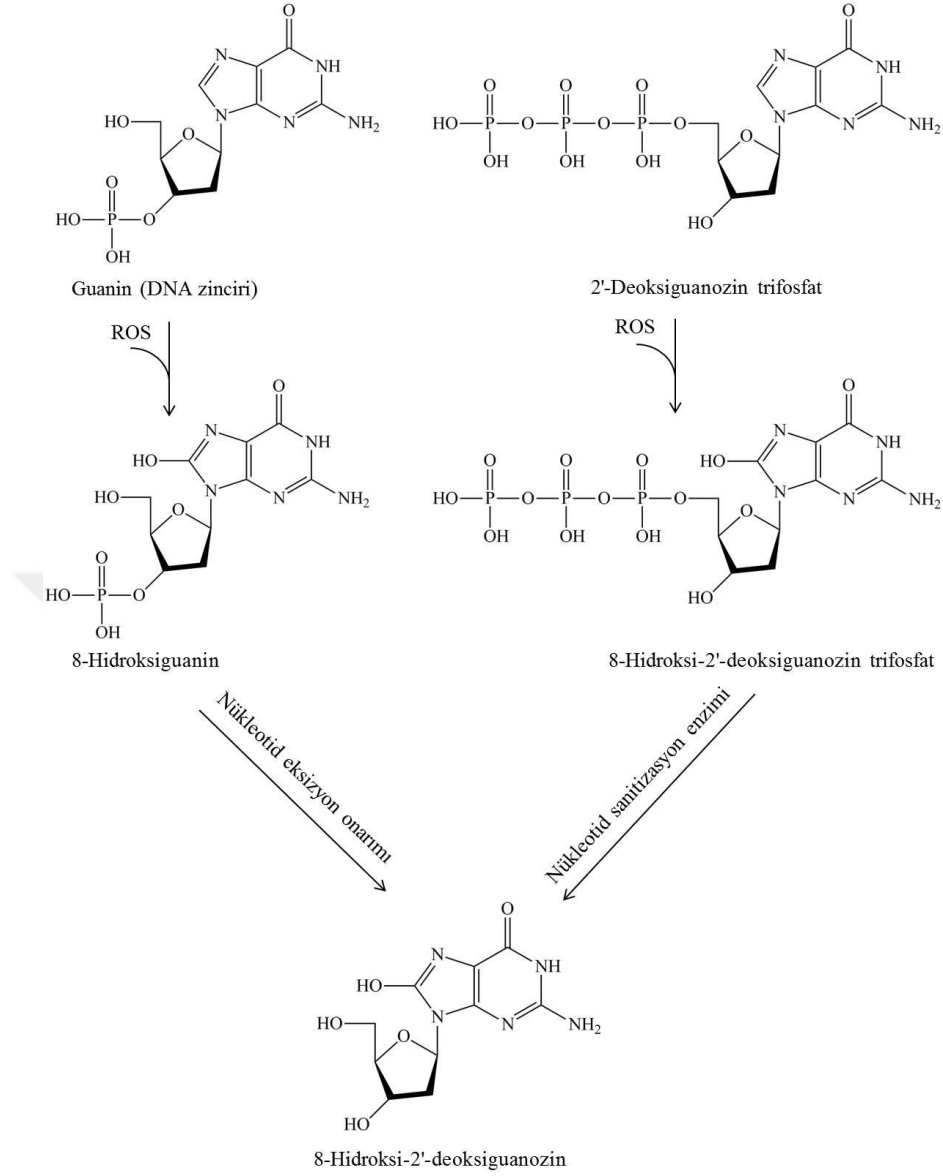
Şekil 11. Comet tekniğinin basamakları (Gunasekarana ve ark., 2015).

4.7.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyi oksidatif stres durumunda oluşan DNA hasarının bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılan bir parametredir. İlk kez 1984 yılında Kasai ve ark. tarafından gıdalarda ısı sonucu oluşan mutajenlerin izolasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada bulunmuştur. Oluşan bu mutajenler oldukça kararsız oldukları için izole edebilmek için onları guanin türevleri şeklinde izole etmek için bir metod geliştirmişlerdir. Aynı zamanda serbest oksijen radikallerinin C-8 oksidasyon reaksiyonuna yol açtıklarını da ortaya koymuşlardır (Kasai ve ark., 1984; Kasai ve Nishimura, 1984). Guanin, düşük iyonizasyon potansiyeli taşımasından dolayı oksidasyona yatkın bir bazdır ve oksidasyonu sonucunda deoksiguanozin oluşur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda 8-OHdG'nin klinik önemi ortaya konmuş ve çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kanseri, yaşlanma, Alzheimer, katarakt, tip II diyabet ve hipertansiyon gibi hastalığı olan hastalarda 8-OHdG düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca sigara içimine bağlı akciğer kanserinin potansiyel bir biyogöstergesi olarak da kabul edilmektedir (Syslová ve ark., 2014). 8-OHdG oluşumu, oksidatif strese neden olan tüm fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet sonucu artış göstermektedir. X-ışınları, asbest, benzen, parakuat, UV, ağır metaller gibi maddeler 8-OHdG oluşumuna katkıda bulunan ajanlara örneklerdir.

Üriner 8-OHdG düzey analizi çeşitli karsinojen maddeler, çevre kirlenmeler ve yaşam tarzı faktörlerine bağlı oksidatif stres ve kanser riskini değerlendirmede kullanılan bir biyogöstergeci (Kasai ve ark., 2001; Cooke ve ark., 2001). Sigara içen insanların akciğer ve periferik lökositler dahil dokularında 8-OHdG düzeylerinin arttığı görülmüştür (Kiyosawa ve ark., 1990). Ayrıca işyeri alanında ve çevresel maruziyet sonucu pasif sigara içicilerinde de 8-OHdG düzeylerinin dikkate değer şekilde artış gösterdiği bulunmuştur (Howard ve ark., 1998). İşçilerin mesleki olarak maruz kaldığı asbest elyaflarının genotoksik ve karsinojenik potansiyeli bilinmektedir. Asbestin hidroksil radikali oluşumuna yol açtığı ve oksidatif DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Marczynski ve ark., 2000).



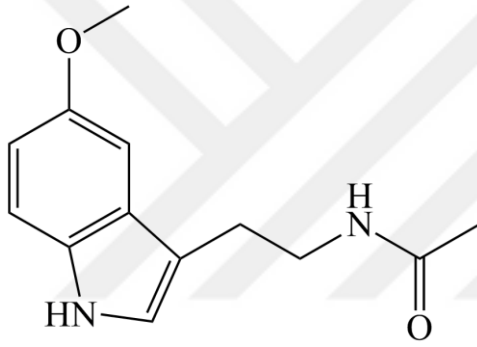
Şekil 12. 8-OHdG oluşum mekanizması (Syslová ve ark., 2014).

4.8. Melatonin

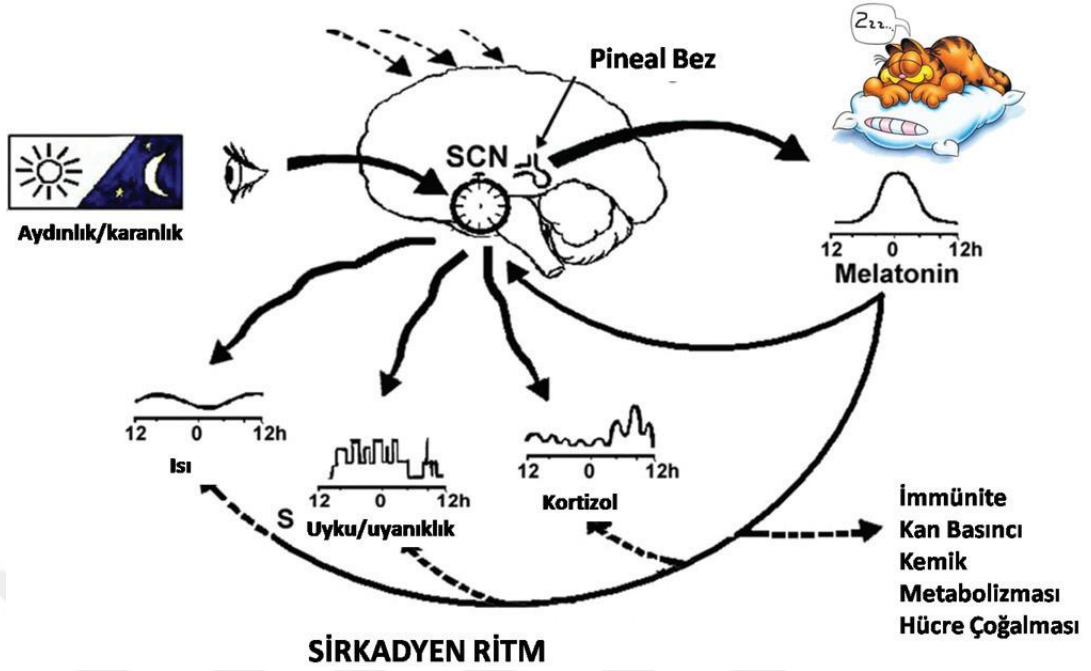
Melatonin (MEL; IUPAC adı: N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil]) başlıca pineal bez olmak üzere retina, kemik iliği, timus, over ve gastrointestinal sistem tarafından sentezlenip salgılanan bir nörohormondur. İlk kez 1958 yılında Lerner ve ark. tarafından keşfedilmiştir. MEL'in temel fizyolojik fonksiyonu gece-gündüz ritmini düzenlemektir (Menendez-Pelaez ve Reiter, 1993; Lerner ve ark., 1958). Retinadan salgılanan MEL retinada bulunan fotoreseptörlerdeki gece-gündüz siklusuna karşı oluşacak cevabın düzenlenmesinde rol alır. Deride, güneş ışınlarının

zararlı radyasyon etkilerine karşı derin dokuların korunması ve pigment granüllerinin değişiminden sorumludur. Safrada ise okside kolesterol türevlerinin ve safra asitinin safra epiteli ve mukozasına oksidatif hasar oluşturmalarına karşı korunmasında rol almaktadır.

Melatonin uyku ritminin düzenlenmesinin yanında antioksidan serbest radikal süpürücü ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT vb.) gen regülasyonu gibi özellikleri taşıdığı gösterilmiş olan antioksidan bir maddedir (Pieri ve ark., 1994; Omurtag ve ark., 2008; Rodriguez ve ark., 2004). Molekül boyutunun küçük olması ve yüksek lipofilik özelliğinden dolayı tüm biyolojik membranlardan geçebilme kapasitesine sahiptir ve tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılmaktadır.



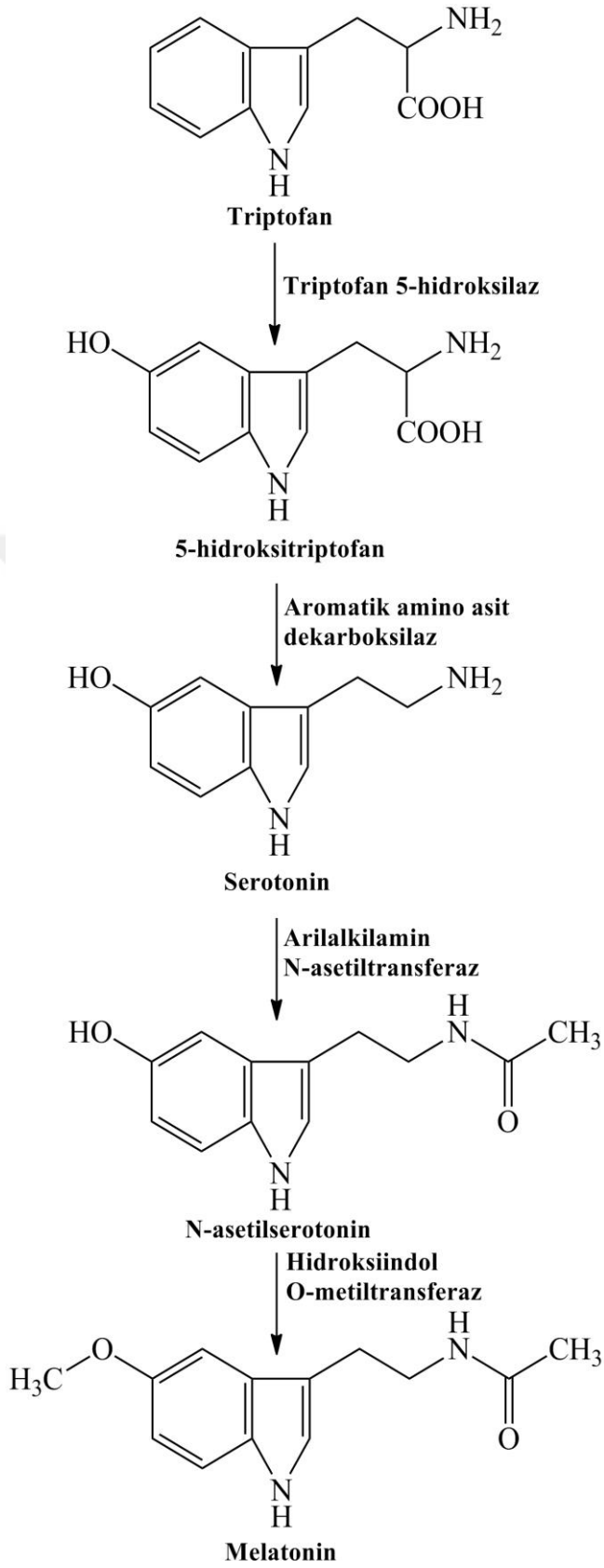
Şekil 13. Melatoninin molekül yapısı.



Şekil 14. Melatoninin sirkadyen ritm düzenlemedeki rolü (Şener, 2010).

İnsanda plazma MEL düzeyleri 24 saatlik periyotta düzenli olarak iniş çıkış gösterir. Plazma MEL düzeyi gece 20.00-23.00 yükselir ve 01.00-05.00 arası doruk değerlere ulaşır. Sağlıklı bireylerde plazma MEL düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece ise 20-200 pg/ml'dir. Bir günde üretilen MEL miktarı yaklaşık olarak 30 mg'dır ve büyük bir kısmı (%80'i) gece üretilir (Şener, 2010).

Melatonin sentezinin birinci basamağında pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından triptofanın N-asetil serotoninine dönüştürülmesi gerçekleşir. İkinci basamakta ise bir diğer pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz katalizörlüğünde N-asetilserotonin melatonine dönüştürülür. MEL pineal bezde üretildikten sonra burada depolanmaz, kapiler kana ve serebrospinal sıvı içerisine difüzenir. Bütün biyolojik membranlardan geçerek tüm dokulara dağılabilmesine rağmen, beyin dokusunda MEL düzeyi daha yüksektir (Tan ve ark., 2010).



Şekil 15. Melatonin sentezinin basamakları.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.

Kimyasal Adı	Firma
Formaldehit	Sigma
Melatonin	Sigma- Aldrich
Ksilen	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
HCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Sigma- Aldrich
EDTA	Sigma
o-dianizidin	Sigma- Aldrich
Sodyum azid	Sigma- Aldrich
Hekzadesiltrimetilamonyum bromür	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)	Sigma- Aldrich
Yüksek kaynama dereceli agaroz (HMA)	Sigma- Aldrich
RPMI	Sigma
Histopaque	Sigma
Sodyum klorür	Merck
Tris	Sigma
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma- Aldrich
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma- Aldrich
5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma- Aldrich
Fosfat tamponu (PBS)	Sigma

5.2. Deneysel Çalışma

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.03.2015 tarihli ve 19.2015.mar No'lu onay belgesi alınarak gerçekleştirildi.

Çalışmada, eşit sayıda yetişkin erkek ve dişi Wistar albino sıçanlar (250-300 g) kullanıldı ve sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edildi. Sıçanlar, deney öncesi iki haftalık sürede laboratuvar koşullarına alıştırdı (12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve 20°C±2). Sıçanlar, standart yem ve çeşme suyu (*ad libitum*) ile beslendi.

5.2.1. Deney Grupları

Çalışmada rastgele seçilen 48 sıçan, her biri 8 sıçandan (4 erkek, 4 dişi) oluşan toplam 6 gruba ayrıldı.

Kontrol (K) grubu: Bu gruptaki sıçanlar formaldehit maruziyeti olmadan benzer kafeslerde 6 hafta boyunca takip edildi.

Melatonin (MEL) grubu: Bu gruptaki sıçanlara 6 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozunda MEL intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Formaldehit inhalasyon (FA-inh) grubu: Bu gruptaki sıçanlara 6 hafta boyunca (6 ppm) formaldehit 8 saat/gün (09:00-17:00) uygulaması yapıldı.

Formaldehit+Melatonin (FA-inh+MEL) grubu: Bu gruptaki sıçanlara 6 hafta boyunca (6 ppm) formaldehit 8 saat/gün (09:00-17:00) uygulaması ve 10 mg/kg dozunda MEL i.p. olarak uygulandı.

Formaldehit intraperitoneal (FA-ip) grubu: Bu gruptaki sıçanlara 14 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda formaldehit i.p. olarak uygulandı.

Formaldehit+Melatonin (FA-ip+MEL) grubu: Bu gruptaki sıçanlara 14 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda i.p. formaldehit uygulamasını takiben MEL uygulaması yapıldı.

5.2.2. Formaldehit İnhalasyon Düzenegi

Formaldehit inhalasyonu Valentine ve Kennedy (2001) tarafından açıklandığı şekilde özel olarak üretilen kabin (Cabinet 1000, Zenon Diagnostic, İstanbul, Türkiye) kullanıldı (Resim 1). Sıçanlar 6 hafta boyunca, günde 8 saat (09:00-17:00) ve 6 ppm dozunda FA'ya maruz bırakıldı. Kabin içi FA konsantrasyonunun istenilen dozda ayarlanabilmesi için MultiRae Lite (RAE Systems, San Jose, CA, USA) gaz dedektörü kullanıldı. Çalışma sırasında kabin içi sıcaklık, nem ve hava akış hızı sırasıyla $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, % 45-55 ve $1,65\pm 0,15$ m³/s olacak şekilde ayarlandı. Çevreye FA salınımı ve istenmeyen maruziyetlerin önüne geçmek için kabinin hava çıkış kısmında aktif kömür içeren çift karbon filtre kullanıldı.



Resim 1. Formaldehit maruziyet kabini.

5.2.3. Deneylerin Sonlandırılması ve Örneklerinin Toplanması

Deney gruplarında yer alan sıçanlar yukarıda açıklandığı şekilde ilgili uygulama süreleri sonunda giyotinle dekapite edilerek çalışma sonlandırıldı. Kan ve doku örnekleri (akciğer, karaciğer ve böbrek) toplandı. Kan örnekleri ikiye ayrılarak, ilk kısımda taze kan ile comet tekniği çalışıldı. İkinci kısımdan ise kan plazma örnekleri

ayrılarak 8-OHdG ölçümleri yapılana kadar -80°C’de saklandı. Doku örnekleri ise biyokimyasal parametreler çalışılana kadar -20°C’de saklandı. Işık mikroskobu çalışmaları için ise %10 nötral tamponlu formaline alındı.

5.3. Kan Örneklerinde DNA Hasarının İncelenmesi

5.3.1. Comet Tekniği ile DNA Hasarının Belirlenmesi

Stok Lizis çözeltisi: 2,5 M NaCl (146,4 g), 100 mM EDTA (37,2 g) ve 10 mM Tris (1,2 g) 1000 ml distile su ile çözeltisi hazırlandı (pH 10).

Lizis çözeltisi için 89 ml stok lizis çözeltisi, 1 ml Triton X-100 ve 10 ml DMSO karıştırıldı.

Nötralizasyon tamponu: 0,4 M Tris (48,5 g) 1000 ml distile su ile çözeltisi hazırlandı (pH 7,5).

Etidyum bromür (Et-Br): 10 mg Et-Br 50 ml distile suda çözülür. Boyama için hazırlanan bu stok çözeltiden 1:5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

Elektroforez tamponu: 37,5 ml 10 M NaOH ve 6,75 ml 0,1 M EDTA distile su ile 1250 ml’ye tamamlanarak hazırlandı (pH>13).

Alkali comet tekniği protokolü Singh ve ark.’nın yönteminden minör modifikasyonlarla uygulanmıştır (Singh ve ark., 1988).

Hücreler %0,65’lik LMA ile karıştırılarak her bir örnek için iki lam olacak şekilde önceden HMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve lamel ile kapatıldı. Sonrasında lamalar +4°C’de donmaya bırakıldı. Lameller dikkatlice uzaklaştırılarak lamalar lizis çözeltisine alınarak (alüminyum folyo ile sarılı cam şalede) +4°C’de 1,5 saat bekletildi. Lizis işlemi tamamlanınca lamalar elektroforez tankına yerleştirildi. Güç kaynağı 300 mA ve 15 V’a ayarlanarak 20 dk. elektroforezde bırakıldı. Elektroforez sonrasında lamalar dikkatlice tanktan alınarak nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Lamalar cam şale içerisinde ve +4°C’de 3x5 dk. olacak şekilde nötralizasyon özeltisinden geçirildi. Son olarak lamalar, her birinde 5 dk. tutularak, sırasıyla %50, 75 ve absolü alkol ile fikse edilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta kurumaya bırakıldı.

Görüntü analizi için her bir lam, önceden hazırlanan, 20 µL Et-Br ile boyandı. Her bir lamdan rastgele 50 (gruptaki her bir sıçan için toplam 100) lenfosit seçilerek X40 büyütme, 546 nm eksitasyon filtreli ve 590 nm bariyer filtreli kamera ataçmanlı floresan mikroskopu (Olympus, BX51) ile incelendi. Kamera ataçmanı ile çekilen görüntüler BAB Bs200Pro görüntü analiz programı kullanılarak hasar durumları değerlendirildi ve sonuçlar kuyruktaki DNA yüzdesi, %DNA_T, olarak verildi.

5.3.2. Plazma 8-OHdG Düzeylerinin Ölçümü

Plazma 8-OHdG düzeyleri ELISA kiti (Katalog No: CEA660Ge, Wuhan USCN Business Co., Ltd., Houston, USA) ile ölçüldü. Yöntem, üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Yöntemin temeli 8-OHdG için spesifik bir antikora karşı biyotin işaretli 8-OHdG ile işaretli 8-OHdG (örnek ve standart) arasındaki yarışmalı inhibisyona dayanmaktadır. 5 farklı konsantrasyonda standart ve örnekler ilgili kuyucuklara eklenerek 37°C'de inkübe edildi. Renk değişimi reaksiyonunu takiben 450 nm'de mikropilaya okuyucu (ELx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) ile absorban ölçüldü. Plazma 8-OHdG düzeyleri pg/ml olarak ifade edildi.

5.4. Dokularda Biyokimyasal İncelemeler

5.4.1. Malondialdehit ve Glutasyon Ölçümleri

250-300 mg tartılan dokuların üzerine 10 katı hacimde %10 triklorasetik asit (TCA) eklenerek homojenize edilerek santrifüjlendi (3000 rpm, 15 dk.). Süpernatantlar alınarak eşit hacimde %0,67 tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de 20 dk. kaynatıldı. Süre sonunda tüpler soğutularak spektrofotometrede 532nm'de ölçümler yapıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak ifade edildi (Yagi, 1984). Dokularda GSH düzeylerinin belirlenmesi için Ellman ayırıcı kullanıldı. Süpernatantların üzerine 0,3 M Na₂HPO₄ ile ditiyobis nitro benzoik asit içeren Ellman ayırıcı ilave edildi. Karanlıkta 15 dk. inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 412 nm'de ölçülerek sonuçlar µmol/ g doku olarak ifade edildi (Boyer ve Ellman, 1972).

5.4.2. Myeloperoksidaz Aktivitesi Tayini

Yöntemde kullanılan çözeltiler:

Çözelti I: % 0,5 HETAB; 50 mM K₂HPO₄ içerisinde hazırlandı.

Çözelti II: % 0,5 HETAB; 10 mM EDTA ve 50 mM K₂HPO₄ içerisinde hazırlandı.

Çözelti III: 50 mM K₂HPO₄ solüsyonu hazırlandı.

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MPO aktivitesi tayini için spektrofotometrik yöntem kullanıldı (Hillegas ve ark., 1990). 0,25-0,30 g doku örneği ağırlığının 10 katı kadar (%w/v) çözelti I içerisinde buzda homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 1,5 ml alınarak +4°C'de 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar atılarak üzerine 1,5 ml çözelti II eklendi ve vorteksenerek buz içerisinde bekletildi. İçerisinde 2900 µl çözelti III bulunan 37°C'deki tüplere 30 µl o-dianizidin ve 60 µl H₂O₂ ilave edildi. Üst fazdan 50 µl örnek alınarak tüplere eklendi. 3 dakika sonra reaksiyonu durdurmak için %2'lik sodyum azid eklendi ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Sonuçlar U/g doku olarak ifade edildi.

5.4.3. Kemilüminesans Ölçümleri (luminol, lusigenin ve NO)

Kemilüminesans ölçümleri luminol ve lusigenin problemleri kullanılarak luminometre (EG&G Berthold Junior LB 9509, Bad Widbad, Almanya) ile yapıldı ve sonuçlar rölatif ışık birimi (**r**elative **l**ight **u**nit-rlu) olarak ifade edildi. 10-30 mg'lık dokular kesilerek 2 ml PBS+HEPES (0,50 M fosfat tamponlu salin ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine alındı.

Luminol aracılı ölçüm ile hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksil radikalleri tespit edilirken, lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali tespit edilir. 0,2 M luminol veya lusigenin eklenen sayım tüpleri luminometrede 1 dk.'lık aralıklarla ve 5 dk. süre ile okutularak ölçümler alındı. Elde edilen ölçümler zamana karşı grafiğe geçirilerek 'eğri altı alan' hesaplandı ve AUC rlu/g doku olarak ifade edildi.

Nitrik oksit ölçümleri için saflaştırılmış luminol-hidrojen peroksit sistemi kullanıldı. Sayım tüpüne alınan dokuların üzerine sırasıyla 0,4 mM K₂CO₃, 60 µM

desferal, 4 mM H₂O₂ ve 3,6 µM saflaştırılmış luminol ilave edilerek luminometre ile sayım yapıldı (Kikuchi ve ark., 1993).

Kemiluminesans ölçümlerinin değerlendirilmesinde kullanılan 'eğri altı alan' (Area Under Curve, AUC) hesaplaması, luminometre ile elde edilen sayımların zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile yapılır. Elde edilen grafikten ölçüm noktalarının integrali alınarak AUC değeri hesaplanmaktadır (Kikuchi ve ark., 1993; Davies ve ark., 1992; Haklar ve ark., 2002). Alan hesaplamada kullanılan formül aşağıda yer almaktadır.

$$\text{Alan} = \Delta t [(y_1/2) + y_2 + y_3 + y_{n-1} + (y_n/2)]$$

Δt : Zaman aralığı.

n: Ölçüm noktası sayısı.

y_1, y_2, \dots, y_n : Ölçümleri ifade eder.

5.5. Işık Mikroskobu İncelemeleri

Işık mikroskobu çalışmaları için dokular sıçanlar dekapite edildikten sonra %10 nötral tamponlu formalinle fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular takip işlemine alındı.

Doku takip işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

- %70 etanol, 1 gece;
- 2x %96 etanol, 30 dk.;
- 2x Absolü etanol, 30 dk.;
- 2x Ksilen, 20 dk.;
- 2x Parafin, 2 saat.

Takip işlemi bitiminde dokular doku gömme merkezinde (Mikrom AP280) parafin blok haline getirildi. Rotari mikrotomda (Leica RM2125 RTS) parafin bloklardan 3 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı. Kesitlere rutin Hematoksilen ve Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Gomori'nin tek aşamalı trikrom (GT) boyaarı uygulandı (Wang ve ark., 2013). Ayrıca akciğer dokusu kesitlerinde apoptozisi incelemek amacıyla terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) yöntemi uygulandı (Miyaji ve ark., 2001).

5.5.1. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

- Lamlara alınan kesitler etüvde 60°C'de 1 saat bekletildi.
- Lamlar iki ayrı ksilende 10'ar *dk.* bekletilerek deparafinize edildi.
- Sırasıyla %96, 80 ve 70'lik etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek hidrate edildi.
- Akan su altında yıkama yapıldı.
- Gill Hematoksilen'de 3 *dk.* bekletildi.
- Akan su altında 5 *dk.* yıkanarak nükleuslar morartıldı.
- %1'lik sulu Eozin'de 30 saniye bekletildi.
- Akan su altında yıkandı.
- Sırasıyla %70, 80 ve 96'lık etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek dehidrate edildi.
- Lamlar kurumaya bırakıldı ve kapama maddesi ile kapatıldı.

5.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyaması

- Lamlara alınan kesitler etüvde 60°C'de 1 saat bekletildi.
- Lamlar iki ayrı ksilende 10'ar *dk.* bekletilerek deparafinize edildi.
- Sırasıyla %96, 80 ve 70'lik etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek hidrate edildi.
- Distile sudan geçirildi.
- %0,5'lik Periyodik asitte 5 *dk.* bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Schiff belirtecinde 15 *dk.* bekletildi.
- Akan su altında 10 *dk.* yıkandı.
- Mayer Hematoksilende 5 *dk.* bekletildi.
- Akan su altında yıkandı.
- Sırasıyla %70, 80 ve 96'lık etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek dehidrate edildi.
- Lamlar kurumaya bırakıldı ve kapama maddesi ile kapatıldı.

5.5.3. Gomori'nin Tek Aşamalı Trikrom (GT) Boyaması

- Lamlara alınan kesitler etüvde 60°C'de 1 saat bekletildi.
- Lamlar iki ayrı ksilende 10'ar *dk.* bekletilerek deparafinize edildi.

- Sırasıyla %96, 80 ve 70'lik etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek hidrate edildi.
- Distile sudan geçirildi.
- Kesitler Bouin's solüsyonunda 56°C'de 1 saat bekletildi.
- Sarı renk gidene kadar musluk suyu altında yıkandı.
- Weigert Hematoksilen'de 10 *dk.* bekletildi.
- Musluk suyu altında 10 *dk.* yıkandı.
- Gomori One Step Trikrom solüsyonunda 20 *dk.* bekletildi.
- %0,5'lik asitik asit ile hızla diferansiye edildi.
- Distile sudan geçirildi.
- Sırasıyla %70, 80 ve 96'lık etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek dehidrate edildi.
- Lamlar kurumaya bırakıldı ve kapama maddesi ile kapatıldı.

5.5.4. Akciğer Dokusunda TUNEL Yöntemi (Apoptozis)

Akciğer dokusunda apoptozisin araştırılması için TUNEL yöntemi kullanıldı. Yöntem, Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (S7101, Millipore, MA, USA) ile çalışıldı.

Parafine gömülü akciğer dokularından mikrotomda 3 µm kalınlığında kesitler alınarak 37°C'de 1 gece deparafinize edildi. Ksilen ve alkol serilerinden geçirilen kesitler hidrate edildi. Sonrasında Proteinaz K (20 µg/ml) ile oda sıcaklığında 15 *dk.* inkübasyona bırakıldı. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H₂O₂ (PBS içinde, pH 7,4) ile 5 *dk.* süreyle baskılandı. Kesitler PBS ile yıkandı, önce oda ısısında dengeleme tamponunda 30 *dk.*, sonra terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi damlatılarak 37°C'de 60 *dk.* inkübasyona bırakıldı. Ardından lamlar yıkama tampon çözeltisi ile 10 *dk.* çalkalanarak yıkandı. Kesitlere antidigoksinin konjugatı uygulanarak oda ısısında 30 *dk.* inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler PBS ile yıkanarak DAB damlatıldı ve 5 *dk.* bekletildi. Distile su ile yıkama sonrası kesitlere Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Alkol serilerinden geçirilen kesitler dehidrate edilen kesitler kapatıldı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

5.6. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel analizleri için Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Grup verilerinin karşılaştırılmasında tek-yönlü varyans analizini (one-way ANOVA) takiben Tukey's çoklu karşılaştırma testi uygulandı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



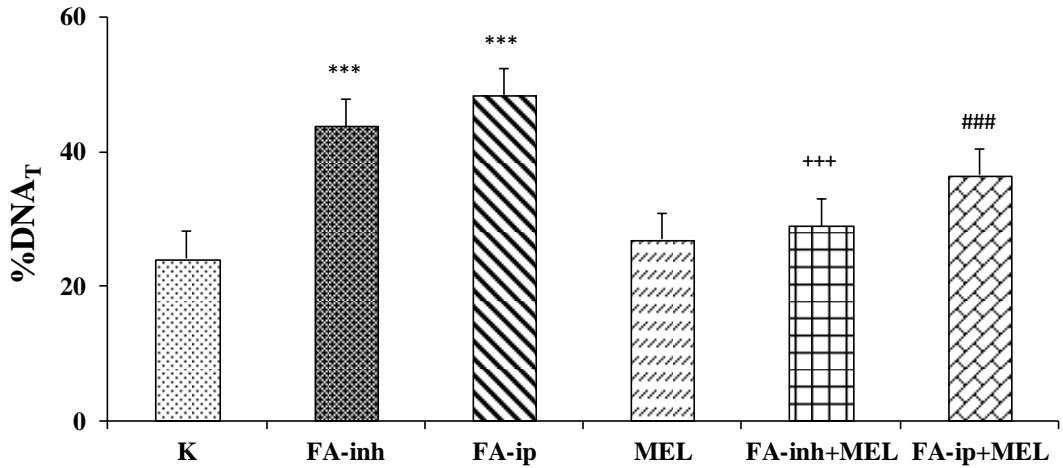
6. BULGULAR

6.1. DNA Üzerine Etkilerin İncelenmesi

Sıçanlarda FA maruziyetine bağlı olarak oluşan DNA hasarının incelenmesi amacıyla plazma örneklerinde 8-OHdG düzeyleri ölçümü ve lenfositlerle comet tekniği uygulandı.

6.1.1. Comet Tekniği: %DNA_T Düzeyleri

Lenfosit hücrelerinin %DNA_T düzeylerinde, FA-inh (43,81±2,25) ve FA-ip (48,43±4,69) gruplarında K grubuna (24,13±2,01) göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001) bir artış tespit edildi (Şekil 16). FA maruziyetini takiben uygulanan MEL tedavisi sonrasında FA-inh+MEL grubunda %DNA_T düzeylerinde, FA-inh grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (28,96±1,78, p<0,001) bir düşüş görüldü. Benzer şekilde FA-ip grubuna kıyasla FA-ip+MEL grubunda da %DNA_T düzeylerinde anlamlı (36,52± 1,61, p<0,001) bir düşüş görüldü (Şekil 16).

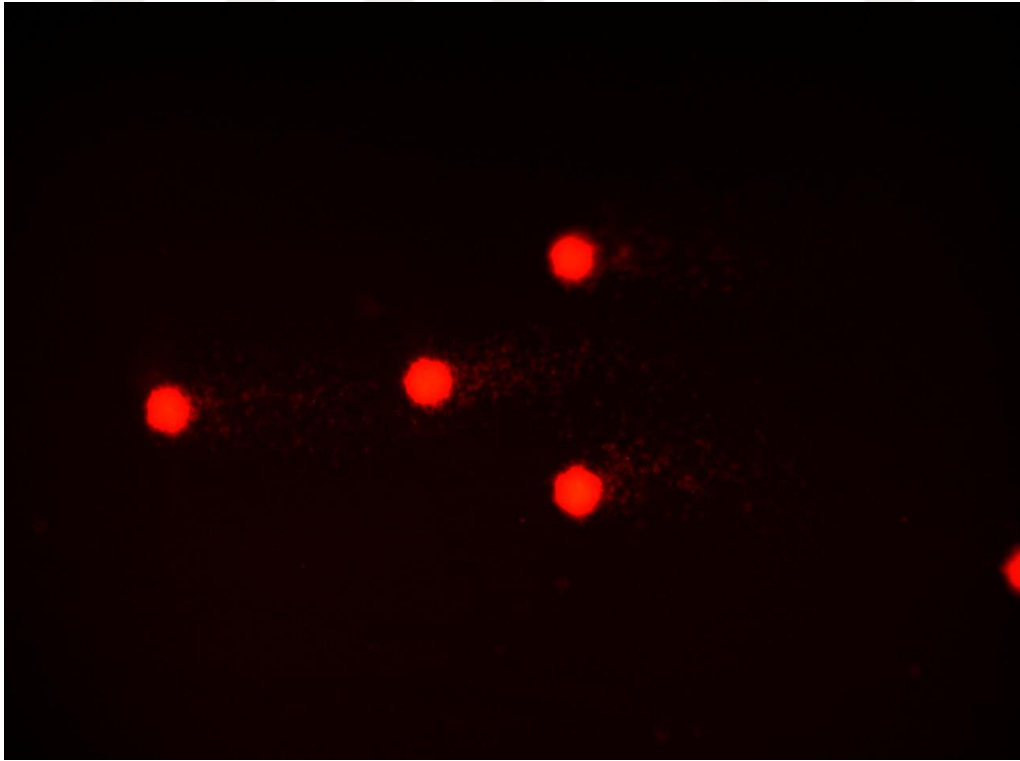


Şekil 16. Sıçanlardan elde edilen lenfosit hücrelerinde %DNA_T sonuçları.

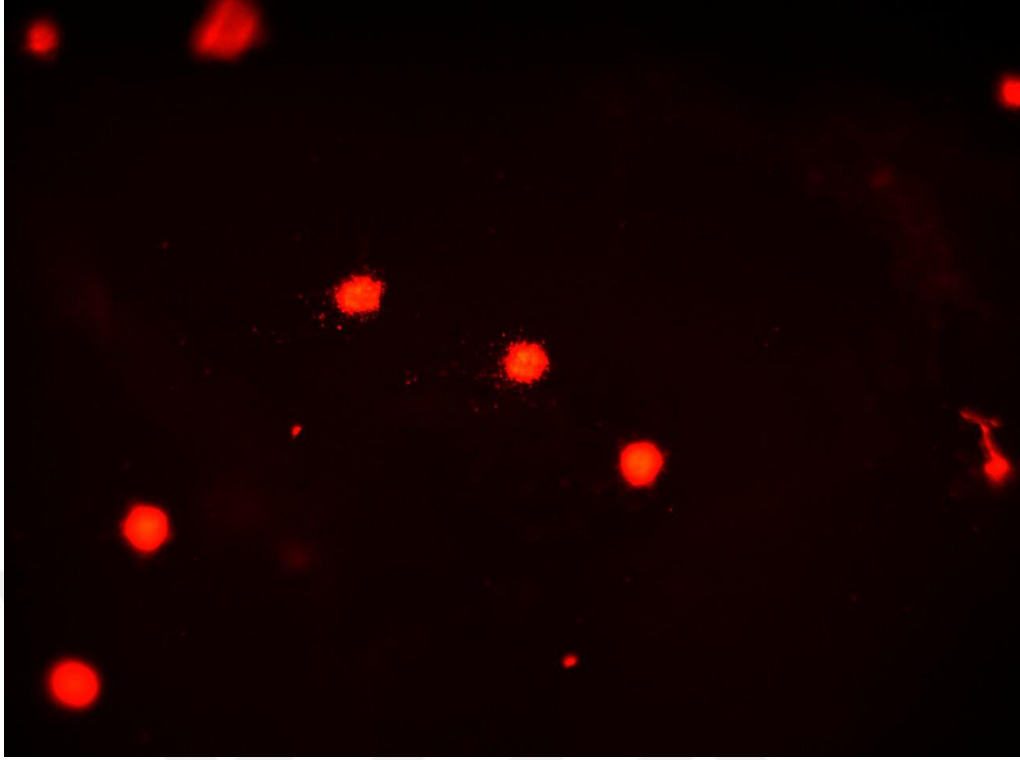
***p<0,001 K grubuna; +++p<0,001 FA-inh grubuna; ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.



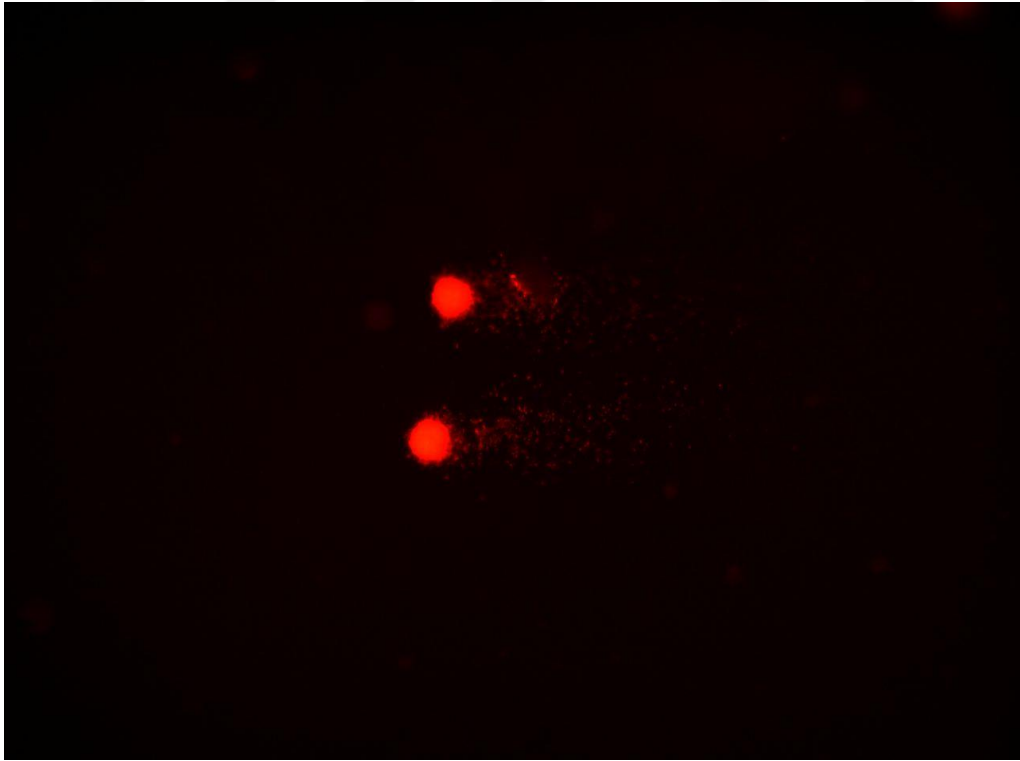
Resim 2. Kontrol grubunda comet görünümü.



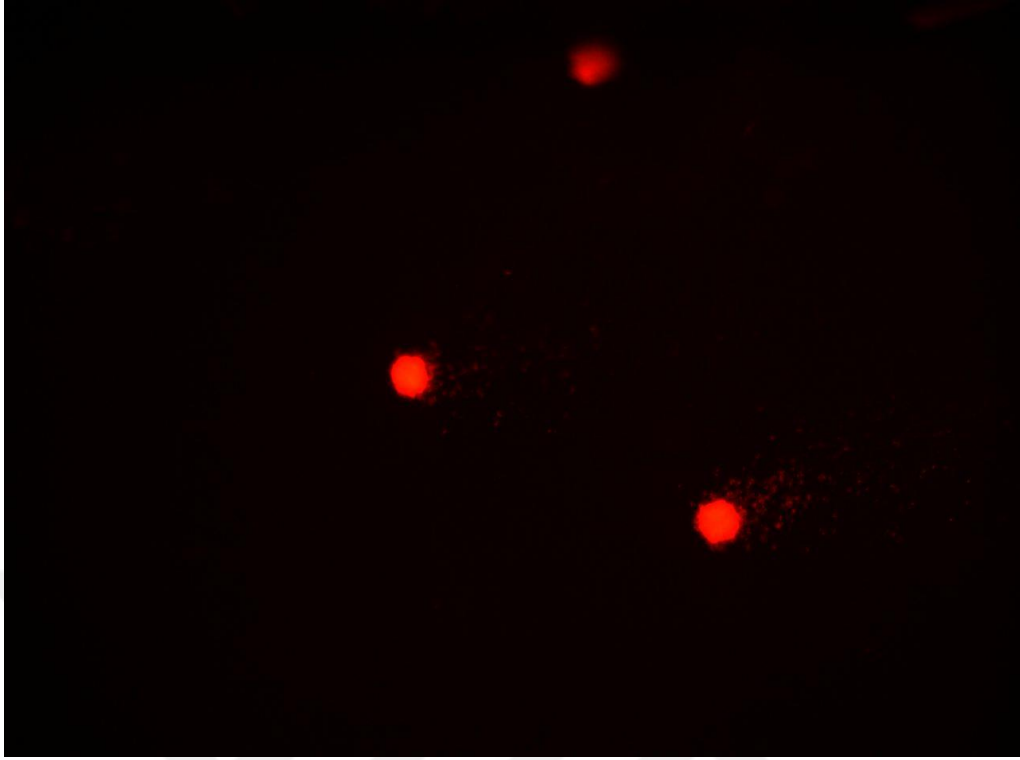
Resim 3. FA-inh grubunda comet görünümü.



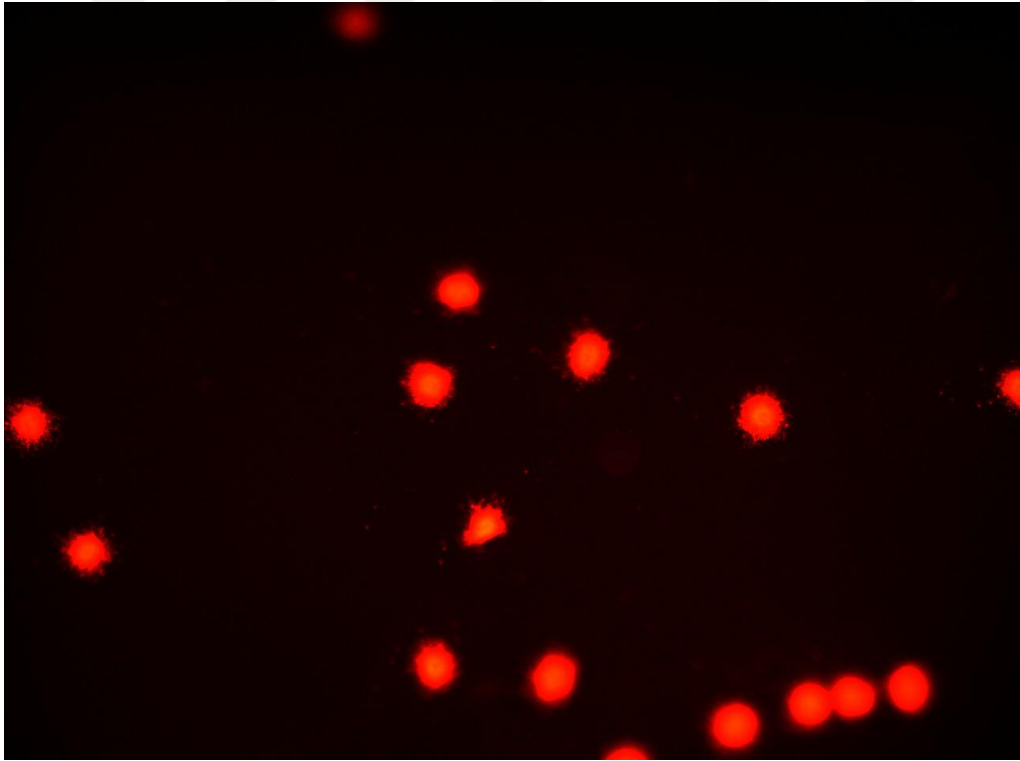
Resim 4. FA-inh+MEL grubunda comet görünümü.



Resim 5. FA-ip grubunda comet görünümü.



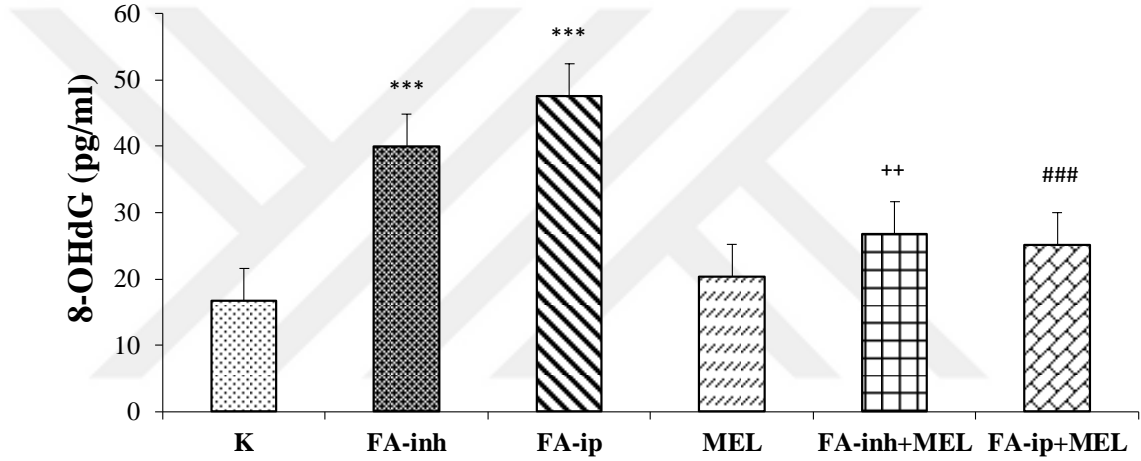
Resim 6. FA-ip+MEL grubunda comet görünümü.



Resim 7. MEL grubunda comet görünümü.

6.1.2. Plazma 8-OHdG Düzeyleri

Plazma 8-OHdG düzeyleri K grubunda $16,63 \pm 1,01$ pg/ml bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında sırasıyla $40 \pm 1,61$ pg/ml ve $47,60 \pm 2,38$ pg/ml olarak bulundu ve K grubuna göre istatistiksel anlam taşıdığı görüldü ($p < 0,001$). FA-inh+MEL grubunda 8-OHdG düzeyleri $26,75 \pm 1,40$ pg/ml olarak ölçüldü ve FA-inh grubuna göre istatistiksel anlamlı bir düşüş olduğu görüldü ($p < 0,01$). FA-ip+MEL grubunda ise yine benzer şekilde FA-ip grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 17).



Şekil 17. Tüm gruplara ait plazma 8-OHdG düzeyleri.

*** $p < 0,001$ K grubuna +++ $p < 0,001$ FA-inh grubuna; ### $p < 0,001$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

6.2. Dokularda Biyokimyasal Bulgular

Sıçanlara inhalasyon ve i.p. yolla uygulanan FA maruziyeti ve takiben uygulanan MEL tedavisi sonucunda akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında biyokimyasal parametrelerde (MDA ve GSH düzeyleri, MPO aktivitesi, luminol, lusigenin ve NO düzeyleri) meydana gelen değişiklikler istatistiksel olarak değerlendirilerek tablo ve şekillerle sunulmuştur.

Tablo 5. Sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve GSH düzeyleri ve MPO aktivitesi ölçüm sonuçları.

Doku	Gruplar	MDA (nmol/g doku)	GSH (μ mol/g doku)	MPO (U/g doku)
AC	K	7,14 \pm 0,89	4,81 \pm 0,99	0,35 \pm 0,06
	FA-inh	13,33 \pm 1,49 ^{***}	2,13 \pm 0,52 ^{***}	0,79 \pm 0,22 ^{***}
	FA-ip	8,8 \pm 0,67 [*]	3,42 \pm 0,22 ^{***}	0,52 \pm 0,13 [*]
	MEL	6,91 \pm 0,73	4,91 \pm 0,35	0,29 \pm 0,07
	FA-inh+MEL	8,21 \pm 0,55 ⁺⁺⁺	4,12 \pm 0,40 ⁺⁺⁺	0,37 \pm 0,08 ⁺⁺⁺
	FA-ip+MEL	7,39 \pm 0,50 [#]	4,02 \pm 0,50	0,41 \pm 0,08
KC	K	11,31 \pm 1,01	6,57 \pm 0,60	0,22 \pm 0,07
	FA-inh	15,33 \pm 1,32 ^{***}	2,42 \pm 0,90 ^{***}	0,41 \pm 0,15 ^{**}
	FA-ip	19,58 \pm 1,85 ^{***}	3,17 \pm 0,48 ^{***}	0,53 \pm 0,12 ^{***}
	MEL	12,66 \pm 1,06	6,28 \pm 0,97	0,26 \pm 0,08
	FA-inh+MEL	12,83 \pm 0,89 ⁺⁺	5,56 \pm 0,69 ⁺⁺⁺	0,30 \pm 0,06 ⁺
	FA-ip+MEL	12,52 \pm 1,55 ^{###}	5,4 \pm 1,05 ^{###}	0,31 \pm 0,05 ^{##}
B	K	15,90 \pm 3,20	4,70 \pm 0,39	0,18 \pm 0,03
	FA-inh	20,55 \pm 2,51 [*]	3,16 \pm 0,40 ^{***}	0,32 \pm 0,10 ^{***}
	FA-ip	24,09 \pm 2,91 ^{***}	3,35 \pm 0,30 ^{***}	0,38 \pm 0,04 ^{***}
	MEL	14,81 \pm 2,70	5,10 \pm 0,37	0,16 \pm 0,04
	FA-inh+MEL	16,94 \pm 2,48	4,26 \pm 0,33 ⁺⁺⁺	0,25 \pm 0,06
	FA-ip+MEL	17,95 \pm 2,27 ^{##}	4,02 \pm 0,57 [#]	0,24 \pm 0,06 ^{##}

AC: Akciğer, KC: Karaciğer, B: Böbrek

Sonuçlar mean \pm SD olarak ifade edilmiştir.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 K grubuna göre kıyasla; +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 FA-inh grubuna göre kıyasla; #p<0,05, ## p<0,01, ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyasla.

Tablo 6. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında kemilüminesans yöntemiyle luminol, lusigenin ve nitrik oksit düzeylerinin ölçüm sonuçları.

Doku	Gruplar	Luminol (rlu/ mg)	Lusigenin (rlu/mg)	NO (rlu/ mg)
AC	K	5,13±1,50	4,33±0,93	5,30±1,47
	FA-inh	13,44±2,76 ^{***}	36,70±11,18 ^{***}	234,50±82,22 ^{***}
	FA-ip	7,48±3,02	15,69±4,70 ^{***}	99,98±66,62 ^{**}
	MEL	3,94±0,79	4,08±0,96	4,78±0,94
	FA-inh+MEL	5,04±0,64 ⁺⁺⁺	6,52±2,47 ⁺⁺⁺	69,25±17,57 ⁺⁺⁺
	FA-ip+MEL	5,40±1,72	4,50±1,01 ^{###}	38,80±10,50
KC	K	3,25±1,05	3,61±1,08	3,88±1,04
	FA-inh	5,96±1,48 ^{***}	8,54±2,90 ^{***}	26,71±12,33 ^{***}
	FA-ip	5,60±1,05 ^{***}	8,68±1,76 ^{***}	35,28±15,90 ^{***}
	MEL	2,64±0,70	2,70±0,43	2,69±1,10
	FA-inh+MEL	2,98±0,63 ⁺⁺⁺	4,60±1,78 ⁺⁺⁺	11,68±7,24 ⁺
	FA-ip+MEL	2,93±0,56 ^{###}	3,88±1,48 ^{###}	14,37±4,52 ^{##}
B	K	4,01±1,29	3,81±1,14	4,44±1,47
	FA-inh	4,56±0,52	4,48±1,03	4,30±1,10
	FA-ip	5,63±2,04	15,47±8,16 ^{***}	38,58±7,24 ^{***}
	MEL	2,96±1,06	3,03±1,66	2,86±0,70
	FA-inh+MEL	5,36±2,26	3,53±1,33	3,75±0,88
	FA-ip+MEL	3,35±0,94	5,75±3,34 ^{###}	16,70±6,48 ^{###}

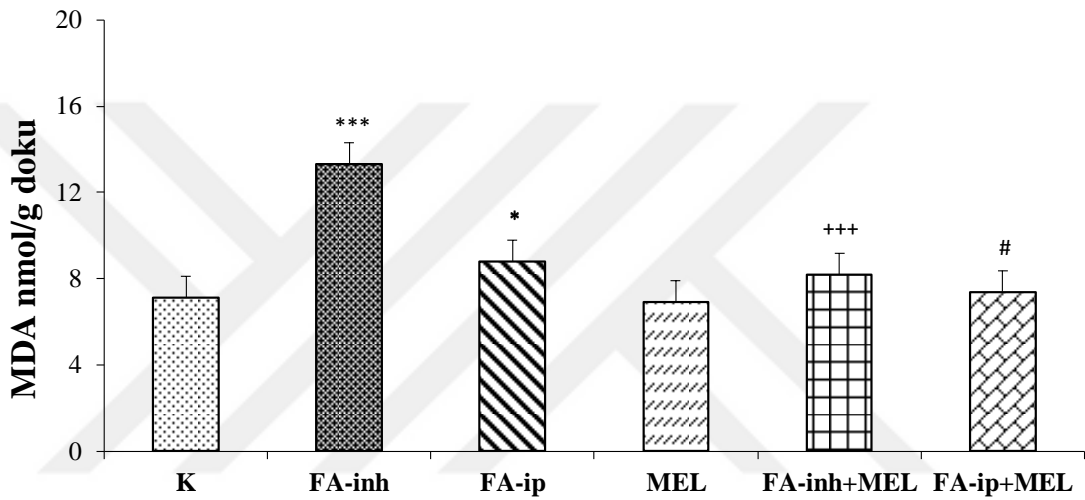
AC: Akciğer, KC: Karaciğer, B: Böbrek

Sonuçlar mean ± SD olarak ifade edilmiştir.

p<0,01, *p<0,001 K grubuna göre kıyasla; +p<0,05, +++p<0,001 FA-inh grubuna göre kıyasla; ##p<0,01, ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyasla.

6.2.1. Dokularda MDA Düzeyleri Bulguları

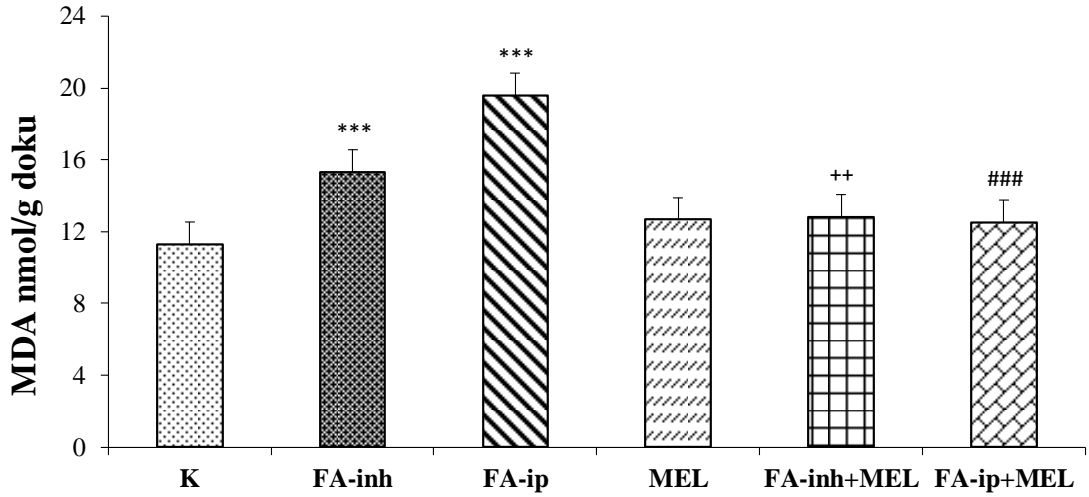
Akciğer dokusuna ait MDA düzeyleri Şekil 18’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama MDA değeri $7,14 \pm 0,89$ nmol/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $13,33 \pm 1,49$ ($p < 0,001$) ve $8,80 \pm 0,67$ ($p < 0,05$) olarak belirlendi. MEL verilen gruplarda MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p < 0,001$, FA-inh+MEL; $p < 0,05$, FA-ip+MEL).



Şekil 18. Sıçanların akciğer dokularında MDA düzeyleri.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ K grubuna; +++ $p < 0,001$ FA-inh grubuna; # $p < 0,05$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

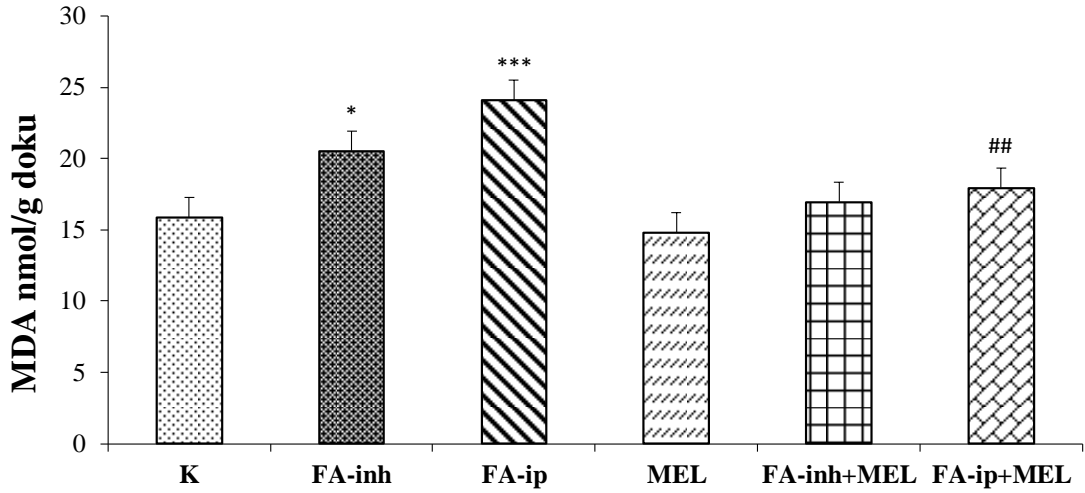
Karaciğer dokusuna ait MDA düzeyleri Şekil 19’da verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama MDA değeri $11,31 \pm 1,01$ nmol/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $15,33 \pm 1,32$ nmol/g doku ($p < 0,001$) ve $19,58 \pm 1,85$ nmol/g doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $12,83 \pm 0,89$ nmol/g doku ($p < 0,01$), FA-ip+MEL grubunda $12,52 \pm 1,55$ nmol/g doku ($p < 0,001$) olarak bulundu.



Şekil 19. Sıçanların karaciğer dokularında MDA düzeyleri.

***p <0,001 K grubuna; ++p< 0,01, +++p<0,001 FA-inh grubuna; ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokularında MDA düzeyleri Şekil 20’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama MDA değeri $15,90 \pm 3,20$ nmol/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $20,55 \pm 2,51$ nmol/g doku ($p < 0,05$) ve $24,09 \pm 2,91$ nmol/g doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi ile FA-inh+MEL grubunda ortalama MDA düzeyin anlamlı bir şekilde düşmediği görüldü ($p > 0,05$). FA-ip+MEL grubunda ise MEL’in ortalama MDA değerini anlamlı bir şekilde düşürdüğü görüldü ($17,95 \pm 2,27$ nmol/g doku, $p < 0,01$).



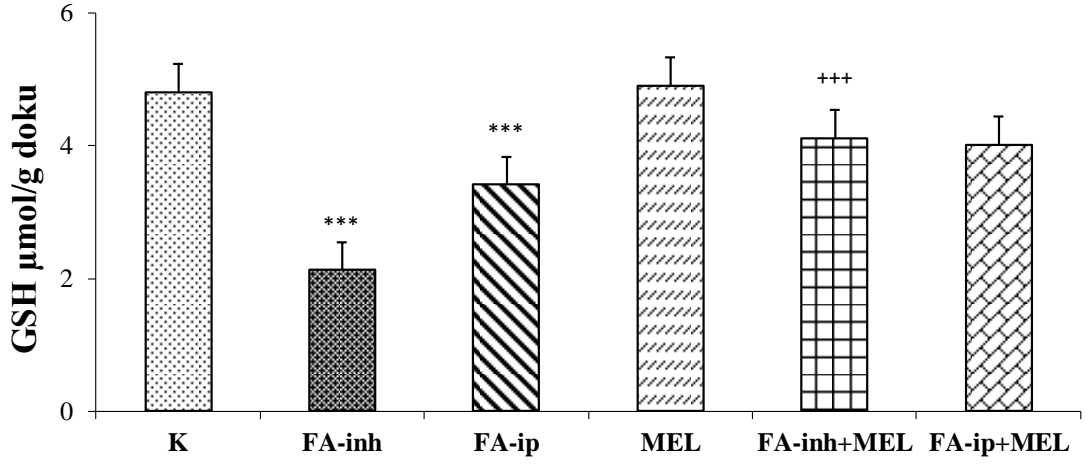
Şekil 20. Sıçanların böbrek dokularında MDA düzeyleri.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna; ## $p < 0,01$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

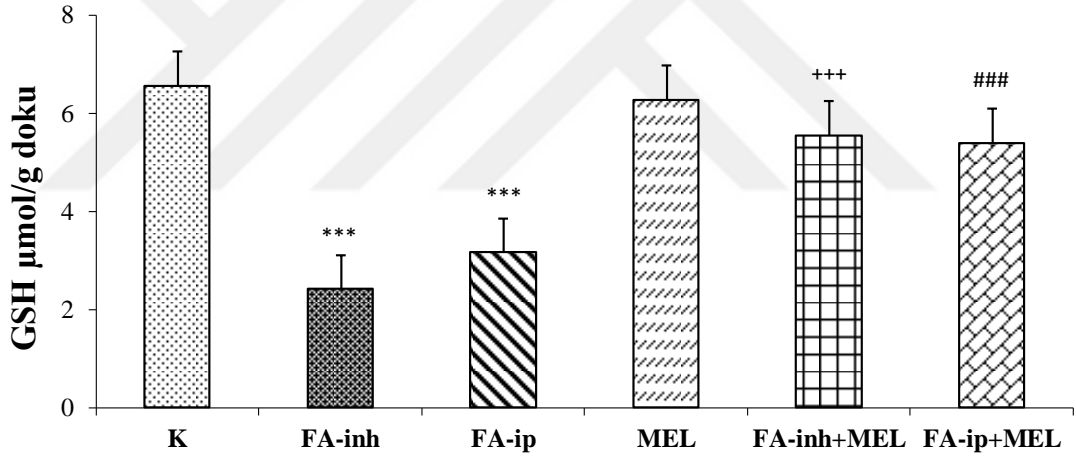
6.2.2. Dokularda GSH Düzeyleri Bulguları

Akciğer dokusuna ait GSH düzeyleri Şekil 21’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama GSH değeri $4,81 \pm 0,99$ $\mu\text{mol/g}$ doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstererek sırasıyla; $2,13 \pm 0,52$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) ve $3,42 \pm 0,22$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda; FA-inh+MEL grubunda GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı ($4,12 \pm 0,40$ $\mu\text{mol/g}$ doku, $p < 0,001$), FA-ip+MEL grubunda ise anlamlı bir değişme olmadığı ($p > 0,05$) görüldü.

Karaciğer dokusuna ait GSH düzeyleri Şekil 22’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama GSH değeri $6,57 \pm 0,60$ $\mu\text{mol/g}$ doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstererek sırasıyla; $2,42 \pm 0,90$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) ve $3,17 \pm 0,48$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı; FA-inh+MEL grubunda $5,56 \pm 0,69$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$), FA-ip+MEL grubunda $5,4 \pm 1,05$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) olarak bulundu.



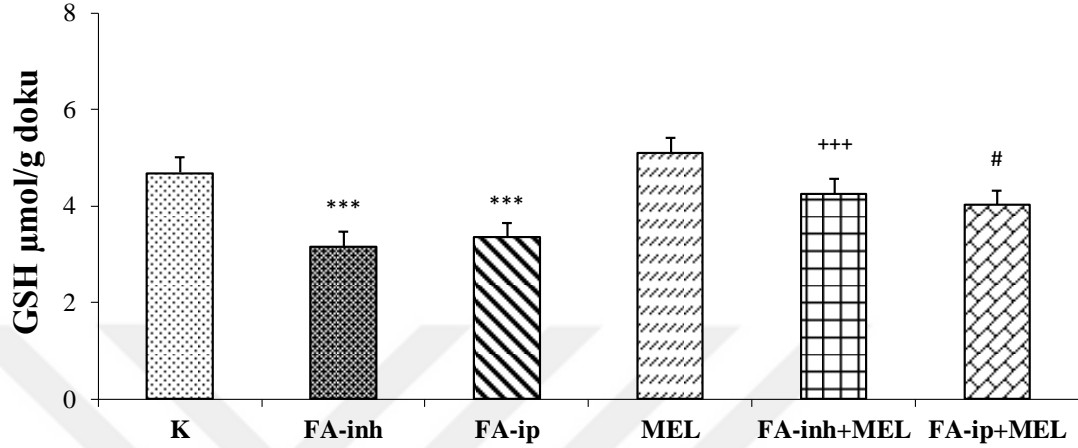
Şekil 21. Sıçanların akciğer dokularında GSH düzeyleri.
 *** $p < 0,001$ K grubuna; +++ $p < 0,001$ FA-inh grubuna göre kıyaslandığında.



Şekil 22. Sıçanların karaciğer dokularında GSH düzeyleri.
 *** $p < 0,001$ K grubuna; +++ $p < 0,001$ FA-inh grubuna; ### $p < 0,001$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokusuna ait GSH düzeyleri Şekil 23’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama GSH değeri $4,70 \pm 0,39$ $\mu\text{mol/g}$ doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstererek sırasıyla; $3,16 \pm 0,40$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) ve $3,35 \pm 0,30$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda GSH düzeylerinin

anlamli bir sekilde arttiğı; FA-inh+MEL grubunda $4,26\pm 0,33$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p<0,001$), FA-ip+MEL grubunda $4,02\pm 0,57$ $\mu\text{mol/g}$ doku ($p<0,05$) olarak bulundu.



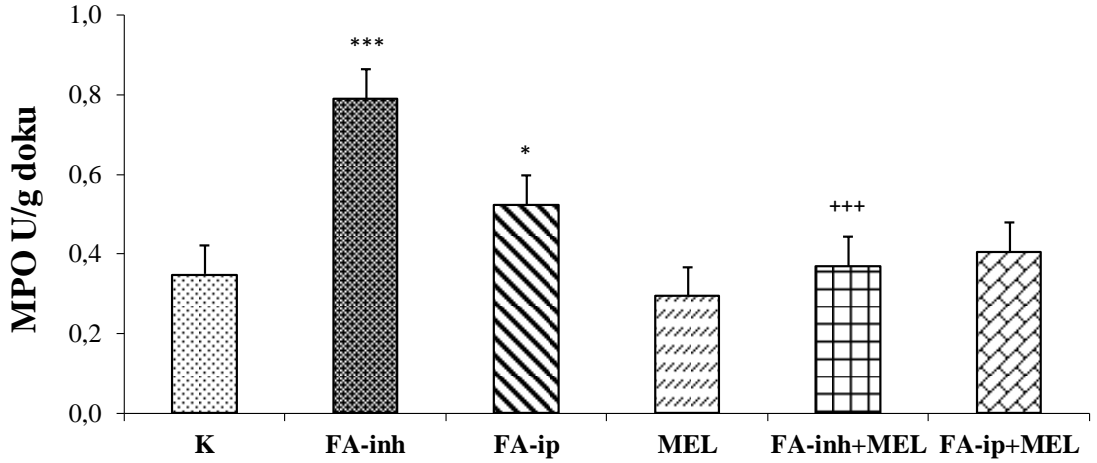
Şekil 23. Siçanların böbrek dokularında GSH düzeyleri.

*** $p<0,001$ K grubuna; +++ $p<0,001$ FA-inh grubuna; # $p<0,05$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

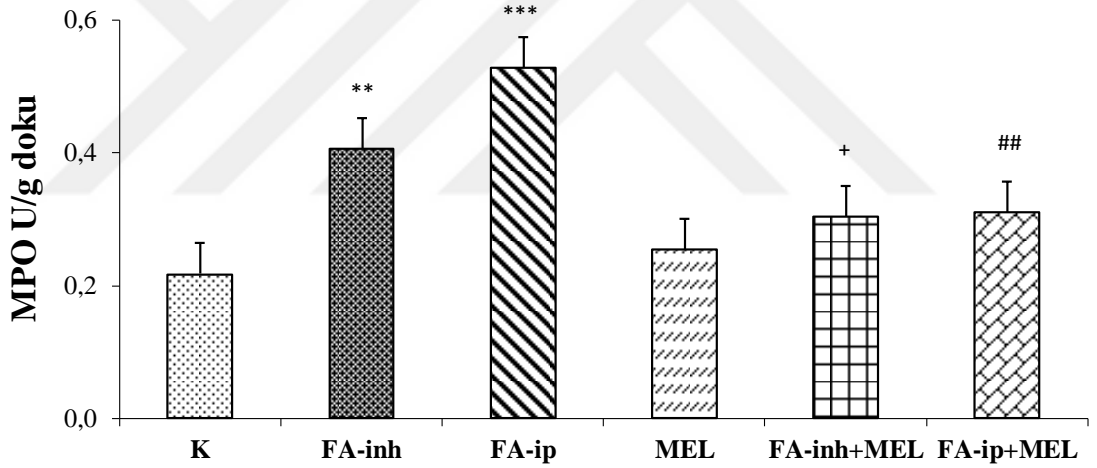
6.2.3. Dokularda MPO Aktivitesi Sonuçları

Akciğer dokusuna ait MPO aktivitesi sonuçları Şekil 24’de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama MPO aktivitesi $0,35\pm 0,06$ U/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MPO aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $0,79\pm 0,22$ U/g doku ($p<0,001$) ve $0,52\pm 0,13$ U/g doku ($p<0,05$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda; FA-inh+MEL grubunda MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde düştüğü ($0,37\pm 0,08$ U/g doku, $p<0,001$), FA-ip+MEL grubunda ise anlamlı bir değişme olmadığı ($p>0,05$) görüldü.

Karaciğer dokusunda MPO aktivitesi sonuçları Şekil 25’de verilmiştir. K grubunda ortalama MPO aktivitesi $0,22\pm 0,07$ U/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MPO aktivitesi K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $0,41\pm 0,15$ U/g doku ($p<0,01$) ve $0,53\pm 0,12$ U/g doku ($p<0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $0,30\pm 0,06$ U/g doku ($p<0,05$), FA-ip+MEL grubunda $0,31\pm 0,05$ U/g doku ($p<0,01$) olarak bulundu.



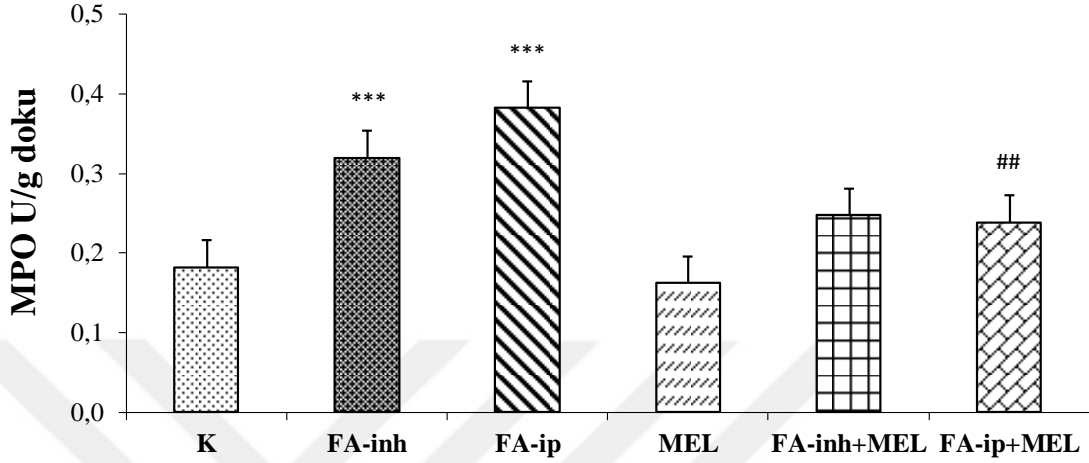
Şekil 24. Sıçanların akciğer dokularında MPO aktivitesi sonuçları.
* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ K grubuna; +++ $p < 0,001$ FA-inh grubuna göre kıyaslandığında.



Şekil 25. Sıçanların karaciğer dokularında MPO aktivitesi sonuçları.
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ K grubuna; + $p < 0,05$ FA-inh grubuna; ## $p < 0,01$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokusunda MPO aktivitesi sonuçları Şekil 26'da verilmiştir. K grubunda ortalama MPO aktivitesi $0,18 \pm 0,03$ U/g doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama MPO aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $0,32 \pm 0,10$ U/g doku ($p < 0,001$) ve $0,38 \pm 0,04$ U/g doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda; FA-ip+MEL

grubunda MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde düştüğü ($0,24 \pm 0,06$ U/g doku, $p < 0,01$), FA-inh+MEL grubunda ise anlamlı bir değişim olmadığı ($p > 0,05$) görüldü.

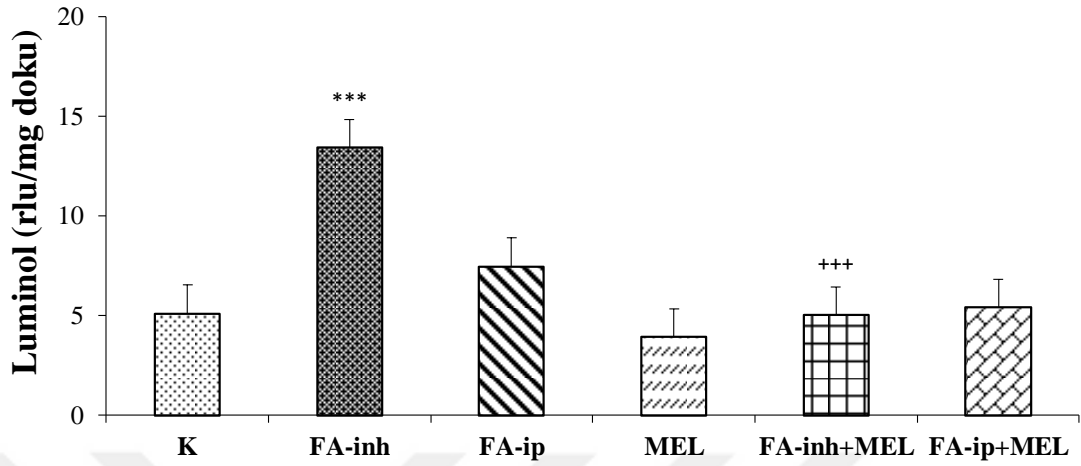


Şekil 26. Sıçanların böbrek dokularında MPO aktivitesi sonuçları.
*** $p < 0,001$ K grubuna; ## $p < 0,01$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

6.2.4. Dokularda Kemilüminesans Ölçüm Sonuçları

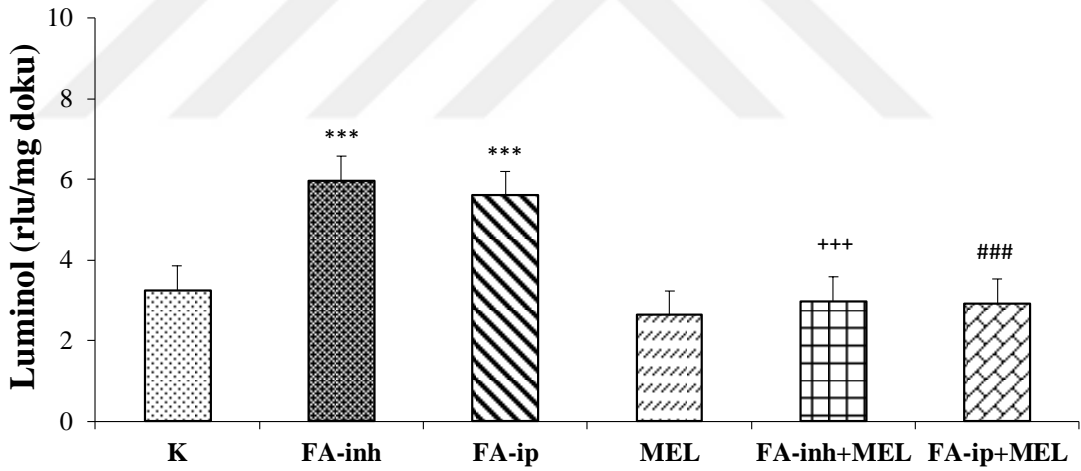
Akciğer dokusunda luminol seviyelerinin sonuçları Şekil 27’de verilmiştir. K grubunda ortalama luminol seviyesi $5,13 \pm 1,50$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh grubunda ortalama luminol seviyesi K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek $13,44 \pm 2,76$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi sonrası FA-inh+MEL grubunda ortalama luminol seviyesi anlamlı bir şekilde düşerek $5,04 \pm 0,64$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. FA-ip ve FA-ip+MEL gruplarının ortalama luminol seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($p > 0,05$).

Karaciğer dokusunda luminol seviyelerinin sonuçları Şekil 28’de verilmiştir. K grubunda ortalama luminol seviyesi $3,25 \pm 1,05$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama luminol seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla $5,96 \pm 1,48$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) ve $5,60 \pm 1,05$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda ortalama luminol seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $2,98 \pm 0,63$ rlu/mg doku ($p < 0,001$), FA-ip+MEL grubunda $2,93 \pm 0,56$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu.



Şekil 27. Sıçanların akciğer dokularında luminol seviyeleri.

***p<0,001 K grubuna; +++p<0,001 FA-inh grubuna göre kıyaslandığında.

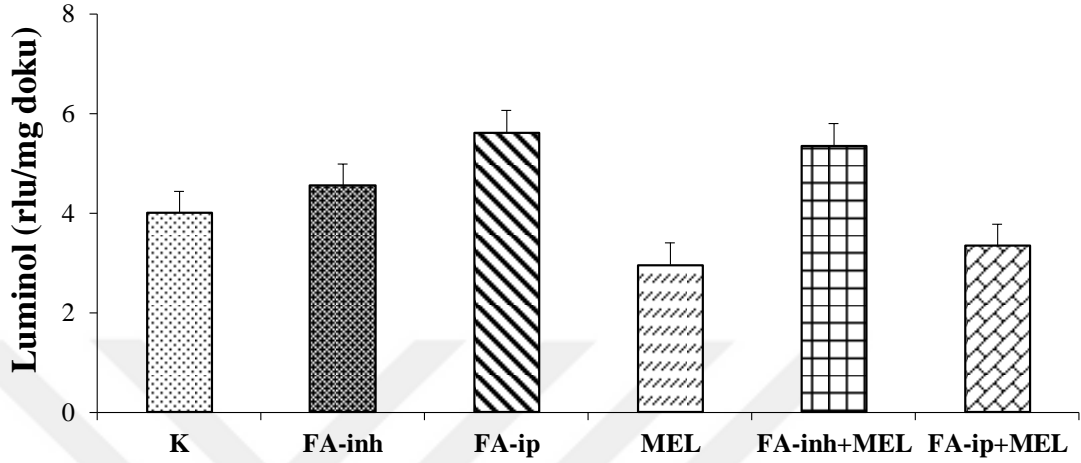


Şekil 28. Sıçanların karaciğer dokularında luminol seviyeleri.

***p<0,001 K grubuna; +++p<0,001 FA-inh grubuna; ###p<0,01 FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokusunda luminol seviyelerinin sonuçları Şekil 29'da verilmiştir. Ortalama luminol seviyeleri K grubunda $4,01 \pm 1,29$ rlu/mg doku; FA-inh grubunda $4,56 \pm 0,52$ rlu/mg doku; FA-ip grubunda $5,63 \pm 2,04$ rlu/mg doku; FA-inh+MEL grubunda $5,36 \pm 2,26$ rlu/mg doku; FA-ip+MEL grubunda $3,35 \pm 0,94$ rlu/mg doku

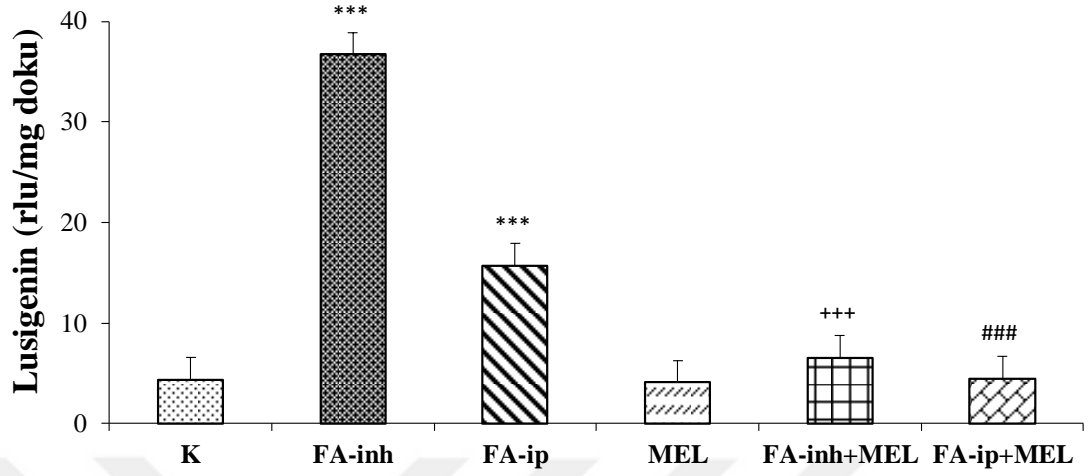
olarak bulundu. Ortalama luminol seviyelerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık taşımadığı görüldü ($p>0,05$).



Şekil 29. Sıçanların karaciğer dokularında luminol seviyeleri.

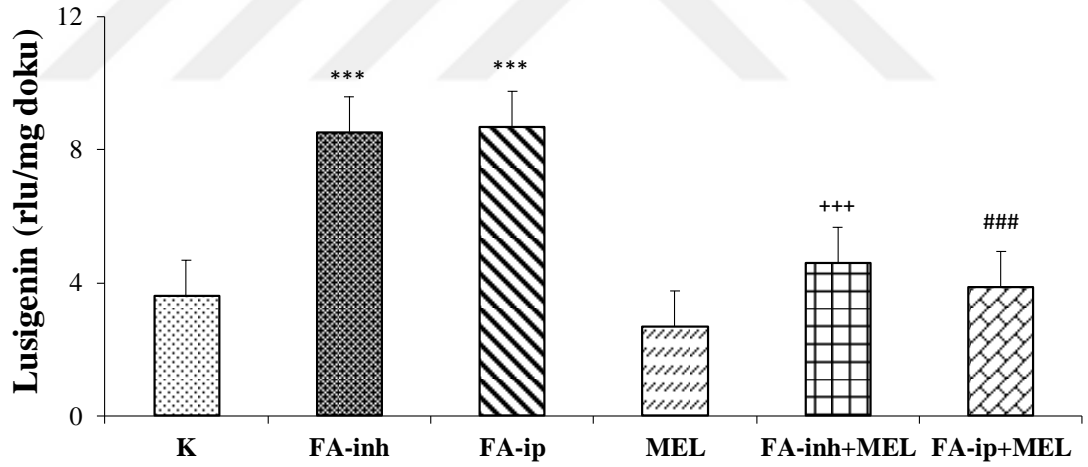
Akciğer dokusunda lusigenin seviyelerinin sonuçları Şekil 30'da verilmiştir. K grubunda ortalama lusigenin seviyesi $4,33\pm 0,93$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama lusigenin seviyeleri K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $36,70\pm 11,18$ rlu/mg doku ($p<0,001$) ve $15,69\pm 4,70$ rlu/mg doku ($p<0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda ortalama lusigenin seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $6,52\pm 2,47$ rlu/mg doku ($p<0,001$), FA-ip+MEL grubunda $4,50\pm 1,01$ rlu/mg doku ($p<0,001$) olarak bulundu.

Karaciğer dokusunda lusigenin seviyelerinin sonuçları Şekil 31'de verilmiştir. K grubunda ortalama lusigenin seviyesi $3,61\pm 1,08$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama lusigenin seviyeleri K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $8,54\pm 2,90$ rlu/mg doku ($p<0,001$) ve $8,68\pm 1,76$ rlu/mg doku ($p<0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda ortalama lusigenin seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $4,60\pm 1,78$ rlu/mg doku ($p<0,001$), FA-ip+MEL grubunda $3,88\pm 1,48$ rlu/mg doku ($p<0,001$) olarak bulundu.



Şekil 30. Sıçanların akciğer dokularında lusigenin seviyeleri.

***p<0,001 K grubuna; +++p<0,001 FA-inh grubuna; ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

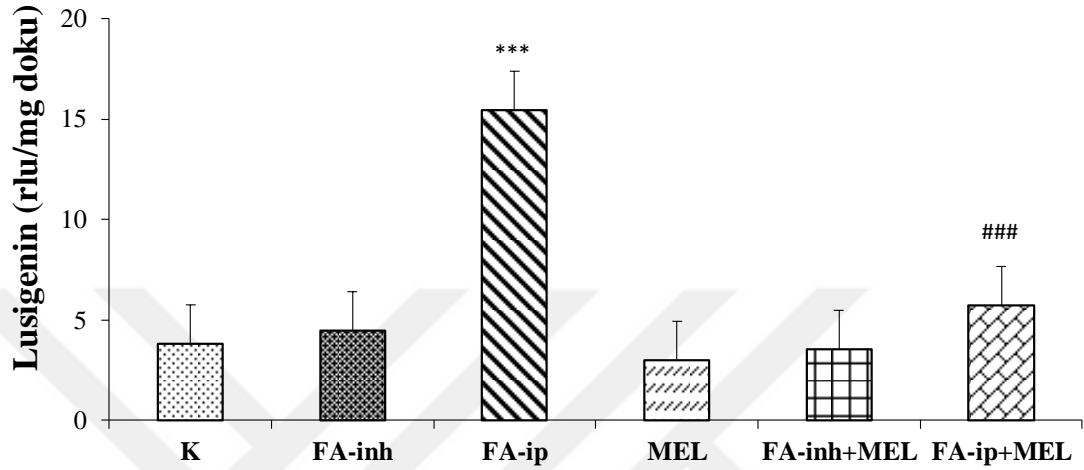


Şekil 31. Sıçanların karaciğer dokularında lusigenin seviyeleri.

***p<0,001 K grubuna; +++p<0,001 FA-inh grubuna; ###p<0,001 FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokusunda lusigenin seviyelerinin sonuçları Şekil 32’de verilmiştir. K grubunda ortalama lusigenin seviyesi 3,81±1,14 rlu/mg doku olarak bulundu. FA-ip grubunda ortalama lusigenin seviyesi K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek 15,47±8,16 rlu/mg doku (p<0,001) olarak bulundu. FA-inh grubunda K grubuna

kıyasla anlamlı bir fark görülmedi ($4,48 \pm 1,03$, $p > 0,05$). FA-ip+MEL grubunun ortalama lusigenin seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü ($5,75 \pm 3,34$ rlu/mg doku, $p < 0,001$) görüldü.

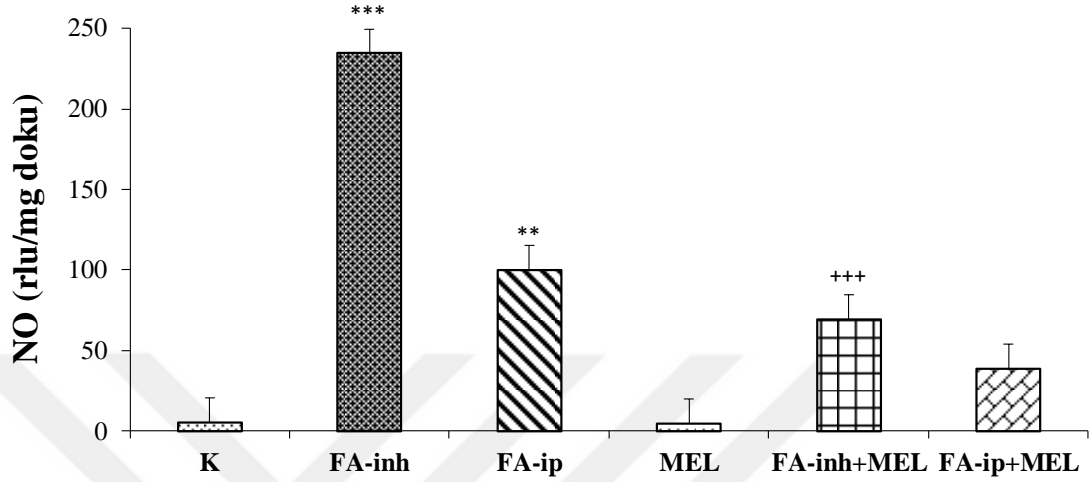


Şekil 32. Sıçanların böbrek dokularında lusigenin seviyeleri.
*** $p < 0,001$ K grubuna; ### $p < 0,001$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Akciğer dokusunda NO seviyelerinin sonuçları Şekil 33’de verilmiştir. K grubunda ortalama NO seviyesi $5,30 \pm 1,47$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama NO seviyeleri K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $234,50 \pm 82,22$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) ve $99,98 \pm 66,62$ rlu/mg doku ($p < 0,01$) olarak bulundu. MEL tedavisi sonrası FA-inh+MEL grubunda ortalama NO seviyesi anlamlı bir şekilde düşerek $69,25 \pm 17,57$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. FA-ip+MEL gruplarının ortalama NO seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($38,80 \pm 10,50$, $p > 0,05$).

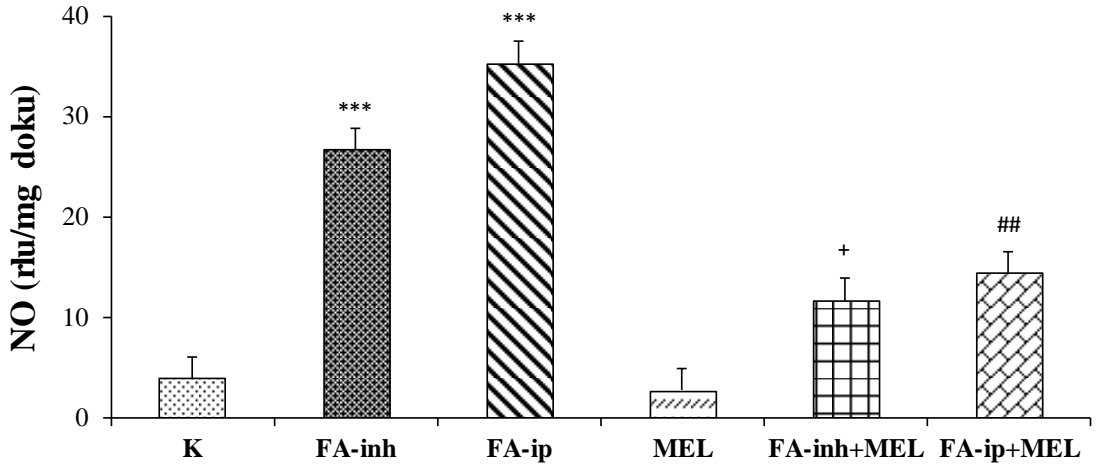
Karaciğer dokusunda NO seviyelerinin sonuçları Şekil 34’de verilmiştir. K grubunda ortalama NO seviyesi $3,88 \pm 1,04$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-inh ve FA-ip gruplarında ortalama NO seviyeleri K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek sırasıyla; $26,71 \pm 12,33$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) ve $35,28 \pm 15,90$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL tedavisi uygulanan gruplarda ortalama NO seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü; FA-inh+MEL grubunda $11,68 \pm 7,24$ rlu/mg

doku ($p<0,05$), FA-ip+MEL grubunda $14,37\pm4,52$ rlu/mg doku ($p<0,01$) olarak bulundu.



Şekil 33. Sıçanların akciğer dokularında NO seviyeleri.

** $p<0,01$, *** $p<0,001$ K grubuna; +++ $p<0,001$ FA-inh grubuna göre kıyaslandığında.

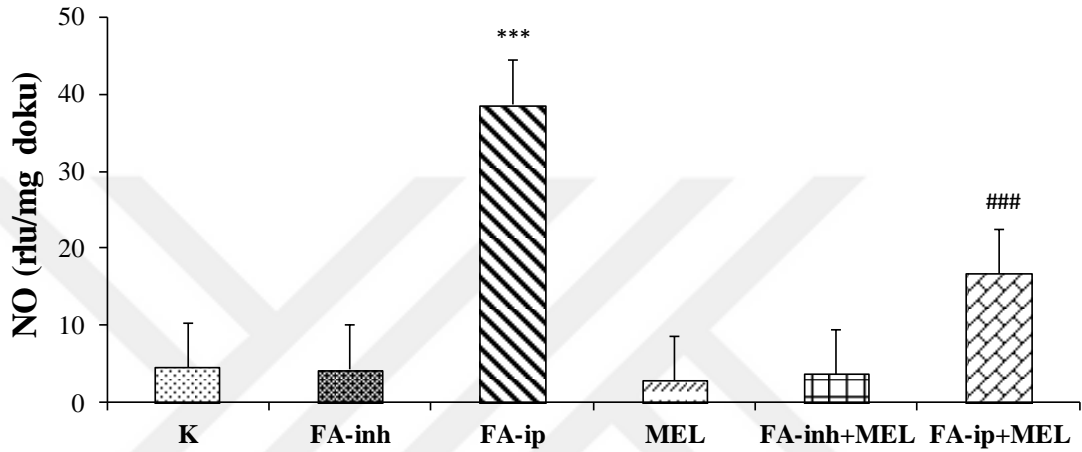


Şekil 34. Sıçanların karaciğer dokularında NO seviyeleri.

*** $p<0,001$ K grubuna; + $p<0,05$ FA-inh grubuna; ## $p<0,01$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

Böbrek dokusunda NO seviyelerinin sonuçları Şekil 35’de verilmiştir. K grubunda ortalama NO seviyesi $4,44\pm1,47$ rlu/mg doku olarak bulundu. FA-ip

grubunun ortalama NO seviyeleri K grubuna göre anlamlı bir artış göstererek $38,58 \pm 7,24$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. MEL uygulaması sonrası FA-ip+MEL grubunda ortalama NO seviyesi anlamlı bir şekilde düşerek $16,70 \pm 6,48$ rlu/mg doku ($p < 0,001$) olarak bulundu. FA-inh ve FA-inh+MEL gruplarının ortalama NO seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($p > 0,05$).



Şekil 35. Sıçanların böbrek dokularında NO seviyeleri.

*** $p < 0,001$ K grubuna; ### $p < 0,01$ FA-ip grubuna göre kıyaslandığında.

6.3. Histopatolojik Bulgular

Tüm gruplardan elde edilen akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında histomorfolojik değişiklikler H&E, PAS ve GT boyamaları uygulanarak incelendi. Akciğer dokusunda alveol yapısı, makrofaj artışı, epitel dejenerasyonu, kollajen artışı, ödem ve inflamasyon hücrelerinin artışı araştırıldı. Karaciğer dokusunda portal alanda, hepatik vende ve hepatositlerde ortaya çıkan değişiklikler araştırıldı. Böbrek dokusunda glomerüllerde ve tübüllerde meydana gelen değişiklikler histomorfolojik olarak değerlendirildi.

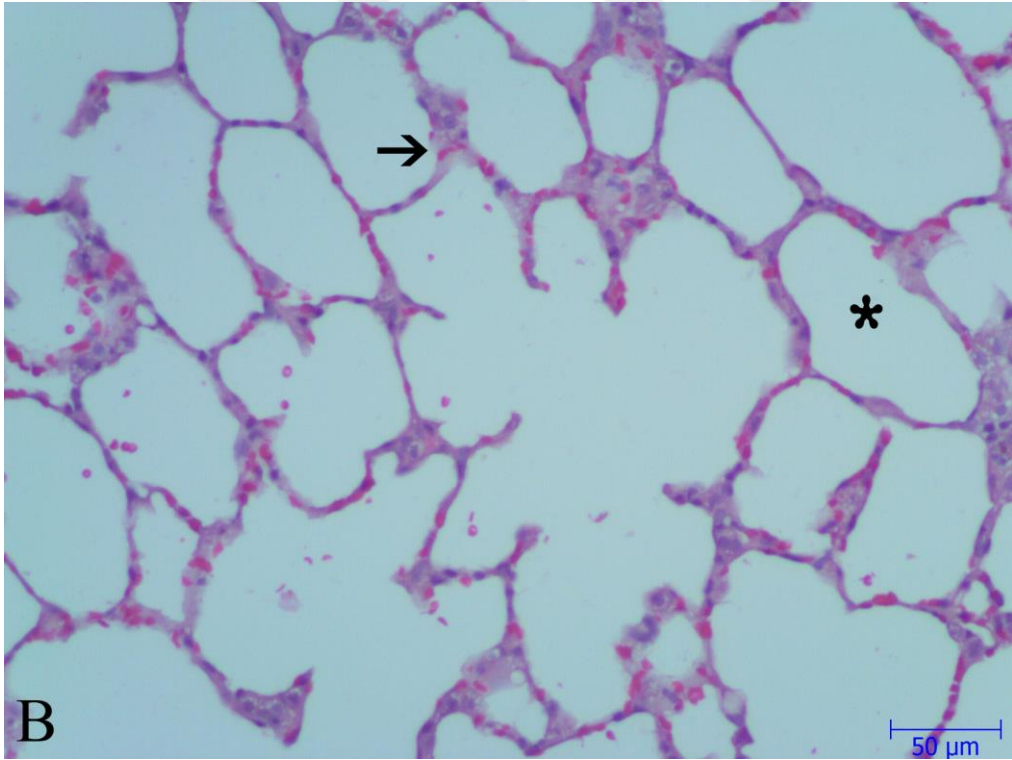
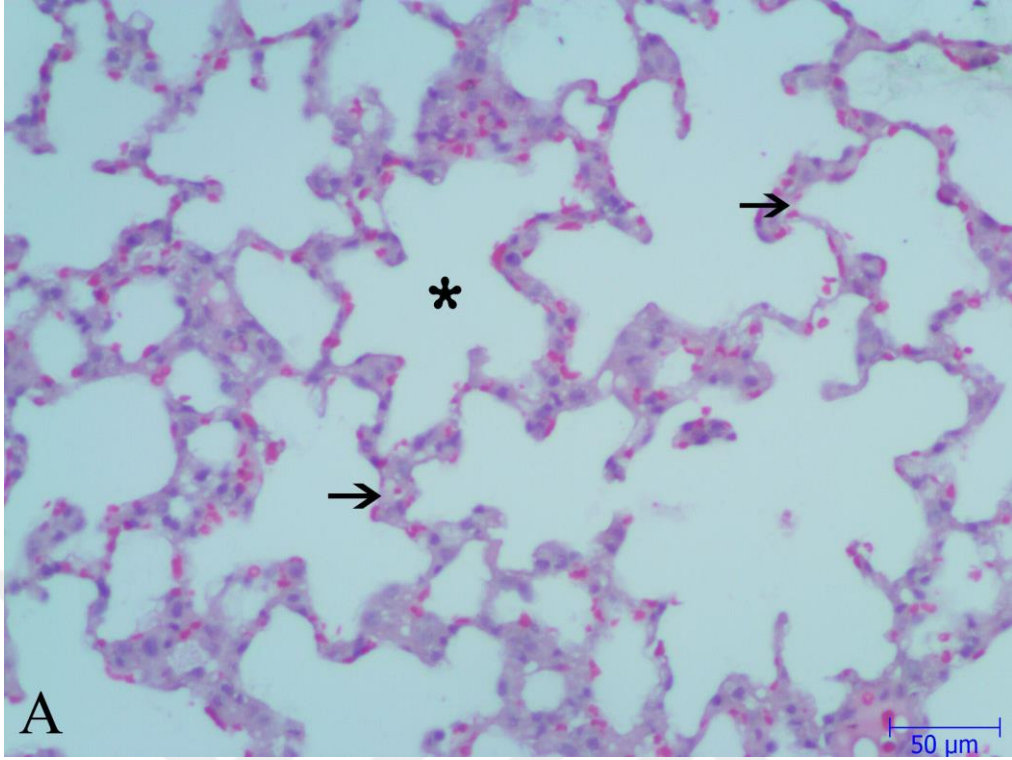
Akciğer dokusunda K grubunda alveollerin normal histolojik görünümde, alveol boşluklarının düzenli ve septa kalınlığının normal olduğu görüldü. FA-inh grubu ile K grubu kıyaslandığında, alveol yapısında düzensizlik, intertisyel inflamasyon hücrelerinde artış, hemoraji ve septa kalınlığında artış görüldü. Ayrıca epitel dejenerasyonu ve alveol boşluklarında kollajen birikimi görüldü. FA-inh+MEL

grubunda alveollerdeki hasarın azaldığı, alveolar septada incelme, inflamasyon hücreleri ve kollajen birikiminde azalma olduğu görüldü. FA-ip grubunda ise alveolar septada kalınlaşma ve konjesyon bulgularına rastlandı ve bu bulguların MEL uygulaması ile azaldığı görüldü (Resim 8-25).

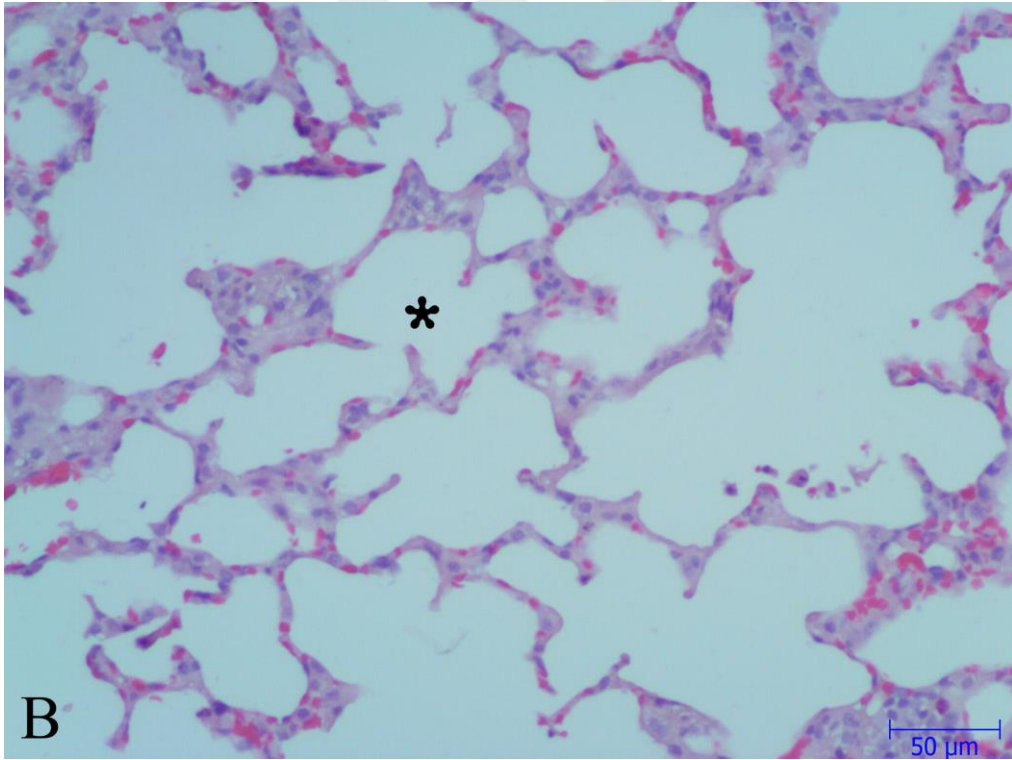
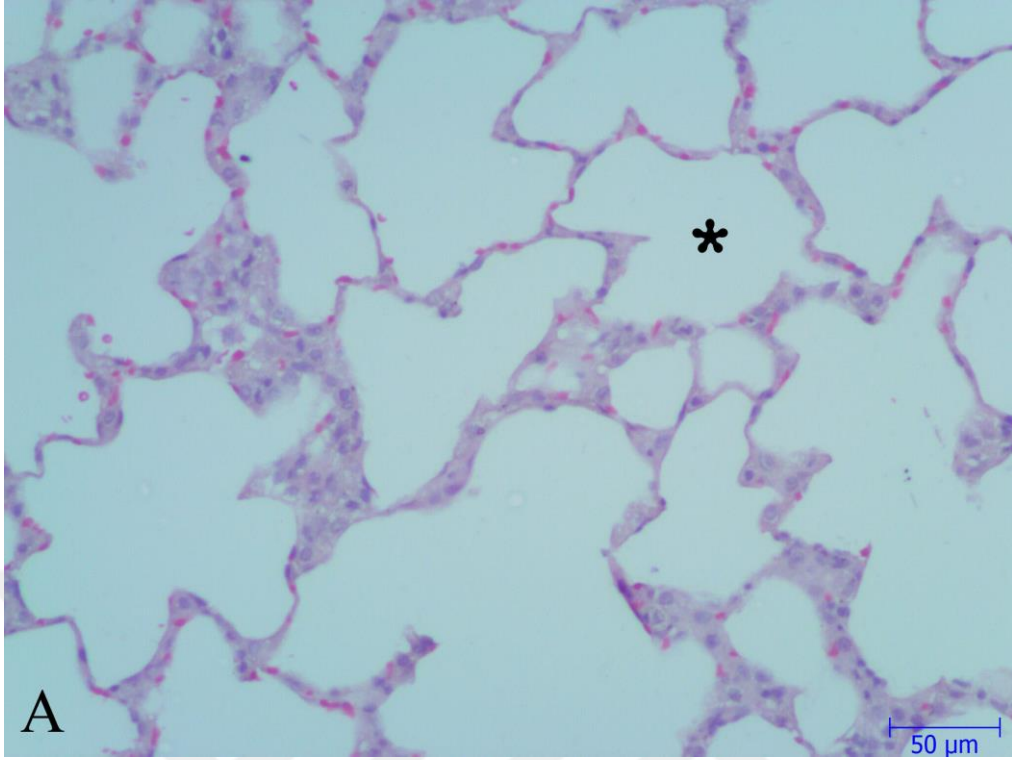
Karaciğer dokusuna ait örnekler incelendiğinde K grubunda karaciğer dokusunun normal histolojik görünümde olduğu görüldü. FA-inh grubunda portal alanlarda konjesyon ve ödem, sinozoidal alanların genişlediği ve hepatositlerde glikojen kaybı olduğu görüldü. MEL uygulaması ile FA-inh+MEL grubunda portal alanlardaki hasarın ve hemorajinin azaldığı, glikojen kaybının FA-inh grubuna göre daha az olduğu görüldü. FA-ip grubunda ise FA-inh grubundaki bulgulara ilave olarak kollajen miktarında artış olduğu ve bu etkilerin MEL uygulaması ile azaldığı görüldü (Resim 26-43).

Böbrek dokusu değerlendirildiğinde, K grubunda glomerül ve tübül yapısı düzenli görüldü. Glomerüller kapiller bazal membranları ve tubulus bazal membranları ince ve düzenli görüldü. FA-inh ve FA-ip grupları K grubu ile kıyaslandığında, glomerüllerde genişleme ve konjesyon, intertisyel lenfoplazmositer infiltrasyon ve tubuler epitel hücrelerinde düzensizleşme olduğu görüldü. MEL uygulaması ile FA maruziyeti sonucu oluşan bu etkilerde belirgin bir azalış olmadığı görüldü (Resim 44-61).

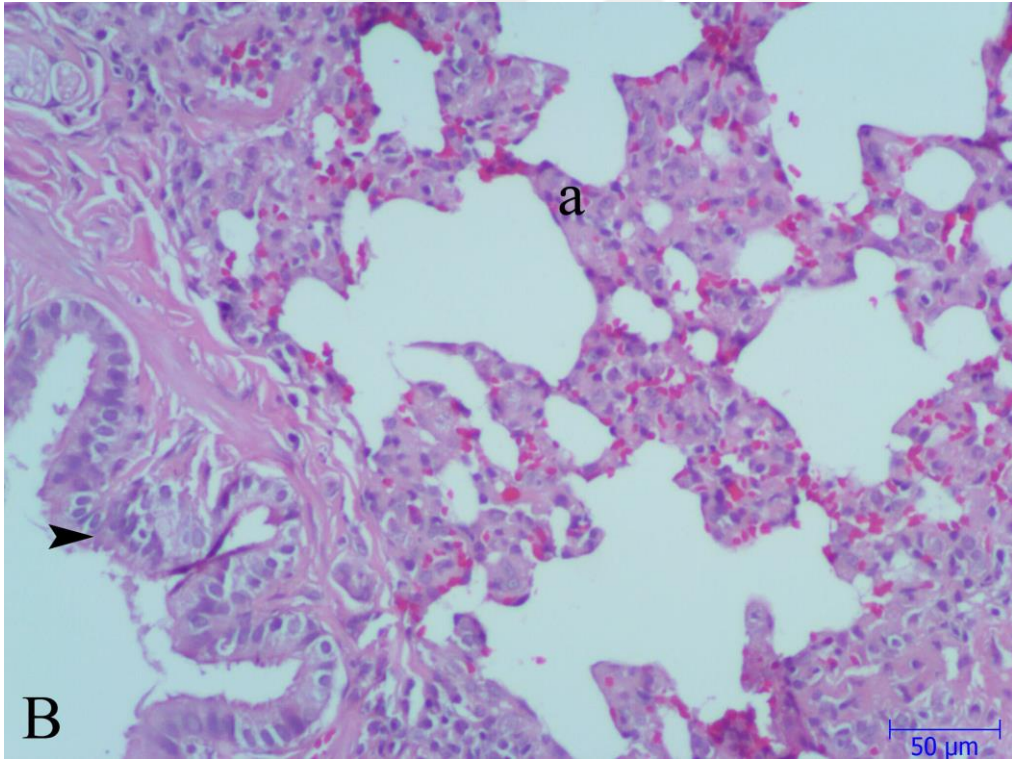
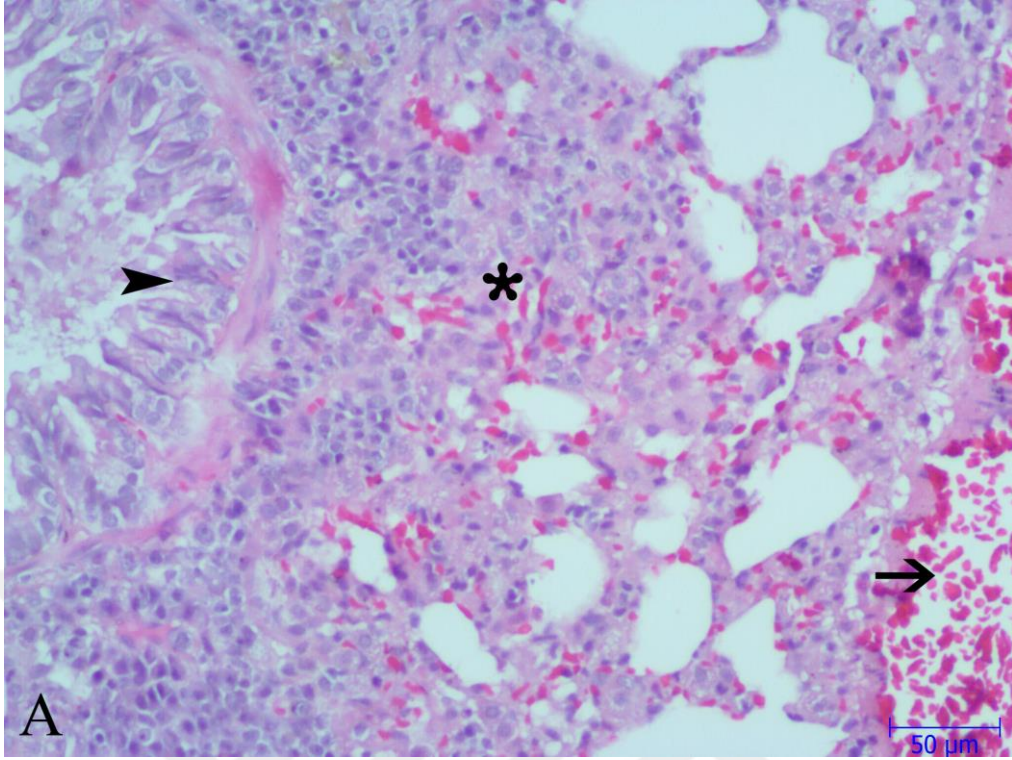
Akciğer dokusunda apoptozisi belirlemek amacıyla TUNEL yöntemi kullanıldı. Yöntemin değerlendirilmesinde kahverengi boyanmış TUNEL (+) apoptotik hücreler sayıldı. TUNEL yönteminde pozitif kontrol dokusundaki boyama referans olarak kabul edildi. TUNEL (+) hücre sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.



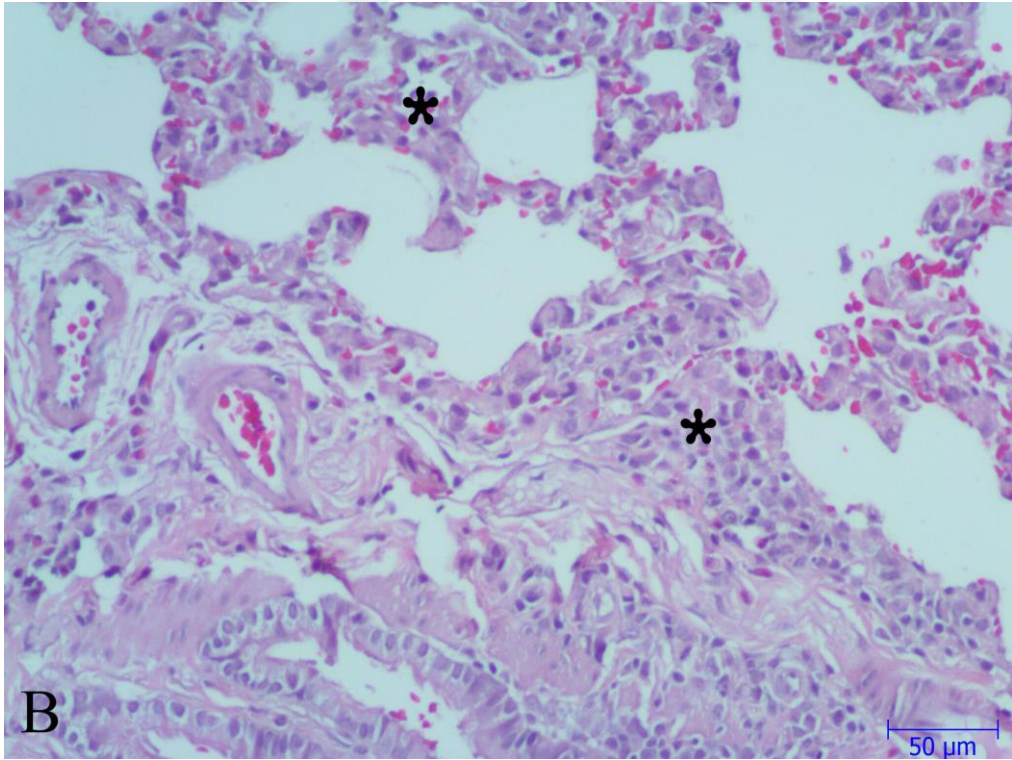
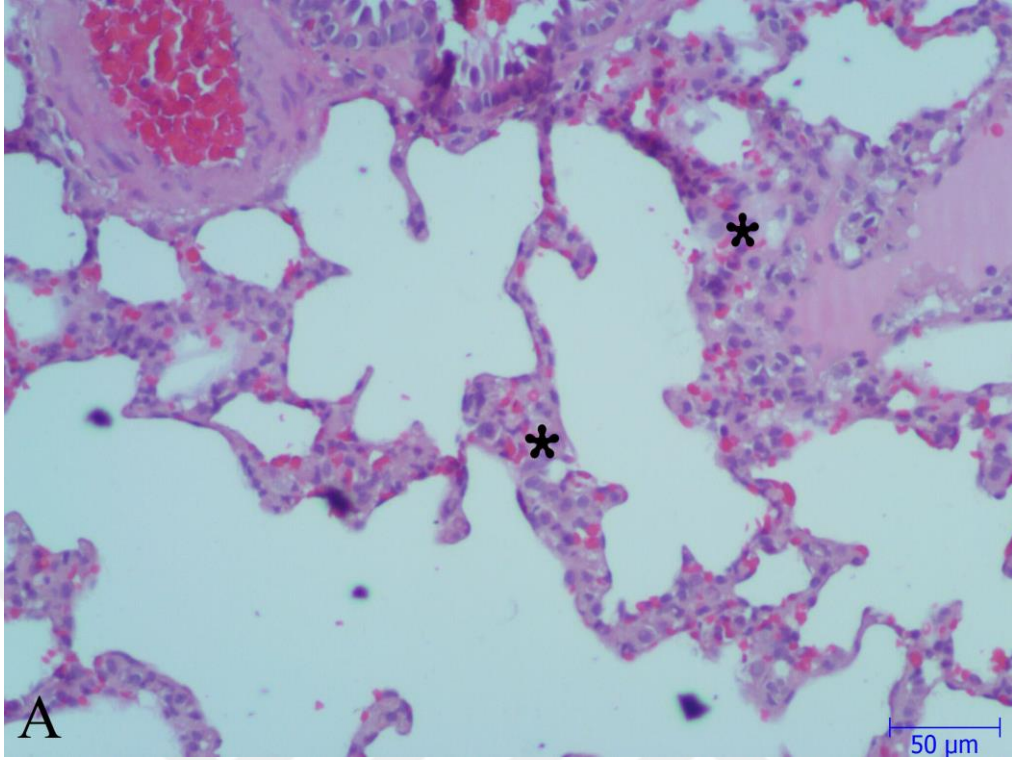
Resim 8. A, B. Akciğer dokusu, K grubunda alveol boşluğu (yıldız) ve alveolar septanın (ok) normal görünümü. H&E boyası.



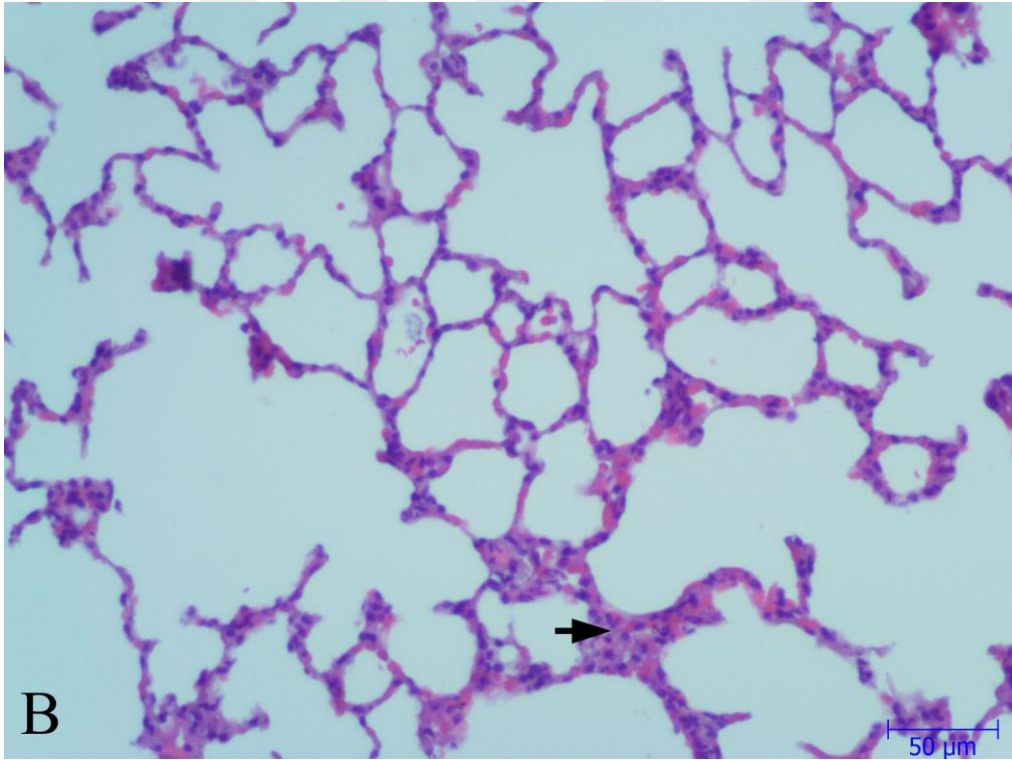
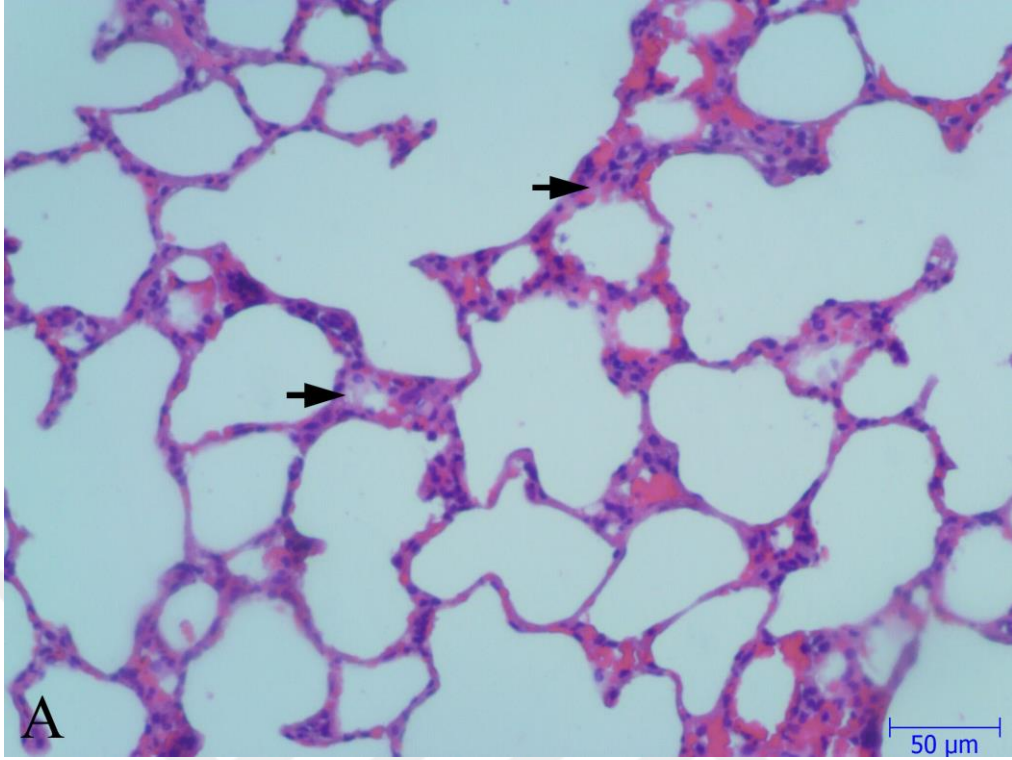
Resim 9. A, B. MEL grubunda normal alveol yapısı (yıldız). H&E boyası.



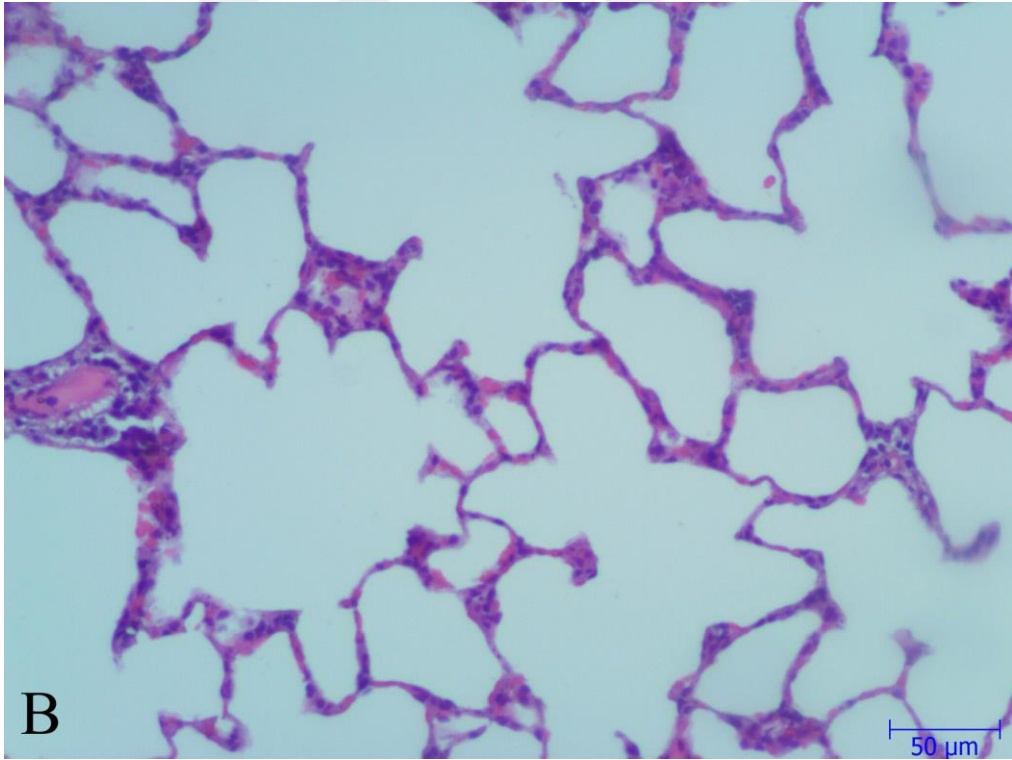
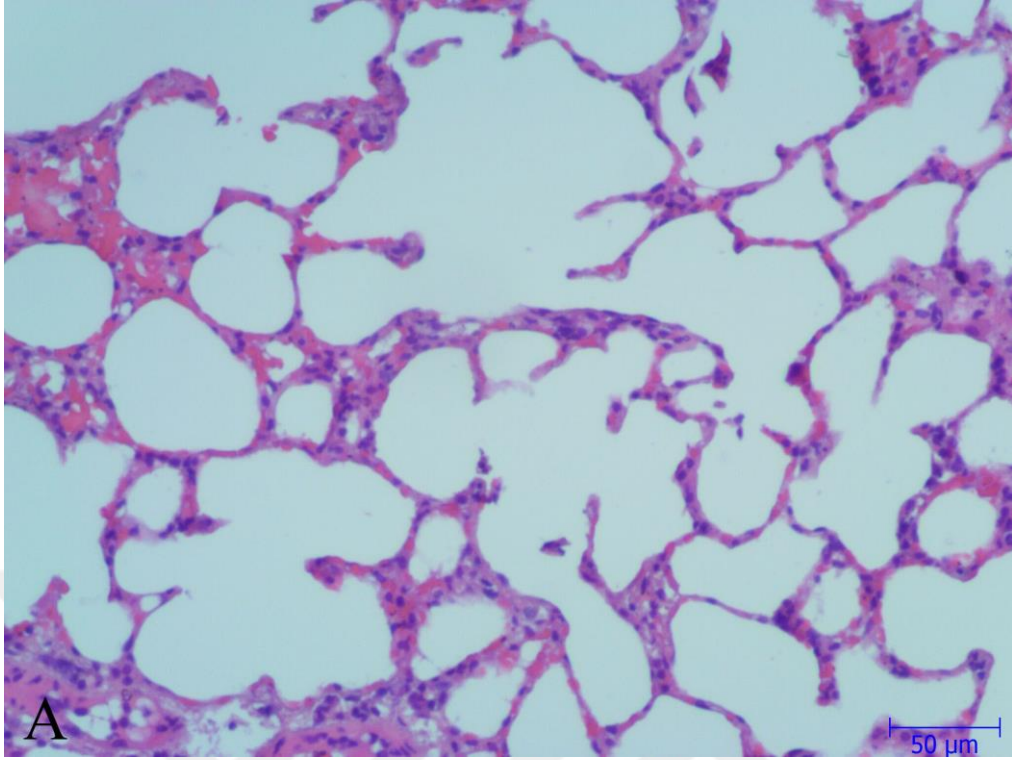
Resim 10. A, B. FA-inh grubunda epitel dökülmesi (ok başı), intertisyel inflamasyon (yıldız), septa kalınlığında artış (a) ve hemoraji (ok). H&E boyası.



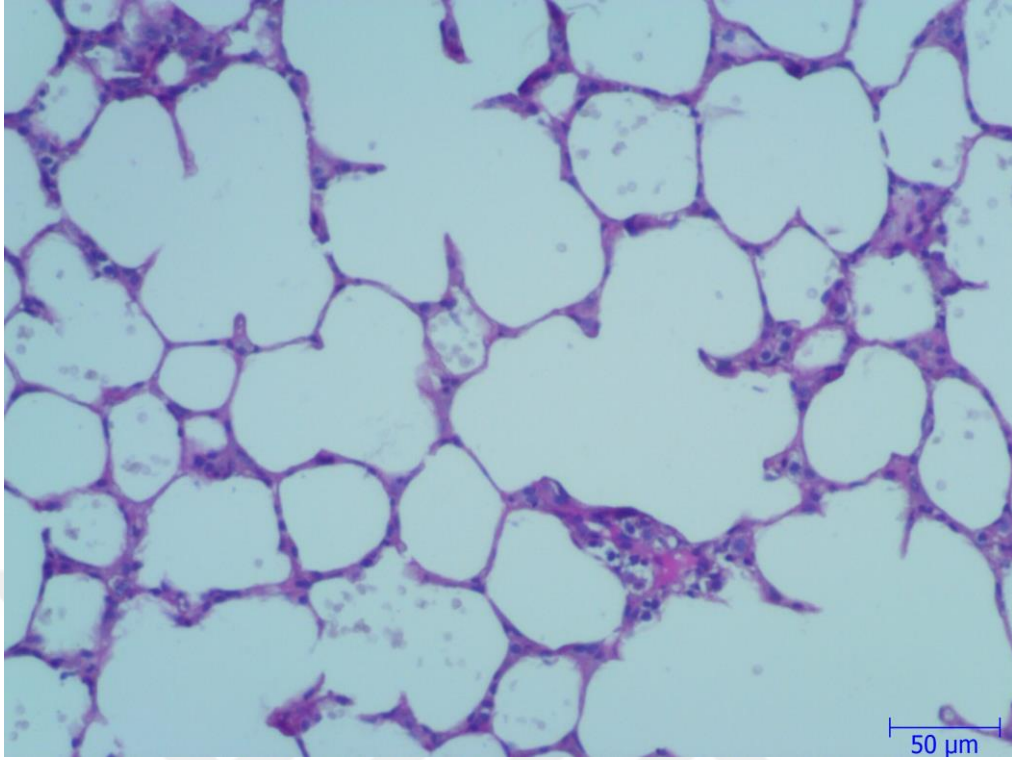
Resim 11. A, B. FA-inh+MEL grubunda intertisyel inflamasyonda azalma, septa kalınlığında incelme ve hemorajide azalma (yıldız). H&E boyası.



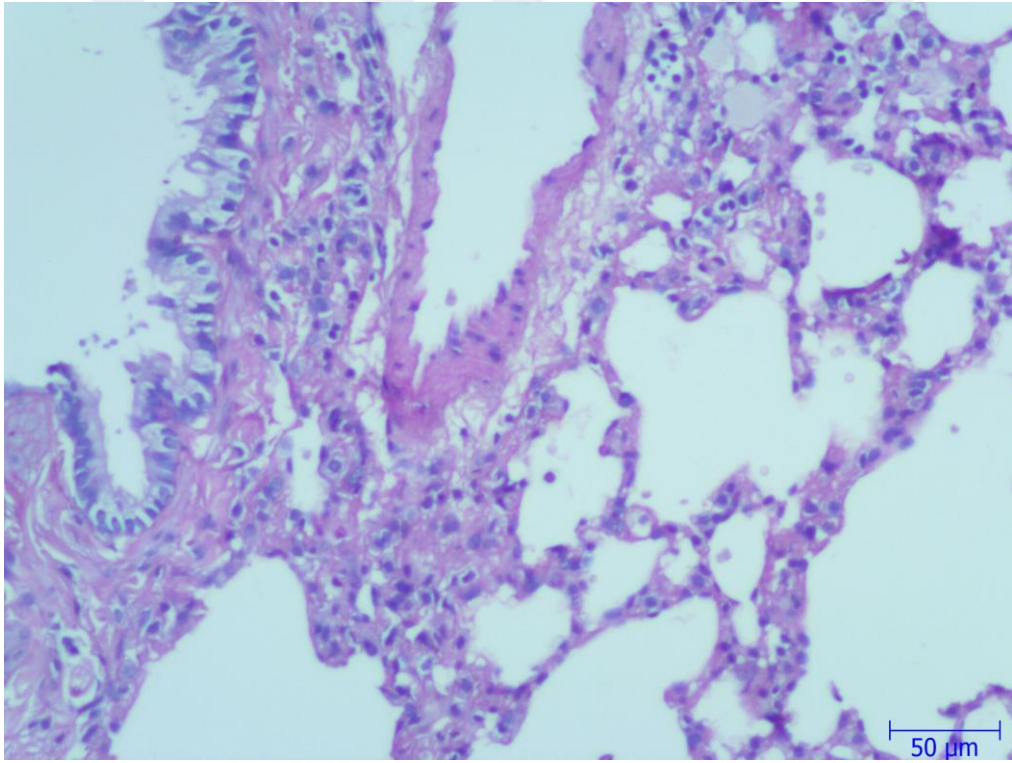
Resim 12. A, B. FA-ip grubunda alveolar septa kalınlaşması ve hemoraji (ok). H&E boyası.



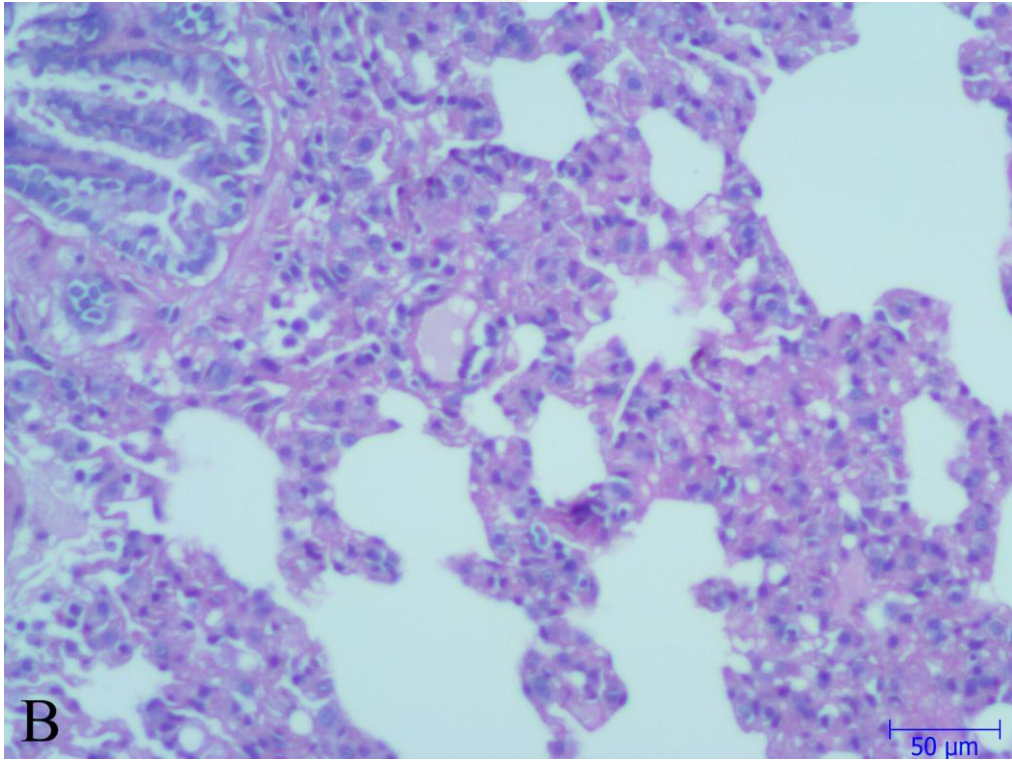
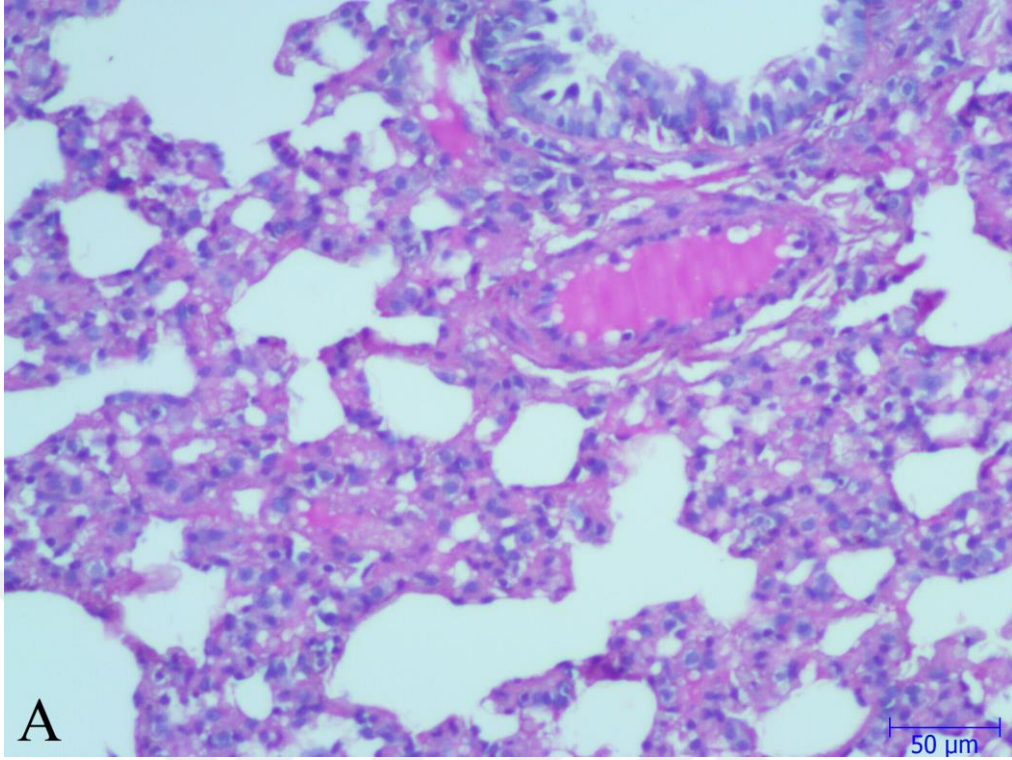
Resim 13. A, B. FA-ip+MEL grubunda alveolar septa kalınlaşması ve hemorajide azalma. H&E boyası.



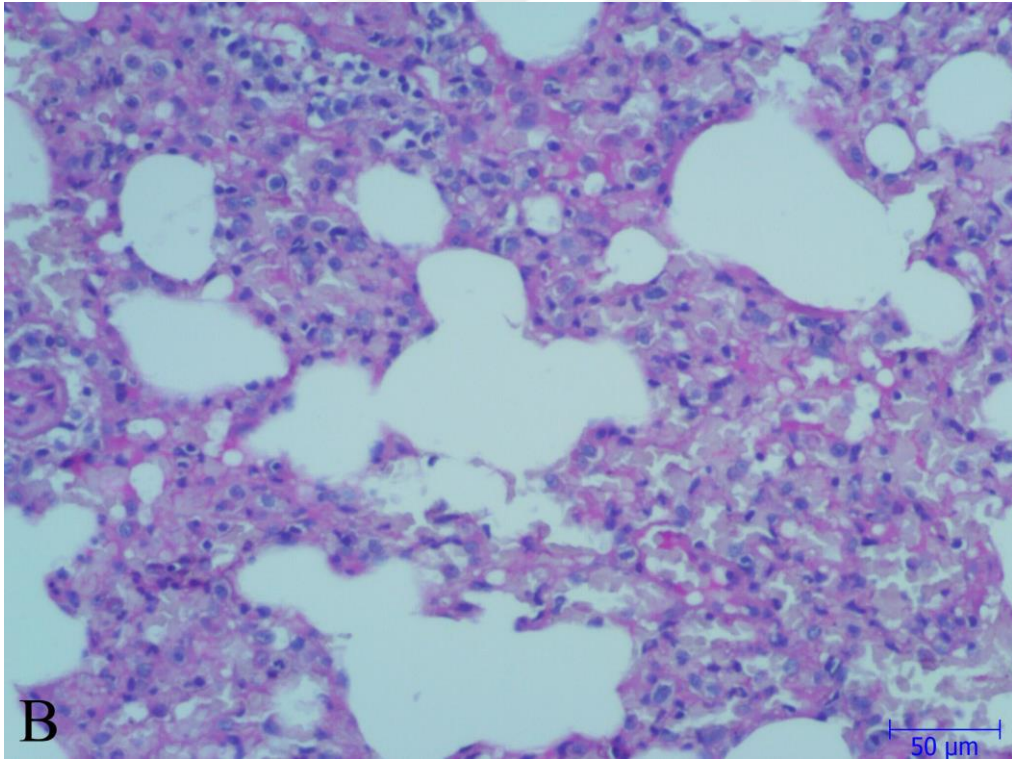
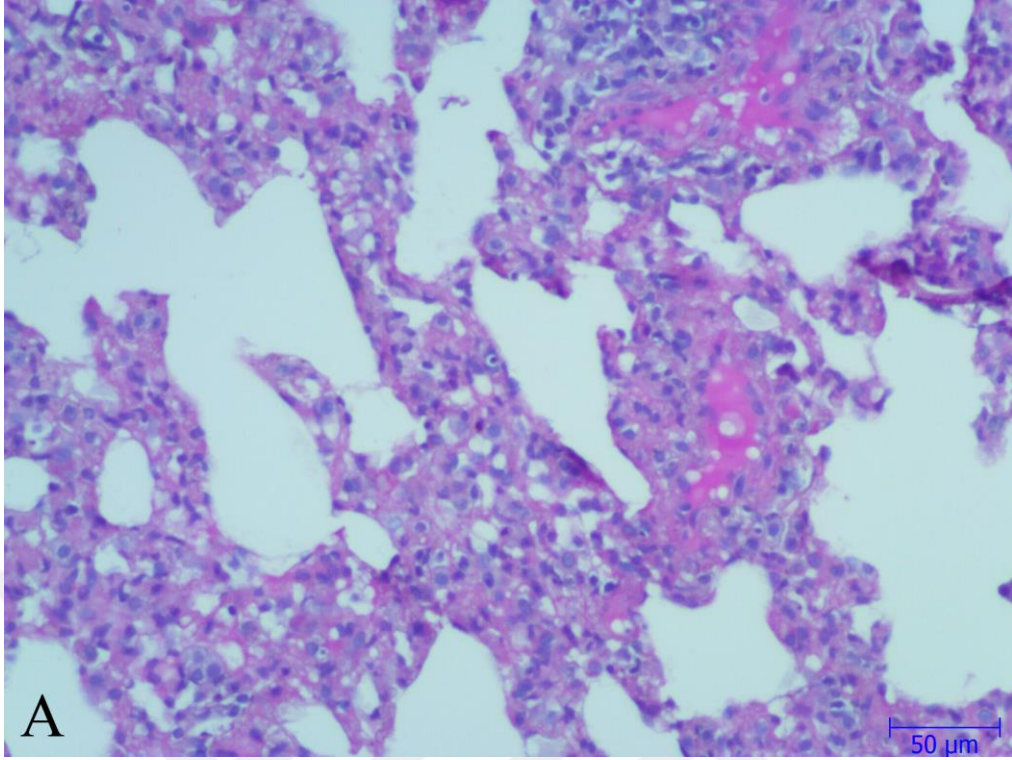
Resim 14. Akciğer dokusu: K grubunda normal alveol yapısı. PAS boyası.



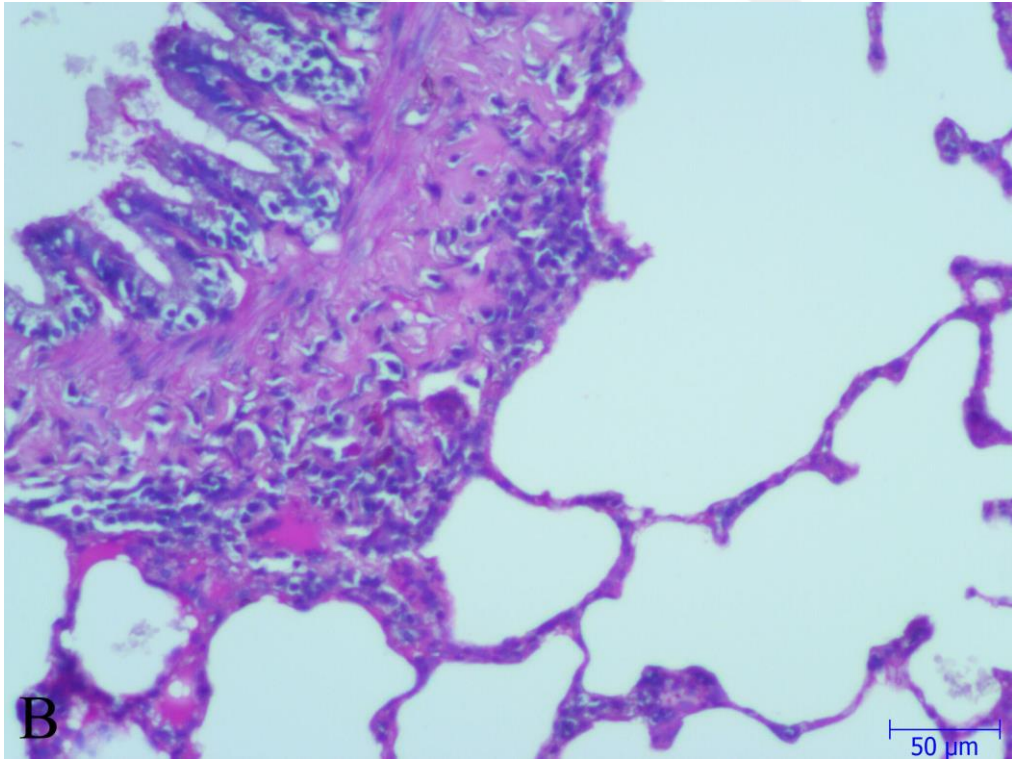
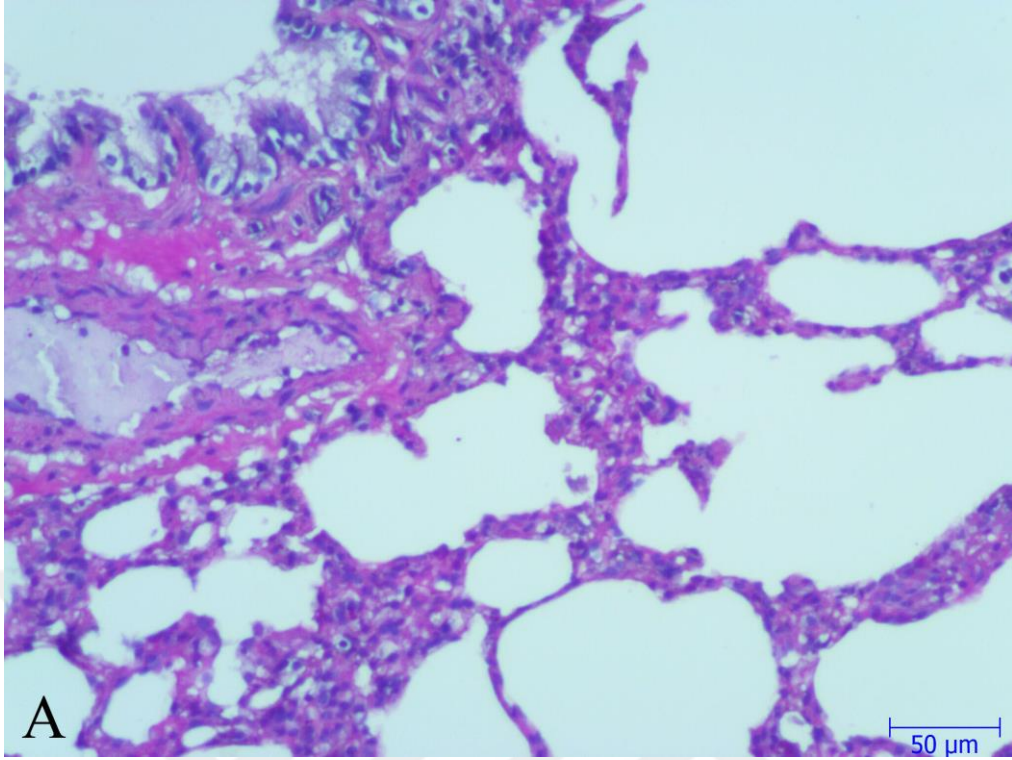
Resim 15. Akciğer dokusu: MEL grubu. PAS boyası.



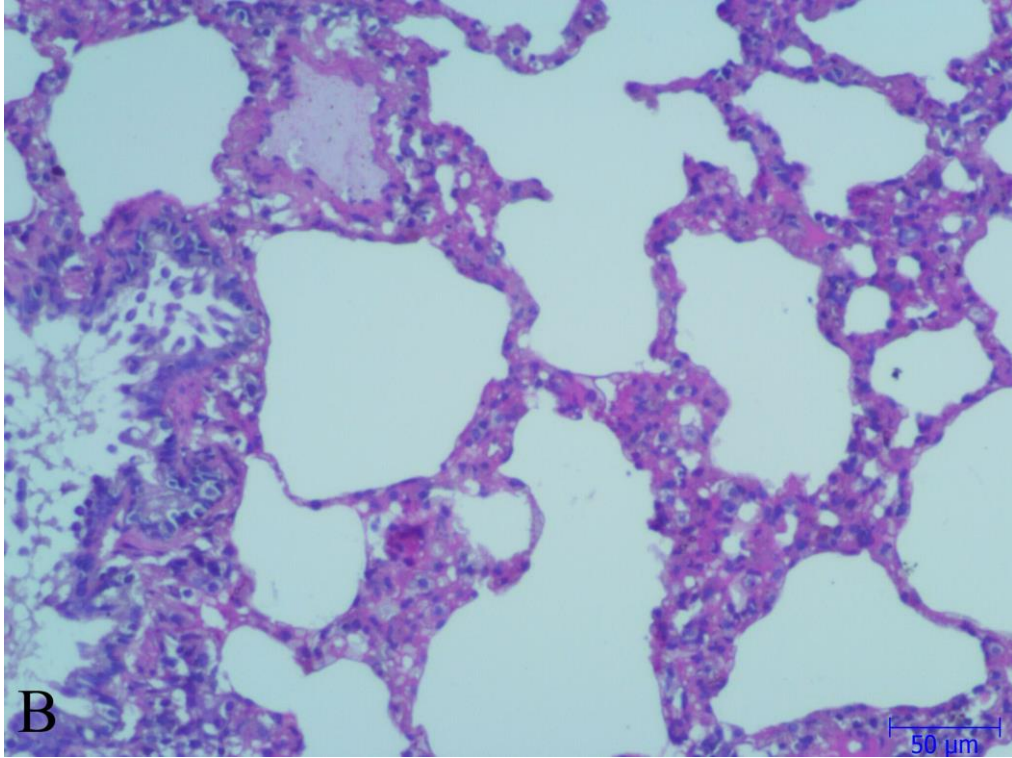
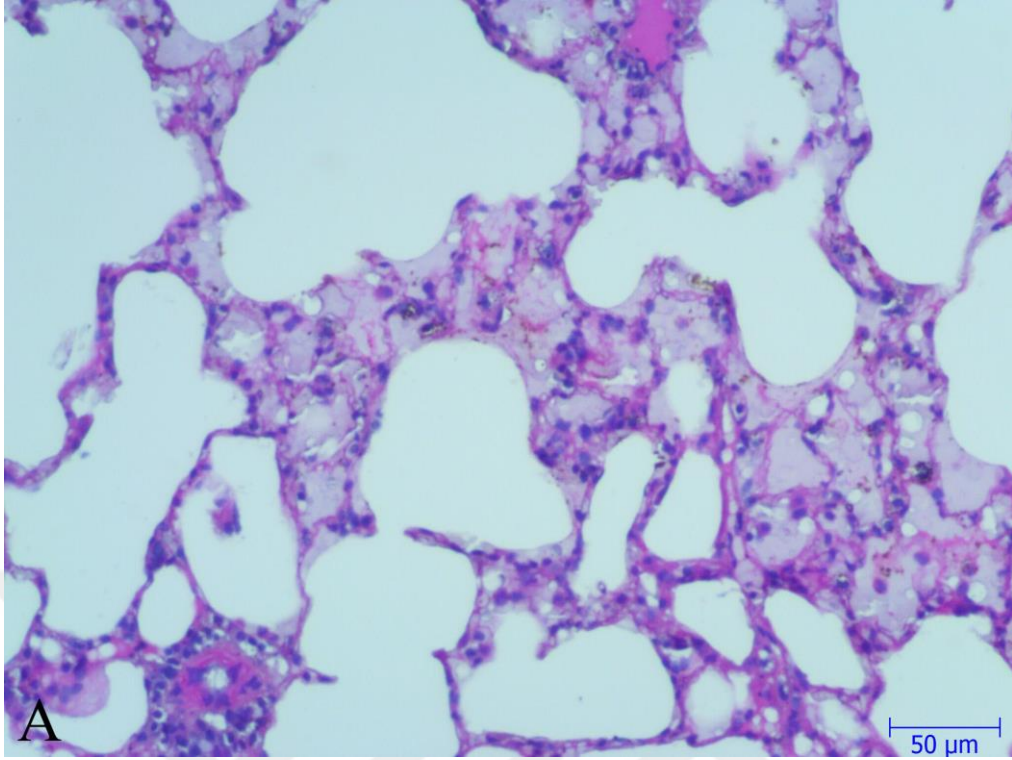
Resim 16. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası.



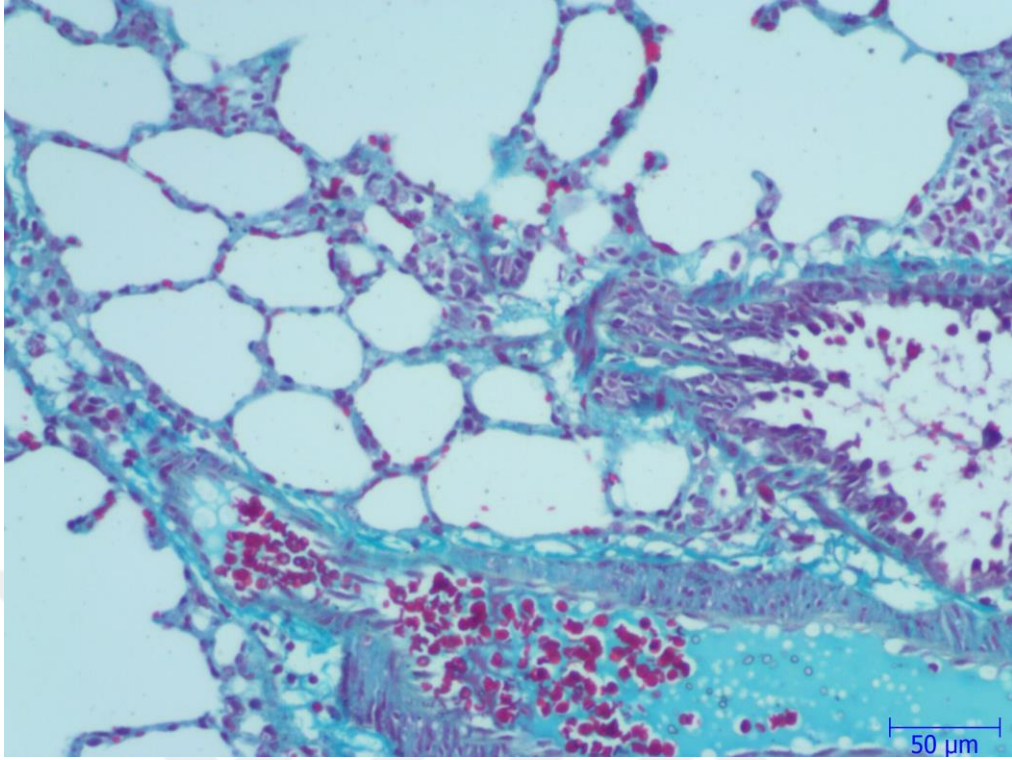
Resim 17. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası.



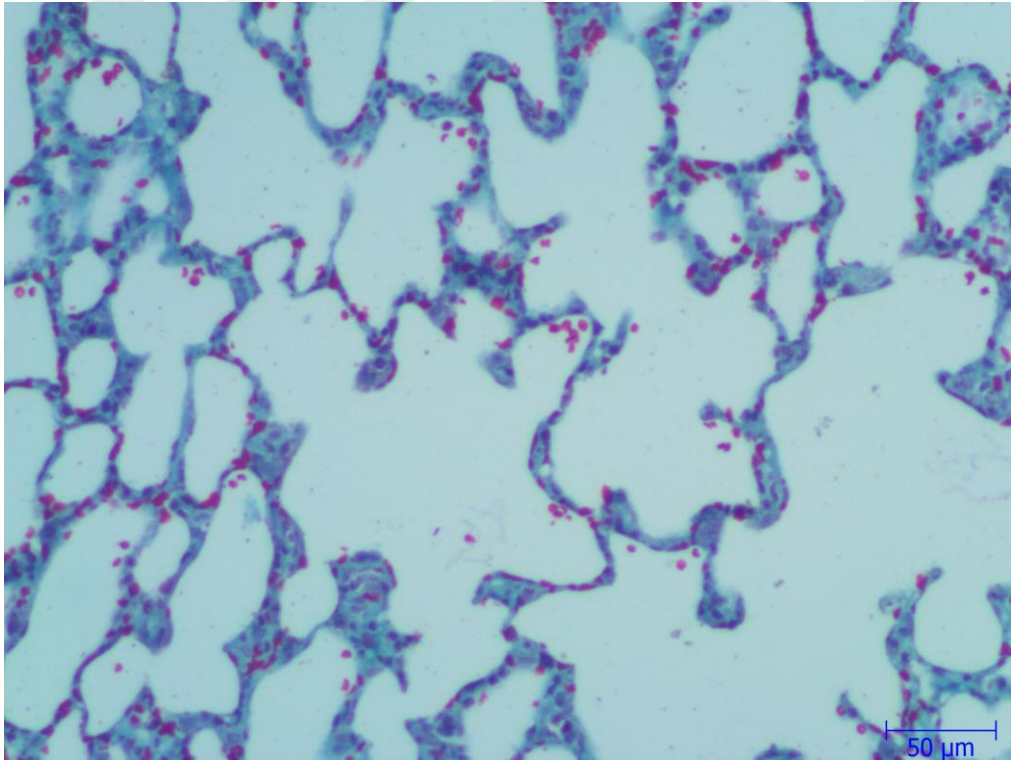
Resim 18. A, B. Akciğer dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası.



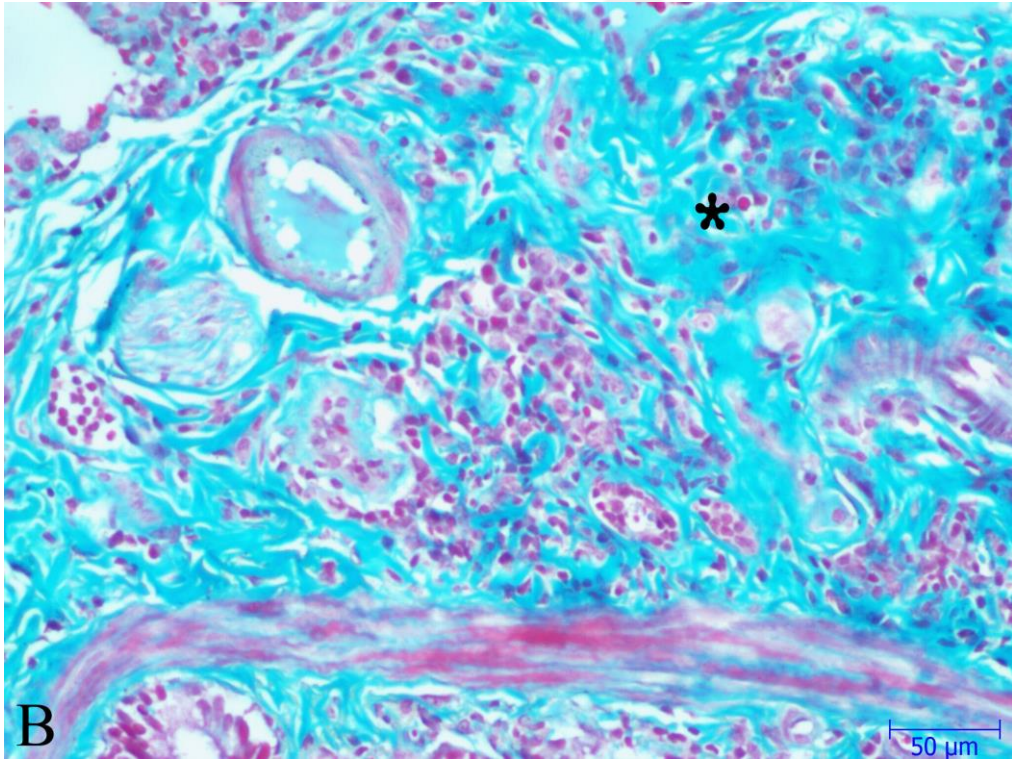
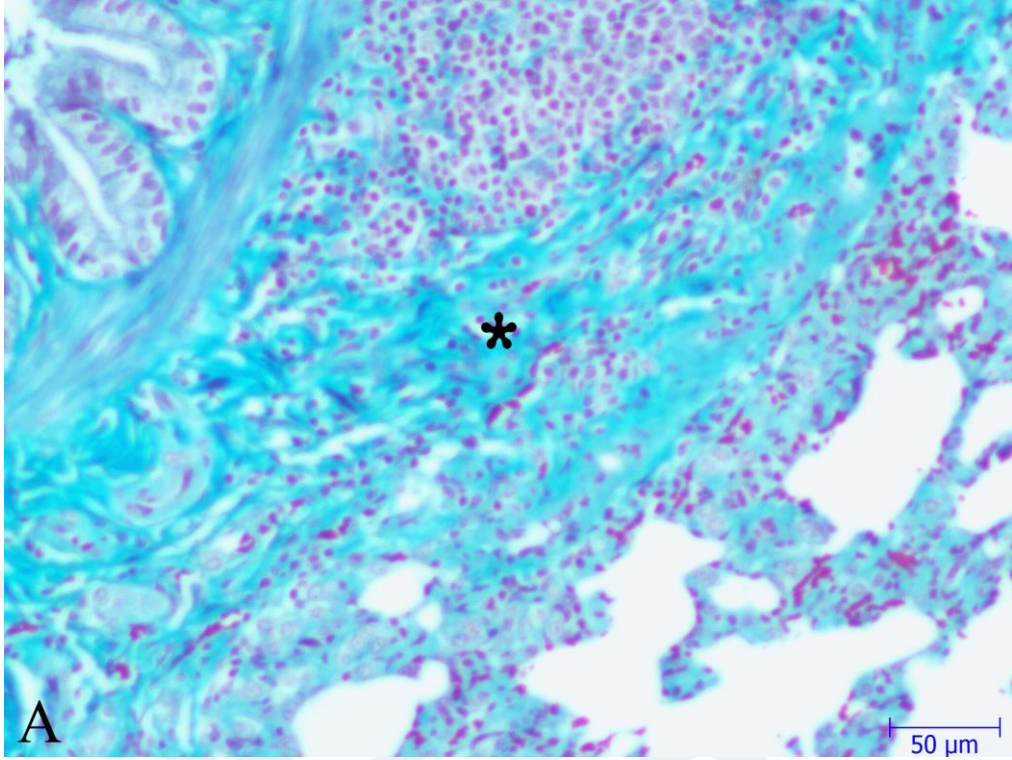
Resim 19. A, B. Akciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası.



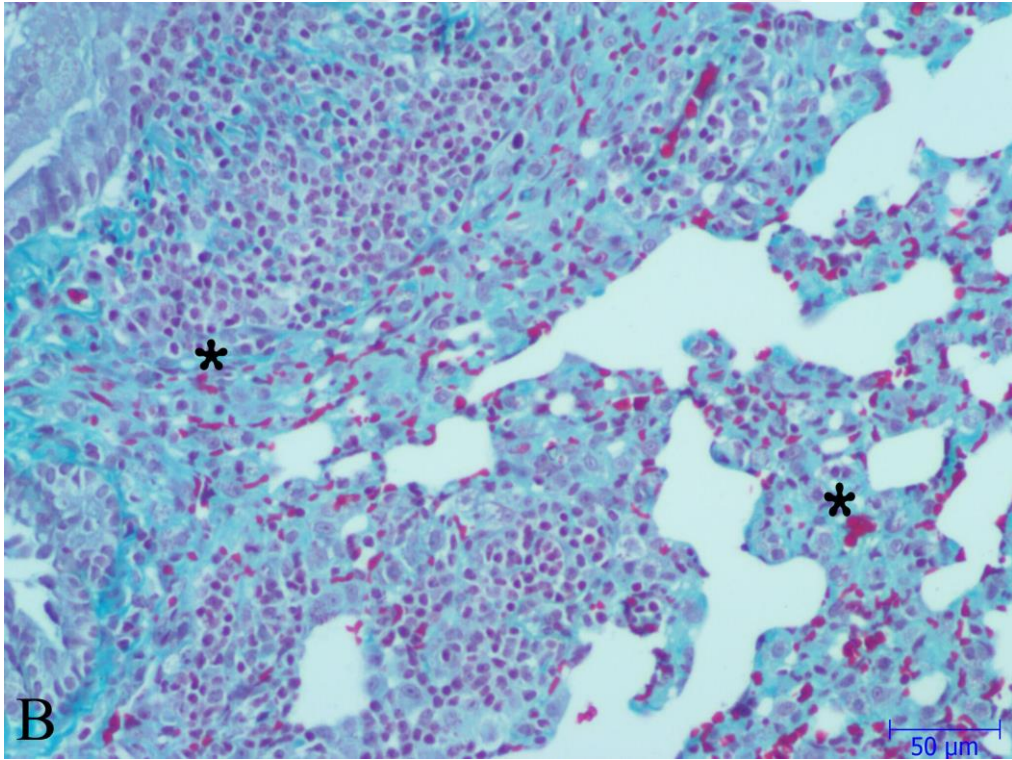
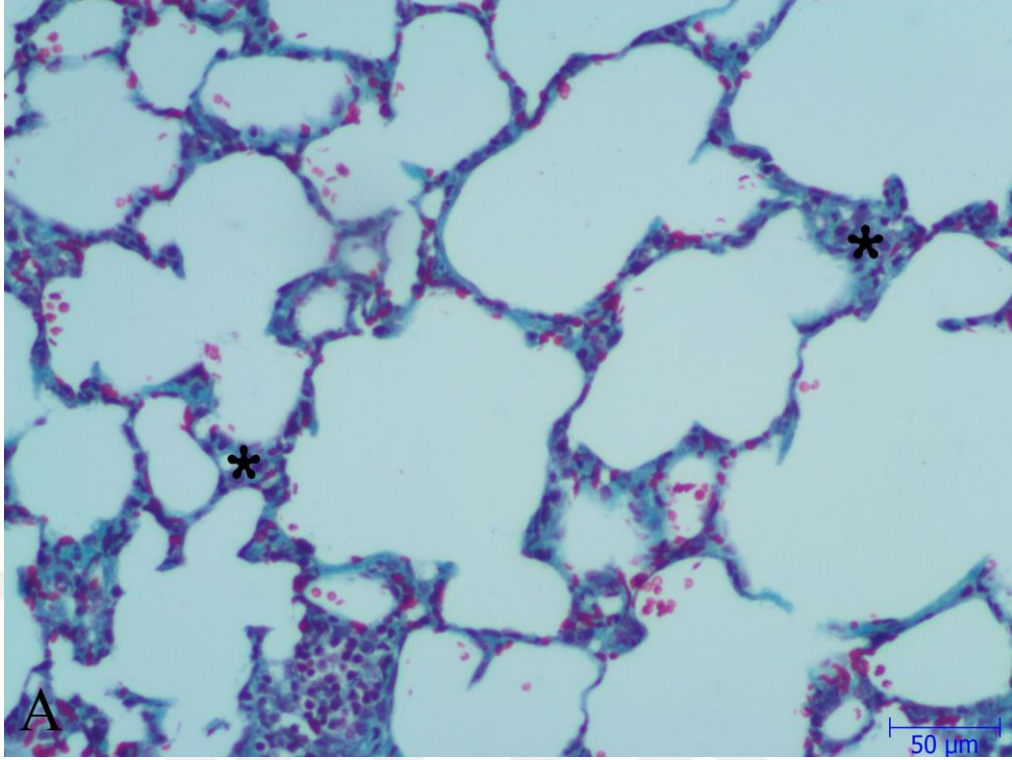
Resim 20. Akciğer dokusu: K grubunda normal alveol yapısı. GT boyası.



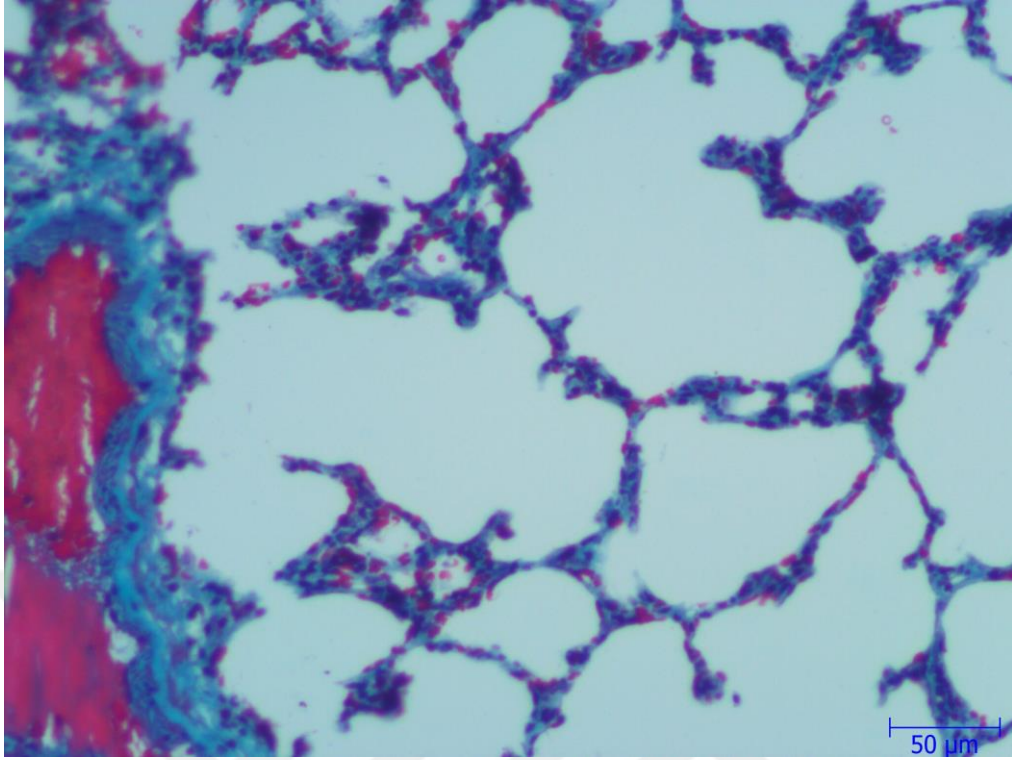
Resim 21. Akciğer dokusu: MEL grubunda normal akciğer yapısı. GT boyası.



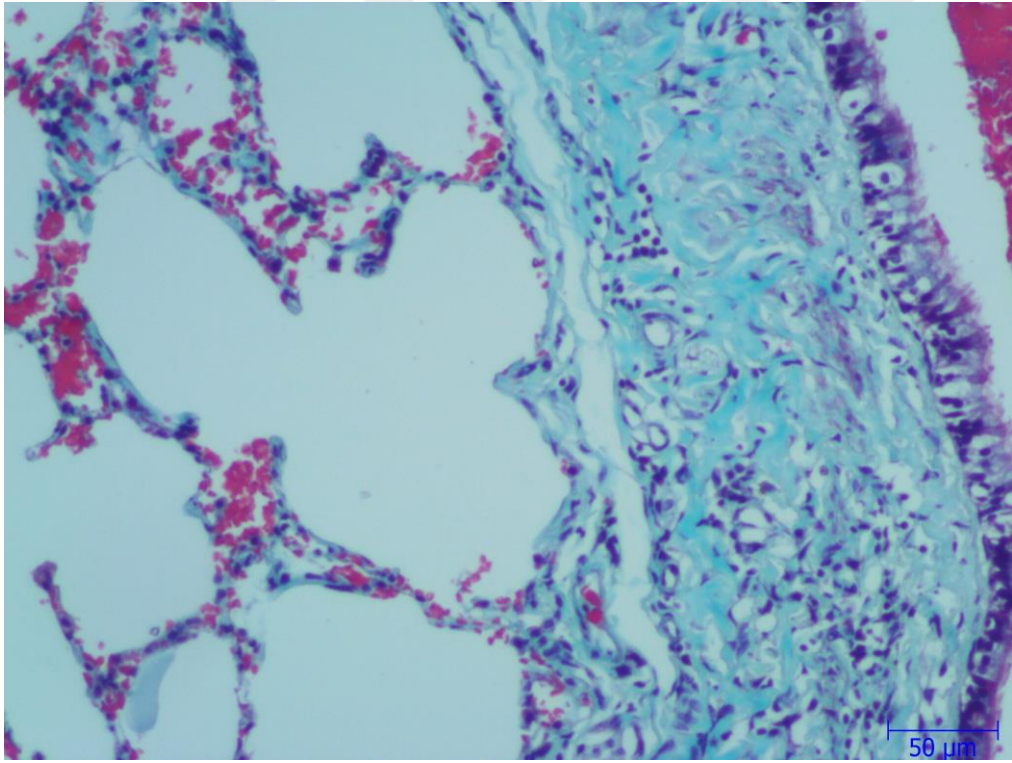
Resim 22. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh grubu, hafif kollajen artışı (yıldız). GT boyası.



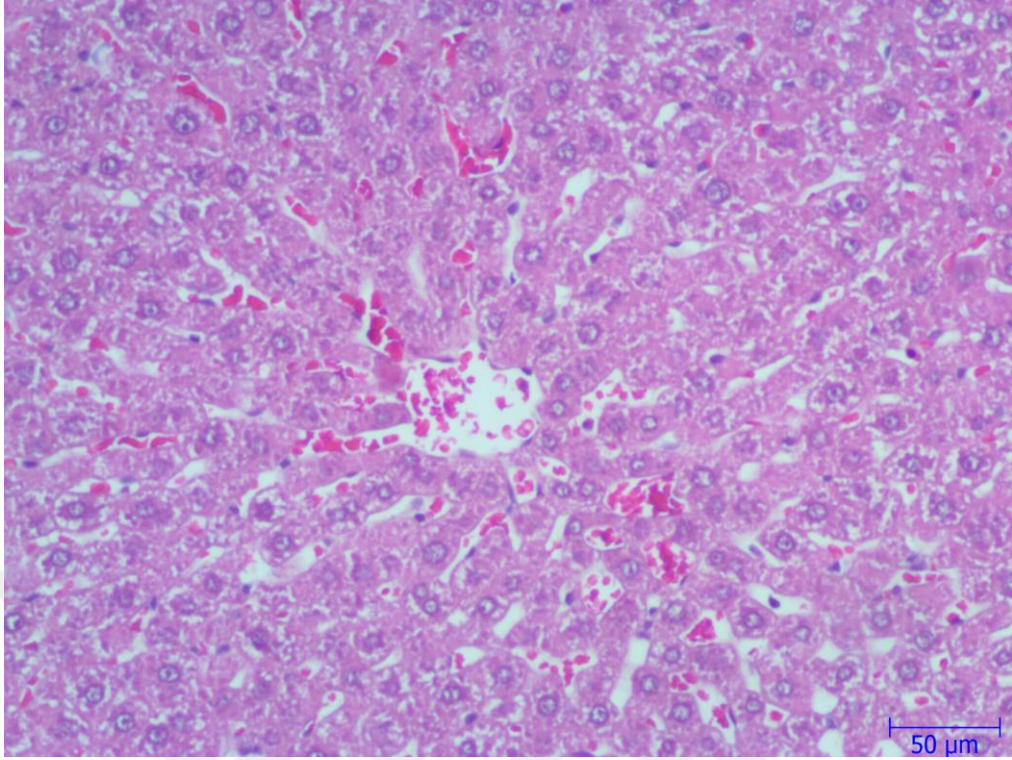
Resim 23. A, B. Akciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu, kollajen miktarında azalma. GT boyası.



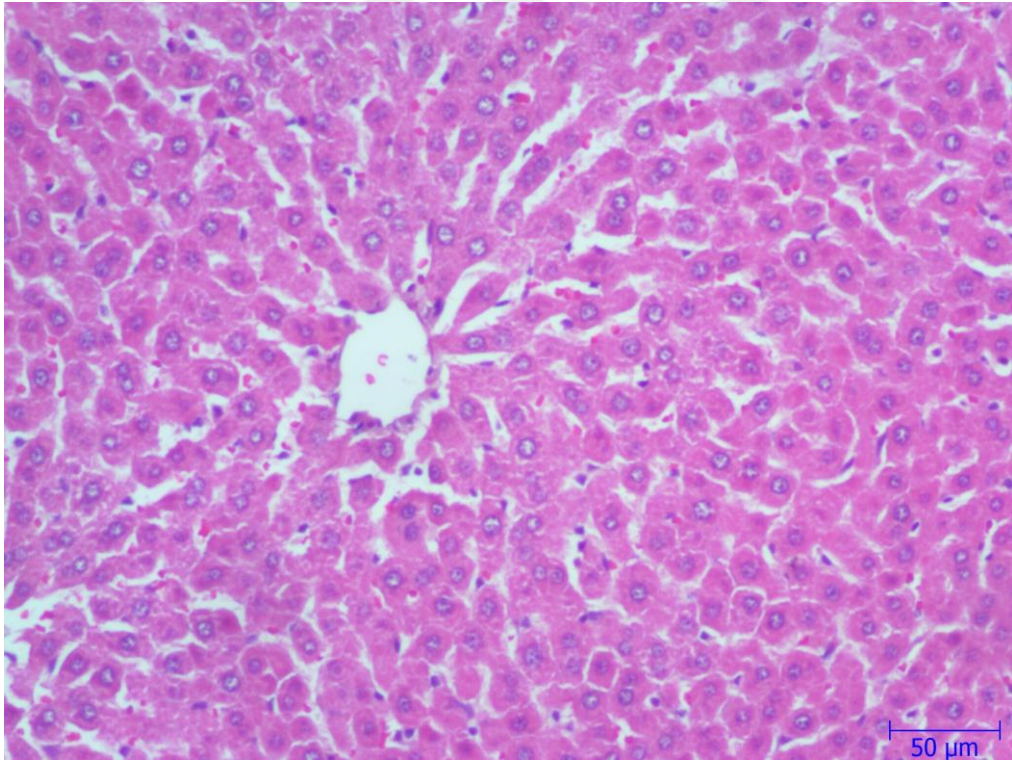
Resim 24. Akciğer dokusu: FA-ip grubu. GT boyası.



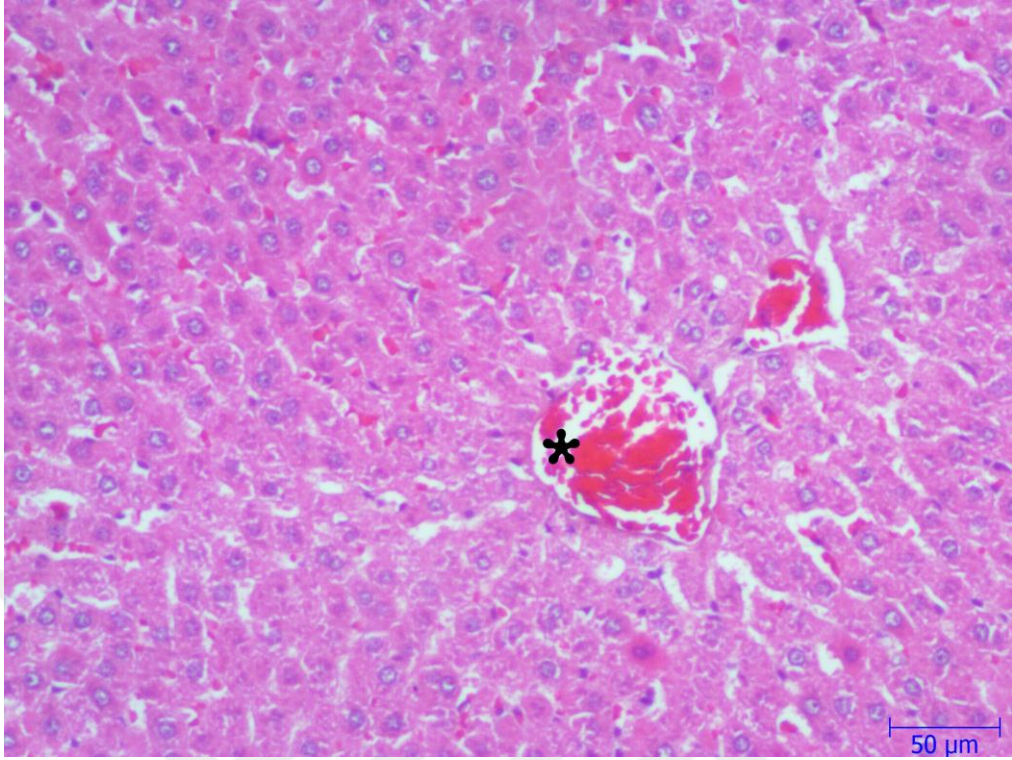
Resim 25. Akciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. GT boyası.



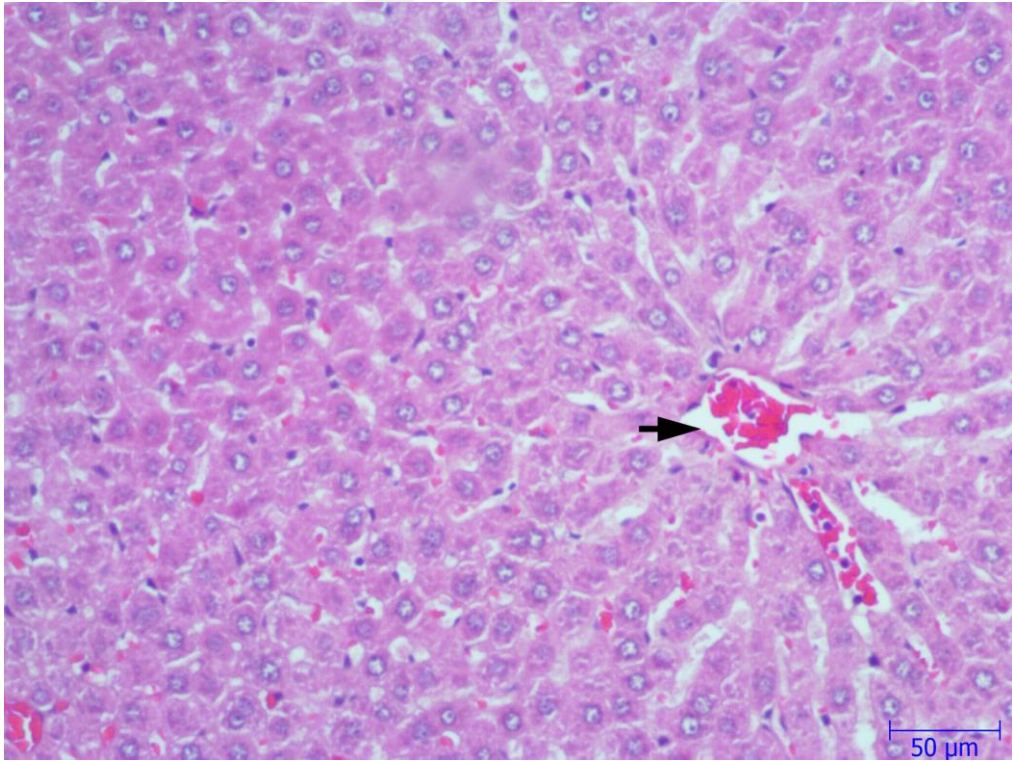
Resim 26. K grubunda karaciğerin normal yapısı. H&E boyası.



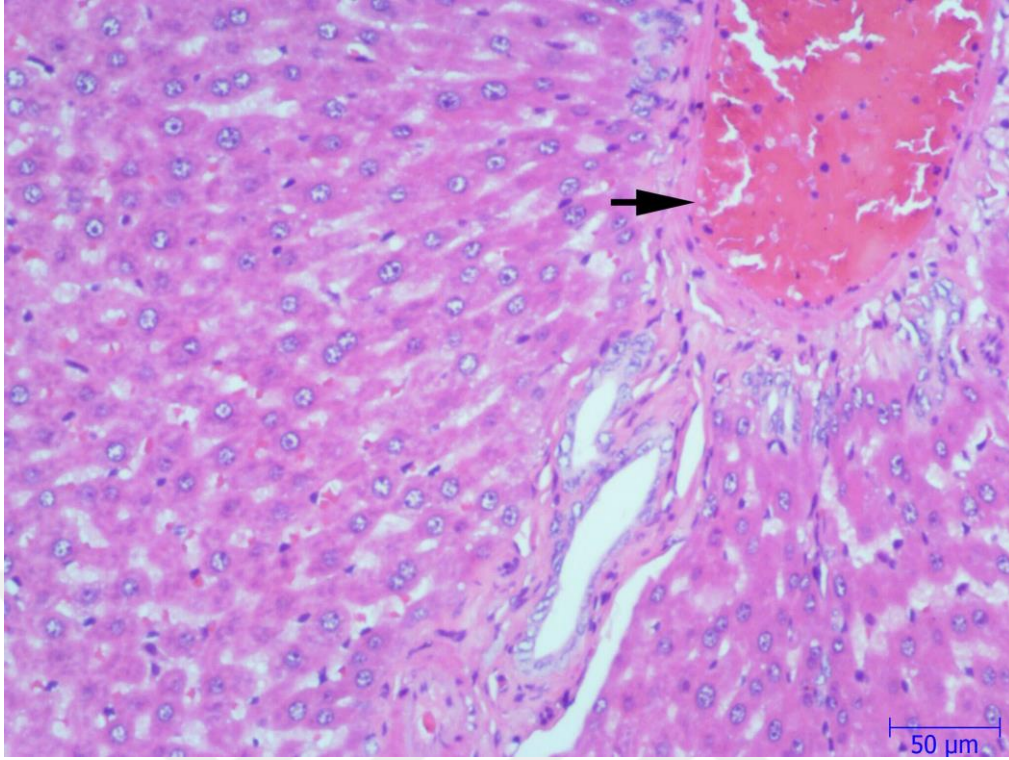
Resim 27. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. H&E boyası.



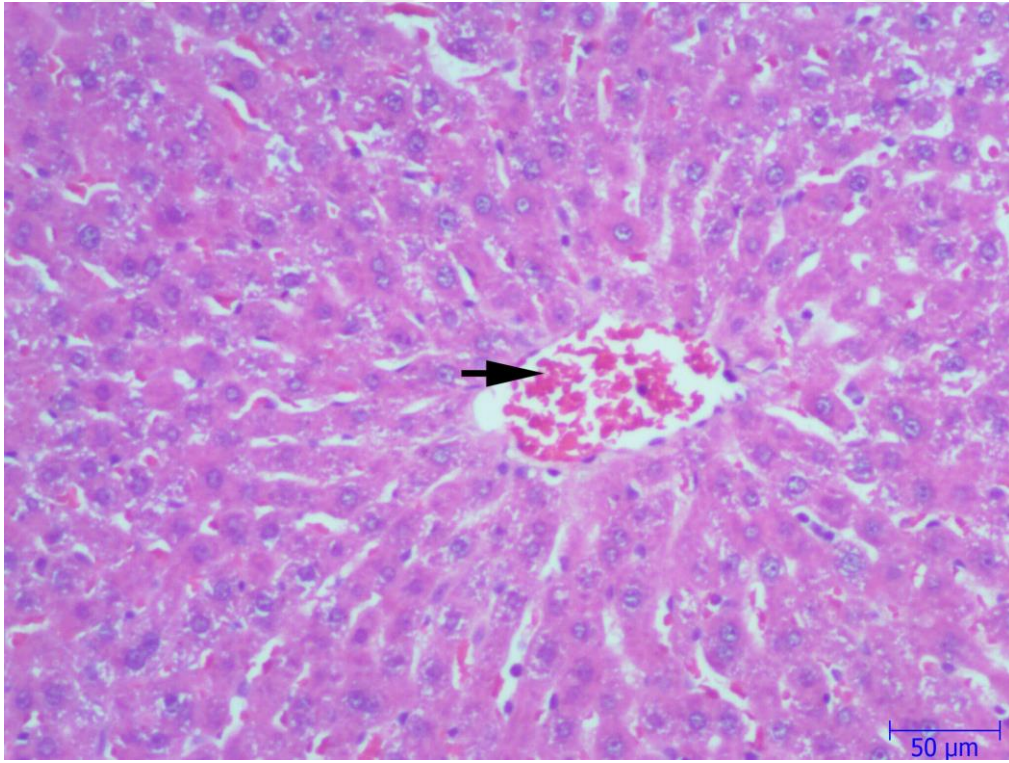
Resim 28. Karaciğer dokusu: FA-inh grubunda hemoraji (yıldız). H&E boyası.



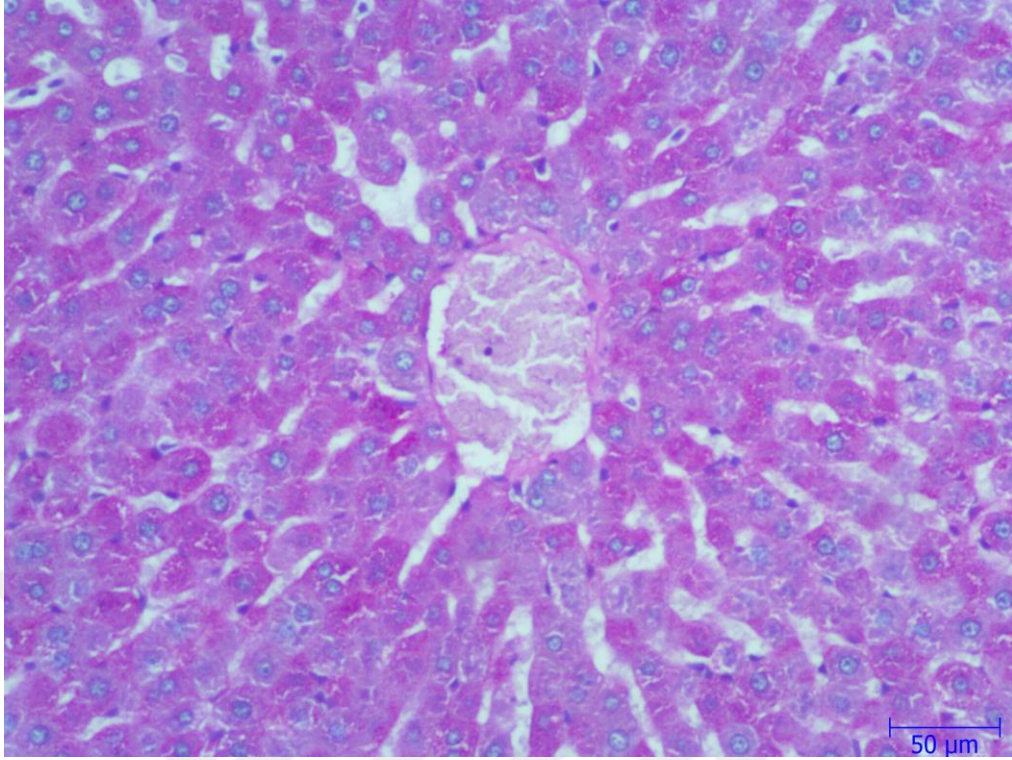
Resim 29. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubunda hemorajide azalma (ok). H&E boyası.



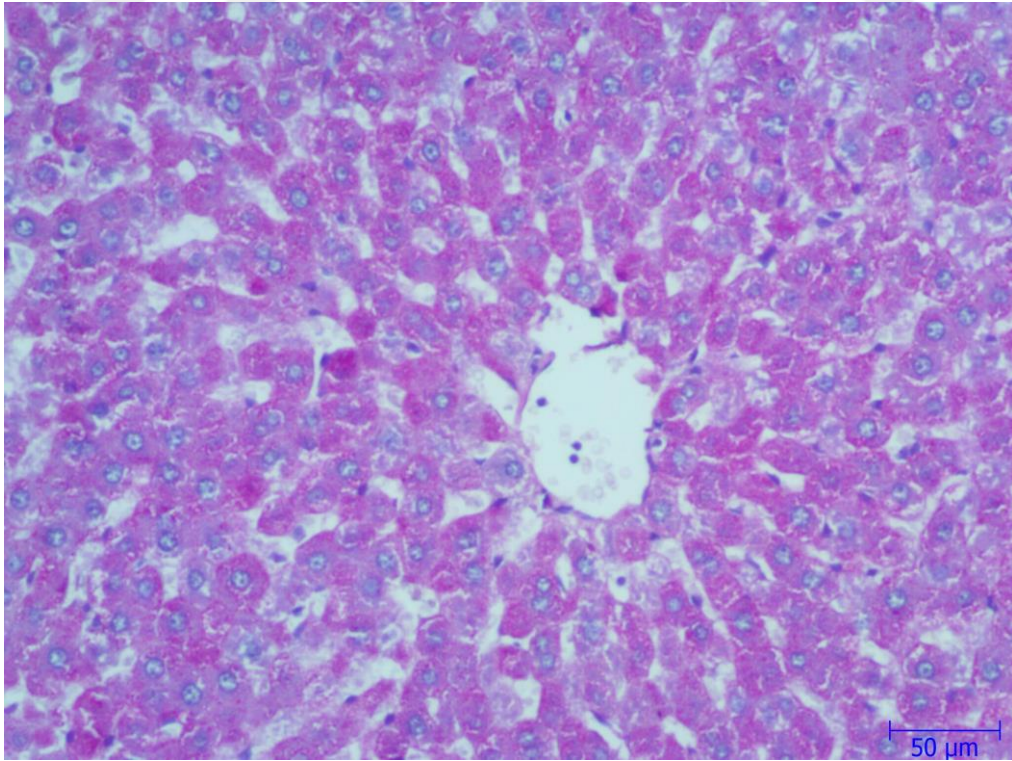
Resim 30. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu. H&E boyası.



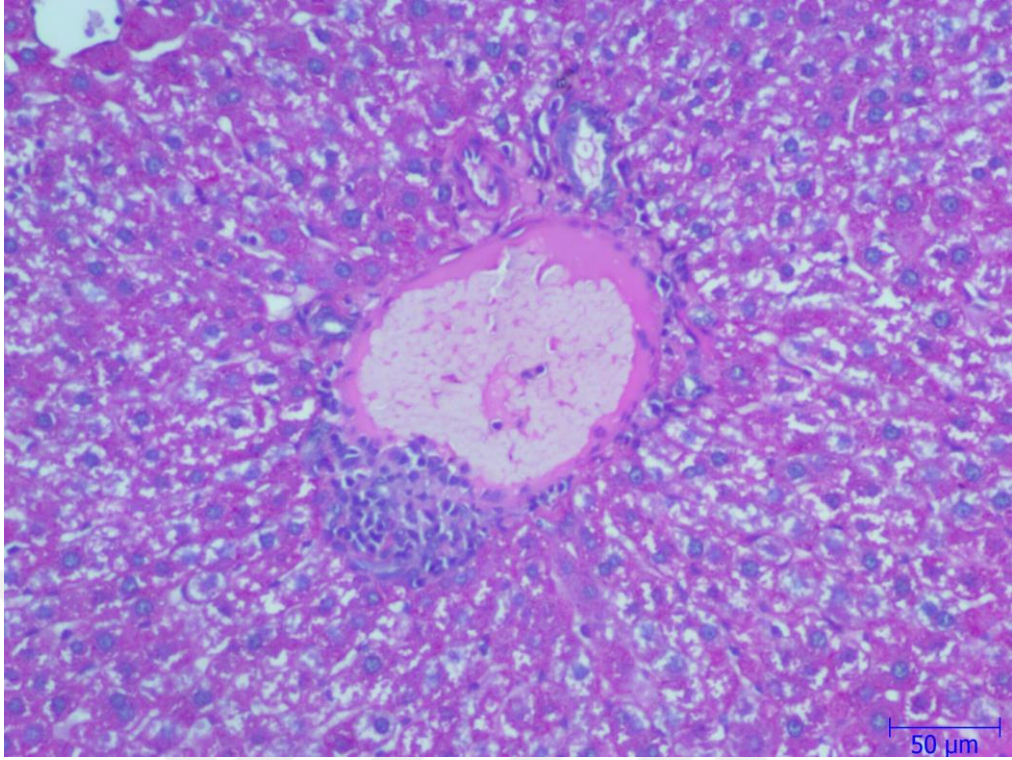
Resim 31. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. H&E boyası.



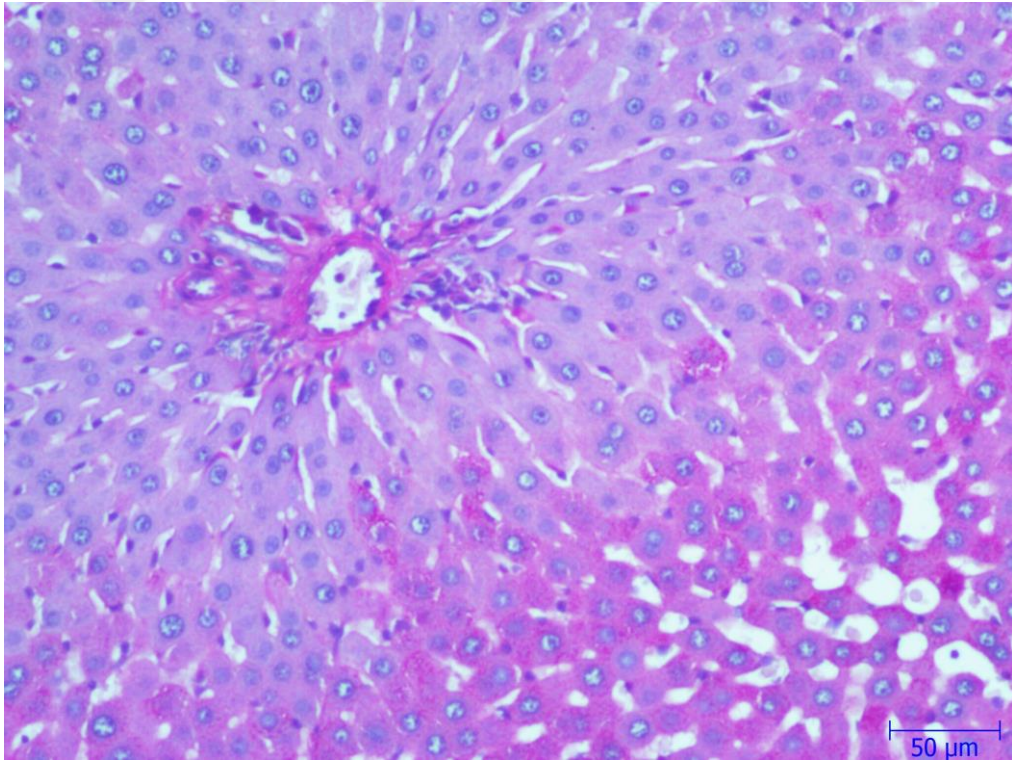
Resim 32. K grubunda karaciğerin normal yapısı. PAS boyası.



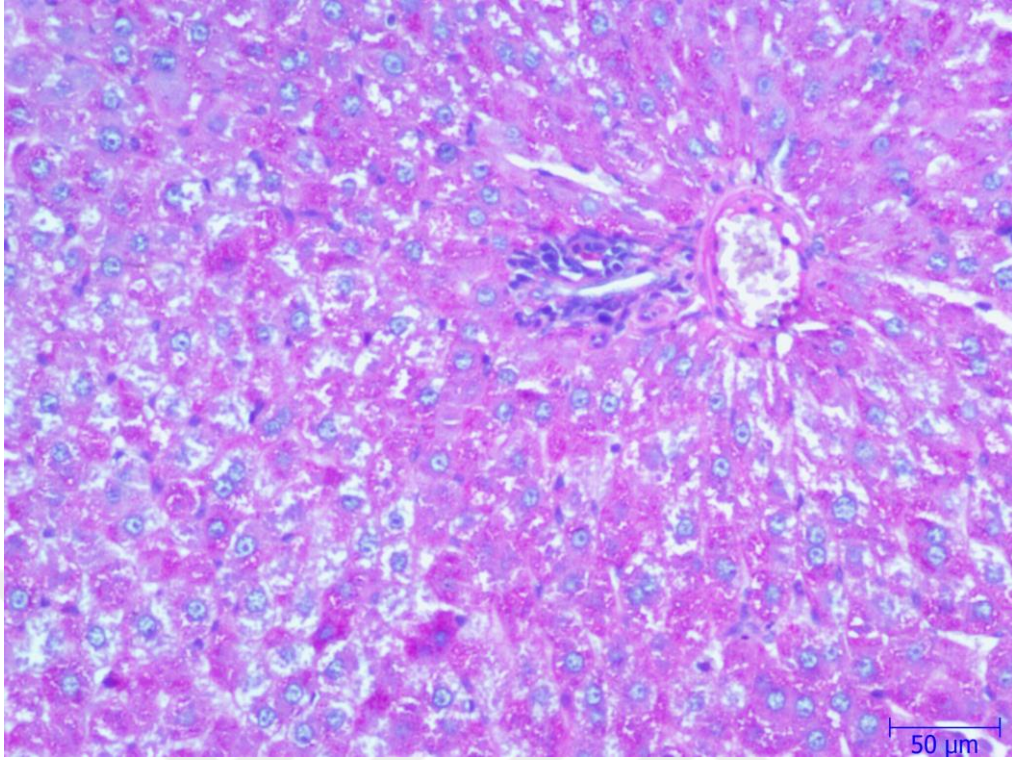
Resim 33. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. PAS boyası.



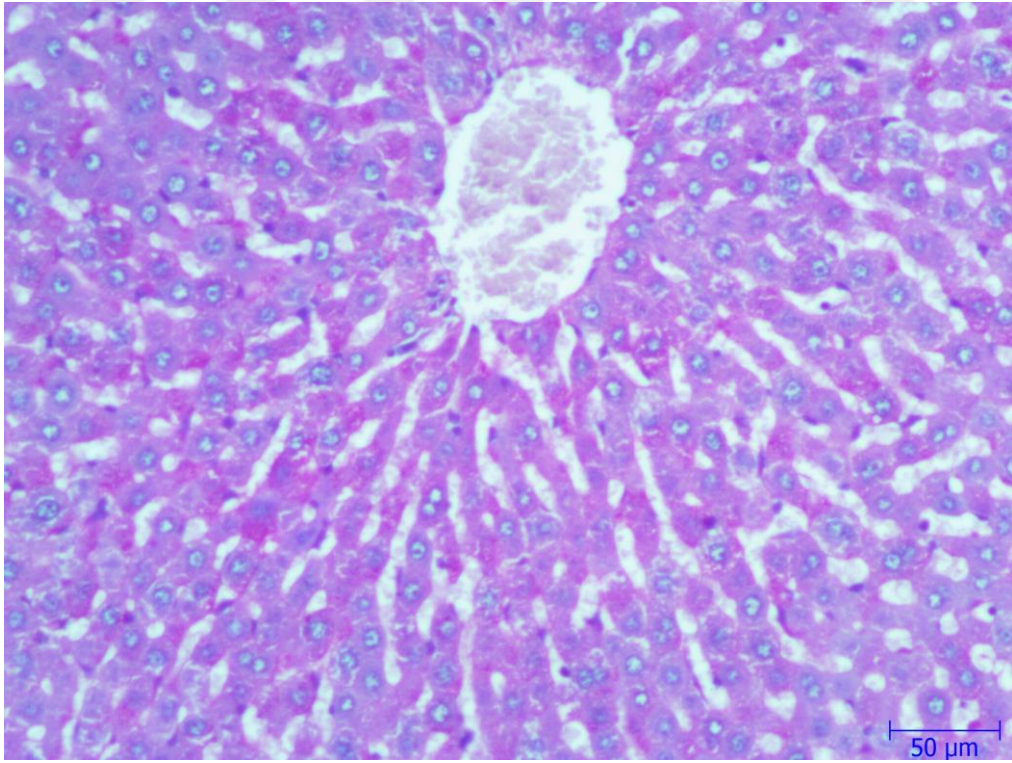
Resim 34. Karaciğer dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası.



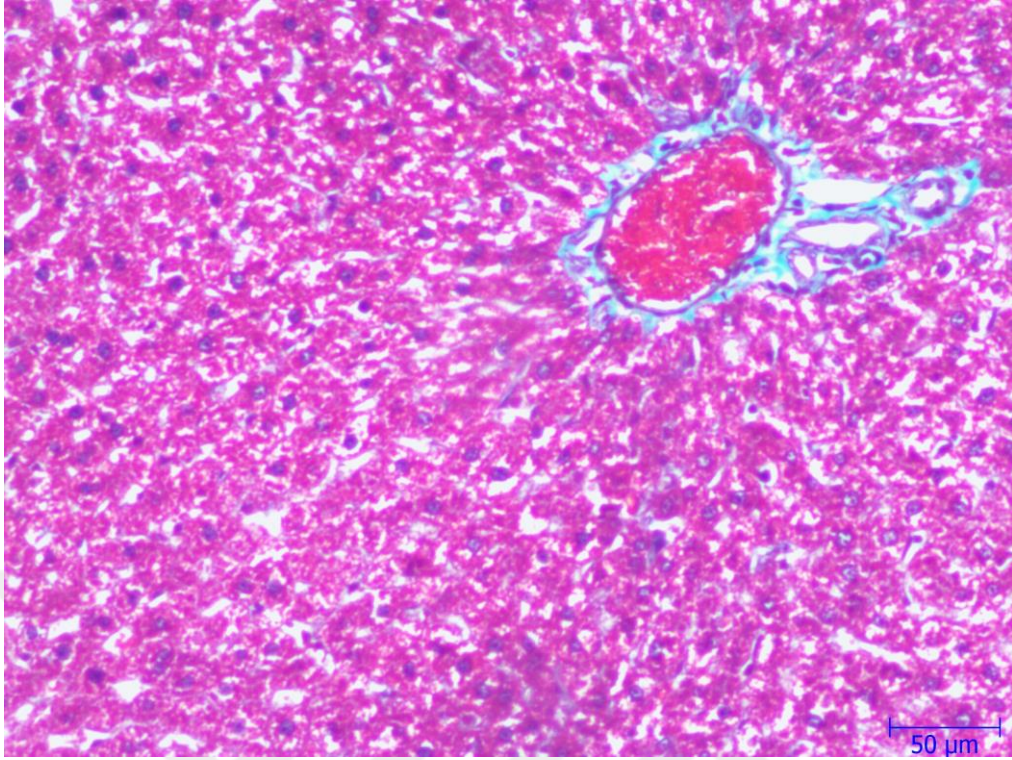
Resim 35. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası.



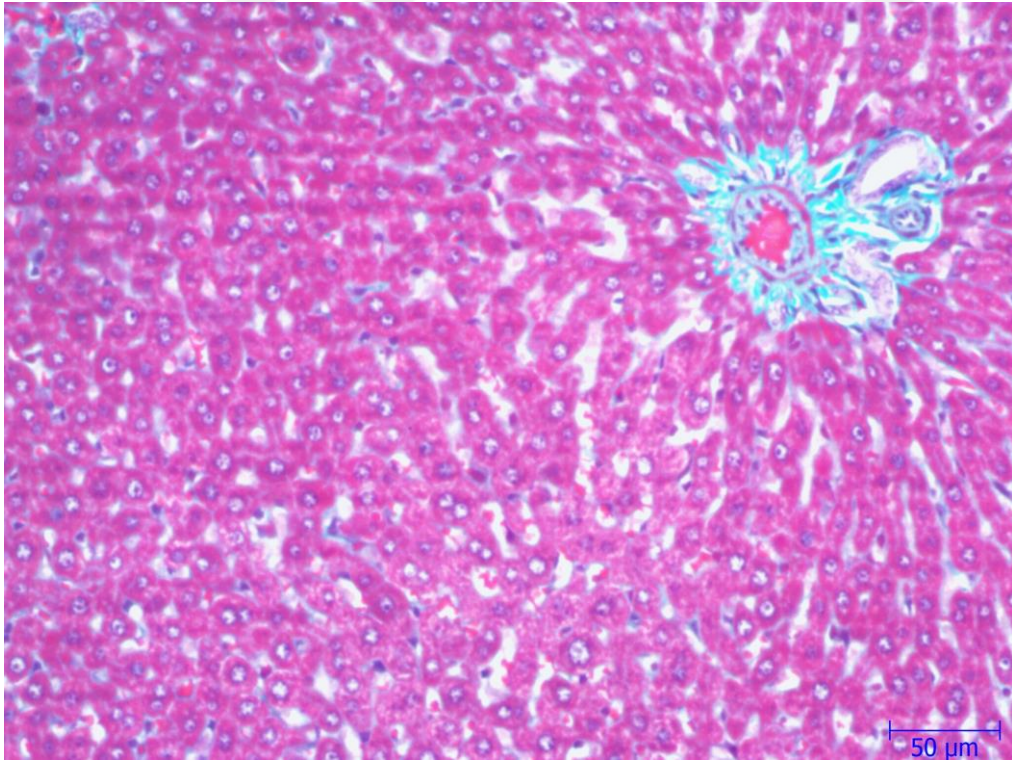
Resim 36. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası.



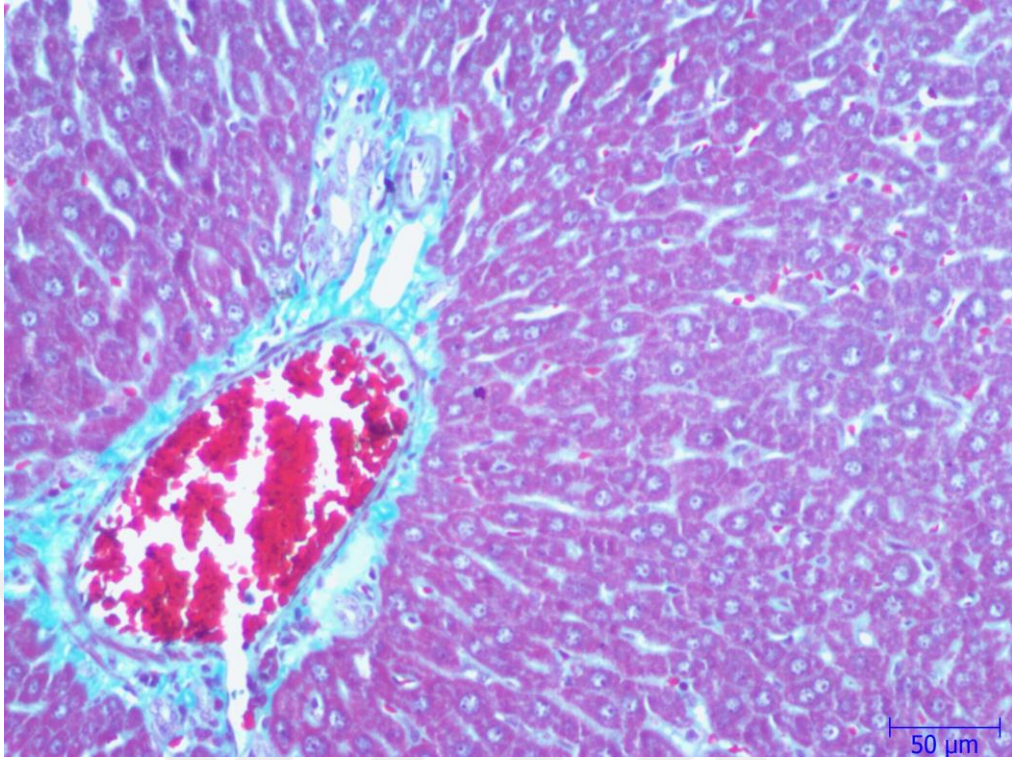
Resim 37. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası.



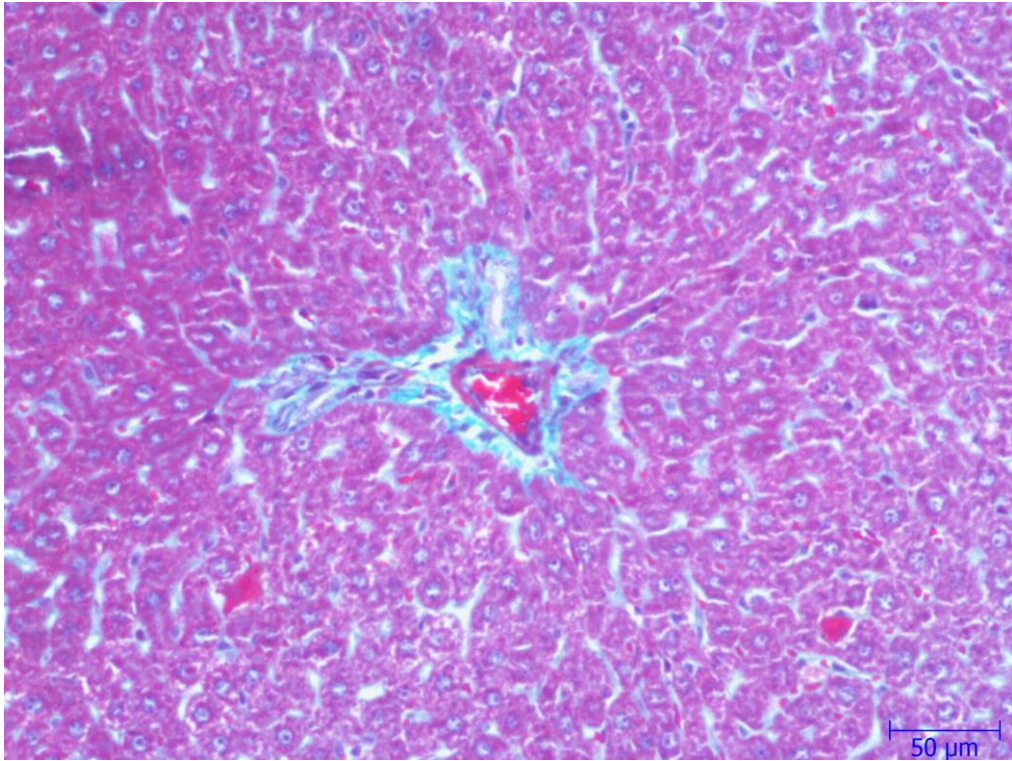
Resim 38. K grubunda karaciğerin normal yapısı. GT boyası.



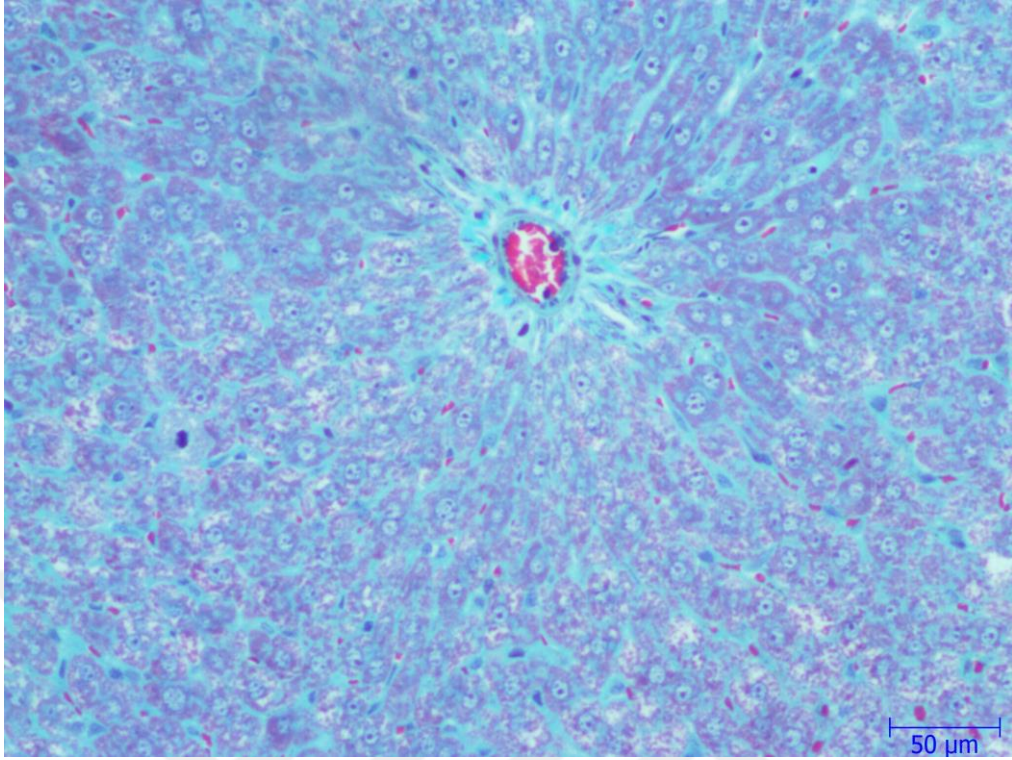
Resim 39. MEL grubunda karaciğerin normal yapısı. GT boyası.



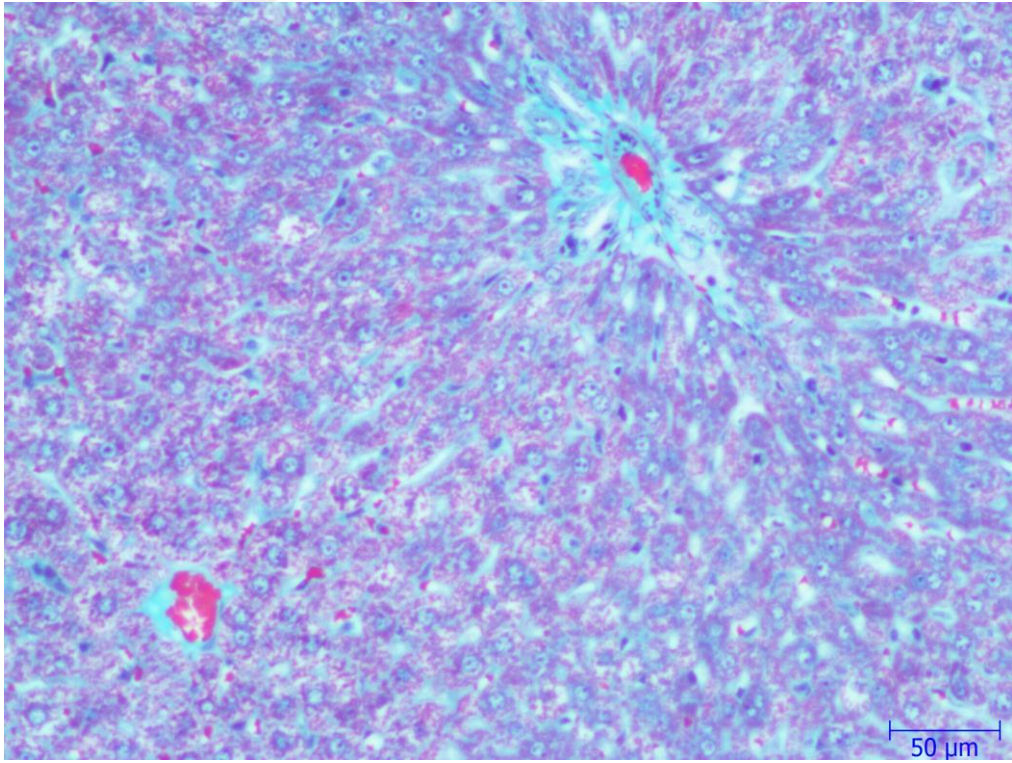
Resim 40. Karaciğer dokusu: FA-inh grubu. GT boyası.



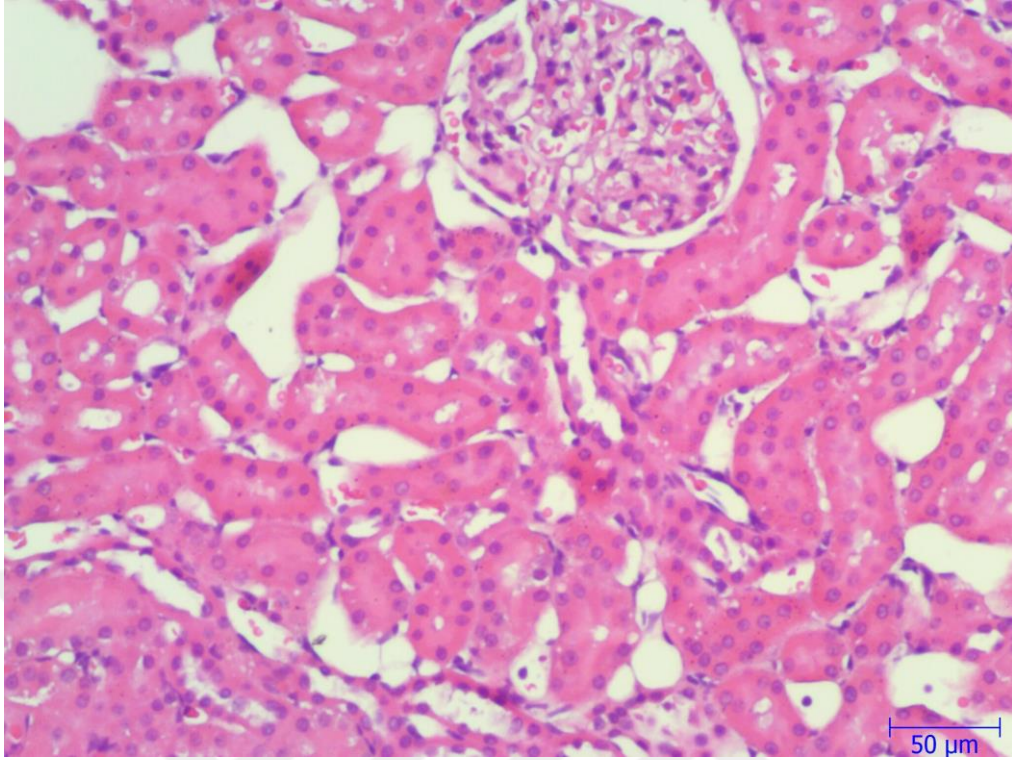
Resim 41. Karaciğer dokusu: FA-inh+MEL grubu. GT boyası.



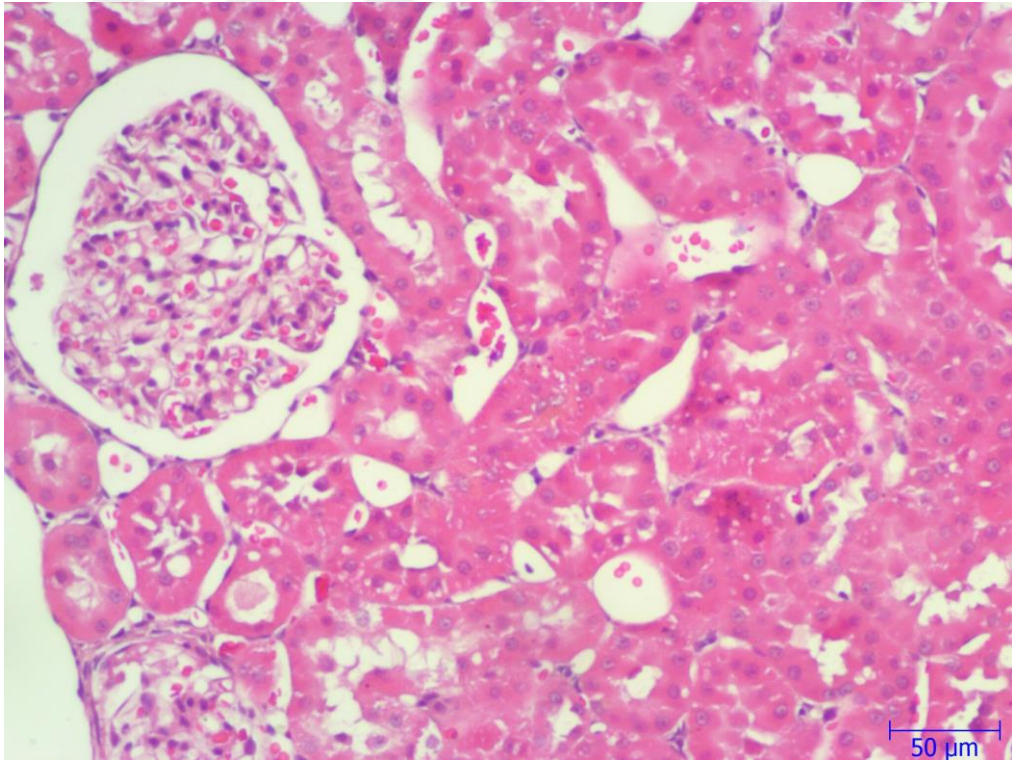
Resim 42. Karaciğer dokusu: FA-ip grubu, kollajen miktarında artma. GT boyası.



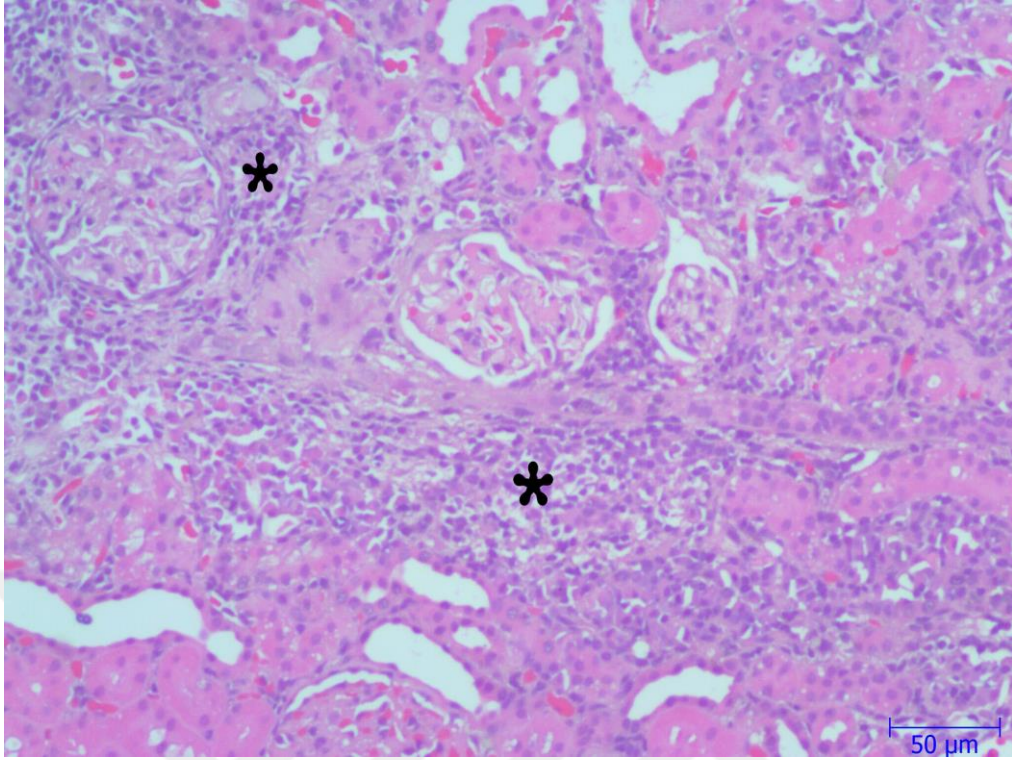
Resim 43. Karaciğer dokusu: FA-ip+MEL grubu, kollajen miktarında azalma. GT boyası.



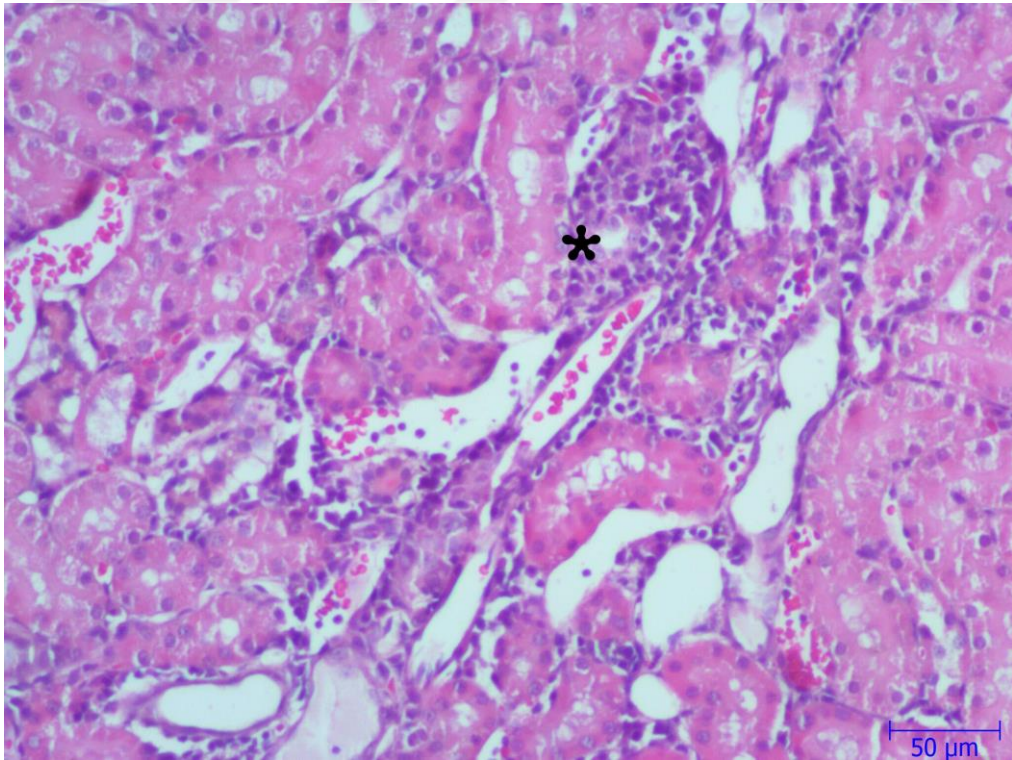
Resim 44. K grubunda böbreğin normal yapısı. H&E boyası.



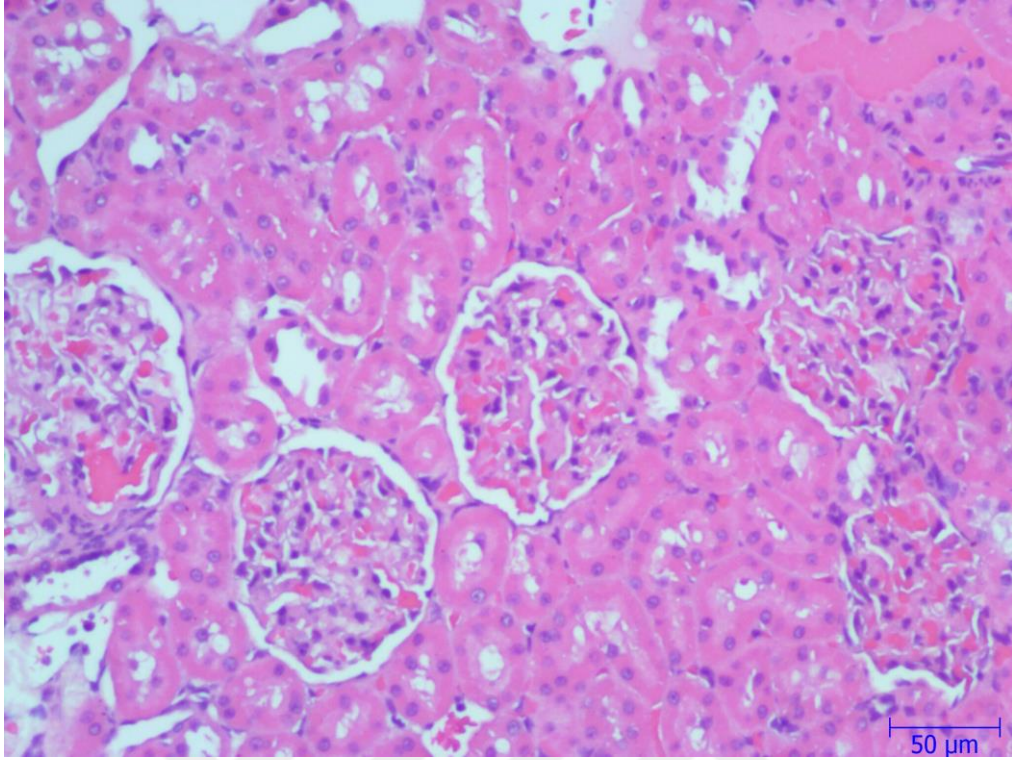
Resim 45. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. H&E boyası.



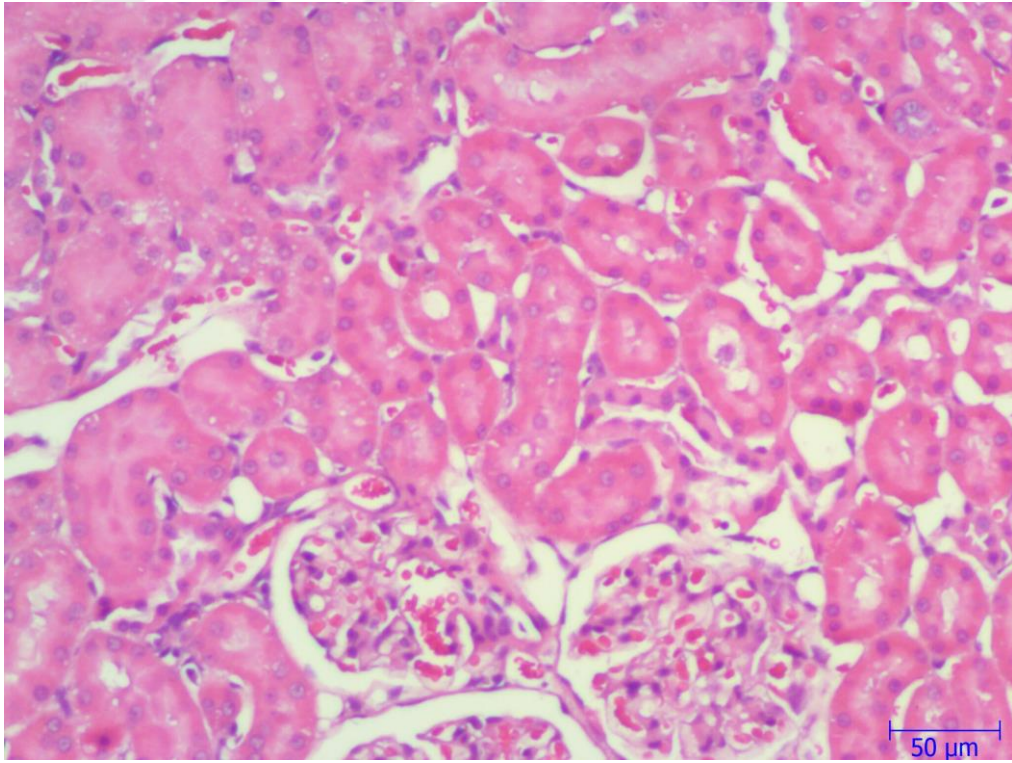
Resim 46. Böbrek dokusu: FA-inh grubu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız). H&E boyası.



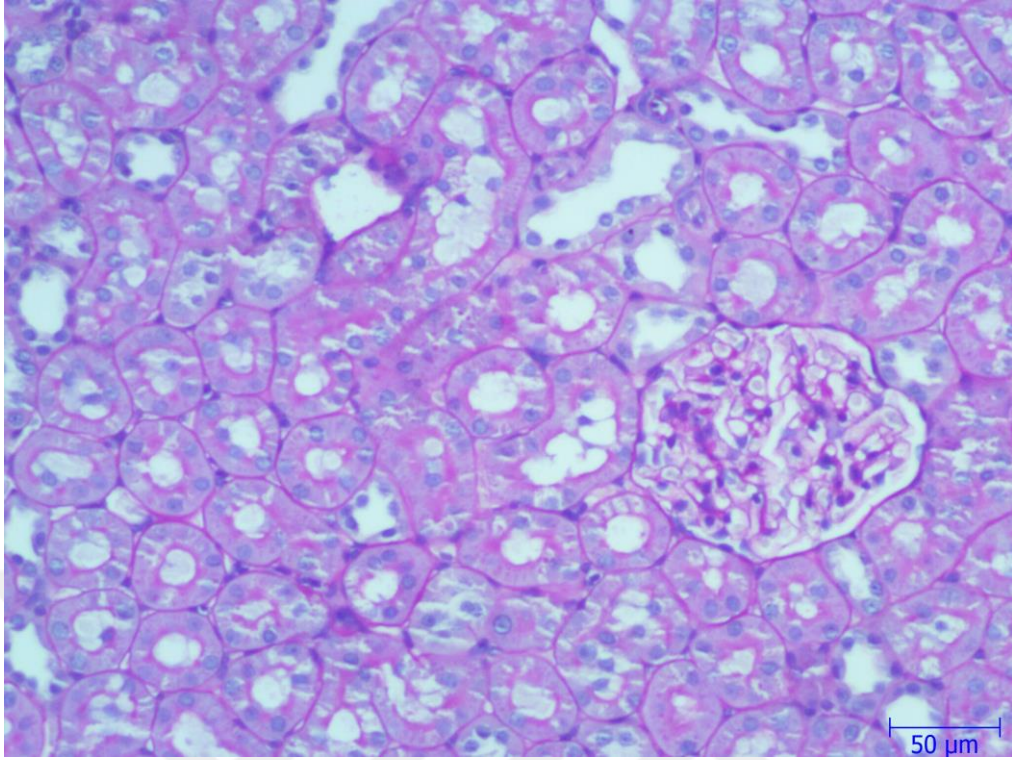
Resim 47. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. H&E boyası.



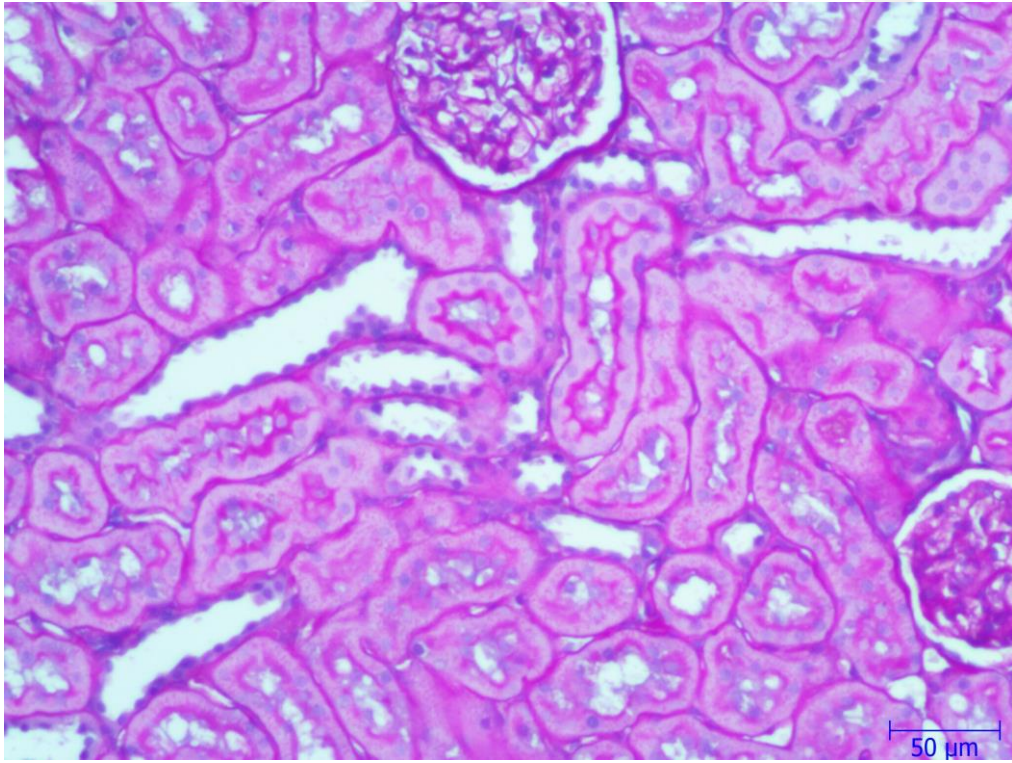
Resim 48. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. H&E boyası.



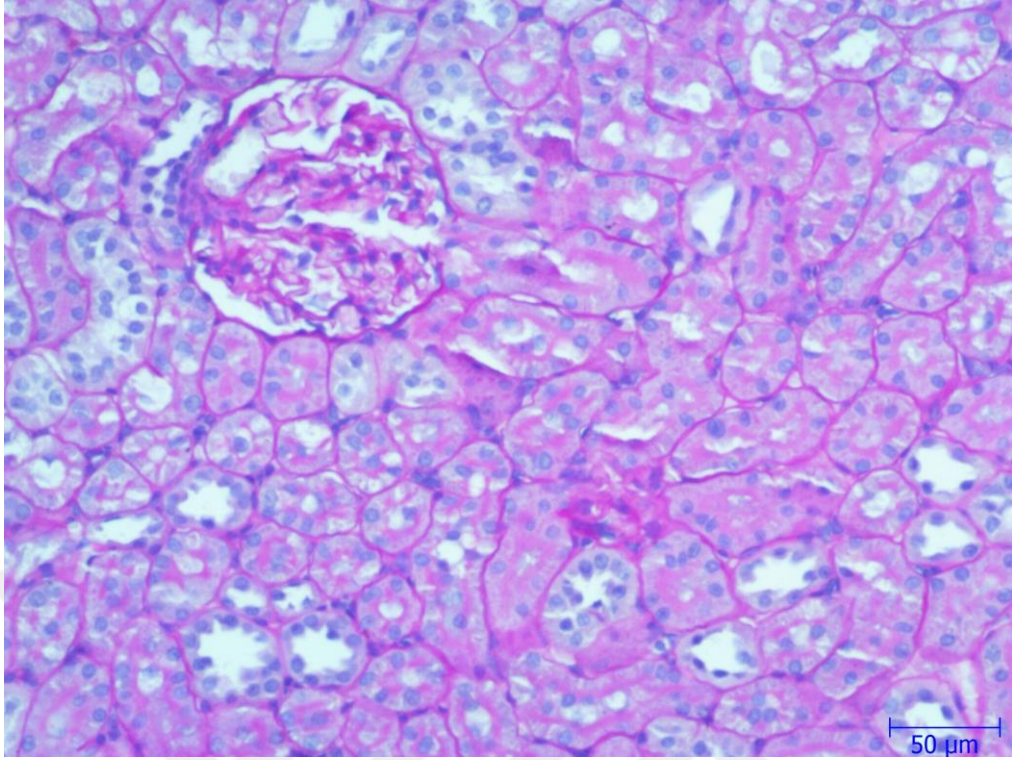
Resim 49. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. H&E boyası.



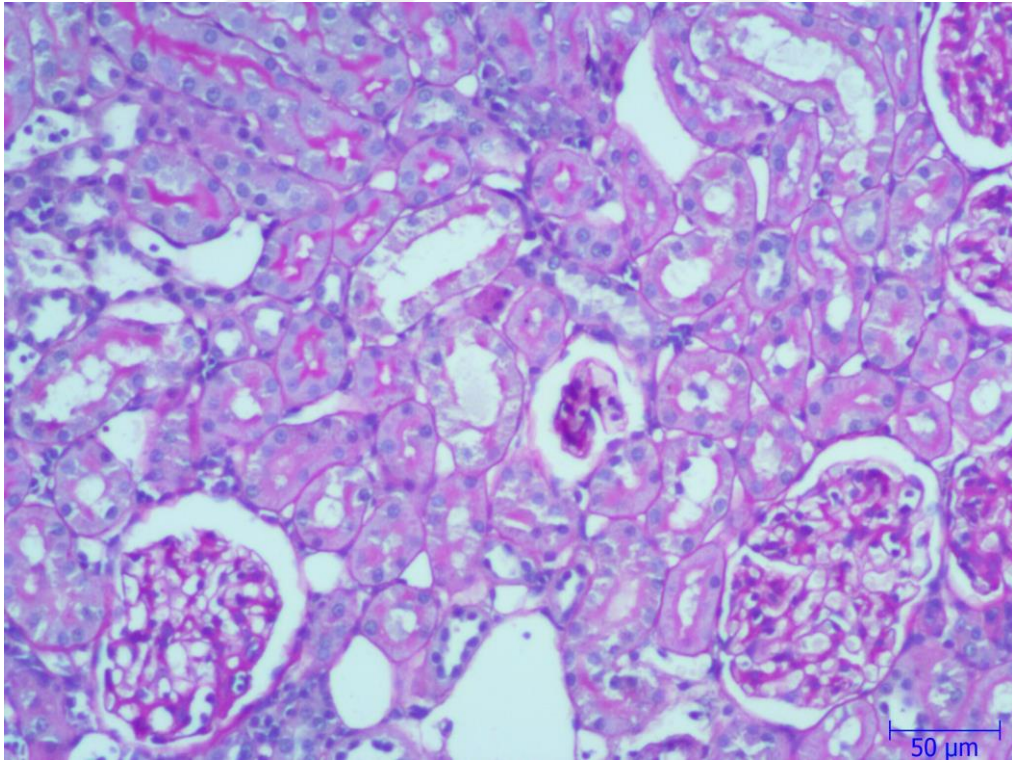
Resim 50. K grubunda böbreğin normal yapısı. PAS boyası.



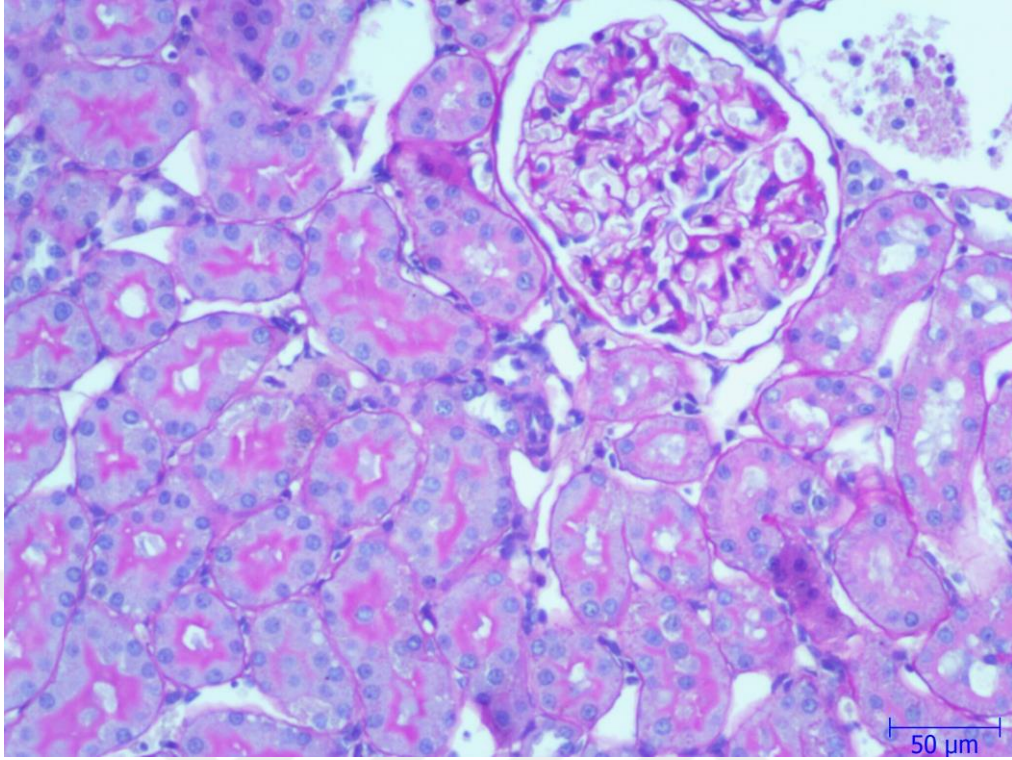
Resim 51. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. PAS boyası.



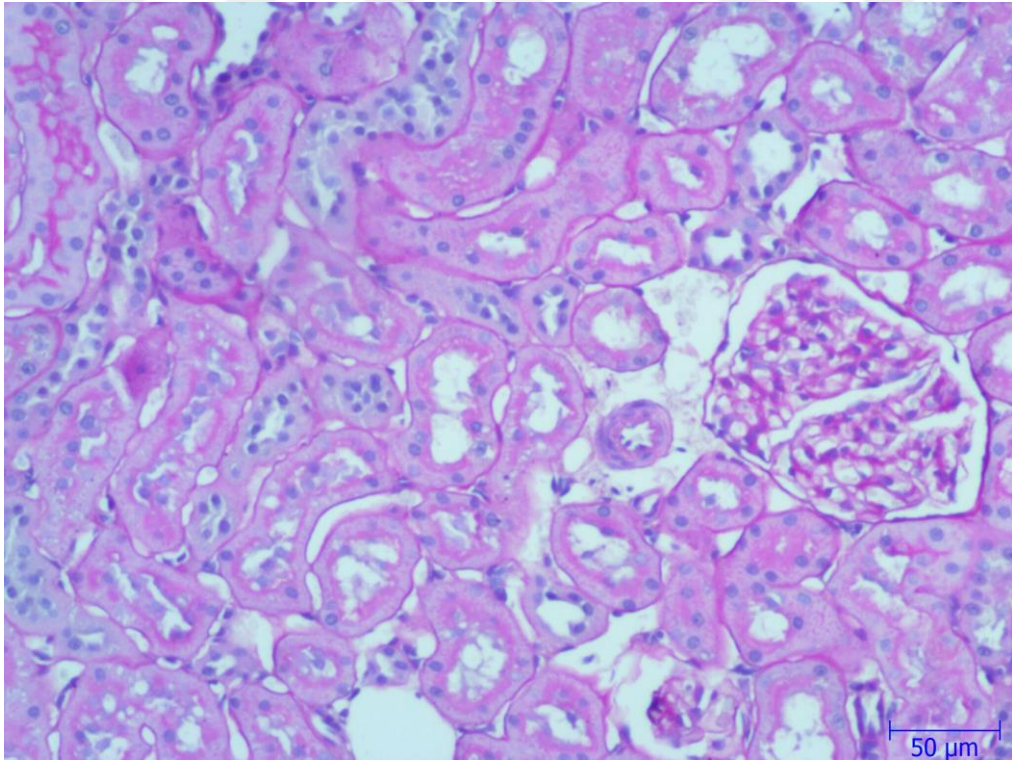
Resim 52. Böbrek dokusu: FA-inh grubu. PAS boyası.



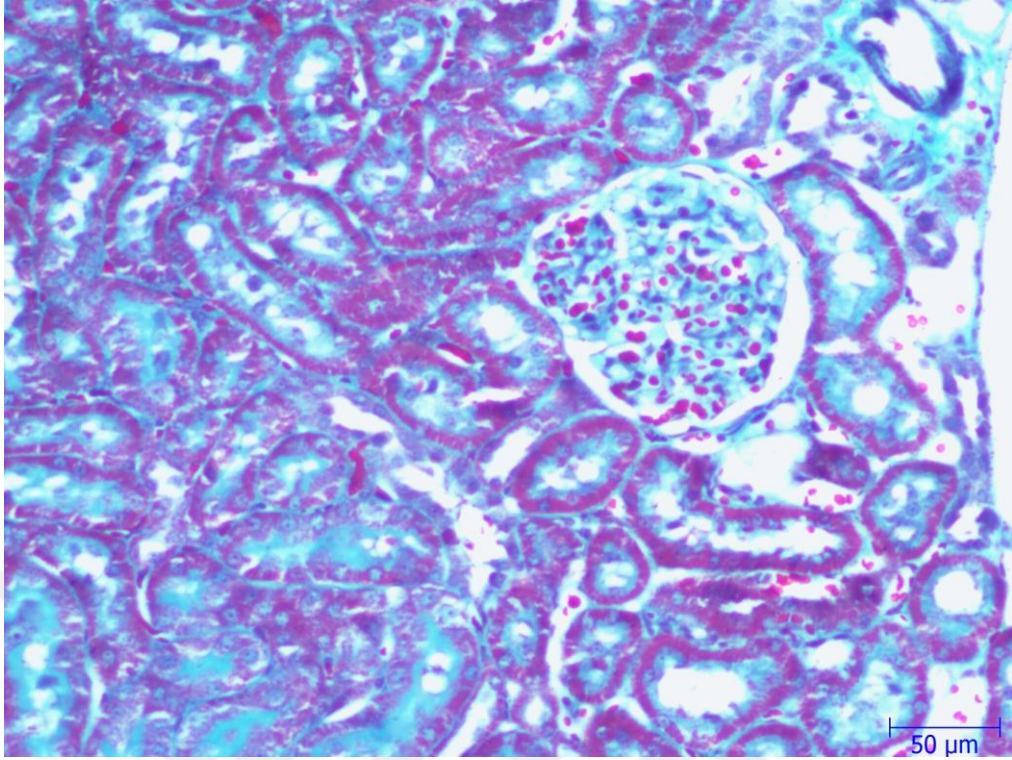
Resim 53. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. PAS boyası.



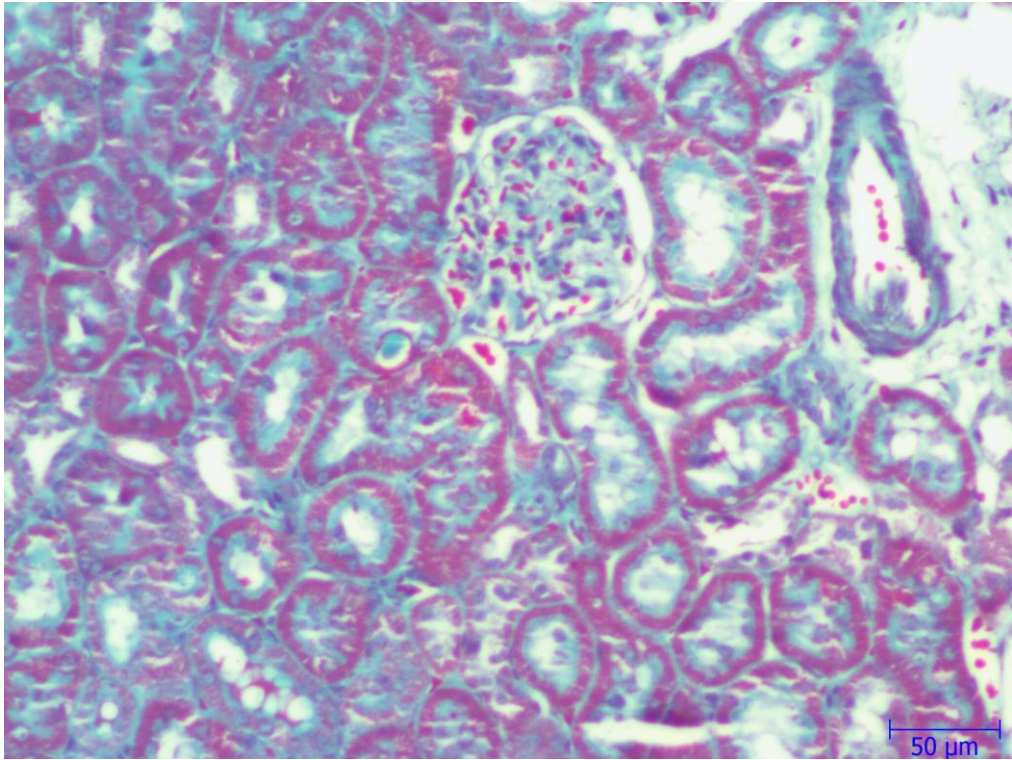
Resim 54. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. PAS boyası.



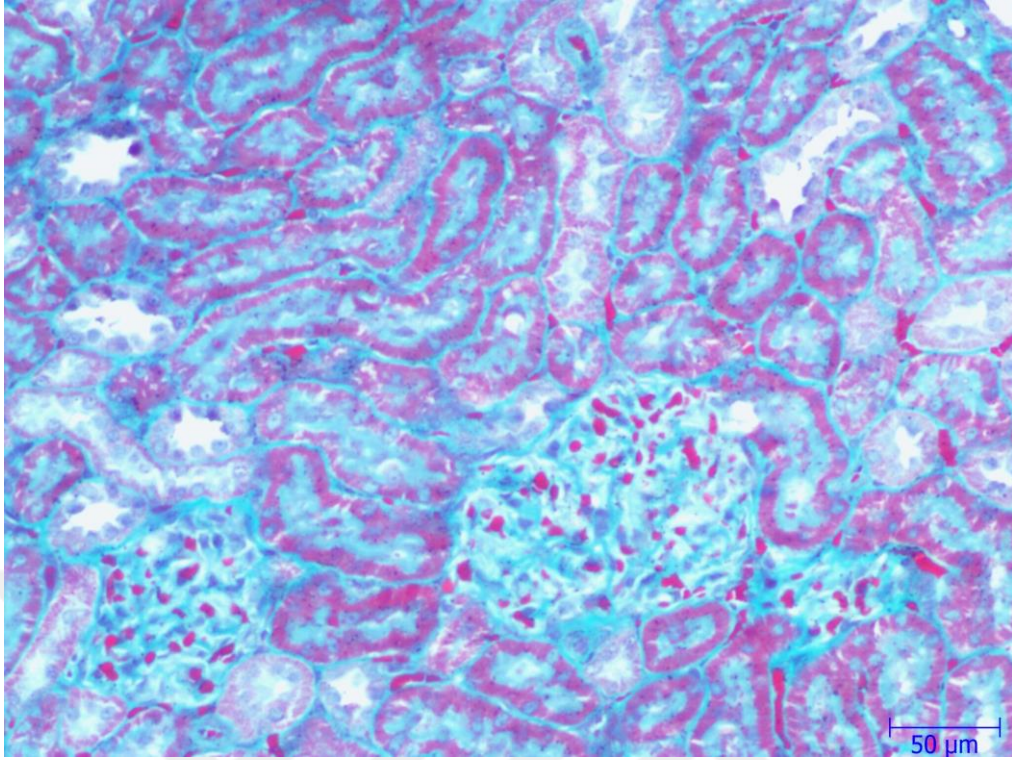
Resim 55. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. PAS boyası.



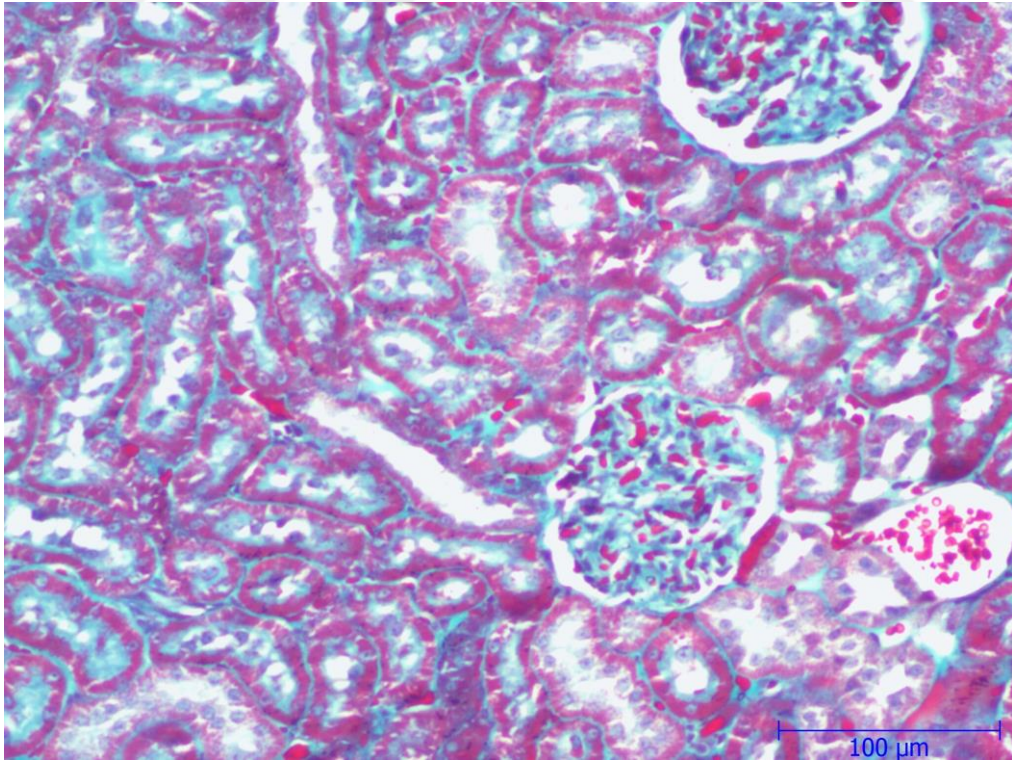
Resim 56. K grubunda böbreğin normal yapısı. GT boyası.



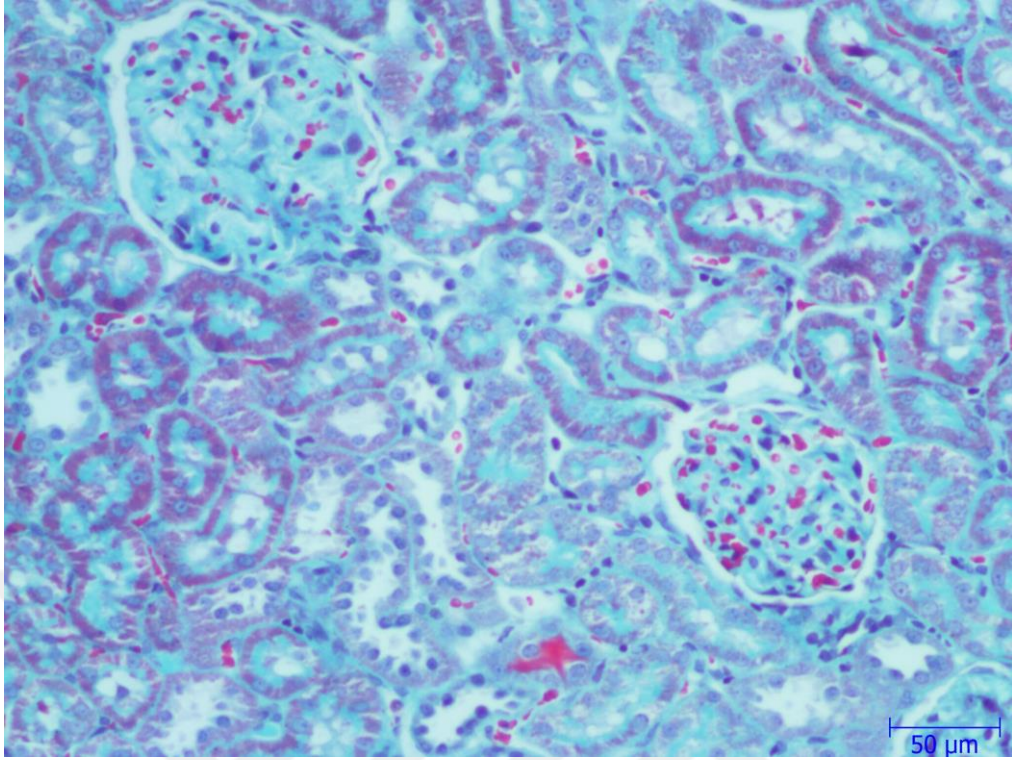
Resim 57. MEL grubunda böbreğin normal yapısı. GT boyası.



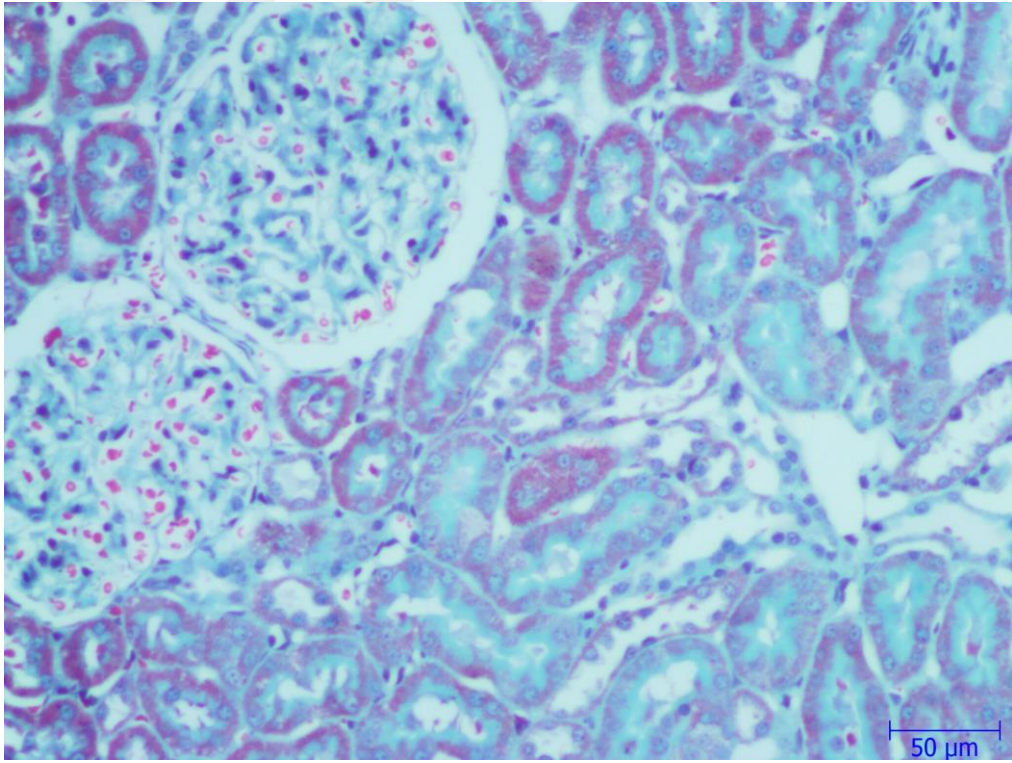
Resim 58. Böbrek dokusu: FA-inh grubu. GT boyası.



Resim 59. Böbrek dokusu: FA-inh+MEL grubu. GT boyası.



Resim 60. Böbrek dokusu: FA-ip grubu. GT boyası.



Resim 61. Böbrek dokusu: FA-ip+MEL grubu. GT boyası.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Formaldehit, aldehit grubunun en basit üyesi olan, renksiz, keskin kokulu, suda yüksek çözünürlüğe sahip ve oldukça reaktif olan bir kimyasal olup, hastane ve sağlık kuruluşlarının anatomi, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında doku ve kadavranın korunması ve fiksasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca mobilya, tekstil ve deri ürünleri sanayisinde, gıda ambalajlarının sterilizasyonu, kozmetik ürünleri, fenolik ve melamin reçinelerin üretimi gibi birçok endüstri alanında da kullanıma sahiptir (Raja ve Sultana, 2012; Olsen ve Døssing, 1982; ATSDR, 1999; Cai ve ark., 2000; Que ve ark., 2007). Geniş bir kullanım alanına sahip olması nedeniyle araştırmacılar FA'nın insan sağlığı üzerine etkilerinin incelenmesine yoğunlaşmıştır. FA maruziyetine bağlı insan sağlığı üzerine ilk olumsuz etkiler 1960'lı yıllarda, prefabrike evlerde yaşayanların gözlerinde ve üst solunum yollarında iritasyona yol açtığı şeklinde bildirilmiştir (Roffael, 1997). Yapılan araştırmalar sonucunda, insan sağlığının olumsuz yönde etkilenmemesi için çeşitli sağlık otoritelerince (WHO, OSHA, NIOSH vb.) gerek işyeri gerekse ev içi havasında bulunmasına izin verilen FA miktarı regüle edilmiştir (IARC, 2012).

Formaldehit sudaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle özellikle solunum yolu ve gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde absorbe olarak biyomoleküllerle reaksiyona girebilmekte ve toksik etkilerini göstermektedir (Khamgaonkar ve Fulare, 1991; Murta ve ark., 2016; Kim ve ark., 2011). Vücutta yarılanma süresinin oldukça kısa olması sebebiyle ilk etkileri temas ettiği dokuda ortaya çıkmaktadır. Başlıca solunum yoluyla maruz kalındığı için özellikle solunum sistemini etkilemekte olup; deri, sinir sistemi ve üreme sistemi üzerine de toksik etkiler göstermektedir (Duong ve ark., 2011; Murta ve ark., 2016; Lyapina ve ark., 2012).

Melatonin kardiyovasküler komplikasyon, konvülsiyon terapisi, vardiyalı çalışma ve jet lag gibi sirkadyen ritim bozukluklarının iyileştirilmesinde önemli rolü olan bir nörohormondur (Altun ve Ugur-Altun, 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar MEL'in serbest radikal süpürücü, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin gen regülasyonu gibi farklı terapötik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Pieri ve ark., 1994; Rodriguez ve ark., 2004; Omurtag ve ark., 2008).

Comet tekniği FA dâhil genotoksik ajanlara maruziyetin biyoizlenmesinde kullanılan ve DNA hasarının düzeyini göstermek amacıyla sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Collins, 2004; Sardas ve ark., 2010; Beceren ve ark., 2016). FA'nın yüksek elektrofilik özellik taşımasından dolayı özellikle nükleofilik merkez içeren DNA ve RNA gibi biyomoleküllerle doğrudan reaksiyona girerek adduktlar oluşturabilme kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir (Lu ve ark., 2010). Ye ve ark.'nın farelerle yaptıkları bir çalışmada inhalasyonla verilen FA'nın DNA-protein çapraz bağlanmalarına yol açtığı görülmüştür (Ye ve ark., 2013). Im ve ark. FA'ya maruz bırakılan sıçanların lenfosit ve karaciğer hücrelerinde neden olduğu DNA hasarını comet tekniği ile incelemiş ve %DNA_T değerlerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür (Im ve ark., 2006). FA'nın DNA üzerine etkileri çeşitli hücre kültürü hatlarında comet tekniği ile araştırıldığında genotoksik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Speit ve Merk, 2002; Speit ve ark., 2007). Ciftci ve ark.'nın sıçanlarla yaptıkları çalışmada i.p. olarak verilen FA'nın 8-OHdG düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Ciftci ve ark., 2015). Benzer şekilde inhale edilen FA'nın sıçanlarda 8-OHdG düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (Im ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2011). Patoloji ve anatomi laboratuvarlarında ve kontraplak fabrikasında çalışanlarla yapılan çalışmalarda FA'nın DNA üzerine etkileri mikronükleus testi, kardeş kromatid değişimi testi ve comet tekniği ile incelenmiş ve FA'ya mesleki olarak maruz kalan çalışmalarda kontrol grubuna göre artmış DNA hasarı tespit edilmiştir (Costa ve ark., 2008; Lin ve ark., 2013).

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada sıçanlara uygulanan FA'nın comet tekniğinde %DNA_T düzeylerinde ve plasma 8-OHdG düzeylerinde istatistiksel bir artışa yol açtığı görüldü. MEL verilen gruplarda ise %DNA_T ve 8-OHdG düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğunu gözlemledik.

Normal fizyolojik fonksiyonlar esnasında ya da dışardan belli ajanlara maruziyet sonucu oluşan serbest radikaller ve bunların etkilerine karşı koruyucu antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine değişmesi durumunda oksidatif stres ortaya çıkar. Organizmanın kimyasallara maruz kalması sonucu hücreiçi ve hücre dışı miktarları artış gösteren ROS'lar membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitlerin yapılarını bozarak oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres FA'nın neden olduğu toksik etkilerin ortaya çıkmasındaki mekanizmalardan biri

olarak görülmektedir (Murta ve ark., 2016; Faghani ve ark., 2014; Abdulqader ve Mustafa, 2014). Bizim çalışmamızda da FA maruziyeti sonucunda akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stres parametrelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü. GSH endojen olarak üretilen ve FA dahil olmak üzere birçok ksenobiyotigin detoksifikasyonunda rol alan antioksidan bir moleküldür. GSH'nin hücrelerde birincil görevi ROS'ları süpürerek biyomoleküllerin hasarına karşı koruyucu bir rol oynamasıdır. Vücuttaki GSH'nin yaklaşık %40'ı karaciğerde bulunmaktadır. GSH hücrelerde FA ile direkt etkileşime girerek önce S-hidroksimetil-GSH'ye sonra da formik asite dönüşerek vücut dışına atılmasına katkıda bulunur (Teng ve ark., 2001). Artmış FA maruziyeti sonucunda GSH depoları tüketilerek doku ve hücrelerde hasara yol açmaktadır (Matsuoka ve ark., 2010).

Çalışmamızda FA verilen sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında GSH seviyelerinin istatistiksel olarak düştüğü görüldü. GSH düzeylerinde görülen bu düşüş ile FA'nın GSH ile konjuge olarak formik asite yıkımı ve atılımının sınırlanması beklenmektedir. Dokularda görülen bu etkilerin FA ile beraber MEL uygulaması ile tersine döndüğü ve GSH düzeylerinin yükseldiği gözlemlendi. Bu durum MEL'in antioksidan özelliği taşıdığını ve FA maruziyetinin dokularda neden olduğu oksidan hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği şeklinde yorumlandı.

Lipit peroksidasyonu dokularda ROS artışına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres durumunda meydana gelmektedir. Özellikle membran lipitlerinin oksidasyona uğraması sonucu hücrenin fonksiyonel bütünlüğünde bozulma olmaktadır. MDA lipit peroksidasyonunun bir ürünü olup aynı zamanda dokularda oksidan hasarın gösterilmesinde kullanılan bir biyogöstergedir (Casini ve ark., 1986). Tang ve ark.'nın farelerde 5 gün boyunca i.p. olarak FA uygulaması sonucu testis dokularında MDA düzeylerinde artış olmuştur (Tang ve ark., 2003). Zararsız ve ark.'nın yaptığı deneysel çalışmada 14 gün boyunca sıçanlara FA uygulaması sonucu beyin dokularında MDA değerlerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Zararsız ve ark., 2006). Sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada FA'nın serum total antioksidan kapasitesini düşürdüğü ve serum MDA düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (Ciftci ve ark., 2015). Murta ve ark.'nın sıçanlarda farklı dozlarda FA uygulaması sonucu akciğer dokularında artan FA konsantrasyonuna bağlı olarak MDA düzeylerinin arttığı görülmüştür (Murta ve ark., 2016). Söğüt ve ark.'nın subakut (4 hafta) olarak

sıçanlarda yaptığı çalışmada FA'nın karaciğer GSH düzeylerini düşürdüğü ancak MDA düzeylerinde anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür (Söğüt ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda 6 hafta boyunca günde 6 ppm olarak inhalasyonla ve 14 gün boyunca i.p. 10 mg/kg/gün uygulanan FA'nın sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı görüldü. MDA düzeylerinde görülen bu artışın dokularda FA maruziyetine bağlı olarak tüketilen GSH depolarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. FA ile beraber MEL uygulamasının doku GSH düzeylerini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda MDA düzeylerinin de düşmesini sağlayarak lipit peroksidasyonunu önemli ölçüde önlediği görüldü. Bu durum FA toksisitesinde antioksidanların önemini yüksek olduğunun ve doku antioksidan kapasitesini artırarak aynı zamanda lipit peroksidasyonunun önlenmesinde de önemli rolleri olduğunun göstergesi olarak düşünülebilir. Yüksek MDA düzeylerinin DNA ile etkileşim sonucu tek-zincir kırıkları, şeker-fosfat iskeletinde ve belli bazlarda modifikasyonlar oluşturarak mutasyonlara yol açabileceği bildirilmiştir (Negre-Salvayre ve ark., 2008; Catala, 2009). Çalışmamızdan elde edilen verilere göre yüksek %DNA_T düzeyleri ile dokularda artmış MDA düzeyleri arasında korelasyon olduğu görülmüştür.

Fagositik hücrelerde bulunan lizozomal bir enzim olan MPO inflamatuvar süreçte ekstraselüler sıvıya salınır. Polimorfonükleer lökositlerin %90'dan fazlasını oluşturan nötrofiller; ROS'lar ve sitokinler tarafından aktive edilirler. Aktive nötrofiller dokularda MPO enzimi salınımı sağlar ve oksidatif stres durumunda artmış MPO aktivitesi oksidan moleküllerin üretimini ve nihayetinde doku hasarına yol açar (Nauseef, 1998; Şener ve ark., 2015). Sıçanlarla yapılan iki farklı çalışmada FA maruziyetinin karaciğer dokularında MPO aktivitesini anlamlı derecede arttırmadığı bildirilmiştir (Bakar ve ark., 2015; Sogut ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda FA maruziyetinin akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MPO aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür. FA maruziyeti ile beraber MEL uygulamasının dokularda MPO aktivitesini düşürdüğü görüldü, sadece akciğer dokusunda i.p. olarak verilen FA'ya karşı MEL uygulamasının MPO aktivitesini anlamlı derecede düşürmediği görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda MPO aktivitesi tayininden elde edilen veriler ışık mikroskobu incelemelerinde dokularda gözlemlenen orta derece inflamasyon ile desteklenmektedir.

Oksijen-türevi serbest radikallerin doku hasarındaki rolleri daha önceki çalışmalarda raporlanmış (Bakar ve ark., 2015; Arthur ve ark., 1985) ve serbest radikallerin süpürülmesinin dokuların oksidan hasara karşı korunmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Ciftci ve ark., 2015; Alturfan ve ark., 2012; Sener ve ark., 2007). SOD, CAT, ve GPx (glutasyon peroksidaz) enzimleri dokularda oluşan ROS'ların enzimatik olarak parçalanmasında ve zararsızlaştırılmasında rol alan enzimlerdir. SOD enzimi süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyerek lipid peroksidasyonunun önlenmesinde rol oynar. CAT yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksiti suya parçalar. GPx enzimi ise hem düşük konsantrasyonda bulunan hidrojen peroksiti suya parçalar hem de lipid hidroperoksitlerinin dokulardan uzaklaştırılmasında rol oynar. Bu enzimlerin aktivitelerinde meydana gelecek azalma ile dokularda bulunan ROS miktarında artış meydana gelecektir. Önceki çalışmalarda FA maruziyetinde bu enzimlerin aktivitelerinin düştüğü raporlanmıştır (Bakar ve ark., 2015; Gerin ve ark., 2016). Ancak literatürde FA maruziyeti ile ROS miktarlarının kemilüminesans yöntemle ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda FA maruziyeti sonrasında akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında luminol ve lusigenin aracılı ROS miktarları ölçülmüştür. Akciğer dokusunda kemilüminesans ölçümler incelendiğinde luminol düzeylerinin sadece FA-inh grubunda artış gösterdiği görülmüştür. Buna karşın FA ile beraber MEL uygulamasının luminol düzeylerini düşürdüğü görülmüştür. Karaciğer dokusunda luminol düzeylerinin FA-inh ve FA-ip gruplarının her ikisinde de arttığı gözlemlenmiştir. MEL uygulaması ile luminol düzeylerinin karaciğer dokusunda azaldığı görülmüştür. FA-inh ve FA-ip gruplarında akciğer ve karaciğer dokularında lusigenin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiş ve bu etkilerin MEL uygulaması ile azaldığı görülmüştür. Böbrek dokusunda luminol düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık taşımadığı görülmüştür. Böbrek dokusunda lusigenin düzeyleri incelendiğinde ise FA-ip grubunda artış olduğu ve MEL uygulaması ile lusigenin düzeyinin düştüğü görülmüştür. Önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi FA'nın SOD aktivitesini azaltarak dokularda serbest radikal salınımını arttırdığı ve hücre içi oksidan/antioksidan dengesi oksidan yönünde değiştirdiği sonucuna varmaktayız.

Uçmaklı ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada FA maruziyeti sonrasında karaciğer dokusunda iNOS ekspresyonu immünohistokimyasal olarak ve NO düzeyi ise spektrofotometrik olarak incelenmiş, doku iNOS ekspresyonu ve NO düzeyinde artış olduğu raporlanmıştır (Uçmaklı ve ark., 2013). Bir başka çalışmada ise FA verilen sıçanların kalp dokularında NO düzeylerinin arttığı görülmüştür (Güleç ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda kemilüminesans yöntemiyle akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında NO düzeyleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. Akciğer ve karaciğer NO düzeyleri FA-inh ve FA-ip gruplarının her ikisinde de kontrole göre anlamlı bir artış göstermiş olup böbrek dokusunda sadece FA-ip grubunda NO düzeyinin arttığı görülmüştür. MEL uygulamasının FA'nın indüklediği NO düzeylerini baskılayarak dokulardaki düzeylerini azalttığı görülmüştür.

Campos ve ark.'nın farelerle yaptığı bir çalışmada sigara dumanına maruz kalma sonucunda alveolar lümen alanında artış olduğu gözlenmiştir (Campos ve ark., 2014). Murta ve ark.'nın yaptığı çalışmada alveolar lümende artış, septa hacim yoğunluğunda azalma ve inflamatuvar hücre artışı görülmüştür (Murta ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda FA maruziyetine bağlı olarak FA-inh grubunda akciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar septa kalınlaşması ve kollajen miktarında artış görülmüştür. FA ile beraber MEL uygulaması oksidatif doku hasarını azaltmıştır. FA-ip grubunda ise belirgin bir farklılık görülmemiştir. Akciğer dokusunda görülen bu histopatolojik değişiklikler artmış MDA düzeyleri ve GSH depolarında azalma şeklinde ortaya çıkan biyokimyasal parametrelerle de desteklenmektedir. Oksidatif stres ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu arasındaki ilişki daha önceki çalışmada ortaya konmuş ve dokuda artmış ROS miktarı hücrelerde inflamatuvar cevabı indüklemektedir (Murta ve ark., 2016). Bu nedenle FA'nın lipitler, proteinler ve DNA ile doğrudan etkileşerek ya da dolaylı yoldan normal hücre metabolizmasını engelleyerek ROS üretimini indüklediği öne sürülebilir. MEL'in oksidatif doku hasarına karşı iyileştirici antioksidan etkileri daha önceki bir çalışmada bildirilmiştir (Omurtag ve ark., 2008). MEL'in FA'nın indüklediği hasara karşı antioksidan savunma sistemini destekleyerek pulmonar dokuyu koruduğu düşünülebilir.

Karaciğer FA dahil dışardan maruz kaldığımız toksik bir çok ksenobiyotığın metabolizmasının merkezinde yer alan hayati bir organdır. Dolayısıyla, karaciğer

sahip olduğu yüksek metabolik aktivite nedeniyle toksik maddelerin ana hedef organıdır. Deney hayvanları ile yapılan çeşitli çalışmalar FA'nın hepatositlerde dejenerasyonlara (Uçmaklı ve ark., 2013), portal ve santral vende hasarlara (Bakar ve ark., 2015), membran bütünlüğünde bozulmalara ve vakuolizasyona (Strubelt ve ark., 1989) neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda karaciğer dokusunda ışık mikroskobu incelemelerinden elde edilen sonuçlar daha önceki bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Portal alanda ve hepatositlerde görülen hasarı sinüzoidlerde konjesyon bulgularının takip ettiği görülmüştür. FA ile beraber MEL uygulamasının hepatic hasarı iyileştirdiği, konjesyon ve hepatosit hasarının daha az olduğu görülmüştür. FA'nın indüklediği böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler glomerüllerde epitel hasarı, mononükleer hücre infiltrasyonu ve proksimal ve distal tubullerde dejenerasyon olarak daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Bakar ve ark., 2015; Faghani ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda FA'nın glomerüler genişleme, intertisyel hücre infiltrasyonu, epitel dökülmesi ve orta derece konjesyon bulgularına yol açtığı görülmüştür. Bu bulguların özellikle FA-ip grubunda FA-inh grubuna göre biraz daha fazla olduğunu gözlemledik. MEL uygulamasının FA'nın neden olduğu böbrek hasarını azalttığı ancak bu azalmanın anlamlı derecede olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak sıçanlar üzerinde yapmış olduğumuz bu çalışmada, biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler sonucunda formaldehite maruz kalan sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında oksidan hasara yol açtığı, ayrıca kan örneklerinde yapılan araştırmalar ile formaldehitin DNA hasarına da neden olduğu görülmüştür.

Bu çalışma formaldehitin inhalasyon ve intraperitoneal olarak iki farklı yolla sıçanlara uygulandığı ve formaldehitin çoklu organlar üzerine ne gibi etkilerinin olduğunu gösterildiği bir çalışmadır. Formaldehit maruziyetinin yol açtığı bu toksik etkilere karşı melatoninin koruyucu rolü incelendiğinde, melatoninin reaktif oksijen türlerinin üretimini baskıladığı, nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği ve dokularda oksidan/antioksidan durumu dengeleyerek oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. Biyokimyasal veriler göz önüne alındığında melatoninin formaldehit maruziyetine bağlı oksidatif doku ve DNA hasarına karşı güçlü bir antioksan etki gösterdiği görülmüştür. Histopatolojik incelemelerde ise formaldehitin oluşturduğu morfolojik değişikliklere karşı etkilerinin minimal olduğu görülmüştür. Bu durum melatoninin

oksidatif strese bağlı doku hasarında biyokimyasal parametrelerde anlamlı bir gerileme göstermesiyle birlikte histolojik düzeyde bu etkilerin yansımalarının daha sonra ortaya çıkabileceği şekilde yorumlanabilir.

Formaldehit oldukça yaygın ve sık kullanım alanına sahip olması sebebiyle gerek iş yeri havasında gerek çevreden kirletici olarak insanların sürekli maruz kaldığı bir kimyasaldır. İş yeri havasında bulunmasına izin verilen miktarı her ne kadar kısıtlanmış olsa da minimal miktarlarda bile uzun süre maruz kalınması sonucunda insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Melatoninin formaldehit toksisitesine karşı kullanışlı bir antioksidan desteği olabileceği ve bu çalışmadan elde edilen sonuçların insanlara ekstrapolore edilebilmesi için uzun süreli melatonin uygulaması içeren ileri çalışmaların yapılması önerilebilir.

8. KAYNAKLAR

Abdulqader SZ, Mustafa IA. The protective role of Vitamin C against formaldehyde induced-hepatotoxicity and nephrotoxicity in male rats. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2014; 9(4): 21-26.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Formaldehyde. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services; 1999.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for formaldehyde (Draft). Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA; 1997.

Akbar-Khanzadeh F, Mlynek JS. Changes in respiratory function after one and three hours of exposure to formaldehyde in non-smoking subjects. *Occup Environ Med.* 1997; 54: 296-300.

Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yay; 1995.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3): 593-615.

Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract.* 2007; 61(5): 835-845.

Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4):4589-4596.

Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89(5): 1114-1122.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360438.

Bakar E, Ulucam E, Cerkezkayabekir A. Investigation of the protective effects of proanthocyanidin and Vitamin E against the toxic effect caused by formaldehyde on the liver tissue. *Environ Toxicol*. 2015; 30(12): 1406-1415.

Barker S, Weinfeld M, Murray D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat Res*. 2005; 589(2): 111-135.

Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3(8-9): 1109-1115.

Beceren A, Akdemir N, Omurtag GZ, Tatlıpınar ME, Sardas S. DNA damage in gasoline station workers caused by occupational exposure to petrol vapour in Turkey. *Acta Pharm Sci*. 2016; 54(1): 53-62.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272(33): 20313-20316.

Bono R, Romanazzi V, Munnia A, Piro S, Allione A, Ricceri F, Guarrera S, Pignata C, Matullo G, Wang P, Giese RW, Peluso M. Malondialdehyde-deoxyguanosine adduct formation in workers of pathology wards: The role of air formaldehyde exposure. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23(8): 1342-1348.

Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*. 1972; 46(2): 639-653.

Brooks SM, Hammad Y, Richards I, Giovonco-Barbas J, Jenkins K. The spectrum of irritant-induced asthma: sudden and not-so sudden onset and the role of allergy. *Chest*. 1998; 113: 42-49.

Cai Y, Lin S, Jin Y, Chen H, Zheng J, Chen B. Investigation of formaldehyde level in marketed marine products. *Strait J Prevent Med*. 2000; 6(5): 32-39.

Campos KK, Dourado VA, Diniz MF, Bezerra FS, Lima WG. Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. *Exp Lung Res.* 2014; 40(4): 164-171.

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* 2000; 87(5): 349-354.

Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck HA. DNA-protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundam Appl Toxicol.* 1994; 23(4): 525-536.

Casini A, Ferrali M, Pompella AS, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986; 123: 520-531.

Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* 2009; 157:1-11.

Checkoway H, Boffetta P, Mundt DJ, Mundt KA. Critical review and synthesis of the epidemiologic evidence on formaldehyde exposure and risk of leukemia and other lymphohematopoietic malignancies. *Cancer Causes Control.* 2012; 23: 1747-1766.

Ciftci G, Aksoy A, Cenesiz S, Sogut MU, Yarim GF, Nisbet C, Guvenc D, Ertekin A. Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde. *Microsc Res Tech.* 2015; 78(5): 391-395.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2 suppl): 637-646.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3): 249-261.

Collins AR. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol.* 2002; 203: 163-177.

Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(12): 1601-1614.

Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, Gaspar J and Teixeira JP. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology.* 2008; 252(1-3): 40-48.

Dai D, Bao Z. Investigative report on formaldehyde occupational workers. *Ind Heal Occup Dis.* 1999; 1: 43-51.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1-2): 23-38.

Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Grandison A, Blake DR, Rampton DS. Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut.* 1992; 33(11): 1467-1472.

Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61: 1-31.

Dix TA, Aikens J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol.* 1993; 6(1): 2-18.

Dreyfuss JH. Occupational formaldehyde exposure linked to increased risk of myeloid leukemia and death. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(3):135-136.

Duong A, Steinmaus C, McHale CM, Vaughan CP, Zhang L. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. *Mutat Res.* 2011; 728(3): 118-138.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1): 81-128.

Faghani M, Kohestani Y, Nasiri E, Moladoust H, Mesbah M. Protective effect of Vitamin E on formaldehyde-induced injuries in the rat kidney. *Gene Cell Tissue*. 2014; 1(3): e21539.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995; 339(1): 37-59.

Fan W, Zhou Y, Jin F, Du L, Jin X. The health effects of pathologists exposed to formaldehyde. *J Occup Environ Med*. 2006; 23(6): 466-468.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18(10): 872-879.

Franklin P, Dingle P, Stick S. Raised exhaled nitric oxide in healthy children is associated with domestic formaldehyde levels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(5): 1757-1759.

Gerin F, Erman H, Erboga M, Sener U, Yilmaz A, Seyhan H, Gurel A. The effects of ferulic acid against oxidative stress and inflammation in formaldehyde-induced hepatotoxicity. *Inflammation*. 2016; 39(4): 1377-1386.

Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazawa K. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(9): 1318-1325.

Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical*. 3rd ed. Research. Florida: CRC Press Inc; 1985, p: 343.

Güleç M, Songur A, Sahin S, Ozen OA, Sarsilmaz M, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products in heart tissue of subacute and subchronic formaldehyde-exposed rats: a preliminary study. *Toxicol Ind Health*. 2006; 22(3): 117-124.

Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. a comprehensive review on clinical applications of comet assay. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(3): GE01-GE05.

Haklar U, Yüksel M, Velioglu A, Türkmen M, Haklar G, Yalçın AS. Oxygen radicals and nitric oxide in chondral and meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 403: 135-142.

Hansen J, Olsen JH. Formaldehyde and cancer morbidity among male employees in Denmark. *Cancer Causes Control.* 1995; 6(4): 354-360.

Heck H, Casanova M, Starr TB. Formaldehyde toxicity-new understanding. *Crit Rev Toxicol.* 1990; 20: 397-426.

Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions: the deoxyguanosine family. *J Biol Chem.* 1996; 271(35): 21177-21186.

Hillegas LM, Griswold DE, Brickson B, Albrightson-Winslow C. Assesment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods.* 1990; 24: 285-295.

Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin.* 2012; 28(4): 499-516.

Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(2): 141-146.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 88: Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. International Agency for Research on Cancer; Lyon, 2006.

Im H, Oh E, Mun J, Khim JY, Lee E, Kang HS, Kim E, Kim H, Won NH, Kim YH, Jung WW, Sul D. Evaluation of toxicological monitoring markers using proteomic analysis in rats exposed to formaldehyde. *J Proteome Res.* 2006; 5(6): 1354-1366.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Formaldehyde. In: Chemical agents and related occupations Volume 100F a review of human carcinogens. IARC

monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon; 2012, p: 401-430.

Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12(4): 2127-2136.

Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, Kawanami K, Kawanami S, Kido R, Ikeda M. Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res.* 2001; 92(1): 9-15.

Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *Gann.* 1984; 75(7): 565-566.

Khamgaonkar MB, Fulare MB. Pulmonary effects of formaldehyde exposure: an environmental-epidemiological study. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 1991; 33(1): 9-13.

Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today.* 2000; 1:8-12.

Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M. Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H₂O₂ system. *Anal Chem.* 1993; 65(13): 1794-1799.

Kim KH, Jahan SA, Lee JT. Exposure to formaldehyde and its potential human health hazards. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2011; 29(4): 277-299.

Kimbell JS, Subramaniam RP, Gross EA, Schlosser PM, Morgan KT. Dosimetry modeling of inhaled formaldehyde: comparisons of local flux predictions in the rat, monkey, and human nasal passages. *Toxicol Sci.* 2001; 64: 100-110.

Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, Chung M-H, Kasai H. Cigarette smoking induce formation of 8-hydroxydeoxy-guanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Radic Res Commun.* 1990; 11(1-3): 23-27.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(5): 598-625.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6): 620-650.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011; 711(1-2): 193-201.

Kulle TJ. Acute odor and irritation response in healthy nonsmokers with formaldehyde exposure. *Inhal Toxicol.* 1993; 5: 323-332.

Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7): 829-838.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc.* 1958; 80(10): 2587.

Li ZG, Chen BC. Effect of low concentration formaldehyde on the health of workers. *Chinese J Ind Med.* 2002; 15(5): 302-303.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology.* 1990; 71(4): 556-559.

Lin D, Guo Y, Yi J, Kuang D, Li X, Deng H, Huang K, Guan L, He Y, Zhang X, Hu D, Zhang Z, Zheng H, Zhang X, McHale CM, Zhang L, Wu T. Occupational exposure to formaldehyde and genetic damage in the peripheral blood lymphocytes of plywood workers. *Occup Health.* 2013; 55(4):284-291.

Liska DJ. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev.* 1998; 3(3): 187-198.

Lu C, Song G, Lin JM. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *Trends Analyt Chem.* 2006; 25(10): 985-995.

Lu K, Collins LB, Ru H, Bermudez E, Swenberg JA. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia. *Toxicol Sci.* 2010; 116(2): 441-451.

Lyapina M, Kisselova-Yaneva A, Krasteva A, Tzekova-Yaneva M, Dencheva-Garova M. Allergic contact dermatitis from formaldehyde exposure. *J of IMAB.* 2012; 18(4): 255-262.

Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761(4): 392-415.

Marczynski B, Rozynek P, Kraus T, Schlosser S, Raithel HJ, Baur X. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany. *Mut Res.* 2000; 468(2): 195-202.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999; 424(1-2): 83-95.

Maruani J. *Molecules in Physics, Chemistry and Biology: Electronic Structure and Chemical Reactivity.* Springer; 1988, p. 73.

Matsuoka T, Takaki A, Ohtaki H and Shioda S: Early changes to oxidative stress levels following exposure to formaldehyde in ICR mice. *J Toxicol Sci.* 2010; 35(5): 721-730.

Meding B, Swanbeck G. Occupational hazard in an industrial city. *Contact Dermatitis.* 1990; 22(1): 13-23.

Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993; 15(2): 59-69.

Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem.* 1982; 257(7): 3747-3753.

Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(5): 900-908.

Monakhova YB, Jendral JA, Lachenmeier DW. The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012; 63: 227-237.

Murta GL, Campos KK, Bandeira AC, Diniz MF, Costa Gde P, Costa DC, Talvani A, Lima WG, Bezerra FS. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. *Environ Pollut.* 2016; 211: 206-213.

National Toxicology Program (NTP) 12th Report on Carcinogens (RoC): Formaldehyde. Washington (DC): National Academies Press (US); 2016.

Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *Mol Med.* 1998; 76: 661-668.

Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2008; 153:6-20.

Nielsen GD, Larsen ST, Wolkoff P. Re-evaluation of the WHO (2010) formaldehyde indoor air quality guideline for cancer risk assessment. *Arch Toxicol.* 2017; 91(1): 35-61.

Olsen JH, Døssing M. Formaldehyde induced symptoms in day care centers. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1982; 43(5): 366-370.

Omurtag GZ, Tozan A, Sehirli AO, Sener G. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res.* 2008; 44(4): 432-438.

Ookhtens M, Kaplowitz N Semin. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Liver Dis.* 1998; 18(4): 313-329.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123(1): 291-298.

Pabst R. Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard? *Anat Rec* 1987; 219(2): 109-112.

Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R and Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994; 55(15): PL271-276.

Pierini D, Bryan NS. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. *Methods Mol Biol.* 2015; 1208: 63-71.

Pinkerton L, Hein M, Stayner L. Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: an update. *Occup Environ Med.* 2004; 61(3): 193-200.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8):1499-1503.

Porter NA. Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In: Richardson T, Finley JW eds. *Chemical Changes in Food During Processing.* Springer US; 1985, p:73-105.

Que Z, Furuno T, Katoh S, Nishino Y. The mathematical model for the formaldehyde emission from wood-based board in room. *Build Environ.* 2007; 42(6): 2321-2324.

Rager JE, Smeester L, Jaspers I, Sexton KG, Fry RC. Epigenetic changes induced by air toxics: Formaldehyde exposure alters miRNA expression profiles in human lung cells. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(4): 494-500.

Raja DS, Sultana B. Potential health hazards for students exposed to formaldehyde in the gross anatomy laboratory. *J Environ Health.* 2012; 74(6): 36-40.

Reuss G, Disteldorf W, Gamer AO, Albrecht Hilt A. Formaldehyde. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 2000.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 36(1): 1-9.

Roffael E. Formaldehyde release from particleboard and other wood based panels. Kuala Lumpur, Malaysia: Forest Research Institute; 1993, p: 281.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, eds. DNA repair mechanisms. New York: Academic Press; 1978, p: 465-468.

Salthammer T, Mentese S, Marutzky R. Formaldehyde in the indoor environment. *Chem Rev.* 2010; 110(4): 2536-2572.

Sardas S, Omurtag GZ, Tozan A, Gul H, Beyoglu D. Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey. *Toxicol Ind Health.* 2010; 26(9): 601-608.

Scheman AJ, Carroll PA, Brown KH, Osburn AH. Formaldehyde-related textile allergy: an update. *Contact Dermatitis.* 1998; 38(6): 332-336.

Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 226(2): 195-202.

SCOEL (Scientific Committee on Occupational Exposure Limits). Formaldehyde. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. 2016.

Sener G, Sehirli O, Tozan A, Velioglu-Ovunc A, Gedik N, Omurtag GZ. Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(4):543-550.

Şener G. Karanlığın hormonu: melatonin. Marmara Ecza Derg. 2010; 14(3): 112-120.

Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, Şener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. J Pediatr Surg. 2015; 50(8):1382-1387.

Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. Occup Environ Med. 2003; 60(6):403-409.

Silva Macedo R, Peres Leal M, Braga TT, Barioni ED, de Oliveira Duro S, Ratto Tempestini Horliana AC, Camara NO, Marcourakis T, Farsky SH, Lino-Dos-Santos-Franco A. Photobiomodulation therapy decreases oxidative stress in the lung tissue after formaldehyde exposure: role of oxidant/antioxidant enzymes. Mediators Inflamm. 2016; 2016: 9303126.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175(1): 184-191.

Smith AE. Formaldehyde. Occup Med. 1992; 42: 83-88.

Sogut S, Songur A, Ozen OA, Ozyurt H and Sarsilmaz M. Does the subacute (4-week) exposure to formaldehyde inhalation lead to oxidant/antioxidant imbalance in rat liver? Eur J Gen Med. 2004; 1:26-32.

Songur A, Ozen OA, Sarsilmaz M. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. Rev Environ Contam Toxicol. 2010; 203: 105-118.

Sorg BA, Hochstatter T. Behavioral sensitization after repeated formaldehyde exposure in rats. Toxicol Ind Health. 1999; 15: 346-355.

Speit G, Merk O. Evaluation of mutagenic effects of formaldehyde *in vitro*: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells. Mutagenesis. 2002; 17(3): 183-187.

Speit G, Schütz P, Högel J, Schmid O. Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells. *Mutagenesis*. 2007; 22(6): 387-394.

Stroup NE, Blair A, Erikson GE. Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 77: 1217-1224.

Strubelt O, Younes M, Pentz R, Kuhnel W. Mechanistic study on formaldehyde-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1989; 27: 351-366.

Sul D, Kim H, Oh E, Phark S, Cho E, Choi S, Kang HS, Kim EM, Hwang KW, Jung WW. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde. *Arch Toxicol*. 2007; 81(8): 589-597.

Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 562860.

Tan DX, Manchester LC, Sanchez-Barcelo E, Mediavilla MD, Reiter RJ. Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*. 2010; 8(3): 162-167.

Tang M, Xie Y, Yi Y, Wang W. Effects of formaldehyde on germ cells of male mice. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003; 32(6): 544-548.

Teng S, Beard K, Pourahmad J, Moridani M, Easson E, Poon R, O'Brien PJ. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2001; 130-132(1-3): 285-296.

Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012; 16(3): 400-405.

Tulpule K, Hohnholt MC, Dringen R. Formaldehyde metabolism and formaldehyde-induced stimulation of lactate production and glutathione export in cultured neurons. *J Neurochem*. 2013; 125: 260-272.

Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? *J Neurochem.* 2013; 127(1): 7-21.

Uçmakli E, Armutçu F, Öztürk A. The effects of formaldehyde intoxication on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide level in the liver tissue of rats. *Turk J Med Sci.* 2013; 43: 52-56.

Walker JF. Formaldehyde. 3rd ed. New York: Reinhold; 1964, p: 701.

Wang W, Wang Q, Zhou Y. Effects of low concentration of formaldehyde on respiratory system and pulmonary function of workers. *Chinese J Ind Med.* 2000; 13(2): 115-116.

Wang Z, Liu J, Sun W. Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy. *Life Sci.* 2013; 93(8): 352-358.

Weisskopf MG, Morozova N, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80: 558-561.

WHO Air quality guidelines for Europe. Chapter 5.8: Formaldehyde. 2nd. ed. World Health Organization European Series; 2000, p: 87-91.

WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Geneva: World Health Organization; 2010.

Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 328-331.

Yang GY, Taboada S, Liao J. Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue. *Methods Mol Biol.* 2009; 512: 119-156.

Ye X, Ji Z, Wei C, McHale CM, Ding S, Thomas R, Yang X, Zhang L: Inhaled formaldehyde induces DNA-protein crosslinks and oxidative stress in bone marrow and other distant organs of exposed mice. *Environ Mol Mutagen.* 2013; 54(9): 705-718.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011; 111(10): 5944-5972.

Zararsiz I, Kus I, Akpolat N, Songur A, Ogeturk M, Sarsilmaz M. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24(3): 237-244.

Zhang DZ, Zhang FL, Jin SY, Liu YH. Investigation on the health of workers occupationally exposed to low level of formaldehyde. *Chinese J Ind Hyg Occup Dis.* 1999; 17(5): 13-14.

Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Lee NH, You HJ, Hyun JW. Triphlorethol-a improves the non-homologous end joining and base-excision repair capacity impaired by formaldehyde. *J Toxicol Environ Health A.* 2011; 74(12):811-821.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Sezgin	Soyadı	Aydemir
Doğum	Devrek-Zonguldak	Doğum Tarihi	12.08.1986
Uyruğu	T.C.	Tel	2163364766 (1139)
E-mail	szgnaydemir@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üni./ Sağ. Bil. Enst./ Farmasötik Toksikoloji ABD	
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üni./ Fen Bil. Enst./ Biyokimya ABD	2012
Lisans	Karadeniz Teknik Üni./ Fen-Edebiyat Fak./ Kimya	2009
Lise	Gökçebey Ç.P.L.	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Arş. Gör.	Marmara Üniversitesi SHMYO	2013-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	75							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Ayça Aktaş Karaçelik, Murat Küçük, Zeynep İskefiyeli, Sezgin Aydemir, Seppe De Smet, Bram Miserez, Patrick Sandra, Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods. *Food Chem.* 2015; 175: 106-114.

A2. Aydemir S, Akgun SG, Beceren A, Yuksel M, Kumas M, Erdogan N, Sardas S, Omurtag GZ. Melatonin ameliorates oxidative DNA damage and protects against formaldehyde-induced oxidative stress in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2017; 10(4): 6250-6261.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	19.2015.mar	Çalışma: Doktora
	PROJE ADI	Sıçanlarda Formaldehitin Oluşturduğu Toksik Etkiye Karşı Melatonin'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr.Gülden Z. OMURTAG	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER	
	DESTEKLEYİCİ	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih	06.03.2015
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırmaya başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile İlişkisi		Toplantıya katılım		İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof. Dr. İsmet ALIÇAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Rezzan AKER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var	Yok	Evet	Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Bilhur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	